

# 動脈血栓における動脈壁の代謝, 特に ATP-ase の 役割についての実験的研究

京都大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 半田 肇教授)

端 和 夫

〔原稿受付: 昭和42年1月30日〕

## Experimental Studies on Arterial Thrombosis

—Especially on the Metabolic Factor in the Arterial Wall  
for Thrombus Formation—

by

KAZUO HASHI

From the Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School  
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

On the pathogenesis of arterial thrombosis a great number of working hypotheses have been published. These studies show that an unknown vascular factor is indispensable for thrombus formation.

On the other hand, it has been generally believed that the platelet clumping on the injured blood vessel wall plays a principal role in the initial stage of thrombus formation, and that the mechanism, not directly related to blood clotting, initiates this platelet clumping. Recently, it has been found that adenosine diphosphate (ADP) is a substance of essential importance in the formation of platelet clumping. Moreover, it has been shown that platelets contain adenosine triphosphate (ATP) in high concentration and that this ATP breaks down when platelets undergo viscous metamorphosis. In a kind of thrombasthenia with defective capacity of platelet clumping, their platelets have been demonstrated to contain relatively small amount of ATP.

With these above-mentioned increasing knowledges about the mechanism of platelet clumping it can be assumed that the energy transfer system mediated by ATP may have some relationships to platelet clumping or thrombus formation. Since informations are available that the arterial wall possesses a considerable metabolic activity and various physiological functions, it is of interest to investigate the relation between thrombus formation and the metabolic process of the arterial wall.

In the present study, the method for production of experimental thrombosis using electrical current was described (Fig. 1), and the effect of some compounds, especially some metabolic inhibitors on the production rate of thrombosis was observed. In connection with these observations, ATP-ase activities of the arterial wall in dogs were estimated in vitro.

In the first series of experiments, the application of a direct current of 5 mA for 15

min. was observed to induce a typical arterial thrombus in the carotid artery in dogs (Table 1, Fig. 2 a and 2 b). Of several compounds, citrate and heparin protected against the electric production of thrombosis while ATP had no significant effect. Adenosine, a specific inhibitor of ADP-induced platelet clumping, was observed to inhibit the electrical thrombosis (Table 2). Of some compounds applied to the arterial wall, azide, a substance which arrests oxydative phosphorylation, resulted in a marked suppression in the production rate of thrombosis, while ouabain or monoiodoacetate showed no significant effect (Table 3).

In the second series of experiments, the evaluation of ATP-ase activities showed the presence of an ATP-ase of considerable activity in the arterial tissue, especially in the particle centrifuged down between 800 g for 5 min. and 12000 g for 15 min. (Table 4 and 5). It had a pH optimum of 8.5 (Fig. 6). The enzyme was activated by  $Mg^{++}$  or  $Ca^{++}$  in the same extent (Fig. 4 and 5), but when contaminated actomyosin was removed using 0.5 M KCl as an isolation medium, the superiority of  $Mg^{++}$  activation became predominant (Table 6). The enzyme was activated slightly by DNP and inhibited by azide (Table 7 and 8). This particle contained only a small amount of cytochromes, and oxygen consumption of these particle was very low (Fig. 7 and 8). The characteristics of this ATP-ase were discussed briefly. No significant activity of Na-K dependent ATP-ase was found in the arterial tissue (Table 11).

From these results it is assumed that the formation of arterial thrombus may be dependent upon the changes in the arterial metabolic process especially upon ATP-ase activity in the arterial wall, and the hypothesis is made that ATP-ase in the arterial wall is activated by injury and then ADP produced at the site causes platelets to adhere to the injured site.

## 結 言

動脈血栓の発生病理の解明は常に血液と動脈壁との関連において行なわれなければならない。血管壁の要因が何らかの形で血栓形成に関与しているであろう事は Virchow 以来しばしば述べられて来たが、まだ十分に解明されていない。

一方動脈血栓が形成される際に見られる初発病変は血管損傷部へのいわゆる血小板集塊の接着である。この血小板集塊形成現象に関して、最近これが凝固系と独立な現象であると考えられ、さらに1960年Hellem<sup>17)</sup>による“Factor R”の発見を契機として Adenosine diphosphate (ADP) によつてこの血小板集塊形成が高度に促進される事が明らかとなり<sup>11)</sup>、血栓形成機構における ADP の役割が重視されるに至つた<sup>16)29)33)42)</sup>。また或る種の thrombasthenia ではその血小板中の Adenosine triphosphate (ATP) の含有量の減少が見られ、それがこの疾患における血小板集塊形成能の低下を来す事が報告され<sup>11)</sup>、さらにまた血小板の viscous meta-

morphosis に際して血小板中の ATP が消費される事も報告されている<sup>50)</sup>。これらの事実は血小板集塊形成及びそれに続く血栓形成と言う現象が、他の多くの生体現象について明らかにされつつあると同様に、ATP を介しての energy transfer system と何らかの関係を有しているのではないかと想像せしめるものである。

一方動脈壁が単なる弾性を持つた管ではなく、他の臓器と同様に多くの機能や代謝を営んでいる事が知られて来ており、共通代謝系としての TCA-cycle や oxydative phosphorylation の存在<sup>31)45)</sup> もほぼ確定的と考えられている。しかし動脈壁におけるこの様な一般的な代謝過程が血栓形成とどのような関係を持つていのかは全く未知の領域である。上述の如く血小板集塊形成機構の解明に伴つて、この機構と普遍的な生体現象の基礎的構造との結びつきが推定し得る現在では、血栓形成の血管壁要因を分析する上で、動脈壁の代謝は新しい角度から検討されなければならないと思われる。

以上の観点より本研究においては、犬を用い先ず電気的方法を用いた動脈血栓作成法を検討し、それに対

する薬剤の影響、ことに2.3の代謝阻害剤の影響を観察した。次いでそれに関連して動脈壁の ATP-ase 活性、チトクローム含有量、酸素消費量等を測定し、それらの結果より動脈血栓形成に対する動脈壁の代謝、ことにATP-aseの役割についてこれらの相関々係を検討した。

## 第1章 電気的作成血栓及びそれに対する2,3の薬剤の影響

標準化された動脈血栓を実験的に作成する事が困難であると言う事が、血栓形成過程あるいは血栓症の治療に関する研究に対して、一つの障害となっていたが、近年電気的方法を用いた血栓作成法が開発され<sup>47)</sup>、極めて高率に閉塞性動脈血栓が作成出来る様になった。本章においては先ずこの電気的血栓の作成のための条件及び二、三の薬剤のそれに対する影響を検討した。

### I. 実験材料及び実験方法

#### 1) 電気的血栓作成法

約10kgの雑種成犬を用い、Nembutal (25mg/kg) 静脈内麻酔の下に総頸動脈に教室の吉田<sup>47)</sup>の方法にならつて実験的血栓を作成した。先ず上甲状腺動脈を含む約5cmの総頸動脈を周囲組織より注意深く剝離し、Fig. 1に示す様に比較的太い絹糸を用いて上、下2ヵ所の狭窄部位を作成した。この際狭窄の程度が一定になる様にするため、No. 18ゲージの注射針を動脈と平行に置き、それと共に血管を結紮し、次で注射針のみを引き抜く様にした。細いポリエチレンチューブで覆った白金線を内電極とし、外電極には約1cm<sup>2</sup>の銀板を銅線に接続したものをを用いた。内電極を上甲状腺動脈より総頸動脈内腔にまで挿入し、外電極を丁度その外部の血管外膜に密着させ、内電極を(+), 外電極を(-)になる様にして直流通電を行なつた。通電中出来るだけ電気的なleakageが生じない様に、血管周囲にゴム板を置いて周囲組織より分離した。また生理的食塩水を浸した綿花で血管を覆い乾燥を防ぐ様にした。通電終了後両電極及び狭窄を除去し、上甲状腺動脈は結紮切断した。7日後に動脈を摘出し内腔を検して血栓作成状態を観察した。

#### 2) 電流の強さ及び通電時間

各種の操作による影響が、最も鋭敏に血栓作成率に反映するように、電流の強さと通電時間の組合せによつて、常に血栓が作成されるための最少の条件を求め

た。即ち3mA, 5分間の通電より始めて、5mA, 15分間の通電までの種々の組合せで実験を行ない、その際の血栓作成率を観察した。

#### 3) 通電部への薬剤の灌流

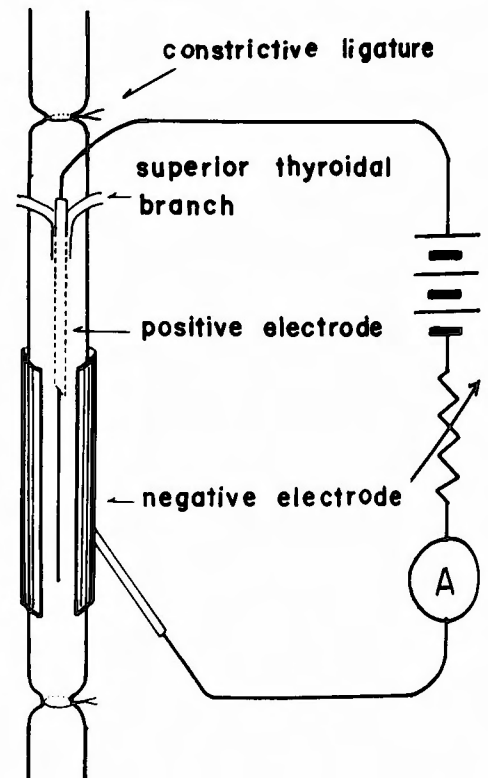
3.8% sodium citrate, 10<sup>-2</sup>M adenosine, 10<sup>-2</sup>M adenosine triphosphate (ATP) などの薬剤を用いて通電中総頸動脈の心臓側より通電部へ灌流を行なつた。adenosine 及びATPは0.07M phosphate buffer pH 7.4に溶解した。電磁流量計<sup>23)</sup>を用いて通電部を流れる血液量を測定し、次で上記薬剤を0.5~1 ml/min. の割合で心臓側から注入しつつ、5mA, 15分間の通電を行なつた。その理由は後述する如く、5mA, 15分間の通電により対照群では常に血栓形成が見られるからである。灌流は通電開始直前より始め、通電終了と共に中止した。

#### 4) heparinization

5000単位 heparin sodium を静脈内に投与し、次で5mA, 15分間の通電を行なつた。

#### 5) 血管壁に対する操作

Fig. 1 Schematic illustration of the method of electric production of thrombus.



