

家兎腎および膀胱ミクロソーム膜系 ATPase の特性と脊髄損傷動物におけるその修飾と Robaveron 投与の影響

—とくにショ糖密度勾配法による ATPase 活性分布
を中心にした解析—

日本商事医薬研究所生物研究部

下 平 正 文*

今 川 登 之

水 野 耕 治

秋 本 吉 信

星ヶ丘厚生年金病院泌尿器科

中 新 井 邦 夫

山 田 薫

CHARACTERISTICS OF ATPase IN THE MICROSOMAL MEMBRANE OF THE RABBIT KIDNEY AND BLADDER:CHANGE AFTER SPINAL INJURY AND EFFECT OF ROBAVERON AN ANALYSIS OF ATPase ACTIVITY DISTRIBUTION BY MEANS OF SUCROSE DENSITY GRADIENT METHOD

Masafumi SHIMOHIRA*, Takayuki IMAGAWA,

Koji MIZUNO and Yoshinobu AKIMOTO

From the Biological Division, Research Laboratory of Nippon Shoji Kaisha, Ltd.

Kunio NAKAARAI and Kaoru YAMADA

From the Department of Urology, Hoshigaoka Welfare Pension Hospital

ATPase in the microsomal membrane of the rabbit kidney and bladder and the related biological macromolecules such as protein and nucleic acid were submitted for the analysis with the sucrose density gradient method in order to know their *in vitro* localization and distribution. On the other hand, the *in vivo* experiment was carried out, with the above group being a standard model, on the rabbits with experimentally induced spinal injury and those with such injury treated with Robaveron.

The following results were obtained.

- 1) ATPase localized in the membrane of organelles such as microsomes, mitochondria, granules, lysosomes and their upper fraction showed the distribution of the regular fashion corresponding well to the protein fractions.
- 2) ATPase of the microsomal membrane of the kidney and bladder, namely 48,000 × g frac-

* 現在：台糖フェイザー株式会社生産本部品質管理部

tion, showed a localization of a single peak exactly corresponding to the distribution of other membrane biological macromolecules such as protein and nucleic acids. This distribution changed to the dual peak pattern under the action of Brij 58 showing the elevation of the relative activity of ATPase. Two peaks consisted of the low density fraction and the upper layer fraction. On the other hand, this enzyme was shifted, under the presence of DOC, to the fraction of the heavy specific gravity accompanied by formation of a new fraction of low density.

3) In animals with injury at the low spinal cord the kidney ATPase and the microsomal biological macromolecules moved to the low density area just as seen in the addition of Brij 58 to the normal rabbit. Administration of Robaveron resulted in restoration to the normal pattern.

4) Hemoglobin-like pigment appearing in the supernatant fraction of the kidney and bladder microsome after spinal cord injury, either the high or low, was effectively inhibited by means of administration of Robaveron.

5) Microsomal ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase was partly purified in the animals, normal, spinal cord injury and Robaveron-treated. The relative activity of this enzyme of these three groups showed no significant difference.

From the results as above, therapeutic effect of Robaveron for the difficulty in urination in spinal cord injury was proved to be related with functional repair of the membrane microsome of the kidney and bladder.

はじめに

家兎における実験的脊髄損傷(以下単に脊損と略称)に伴う排尿機能障害に対する前立腺抽出物(Robaveron)の効果については、脊損部位を異にする動物群を用いて、膀胱内圧および筋電図、膀胱組織呼吸能および ATPase 活性変動に及ぼす修復作用を中心にすでに報告した¹⁻³⁾。

一方求心、遠心の両性神経を介する反射弓回路の障害に基づく脊損症においては、膀胱筋肥厚に伴う基質的变化とともに⁴⁻⁶⁾、家兎でみられるように glycogen 分解系の抑制、energy 産生の低下⁷⁾なども報告されており、その実態の多様性がうかがわれる。

このほか、脊損症では、とくにその末期において重篤な腎機能障害をきたすという報告があり^{8,9)}、排尿機能を中心とする一連の神経因性障害は、その発生頻度の増大に伴い、近年臨床領域でとくに注目を呼んでいる。

そこで、今回われわれは、家兎における実験的脊損病態に対する Robaveron の影響を生化学的に解明する目的で、腎および膀胱ミクロソーム ATPase を中心に、膜系高分子群の局在性分布についてシヨ糖密度勾配法を用いて、次の諸点に関する検討を試みた。

i) 正常家兎の腎および膀胱ミクロソーム膜系 ATPase およびその他の生体高分子(タンパク質および核酸)の局在分布の特性。

ii) 脊損家兎腎ミクロソーム膜系 ATPase 局在性分布の修飾と Robaveron 投与によるその修復効果。

iii) 脊損家兎腎および膀胱ミクロソーム上清分画に出現する血色素様色素と Robaveron 投与によるその抑制作用。

iv) 脊損家兎腎および膀胱ミクロソーム ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase 活性と Robaveron 投与の影響について。

以下これらについて得られた実験成績の概要について述べたい。

実験材料および方法

供試実験動物の選択、管理法などについては前報¹⁾に準じておこなった。

1. 腎細胞分画法

A) Maunsbuch 法^{10,11)}による重細胞全顆粒分画—上記の基準で選ばれた体重 2kg 前後の雄性家兎5羽を用いて、腎 cortex, medulla を含む全組織(湿重量で1対の腎から平均 18.7 g を得た)を摘出した。試料を鉄で細片にして、0.44 M シヨ糖溶液中で、テフロンホモジナイザーを用い、10%ホモジネートを調製した。この粗調製物を出発材料として、Fig. 1 に示す要領でこれを (A) 上清部(主としてミクロソーム膜系成分を含む)と (B) その沈殿部(0.44 M sucrose に再浮遊させた分画を primary granule 分画と呼び、リソソーム、ミトコンドリアなどをはじめ比較的比重の大きい細胞顆粒混合物を含む)の2つの部分に分離した。これら2つの試料をそれぞれ 1.1~1.9 M のシヨ糖密度勾配液上に重層し、日立 55P-2A 型超遠心機、RPS-2A 型 swinging bucket rotor で 25,000 rpm

Fig. 1. Preparation of the sub-cellular fractions of rabbit kidney.

