

# 血球及び組織細胞の ATP-ase 活性に関する 生化学的並びに組織化学的研究

## 第 3 編

### 白血病化学療法剤の ATP-ase 活性に及ぼす影響について

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾左知丸教授)

大 谷 恭 一 郎

[昭和32年12月31日受稿]

#### I. 緒 言

各種抗白血病剤の中で Nitrogen-mustard (NM) 及びその誘導体は細胞分裂の抑制, 突然変異の誘起, 発癌起炎作用, 諸種酵素作用の抑制, 核酸合成の抑制, 白血球の破壊等の諸作用を有し, これ等の X 線に類似する生物学的作用のため Radiomimetic Compounds と呼ばれ, その興味ある作用機序に関しては多数の業績を見る事が出来る。これ等の中で SH 基との関係についても多くの人によつて追求され, 夫々一定の成果が得られている。即ち, Hellerman<sup>1)</sup> は NM が cysteine や glutathione の SH 基と結合する事を発見し, 続いて Barron 等<sup>2,3)</sup>, Loveles<sup>4)</sup> 及び平出<sup>5)</sup> は NM による生体内 SH 基阻害がその生物学的作用発現に重要な意味をもつ事を明かにした。木村等<sup>6)</sup> はウニ卵の卵割に及ぼす NM 並びに Nitrogen-mustard-N-oxide (NMNO) の作用を観察し, これ等の作用により一度停止した卵割が cysteine や glutathione の如き SH 試薬添加により 15~25 分後再び正常卵割過程に戻る事を見出して, 可逆性の SH 基阻害を証明している。

NM の作用機序と NMNO のそれとが本質的に同種のものであり, NMNO は注射後生体内の摂取された場所の酸化還元的環境に支配されて, 逐次 NM を生じこれにより作用を発現するという事は既に石館等<sup>7,8)</sup> により報告された。

私は前報<sup>9)</sup> に於て SH 酵素としての ATP-ase 活性が X 線照射動物に於て時間的に可成り著明な変動を示す事を明らかにしたが, 今回は NMNO の ATP-ase 活性に及ぼす影響を検索し, これを注射した場合及び組織切り出し後体外的にこれで処理した場合

の ATP-ase 活性について興味ある結果を得たので報告する。又細胞分裂毒として有名な Colchicine の作用が, 細胞分裂期の紡錘糸に働く ATP の力を阻害するものであり, 十分 ATP を加えると分裂阻止が起らないという木村<sup>6)</sup> 等の報告に基き, ATP-ase 活性に対する NMNO の作用と Colchicine の作用を比較検討した結果も併せて報告したい。

#### II. 実験材料及び方法

正常マウスの腹腔内に NMNO の 1% 水溶液を致死量を遙かに越える 300 mg/kg B. W. の割合で注入し, その後の時間的経過を追つて肝・脾・心・腎・十二指腸の ATP-ase 活性の変動を生化学的及び組織化学的に追求した。この注射量では体重 15~20 g のマウスは大多数 6~8 時間後に死亡する。

次に正常組織を NMNO で体外的に処理した場合の ATP-ase 活性への影響をしらべ, 又 Colchicine による影響と比較するため, 正常マウスの上記各臓器及び正常家兎末梢血・骨髓を用い, これ等を夫々正常 media,  $10^{-2}$  mol NMNO 添加 media,  $10^{-6}$  mol Colchicine 添加 media の 3 者で反応させた時の ATP-ase 活性を生化学的に測定して比較した。

これと同時に組織化学的には, 正常組織切片及び末梢血塗抹標本, 骨髓スタンプ標本等を予め上記濃度の NMNO 或は Colchicine 溶液に 30 分浸漬後蒸溜水で十分洗い, 標準基質液又は cysteine 添加基質液で反応を試みた。

以上何れの場合に於ても反応の実施方法はすべて前報<sup>10)</sup> に述べた通りである。即ち ATP は家兎及び犬の骨骼筋から Lohmann の方法<sup>11)</sup> を用いて抽出精製したものを用い, 生化学的方法では Myosin