0.01M sodium monoiodoacetate, 0.1M sodium azide, 1 mM ouabain を夫々0.07M phosphate buffer pH7.4に溶解したものをを用い, 薬剤の効果が出来るだけ血管壁のみに限局し, 血栓形成状態の変化が血管壁にもたらされた変化の反映であるようにするため次のような操作を行なった。即ち絹糸による狭窄にかえて, atraumatic clamp を用いて通電部の血流を遮断し, 中の血液を除去した後, 上甲状腺動脈より上記薬剤の溶液を注入し, そのまま約30分間放置した。次で溶液を除去し clamp にかえて絹糸による狭窄を作成し, 次で5 mA, 15分間の通電を行なった。

## II. 実験成績

Table 1 に示す様に実験を行なった範囲では血栓作成率は電流の強さ及び通電時間の影響をうけ, 電気量の増加にしたがって血栓形成傾向の増加を示した。5 mA, 15分間の通電により常に血栓の形成が見られ, 5例中3例は血栓によつて血管内腔は完全に閉塞していた。組織学的には Fig. 2 に示す様に梁構造を持つた明らかな動脈血栓の像を示した。血管壁においては内膜の膨化, 消失, 内膜下及び中膜内層部への出血, あるいは中膜内層の線維の走行の乱れなどが観察された。

通電中灌流を行なった群では Table 2 に示す様に, citrate 及び adenosine による血栓抑制効果が観察され

た。即ち citrate を灌流した際には8例中5例, adenosine の場合は8例中4例において血栓形成が見られなかった。ATP を灌流した場合は著明な影響は認められなかった。また heparinization を行なった群では Table 2 の様に8例中5例に非血栓例が見られた。

血管壁に対して薬剤を作用させた群においては Table 3 に示す様に azide によつて著明な血栓抑制が観察され, 血栓形成を見たのは14例中3例に過ぎなかった。monoiodoacetate 及び ouabain ではほとんど影響は認められなかった。

## III. 考 察

### 1 電気的動脈血栓作成

電流を流す事によつて血液凝固が起る事はすでに1824年頃<sup>39)</sup>より述べられていたが, 1953年に Sawyer 等<sup>35)</sup>によつて血栓形成と bioelectric phenomena との関係が提唱されて以来, 次第にこの方面の研究が行なわれるようになって来た。

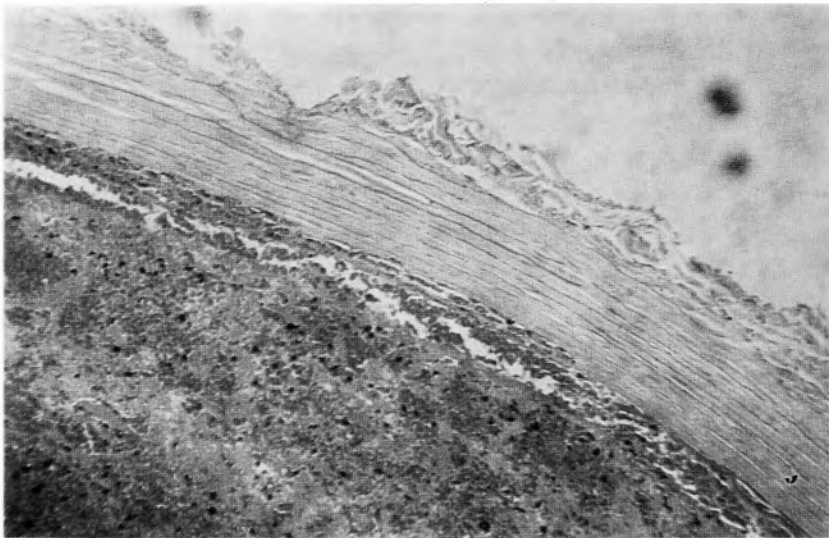
Sawyer 等<sup>36)37)</sup>によれば正常血管において内膜面が外膜面に対して陰性であるような polarity が存在し, このため陰性の表面荷電を持つ血液成分が常に内膜面から反撥的な力を受け, それによつて血栓形成が防止されていると言う。そしてこの polarity を逆転する方向への通電によつて血栓形成が見られる事を報告した。一方血管壁又は血液構成成分の電解による変化を重視

Table 1 Relationship between the amount of an electric current and the rate of thrombus formation

| Applied current and its duration |         | cases | No thrombus | Mural thrombus | Occluding thrombus |
|----------------------------------|---------|-------|-------------|----------------|--------------------|
| 3 mA                             | 5 min.  | 5     | 4           | 0              | 1                  |
|                                  | 10 min. | 5     | 4           | 0              | 1                  |
|                                  | 15 min. | 5     | 1           | 3              | 1                  |
| 5 mA                             | 5 min.  | 5     | 3           | 1              | 1                  |
|                                  | 10 min. | 5     | 1           | 2              | 1                  |
|                                  | 15 min. | 5     | 0           | 2              | 3                  |

Table 2 Effect of perfusion with various compounds on the rate of thrombus formation

| Compound                                | cases | No thrombus | Mural thrombus | Occluding thrombus |
|-----------------------------------------|-------|-------------|----------------|--------------------|
| (Control)                               | 5     | 0           | 2              | 3                  |
| Sodium citrate                          | 8     | 5           | 2              | 1                  |
| Adenosine                               | 8     | 4           | 3              | 1                  |
| ATP                                     | 8     | 1           | 4              | 3                  |
| Heparin sodium<br>(given intravenously) | 8     | 5           | 2              | 1                  |



**Fig. 2 a** Microscopic section of electric thrombus. (×40)



**Fig. 2 b** Microscopic section of electric thrombus and vessel wall. Note disarrangements of fibers at the internal layer of the media and hemorrhages between them. (×100)

Table 3 Effect of metabolic inhibitors on the rate of thrombus formation

| Compound               | cases | No thrombus | Mural thrombus | Occluding thrombus |
|------------------------|-------|-------------|----------------|--------------------|
| (Control)              | 5     | 0           | 2              | 3                  |
| Sodium monoiodoacetate | 4     | 1           | 1              | 2                  |
| Sodium azide           | 14    | 11          | 1              | 2                  |
| Ouabain                | 8     | 1           | 5              | 2                  |

するもの<sup>24)</sup>, polarity の変化よりも血管壁の損傷自体にその原因を求めるものなどもあり<sup>12)</sup>必ずしも意見は一致していない。このように電氣的作成血栓の発生機序には電気泳動的な血液成分の集合の他に, 多くの複雑な要因が含まれているものと思われる。しかし Table 1, Figs. 2a, 2b に示したように, 5 mA, 15 分間の通電により確実に, しかも形態学的にも典型的な動脈血栓の作成が可能であり, 実験的血栓を作成する方法として有効な手段と考えられる。

## 2 通電法による動脈血栓作成に及ぼす各種薬剤の影響

本実験においては heparin, citrate, adenosine, ATP, monoiodoacetate, azide, ouabain 等の薬剤について検討したが, その結果 Table 2 及び 3 に示した如く, heparin, citrate, adenosine, azide により血栓形成が抑制された。

1) heparin 電氣的作成血栓が heparin によつて抑制を受ける事は Schwartz<sup>38)</sup>, Hunt 等<sup>19)</sup>によつて報告されている。Schwartz<sup>38)</sup>によれば heparin によつて血管内外の電位差は約 125% 増強され, この内膜面における電気陰性度の増加によつて血栓形成が抑制されると言う。

2) adenosine adenosine<sup>6)7)34)</sup>は ADP による血小板集塊形成に対する特異的な inhibitor として知られている物質である。この adenosine による灌流が電氣的作成血栓において抑制的に作用すると言う事実は, 動脈血栓形成の過程に重要な役割を果たしていると推定されている ADP による血小板集塊形成現象が, 電氣的作成血栓が形成される際にも関与している事を示すものと思われる。