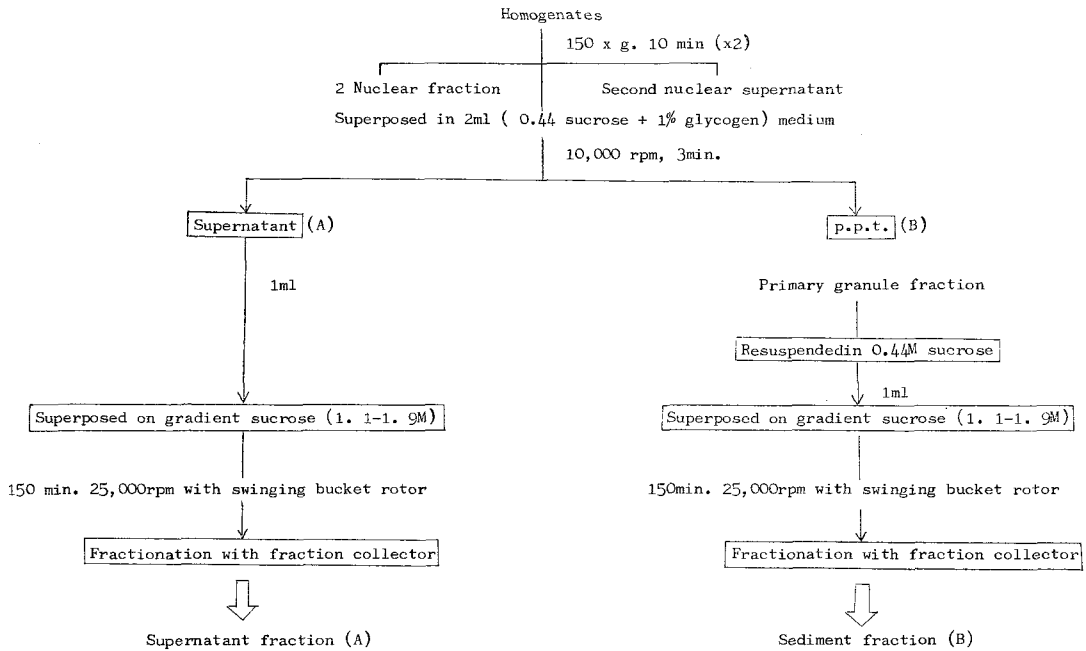


Fig. 2. Preparation of rabbit renal microsomal fractions.

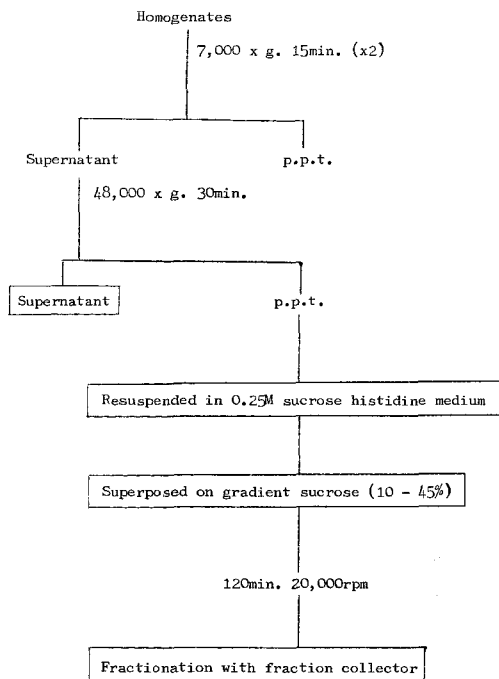
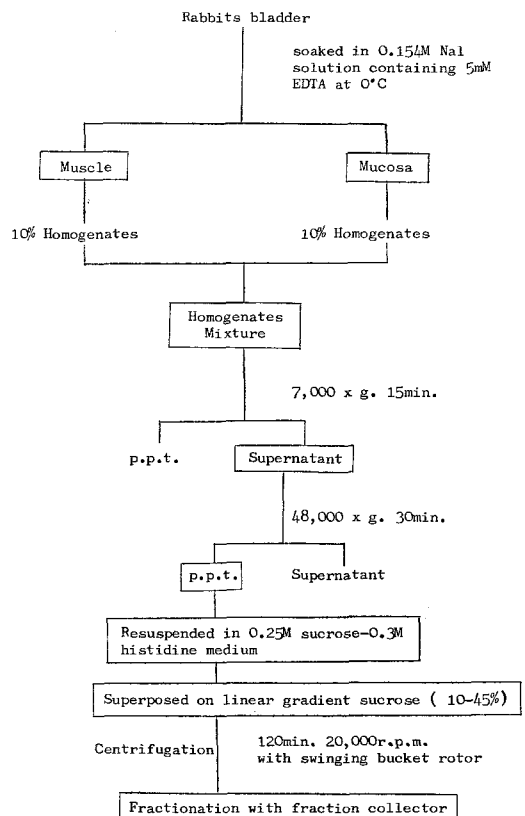


Fig. 3. Preparation of microsomal fractions from rabbit bladder.



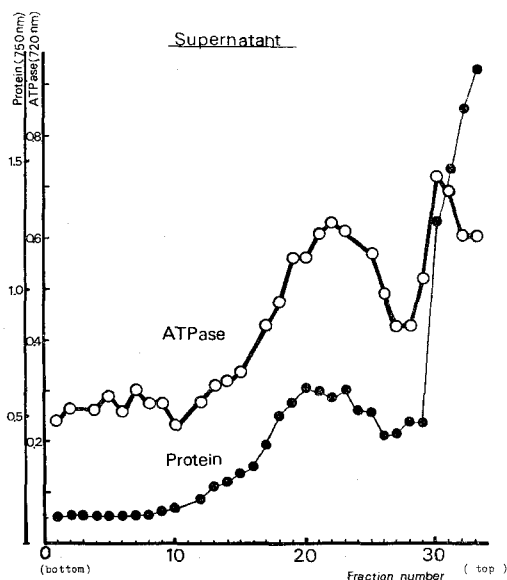


Fig. 4. Distribution of membrane ATPase and proteins in the supernatant fraction of sub-cellular particles of rabbit kidney (Maunsbuch method: see text).

150分間遠心分離したのち、fraction collector, Toyo, SF 160 (rectangular balance-operated fraction collector) で33分画前後に分離した。

B) Jørgensen-Skou 法¹²⁾による腎ミクロソーム分画—腎は、Maunsbuch 法の場合と同様に摘出した。摘出腎から、0.25 M sucrose-histidine (0.03 M) 凍結メデウム上で、cortex のみを注意深く集めた。これを前記と同様に10%ホモジネートとして、Fig. 2 に示す要領で $48,000 \times g$ のミクロソーム膜系成分として回収し、前記に準じて10~45%のシヨ糖密度勾配法で、20,000 rpm 120分間遠心分離して分画した。

2. 膀胱ミクロソーム分画

Cortas¹³⁾とJørgensen-Skou 法¹²⁾の組み合わせによる方法で調製した。概要はFig. 3に示すごとく、腎の場合と同様、10~45%のシヨ糖密度勾配法で20,000 rpm 120分間遠心分離後に分画した。

3. ATPaseの測定

50m M Tris buffer (pH 7.4), 3 mM $MgCl_2$ 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM ATP (pH 7.0) と ATPase 試料を含む全量 2 ml の反応液¹⁴⁾を $37^\circ C$, 10 分間保温したのち、10% TCA 2 ml を添加して反応を停止させた。この遠心清 2 ml について、Fiske-Subbarow 法¹⁵⁾で遊離 Pi を測定し ATPase 力価を推定した。

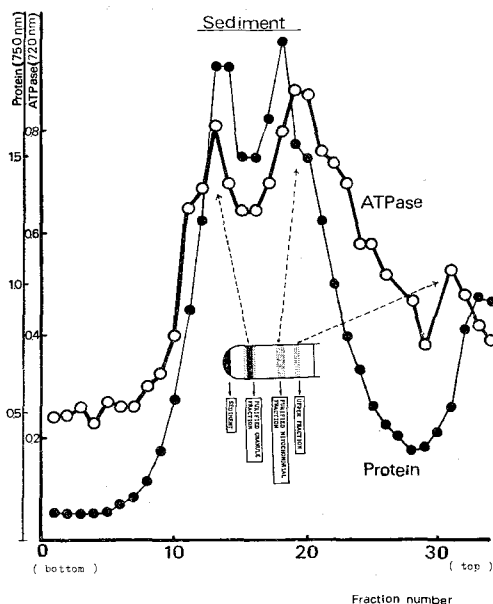


Fig. 5. Distribution of membrane ATPase and proteins in the sediment fraction of sub-cellular particles of rabbit kidney (Maunsbuch method: see text).

