

ラット肝ミトコンドリアに対する種々抗結核剤の影響 (第1報)

和 知 勤・井 上 豊 治
内 能 美 義 仁・伊 藤 三 千 穂

国立療養所近畿中央病院貝塚分院

受付 昭和43年5月24日

EFFECTS OF ANTITUBERCULOUS DRUGS ON THE
OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN RAT
LIVER MITOCHONDRIA (Report I)*

Tsutomu WACHI, Bunji INOUE, Yoshihito UCHINOMI and Michiho ITO

(Received for publication May 24, 1968)

From the viewpoint of host-drug relationship, studies were made about the effect of antituberculous drugs on oxidative phosphorylation and morphological change of mitochondria. As antituberculous drugs, INH, PAS, SM and KM etc. were employed.

The mitochondria were isolated from the liver of adult male rats according to the modified method of Hogeboom and Schneider. Using the apparatus specially devised by Utsumi, effects of antituberculous drugs on various factors, such as, respiratory control (R.C.=State 3/State 4), oxidative phosphorylation (ADP/O), oxidation-reduction of pyridine nucleotides and morphological structure of mitochondria were observed. Also ATP-Pi exchange reaction and ATPase activity were measured respectively by Hagihara's method and Takahashi's method. The following results were obtained.

The changes of R.C caused by the addition of the drugs were remarkable in KM (160 mcg/ml), VM (160 mcg/ml), Tb₁ (0.42 mM) and SM (160 mcg/ml), the value of which being 1.1, 1.3, 1.7 and 1.9 respectively in comparison with that of the control (2.3 to 3.0). On the other hand with respect to ADP/O, KM, VM and SM showed inhibitory effect, the value of which being 1.1 to 1.4 in comparison with that of the control (1.7 to 2.0), and both KM and VM showed parallel depression in R.C and ADP/O as the concentration of the drugs increased.

Mitochondrial pyridine nucleotides were reduced by the addition of PAS, but were oxidized in various extent by other antituberculous drugs.

The morphological changes of mitochondria measured by the light scattering were not remarkable by these drugs, although most of them caused slight swelling of mitochondria.

All the drugs except CS and PZA showed inhibitory effect on ATP-Pi exchange reaction in mitochondria. The extent of inhibition in contrast with the control was 40 to 55% with Tb₁ (0.4 mg/ml), VM (0.8 mg/ml) and 1314 TH (2.5×10^{-3} M) and 10 to 33% with PAS (5×10^{-3} M), SM (0.8 mg/ml), SIX (0.16 mg/ml), KM (0.8 mg/ml) and disoxyl (0.16 mg/ml).

The latent ATPase activity of mitochondria was stimulated with VM, KM, PAS, SM and SIX. In the case of VM, KM and SM, they induced linear increase of the activity in proportion to the concentration of the drugs. On the other hand, the concentration of PAS and

* From Kaizuka Branch, National Sanatorium Kinki Central Hospital, 1587 Hashimoto, Kaizuka City, Osaka, Japan.

others had no effect on the ATPase activity.

From the results mentioned above, it is suggested that VM, KM and SM act as true uncouplers on the oxidative phosphorylation of mitochondria. The uncoupling activity of these drugs was following order of magnitude; $VM > KM > SM$. Although the action of VM and KM to mitochondria are similar to that of 2,4-DNP, the concentration of these drugs were much higher than that of 2,4-DNP.

Tb₁ and 1314 TH probably interact to the mitochondrial energy transfer reaction although the mechanism is still obscure, because the ATP-Pi exchange reaction of mitochondria was inhibited without inhibition of ADP/O ratio by these drugs.

緒言

抗結核剤の作用機作については数多くの研究がなされているが、それらのうちで抗結核剤による副作用の発現機序を宿主の細胞ないしは細胞顆粒レベルで追究した結果についての報告は比較的少ないようである。

いうまでもなく好氣的細胞の生活または生育に必要なエネルギーは、その大部分がミトコンドリアで行なわれる酸化の磷酸化反応によつて供給されるものであるが、この反応は複雑かつ不安定であり、種々の抗生物質をはじめ多数の物質により容易に阻害を受けることが知られている¹⁾²⁾。したがつて今日使用されている抗結核剤の中にもこの系になんらかの作用を及ぼすものがあることは容易に想像されることであり、このことが副作用発現の一因をなしている可能性も考えられる。

われわれはこのような観点から、INHをはじめ各種の抗結核剤が、ラット肝ミトコンドリアにおける酸化の磷酸化反応およびこれに伴う諸変化に対していかなる作用を及ぼすかを調べ若干の知見を得ることができたので報告する。

材料および方法

I. 実験動物

実験動物としては、体重 150~200 g の Wister 系雄ラットを用いた。

II. 肝ミトコンドリアの分離法

肝ミトコンドリアの分離は Hogeboom-Schneider³⁾ の方法を用いた。すなわち、ラットをあらかじめ一夜絶食させ、断頭脱血後直ちに開腹し取り出した肝臓を秤量した後、細かく切断して氷冷した蔗糖液 (蔗糖 0.25 M, トリスマミノメタン 5 mM (pH 7.4), EDTA 0.1 mM) に浸した。この材料より表1のごとくにしてミトコンドリアを分離した。分離したミトコンドリアは 2 g 組織当りを 1 ml の蔗糖液 (蔗糖 0.25 M, トリスマミノメタン 5 mM, pH 7.4) に懸濁して実験に用いた。

