

原 著

ラット肝ミトコンドリアの呼吸系に及ぼす
Rifampicin およびその誘導体の影響

和 知 勤・井 上 豊 治

国立療養所近畿中央病院

受付 昭和 49 年 5 月 17 日

EFFECT OF RIFAMPICIN AND ITS DERIVATIVES ON ENERGY
TRANSFER REACTIONS IN MITOCHONDRIA

Tsutomu WACHI and Bunji INOUE*

(Received for publication May 17, 1974)

Rifampicin possesses a high antibacterial activity both in vitro and in vivo against *Mycobacterium tuberculosis* and is used routinely as an effective antituberculous drug. In accordance with an increase in its application to pulmonary tuberculosis, however, various side effects caused by the administration of rifampicin have been reported. It has therefore become necessary to investigate the mechanism by which side effects occur. This paper describes some experiments planned to clarify the biological effects of rifampicin and its derivatives on liver mitochondria in connection with the relationship between liver function disorders after the administration of rifampicin and the mitochondrial functions.

Male Donryu-strain rats were used. Liver mitochondria were isolated and a bioxygraph connected to a Galvani electrode was used for the measurement of oxygen consumption, respiratory control and oxidative phosphorylation in the mitochondria.

Of the antibiotics examined, 3-formylrifamycin SV at the concentration of 7×10^{-6} to 2.8×10^{-5} M caused a remarkable decrease in respiratory control and oxidative phosphorylation (ADP : O ratio) with enhanced state 4 respiration of the isolated liver mitochondria, though rifampicin itself and other derivatives at the same concentration showed no noticeable effect. 3-formylrifamycin SV (3.4×10^{-5} to 2.7×10^{-4} M) activated mitochondrial latent ATPase (2.4 to 2.8 times of the control) and inhibited ATP- ^{32}P i exchange reaction remarkably (approximately 90% inhibition).

The increase in body weight during the administration of a large quantity of 3-formylrifamycin SV, however, was normal and there was no difference between normal and medicated rats in serum transaminase activity. The mitochondria from rats administered 3-formylrifamycin SV orally showed no conspicuous damage on the respiratory activity and oxidative phosphorylation.

From these results it may be concluded that 3-formylrifamycin SV acts as a potent uncoupler in vitro on rat liver mitochondria. However, further investigation should be performed concerning in vivo effect of 3-formylrifamycin SV as well as the metabolism of rifampicin.

* From the National Sanatorium Kinki Central Hospital for Chest Disease, 1180 Nagasone-cho, Sakai-shi, Osaka 591 Japan.

緒 言

Rifampicin (RFP) は放線菌の一種 *Streptomyces mediterranei* によつて産生される rifamycin 群から誘導された半合成抗生物質であり、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して広い抗菌スペクトルを有する^{1)~3)}。RFP はまた、*in vitro* および *in vivo* とともに、結核菌に対して強い活性をもつ^{1)4)~7)}。細菌に対する RFP の一次的な作用は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼと結合し、DNA-enzyme 複合体の安定性を妨げるることによつて細菌細胞の成長を抑制することにあるといわれている^{8)~10)}。かくして RFP は *in vitro*^{8)~11)}、*in vivo*¹²⁾ とともに細菌の DNA 依存性 RNA 合成を抑制するが、細菌の DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ¹⁰⁾¹³⁾ および哺乳類の DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾ に対する同様な抑制はともにみられない。

他方、RFP はその誘導体のあるものが抗ウイルス作用をもつために癌研究の分野でも注目されている¹⁵⁾¹⁶⁾。RFP の特に結核領域における優れた治療効果については、数多くの研究によりすでに明らかである^{17)~19)}。しかし一方、RFP の結核患者に対する使用症例が増加するに従つて肝機能障害^{20)~22)}、白血球²³⁾・血小板^{23)~25)}の減少およびアレルギー様症状等^{25)~27)}の副作用が注目され、今後その増加が予想されるので、薬剤の宿主に対する侵襲が一種の医療公害現象として問題を提起しつつある現在、特に長期にわたり大量に投与される抗結核剤による副作用発現の機序解明が望まれる。

薬剤が体内で代謝される場所は主として肝臓内である。また一般に抗生物質は細菌細胞に特異的に作用するものであるが、ミトコンドリア (Mt) はいくつかの点で prokaryote の性格をそなえており、RFP の寄生体に対する作用と同時に、宿主肝 Mt の機能に対する作用が考えられる。このような観点から、われわれはラット肝 Mt に対する RFP とその誘導体の作用を検討したので、その結果について報告する。