ATP-ase 活性を Perry の方法<sup>12)</sup>で, Mitochondrial ATP-ase 活性を Kielley の方法<sup>13)</sup>で測定した。組織化学的には冷中性ホルマリン固定凍結切片のみを用い, 末梢血はホルマリンガス固定塗抹標本を, 骨髄は未固定スタンプ標本を夫々用いた。NMNO は市販の Nitromin を使用した。

### III. 結 果

#### 1. 腹腔内注射の場合

正常マウスの腹腔内に NMNO 1% 水溶液 300 mg/kg B. W. を注入して, その後時間的に肝・脾・心・腎・十二指腸の ATP-ase 活性の変動をしらべると, 生化学的には各臓器共大体類似した変動を示した (Fig. 1~Fig. 5)。

即ち Myosin ATP-ase 及び Mitochondrial ATP-ase 共その活性は注射後30分で或程度の低下を来し, 3時間後には一度回復して正常値附近乃至はそれ以上にまで上昇する。この上昇は肝に於て最も著明であり, 又十二指腸の Mitochondrial ATP-ase のみはこの回復が認められなかつた。その後これ等の活性は再び次第に下降し来り, マウスが死戦期にあ

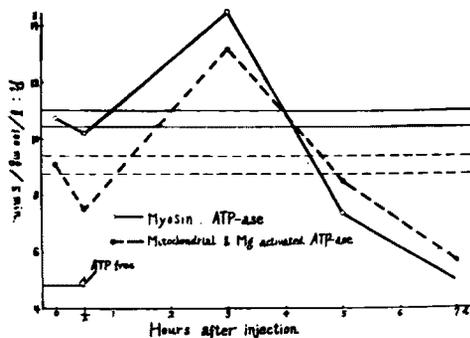


Fig. 1 ATP-ase Activity of Liver after Nitromin-injection (300 mg/kg B. W.)

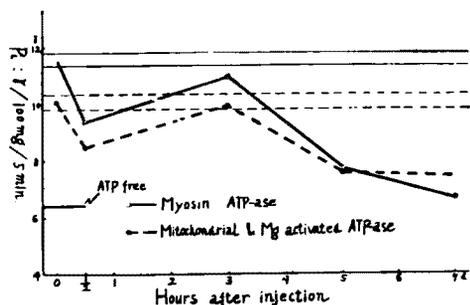


Fig. 2 ATP-ase Activity of Spleen after Nitromin-injection (300 mg/kg B. W.)

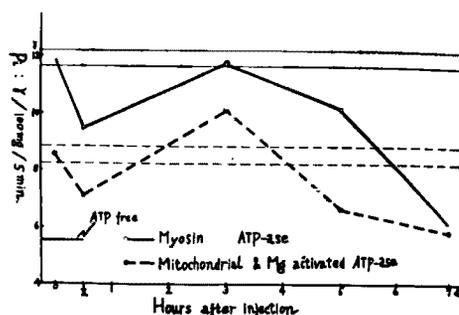


Fig. 3 ATP-ase Activity of Heart after Nitromin-injection (300 mg/kg B. W.)

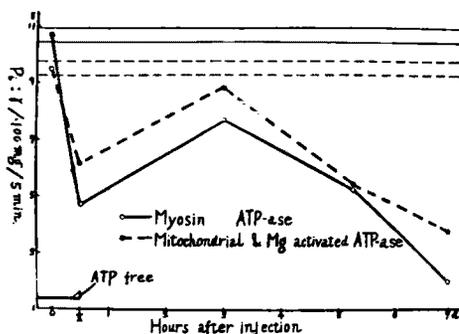


Fig. 4 ATP-ase Activity of Kidney after Nitromin-injection (300 mg/kg B. W.)

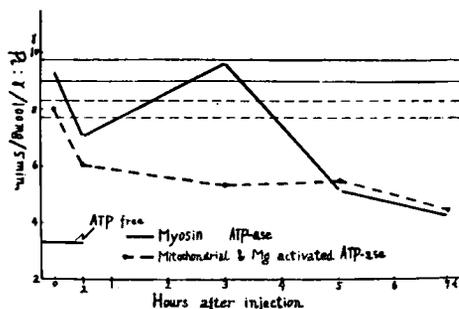


Fig. 5 ATP-ase Activity of Duodenum after Nitromin-injection (300 mg/kg B. W.)