III. 薬剤および試薬

本実験では抗結核剤として SM (Dihydrostreptomycin sulfate, 武田薬品工業), KM (Kanamycin sulfate, 万有製薬), VM (Viomycin sulfate, Parke, Davis Co.), CS (Cyclomycin, 塩野義製薬), INH (Isonicotinic acid hydrazide, 武田薬品工業), PAS (Sodium 2-hydroxy-4-aminobenzoate, 第一製薬), PZA (Pyrazinamide, 三共), 1314 TH (2-ethylthioisonicotinamide, 第一製薬), Tb₁ (Thioacetazone, 中外製薬), SIX (Sulfisoxazol, 塩野義製薬) および Disoxyl (明治乳業) を使用した。ATP (Adenosine triphosphate) および ADP (Adenosine diphosphate) はいずれもシグマ社のものを、コハク酸ナトリウムおよびオレイン酸ナトリウムは和光純薬工業のものをを用いた。

Table 1. The Isolation of Liver Mitochondria in Isotonic Sucrose

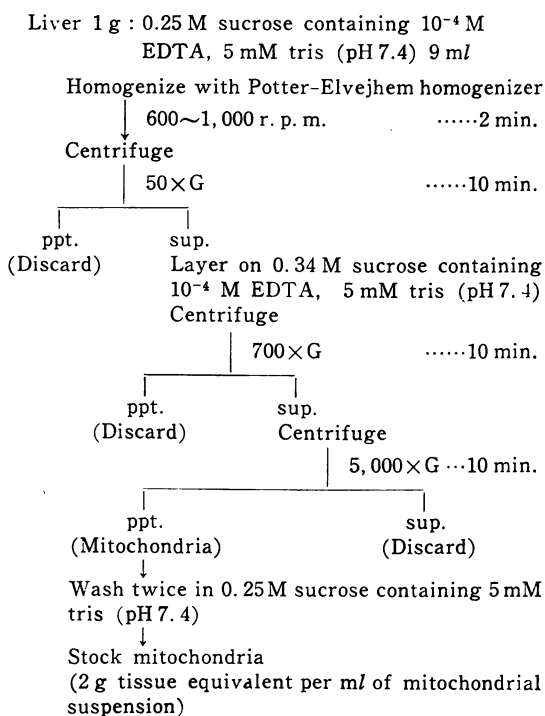
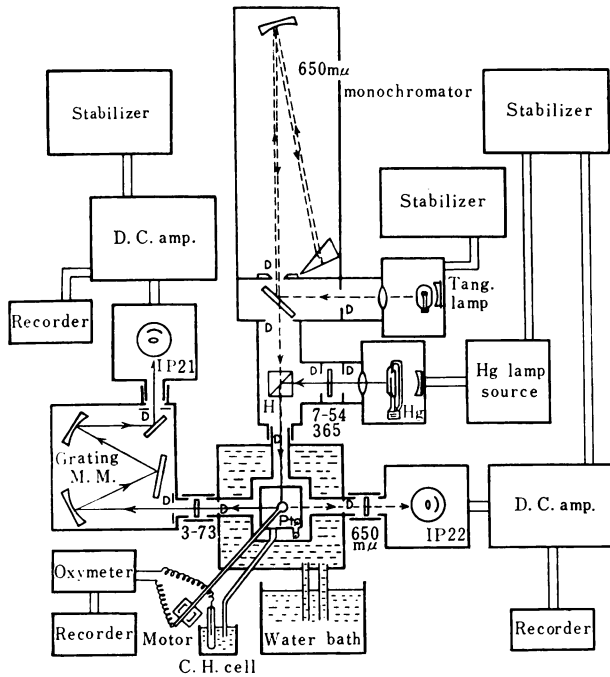


Fig. 1. Outline of the Apparatus



Tang. lamp: tangsten lamp, monochromator: prism monochromator, D.C. amp.: D.C. amplifier, H: half mirror, 650 m μ : 650 m μ filter, 1P 22: photomultiplier, recorder: autorecorder, Hg lamp source: source of mercury lamp, Hg: mercury lamp, 7-54: filter of Corning No 9863, 365: Hitachi filter 365 m μ , 3-73: filter of Corning No 3389, grating M.M.: grating mirror monochromator, 1P 21: photomultiplier, Pt: rotating platinum electrode, motor: synchronous motor, C.H. cell: calomel half cell, oxymeter: oxymeter constructed by the method of Hagihara, D: diaphragm.