3) citrate 血栓形成に際して  $Ca^{++}$  は血液凝固の機構に関与する他に, 血小板集塊形成に対しても不可欠の要因であると言われている<sup>17)33)</sup>。従つて citrate の抑制効果は血栓形成機構のうちの血液凝固に関連した部分のみの阻害によると結論する事は出来ないが, 少なくとも電氣的作成血栓においては, 先きに述べた如き電気泳動的な血液成分の集合の他に, 血小板相互の化

学的接着, 血液凝固過程等の機構が関与している事を示すものと思われる。

4) azide azide の作用機転はいろいろ考えられるが, 一つには呼吸鎖リン酸化系において, 電子伝達系と共にリン酸化系の高エネルギー結合の転移反応を阻害する薬剤として知られている。従つて本実験における如く約 30 分にわたり azide の血管腔内注入を行なえば, 当然動脈壁における呼吸, ATP 生成等は高度に障害された状態となり, その結果血栓形成が著しく抑制される事が考えられる。この事は同時に血栓形成の機構において動脈壁の一般的な代謝過程の変化が大いに関与していることを示すものと思われる。即ち先きに述べた如く, 現在, ADP による血小板集塊形成が血栓形成の初発病変と考えられ, しかも血栓形成機構と ATP を介する基礎的代謝経路との何らかの結びつきが推定されているが, この知見から考えれば, 通電法による血栓形成は, 血栓形成に関与する ADP を動脈壁より遊離させる如き代謝の異常の結果であり, azide はその過程を抑制し, 血栓抑制を来すのではないかと考えられる。ただ動脈壁における thromboplastin,<sup>1)</sup> vasculokinase<sup>30)</sup> 等血栓形成的に作用すると思われる物質の活性が, azide によつて影響を受ける事は考慮すべきであり, 今後の検討を要する問題である。

5) ATP, monoiodoacetate, ouabain, これらの薬剤は血栓作成率に明らかな影響を及ぼさなかつた。

ATP に関しては, Born 等<sup>6)</sup>が報告している如く, ATP は ADP による血小板集塊形成に対し阻害作用を有する事が知られており, 血管損傷部において ATP より ADP が産生される一方, ADP による血小板集塊形成は ATP の灌流により阻害されるものと考えられる。

monoiodoacetate に関しては, Honour 等<sup>18)</sup>は細い動脈における platelet plug の形成に対して monoiodoacetate は抑制効果があるか, しかし azide 等に比べてその抑制効果が一時的である事を述べている。従つて本実験においても, monoiodoacetate の効果が血管内よりその溶液を除去した後短時間で消失し, 通電時にま

で持続しなかつた事も考えられる。また血栓形成に関与する ADP は解糖系のみでなく、最近次第に動脈壁においてもその存在が明らかにされて来ている TCA-cycle や oxidative phosphorylation<sup>31)45)</sup> などの系に由来する事も考えられる。

ouabain はイオン能動輸送の阻害剤として知られている物質である。先きに述べた血管内外の電位差がイオン能動輸送による結果である事は充分考えられるが、本実験においては ouabain は血栓作成率に余り影響を及ぼさなかつた。総頸動脈の如き太い血管におけるイオン能動輸送機構の存在及びその生理的意味については、後述の Na-K dependent ATP-ase 活性を総頸動脈において証明出来なかつた事と共に、今後に残された問題であろう。

以上の如く、電気的作成血栓において ADP による血小板集塊形成機序の関与、さらに通電によつて惹起された動脈壁の代謝の異常により動脈壁より ADP が遊離されると言う機構が考えられる。従つて動脈壁における ATP-ase 活性及び各種の刺激に対するその変化は、以上の可能性を検討する上で注目すべきである。

#### IV. 小 括

1) 電気的方法により犬の総頸動脈に実験的に高率に動脈血栓を作り得る。本研究に用いた方法では 5 mA, 15 分間の直流通電により、常に形態学的に典型的な動脈血栓形成が見られ、5 例中 3 例は血栓により動脈は完全に閉塞された。

2) citrate あるいは adenosine を通電部の動脈に灌流する事によつて血栓作成率は低下し、夫々 8 例中 5 例及び 4 例に血栓形成が見られなかつた。ATP は血栓作成率に明らかな影響を及ぼさなかつた。

3) heparinization によつて血栓作成率は低下し、8 例中 5 例に血栓形成が見られなかつた。

4) azide を血管壁に作用させた場合、血栓作成率は高度に低下し、14 例中 11 例が patent であつた。一方 ouabain 及び monoiodoacetate はほとんど影響を及ぼさなかつた。

5) これらの結果より、電気的作成血栓の発生機序においては ADP による血小板集塊形成及び動脈壁における一般的な代謝過程の変化が関与している事が推定出来る。

### 第II章 動脈壁における ATP-ase 活性について

血栓形成の初発病変と考えられる血小板集塊形成が ADP によつて促進される事が近年明らかとなり<sup>11)17)</sup>、その関連して血小板中の ATP の消長等が追求され、その結果血小板集塊形成及びそれに続く血栓形成機構と基礎的代謝経路との結びつきがようやく解明され始めて来た。第 I 章において、動脈血栓形成に際して動脈壁における一般的な代謝、ことに ADP またはそれに関連した代謝経路が血栓形成に関与しているのではないかと言う所見を得た。

そこで本章においては動脈壁における ATP-ase 活性及び種々の操作によるその消長、またそれに関連して動脈壁におけるチトクローム含有量、酸素消費量などを測定し、血栓形成におけるこれらの関与、ことに動脈壁における ATP-ase 活性と血栓形成との関係について検討した。

#### I. 実験材料及び実験方法

##### 1) 分離

約 10kg の雑種成犬を用い Nembutal (25mg/kg) 静脈内麻酔の下に総頸動脈を約 5 cm の長さにわたり摘出し、直ちに氷冷せる 0.25M sucrose 液、pH 7.2 に入れ、血管周囲の結合組織及び外膜を除去し血液成分を洗い落した。標本を 0.25M sucrose 液 20ml 中で細切し、次で Potter-Elvehjem 型のガラス製 homogenizer を用い水槽に浸しながら約 3 分間 homogenize した。refrigerated centrifuge を用い 800 × g, 5 分間遠心し、沈渣は 3 ml の上記 sucrose 液に浮遊させた (Sed<sub>800</sub> と記す)。上清は次で 12000 × g, 15 分間遠心し、沈渣は 3 ml の sucrose 液に浮遊させ (Sed<sub>12000</sub>)、上清はそのまま実験に使用した (Sup<sub>12000</sub>)。

##### 2) ATP-ase 活性の測定

0.3M mannitol, 0.01M KCl, 0.1mM EDTA, 0.01M tris buffer pH 7.4, 3 mM ATP 及び前記浮遊液を含む総量 1.3ml の反応系を用いた。反応は 37°C, 数分間の preincubation の後 0.3ml の浮遊液を加える事で開始し、30 分後に silica tangstate 液 1 ml を加えて停止せしめた。遠心した後上清 1 ml 中の inorganic phosphate を Lindberg and Ernster 法<sup>26)</sup>を用いて定量した。ATP-ase 活性は  $\mu$  moles Pi/mg Protein/hr. で表現した。蛋白質量は Lowry et al. 法<sup>27)</sup>で定量した。

##### 3) チトクローム含有量\*

Sed<sub>12000</sub> における total cytochrome content は、sodium sulfide によつて還元型とし、split beam spectrophotometer<sup>46)</sup>を用いて測定した。



## 4) 酸素消費量

Sed<sub>12000</sub> における酸素消費量の測定は萩原<sup>15)</sup> によつて考察された回転白金電極を装着したポーログラフを用いて行なつた。反応液は0.3M mannitol, 0.01M KCl, 0.2mM EDTA, 0.01M tris buffer, 5 mM K-phosphate buffer を用い, 22°C pH7.4で測定した。

5) 各種の動脈及び静脈壁におけるATP-ase活性  
胸部大動脈, 総頸動脈, 股動脈及び下大静脈におけるSed<sub>12000</sub>について, 夫々ATP-ase活性を測定した。

## 6) in vivo において加えた操作によるATP-ase 活性の変動

in vivo において総頸動脈壁に対し, 次の如き操作を加えたものについて, その Sed<sub>12000</sub> における ATP-ase活性を測定した。対側の動脈を対照とした。

i) 第1章に述べた方法による動脈壁に対する5 mA, 15分間の通電。

ii) 動脈壁に点状出血を認める程度の止血鉗子による圧挫及び圧挫部と周辺正常部との比較。

iii) 動脈内腔への薬剤の注入。第1章において行なつた如く, 血流を遮断した総頸動脈内腔へ0.1M sodium azide, 又は500単位/ml thrombin の溶液 (0.07M phosphate buffer pH7.4に溶解したもの) を注入し, 約15分間放置し, 次で溶液を完全に洗浄した後動脈を摘出した。対側の動脈へは phosphate buffer のみを注入し

た。

## 7) Na-K dependent ATP-ase

分離溶液として0.25M sucroseを用いた場合及びSkou<sup>41)</sup>に従つて Table 11に示す如く deoxycholate を含む溶液を用いた場合についてNa-K dependent ATP-ase の活性を測定した。反応液は 3mM tris ATP, 30mM histidine, 0.02M KCl, 0.08M NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub> を含み, イオン強度は0.6M sucroseを用いて調整した。ホモジネートあるいは各分画における浮遊液 0.2ml を加え, 総量 1 ml の反応系でpH7.2, 37°C, 30分間反応せしめた。この反応系における活性と, K<sup>+</sup> 及び Na<sup>+</sup> を含まない系における活性の比をとり activity ratio として表わした。また10<sup>-3</sup>M ouabain を加えNa<sup>+</sup>及びK<sup>+</sup>によつて活性化されるATP-aseに対する影響を観察した。