る7時間後では例外なく著明な低下を来し各臓器の固有無機燐量にまで近づく程である。Mitochondrial ATP-ase 活性はX線照射の場合と異り, Myosin ATP-ase 活性の変化に先行するような傾向を示す事なく, 大体平行的の関係を保ちつつ変動するのが特徴である。全経過中の活性の変動範囲は各臓器共常に Myosin ATP-ase の方が大であり, 注射前の正常時には Mitochondrial ATP-ase 活性より高値を示していた Myosin ATP-ase 活性が, 死戦期に於ては反対により低い値をとるものが多い。

組織化学的には、各臓器共注射後 3~5 時間以内の活性の変動は殆んど認め難い程度のものであつたが、約 7 時間後の死戦期に於けるものに於ては心筋線維、肝実質細胞、腎細尿管上皮基底部等の染色性の或程度の低下を認める事が出来た。血管壁の反応は殆んど不変であるが、脾髄の血球の反応は予期に反して幾分の低下を示した。

2. 体外的処理の場合

正常マウスの肝・脾・心・腎・十二指腸及び正常家兎の末梢血・骨髄の Myosin ATP-ase 活性並びに Mitochondrial ATP-ase 活性を、正常 media,  $10^{-2}$  mol NMNO 添加 media,  $10^{-6}$  mol Colchicine 添加 media の 3 種を用いて生化学的に測定した結果は Fig. 6 及び Fig. 7 に示す通りである。これ

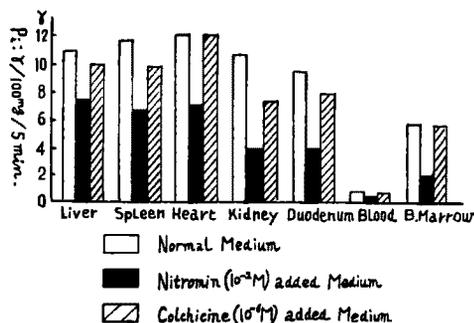


Fig. 6 A Comparison of Myosin ATP-ase Activity in Normal and Nitromin or Colchicine added Media

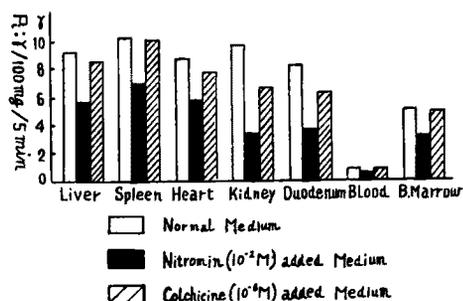


Fig. 7 A Comparison of Mitochondrial ATP-ase Activity in Normal and Nitromin or Colchicine added Media

等により明らかな如く、Myosin ATP-ase 及び Mitochondrial ATP-ase 共 medium に NMNO を添加する事によりすべての臓器に於て著明な活性の低下を来し、極端な時は正常の半分以下の値を示すのであるが、Colchicine 添加によつては活性値は不

変又は極く軽度の低下を来すに過ぎない。

組織化学的方法によつても、組織切片又は末梢血塗抹標本、骨髄スタンプ標本等を予め NMNO で処理すると、各臓器、組織により色々の程度の反応性の低下を認める事が出来るが、Colchicine 処理による影響は全く見られない。即ち肝に於て切片を予め  $10^{-2}$  mol NMNO 溶液に 30 分間浸漬後染色した場合、実質細胞の反応は明かに減弱され毛細胆管も染まつて来ない。血管壁の染色も幾分減弱したように見えるがこれは極めて軽度である。NMNO 処理後 cysteine 添加基質液で反応させると、肝細胞の反応が幾分回復するようであるが、毛細胆管が染つて来るまでには至らない。脾に於ては脾髄の血球その他の染色が NMNO により明らかに低下し、濾胞中心動脈壁の反応も或程度減弱している (Plate Fig. 1, 2)。