IV. ミトコンドリアの呼吸および形態変化の同時測定法

ミトコンドリアの呼吸および形態の変化は内海⁴⁾の考案した装置を用いて測定した。装置の概略は図1に示すごとく、半密閉型の回転白金電極によるポーラログラフィックなオキシメーター⁵⁾、ミトコンドリアの膨潤収縮の度合を測定するための90°光散乱装置およびピリジンスクレオタイド(PN)の酸化還元状態を測定するための蛍光分光装置の3部分より成るものである。

測定に際しては蔗糖 0.05 M, KCl 0.02 M, 燐酸カリウム 0.02 M (pH 7.4), MgCl 1 mM, EDTA 0.1 mM より成る反応液 2 ml をキューベットにとり、これにミトコンドリア懸濁液 0.1 ml を加え一定時間後にコハク酸 8 mM, 各濃度の薬剤溶液, ADP 100 μ M を順次添加して呼吸活性の変動, 波長 650 m μ の 90° 光散乱の変化によるミトコンドリアの形態変化および波長 650 m μ の励起光による蛍光の変化で PN の酸化還元状態を同時に連続的に記録測定した。

V ATP-Pi 交換反応測定法

ATP-Pi 交換反応の測定は萩原⁶⁾の方法によつた。

すなわち蔗糖 0.05 M, KCl 0.02 M, トリシアミノメタン 5 mM (pH 7.4), EDTA 0.1 mM より成る反応液 1.3 ml をあらかじめ試験管に入れ、これに各濃度の薬剤溶液 0.2 ml, 30 mM ATP 0.2 ml, 30 mM ³²P 0.2 ml およびミトコンドリア懸濁液 0.1 ml を加えて 20°C で 15 分間振盪した後この 0.5 ml をとり、別に氷冷しておいた 0.9 M HClO₄ と 0.6 M NaSO₄ より成る反応液 1 ml を含む試験管に移した。ついで 4% モリブデン酸アンモニウム溶液 0.5 容, メタノール 0.4 容, ヘキサノール 0.012 容および蒸留水 0.15 容より成る反応液 1.5 ml を加えて混和, 数分後シリコナイズした celite のカラムに注入し、一夜氷室中に放置した後流出液 0.5 ml をとつて乾燥, ガイガー カウンター (日本無線医学研究所 TDC 1 型) でカウントを測定した。

VI. ATPase 活性測定法

ATPase 活性の測定は高橋⁷⁾の方法によつた。すなわち蔗糖 0.05 M, KCl 0.02 M, トリシアミノメタン 5 mM (pH 7.4), EDTA 0.1 mM より成る反応液 1.5 ml を小遠沈管にとつてあらかじめ氷冷しておき、これに薬剤溶液 0.2 ml, 30 mM ATP 0.2 ml, ミトコンドリア懸濁液 0.1 ml を添加し、25°C で 15 分間振盪した後 0°C に急冷, 別に氷冷しておいた 24% HClO₄ 1 ml を加えた。これをよく振盪して 10 分間放置した後遠沈, 上清を被検液として用いた。

共栓付きの試験管に 1.5 N 硫酸 1 ml, 2% モリブデン酸アンモニウム溶液 1 ml およびイソブタノール 4 ml をとつてあらかじめ氷冷しておき、これに被検液 1 ml をとつて 10 秒間激しく振盪, しばらく放置した後ブタノール層 1 ml を別の試験管に移し, 0.5% アスコルビン酸 2 ml, エタノール 1 ml を加えて混和, 37°C の温水中に 45 分間放置した後室温に冷却し, 呈色したものを日立分光光度計 DPU 2 型を用いて波長 700 m μ における吸収を測定した。

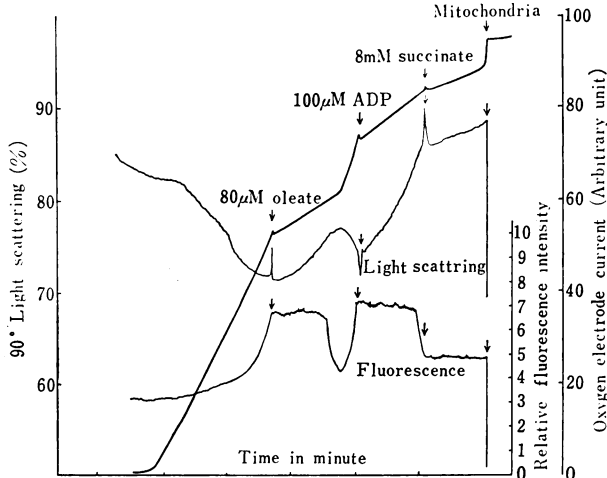
VII. 蛋白質定量法

ミトコンドリアの蛋白質の定量は一定量のミトコンドリア懸濁液を濃硫酸中で湿性灰化した後蒸留水で希釈し, ネスラーの試薬⁸⁾を加えて呈色したものをベックマン分光光度計 B 型を用いて, 波長 430 m μ における吸収を測定し定量した。

結 果

I. ラット肝ミトコンドリアの呼吸および形態変化に対する影響

Fig. 2. Effect of Na-succinate, ADP and Na-oleate on the Oxygen Consumption, Swelling-Shrinkage and Oxidation-Reduction of Pyridine Nucleotides of Rat Liver Mitochondria



The medium contained; 0.05 M sucrose, 0.02 M KCl, 0.02 M K-phosphate (pH 7.4), 1 mM MgCl₂ and 0.1 mM EDTA. Temperature; 25°C.