材料および方法

1. 実験動物

実験動物には、固型飼料 (ゼネラル MR-1, 実験動物関西研究所) で飼育した体重 150~200 g の呑竜系雄ラットを用いた。

2. 薬剤の投与方法

RFP およびその誘導体の投与方法については、0.5% carboxy methylcellulose (CMC) を溶媒とし、耳鼻科用水銃を用いて体重 kg 当り 400 mg を 1 回のみ、また体重 kg 当り 200 mg を 2 週間連日経口投与した。対照には同量の 0.5% CMC 溶液のみを同様に与えた。RFP または誘導体の連続投与群 (各群 5 匹) については、

対照群 (4 匹) とともに期間中 2 日ごとに体重測定を実施した。

3. 血清トランスアミナーゼ活性の測定

RFP または誘導体の連続投与群および対照群の各群について、頸動脈より採血した血清を用い、Reitman-Frankel 法により GOT および GPT 活性を測定した。

4. 肝 Mt 試料の調製法

実験動物を 1 夜絶食した後断頭により屠殺し、内海²⁸⁾の方法に従い 0.33 M 蔗糖, 1 mM EDTA および 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) を含む溶媒で肝 Mt を分離調製した。上記溶媒中に懸濁した分離 Mt 試料は 0°C で保存し、調製後速やかに実験に供した。

5. 使用薬剤

本研究のために使用した RFP, 25-desacetyl rifampicin (DA-RFP), rifampicin quinone (RFP-Q) および 3-formyl rifamycin SV (3 F-RFM SV) は第一製薬株式会社より提供されたものである。

6. Mt の呼吸および酸化的リン酸化反応の測定

分離した Mt の酸素消費速度および酸化的リン酸化反応は、ガルバニ電極を備えた生化学用 DO 測定装置²⁹⁾ (給水化学研究所, 東京) を用いて測定した。すなわち、10 mM KH₂PO₄, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂ および 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) より成る反応液 2.5 ml に Mt 試料 (1.5~8.8 mg 蛋白相当) を加え、マグネチックスターラー上で攪拌しながら 25°C でインキュベートした。インキュベーション中一定時間ごとに呼吸基質 (4 mM コハク酸ナトリウムまたはイソクエン酸ナトリウム), RFP またはその誘導体および ADP 等を順次添加し、Mt の示す呼吸経過を自記記録装置で連続的に記録測定した。記録された呼吸経過曲線より Mt 蛋白 1 mg 当り 1 分間の酸素消費速度、呼吸調節率 (State 3/State 4) および酸化的リン酸化能 (ADP : O 比) を算出した³⁰⁾。

7. ATPase 活性の測定

Mt の潜在性 ATPase 活性はつぎのごとき方法で測定した。すなわち、50 mM 蔗糖, 20 mM KCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 3 mM MgCl₂ および 0.1 mM EDTA より成る反応液中で Mt 試料を 3 mM Na-ATP とともに 25°C, 15 分間インキュベートした後、終末濃度 8% の氷冷 PCA で反応を停止し、除蛋白遠心分離後の上清液に含まれる無機リン (Pi) を高橋の方法³¹⁾で測定した。

8. ATP-³²Pi 交換反応の測定

上記 7 に示した反応液 1.3 ml に 6 μ mole Na-ATP, 1 μ Ci ³²Pi を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4) 6 μ mole, 50 n mole Na-Azide および Mt 試料 (4.6 mg 蛋白相当) を加えて全量を 2.0 ml とし、25°C, 10 分間インキュベートした。終末濃度 8% の氷冷 PCA で反応を停止し、遠心分離後の上清について、上記高橋の方法³¹⁾による無機リン定量の際の水層を被験液として用いた。すなわ

ち、等量のイソブタノールで3回洗浄した被験液 1 ml を試料皿の上で乾燥し、ガスフローカウンター (Aloka FC-1 E, 日本無線医理学研究所, 東京) で有機リン化合物のカウントを測定した^{32), 33)}。

9. Mt 蛋白の定量

一定量の Mt 試料を濃硫酸中で灰化した後蒸留水で希釈, ネスラーの試薬³⁴⁾で発色させ、波長 430 nm における吸収で Mt 蛋白の定量を行った。

結 果

1. 正常ラット肝 Mt の呼吸および酸化的リン酸化に及ぼす影響

Table 1 は正常ラット肝より分離調製した Mt の酸素消費速度, 呼吸調節および ADP : O 比に対する RFP とその誘導体の影響を示したものである。Mt を含む反応液に呼吸基質としてコハク酸ナトリウム (終末濃度 4 mM) を加えた後, さらに RFP, DA-RFP または RFP-Q (終末濃度 2.8×10^{-5} M) の添加による酸素消費速度 (State 4) には変化が認められなかった。またこの際の呼吸調節および ADP : O 比はいずれも対照のそれぞれの値と大差がなかった。これに対し等濃度の 3 F-RFM