## II. 実験成績

## 1) 動脈壁におけるATP-ase

動脈壁においては内在性のATP-ase活性は弱く Table 4 に示す如くMg<sup>++</sup>あるいはCa<sup>++</sup>を加える事によつて活性化されるATP-aseが存在する。各組織分画におけるこのATP-ase活性は Table 5 に示す如くで, 各分画における平均値の間には統計学的に有意の差を認め ( $\alpha < 0.01$ ), Sed<sub>12000</sub> において最も高く平均  $3.60 \pm 0.59 \mu$  moles Pi/mg Protein/hr.を示した。

Table 4 Effect of Mg<sup>++</sup> or Ca<sup>++</sup> on ATP-ase activity of the Sed<sub>12000</sub> suspension

| Concentration of MgCl <sub>2</sub> (M) | Concentration of CaCl <sub>2</sub> (M) | No. of expt. | ATP-ase activity<br>( $\mu$ moles Pi/mg Protein/hr.) |
|----------------------------------------|----------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------|
| 0                                      | 0                                      | 4            | 0.18 $\pm$ 0.12*                                     |
| 0                                      | $4 \times 10^{-3}$                     | 4            | 3.26 $\pm$ 0.35                                      |
| $4 \times 10^{-3}$                     | 0                                      | 4            | 3.40 $\pm$ 0.50                                      |

\* standard deviation

The reaction mixture contained 0.3M mannitol, 0.01M KCl, 0.1 mM EDTA, 0.01M tris buffer (pH 7.4), 3mM ATP and 0.3ml of Sed<sub>12000</sub> suspension. The mixture was incubated for 30min. at 37°C.

Table 5 The ATP-ase activities for different fractions from the carotid artery in dogs

| Fraction             | No. of expt. | ATP-ase activity<br>( $\mu$ moles Pi/mg Protein/hr.) |
|----------------------|--------------|------------------------------------------------------|
| Sed <sub>800</sub>   | 4            | 1.39 $\pm$ 0.51*                                     |
| Sed <sub>12000</sub> | 12           | 3.60 $\pm$ 0.59                                      |
| Sup <sub>12000</sub> | 10           | 2.56 $\pm$ 0.53                                      |

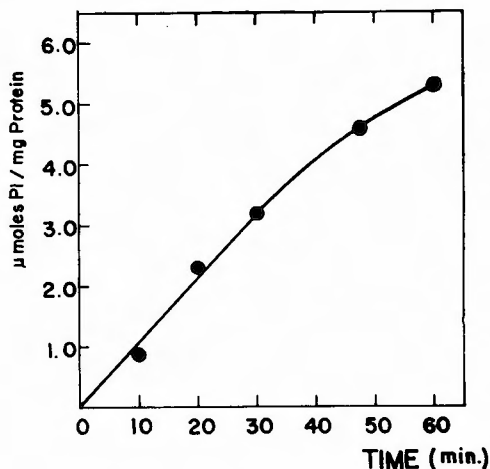
\* standard deviation

The reaction mixture contained 6mM of MgCl<sub>2</sub>. Other additions and conditions were the same as given for Table 4.



Sed<sub>12000</sub>におけるATP-ase活性の時間的経過は  $Mg^{++}$  存在下で Fig. 3 に示す如く約45分までは直線的関係が認められた。

Fig. 3 Liberation of inorganic phosphate by the Sed<sub>12000</sub> suspension as a function of time.



The reaction mixture contained 6 mM of  $MgCl_2$ . Other additions and conditions were the same as given for Table 1

## 2) $Mg^{++}$ 及び $Ca^{++}$ の影響

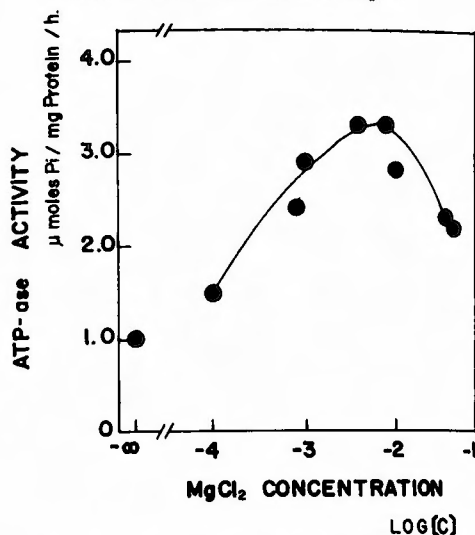
Sed<sub>12000</sub>において $Mg^{++}$ 及び $Ca^{++}$ 濃度による活性の変動は Fig. 4 及び Fig. 5 に示す如くであり、夫々  $8 \times 10^{-3}M$  附近で最も強く活性化された。両イオンによる活性化の pattern はほぼ同様の curve を示し、また Table 4 に示した結果においても  $Mg^{++}$  及び  $Ca^{++}$  のいずれか一方の優位を認める事は出来なかつた ( $F = 0.21$ ,  $\alpha > 0.05$ )。

この両イオンに対する態度をさらに検討する目的で、分離溶液として 0.5M KCl, 0.0M  $NaHCO_3$  pH7.4 を用いて actomyosin を可溶化し、Sed<sub>12000</sub>の中に出来るだけ actomyosin が含まれないようにした。その結果、Table 6 に示す如く、Sed<sub>12000</sub>においては $Ca^{++}$ 活性化部分は減少し、一方 Sup<sub>12000</sub>においては $Ca^{++}$ 活性化部分の増加を認めた。即ち 0.5M KCl を用いて分離する事によつて $Ca^{++}$ 活性化部は Sed<sub>12000</sub>から Sup<sub>12000</sub>に移行し、この事は分離液として 0.25M sucrose を用いた場合には、Sed<sub>12000</sub>に actomyosin がある程度混在する事を示すものと思われる。

## 3) pH-curve

$Mg^{++}$ の存在下において Sed<sub>12000</sub>の ATP-ase の pH-curve は Fig. 6 の如くであり、optimum pH は 8.5 附近

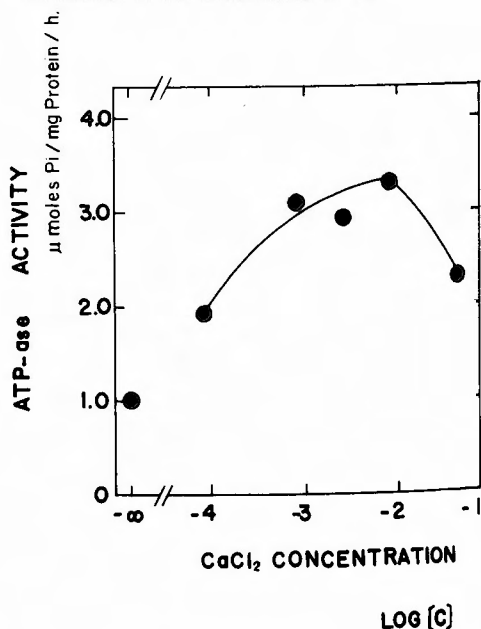
Fig. 4 Enzyme activity of the Sed<sub>12000</sub> suspension in relation to the concentration of  $Mg^{++}$ .



Abscissa, the logarithm of molar concentration of  $MgCl_2$ ; ordinate, the ATP-ase activity.

The reaction mixture and conditions were the same as given for Table 4.

Fig. 5 Enzyme activity of the Sed<sub>12000</sub> suspension in relation to the concentration of  $Ca^{++}$ .



Abscissa, the logarithm of molar concentration of  $CaCl_2$ ; ordinate, the ATP-ase activity.

The reaction mixture and conditions were the same as given for Table 4.

**Table 6** Effect of 0.5M KCl as an isolation medium on the rate of activation by  $Mg^{++}$  or  $Ca^{++}$  in the Sed<sub>12000</sub> and Sup<sub>12000</sub> suspension

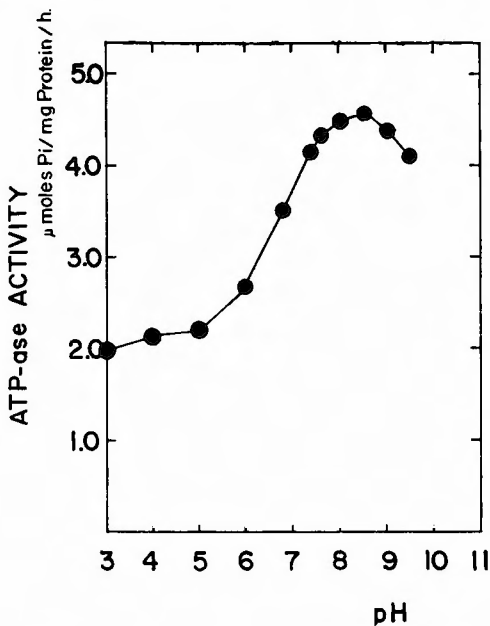
| Isolation medium                     | ATP-ase activity     |      |       |                      |      |       |
|--------------------------------------|----------------------|------|-------|----------------------|------|-------|
|                                      | Sed <sub>12000</sub> |      |       | Sup <sub>12000</sub> |      |       |
|                                      | Mg                   | Ca   | Ca/Mg | Mg                   | Ca   | Ca/Mg |
| 0.25M sucrose                        | 1.16                 | 1.48 | 1.08  | 1.08                 | 2.37 | 0.58  |
| 0.5M KCl, 0.03M NaHCO <sub>3</sub> * | 4.36                 | 3.00 | 0.68  | 4.54                 | 3.56 | 0.78  |

\* pH was adjusted to 7.4.

