

ヒト脳腫瘍における $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ 活性の検討

三宅 仁志・栗原 正紀・河野 輝昭・森 和夫

 $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ in Human Brain Tumors

Hitoshi MIYAKE, Masaki KURIHARA, Teruaki KAWANO and Kazuo MORI

Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki

Abstract

Na^+-K^+ -stimulated adenosine triphosphatase ($\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$) activities were measured in 12 human brain tumors and surrounding tissue (white matter and cortex) by the colorimetric determination of hydrolyzed inorganic phosphorus (Pi) from adenosine triphosphate (ATP). In glioma cases, the brain microvessels, glial component, and neurons were isolated from the cortex by the methods of Brendel, *et al.*, and Nagata, *et al.* In each sample, $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ activity was measured in the presence of various K^+ ion concentrations.

In 8 glioma cases, the lowest value was obtained in the glioblastoma multiforme. Decrease in $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ activity in the tumor or in the surrounding tissue was roughly proportional to the pathological malignancy of the tumor. In 2 cases of glioma with an epileptic focus shown by electroencephalography, activity of the enzyme was decreased in the epileptic cortex. In one case of glioma without epileptic focus, decrease of the enzyme activity was mainly attributed to decrease in the glial component. The kinetic parameters, maximum velocity (V_{max}) and activation constant for K^+ (K_a) were also calculated in each sample to determine the effect of the K^+ ion on the $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ activity. V_{max} in the tumor region was significantly decreased compared with the surrounding tissue. On the other hand, differences in K_a were not so significant. Disturbed buffering action for the extracellular K^+ ions observed in the glioma group might result in lowered ability to maintain the electrolytic milieu, and might play a significant role in the development of the epileptic focus.

Key words: brain neoplasms, $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$, glia, epileptogenesis

I はじめに

$\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ は細胞の形質膜に局在し、ATP をエネルギー源とし Na^+ や K^+ の能動輸送に関与するが、ヒト脳腫瘍における本酵素活性の変動をみた報告は少ない。一方、細胞の静止膜電位は K^+ イオンの平衡電位に等しく、 $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ 活性の障害による細胞外 K^+ 濃度の増加は細胞の興奮性を高めるため、本酵素とてんかん原性 (epileptogenesis) との関連を論じた報告も散見される^{2-5,10,13,17,19)}、ヒト脳腫瘍についての検討は、これまたきわめてまれである。

II 対象および方法

1. 対象

長崎大学脳神経外科において手術を受けた脳腫瘍患者12例を対象とした。内訳は astrocytoma 7例, glioblastoma multiforme 1例, neuroblastoma 1例, metastatic brain tumor 2例, meningioma 1例であり、男女比は4:8、年齢は24~66才であった。

2. 方法

検体の採取: 開頭手術時、腫瘍到達経路に沿い、大脳皮質部(以下 cortex)、皮質下腫瘍周囲白質部(以下 white mat-

長崎大学脳神経外科

Address reprint requests to: H. Miyake, M.D., Department of Neurosurgery, Nagasaki University, 7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki 852.

受稿 1984年10月29日 受理 1985年2月4日

ter), および腫瘍部(以下 tumor)より検体を採取し, これを 0.32 M sucrose を含む氷冷 0.01 M Tris HCl buffer (pH 7.4)にて血液成分を洗滌後, 速やかに凍結し, 活性測定時まで -80°C で保存した. また, 減圧の目的で脳葉切除術(lobectomy)を施行した症例について腫瘍から離れたところの cortex を対照として用いた.

Na⁺-K⁺ATPase 活性の測定: 上記検体の whole homogenate を酵素標品とし, final condition が NaCl 100 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 1 mM, Tris HCl (pH 7.4) 50 mM, ATPNa₂ 3.3 mM の buffer とともに 37°C 下で約20分間 incubate し, 反応後生じた燐を中村らの方法^{15,16)}により測定した. 比活性は, この反応系において 1 mM ouabain を加えていないときの値(total ATPase 活性)と加えたときの値(Mg²⁺ATPase 活性)との差より求め, $\mu\text{M Pi/mg protein/hr}$ で表した. また, 蛋白量は Lowry 法¹¹⁾にて測定した.