4. (Na^+K^+) ATPase の測定

実験成績の部で記載する(本文および図表の脚注)要領でとくに 2 mM の EDTA と DOC の選択的な適用によって本酵素を部分的に純化した。これを用いて、ouabain を加えた反応液中で Na^+ , K^+ の濃度組み合わせを変えながら (Na^+K^+) ATPase の推定酵素力価を Allen 法¹⁶⁾で測定した。

5. タンパク質および核酸の定量

各試料について、タンパク質は Lowry 法¹⁷⁾で、核酸は 260 nm の吸収によってそれぞれ推定した。

6. $48,000 \times g$ ミクロソーム上清分画中に出現する色素様色素の特異吸収の追跡

一定率に希釈した試料について、350~540 nm における吸収スペクトラムを測定した。とくに 415 nm における特異吸収の程度でその強さを推定した。

7. 腎損家兎の調製法と Robaveron の投与法

8. 試薬その他

酵素定量用試薬は、すべて半井化学製の試薬特級を、ATP は Sigma 社製のものを用いた。

実験結果

1. Maunsbuch 変法^{10,11)}により抽出した腎全組織の垂細胞分画中に分布する ATPase 活性

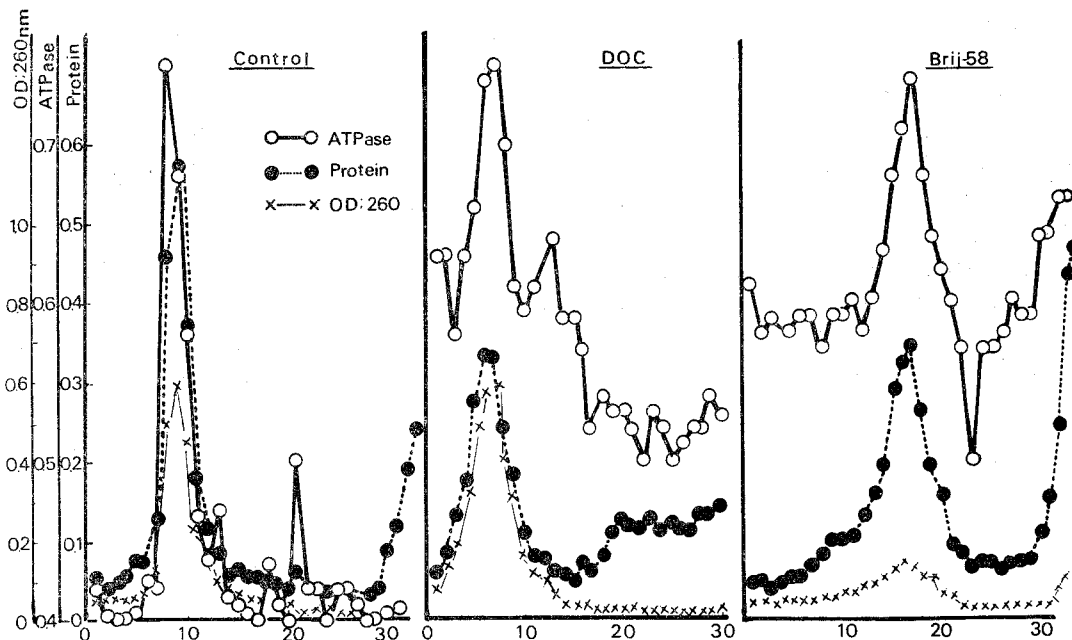


Fig. 6. Influence of DOC and Brij 58 on the distribution profile of renal microsomal ATPase and the other macromolecular substances (proteins and nucleic acids) in rabbit: Sucrose density gradient (10~45%) was carried out in accordance with text.

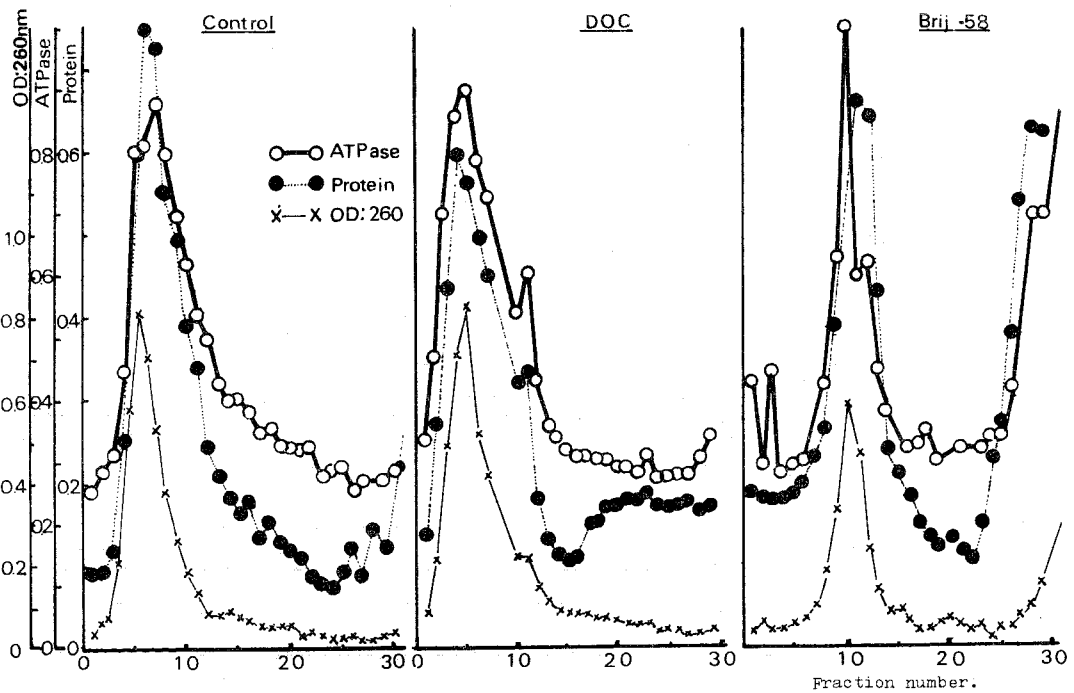


Fig. 7. Influence of DOC and Brij 58 on the distribution profile of cystic ATPase and the other macromolecular substances (proteins and nucleic acids) in rabbit: Sucrose density gradient (10~45%) was carried out in accordance with text.