The reaction mixture contained 6mM of  $MgCl_2$  or  $CaCl_2$ .

Other additions and conditions were the same as given for Table 4.

ATP-ase activity was expressed as  $\mu$ moles Pi/mg Protein/hr.

**Fig. 6** Relation between enzyme activity of the Sed<sub>12000</sub> suspension and pH.

The reaction mixture contained 6 mM of  $MgCl_2$ .

The buffers, 0.01 M citrate pH 3 to 6, 0.02 M malate pH 6 to 7, and 0.02 M tris pH 7.4 to 9.5. other additions and conditions were the same as given for Table 4.

に認められた。

#### 4) 2,4-dinitrophenol (DNP)

Sed<sub>12000</sub>においてDNPはTable 7に示す如く軽度の添加効果を示し,  $8 \times 10^{-4}M$ において約30%の活性化が認められた ( $F = 79.3$ ,  $\alpha < 0.01$ ).

#### 5) azide

Sodium azideはこのATP-aseに対して抑制効果を示しTable 8に示す如く $2.3 \times 10^{-4}M$ において約55%の抑制が認められた ( $F = 6.21$ ,  $\alpha < 0.05$ ).

#### 6) チトクローム含有量

Fig. 7に示す如く total cytochrome contentを示す吸収曲線において夫々のチトクロームの特有なpeakを示さず, またその濃度は夫々 $10^{-10}M/mg$  Protein以下であつた。

#### 7) 酸素消費量

Fig. 8に示す如く, Sed<sub>12000</sub>における酸素消費量は succinate を基質とした場合 ADP の存在下で $3.18 m\mu$  atoms/mg. Protein/min.を示し, 一方 glutamate を基質とした場合は $1.93 m\mu$  atoms/mg. Protein/min.を示した. DNP,  $Mg^{++}$ はよる影響はほとんどなく, azide によって抑制が見られた。

#### 8) 各種の動脈及び静脈壁における活性

Table 9に示す如く, Sed<sub>12000</sub>におけるATP-ase活性は大動脈, 総頸動脈, 股動脈の間に有意の差は認められなかつた ( $\alpha > 0.05$ ). 一方静脈壁においては低い値を示した。

#### 9) in vivo において加えた操作によるATP-ase 活性の変動

Table 10に示す如く, 通電または動脈壁の圧挫を行なつた例ではATP-ase活性は低下した。また通電を行なつた例においてATP-ase活性の変動を日を追つて測定した結果はFig. 9に示す如くて, Sup<sub>12000</sub>においては約10日, Sed<sub>12000</sub>においては約3週間で, もとの値に回復した。後述する如く, 血管損傷部に隣接するいわゆる正常部ではATP-ase活性が上昇しているのではないかと考えられており<sup>(10)</sup>, この問題を観察するために, 血管壁の圧挫を行なつた例で, 血管損傷部といわゆる

**Table 7** Effect of 2,4-dinitrophenol on ATP-ase activity of the Sed<sub>12000</sub> suspension

| Concentration of MgCl <sub>2</sub> (M) | Concentration of DNP (M) | No. of expt. | ATP-ase activity (μmoles Pi/mg Prot./hr.) |
|----------------------------------------|--------------------------|--------------|-------------------------------------------|
| 0                                      | 0                        | 4            | 0.18 ± 0.12*                              |
| 0                                      | 8 × 10 <sup>-4</sup>     | 4            | 0.48 ± 0.26                               |
| 4 × 10 <sup>-3</sup>                   | 0                        | 5            | 3.41 ± 1.29                               |
| 4 × 10 <sup>-3</sup>                   | 8 × 10 <sup>-4</sup>     | 5            | 4.15 ± 1.25                               |

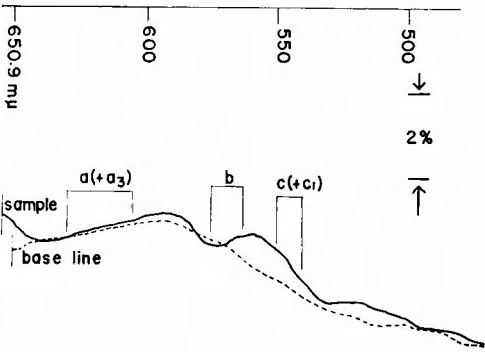
\* standard deviation  
Additions and conditions were given in the text.

**Table 8** Effect of sodium azide on ATP-ase activity of the Sed<sub>12000</sub> suspension

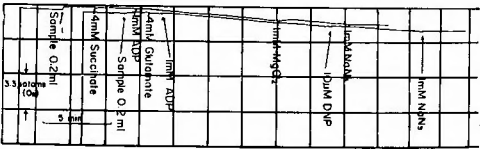
| MgCl <sub>2</sub> (4 × 10 <sup>-3</sup> M) | DNP (8 × 10 <sup>-4</sup> M) | NaN <sub>3</sub> (2.3 × 10 <sup>-3</sup> M) | No. of expt. | ATP-ase activity (μmoles Pi/mg Prot./hr.) |
|--------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------|
| —                                          | +                            | —                                           | 4            | 0.48 ± 0.26*                              |
|                                            |                              | +                                           | 2            | 0.12 ± 0.04                               |
| +                                          | —                            | —                                           | 5            | 3.46 ± 1.34                               |
|                                            |                              | +                                           | 4            | 1.56 ± 0.72                               |
| +                                          | +                            | —                                           | 4            | 4.38 ± 1.60                               |
|                                            |                              | +                                           | 3            | 2.00 ± 0.80                               |

\* standard deviation  
Additions and conditions were given in the text.

**Fig. 7** Spectrophotometric recording of the Sed<sub>12000</sub> suspension indicating low cytochrome content. Concentration of protein of the sample was 1.5 mg/ml.



**Fig. 8** Polarographic recording of respiratory activities of the Sed<sub>12000</sub> suspension.



Reaction medium consisted of 0.3 M mannitol, 0.01 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.01 M tris buffer, 5 mM K-phosphate buffer, at pH 7.4 in a total volume of 2.4 ml. As substrate succinate or glutamate of 4 mM was used. 1 mM ADP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 mM DNP, and 1 mM NaN<sub>3</sub> were also added in the system. Protein concentration of the Sed<sub>12000</sub> suspension was 6.77 mg/ml. 0.2 ml of the sample was used in the experiment.

**Table 9** The ATP-ase Activity of the Sed<sub>12000</sub> suspension from different vessels in dogs

| Vessels               | No. of expt. | ATP-ase activity (μmoles Pi/mg Prot./hr.) |
|-----------------------|--------------|-------------------------------------------|
| Thoracic aorta        | 4            | 3.16 ± 0.86*                              |
| Common carotid artery | 4            | 3.78 ± 0.55                               |
| Femoral artery        | 4            | 3.08 ± 0.87                               |
| Inferior caval vein   | 2            | 0.33 ± 0.14                               |

\* standard deviation  
The reaction mixture contained 6mM of MgCl<sub>2</sub>. Other additions and conditions were the same as given for Table 4.  
The suspensions added to the reaction medium contained 0.3 to 0.1mg. of protein.

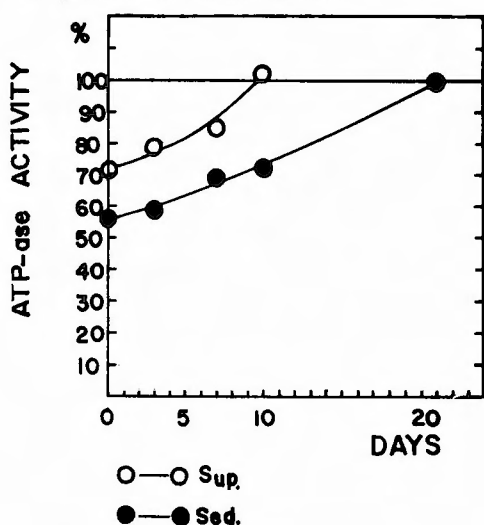
Table 10 Changes of ATP-ase activity of the Sed<sub>12000</sub> suspension after various treatments in vivo

| Treatment                                       | cases | Percentage difference of the activity |
|-------------------------------------------------|-------|---------------------------------------|
| Application of electric current (5 mA, 15 min.) | 2     | 42.9                                  |
| Crushing (crushed portion)                      | 4     | 21.3                                  |
| (the borders of crushed portion)*               | 2     | 3.1                                   |
| Topical use of azide**                          | 2     | 38.8                                  |
| Topical use of thrombin**                       | 2     | 11.1                                  |

\* The common carotid artery was crushed with hemostatic forceps. The procedure produced some petechial hemorrhages in the vessel wall. After 15 minutes, small pieces of non-crushed parts of the vessel wall including the exact borders of crushed portions were extirpated. Then the ATP-ase activity of these tissue areas was estimated and compared to contralateral uninjured vessel.