心に於ては心筋線維の染色性は NMNO により著明に減弱されるが冠狀動脈壁の黒染は殆んど影響されない。cysteine 添加基質液で反応させると心筋線維の反応が或程度回復されて来るのが認められる (Plate Fig. 3, 4, 5)。腎に於ては細尿管上皮基底部に軽度に認められる反応が NMNO により全く消失する以外、糸球体や腎動脈壁等の染色は何等の変化も受けず cysteine の影響も見られなかつた。十二指腸に於ても粘膜上皮、十二指腸腺上皮及び平滑筋層等の反応は NMNO 処理に対し殆んど影響を受けない。X線によつて活性の変化が殆んど見られなかつた末梢血又は骨髄の血球の反応が NMNO により著明に減弱されるのは面白所見である (Plate Fig. 6, 7)。しかし cysteine による回復は全く見られない。

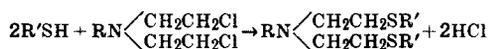
IV. 総括並びに考按

NM 及びその誘導体が放射線に類似する生物学的作用を有するため、Radiomimetic Compounds と呼ばれ、特に生体内 SH 基と結合してその作用を阻害する事は前述の如く多くの人々により報告されている。前報<sup>9)10)</sup>に於て私は SH 酵素である ATP-ase に関し ATP を基質として生化学的並びに組織化学的に正常組織に於ける活性を追求し、PCMB, cysteine を使つて真の ATP-ase の組織化学的反應がどのようなものであるかを示し、又一方大量の X線照射動物に於て ATP-ase 作用の阻害される事を示した。この結果から真の ATP-ase の反応を確立すると共に X線阻害によつて組織の ATP-ase 活性が

如何に変化するかを示した。而して更に今回の実験により NMNO も又 ATP-ase 活性を著明に阻害することを明かにし得た。

即ち致死量を越える大量の NMNO を正常マウスの腹腔内に注射した場合は、大量 X 線照射の時と同様 ATP-ase 活性値は時間的に著明な変動を来すが、変動範囲は後者の時より更に大きく正常活性値の 50% 以上にも及び、殊に死戦期の低下が甚だしい。各臓器とも時間的に大体一致した変動を示し、Myosin ATP-ase と Mitochondrial ATP-ase の両者も平行的に変化するのが特徴である。NMNO が注射後逐次 NM に変わりこれにより作用を発現する事は石館等<sup>7,8)</sup>の報告の如くて、両者の作用は本質的に同一と考えられる。

然し NM が SH 基と結合する場合は



の如く一種のアルキル化反応であり<sup>14)</sup>、生体内の単なる酸化還元要素の影響によるものではないので、X 線照射の場合にくらべて比較的一定した大なる変動を示すものとも考えられる。

NMNO による正常臓器組織の体外的処理の場合に於ても ATP-ase 活性の著明な低下が認められているが、特に組織化学的所見は興味深いものがある。即ち前編<sup>10)</sup>に報告した如く SH 酵素としての特異的 ATP-ase 活性に間違いないと考えられる心筋線維の反応が明らかに減弱しているのは当然であるが、特異的 SH 賦活剤乃至阻害剤に対して何等の影響の認められなかつた血球の反応が著明に減弱されているのである。しかも血球と同一群と考えられた血管系の反応は NMNO によつても矢張り大した低下を来たしていない。又肝実質細胞及び毛細胆管、腎細尿管上皮細胞基底部等の反応が NMNO で減弱されるのに、これ等と同一種類と思われた十二指腸壁平滑筋の反応は殆んど不変である。かかる現象の本態については、組織化学的に表現される ATP 分解酵素の複雑性によるという外はなく、不明の点が多いが、SH 基以外の活性基をもつ ATP 分解酵素の或種のものを NMNO が阻害する結果によることだけは確実である。

NMNO と SH 基との結合はアルキル化反応であり、SH 化合物によつても回復不能と考えられるが、木村等<sup>6)</sup>は NM によるウニ卵の卵割阻害が SH 試薬添加により回復する事実を報告しており、私も今回の実験で NMNO 処理後 cysteine 添加基質液で

反応さす事により心筋線維及び肝実質細胞の染色性が幾分回復する事を見出した。この事実から NMNO の SH 基阻害には一部に於て単なる酸化等の可逆性の過程も含まれていると考えざるを得ない。