SV を同様に添加した場合には State 4 の呼吸は急激に増加し (対照の 3.2 倍), これに伴い呼吸調節, ADP : O 比はともに著明な低下が認められた (それぞれ対照の 31% および 55%)。イソクエン酸ナトリウムを呼吸基質に用いた場合 (Table 2) にも, 3 F-RFM SV の添加による呼吸の増加は著しく (対照の 2.8 倍), これに伴い呼吸調節, ADP : O 比はそれぞれ対照の 30% および 63% に低下した。

3 F-RFM SV の Mt に対する上記の作用は, 脱共役剤として知られている 2,4-dinitrophenol (DNP) の作用と類似するので, 3 F-RFM SV の濃度と作用との関連について検討を加えた。Fig. 1 に示すごとく, State 4 の呼吸は添加する 3 F-RFM SV の濃度によりさまざまな程度に促進されるが, $7 \times 10^{-6} \sim 7 \times 10^{-5}$ M の範囲では, 濃度の上昇と平行して呼吸の増進がみられる。しかし 7×10^{-5} M の 3 F-RFM SV 添加によつて急激に促進された呼吸はその後次第に低下し, この傾向は更に高濃度の 3 F-RFM SV (1.1×10^{-4} M) 添加により一層顕著である。3 F-RFM SV によるこの抑制された呼吸は, DNP または ADP の添加によつて解放されない。Fig. 2 は各 State の呼吸に対する 3 F-RFM SV の効果を示したも

Table 1. Effect of Rifampicin and Its Derivatives on the Respiration and Oxidative Phosphorylation in Mitochondria Isolated from Livers of Normal Rats

Additions (M)		Oxygen uptake (natoms/min/mg protein)	Respiratory control index	ADP : O ratio
None		21.0	4.9	2.0
RFP	2.8×10^{-5}	21.2	5.0	1.9
DA-RFP	2.8×10^{-5}	20.9	4.7	1.8
RFP-Q	2.8×10^{-5}	22.1	4.7	1.7
3 F-RFM SV	7×10^{-6}	39.2	2.3	1.6
	1.4×10^{-5}	51.3	1.9	1.4
	2.8×10^{-5}	67.8	1.5	1.1

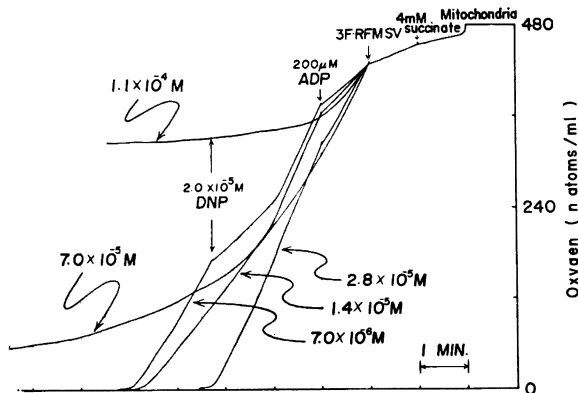
Mitochondria (4.1 mg protein) were added to a reaction mixture containing 10 mM KH_2PO_4 , 80 mM KCl, 5 mM MgCl_2 and 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) in a final volume of 2.5 ml. Rifampicin or its derivatives was added after the addition of 10 μ moles sodium succinate as a respiratory substrate. Then 500 n moles sodium ADP was added, changes in the rate of oxygen uptake were traced. Experiments were carried out at 25°C. Each value represents the mean of three trials. Oxygen uptake shows the substrate-level respiration.

Table 2. Effect of Rifampicin and Its Derivatives on the Respiration and Oxidative Phosphorylation in Mitochondria Isolated from Livers of Normal Rats

Additions (M)		Oxygen uptake (natoms/min/mg protein)	Respiratory control index	ADP : O ratio
None		15.5	4.6	2.4
RFP	2.8×10^{-5}	17.5	4.6	2.6
DA-RFP	2.8×10^{-5}	16.6	5.8	2.7
RFP-Q	2.8×10^{-5}	16.5	4.7	2.8
3 F-RFM SV	7×10^{-6}	25.5	3.6	2.6
	1.4×10^{-5}	33.9	2.4	2.2
	2.8×10^{-5}	43.1	1.4	1.5

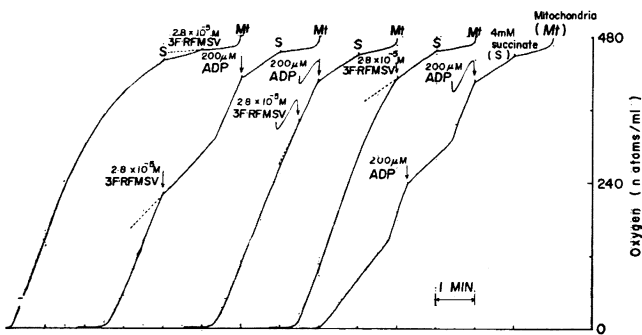
6.0 mg protein of mitochondria and 10 μ moles sodium isocitrate as a respiratory substrate were used. Other conditions were the same as in Table 1.