腎ミクロソーム系 ATPase 活性に関する研究は、Skou 派によって、とくに (Na^+-K^+) ATPase を中心にして系統的に検討されている^{12,18-21)}。

われわれは、ミクロソーム ATPase について検討するに先き立って、細胞顆粒全域に分布する膜系 ATPase と生体高分子の相関性を追求するために、あらかじめ核を除去した亜細胞系における ATPase とタンパク質の分布を Maunsbuch 分画法で得た分画について検討してみた。上清分画と沈殿分画について得られた成績は、Fig. 4 および Fig. 5 にそれぞれ示すごとくである。

上清分画における ATPase の分布は、2 相性を呈

している。その第 1 相は、13~26 分画に広がる比較的幅の大きい分画として分布し、ついで第 2 相は、28~32 分画にみられるような、狭い幅の軽い粒子相として分別された。ATPase の担体となるタンパク質分画も、これにはほぼ対応したパターンを示し、とくに第 1 相におけるその一致性が目立つ (Fig. 4)。当然のことながら、上清分画には、ミクロソーム膜系酵素が豊富に含まれているため、この分画は、そのような特性を代表するものと考えられる。なお、腎皮質ミクロソーム膜系 ATPase の分布については、この報告の中心テーマとして、あとで詳述されることになっている。

一方、沈殿部 (primary granule fraction) の再浮遊

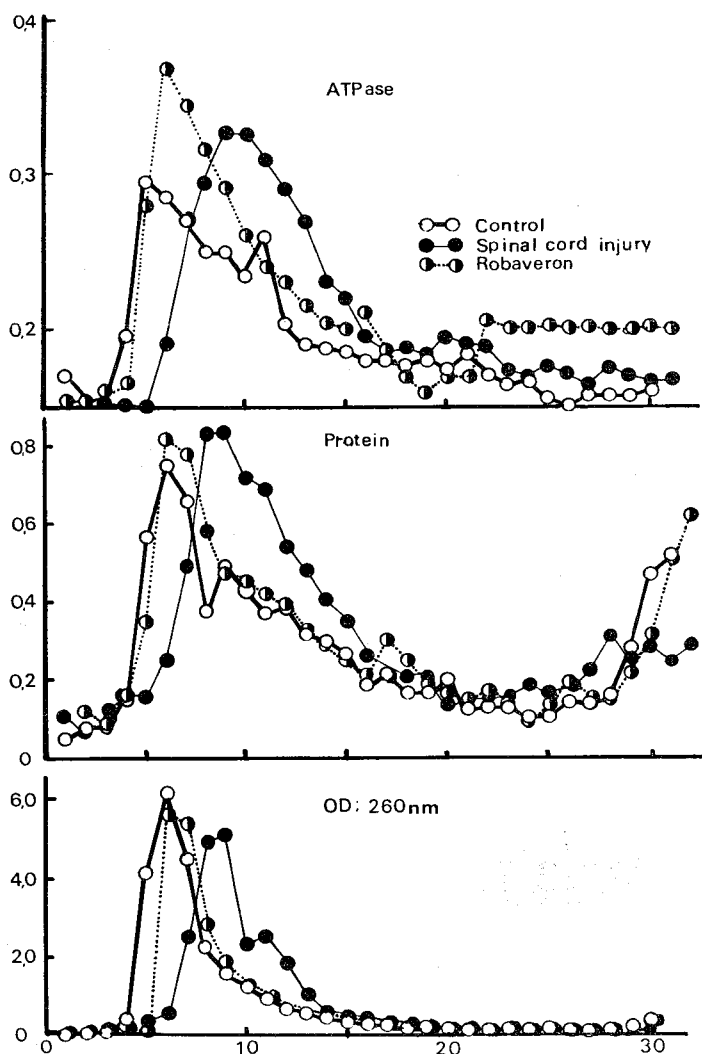


Fig. 8. *In vivo* normalizing effect of Robaveron on the modified distribution profile of renal microsomal ATPase and the other macromolecular substances (proteins and nucleic acids) in spinal cord injury rabbits.

分画について得られた結果は、Fig. 5 に示すごとくで、(i) upper fraction, (ii) purified mitochondrial fraction, (iii) purified granule fraction および (iv) sediment fraction の4分画として回収され、Maunsbuch が得た成績¹¹⁾ ときわめてよい一致性を示していた。

このような条件下に解析された ATPase 活性とタンパク質の相関性分布は、次のような特性を呈していた (Fig. 5)。

出現した ATPase 活性は、3 峰性であり、その最大ピークは、purified mitochondria 分画 (前記 (ii) 分画) に相当する 19~20 分画に存在する。タンパク質の極大ピークも、わずかな (1 分画) ずれはあっても、ATPase と一致していた。つぎに活性の高い部分は、第13分画に出現する purified granule fraction (前記 (iii) 分画) で、タンパク質のピークとも全く一致していた。最も軽い粒子分画に相当する upper fraction (前記 (iv) 分画) は31分画の上層部位で確認された。以上のごとく腎細胞内顆粒の ATPase 活性は、膜系タンパク質の局在性とよく対応する配列分布をしていることが判明した。この成績でみられるように、ミクロソーム分画を除く他の顆粒では、ミトコンドリア分画において ATPase 活性の高いことが注目される。

2. 腎および膀胱ミクロソーム膜系 ATPase 分布

の特性と DOC, Brij 58 などの界面活性剤による局在性修飾—シヨ糖密度勾配法による解析—

A) 腎ミクロソーム系

Jørgensen-Skou 法¹²⁾ (Fig. 2) によって分画したミクロソーム分画を 6 ml のシヨ糖溶液中に再浮遊させたのち、Fig. 6 脚注に示す反応系を用い、DOC および Brij 58 の終末濃度がそれぞれ 0.6 mg/ml, 0.5% になるように添加して、37°C 10分間反応させたのち、シヨ糖密度勾配法で分析した。得られた結果は Fig. 6 に示すごとくである。

i) 無添加対照系；ATPase 活性は、第7分画、タンパク質と核酸はそれぞれ第6分画にピークを現わし、検討されたこれら3種類の生体高分子群の局在性は、すべて単峰性でそれぞれ対応性が認められた。

ii) DOC 処理系；ATPase 活性と核酸の分布では、いずれも第5分画にピークが観察され、タンパク質は第4分画に出現していた。このように、DOC 処理によって腎ミクロソーム ATPase 活性を中心とする生体高分子群の分画は、対照系に比べて若干比重の大きい分画として確認された。第11分画に出現する小ピークは、後述する膀胱ミクロソームにも現われてくる点で注目に値する。

DOC 処理によって発生する他のひとつの特徴は、対照系に比較して ATPase 活性の上昇とタンパク質

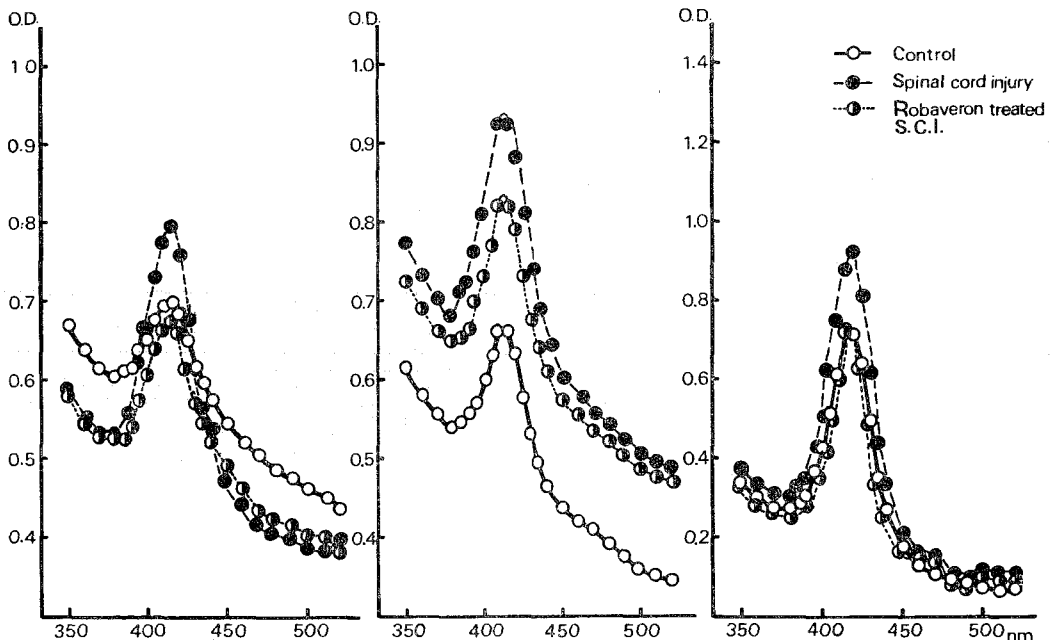


Fig. 9. Preventive effect of Robaveron against hemorrhagic phenomenon in the supernatant fraction of renal microsomes (48,000 $\times$ g) in the spinal cord injury rabbit.