Colchicine 処理による ATP-ase 活性への影響は殆んど認められなかつたが、これによつても細胞分裂の抑制の本態が NMNO と全く異なる機序によるものである事は明らかである。Colchicine の作用が細胞分裂期の紡錘糸に働く ATP それ自体を阻害する<sup>6)</sup>という報告と併せて考えると、私の使用した反応液中には十分な量の ATP を含有していたので酵素作用の阻害を起すに至らなかつたのであろうと想像される。即ち Colchicine の作用は非常に不安定なもので、十分な ATP の存在はその作用を打消すように作用するものと考えられる。

何れにしても以上の実験結果から考えて、NMNO 乃至は NM の生物学的作用の機序には生体内 SH 基阻害が重要な意味をもつ事は間違いないといえようし、ATP-ase その他の主要 SH 酵素の不活性化はその NMNO 作用の主要部分を占めるものと考えられる。

## V. 結 論

正常マウスの腹腔内に Nitrogen mustard n-oxide (NMNO) の 1% 水溶液を 300 mg/kg B. W. の割合で注入し、その後の時間的経過を追つて肝・脾・心腎・十二指腸の ATP-ase 活性の変動をしらべた。この注射量では体重 15~20 g のマウスは大多数 6~8 時間後に死亡する。又注射群とは別に正常マウスの上記各臓器及び正常家兎の末梢血、骨髄を用い、これ等を夫々正常基質液、 $10^{-2}$  mol NMNO 添加基質液、 $10^{-6}$  mol Colchicine 添加基質液の 3 者で反応させた時の ATP-ase 活性を比較した。

1) NMNO 注射後各臓器の ATP-ase 活性は時間的に大体類似の変動を示した。即ち Myosin ATP-ase, Mitochondrial ATP-ase 共その活性は注射後 30 分で軽度の低下を示し、3 時間後には一度回復して正常値附近乃至はそれ以上にまで上昇する。例外として十二指腸の Mitochondrial ATP-ase のみはこの回復が認められなかつた。その後はこれ等の活性は再び下降し、死戦期にある 7 時間後では例外なく著明な低下を見せ、その臓器の固有無機燐量にまで近づく程である。この低下は組織化学的にも明らかに認める事が出来た。全経過を通じ Mitochondrial ATP-ase 活性の変動は Myosin ATP-ase のそれに

比し軽度であつた。

2) 正常組織を NMNO 添加基質液で反応させると ATP-ase 活性の著明な低下を示すに反し, Co-lehicine 添加では然々無影響か又は極めて軽度の低下を示すに過ぎなかつた。

3) 組織化学的には NMNO 処理では心筋線維, 肝実質細胞及び毛細尿管, 脾髄の血球・腎細尿管上皮細胞基底部分の反応性の明らかな低下が見られ, X線照射により影響の見られなかつた末梢血及び骨髓の血球の反応も著明に減弱する。これ等の中で

cysteine 添加基質液で反応させた場合, 心筋線維及び肝実質細胞の反応は或程度回復する。

稿を終るに当り恩師妹尾教授の御懇篤なる御指導と御校閲に深く感謝する。尚本実験は岡山大学第1生理学教室村上助手の御援助に負う所甚だ大であるので記して謝意を表す。本研究は文部省科学研究費の援助を受けた。

(本研究の要旨は日本病理学会第46回総会に於て報告した)

### 参 考 文 献

- 1) Hellerman, L.: Personal communication, 1943.
- 2) Barron, E. S. G., Bartlett, G. R. & Miller, Z. B.: J. Exptl. Med., 87, 1948.
- 3) Barron, E. S. G., Bartlett, G. R., Miller, Z. B., Meyer, J. & Seegmiller, J. E.: J. Exptl. Med., 87, 1948.
- 4) Loveles, A.: Nature, 167, 1951.
- 5) 平出: 化学の領域, 2, 1947.
- 6) 木村, 太田, 仲田: 最新医学, 11, 1956.
- 7) 石館, 小林, 桜井, 佐藤, 吉田: 日本学士院紀要, 27, 1951.
- 8) 石館, 桜井, 吉田, 佐藤, 松井, 今村: 第12回日本癌学会発表, 1952.
- 9) 大谷: 岡山医学会誌, 本巻, 第2篇.
- 10) 大谷: 岡山医学会誌, 本巻, 第1篇.
- 11) Lohmann, H.: Biochem. Z., 202, 1929.
- 12) Perry, S. V.: Methods in Enzymol., 2, 1955.
- 13) Kielley, W. W.: Methods in Enzymol., 2, 1955.
- 14) Barron, E. S. G.: Advances in Enzymol., XI, 1951.