K⁺ による Na⁺-K⁺ATPase の賦活効果: 標品を種々の濃度(0~20 mM の範囲)の K⁺ 溶液中で反応させ, 得られた活性値より K⁺ による Na⁺-K⁺ATPase の activation curve を描き, maximum velocity(以下 Vmax)および activation constant for K⁺(以下 Ka)を求めた.

Cortex における分離組織別 Na⁺-K⁺ATPase 活性の測定: Ficoll gradient を用いた永田らの bulk separation 法¹⁴⁾ および nylon mesh を用いた Brendel らの微小血管分離法¹⁾により cortex 標本をさらに neuron, glia, および microvessel の 3 部に分離し, 各分離組織別に本酵素活性を測定した.

III 結 果

1. 検体採取部位別, 病理組織型別にみた Na⁺-K⁺ATPase 活性

検体採取部位別では, Na⁺-K⁺ATPase 活性は各症例において cortex でもっとも高く, tumor 部でもっとも低い傾向を示した(Table 1). Tumor 部では<症例 1>(astrocytoma grade I)で1.14, <症例 5>(同 grade II)で0.97, <症例 6>(同 grade III)で0.35と良性グリオーマほど活性値が高く, glioblastoma の<症例 8>では0.19と活性値がもっとも低下していた. また, 転移性脳腫瘍の 2 例も著しい低値を示していた.

2. 焦点形成の有無と cortex の Na⁺-K⁺ATPase 活性

術前に EEG が記録されたグリオーマ 6 例のうち発作波がみられたものが 2 例あり(Table 1), これらでは cortex の活性値がほぼ $2 \mu\text{M Pi/mg protein/hr}$ のあたりにあり, 対照に比し明らかに低値を示していた(Fig. 1). 一方, 臨床, EEG 上ともに発作を認めない残りの 4 例では最低

Table 1 Histopathology, specific activity of Na⁺-K⁺ATPase and EEG finding

Case No.	Age & Sex	Pathology	Na ⁺ -K ⁺ ATPase activity ($\mu\text{M Pi/mg protein/hr}$)			EEG*
			Cortex	White matter	Tumor	
1	44F	astrocytoma grade I	2.32	2.00	1.14	+
2	49F	astrocytoma grade I-II	4.44	1.37	0.86	
3	24F	astrocytoma grade II	3.75	2.83	1.15	-
4	43F	astrocytoma grade II	3.32	1.18	0.98	-
5	66M	astrocytoma grade II	3.18	1.42	0.97	
6	47M	astrocytoma grade III	1.79	1.30	0.35	+
7	38F	astrocytoma grade III	2.00	0.17	0.35	-
8	33F	glioblastoma multiforme	1.21	0.93	0.19	-
9	27M	neuroblastoma	4.18	2.61	3.08	-
10	66F	metastatic brain tumor	2.08	1.58	0.13	
11	57M	metastatic brain tumor	4.24	2.00	0.33	
12	59F	meningioma control	— 3.99±0.14	—	3.38	

*EEG (+): seizure discharge was present in EEG, (-): seizure discharge was absent in EEG. Na⁺-K⁺ATPase indicates Na⁺-K⁺-stimulated adenosine triphosphatase; EEG, electroencephalogram.

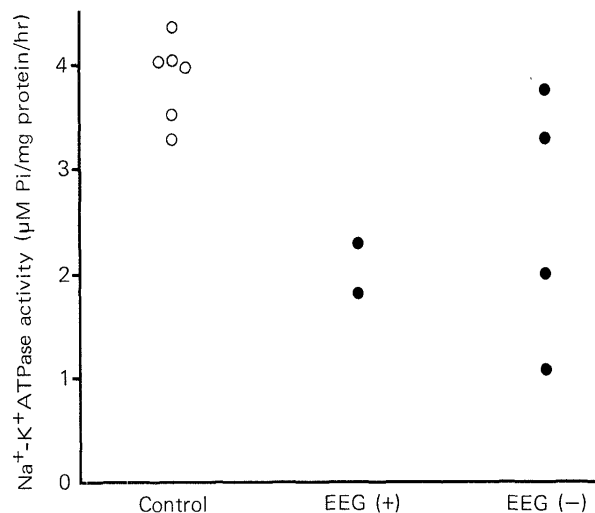


Fig. 1 Relationship between Na⁺-K⁺-stimulated adenosine triphosphatase (Na⁺-K⁺ATPase) activity in the cortex overlying the glioma and electroencephalographic (EEG) finding. EEG (+): seizure discharge was present in EEG, (-): seizure discharge was absent in EEG.