\*\* Sodium azide (0.1M) or thrombin (500units/ml.) in 0.07M phosphate buffer (pH7.4) was poured into the vessel lumen. After 15 minutes the vessel was extirpated. The activity was compared to the contralateral vessel to which phosphate buffer was applied.

Fig. 9 Changes of ATP-ase activity of the Sed<sub>12000</sub> and Sup<sub>12000</sub> suspension of dog carotid artery after the application of electric current.



Abscissa, days after the application of electric current; ordinate, the percentage of ATP-ase activity compared to contralateral intact vessel.

The method of application of electric current was given in the text.

正常部との境界部を中心にATP-ase活性の比較を行なった。その結果は Table 10に示す如く、対側の対照血管と差はほとんどなく、本実験においては損傷部と正常部の境界におけるATP-ase活性の上昇を確かめ得なかつたが、これはATP-ase活性の上昇部位が、境界部の狭い範囲に局限しているためと思われる。

一方血管腔内へ azide を注入したものでは約40%の

ATP-ase 活性の低下を認め、これに対して thrombin 溶液を注入したものでは約10%の増加を認めた。

#### 10) Na-K dependent ATP-ase

Table 11に示す如く、Na<sup>+</sup>及びK<sup>+</sup>によつて活性化されるATP-aseは少なく、また activity ratio が1.30を示したものにおいても ouabain による活性の抑制は認められなかつた。

### III. 考 察

動脈壁におけるATP-aseについての生化学的検討は1948年 Baló 等<sup>2)</sup>が aorta のホモジネートについて aorta adenylypyrophosphatase と呼称して報告して以来、Banga, et al.,<sup>3)</sup> Carr, et al.,<sup>8)</sup> Kirk<sup>22)</sup>, Zemplényi<sup>49)</sup>等によつて測定されて来たが、その細胞内における distribution, あるいは構成成分や性質について種々の臓器に見出されるものとの相違など、その比較を行なつた報告はまだ見当らない。

本実験では主に犬の総頸動脈を中心に血管壁の ATP-ase活性を測定したが、Table 5に示す如く、動脈壁においては800 g, 5分間と12000 g, 15分間の遠心の間に得られる particle (Sed<sub>1000</sub>) に最も高いATP-ase活性が存在する事を知つた。

この分画は一般にいわゆる mitochondria 分画に相当すると言われているが、本実験では Fig. 7 及び Fig. 8に示した如く、この particle におけるチトクローム含有量、酸素消費量などは非常に小さく、従つてこの particle に存在する mitochondria の量は非常に少ないものと考えざるを得ない。即ち Sed<sub>12000</sub> において比較的高い ATP-ase 活性が認められるのは、mitochondria

**Table 11** The  $Mg^{++} + K^{+} + Na^{+}/Mg^{++}$  activity ratio for different fractions of the enzyme prepared by various isolation media and differential centrifugation

| Isolation medium          | Enzyme fraction        | Activity ratio ( $Mg^{++} + K^{+} + Na^{+}/Mg^{++}$ ) |
|---------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------|
| 0.25M sucrose             | homogenate             | 1.17                                                  |
| 30mM histidine            | Sed <sub>800</sub> *   | 1.00                                                  |
| 5mM EDTA                  | Sed <sub>12000</sub> * | 1.30                                                  |
| 0.1% deoxycholate (pH6.8) | Sup <sub>12000</sub>   | 1.25                                                  |
| 0.25M sucrose (pH7.2)     | homogenate             | 1.11                                                  |
|                           | Sed <sub>800</sub>     | 1.00                                                  |
|                           | Sed <sub>12000</sub>   | 0.92                                                  |
|                           | Sup <sub>12000</sub>   | 1.05                                                  |

\* The suspension medium consisted of 0.25M sucrose, 30mM histidine and 1 mM EDTA.

The reaction mixture contained 3mM tris ATP, 30mM histidine, 0.02M KCl, 0.08M NaCl, and 6mM  $MgCl_2$ . Ionic strength of the reaction mixture was adjusted isotonic by 0.6M sucrose.

に由来するATP-aseの他に myofibril の actomyosin あるいは microsome の ATP-ase などが含まれているためと考えらる。

Sed<sub>12000</sub>におけるATP-aseは Fig. 4 及び Fig. 5 に示す如く、 $Mg^{++}$  あるいは $Ca^{++}$  によつて同程度に活性化されるが、Table 6 に示した如く、分離溶液として0.5 M KClを用い、actomyosinを可溶化した場合には、 $Ca^{++}$  活性化部分はある程度 Sup<sub>12000</sub>に移動する傾向を示し、Sed<sub>12000</sub>の中に actomyosin の ATP-aseが混在している事が明らかである。従つて Table 7 に示した DNP によるこのATP-aseの軽度の活性化は、mitochondria に由来する latent ATP-aseの活性化によると考えるよりは、むしろ混在する actomyosin の影響によると考えた方が適当であると思われる。

しかし Table 6 に示した如く、0.5M KClを用いて分離した場合でもなお Sed<sub>12000</sub> 中に高い $Mg^{++}$ 活性化 ATP-aseの存在が認められた。actomyosin の ATP-aseが低イオン強度において $Mg^{++}$  によつて活性化される事は良く知られており、Maruyama 等<sup>28)</sup>は  $I = 0.07$  以下では $Ca^{++}$ より $Mg^{++}$ が優位を示すと述べている。しかし Table 6 の実験条件では、 $I > 0.2$ である点より考えれば、この場合 Sed<sub>12000</sub>に残る $Mg^{++}$ 活性化 ATP-aseは actomyosin によるものとは考え難い。さらに Table 9 に示した如く、大動脈、総頸動脈などの弾性血管と股動脈などの筋性血管との間では、平滑筋成分の含有量に明らかな差があるにもかかわらず、ATP-ase活性には有意の差を認めない事も、Sed<sub>12000</sub>におけるATP-ase活性の中に含まれる actomyosin によるATP-aseが比較的少ない事を示しており、Sed<sub>12000</sub>のATP-ase活性

の主成分は actomyosin 以外にあると考えられる。

1956年、Needham 等<sup>32)</sup>は uterus のホモジネートにおいて mitochondrial 及び microsomal fraction に存在し、 $Mg^{++}$  及び  $Ca^{++}$  によつて同程度に活性化され、DNP にほとんど影響されない ATP-ase を報告し、これを particulate ATP-aseと呼んだ。本実験において得られた Sed<sub>12000</sub>におけるATP-aseはこの Needham 等のいう particulate ATP-aseそのものと比較的類似した性質を示しているように思われる。Needham 等は particulate ATP-ase は damaged mitochondria あるいは Kielley and Meyerhof の  $Mg$ -activated ATP-ase<sup>20)</sup> などに由来するものと推定しているが、本実験における Sed<sub>12000</sub>のATP-aseは mitochondria に由来するATP-aseが主成分ではなくその量は少ない事、また0.5M KClを用いて分離する事によつて $Ca^{++}$  活性化部分は減少し、 $Mg^{++}$  活性化の優位の傾向が現われる事などより考えて、Kielley and Meyerhof の  $Mg$ -activated ATP-ase<sup>20)</sup> と同種のものが主成分ではないかと考えられる。

以上の如く、Sed<sub>12000</sub>におけるATP-aseには各種の要素の混在があり、またその生理的意味に関しても多くの未解決な問題を含んでいるが、その活性は血小板について述べられている thrombosthenin<sup>4)</sup> に比較して充分高く、血栓形成に関与する ADP がこのATP-aseを介して動脈壁より生成される可能性は充分考えられる。この事はさらに Table 8 に示した如く、azide がこのATP-aseに対して抑制を示し、また in vivo における azide 溶液の血管腔内注入によつて活性が低下している事、また実験的血栓作成法の一つとして知られている thrombin 溶液の血管腔内注入によつてもATP-

ase 活性の上昇が観察された事などからも考えられる。

しかるに、動脈壁に対する通電, 圧挫などの血栓形成的刺激と考えられる操作を加えたものにおいて、Table 10に示した如く、逆にこの動脈壁ATP-ase活性は低下を示している。即ち血栓形成傾向と動脈壁のATP-ase活性の程度とは必ずしも平行していない。この事に関して教室の古瀬<sup>10)</sup>は動脈壁に通電, 圧挫, 内膜搔爬などの血栓形成的刺激を加えた後血管壁を組織化学的に研究しているが、損傷部においてはATP-ase活性は低下しているにもかかわらず、損傷部と正常部との境界において活性の明らかな増加が観察されると言う。また Essbach<sup>9)</sup>は血栓形成は内膜損傷部の周辺部より初発する事を述べている。従つて本実験の如く、ATP-ase 活性を動脈壁約5 cmの長さに亘つて測定、平均した場合には、たとえ動脈壁ATP-ase活性が低い値を示しても、この様な血管損傷部の周辺における局所的な活性の増加が存在し、その部に生じたADPが血栓形成の初発変化に関与する可能性は当然考えられる。この点に関しては、本実験において用いた測定法ではこの局所的な活性の変化を確認する事が出来ないために、測定方法そのものを改良した上でなければ確認出来ない。