1) 無傷ラット肝ミトコンドリアにおける呼吸様式、膨潤収縮およびPNの変化についての検討

図2は無傷のミトコンドリアにおける呼吸、膨潤収縮およびPNの変化を前記の同時測定装置を用いて測定したものである。

まず呼吸については、キューベットの反応液にミトコンドリアを加えると、この中はほとんど無酸素状態になっているため反応液中の酸素濃度が希釈される結果、わずかではあるが急激な低下を示し、その後固在基質による呼吸のため緩やかな酸素消費がみられる。ついで8 mMのコハク酸を加えると呼吸速度は増大し(State 4⁹⁾), 100 μMのADP添加によつてその速度はさらに著しくなる(State 3⁹⁾) が、ADPが磷酸化されてしまうと呼吸速度は再びState 4のレベルにもどる。この状態で典型的な共役阻害剤であるオレイン酸80 μMを加えると呼吸の解放が起こりその速度はState 3と同程度を示すが、ここでADPを添加しても呼吸速度の変化はみられず無酸素状態になつて0となる。

一方ミトコンドリアの形態変化については、はじめ反応液中で緩やかな膨潤を示しているがコハク酸の添加(State 4)で著しく膨化し、さらにADPの添加によつて呼吸様式ではState 3の状態を示すのに対応してミトコンドリアは急激な収縮を示す。しかしADPが磷酸化された後再び膨化が起こり、オレイン酸の添加あるいは無酸素の状態で収縮はじめる。

PNによる蛍光の変化については、はじめ反応液中ではほとんど変化はみられないが、コハク酸の添加に伴い高エネルギー中間体の蓄積が起こり、そのエネルギーによりコハク酸からPNへと電子の逆流が起こる結果PN

の還元がみられる。ついでADPの添加による呼吸の増大(State 3)ですべてのエネルギーはATP合成に利用されPNは急激に酸化されるが、ADPが磷酸化されてしまうと再び呼吸エネルギーはPNの還元利用される。この状態でオレイン酸を加えると酸化的磷酸化は脱共役され、エネルギー転換反応の阻害により呼吸の解放が起こり、呼吸の増大にもかかわらずPNの酸化がみられる。

2) ラット肝ミトコンドリアの呼吸、膨潤収縮およびPNの変化に対する各種抗結核剤の影響

上記のごとき呼吸様式あるいは形態変化を示すミトコンドリアにコハク酸を添加した後、各種の抗結核剤、ついでADPを添加した場合の呼吸調節率(R·C=State 3/State 4)、酸化的磷酸化能(ADP/O)、ミトコンドリアの膨潤収縮およびPNの酸化還元状態を測定し、表2のごとき結果を得た。

呼吸調節についてみると、薬剤無添加の対照ではR·C=2.3~3.0であつた。これに対し終末濃度160 mcg/ml KM, 160 mcg/ml VM, 0.42 mM Tb₁および160 mcg/ml SMが著明な阻害効果を示し、1 mM 1314 THでもわずかな阻害が認められた。INH, PAS, PZA, SIXおよびCSでは、それぞれ20 mM, 20 mM, 20 mM, 2 mMおよび160 mcg/mlの濃度では影響は認められなかつた。

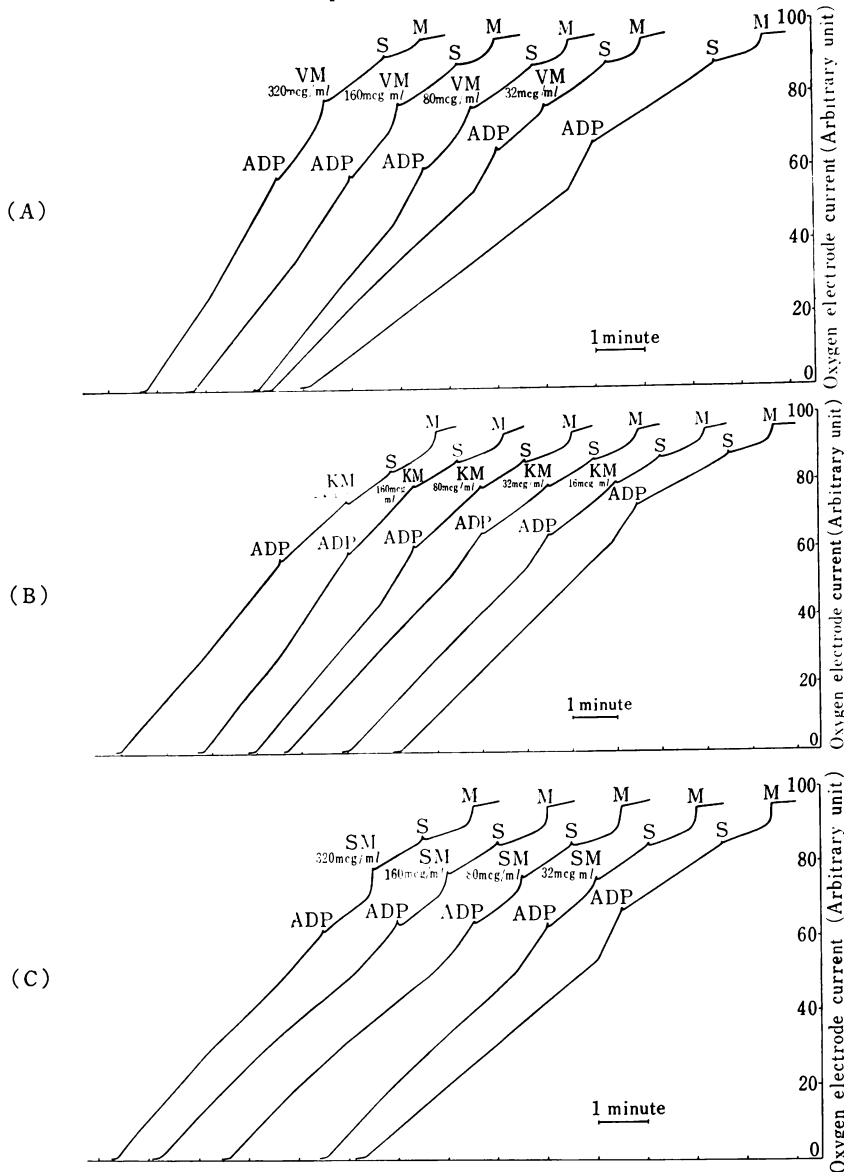
磷酸化能については、対照のADP/O=1.7~2.0に対してKM, VMおよびSMが著しい阻害を示したのみで、INH, PZA, PAS, 1314 TH, SIX, Tb₁およびCSでは影響を認めなかつた。