Fig. 1. Effect of 3-Formyl Rifamycin SV on the Respiratory Activity of Rat Liver Mitochondria



4.1 mg protein of mitochondria used. Other conditions were the same as in Table 1.

Fig. 2. Effect of 3-Formyl Rifamycin SV on Various States of the Respiration in Rat Liver Mitochondria



6.0 mg protein of mitochondria used. Other conditions were the same as in Table 1.

のである。各 State の呼吸は 3F-RFM SV により促進されるがその程度は State ごとに異なり、State 4 の呼吸はほぼ完全に解放される。

2. 潜在性 ATPase 活性に対する影響

Fig. 2 に示すごとく、3F-RFM SV は *in vitro* で Mt の呼吸に促進的に作用し、また 3F-RFM SV によつて解放された呼吸は 10^{-4} M KCN で完全に阻害される。このことは 3F-RFM SV による呼吸調節および ADP:O 比の低下とともに、3F-RFM SV が Mt における酸化的リン酸化反応に対し脱共役作用をもつことを示唆する。したがつて 3F-RFM SV に関しては、脱共役剤のもつ他の作用についても検討しなければならない。脱共役剤の多くは Mt の潜在性 ATPase を活性化し、リン酸化反応の逆反応を促進する³⁵⁾³⁶⁾。そこで 3F-RFM SV の Mt 潜在性 ATPase 活性に対する影響を調べた。

その結果、Table 3 に示すごとく RFP, DA-RFP および RFP-Q (終末濃度 $3.4 \times 10^{-5} \sim 2.7 \times 10^{-4}$ M) はいず

れも DNP の存否にかかわらず、ATPase 活性に対する明らかな作用は認められない。これに対して 3F-RFM SV は、intact な Mt の潜在性 ATPase 活性に著明な促進作用を示した。すなわち、終末濃度 3.4×10^{-5} M の 3F-RFM SV 存在下では、ATPase 活性は対照の 2.4 倍に上昇し、より高濃度の 3F-RFM SV 添加による更に顕著な活性の上昇がみられた (Fig. 3)。しかし Table 3 および Fig. 3 に示すごとく、DNP で促進される ATPase 活性に対しては、RFP および他の誘導体と同様に明らかな作用は認められない。

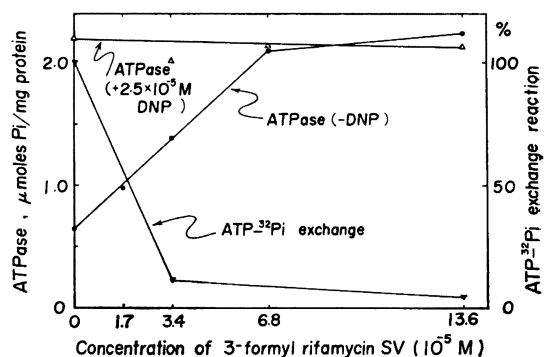
3. ATP-³²Pi 交換反応に対する影響

Mt における酸化的リン酸化反応の部分反応と考えられる ATP-³²Pi 交換反応は、DNP をはじめ多くの脱共役剤によつて阻害される³⁷⁾。すでに述べたごとく、Mt の呼吸および ATPase 活性に及ぼす 3F-RFM SV の作用は DNP が示す脱共役作用と類似するので、Mt における ATP-³²Pi 交換反応に対する 3F-RFM SV の阻害作用が予測される。事実、Table 4 に示すごとく、DNP (終末濃度 2.5×10^{-4} M) による交換反応の阻害は極めて著しくその阻害率は対照の 96.9% に及び、また 3F-RFM SV (終末濃度 3.4×10^{-5} M) による阻害作用も著明で、その阻害率はおよそ 90% であつた。等濃度の RFP および他の誘導体による交換反応の阻害はいずれも 10% 以下であり、3F-RFM SV に比べそ

の作用は著しく軽度である。

以上の実験結果から、肝 Mt の呼吸系に対する RFP とその誘導体の *in vitro* の作用が明らかになつたので、特に 3F-RFM SV に関しては、*in vivo* の作用につい

Fig. 3. Effect of 3-Formyl Rifamycin SV on Latent ATPase and ATP-³²Pi Exchange Reaction



Conditions were the same as in Tables 3 and 4.