一方 Skou<sup>40)</sup>によつて報告され、イオン能動輸送に関与していると考えられている $\text{Na}^+$ 及び $\text{K}^+$ によつて活性化されるATP-aseは Table 11 に示した如く、その存在を証明する事は出来なかつた。

#### IV. 小 括

1) 犬の総頸動脈におけるATP-aseは800 g, 5分及び12000 g, 15分の遠心の間に得られる particle (Sed<sub>12000</sub>)において最も高い活性を示したが、この particle におけるチトクローム含有量, 酸素消費量は少なかつた。

Sed<sub>12000</sub>におけるATP-aseは $\text{Mg}^{++}$ 及び $\text{Ca}^{++}$ によつて

同程度に活性化され、DNPによつて軽度活性化されたが、0.5M KClを用いて分離する事によつて、Sed<sub>12000</sub>における $\text{Ca}^{++}$ 活性化部分は減少し、また人動脈, 総頸動脈, 股動脈の間に活性値の有意の差は認められなかつた。下大静脈では活性は低く、動脈の約1/10の値を示した。

Sed<sub>12000</sub>のATP-aseの optimum pHは8.5附近に認められた。

Sed<sub>12000</sub>のATP-aseはazideによつて抑制され、in vivoにおける azide の血管腔内注入によつても活性は約40%低下した。一方 thrombin 溶液を血管腔内に注入した場合には活性は約10%上昇した。動脈壁に対して通電, 圧挫等の操作を加えた場合には、このATP-aseの活性は低下した。

2) 総頸動脈壁においてはNa-K dependent ATP-aseの活性はほとんど認められなかつた。

3) 以上の如く、動脈壁において高いATP-ase活性が存在し、血栓形成に関与するADPがこのATP-aseによつて産生される可能性が考えられるが、動脈壁に対して通電, 圧挫などの損傷的刺激を加えた場合には、損傷部とそれに隣接するいわゆる正常部との境界附近におけるATP-ase活性の上昇が推定され、この事に関しては今後の検討が必要である。

### 第三章 考 按

血小板において actomyosin 様の蛋白でATP-ase活性を有する物質の存在が報告されており<sup>41)</sup>、そのATP-aseによるADP生成が血栓形成に関与する事が述べられている<sup>43)</sup>。また thrombin<sup>13)</sup>, collagen<sup>51)</sup>, connective tissue<sup>51)</sup>, noradrenalin<sup>34)</sup>, 5-hydroxytryptamin<sup>5)</sup> など血小板集塊形成を促進する物質がATP-aseを活性化する事を強調する報告もある<sup>34)</sup>。さらに Honour 等<sup>18)</sup>は動脈壁の損傷に際してADP又はそれに関連する物質が損傷部より遊離される可能性を示唆している。

Table 12 Characteristics of ATP-ase of the Sed<sub>12000</sub> suspension of dog carotid artery

|                          |                                                            |
|--------------------------|------------------------------------------------------------|
| localization             | sediment between 800g for 5 min.<br>and 12000g for 15 min. |
| $\text{Mg}^{++}$         | activation                                                 |
| $\text{Ca}^{++}$         | activation                                                 |
| DNP                      | slight activation                                          |
| optimum pH               | 8.5                                                        |
| cytochrome content       | low                                                        |
| oxygen uptake            | low                                                        |
| actomyosin contamination | probable                                                   |

第Ⅰ章及び第Ⅱ章において観察した如く、血栓形成に際して動脈壁の一般的な代謝過程の変化が関与している事、また動脈壁においては血小板について述べられている thrombosthenin<sup>4)</sup> に比較して充分高い ATP-ase 活性が存在する事が明らかとなつた。これらの事を考慮すれば、血栓形成に関与する vascular factor の一つとして動脈壁の ATP-ase 活性を想定する事が出来る。即ち血栓形成的刺激が動脈壁に加えられる事によつて動脈壁における ATP-ase が活性化され、生じた ADP によつてその部に血小板集塊が形成されると言う機構が考えられる。この事に関して、通電法による動脈血栓形成に対する各種薬剤の影響を観察したが、azideにより血栓形成は著しく阻害され、これは azide により動脈壁 ATP-ase が阻害された結果 ADP 産生が抑制されるためと考えられる。また thrombin 溶液の血管腔内注入により動脈壁の ATP-ase が活性化された事も、動脈壁の ATP-ase 活性が血栓形成に関与している事の可能性を支持する所見である。第Ⅱ章において観察された通電、圧挫等の動脈壁損傷による ATP-ase 活性の低下も、すでに考察した如く、損傷部と正常部との境界における ATP-ase 活性の上昇、あるいは損傷の周辺部よりの血栓の初発などを考慮すれば前述の血栓形成に対する動脈壁 ATP-ase の役割を否定するものではない。また静脈壁において ATP-ase 活性が低い事も、Wessler<sup>14)</sup> の述べている如く、静脈血栓が主として凝固血栓である事を考えれば、動脈血栓の場合と異なつた発生機序によるものとして解釈する事が出来る。

本研究においては血栓形成に関する ATP-ase が、生体の動脈の機能の上で如何なる役割を果しているかは明らかにし得なかつたが、これに関して、Honour 等<sup>18)</sup> は血小板集塊形成を促進する多くの物質が同時に血管収縮作用を持つている事を報告しており、この事は血管収縮を行なう動脈壁の actomyosin ATP-ase の活性が、血栓形成と関係を持つ事を示唆している。また O'Brien<sup>33)</sup> は mitochondria の swelling を防止する二、三の薬剤によつて血小板集塊形成が防止されるというが、この事は oxidative phosphorylation に関連した ATP-ase の活性化によつて血小板集塊が形成される可能性をも示している。動脈壁における主要な代謝経路は従来より glycolysis にあると言われて来たが<sup>25)</sup>、TCA-cycle や oxidative phosphorylation の存在も次第に明らかにされつつあり、ことに血管内膜においては活潑なこれらの代謝経路が存在する事が明らかとなつ

ている<sup>21)</sup>。従つて内膜における mitochondria の latent ATP-ase の活性化が血栓形成の要因となる事も考えられる。

以上の如く、詳細な作用機転に関しては多くの問題が解決されなければならないが、現在のところ血栓形成に関する vascular factor として動脈壁における ATP-ase 活性の変化が想定され、動脈壁の損傷的刺激により ATP-ase が活性化され、生じた ADP によつてその部に血小板集塊が形成されるに至る事が考えられる。

## 結 語

1) 電気的方法を用いた血栓作成法により、犬の総頸動脈に形態学的に典型的な動脈血栓を高率に作成し得る。血栓作成率は電流の強さ及び通電時間の影響を受け、本研究において用いた条件では 5 mA, 15 分間の直流通電によつて常に血栓形成が見られた。

2) 通電部の動脈内への薬剤の灌流によつて血栓作成率は変化する。citrate 及び adenosine は抑制的な効果を示したが、ATP による影響は明らかではなかつた。

静脈内への heparin の投与によつて血栓作成率は低下する。

通電を行なう前に動脈壁に薬剤を作用させる事によつて血栓作成率は変化する。即ち azide 溶液の血管内注入によつて著明な血栓形成の抑制が認められた。一方 ouabain, monoiodoacetate は明らかな効果を及ぼさなかつた。

3) 犬の総頸動脈においては比較的高い ATP-ase 活性が存在し、800 g, 5 分及び 12000 g, 15 分の遠心の間に得られる particle において最も高い活性を示すが、この particle におけるチトクローム含有量、酸素消費量は少ない。この particle における ATP-ase は  $Mg^{++}$  及び  $Ca^{++}$  によつて同程度に活性化され、DNP によつて軽度活性化されるが、0.5 M KCl を用いて分離する事によつて  $Ca^{++}$  活性化部分は減少する。また大動脈、股動脈においても同程度の ATP-ase 活性が存在する。一方下大静脈においては活性は低い。

この ATP-ase の optimum pH は 8.5 附近に存在する。azide はこの ATP-ase に対して抑制効果を示し、in vivo における azide の溶液の血管腔内注入によつて活性は低下する。一方 thrombin 溶液の血管腔内注入によつて活性は軽度上昇する。動脈壁に通電、圧挫などを行なつた場合には活性は低下する。

動脈壁においては  $Na^+$  及び  $K^+$  によつて活性化され



るATP-aseはほとんど認められない。

4) 以上の結果より, 動脈壁における基礎的代謝過程の変化が血栓形成に関与している事が推定され, ことにADPによる血小板集塊形成現象に関連して, 動脈壁におけるATP-ase活性の変化が血栓形成に対するvascular factor として想定される。即ち動脈壁に加えられた刺激によるATP-aseの活性化により, 動脈壁においてADPが産生され, それによつてその部に血小板集塊が形成されると言う機構が考えられる。

\* チトクローム含有量測定に際して, spectrophotometric recording は大阪大学生化学教室(萩原文二教授)の好意により実施していただいた。謹んで謝意を表します。