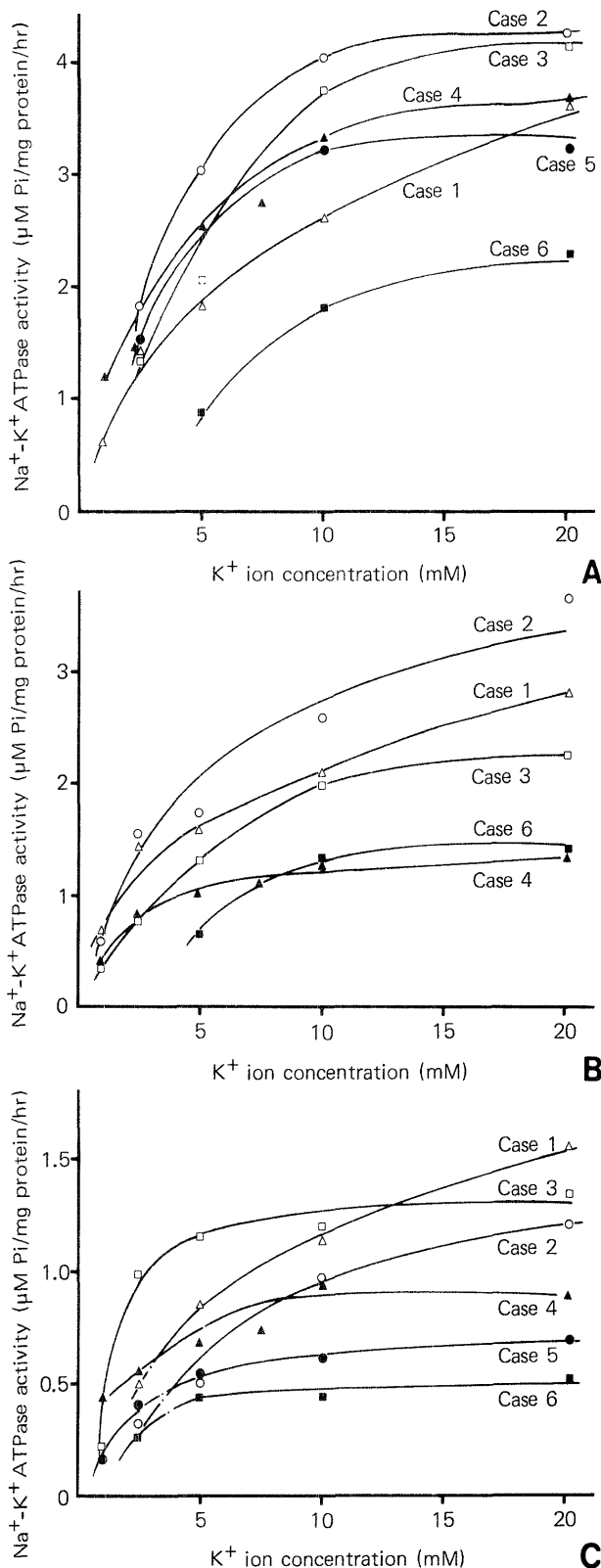


Fig. 2 Influence of K⁺ ion on the Na⁺-K⁺ATPase activities of cortex (A), white matter (B), and tumor (C).

1.21(〈症例8〉)から最高3.75(〈症例3〉)の範囲を示し、大きなばらつきが認められた。

3. K⁺濃度変化に伴うNa⁺-K⁺ATPaseの賦活効果

Fig. 2は、各症例におけるcortex, white matter, および tumor部での反応液中のKイオン濃度([K⁺])と本酵素活性値との関係を示したものである。逆数プロット法を用いるとほぼ直線となり、これよりkinetic parameterであるVmaxおよびKaを求めると、Table 2およびTable 3に示すようにVmaxはtumor部でもっとも低い値を、cortexでもっとも高い値を示していた。しかし、Kaについては〈症例5〉のようにcortexとtumor部でほぼ同値を示すもの、〈症例2〉のように逆にtumor部で高くなっているものもあり、white matterでもばらつきが多く、統計学的に有意の差はみられなかった。