量の低下，したがって，ATPase の比活性が高まっていたことである。しかし，この現象は，Jørgensen らが (Na^+-K^+) ATPase で認めている¹²⁾ ように数倍におよぶ上昇という程のものではなかった。理由は，この実験系では，EDTA が用いられなかったため， (Na^+-K^+) ATPase 活性が選択的に上昇しなかったのではないかと判断される。この点については，膀胱ミクロソーム系においてさらに言及したい。

iii) Brij 58 処理系；ATPase，タンパク質および核酸の主ピークは，第10分画に一致して出現している。このほかに，対照系や DOC 処理系ではみられなかった新しい活性分布が第27分画以降の上層部に見られるという2相性パターンが観察された。以上の事実から，Brij 58 は，膜系高分子を，比較的軽い粒子として回収させるように，その局在性に影響を及ぼしていることがわかった。

B) 膀胱ミクロソーム系

Cortas¹³⁾，Jørgensen-Skou¹²⁾ の組み合わせ法による解析結果は，Fig. 7 に要約されるごとくである。腎ミクロソームの場合と対比しながらその特性を述べたい。

i) 無添加対照系；腎の場合とよく似た分布を示していた。ATPase 活性は，第8分画に，また，タンパク質と核酸分画は，それぞれ第9分画にピークを示す

きわめてシャープな分布で観察された。そこで，腎と膀胱のミクロソーム ATPase を中心とする生体高分子群の粒子サイズと局在性プロフィールは，きわめて類似するものと考えてよからう。膀胱での21分画の ATPase 活性の小ピークの出現の意義については不明である。

ii) DOC 処理系；ATPase および核酸のピークは，対照系に比較してやや比重の大きい分画と思われる第7分画にそれぞれ一致して出現し，またタンパク質のそれも第6分画へ出現していた。一方，腎ミクロソームの場合と同様に，第13分画に ATPase 活性の新しいピークが観察された。

このように，膀胱ミクロソームでも，腎ミクロソームと同様，DOC は，ミクロソーム系生体高分子群を，比較的軽い粒子の新生を伴いつつ，比重の大きい方へと修飾転移させている。腎ミクロソームの場合と異なる点は，主ピークにおける ATPase 活性は変わらないのに反して，タンパク量が半減していること，換言すれば比活性が倍増していることである。その理由は，膀胱ミクロソーム調製時に 5mM EDTA を適用したため，Jørgensen ら¹²⁾ の成績とよく一致している。

iii) Brij 58 処理系；腎の場合と同様，主ピークは，軽い分画（ATPase，タンパク質はそれぞれ第17分画，核酸は第16分画）へと移動し，同時に上層部位（第30分画以上）への ATPase およびタンパク質の著明な移動分布が認められた。ATPase の比活性は，DOC の場合と同様に倍加されている。

以上のごとく，腎と膀胱の両組織の抽出ミクロソーム系で，界面活性剤 DOC と Brij 58 による，*in vitro* の ATPase を中心とする生体高分子の局在性分布の修飾像が検討されたが，そのプロフィールは両臓器でほぼ一致していることがわかった。

そこで，これらの成績を prototype の standard model として，以下の脊損動物群における病変標的臓器での同様の実験をおこない，前立腺抽出物 Robaveron の実験的治療効果について述べることにした。

3. 家兎における実験的脊損障害腎ミクロソーム ATPase 活性分布の修飾像と Robaveron 投与による修復効果

実験は，家兎を用いて，3群の動物群についておこなった。すなわち，第1群：無処理対照動物群，第2群：前報によって作られた脊髄下位損傷動物群，および第3群：第2群を Robaveron 1 アンプル/day で14日間連続筋注して治療した動物群である。各実験群は10羽の家兎で構成されていたが，そのうちから2羽ずつを無作為的に抽出し，各動物一対の腎を摘出し計

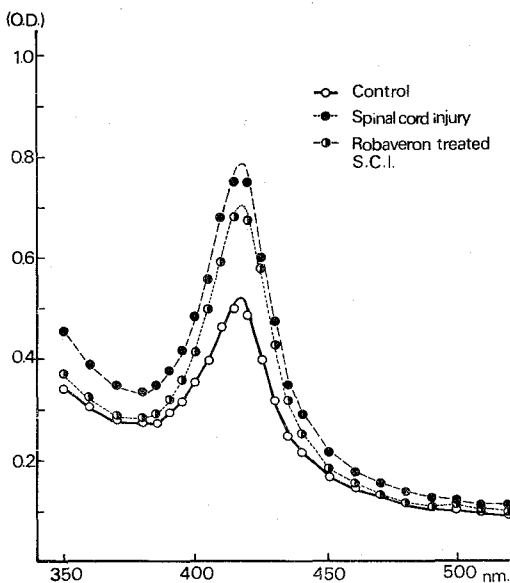


Fig. 10. Preventive effect of Robaveron against hemorrhagic phenomenon in the supernatant fraction of cystic microsomes ($48,000 \times g$) in the spinal cord injury rabbit.

4 腎の Cortex 湿量平均 25 g について前述同様、48,000×g ミクロソーム分画についてシヨ糖密度勾配法で分析した。2 回の復行実験の結果、典型的な一例について得られた成績を Fig. 8 に掲げる。

実験成績は、ATPase タンパク質および核酸のそれぞれについて、3 群間で比較されたが、その概要は、次のごとくであった。

i) ATPase 活性；第 1 群では、第 5 分画に主ピークが観察された。一方、第 2 群では、主ピークが第 10 分画まで移動しており、*in vitro* で Brij 58 の作用下に観察された成績に似た傾向で粒子サイズの小さい軽い部分へと移行修飾の影響があらわれていた。このことは、脊損手術後比較的長期間を経て、排尿障害と共に、腎機能、とくにミクロソーム系 ATPase が、その機構は不詳であっても、その局在性においてなんらかの修飾を受けたものと理解される。

一方、第 3 群では、第 6 分画にピークが観察され、脊損動物でみられた ATPase 活性ピークの移動が Robaveron 投与によって対照系近くまで復元していることがわかった。すなわち、Robaveron は、脊損動物の腎ミクロソーム ATPase を中心にする機能修復作用を有するものと判断される。

ii) タンパク質および核酸；ATPase 活性に呼応して、第 3 群でのピークは、第 1 群のピーク(第 5 分画)まで修復していることが観察された。

4. 実験的脊損動物の腎および膀胱の 48,000×g ミクロソーム上清分画における血色素様色素出現と Robaveron 投与による抑制効果

Jørgensen-Skou 法¹²⁾ (Fig. 2) および Cortas¹³⁾ と、Jørgensen-Skou 法¹²⁾ の組み合わせ法 (Fig. 3) で分