一方、形態変化については、1314 TH, Tb₁およびKMに膨潤効果がみられ、その他の薬剤についてもSIX,

Table 2. Effects of Antituberculous Drugs on Rat Liver Mitochondria

Drugs	Final concentration	State 3 / State 4	ADP / O	NADH Oxi. + Red. -	Swel. + Cont. -
Control		2.3~3.0	1.7~2.0		
INH	20 mM	2.7	1.8	+	+
PAS	20 mM	2.3	2.0	-	+
PZA	20 mM	2.8	1.7	+	+
1314Th	1 mM	2.1	2.0	+	+
SIX	2 mM	2.4	2.0	+	±
Tb ₁	0.42 mM	1.7	2.0	+	+
SM	160mcg/ml	1.9	1.4	+	+
VM	160mcg/ml	1.3	1.2	+	+
KM	160mcg/ml	1.1	1.1	+	+
CS	160mcg/ml	2.3	1.8	±	±

Fig. 3. Effects of VM, KM and SM on the Oxygen Consumption of Rat Liver Mitochondria



The medium contained; 0.05 M sucrose, 0.02 M KCl, 0.02 M K-phosphate (pH 7.4) and 0.1 mM EDTA. Temperature; 25°C. M; mitochondria, S; 8 mM Na-succinate, ADP; 100 μM.

CS 以外はわずかながら同じ傾向がみられた。

また PN の変化についても PAS が蛍光の増加を示したほかはいずれも減少をきたし、エネルギー転換反応の阻害を示唆した。

II. ラット肝ミトコンドリアの呼吸調節および磷酸化能に対する VM, KM および SM の濃度変化による影響

前記の実験結果から、最も著明な影響のあつた VM, KM および SM について、濃度依存性を呼吸調節および磷酸化能に対する作用から調べた。測定は前記の内海

らの装置のうち、オキシメーター部分のみを用いて行なつた。

図3の(A), (B)および(C)はそれぞれ VM, KM および SM についての成績であり、表3はそれらを総合したものである。VM については終末濃度 1 ml 当り 32, 80, 160 mcg および 320 mcg, KM については同じく 16, 32, 80, 160 mcg および 320 mcg, SM については同じく 32, 80, 160 mcg および 320 mcg の各濃度で検討した。VM, KM では濃度変化に伴つて明らかに呼吸調節と磷酸化能の低下に平行関係が認められるの

Table 3. Effects of Antituberculous Drugs on Respiratory Control and ADP/O Ratio of Rat Liver Mitochondria

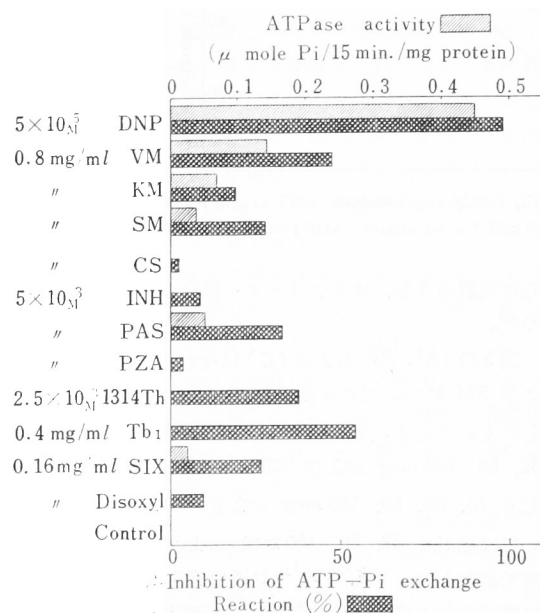
Drugs	Final concentration	State 3 State 4	ADP/O
Control		2.7~3.4	1.5~1.8
VM	32 mcg/ml	1.8	1.7
	80	1.6	1.3
	160	1.3	0.9
	320	1.1	0.6
KM	16	1.9	1.7
	32	1.2	1.5
	80	1.3	1.1
	160	1.1	0.7
	320	1.0	0.6
SM	32	2.0	1.7
	80	2.0	1.6
	160	1.4	1.4
	320	1.3	1.6