でも検討されなければならない。

4. 体重増加に及ぼす影響

対照群および RFP または 3F-RFM SV 投与群の体重変化を、各群 (4~5 匹) の平均値として Fig. 4 に示

Table 3. Effect of Rifampicin and Its Derivatives on ATPase Activity

Additions (M)		Pi liberated (μ moles Pi/mg protein per 15 min)	
		-DNP (2.5×10^{-5} M)	+DNP
None		0.60	1.75
Azide	5×10^{-5}	0.28	1.04
RFP	3.4×10^{-5}	0.65	1.63
	2.7×10^{-4}	0.70	1.57
DA-RFP	3.4×10^{-5}	0.63	1.68
	2.7×10^{-4}	0.64	1.70
RFP-Q	3.4×10^{-5}	0.63	1.66
	2.7×10^{-4}	0.67	1.57
3F-RFM SV	3.4×10^{-5}	1.45	1.77
	2.7×10^{-4}	1.68	1.72

Rifampicin or its derivative (final concentrations as shown above), 6μ moles sodium ATP and mitochondria (3.4 mg protein) were added to 1.5 ml of a medium containing 0.05 M sucrose, 0.02 M KCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 3 mM $MgCl_2$ and 0.1 mM EDTA to give the total volume 2.0 ml. After incubation for 15 min. at 25°C, 1 ml of ice-cold PCA (24%) was added, well mixed, left standing for 10 min. and then the supernatant was separated by centrifugation. An aliquot of the supernatant was used as a material for the determination of inorganic phosphate liberated according to the method of Takahashi⁽¹¹⁾.

Table 4. Effect of Rifampicin and Its Derivatives on the ATP- 32 Pi Exchange Reaction

Additions (M)		cpm	%
None		79,118	100
DNP	2.5×10^{-4}	2,414	3.1
RFP	3.4×10^{-5}	72,288	91.4
DA-RFP	3.4×10^{-5}	76,945	97.3
RFP-Q	3.4×10^{-5}	75,590	96.0
3F-RFM SV	3.4×10^{-5}	8,229	10.4

Rifampicin or its derivative (final concentrations as shown above), 6μ moles sodium ATP, 6μ moles phosphate buffer (pH 7.4) containing 1μ Ci of 32 Pi, 100 n moles azide and mitochondria (4.6 mg protein) were added to 1.3 ml of the medium described in Table 3 to give the total volume 2.0 ml. After incubation for 10 min. at 25°C, treatment with PCA and centrifugation were done as before. The supernatant was treated with an equal volume of isobutanol, aqueous phase containing organic phosphorus compounds was separated. After washing three times with an equal volume of isobutanol, 1 ml of the aqueous solution was dried on a sample plate and radioactivity was measured by a gas flow counter.

した。図から明らかなように、RFP または 3F-RFM SV (200 mg/kg 体重/日) の継続投与群と対照群との間には、体重増加の有意差は認められない。

5. 血清トランスアミナーゼ活性に対する影響

Table 5 は、RFP または 3F-RFM SV (200 mg/kg 体重/日) を 2 週間継続投与した際の血清 GOT および GPT 活性の変動を示したものである。RFP または 3F-RFM SV 投与群の GOT 活性は、いずれも対照群との間に差を認め難い。GPT 活性については RFP 投与群にわずかな活性上昇の傾向がみられたが、3F-RFM SV 投与群には対照群と比べて、明らかな差が認められなかった。

6. RFP および RFP 誘導体投与ラット肝 Mt の呼吸および酸化的リン酸化能

Table 6 は、RFP およびその誘導体 (400 mg/kg 体重) をラットに経口投与し、24 時間後に肝臓より分離調製した Mt についてその酸素消費速度、呼吸調節および ADP:O 比を測定した結果である。また Table 7 は、RFP および 3F-RFM SV (200 mg/kg 体重/日) をそれぞれ 2 週間経口的に継続投与したラット肝より分離調製した Mt について、同様にそれぞれの呼吸ならびにリン酸化能を測定した結果である。これらの結果が示すように、RFP およびその誘導体の大量投与にもかかわらず、Mt の呼吸機能ならびにリン酸化能の明らかな低下は認

Fig. 4. Body Weight during the Administration of Rifampicin and 3-Formyl Rifamycin SV

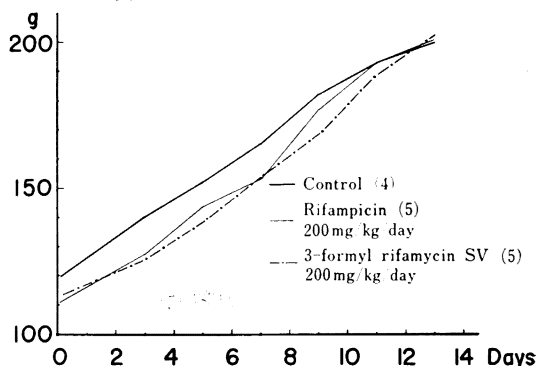


Table 5. Serum Transaminase Activities of Rifampicin or 3-Formyl Rifamycin SV Administered Rats

