

## B-23 アドリアマイシン心筋症のミトコンドリア障害

研究協力者：小倉良平（久留米大学 医化学）

共同研究者：日高敏博（久留米大学 医化学）

目的：ライ症候群患者の生検筋ミトコンドリアには変性・膨潤等の形態変化が報告されている。一方，抗癌剤であるアドリアマイシン(ADR)には副作用として心筋症があり，心筋ミトコンドリア障害が報告されている。我々の教室では心筋症発生の機序解明のためラットに急性毒性を誘起させて心筋ミトコンドリアへの影響を観察してきた。本研究をライ症候群のモデル実験として報告し，解明の一序としたい。

材料および方法：体重200g前後のウィスター系ラットに体重あたりkgあたり4mgのADRを連日腹腔内に注射した。7日目に心筋よりミトコンドリアを，アルカリproteinase(Nagarse)を用いる遠心分画法により分離した<sup>1)</sup>。分離したミトコンドリアについて，形態変化を電顕的に観察し，生化学的変化を過酸化脂質，呼吸鎖機能，CoQ同族体のHPLC分析，ATP定量等の面より観察した。

成績：1)電顕的観察：ADR投与をうけた心筋ミトコンドリアは図1に示す如く全体的に大きく形態に不整が認められ，クリステの内腔も拡大し，マトリックスの狭小が認められる<sup>2)</sup>。(図1)

2)過酸化脂質：TBA反応による過酸化脂質はタンパク1mgあたりのmalondi-aldehydeのnanomolesで表示して下記の如く顕著な増加が認められた<sup>2)</sup>。

|       |             |           |
|-------|-------------|-----------|
| 対 照   | 0.95 ± 0.08 | nanomoles |
| ADR処理 | 1.92 ± 0.14 |           |

3)呼吸鎖機能：コハク酸を呼吸基質に呼吸鎖機能を観察した。表1に示す如くstate 3の減少による呼吸調節率(RCR)の低下があり，DNPの添加による呼吸開放が顕著でなく，ADRの投与で呼吸鎖に脱共役を発現した<sup>3)</sup>。

また，コハク酸とADPの存在下で生成するATP量をルシフェラーゼ法により測定したが，ADR投与のミトコンドリアではタンパクmg当たり次の如く低下していた。ADRの投与は呼吸鎖機能の障害を介してATPエネルギーの枯渇を生じていた。(表1)

|       |             |           |
|-------|-------------|-----------|
| 対 照   | 2.86 ± 0.83 | nanomoles |
| ADR処理 | 1.54 ± 0.34 |           |

4)CoQ同族体：Lichrosorb RP-18カラムによる高速液体クロマトグラフによる分析でCoQ<sub>7,8,9,10</sub>同族体を定量とした。心筋ミトコンドリアの総CoQ量はタンパクmg当たり6.16 ± 0.79 μgであり，同族体の分布ではCoQ<sub>9</sub>が90.5%を占めていた(ヒトではCoQ<sub>10</sub>)。ADR投与群では表2に示す如く電子伝達系の構成成分として重要なCoQ，特にCoQ<sub>10</sub>の枯渇を来し，これがADR

による呼吸鎖の機能低下の一因と考えられた<sup>2,3)</sup>。(表2)

5)リボフラビン:心筋ミトコンドリアからリボフラビンを抽出し、Lichrosorb RP-2カラムによる高速液体クロマトグラフにより分析を行なった。表3に示す如く、FADが約83%を占めているが、ADRの投与ではFAD, FMNの減少を認めた<sup>5)</sup>。(表3)