### 写 真 説 明

- Fig. 1. 脾, 冷中性フォルマリン固定凍結切片, ATP, 30分,  
脾髄の細胞は略々様に中等度の黒染を示し, 濾胞の胚中心のみは幾分反応が弱い。濾胞中心動脈その他の血管壁の染色も見られる。
- Fig. 2. 脾, 同上切片,  $10^{-2}$ mol NMNO 溶液30分後, ATP, 30分,  
脾髄の細胞の染色が明かに低下し, 動脈壁の反応も或程度減弱している。
- Fig. 3. 心, 冷中性フォルマリン固定凍結切片, ATP, 30分,  
心筋線維及び冠狀動脈壁に高度の反応が見られる。
- Fig. 4. 心, 同上切片,  $10^{-2}$ mol NMNO 溶液30分後, ATP, 30分,  
心筋線維の反応は著明に減弱しているが, 冠狀動脈壁の黒染は大した影響を受けていない。
- Fig. 5. 心, 同上切片,  $10^{-2}$  mol NMNO 溶液30分後, ATP + Cysteine, 30分,  
心筋線維の反応が或程度回復されている。
- Fig. 6. 家兎骨髓, 未固定スタンブ標本, ATP, 2時間,  
骨髓細胞の胞体に強い黒染が見られる。
- Fig. 7. 家兎骨髓, 同上標本,  $10^{-2}$ mol NMNO 溶液30分後, ATP, 2時間,  
骨髓細胞の胞体の反応が著明に減弱されている。

Biochemical and Histochemical Studies on ATP-ase Activities  
of Blood and Tissue Cells

Part 3.

The Effects of Anti-Leukemic Agents, Nitrogen Mustard n-Oxide  
(NMNO) and Colchicine, on the ATP-ase Activity

By

Kyohichiro OHTANI. M.D.

Department of Pathology, Okayama University Medical School  
(Director : Prof. Satimaru Seno)

Among the various anti-leukemic agents, nitrogen mustard and its derivatives have the similar biological effects identical with x-ray inactivating the SH group. Following up the author's former reports, in which a marked fluctuation of ATP-ase activity in various tissues of the x-ray irradiated mice was described, the author reports the effect of NMNO on the ATP-ase activities of the liver, spleen, heart, kidney and duodenum of mice. By a single injection of 1% NMNO, 300 mg/Kg., most of the adult mice died after 6 to 8 hours. Hourly observations revealed the marked fluctuation of ATP-ase activity in various organs as in the case of x-ray irradiation. The activities both of myosin and mitochondrial ATP-ase decreased slightly in every organ 30 minutes after the injection of NMNO, and then increase slightly reaching nearly the normal level after 3 hours. Further observations revealed that the transient recovery of activities decreased again, reaching the level of inorganic P contents proper to each organ 7 hours after injection. The histochemical observation revealed also a marked decrease in the activity of ATP-ase. The inhibitory effect of NMNO to the ATP-ase activities was also proved in vitro, adding  $10^{-2}$  mol. NMNO in the incubating media. The colchine, a mitotic poison, added in the same media  $10^{-2}$  mol. effected only a slight decrease in ATP-ase activity. The incubation with L-cysteine after the treatment with NMNO restored the ATP-ase activity to a certain degree. In the case treated with NMNO a marked decrease in the reactions of liver parenchymal cells, biliary tubules, blood cells of splenic pulp, cardiac fibers, the basillar part of epithelial cells of renal tubules is observable; and reactions of peripheral blood and blood in bone marrow, which received no effect from X-ray irradiation, are reduced markedly. However, when the reaction is made to take place in the substrate loaded with cysteine, only the reactions of cardiac fibers and liver parenchymal cells are restored to a certain degree.

---

大谷論文附図