に対して、SM では呼吸調節に対してのみ明らかな濃度依存性が認められる。その他の薬剤についても同様な実験を行なったが、いずれも濃度変化による影響の差は認められなかった。

Ⅲ. ラット肝ミトコンドリアの ATP-Pi 交換反応および ATPase 活性に及ぼす抗結核剤の影響

次にラット肝ミトコンドリアの ATP-Pi 交換反応お

Fig. 4. Effects of Antituberculous Drugs on Latent ATPase Activity and ATP-Pi Exchange Reaction of Rat Liver Mitochondria



よび ATPase 活性に及ぼす各種抗結核剤の影響を調べた結果、図 4 に示すとき成績を得た。

ATP-Pi 交換反応では、薬剤を添加しないものを対照とし、その活性に対する阻害率(%)で表わした。薬剤の濃度はいずれも終末濃度を示している。これによると、共役阻害剤である 2,4-Dinitrophenol (DNP) は 5×10^{-5} M で 100% に近い完全阻害を示しているのに対して、抗結核剤では 0.4 mg/ml Tb₁, 0.8 mg/ml VM および 2.5×10^{-3} M 1314 TH でそれぞれ 55%, 47% および 38% の阻害を示した。 5×10^{-3} M PAS, 0.8 mg/ml SM, 0.16 mg/ml SIX, 0.8 mg/ml KM および 0.16 mg/ml Disoxyl では 33~10% の阻害率であつたが、 5×10^{-3} M PZA, 0.8 mg/ml CS ではほとんど阻害を示さなかつた。

薬剤無添加の対照には ATPase 活性はほとんど認められないので、薬剤を添加した際の ATPase 活性促進の程度を示すために、ミトコンドリア蛋白量 1 mg 当り 15 分間に ATP より遊離する無機磷の量を μ mole 単位で表わした。その結果、DNP では著明な促進作用がみられ、抗結核剤では VM, KM, SM, PAS および SIX に明らかな促進作用を認めた。これを前記の成績と合わせてみると、これらの薬剤のうち VM, KM, SM は酸化的磷酸化反応、ATP-Pi 交換反応および ATPase 活性に対して DNP と同様な態度を示していることになる。これに対して ATP-Pi 交換反応では明らかな阻害作用を示した 1314 TH, Tb₁, Disoxyl および INH では ATPase 活性の促進作用が認められないので、現在一般に認められている酸化的磷酸化反応の部分反応としての ATP-Pi 交換反応の概念に一致せず興味ある問題を残している。

そこで ATP-Pi 交換反応に対して阻害効果を示し、ATPase 活性に対しては促進作用を示した VM, SM, KM, PAS および SIX の濃度を変えた場合の ATPase 活性に対する影響を検討するため、まず比較する意味で DNP について実験を行なつてみた。DNP の終末濃度が 10^{-4} M, 0.5×10^{-4} M, 0.25×10^{-4} M および無添加の場合のラット肝ミトコンドリアの ATPase 活性を測定した結果、図 5 に示すとき成績を得た。これにより、DNP 濃度が上昇するとほぼ直線的に ATPase 活性も促進される。これに対して VM, SM, KM の終末濃度が 6.4, 3.2, 0.8 mg/ml および無添加の場合、図 6 に示すごとく ATPase 活性はこれらの薬剤濃度が上昇するに従つてほぼ直線的に促進される。しかしこの促進作用は DNP の場合ほど著明ではない。PAS では図 7 にみられるごとく、濃度を 0.5×10^{-2} M から 4×10^{-2} M に上昇しても ATPase 活性促進作用はほとんど増加しない。その他の薬剤、CS, INH, PZA, 1314 TH, Tb₁, SIX および Disoxyl では濃度上昇による活性の促進作用は認められなかつた。

Fig. 5. The Effect of 2,4-DNP on the Latent ATPase Activity of Rat Liver Mitochondria

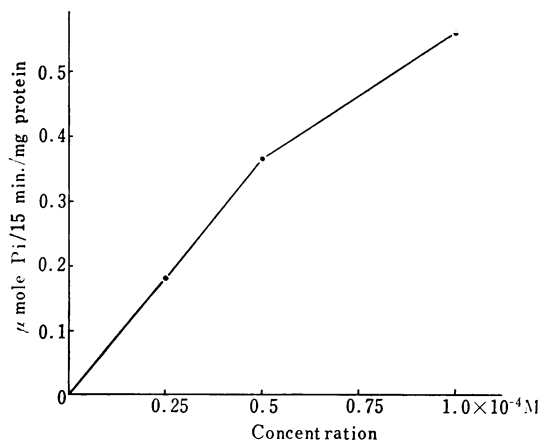


Fig. 6. The Effect of KM, VM and SM on the Latent ATPase Activity of Rat Liver Mitochondria