考察: ADRをラットの腹腔内に投与して急性毒性を生ぜじめると、心筋ミトコンドリアに顕著な膨化を始め形態的異常が認められ、機能的には呼吸鎖機能障害からATP生成量の低下をきたし、種々の障害が発現した。その成因としてADRの一電子還元によるセミキノン生成を介する過酸化脂質の生成、または鉄とADRとの複合体形成による過酸化脂質の生成が考えられている。いずれによっても膜の構造・機能に障害が及ぶ事が容易に考えられる。過酸化脂質の増加はリボフラビンの消費を高め、表3にもみる如くFAD量の低下と共にこれを補欠族とするグルタチオン還元酵素の活性低下を来たし、これらが一層過酸化脂質の貯蓄をきたしてくる。一方ADRにはCoQの生合成低下が報告されており、呼吸鎖障害と共に抗酸化機能の低下と相俟って過酸化脂質を増加させるものと考えられる。ミトコンドリア膜はタンパク質/脂質過酸化が高く、容易に構造・機能タンパクに障害を及ぼす事が考えられる。我々の教室では呼吸鎖機能障害と共に、膜の流動性やCa<sup>2+</sup>ホメオスターシス<sup>6)</sup>などに障害のある事も認められている。そこで我々の教室では顕著に低下したCoQやリボフラビンをADRと共に投与して、その影響を観察した。CoQ<sub>10</sub>は体重Kgあたり25mgを、リボフラビンはリボフラビン酪酸エステルとして20mgをADRと共に投与した。その結果、電顕所見では構造に障害を有するミトコンドリアが数の上で減少しており、膨化も軽度であった。過酸化脂質は正常域にとどまり、呼吸鎖機能も表1に示す如く回復し、ATP生成量も1.85±0.55 nanomolesとATPの枯渇が減少していた。CoQ<sub>10</sub>, FADの量も表2, 3に示す如く正常に復していた<sup>2,3,5,6,7)</sup>。この如くADRによるミトコンドリア障害を軽度に止どめ得た。

まとめ: アドリアマイシンの腹腔内投与によりラット心筋ミトコンドリアにはライ症候群と類似した膨潤変性が認められ、機能障害をも伴った。これに対してCoQ<sub>10</sub>やビタミンB<sub>2</sub>の併用投与は心筋ミトコンドリア障害を軽減する上に極めて有用であった。

#### 文献

1. 原 洋, 香月 司, 小野辰也, 小倉良平, 森園隆昭, 村上正浩: Ultra-Turraxとprotease併用による心筋ミトコンドリアの分離。久留米医学会誌, 43, 333-340, 1980.
2. 外山博之, 抗癌剤アドリアマシンの心筋毒性に対するユビキノンの投与効果に関する実験的研究。久留米医学会誌, 42, 603-625, 1979.

3. Ogura, R., Toyama, H., Shimada, T. and Murakami, M.: The role of ubiquinone in preventing adriamycin induced mitochondrial disorders in rat heart. *J. Appl. Biochem.*, 1, 325-335, 1979.
4. 尹 承富: ミトコンドリアレベルの抗癌剤adriamycinの臓器障害特異性に関する研究. 久留米医学会誌, 45, 993-1008, 1982.
5. 日野雄二: アドリアマイシン投与時のラット心筋ミトコンドリアGSH peroxidase-GSH reductaseの動態とビタミンB<sub>2</sub>酪酸エステルの保護効果. 久留米医学会誌, 47, 1319-1333, 1984.
6. 鍵山明弘: 心筋ミトコンドリア膜のカルシウム動態に対するadriamycinの影響. 久留米医学会誌, 48, 1-13, 1985.
7. 香月 司, 尹 承富, 小倉良平: アドリアマイシンによる心筋ミトコンドリア障害に対するビタミンB<sub>2</sub>酪酸エステルとユビキノンの同時併用投与効果. *ビタミン*, 55, 517-522, 1981.

表1. ラット心筋ミトコンドリアの呼吸鎖機能

|                                 | oxygen consumption                    |          | RCR        | ADP/O      |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------|------------|------------|
|                                 | (n atoms O/mg protein/min)<br>state 3 | state 4  |            |            |
| 対 照                             | 220.9±5.6                             | 41.0±4.9 | 5.46±0.80  | 1.72±0.10  |
| ADR                             | 182.2±15.1*                           | 45.2±3.3 | 4.03±0.35* | 1.52±0.12* |
| ADR+リボフラビン                      |                                       |          |            |            |
| +C <sub>o</sub> Q <sub>10</sub> | 210.6±19.2                            | 42.4±2.6 | 5.01±0.33  | 1.62±0.09  |
| リボフラビン                          |                                       |          |            |            |
| +C <sub>o</sub> Q <sub>10</sub> | 214.7±9.3                             | 40.6±3.3 | 5.31±0.47  | 0.65±0.09  |

values are mean±S.D.

