

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | furosemideのmitochondria呼吸・電子伝達系および組織adenine nucleotides含量への影響   |
| Author(s)    | 福原, 吉典  |
| Citation     | 大阪大学, 1981, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32997">https://hdl.handle.net/11094/32997</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 福原吉典  |
| 学位の種類   | 医学博士  |
| 学位記番号   | 第 5472 号  |
| 学位授与の日付 | 昭和 56 年 12 月 1 日  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 2 項該当  |
| 学位論文題目  | <b>furosemide の mitochondria 呼吸・電子伝達系および組織 adenine nucleotides 含量への影響</b> |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 阿部 裕<br>(副査)<br>教授 山野 俊雄 教授 田川 邦夫                              |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

利尿薬の特性は生理学的には解明されたが、生化学的にはなお充分とはいえない。著者は利尿薬分子が電子受容能を有するとの報告より、生体系における対象として電子伝達系を持つ mitochondria を選び、その呼吸・電子伝達系への強力活性利尿薬 furosemide の影響を検討した。次いで in vitro で証明された電子伝達阻害作用が、in vivo で ATP 産生に影響を及ぼすか否かを組織 adenine nucleotides 含量を測定し検討せんとした。

#### 〔方 法〕

SD 系雄性 rat の腎皮質、腎髄質、肝より萩原の方法で mitochondria を調製し、酸素消費速度測定、分光学的解析に供した。牛心筋 mitochondria は Azzone らの方法で調製、音波処理により submitochondrial particle とし、電子伝達系酵素活性測定に供した。

mitochondria 酸素消費速度に及ぼす furosemide の影響は三宅式電極槽、galvanic electrode を用い 25℃ の温度条件で測定した。mitochondria 電子伝達系酵素活性は音波処理 submitochondrial particle を用い、2,6-dichloroindophenol (DCIP), cytochrome c (cyt. c) を electron acceptor とし、Cary 17 autorecording spectrophotometer で測定した。mitochondria 呼吸鎖成分の redox state は日立二波長自記分光光度計 556 型を用い、cyt. b, cyt. c + c<sub>1</sub> を各々 ΔA 562—575 nm, ΔA 550—540 nm で測定した。腎・肝 adenine nucleotides 含量は、furosemide を経静脈性に注入した SD 系雄性 rat で経時的に測定した。腎・肝は摘除後直ちに freeze-clamp、一晩の凍結乾燥後過塩素酸で抽出、除蛋白し、KOH で中和測定に供した。ATP, ADP, AMP 測定は IEX540 陰イオン交換カラムを用い

た高速液体 chromatography によった。

〔成績〕

- (1) 腎皮質, 腎髄質, 肝 mitochondria の state 3 呼吸は, glutamate-malate, succinate いずれを基質とした際も furosemide  $10^{-4}$  M ~  $4 \times 10^{-3}$  M 添加により dose-related に抑制された。state 3 呼吸 50% 抑制に要する furosemide 濃度はいずれの場合も 1 ~ 2 mM であった。肝 mitochondria で SF 6847 ( $10^{-7}$  M) により解放された state 4 呼吸も furosemide ( $5 \times 10^{-6}$  M 以上) 添加により dose-related に抑制された。
- (2) 牛心筋音波処理 submitochondrial particle の NADH-DCIP reductase, NADH-cyt. c reductase, succinate dehydrogenase, succinate-cyt. c reductase 活性は furosemide 4 mM 添加により各々 3.8% (n. s.), 78.2% ( $p < 0.001$ ), 12.4% (n. s.), 79.2% ( $p < 0.001$ ) 阻害された。
- (3) rotenone (3%) + succinate 添加による state 4 の rat 肝 mitochondria に furosemide 2 mM を添加すると, cyt. b の還元率は 46% より 67% へ増加, 逆に cyt. c +  $c_1$  の還元率は 29% より 24% へと減少した。

以上より, furosemide は mitochondria 電子伝達阻害作用を有し, その阻害部位は電子伝達系酵素活性阻害, 呼吸鎖成分の cross over point より cyt. b ~ cyt. c 間であることが証明された。

- (4) furosemide 0.1 mg/kg B. W./hr 投与時には腎 adenine nucleotides 含量にはほとんど変化がみられないが, 10, 20 mg/kg B. W./hr 投与時には経時的な ATP 含量の減少 (control  $7.64 \pm 0.16$ , 各々 60 分目の値,  $5.27 \pm 0.36$ ;  $p < 0.05$ ,  $5.42 \pm 0.19 \mu$  moles/g dry weight;  $p < 0.05$ ), AMP 含量の増加, total adenine nucleotides 含量 (=ATP+ADP+AMP) の減少 (control  $10.83 \pm 0.25$ , 各々 60 分目の値  $9.47 \pm 0.14$ ;  $p < 0.05$ ,  $9.80 \pm 0.14 \mu$  moles/g dry weight;  $p < 0.05$ ) を認めた。3 mg/kg B. W./hr でも有意ではないものの同様の傾向を認めた。

肝 adenine nucleotides 含量は, furosemide 3, 20 mg/kg B. W./hr 投与中の全経過を通じ control 値 (ATP  $13.09 \pm 0.42$ , ADP  $3.96 \pm 0.23$ , AMP  $1.15 \pm 0.11$ , total  $18.21 \pm 0.42 \mu$  moles/g dry weight) との間に差を認めなかった。

以上の成績は in vitro で示された furosemide の電子伝達阻害作用が, in vivo でも発現され, ATP 産生抑制に働いていることを示唆する。腎で adenine nucleotides 含量に変化がみられ, 肝では認められなかったことは, furosemide 作用の臓器特異性の一端を示すものと考えられる。

〔総括〕

- (1) furosemide は単離 mitochondria (rat 腎皮質, 腎髄質, 肝) において,  $10^{-4}$  M 以上の濃度で state 3 呼吸を抑制する。その機序として mitochondria 電子伝達系を cyt. b ~ cyt. c 間で阻害する antimycin A 様電子伝達阻害作用を furosemide が有することを明らかにした。
- (2) in vivo における furosemide 投与 (10, 20 mg/kg B. W./hr) により, 腎 ATP, total adenine nucleotides 含量減少, AMP 含量の増加が認められたが, 肝ではこれらの変動を認めなかった。この成績は in vitro で証明された furosemide の作用が in vivo でも発現されていることを窺わせ, かつ furosemide 作用の臓器特異性の一端を示すものである。

## 論文の審査結果の要旨

利尿薬の生化学的特性に関する研究は現在に至るまで極めて少ない。薬物の生化学的特性を明らかにすることは、生体内での薬物の諸作用の解明につながり非常に有用と考えられる。本研究では利尿薬 furosemide が単離 mitochondria に対し state 3 呼吸抑制, cyt. b~c<sub>1</sub> 間での電子伝達阻害作用を有する点, rat に furosemide を投与した際, 腎では ATP, total adenine nucleotides 含量減少, energy charge 低下をおこすが, 肝のそれは不変であることを明らかにした点で価値ある研究と評価できる。