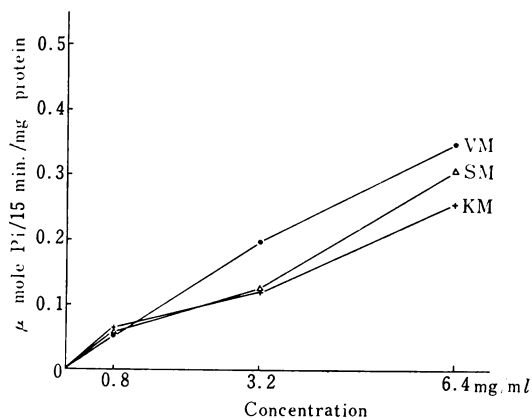
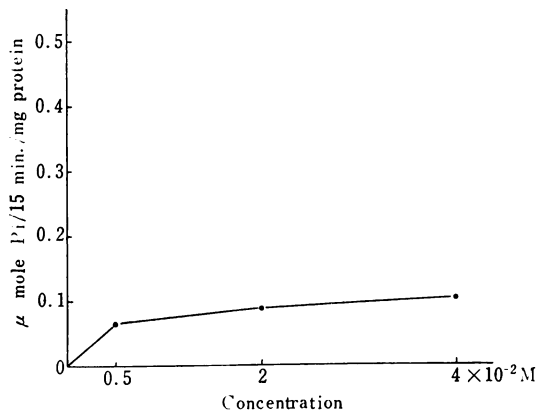


Fig. 7. The Effect of PAS on the Latent ATPase Activity of Rat Liver Mitochondria



考 察

本実験でテストされた抗結核剤は主に現在臨床的に使用されているもので、これらが示す高等動物の酸化的磷酸化反応に対する作用を究明することは、その副作用発現の機序を追究する一方法として有意義な研究と考えられる。現在、酸化的磷酸化反応の研究は極めて多方面からいろいろな方法で進められ、薬剤のエネルギー転換反応への作用は一面的研究では究明することができない。本研究ではそれらを考慮し、現在考えられているミトコンドリアのエネルギー転換反応に対する薬剤の作用を立体的に検討すべく努力した。すなわち、呼吸調節、磷酸化能、電子逆流能、形態変化、ATP-Pi 交換反応および ATPase 活性等の多岐にわたる反応に対する作用を調べた。ミトコンドリアにおけるこのような種々の反応に対する抗結核剤の作用を調べた結果を総合的に判定すれば、VM, KM および SM の3者が酸化的磷酸化の共役阻害剤としての作用をもつていると結論できる。

すなわち、これらのことをいまいし詳細に検討してみると、表2に示すごとく VM, KM および SM は呼吸調節、磷酸化能に対していずれも阻害効果を示していることから、ミトコンドリアの酸化的磷酸化反応に対しては脱共役的な作用をもつことが考えられ、このことは PN の酸化的傾向によつても裏づけることができる。すなわち、脱共役による呼吸の解放で電子伝達が容易になる結果、還元型 PN の急速な酸化が起こると考えられよう。

一方、ミトコンドリアにおける呼吸および酸化的磷酸化反応は、その膨潤収縮で示される形態変化と密接な関連性をもつことがこれまでの研究で明らかにされている¹⁰⁾¹¹⁾。この形態変化は、受動的に起こる非生理的な大幅膨化と、主として能動的に起こる生理的な小幅膨化の2種類に分けられる¹⁰⁾¹²⁾。後者は酸化的磷酸化能をもつミトコンドリアにおいて認められ、 Mg^{++} の存在下で呼吸基質と無機磷の添加、すなわち電子伝達に伴い、イオン輸送の結果ミトコンドリアの膨化が起こり、ADP や呼吸阻害剤の添加、あるいは無酸素状態によるイオン輸送のためのエネルギー供給阻害や共役阻害剤により収縮が起こることが知られている¹³⁾。

このことを表2に示す結果について考えると、VM, KM, SM は呼吸調節および磷酸化能に対する阻害作用から、明らかに共役阻害剤としての性格を示しているにもかかわらず、形態的には膨潤効果を示しているが、DNP や脂肪酸のごとき共役阻害剤においても低濃度では収縮を起こし、高濃度になるにしたがいミトコンドリアの損傷が著しくなるとともに膨潤効果も著しくなることが知られている¹⁴⁾。また共役阻害剤の中には膨潤効果を示すものもある¹⁵⁾ので、これら薬剤の脱共役的な作用

を表2に示す形態変化だけで否定することはできない。Tb₁ および 1314 TH にもわずかに呼吸調節に対する阻害が認められるが、磷酸化能に対しては影響が認められない。しかし形態変化についてはいずれも膨潤効果が認められるところから、ミトコンドリアの機能に対する何らかの作用が考えられる。

PN の変化については、PAS を除くすべての薬剤に酸化的傾向がみられるが、呼吸調節および磷酸化能に影響を示さない INH, PZA, SIX 等においても同様に酸化的傾向がみられることから、ここでこの現象をミトコンドリアの機能に対する作用と直接関係づけることは難しい。

VM, KM, SM の呼吸調節および磷酸化能に対する影響は、図3および表3からいつそう明らかである。VM, KM では濃度の上昇に伴って、それぞれ呼吸調節および磷酸化能に対する阻害の度合が平行していることが分かる。これに対して SM では磷酸化能に対する阻害効果が顕著でなく、VM, KM ほど典型的な共役阻害を示さない。