Doses	GOT (Unit)	GPT (Unit)
Control (4)	122.3 $\pm$ 17.1	18.8 $\pm$ 4.9
Rifampicin 200 mg/kg, 2 weeks (5)	123.7 $\pm$ 12.1	23.7 $\pm$ 4.7
3-Formyl rifamycin SV, 200 mg/kg, 2 weeks (5)	109.0 $\pm$ 13.9	16.3 $\pm$ 3.5

Table 6. Respiratory Activity and Oxidative Phosphorylation of Mitochondria from Livers of Medicated Rats

Doses	Oxygen uptake (natoms/min/ mg protein)	Respiratory control index	ADP : O ratio
Control	25.1	4.1	1.8
Rifampicin 400mg/kg, 24hrs.	24.7	4.3	1.8
Control	23.4	4.0	1.8
Desacetyl rifampicin 400mg/kg, 24hrs.	22.8	3.6	1.7
Control	24.8	2.9	1.9
Rifampicin quinone 400mg/kg, 24hrs.	25.5	3.7	1.8
Control	24.6	4.1	1.8
3-Formyl rifamycin SV 400mg/kg, 24hrs.	23.7	3.9	1.8

3.4 to 6.6 mg protein of mitochondria and 10 μ moles sodium succinate as a respiratory substrate were used. Other conditions were the same as in Table 1.

Table 7. Respiratory Activity and Oxidative Phosphorylation of Mitochondria from Livers of Medicated Rats

Doses	Oxygen uptake (natoms/min/ mg protein)	Respiratory control index	ADP : O ratio
Control	24.7	3.8	1.7
Rifampicin 200mg/kg, 2 weeks	27.7	3.8	1.6
Control	28.3	3.3	1.6
3-Formyl rifamycin SV 200mg/kg, 2 weeks	28.4	4.1	1.8

4.2 to 6.8 mg protein of mitochondria and 10 μ moles sodium succinate as a respiratory substrate were used. Other conditions were the same as in Table 1.

められない。呼吸基質に等濃度のイソクエン酸ナトリウムを用いた場合にも同様の結果が得られた。

考 察

RFP の生体内代謝に関してはいくつかの報告があり^{38)~41)}, その主要代謝産物は DA-RFP であることが明らかにされている。砂原ら⁴²⁾⁴³⁾ および佐野ら⁴⁴⁾ は, RFP を投与した健康人ならびに結核患者の尿中代謝産物を調べて DA-RFP の他に RFP-Q および 3F-RFM SV を検出し, これらが体内で代謝的に産生されるとの見解を示している。したがって RFP の副作用ならびにその発現の機序解明に際しては, RFP のみならず, 同時にこれら代謝産物の作用についても検討されなければならない。

前述のごとく, 本研究では RFP による副作用のうち, 特に肝臓機能障害との関連において, 肝内エネルギー代謝系に及ぼす RFP とその誘導体の作用を明らかにすることを目的とした。現在, 生体のエネルギー産生系に関する研究は極めて多方面からさまざまな方法で進められており, 特に薬剤のエネルギー転換反応への作用は一面的な手法では究明することができない。本研究を進めるに当ってはその点に留意し, Mt における呼吸ならびに呼吸調節, 酸化的リン酸化能およびリン酸化系部分反応

としての潜在性 ATPase 活性, ATP-³²Pi 交換反応等, 多岐にわたる反応について RFP とその誘導体の作用を検討した。

その結果, RFP 自体は上記の諸反応に対し, *in vitro* ならびに経口投与の際ともに明らかな作用は認められない。RFP よりやや劣るが優れた抗菌力をもつ DA-RFP⁴⁵⁾ と RFP-Q についても同様である。これに対し 3F-RFM SV は *in vitro* で Mt の呼吸および ATPase 活性に著明な促進作用を示すとともに, 呼吸調節, 酸化的リン酸化能および ATP-³²Pi 交換反応を著明に阻害し, その作用は明らかに true uncoupler としての特質を示すものである。しかも 3F-RFM SV の示す脱共役作用は, DNP との比較においてかなり強力なものと見えよう。RFP は元来脂溶性で水に対しては難溶性であるが, 3F-RFM SV については RFP および他の誘導体に比べて更にその傾向が強く, DNP⁴⁶⁾, 不飽和脂肪酸等⁴⁷⁾ の脱共役剤と同様, Mt の膜脂質に溶け込むことにより膜の構造ならびに機能の変化をもたらし⁴⁸⁾⁴⁹⁾ ものと推測される。