終りに臨み, 本研究にあつて終始御指導いただき, 御校閲を賜つた半田 肇教授に心から感謝いたします。また多くの有益な御忠告, 御助力を賜つた小沢和恵博士に厚く御礼申しあげます。

本論文の要旨は, The Third International Congress of Neurological Surgery (1965. 8) 及び第7回日本脈管学会総会(1966. 10)で発表した。

## REFERENCES

- 1) Astrup, T., Albrechtsen, O. K., Classen, M. and Rasmussen, J.: Thromboplastic and fibrinolytic activity of the human aorta. *Circ. Res.* **7**: 969-976, 1959.
- 2) Baló, J. Banga, I. and Josepovits, G.: Enzymic activity of the aorta. Adenylpyrophosphatase of the aorta. *Ztschr. Vit. Horm. Fermentforsch.* **2**: 1-10, 1948.
- 3) Banga, I. and Nowotny, A.: Comparative studies about adenosinetriphosphatase activity of human muscle, aorta, and arteria femoralis. *Acta Physiol. Acad. Scient. Hung.* **2**: 317-325, 1951.
- 4) Bettex-Galland, M. and Lüscher, E. F.: Thrombosthenin-A contractile protein from thrombocytes. Its extraction from human blood platelets and some of its properties. *Biochim. Biophys. Acta* **49**: 536-547, 1961.
- 5) Born, G. V. R., Ingram, G. I. C. and Stacey, R. S.: The relationship between 5-hydroxytryptamine and adenosine triphosphate in blood platelets. *Brit. J. Pharmacol.* **13**: 62-64, 1958.
- 6) Born, G. V. R. and Cross, M. J.: The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* **168**: 179-195, 1963.
- 7) Born, G. V. R., Honour, A. J. and Mitchell, R. A. Inhibition by adenosine and by 2-chloroadenosine of the formation and embolization of platelet thrombi. *Nature (London)* **202**: 761-765, 1964.
- 8) Carr, C. J. Bell, F. K. and Krantz, J. C. Jr.: Adenosine triphosphatase activity of the vascular system. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **80**: 323-325, 1952.
- 9) Essbach, H.: Pathologische Anatomie der kranken Gefäßwand. Gefäßwand und Blutplasma. Jena G. Fischer, p. 1, 1961.
- 10) Furuse, S.: To be published. *Arch. Jap. Chirurg.*
- 11) Gaarder, A., Jonsen, L., Laland, S., Hellem, A. J. and Owren, P. A.: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature (London)* **192**: 531-532, 1961.
- 12) Gilsdorf, R., Bina, P. C. and Absolon, K. B.: Investigation on thrombosis using a new experimental model. *J. A. M. A.* **186**: 932-934, 1963.
- 13) Grette, K.: The mechanism of thrombin-catalyzed hemostatic reactions in blood platelets. *Acta Physiol. Scand.* **56** Suppl. 195, 1962.
- 14) Gross, R., Gerok, W., Löhr, G. W., Waller, H. D. and Theopold, W.: Über die Natur der Thrombosthenie (Thrombosthenie Glanzmann-Naegeli). *Klin. Wchnschr.* **38**: 193-206, 1960.
- 15) Hagihara, B.: Application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* **46**: 134-142, 1961.
- 16) Haslam, R. J.: Role of adenosine diphosphate in the aggregation of human blood platelets by thrombin and fatty acids. *Nature (London)* **202**: 765-768, 1964.
- 17) Hellem, A. J.: The adhesiveness of human blood platelets in vivo. *Scand. J. Clin. Lab.*

- Invest. 12 Suppl. 51, 1960.
- 18) Honour, A. J. and Mitchell, J.R.A. : Platelet clumping in injured vessels. *Brit. J. Exp. Path.* **45** : 75-87, 1964.
  - 19) Hunt, P. S., Reeve, T. S. and Hollings, R. M. : A "standard" experimental thrombus. Observations on its production, pathology, response to heparin, and thrombectomy. *Surgery* **59** : 812-816, 1966.
  - 20) Kielley, W. W. and Meyerhof, O. : Studies on adenosinetriphosphatase of muscle. 2. A new magnesium-activated adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.* **176** : 591-601, 1948.
  - 21) Kirk, J. E., Hansen, P. F., Effersøe, I. G. and Iversen, K. : A procedure for determination of the respiration of avascular and poorly vascularized tissue membranes. *J. Biol. Chem.* **208** : 17-21, 1954.
  - 22) Kirk, I. E. : The adenylpyrophosphatase, inorganic pyrophosphatase, and phosphomonoesterase activities of human arterial tissue in individuals of various ages. *J. Gerontol.* **14** : 181-188, 1959.
  - 23) Kolin, A. : An electromagnetic flowmeter. Principle of the method and its application to blood-flow measurements. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **35** : 53-63, 1936.
  - 24) Lamb, J. C., Isaacs, J. P., Bloom, W. L., and Harmer, D. S. : Electrical thrombosis of blood vessels : A voltage-dependent phenomenon. *Am. J. Physiol.* **208** : 1006-1008, 1965.
  - 25) Lehninger, A. L. : The metabolism of the arterial wall. Lansing, A. L. ed. *The arterial wall* : p. 220-246, Baltimore, Williams and Wilkins Corp. 1956.
  - 26) Lindberg, O. and Ernster, L. : Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analysis. *Meth. Biochem. Anal.* **3** : 1-22, 1956.
  - 27) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
  - 28) Maruyama, K. and Ishikawa, Y. : Effect of magnesium and calcium on the ATP-ase activity of actomyosin at low ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta* **77** : 682-685, 1963.
  - 29) Mitchell, J. R. A. and Sharp, A. A. : Platelet clumping in vitro. *Brit. J. Haemat.* **10** : 78-93, 1964.
  - 30) Murray, M. : Vasculokinase, a clotting substance from arteries. *Am. J. Clin. Path.* **36** : 500-504, 1961.
  - 31) 中村元臣 : 動脈の代謝. 最新医学, 18巻 804-812頁 昭38.
  - 32) Needham, D. M. and Cawkwell, J. M. : Some properties of the actomyosin-like protein of the uterus. *Biochem. J.* **63** : 337-344, 1956.
  - 33) O'Brien, J. R. : Platelet aggregation. *J. Clin. Path.* **15** : 446-455, 1962.
  - 34) O'Brien, J. R. : A comparison of platelet aggregation produced by seven compounds and a comparison of their inhibitors. *J. Clin. Path.* **17** : 275-281, 1964.
  - 35) Sawyer, P. N. and Pate, J. W. : Bio-electric phenomena as an etiologic factor in intravascular thrombosis. *Am. J. Physiol.* **175** : 103-107, 1953.
  - 36) Sawyer, P. N. and Pate, J. W. : Electric potential differences across the normal aorta and aortic grafts of dogs. *Am. J. Physiol.* **175** : 113-117, 1953.
  - 37) Sawyer, P. N., Pate, J. W. and Weldon, C. H. : Relation of abnormal and injury electric potential differences to intravascular thrombosis. *Am. J. Physiol.* **175** : 108-112, 1953.
  - 38) Schwartz, S. I. : Prevention and production of thrombosis by alterations in electric environment. *Surg. Gynec. Obstet.* **108** : 533-536, 1950.
  - 39) Scudamore, C. : *Essay on the blood*. Longmans, Hurst, Rees, Orme, Brown and Green. London. 1824.
  - 40) Skou, J. C. : The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* **23** : 394-401, 1957.
  - 41) Skou, J. C. : Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved

- in active transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  *Biochim. Biophys. acta* **58**: 314-325, 1962.
- 42) Spaet, T. H. and Zucker, M. B. : Mechanism of platelet plug formation and role of adenosine diphosphate. *Am. J. Physiol.* **206** : 1267-1274, 1964.
- 43) Troup, S. B. and Lüscher, E. F. : Hemostasis and platelet metabolism. *Am. J. Med.* **33** : 161-165, 1962.
- 44) Wessler, S. : Stasis, hypercoagulability, and thrombosis. *Fed. Proc.* **22** : 1366-1370, 1963.
- 45) Wollemann, M. and Kocsar, L. : Oxydative phosphorylation in aortic homogenates. *J. Atheroscler. Res.* **4** : 367-369, 1964.
- 46) Yang, C. C. and Legallais, V. : Rapid and sensitive recording spectrophotometer for the visible and ultraviolet region. 1. Description and performance. *Rev. Sci. Instr.* **25** : 801-807, 1954.
- 47) Yoshida, K. : Experimental studies on the production and treatment of the carotid thrombosis in dogs. *Arch. Jap. Chirug.* **31** : 502-525, 1964.
- 48) Zemplényi, T. : Enzymes of the arterial wall. *J. Atheroscler. Res.* **2** : 2-22, 1962.
- 49) Zemplényi, T. : The phosphomonoesterase and adenylypyrophosphatase activities of the aorta in different animal species. *Brit. J. Exp. Path.* **44** : 278-283, 1963.
- 50) Zucker, M. B. and Borrelli, J. : Changes in platelet adenosine triphosphate concentration and phosphate distribution during viscous metamorphosis and clot retraction. *Blood platelets*. p. 383, Boston, Little, Brown and Co. 1961.
- 51) Zucker, M.B. and Borrelli, J. : Platelet clumping produced by connective tissue suspension and by collagen. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **109** : 779-787, 1962.