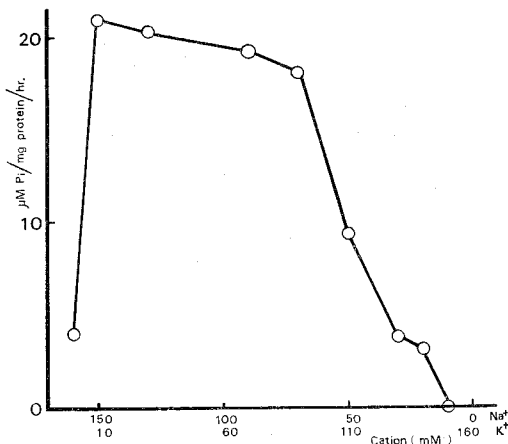


Fig. 11. (Na^+-K^+) ATPase activity of rabbit renal microsome relating to the concentration of Na^+ and K^+ in the presence of Mg^{++} .

離した 48,000×g 上清分画を、Table 1, Fig. 9 および Fig. 10 に示す要領で一定率に稀釈して 350~540 nm の吸収スペクトルを追跡し、また、極大吸収 (415 nm) における吸光度比を求めた結果、腎と膀胱に関して次のような成績が得られた。

i) 腎ミクロソーム上清；脊髄下位損傷 4 例、脊髄上位損傷 1 例 およびこれらに対応する無処理対照群各 1 例 (計 5 例) について検討した。各例とも 3 羽ずつの動物から抽出した試料で実験がおこなわれた。

脊髄下位損傷群 4 例中 3 例にミクロソーム上清部へ血色素様色素の出現が著明であった (Table 1)。

Robaveron 投与群について観察するとき、下位脊損 2 例、上位脊損 1 例、計 3 例においてこれらの血色素様色素の出現が抑制されていた。

この 3 例について描かれた吸収スペクトルは、Fig. 9 に示すごとくである。

ii) 膀胱ミクロソーム上清；腎と同様に測定された吸収スペクトルの 1 例を Fig. 10 に示す。得られた曲線の形状は、腎の場合と同様である。

以上のことから、Robaveron は、脊損手術に伴う腎、膀胱の血色素様色素出現も抑制することがわかった。

5. 腎および膀胱ミクロソーム (Na^+-K^+) ATPase 活性の特性と脊損時における酵素力価の変動と Robaveron 投与の影響

この実験は、とくに部分的に純化した (Na^+-K^+) ATPase の力価を指標にして、脊損動物の腎および膀胱の ATPase 活性と Robaveron の影響をみるためにおこなわれたものである。

i) 正常腎ミクロソーム (Na^+-K^+) ATPase；上記 48,000×g 分画を出発材料として、DOC, 0.6mg/ml, 2 mM EDTA, 25 mM imidazole を含む溶液中に、終末ミクロソームタンパク質 0.5 mg/ml を含む反応液を作成し、20°C, 30 分間反応させて (Na^+-K^+) ATPase を部分的に純化した。この試料を用いて Table 2 脚注に示した反応系に基づき、 Na^+ , K^+ イオン濃度の種々な組合せと ouabain の選択作用を利用し (Na^+-K^+) ATPase と Mg^{2+} ATPase を分別定量した。

得られた結果は、Table 2 および Fig. 11 に示すごとくである。これによれば、 (Na^+-K^+) ATPase 活性は、 Na^+ : 150~70 mM, K^+ : 10~90 mM の組合せで最高になることが判明した。

ii) 正常動物、脊損動物および Robaveron 投与による治療動物の腎および膀胱ミクロソームの部分的純化 (Na^+-K^+) ATPase 活性の比較；上記の要領で部分的に純化した各実験群ごとの腎および膀胱の $(\text{Na}^+-$

Table 1. *In vivo* protective effect of Robaveron against hemorrhagic phenomenon in the supernatant fraction of renal microsomes (48,000×g) in the spinal cord injury rabbit.

Experimental system	optical density at 415 nm and absorption ratio				
	I*	II*	III**	IV*	V*
	OD (ratio)	OD (ratio)	OD (ratio)	OD (ratio)	OD (ratio)
Control	0.700 (1.00)	0.660 (1.00)	0.718 (1.00)	0.512 (1.00)	0.460 (1.00)
Spinal cord injury	0.795 (1.14)	0.925 (1.40)	0.880 (1.23)	0.665 (1.30)	0.450 (0.98)
Spinal cord injury + Robaveron	0.674 (0.96)	0.820 (1.24)	0.718 (1.00)	-	0.390 (0.85)
Dilution unit of supernatant	x 10	x 4	x 5		x 10
Judgement on the effect of Robaveron	Positive	Positive	Positive		Negative

Note: (1) Remark : * Lower spinal cord injury animal ** Upper spinal cord injury animal

(2) Each experimental group consists of 3 individuals.

Table 2. (Na⁺-K⁺) ATPase activity prepared from renal microsomes of rabbit.

Concentration of Na ⁺ and K ⁺ in the reaction mixture Na ⁺ K ⁺ (mM)		ATPase activity (μ moles Pi/mg protein/hour)		
		Total ATPase	Mg ⁺⁺ ATPase (In the presence of ouabain 1mM)	(Na ⁺ - K ⁺) ATPase (Total ATPase - Mg ⁺⁺ ATPase)
160	0	20.14	16.25	3.89
150	10	34.84	13.93	20.91
130	30	34.83	14.71	20.12
110	50	35.60	19.35	16.25
90	70	34.83	18.58	19.35
70	90	32.51	14.71	17.80
50	110	24.77	15.48	9.29
30	130	21.0	17.28	3.71
20	140	18.58	15.48	3.1
10	150	19.34	21.68	- 2.3

The microsomal fraction was incubated at 20°C for 30 minutes as described in text. Then, 0.2ml of sample was transferred to test tubes containing 3mM Mg⁺⁺, 0-150 mM Na⁺, 0-150 mM K⁺, and 50 mM Tris-HCL buffer, pH 7.1 (total 1.8ml).

The reaction mixtures were preincubated at 37°C for 10 minutes and after that, 0.2 ml of 10 mM ATP was further added and the incubation was performed at 37°C, for 15 minutes. The reaction was stopped with 1ml of 10% TCA.

Liberated Pi was estimated (15).

K⁺) ATPase 活性を測定し、タンパク mg 当りの力価で表現した成績は、Table 3 および 4 に示すごとくである。

これらの結果からわかるように、無処理対照群、脊損群および Robaveron 投与群間における腎および膀胱の (Na⁺-K⁺) ATPase 活性には個々の実験群間に若干の差異はあっても、それらには変動上の一定した方向性が認められなかった。すなわち、(Na⁺-K⁺) ATPase のように、部分的に純化した酵素を指標にして検

討する場合には、脊損による影響も、また Robaveron による治療効果も認められないということであり、純化された (Na⁺-K⁺) ATPase の力価は、病態像とは無関係によく保持されていることがわかった。

考 察

ミクロソームに局在する膜系酵素の数は多い。それらは、集合して、いわゆる複合酵素系を形成し、生体機能に重要な役割を演じている。このうち、ATPase とくに (Na⁺-K⁺) ATPase は、生体膜面における Na⁺,

Table 3. *In vivo* effect of Rovaberon on the activity of renal microsomal (Na⁺-K⁺) ATPase in spinal cord injury rabbit.