しかし大量の 3F-RFM SV を経口投与した場合に, *in vitro* における強力な脱共役作用にもかかわらず, 肝 Mt の呼吸およびリン酸化能はともに対照肝 Mt との間に有意の差異は認められない。この際 Fig. 4 および Table 5 から明らかなように, 3F-RFM SV 投与ラッ

トの体重増加および血清トランスアミラーゼ活性はともに対照群との間に明らかな差が認められない。3F-RFM SV のラット肝 Mt に対する作用のこうした相違は、おそらく、*in vitro* の場合の Mt に対する 3F-RFM SV の直接作用に対し、経口投与の場合には 3F-RFM SV が肝細胞ないしはオルガネラに至るまでに種々の barrier が存在することによるものと思われる。たとえば、特に 3F-RFM SV が血清蛋白と強い結合性をもつ⁵⁰⁾ことも、むしろ 3F-RFM SV の直接作用を免れるための1つの手段と考えることができる。またわれわれは、*in vitro* で 3F-RFM SV に酵素的に作用する未知物質がラットの小腸摩砕物中に存在することを確認し、現在詳細について検討中である。しかし 3F-RFM SV 投与ラットにおける上記の実験結果だけから、その生体内における作用を否定することは早計であろう。そのためには RFP および関連物質の細胞レベルならびに組織ないしは器官レベルでの作用を明らかにするとともに、それぞれの生体内代謝を明らかにすることが必要である。

いずれにせよ 3F-RFM SV に関しては、それが生体内では主としてどの臓器でどのように生成され、このものが生体内ではいかなる作用をもち、更にその作用が、RFP 投与による副作用とどのような関連をもつか等、今後追究すべき問題である。

結 論

1. RFP の宿主に対する生物作用を明らかにするとともに、副作用のうち特に肝機能障害との関連性を追究する目的で、RFP とその誘導体のラット肝 Mt の呼吸系に及ぼす影響について調べた。

2. 正常ラット肝より分離した Mt に対し、3F-RFM SV が著明な呼吸促進効果を示し、呼吸調節および酸化的リン酸化能の著しい低下が認められた。

3. 3F-RFM SV はまた、intact な Mt の潜在性 ATPase 活性を著明に促進し、ATP-³²Pi 交換反応に対する著明な阻害作用を示した。

4. しかし 3F-RFM SV を大量に経口投与したラット肝 Mt の呼吸および酸化的リン酸化能は対照との間に差が認められなかつた。この際、3F-RFM SV 投与ラットの体重増加には異常がなく、また血清トランスアミナーゼ活性にも明らかな異常は認められなかつた。

5. これらの結果から、3F-RFM SV が *in vitro* では肝 Mt に対し脱共役剤として作用することが明らかとなつた。3F-RFM SV は RFP の代謝産物と考えられるので、このものが *in vitro* で著明な脱共役作用を示すことは注目すべきである。3F-RFM SV の生体内での作用についてはなお検討すべき問題があり、RFP による副作用との関連においても追究する必要がある。