\* significantly different from control ( $p < 0.01$ )

ADR: 体重Kgあたりアドリアマイシン4mg連日腹腔内6日間

リボフラビン: 体重kgあたりリボフラビン酪酸エステル20mg腹腔内6日間

C<sub>o</sub>Q<sub>10</sub>: 体重kgあたりユビキノンの25mg腹腔内投与6日間

表2. ラット心筋ミトコンドリアのCoQ同族体

|                    | CoQ content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) |                  |                   |                         |
|--------------------|--|------------------|-------------------|-------------------------|
|                    | CoQ <sub>8</sub>                               | CoQ <sub>9</sub> | CoQ <sub>10</sub> | total CoQ <sub>10</sub> |
| 対 照                | 0.56 $\pm$ 0.08                                | 9.18 $\pm$ 0.32  | 0.50 $\pm$ 0.05   | 10.31 $\pm$ 0.34        |
| A D R              | 0.52 $\pm$ 0.04                                | 9.16 $\pm$ 0.15  | 0.37 $\pm$ 0.02*  | 10.13 $\pm$ 0.1         |
| ADR+リボフラビン         |  |                  |                   |                         |
| +CoQ <sub>10</sub> | 0.55 $\pm$ 0.03                                | 9.23 $\pm$ 0.07  | 0.63 $\pm$ 0.05*  | 10.48 $\pm$ 0.18        |
| リボフラビン             |  |                  |                   |                         |
| +CoQ <sub>10</sub> | 0.49 $\pm$ 0.04                                | 9.28 $\pm$ 0.23  | 0.69 $\pm$ 0.04*  | 10.57 $\pm$ 0.26        |

values are mean $\pm$ S.D.

significantl different from control ( $p < 0.01$ )

A D R: 体重kgあたりアドリアマイシン 4mg 連日腹腔内 6日間

リボフラビン: 体重kgあたりリボフラビン酪酸エステル 20mg 腹腔内 6日間

CoQ<sub>10</sub>: 体重kgあたりユビキノン 25mg 腹腔内投与 6日間

表3. ラット心筋ミトコンドリアのリボフラビン

|        | FAD              | FMN             | free riboflavin   | グルタチオン<br>還元酵素   |
|--------|------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| 対 照    | 0.67 $\pm$ 0.15  | 0.13 $\pm$ 0.13 | 0.008 $\pm$ 0.004 | 4.93 $\pm$ 0.38  |
| A D R  | 0.43 $\pm$ 0.11* | 0.06 $\pm$ 0.05 | 0.007 $\pm$ 0.003 | 3.68 $\pm$ 0.69* |
| ADR +  |                  |                 |                   |                  |
| リボフラビン | 0.72 $\pm$ 0.13  | 0.24 $\pm$ 0.15 | 0.001 $\pm$ 0.002 | 8.86 $\pm$ 2.66  |
| リボフラビン |                  |                 |                   |                  |
| リボフラビン | 0.89 $\pm$ 0.08  | 0.08 $\pm$ 0.05 | 0.003 $\pm$ 0.001 | 10.6 $\pm$ 1.0   |