Experimental system	ATPase activity (μ moles Pi/mg Protein/hour)		
	Total ATPase	Mg ⁺⁺ ATPase	(Na ⁺ - K ⁺)ATPase
I. Control (Normal rabbit)	61.4	22.1	39.3 (1.0)*
II. Lower site spinal injury	81.8	29.6	52.2 (1.33) (1.0)*
III. " (Robaveron treated)	73.5	29.5	44.0 (1.12) (0.84)
IV. Upper site spinal injury	83.1	29.3	53.8 (1.37) (1.0)
V. " (Robaveron treated)	91.8	34.4	57.4 (1.46) (1.07)

Note: (1)* Ratio of (Na⁺ - K⁺) ATPase activity.

(2) General procedure : As described in the text, the renal microsomal fraction was isolated from each experimental animal group (consisted of 3 individuals). The preparation of (Na⁺ - K⁺) ATPase was carried out using the same method as noted in Table IV. Enzyme activity was measured in the reaction mixture containing 130 mM Na⁺ and 20 mM K⁺.

Table 4. *In vivo* effect of Rovaberon on the activity of cystic microsomal ATPase of spinal cord injury rabbit.

Experimental system	ATPase activity (μ moles Pi/mg protein/hour)	
	Total ATPase	Mg ⁺⁺ ATPase
I. Control (Normal rabbit)	39.36	39.36
II. Lower site spinal injury	37.27	35.69
III. " + (Robaveron treated)	37.15	40.25
IV. Upper site spinal injury	39.0	36.0
V. " + (Robaveron treated)	35.53	34.02

Note: Experimental procedure : as described in Table V.

K⁺ の能動輸送を通じて筋収縮機構に大きな関係をもつといわれている。

さて、このような (Na⁺-K⁺) ATPase は、現在 Skou 1 派の研究^{12,17-21})をはじめ、Towel²²), Uesugi^{23,24}) および Kyte²⁵) によって高度に精製された標品として調製・報告されている。

この酵素がきわめて強い膜依存性を示すことは、酵素力価の不安定さと相まって、この方面における研究をさらに複雑なものにしている。

そこで、われわれは、48,000×g という比較的粗いミクロソーム分画における ATPase 活性を生体高分子における局在性の変動という観点から追求してみた。

脊損動物とこれを Robaveron で治療した *in vivo* での成績を論ずるに先立って、*in vitro* で得られた成績から考察すれば、Maunsbuch 法^{10,11}) で分析した核を除く全細胞顆粒分画 (Fig. 4 および 5) で、ATPase 活性は、タンパク質分画と全く一致したパターンを呈していることがわかった。また、正常な腎および膀胱での 48,000×g ミクロソーム分画でも、ATPase は、タンパク質あるいは核酸のような他のミクロソーム膜系構築因子とほとんど同一な局在性を示すこともわかった (Fig. 6, 7 および 8)。

もちろん、Uesugi^{23,24}) および Kyte²⁵) によって報告されているように、精製 (Na⁺-K⁺) ATPase では、この酵素がタンパク質分画のある特定部位に局在しているという報告もあるが、それらは、酵素の精製度の差異に基づくものであろう。

そこで、われわれは、このような粗ミクロソーム系 ATPase を 2 種類の界面活性剤 DOC と Brij 58 を用いて、局在性の修飾を誘導することからはじめた。

一般に膜系 ATPase の純化のために、DOC は広く利用されているようであり、とくに、膜成分と小胞体内腔成分の分離というオルガネラレベルでの微細構造の研究に好んで適用されている^{26,27})。一方、本剤は、肝粗面小胞体からポリゾーム、リボゾームを調製する場合の標準品としても利用され、その応用性は広い^{28,29})。

他方、Brij 58 は、細菌のスフェロプラストからポリゾームを分離する際、膜 labilizer として本方^{30,31}) が賞用した界面活性剤であり、われわれも、この方法によって *E. coli* K-12 株から TOS リボゾームの調製をおこなった^{32,33})。

その機構は、これら 2 種類の界面活性剤が、不溶性の内在性タンパク質と複合体をつくることによって、多くの中間段階を経て、“可溶化”作用を発揮できる

特性に基づくものである。

さて、この研究において、われわれは、腎と膀胱のミクロソームで Brij 58 が、共通的に ATPase や他の生体高分子群 (タンパク質および核酸) を比重の軽い分画へと修飾し、さらに、上層部位へ移動する新しい分画の発現を誘発する作用を示すことを認めた。また、DOC の場合は、主ピークが重い分画へ移動する現象のほかに、Brij 58 ほどではないが、比較的軽い分画に新たなピークの発現を腎・膀胱で共通して確認しえた。

このような *in vitro* における界面活性剤の作用特異性を prototype にして、脊損動物で得られた *in vivo* の成績を比較するとき、脊損系での腎ミクロソーム ATPase 局在性修飾は、Brij 58 の場合に類似しており、Robaveron は、このような修飾を改善する効果をもつことがわかった。このような現象を支配している脊損手術とミクロソーム系高分子の修飾との因果関係に関しては、全く未知であり、その解明には *in vitro* および *in vivo* の実験試料について電顕的微細構造の観察などの補足的情報強化を要請されよう。

ただ、olcr³⁴) および Kisilevsky³⁵) は、ラットにエチオニン投与後、4~24 時間を経て、肝ポリゾームがリボゾームへと転化する様相をわれわれと同様に粒子分画の修飾転移現象で観察している。われわれもこの実験を追試し、さらに phosphatidylcholine 投与によるその防止効果を確認している³⁶)。このほか、m-RNA 合成阻害とその turnover rate を指標とする酵母ポリゾームに対する thiolutin の作用においても類似の解析法が適用されている³⁷)。

Robaveron 投与による脊損動物の腎ミクロソーム局在性修飾に対する修復効果は、同時におこなった脊損動物の腎および膀胱ミクロソームへの出血現象の抑制作用によって裏付けられている (Table 1, Fig. 8 および 9)。

一般に、脊損と血色素様色素、あるいは、血流障害との関連性については、かなり着目されており、すでに古典的にも Dea³⁸) によって、後根切断脊損において粘膜下の毛細管破壊による血尿現象が報告されている。また、本邦では、田上³⁹) によって同様な観察が得られている。このような出血現象は、標的臓器の膜系微細構築における構造修飾に相連して、さきのミクロソーム系高分子群局在性修飾の現象と対比して考察するとき興味深い。脊損時の排尿障害機構と平滑筋の収縮、弛緩作用に関連して、腎および膀胱の ATPase、とくに (Na⁺-K⁺) ATPase 活性変動は考慮すべき対象となるであろう。神経因性膀胱の組織化学的研究

究³⁹⁻⁴¹⁾ および膀胱組織全体を用いた化学的研究³⁾ではいずれも ATPase の活性の低下が指摘されている。しかし、ここに記したように部分的に純化した ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) ATPase を用いて測定したその酵素比活性は、対照群、脊損動物群、Robaveron 投与群間で著明な差異のないことがわかった。この事実、このように脊損障害が、酵素そのものの絶対的活性に影響を及ぼすものではなく、膜系酵素として局在する生体高分子レベルのマクロな profiles が生理・生化学的に機能障害を受け、粗大な測定では見かけ上、活性が低下したと考えられる。