次に DNP をはじめ酸化的磷酸化反応の共役阻害剤として作用する物質は、高エネルギー中間体の加水分解によつて、 $ATP + H_2O \rightarrow ADP + Pi + H^+$ の反応を促進する結果、ミトコンドリアの潜在性 ATPase 活性の促進作用がみられ、同時に酸化的磷酸化反応の部分反応としての Pi と ATP の末端磷酸基との交換、すなわち ATP-Pi 交換反応の阻害が知られている。図4の結果から、VM, KM, SM, PAS および SIX はいずれも ATPase に対して促進作用を示し、ATP-Pi 交換反応に対しては阻害作用を示している。しかし ATPase に対する影響については、VM, KM, SM が DNP (図5) 同様、濃度にはほぼ比例して促進作用が増加するのに対して、PAS では濃度上昇による促進作用の増加がきわめてわずかで、SIX では濃度上昇による作用の変化がみられない。したがって呼吸調節、磷酸化能に対する作用と合わせて PAS, SIX が VM, KM, SM のごとき脱共役作用をもつとは考えられない。

Tb₁ および 1314 TH では ATPase の促進作用が全く認められず、しかも磷酸化能も阻害しないにもかかわらず、ATP-Pi 交換反応に対してはかなり強い阻害を示している。このことは現在考えられている酸化的磷酸化反応の概念では解決できない。したがってこの問題は、この方面の研究の発展によつて解決される今後の課題であろう。

結 論

1. ラット肝ミトコンドリアに対する各種抗結核剤の影響を、呼吸調節、磷酸化能、電子逆流能、形態変化、ATP-Pi 交換反応および ATPase について検討した。

2. その結果、本実験に使用した抗結核剤は、エネルギー転換反応に対する作用から、次の3つに分けられる。

- a) 呼吸調節、磷酸化能、ATP-Pi 交換反応を阻害し、ATPase 活性を促進するもの……VM, KM, SM
- b) ATP-Pi 交換反応を阻害し、ATPase 活性を促進するもの……PAS
- c) ATP-Pi 交換反応を阻害するもの……Tb₁, 1314 TH, SIX, Disoxyl および INH

3. VM, KM および SM はミトコンドリアの呼吸系に対して脱共役的に作用し DNP と同様な傾向を示すが、Mg⁺⁺ の存在下では呼吸調節、磷酸化能に対する阻害はわずかで、使用した濃度も薬用濃度に比べかなり高いことなど、共役阻害剤としての作用は必ずしも強力とは思われない。PAS は呼吸調節、磷酸化能に対し明らかな影響を示さないが、ATP-Pi 交換反応の阻害および ATPase 活性の促進がみられ、一部エネルギー転換反応に何らかの作用を及ぼすことを唆している。

4. VM, KM, SM 以外のものは、現在のミトコンドリアの酸化的磷酸化反応の概念から、共役阻害剤とは考えられないが、エネルギー転換反応に対する何らかの作用は見逃がせない。

5. これらの結果が直ちに宿主に対する副作用との関連性を示しているとはいえないが、大量かつ長期にわたるこれら薬剤の投与においては、エネルギー産生系に対する作用が副作用発現の一因となりうることも考えられる。

稿を終るに臨みご懇切なるご指導とご校閲を贈りました岡山大学癌研助教授内海耕穂博士、ご指導いただきました山本剛禧氏に深甚なる謝意を表します。

本報告の要旨は昭和40年5月第40回日本結核病学会において、また一部は昭和39年10月第19回国立病院療養所総合医学会において発表した。

なお本報告は、厚生省国立結核療養所中央個別研究費の配分を受けて研究した結果の一部である。

文 献

- 1) 小林茂保・田川邦夫：蛋白質核酸酵素，10：56，昭40。
- 2) 萩原文二・Conelly, J. L.・四釜慶治・押野礼子・奥貫一男：酵素化学シンポジウム，17：58，昭37。
- 3) Hogeboom, G. H.: Method in Enzymology I: 16, 1955.
- 4) Utsumi, K. and G. Yamamoto Acta Med. Okayama, 18: 111, 1964.
- 5) Hagihara, B.: Biochim. Biophys. Acta, 46: 134, 1961.
- 6) Hagihara, B. and Lardy, H. A.: J. Biol. Chem., 235: 889, 1960.

- 7) 高橋泰常：生化学, 26 : 690, 昭 30.
- 8) Koch, F. C. and McMeekin, T.L. : J. Am. Chem. Soc., 46 : 2066, 1924.
- 9) Chance, B. and Williams, G. R. . Adv. Enzymology, 17 : 65, 1956.
- 10) 内海耕髓・山本剛禧・稲葉耕三・大原幸子・山本道夫：細胞化学シンポジウム, 13 : 113, 昭 38.
- 11) Lipsett, M.N. and Corwin, L.M. : J.Biol. Chem., 234 : 2448, 1959.
- 12) 妹尾左知丸・高木康敬：新細胞学 : 154, 朝倉書店, 東京, 昭 40.
- 13) Utsumi, K. and Packer, L. Arch. Biochem. Biophys., 120 : 404, 1967.
- 14) Utsumi, K. : Acta Med. Okayama, 18 : 189, 1964.
- 15) Neubert, D. and Lehninger, A. L. : J.Biol.Chem., 237 : 952, 1962.