本研究の要旨は昭和 47 年 11 月第 45 回日本生化学会総会ならびに昭和 48 年 4 月第 48 回日本結核病学会総会において発表した。

なお本研究は、厚生省国立結核療養所中央個別研究費の配分を受けて行つた研究の一部である。

文 献

- 1) Sensi, P., Maggi, N., Furesz, S. and Maffii, G.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Philadelphia, 1966, Amer. Soc. Microbiol.: 699, 1967.
- 2) Furesz, S., Arioli, V. and Pallanza, R.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Philadelphia, 1965, Amer. Soc. Microbiol.: 770, 1966.
- 3) Arioli, V., Pallanza, R., Furesz, S. and Carniti, G.: Arzneimittel-Forsch., 17: 523, 1967.
- 4) Pallanza, R., Arioli, V., Furesz, S. and Bolzoni, G.: Arzneimittel-Forsch., 17: 529, 1967.
- 5) Hobby, G. L. and Lenert, T. F.: Amer. Rev. Resp. Dis., 97: 713, 1968.
- 6) Verbist, L. and Gyselen, A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98: 923, 1968.
- 7) Gyselen, A., Verbist, L., Cossemans, J., Lacquet, L. M. and Vandenbergh, E.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98: 933, 1968.
- 8) Wehrli, W., Knüsel, F., Schmidt, K. and Staehelin, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 61: 667, 1968.
- 9) di Mauro, E., Snyder, L., Marino, P., Lamberti, A., Coppo, A. and Tocchini-Valentini, G. P.: Nature, 222: 533, 1969.
- 10) Hartmann, G., Honikel, K. O., Knüsel, F. and Nüesch, J.: Biochim. Biophys. Acta, 145: 843, 1967.
- 11) Umezawa, H., Mizuno, S., Yamazaki, H. and Nitta, K.: J. Antibiotics, 21: 234, 1968.
- 12) Lancini, G. C. and Sartori, G.: Experientia, 24: 1105, 1968.
- 13) Wehrli, W., Nüesch, J., Knüsel, F. and Staehelin, M.: Biochim. Biophys. Acta, 157: 215, 1968.
- 14) Jacob, S. T., Sajdel, E. M. and Munro, H. N.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 32: 831, 1968.
- 15) Gallo, R. C., Yang, S. S. and Ting, R. C.: Nature, 228: 927, 1970.
- 16) Gurgo, C., Ray, K. R., Thiry, L. and Green, M.: Nature, 229: 111, 1971.
- 17) 特集“新抗生物質 Rifampicin について”臨床、診療: 928, 1970.
- 18) Symposium “Rifampicin in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis”, Chest, 61: 517, 1972.
- 19) Lesobre, R., Ruffino, J., Teyssier, L., Achard, F. and Brefort, G.: Rev. Tuberc. Pneumol., 33: 393, 1969.
- 20) Lees, A. W., Asgher, B., Hashem, M. A. and Sinha, B. N.: Brit. J. Dis. Chest, 64: 90, 1970.

- 21) 馬場治賢・高橋龍之助・吾妻洋：結核，46：481，1971.
- 22) 山田充堂・新谷和夫：結核，47：426，1972.
- 23) Blajchman, M. A., Lowry, R. C., Pettit, J. E. and Stradling, P. : Brit. Med. J., 3 : 24, 1970.
- 24) Poole, G., Stradling, P. and Worlledge, S. : Brit. Med. J., 3 : 343, 1971.
- 25) Bono, M. D. and Sisti, F. : Arch. Tisiol., 22 : 507, 1967.
- 26) Zierski, M. : Brit. Med. J., 1 : 183, 1972.
- 27) 山本和男・相沢春海・笹岡明一他：結核，47：467，1972.
- 28) Packer, L., Utsumi, K. and Mustafa, M. G. : Arch. Biochem. Biophys., 117 : 381, 1966.
- 29) 内海耕髓・小田琢三・倉橋研吾・宮原正信・保田雅夫：蛋白質核酸酵素，14：621，1969.
- 30) Hagihara, B. : Biochim. Biophys. Acta, 46 : 134, 1961.
- 31) 高橋泰常：生化学，26：690，1955.
- 32) Pullman, M. E. : Method Enzymol., 10 : 57, 1967.
- 33) Wadkins, C. L. and Lehninger, A. L. : Method Enzymol., 6 : 265, 1963.
- 34) Koch, F. C. and MacMeekin, T. L. : J. Am. Chem. Soc., 46 : 2066, 1924.
- 35) Cooper, C. and Lehninger, A. L. : J. Biol. Chem., 224 : 547, 1957.
- 36) Utsumi, K., Ohara, S., Yamamoto, G., Inaba, K., Urakami, H. and Yamamoto, M. : Acta Med. Okayama, 16 : 317, 1962.
- 37) Löw, H., Siekevitz, P., Ernster, L. and Lindberg, O. : Biochim. Biophys. Acta, 24 : 392, 1598.
- 38) Akimoto, T., Ono, K. and Nampo, T. : Jap. J. Antibiotics, 23 : 250, 1970.
- 39) Maggi, N., Furesz, S., Pallanza, R. and Pelizza, G. : Arzneimittel-Forsch., 19 : 651, 1969.
- 40) Tenconi, L. T., Pallanza, R., Beretta, E. and Furesz, S. : 6th International Congress of Chemotherapy (Tokyo), 1 : 346, 1969.
- 41) 清水喜八郎・国井乙彦：診療，23：969，1970.
- 42) Sunahara, S. and Nakagawa, H. : Chest, 61 : 526, 1972.
- 43) 中川英雄・砂原茂一：結核，48：167，1973.
- 44) Sano, K. and Hakusui, H. : Jap. J. Antibiotics, 23 : 416, 1970.
- 45) 岩崎龍郎・豊原希一：リファジン文献集，Vol.1（基礎編）（第一製薬KK）：152，1971.
- 46) Myers, D. K. and Slater, E. C. : Biochem. J., 67 : 558, 1957.
- 47) 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，13：113，1963.
- 48) Chappell, J. B. and Haarhoff, K. M. : Biochem. J., 105 : 75, 1967.
- 49) Packer, L. and Utsumi, K. : Arch. Biochem. Biophys., 131 : 386, 1969.
- 50) 中川英雄：臨床薬理，2：362，1971.