前報までの実験¹⁻³⁾ でみてきた脊損動物のいくつかの臓器(組織)切片の呼吸活性に及ぼす Robaveron の促進効果も、膜系レベルにおける酵素の安定化、恒常化と基質透過性改善などを含めたミトコンドリア、ないしはミクロソームの機能の保護作用によるものと判断される。

最後に、脊損症における腎と膀胱の機能障害の相関性について知見を求め、Robaveron の排尿障害に対する有効性を総合的に考察したい。

Runts は、脊損腎—膀胱機能の平行説を唱えた先駆者のひとり^{42,43)} である。藤村⁸⁾ も、116例の脊損臨床例で230腎について、両臓器における障害の相関性を統計的に検討し、脊損時における腎機能障害の重要性に注目した。

このように考察するとき、脊損によって発生する神経因性排尿障害に対する Robaveron の治療効果とその作用機序の究明は、腎—膀胱機能障害回復という総合的レベルでさらに拡大展開されるべきではないかと考えられる。

結 論

家兎の腎および膀胱ミクロソーム膜系 ATPase とこれに関連する生体高分子群(タンパク質および核酸)の *in vitro* における局在性分布をシヨ糖密度勾配法で分析した。また、他方、これを standard model にして、実験的脊髄損傷(脊損)病態動物群とこれを Robaveron で治療した動物群について得られた *in vivo* の実験成績を総合して次のごとく結論した。

(1) 家兎腎のオルガネラ(ミクロソーム、ミトコンドリア、顆粒、リソソームおよびその上層分画)膜系に局在する ATPase は、タンパク質分画と対応する規則正しい分布を示す。

(2) 腎および膀胱ミクロソーム膜系 ATPase (48,000 $\times$ g 分画) は、単峰性の局在分布を示し、これらもタンパク質、核酸などの他の膜系生体高分子群の分布と

厳密な対応性を表わす。しかも、このような分布は、Brij 58 の作用によって密度の低い分画すなわち上層へ移動する2峰性分画に修飾され、ATPase 比活性の上昇を現わした。一方 DOC の存在下にこの酵素は、低密度の新生分画の発現を伴いながら、その主峰が比重の重い分画へと修飾・移動されている。

(3) 脊髄下位損傷動物の2実験群において、腎 ATPase を中心とするミクロソーム生体高分子群の局在性動物群に比べ、*in vitro* の Brij 58 の添加では、正常見られたように低密度部位へと修飾転移されるが、Robaveron 投与によって正常系へ復元する傾向を示した。

(4) 脊髄上位および下位損傷動物の腎および膀胱ミクロソーム上清分画中へ出現する血色素様色素は、Robaveron 投与によって効果的に抑制された。

(5) 正常動物、脊損動物およびこれに Robaveron を投与した動物群で、ミクロソーム ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) ATPase をそれぞれ部分的に純化し、その酵素比活性を比較してみたが、それらの間には、有意の変化は認められなかった。

以上の結果から脊損動物における Robaveron の排尿障害改善効果は、腎—膀胱膜系ミクロソームの機能的修復に関連することが判明した。

文 献

- 1) 中新井邦夫・太田 謙・佐藤義基・清水世安・下平正文：泌尿紀要，20：633，1974。
- 2) 中新井邦夫・太田 謙・佐藤義基・下平正文・清水世安：泌尿紀要，20：645，1974。
- 3) 中新井邦夫：泌尿紀要，21：823，1975。
- 4) Elliot, T. R.: J. Physiol., 35: 367, 1907.
- 5) Barrington, F. J. F.: J. Exptl. Psychol., 8: 33, 1914.
- 6) Fearnside, E. G.: Brain, 40: 149, 1917.
- 7) 上田恭一郎：泌尿紀要，15：321，1969。
- 8) 藤村 誠：日泌尿会誌，56：848，1965。
- 9) Stone, E. P.: J. Urol., 63: 673, 1950.
- 10) Maunsbuch, A. B.: Nature, 202: 1,131, 1964.
- 11) Maunsbuch, A. B.: J. Ultrastruct. Res., 16: 13, 1966.
- 12) Jørgensen, P. L.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 37: 39, 1969.
- 13) Cortas, N. and Walser, M.: Biochim. Biophys. Acta, 249: 181, 1971.
- 14) Tanaka, R. and Strickland, K. P.: Arch. Biochem. Biophys. 111: 583, 1965.
- 15) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: J. Biol. Chem.,

- 66: 375, 1925.
- 16) Allen, R. J. L.: *Biochem. J.*, **34**: 854, 1940.
- 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- 18) Skou, J. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **58**: 314, 1962.
- 19) Skou, J. C.: *Physiol. Rev.*, **54**: 596, 1965.
- 20) Jørgensen, P. L.: *Acta Physiol. Scand.*, **74**: 11A, 1968.
- 21) Jørgensen, P. L., Skou, J. C. and Solomonson, K. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **233**: 381, 1970.
- 22) Towel, D. W. and Copenhaver, J. H., Jr.: *Biochim. Biophys. Acta*, **203**: 124, 1970.
- 23) Uesugi, S., Dulak, N. C., Doixon, I. F., Hexum, T. D., Dahl, J. L., Perdus, J. F. and Hokin, L. E.: *J. Biol. Chem.*, **246**: 531, 1971.
- 24) Uesugi, S., Kahlenberg, A., Medizihradsky, F. and Hokin, L. E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**: 156, 1969.
- 25) Kyte, J.: *J. Biol. Chem.*, **246**: 4157, 1971.
- 26) de Babbian, Vester, F., Sellinger, O. Z. and Harkin, J. C.: *J. Cell Biol.*, **25**: 69, 1965.
- 27) Dallner, G.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, suppl. **166**: 1963.
- 28) Kolner: *Biochim. Biophys. Acta*. **35**: 554, 1959.
- 29) Ernester, L., Siekevitz, P. and Palada, G. E.: *J. Cell Biol.*, **15**: 541, 1962.
- 30) Kiho, Y. and Rich, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**: 111, 1964.
- 31) Kiho, Y. and Rich, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**: 1,751, 1967.
- 32) 下平正文・諫山寿康・長坂保則：第20回日本化学療法学会西日本支部総会, 1972年12月20日（福岡）発表.
- 33) 下平正文・森 康史・横山信治・角田滋雄：防菌防微誌, **2** : 8, 1974.
- 34) Oler, A., Farber, E. and Shull, K. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **190**: 161, 1969.
- 35) Kisilevsky, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **272**: 463, 1972.
- 36) 下平正文・ほか：未発表.
- 37) Jimenez, A., Tipper, D. J. and Davies, J.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **3**: 729, 1973.
- 38) Dee, J. E. and Langworthy, O. R.: *J. Urol.*, **34**: 359, 1935.
- 39) 田上恭一郎：泌尿紀要, **15**: 321, 1969.
- 40) 遠藤博志：第56回日本泌尿器科学会総会, 1968.
- 41) 緒方二郎：皮と泌, **30**: 306, 1968.
- 42) Runts, R. C.: *J. Urol.*, **79**: 177, 1957.
- 43) Runts, R. C.: *J. Urol.*, **81**: 720, 1959.

(1978年6月16日受付)