nanomoles per mg protein \* $p < 0.05$

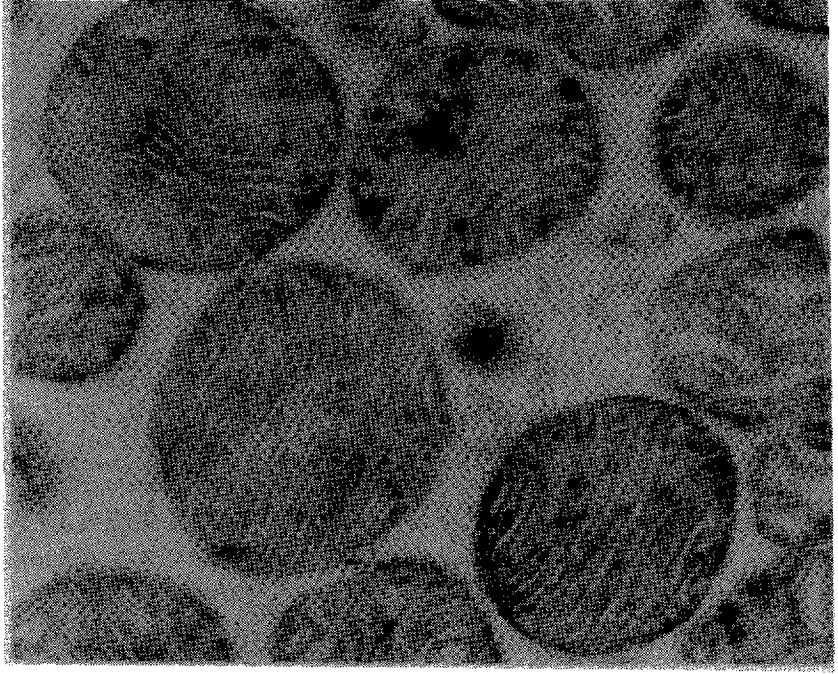
A D R: 体重kgあたりアドリアマシ 4mg 連日腹腔内 6日間

リボフラビン: 体重kgあたりリボフラビン酪酸エステル 20mg 腹腔内 6日間

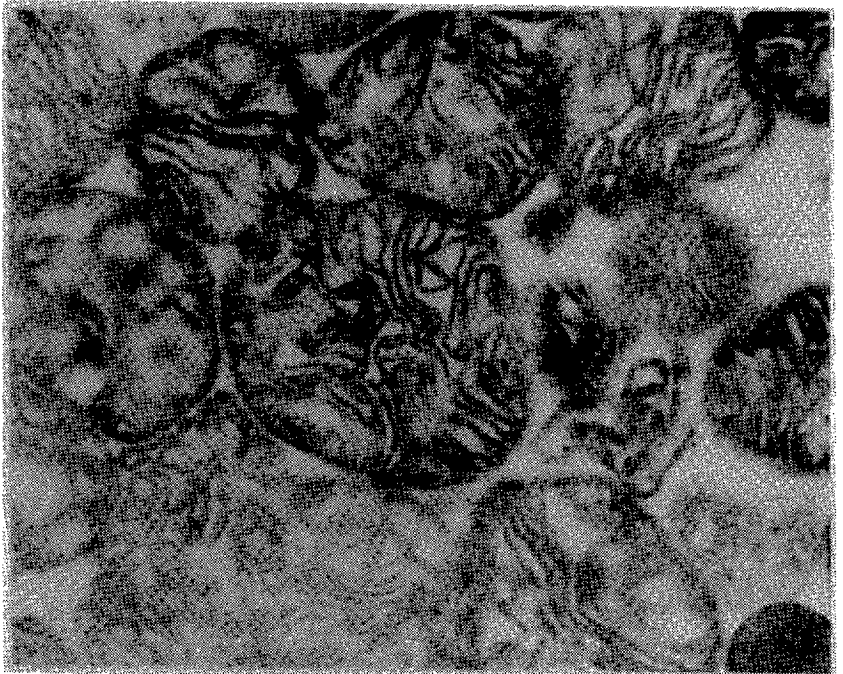


図 1

対  
照



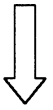
アドリアマイシン  
処理





## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



目的:ライ症候群患者の生検筋ミトコンドリアには変性・膨潤等の形態変化が報告されている。一方,抗癌剤であるアドリアマイシン(ADR)には副作用として心筋症があり・心筋ミトコンドリア障害が報告されている。我々の教室では心筋症発生の機序解明のためラットに急性毒性を誘起させて心筋ミトコンドリアへの影響を観察してきた。本研究をライ症候群のモデル実験として報告し,解明の一序としたい。