4. Cortex部の各分離組織別Na⁺-K⁺ATPase活性

対照群においてはgliaはneuronの約3倍、microvesselはneuronの約1/2の活性値を示し、glia成分でもっとも高い値が認められた(Fig. 3)。これに対しグリオーマの〈症例7〉においては、対照群と比較し主としてglia成分で活性値が低下していた。

Table 2 Values of kinetic parameters of Na⁺-K⁺ATPase measured in astrocytoma

Case No.	Cortex		White matter		Tumor	
	Vmax	Ka	Vmax	Ka	Vmax	Ka
1	3.69	8.80	3.02	3.95	1.77	5.92
2	5.09	3.75	4.21	5.56	2.05	4.59
3	6.08	5.18	3.43	9.27	1.40	1.24
4	4.19	3.11	4.35	3.81	0.88	0.98
5	3.62	2.96	—	—	0.76	2.97
6	—	—	—	—	0.54	2.42

Values were calculated from the curves of Fig. 2. Vmax: maximum velocity (μM Pi/mg protein/hr), Ka: activation constant for K⁺ (mM [K⁺]).

Table 3 Values of kinetic parameters of Na⁺-K⁺ATPase measured in cortex, white matter, and tumor

	n	Vmax	Ka
Cortex	5	4.53±1.04*	4.76±2.42
White matter	4	3.75±0.63*	5.64±2.54
Tumor	6	1.23±0.60*	3.02±1.92

Values were calculated from the data of Table 2. *These values are significantly different at the 1% level.

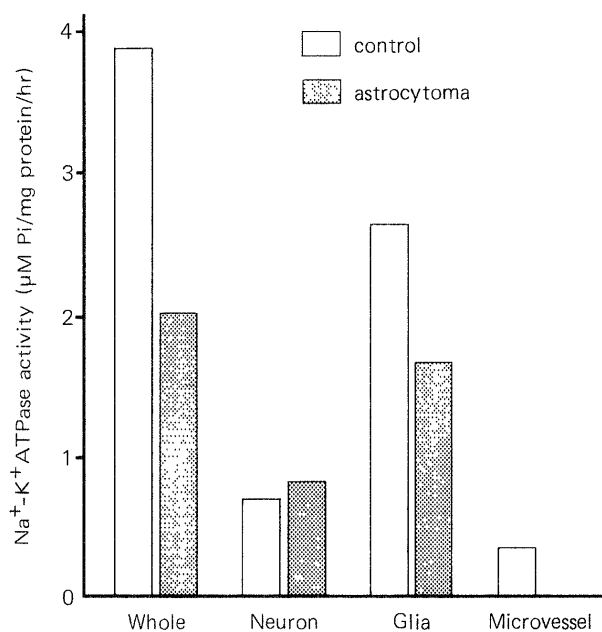


Fig. 3 Na⁺-K⁺ATPase activities of neuron, glia, and microvessel in cortex of control and of astrocytoma. Components of the control were isolated from the lobectomized cortex far from the tumor.

IV 考 察

臨床例においても動物実験においても、脳腫瘍の病理組織と本酵素活性を対比した検討は非常に少ない⁷⁻¹⁰⁾。そのなかでは59例の脳腫瘍についての Laws ら⁹⁾の報告が目をはなれ、彼らは多くの腫瘍で本酵素活性が低下しており、さらに組織の悪性度と活性値の低下が相関していると、本酵素活性の低下は中枢神経系腫瘍に特徴的な所見であると述べている。我々の今回の結果もこれとほぼ一致していた。

次に、てんかん焦点部における本酵素活性値については報告者により見解が大きく異なっている。たとえば、freezing injury やコバルトなどによる実験焦点においても活性値が増加するとするもの^{10,13)}と逆に低下するとするもの^{3,6,12,18-20)}とがあり、一致がみられないが、おしなべて慢性期の interictal stage では活性低下をみるとの報告が多い^{4,9,20)}。一方、臨床例の焦点における報告はまだまだ少なく、Rapport ら¹⁸⁾のヒト脳腫瘍における検討などが散見されるにすぎないが、彼らは皮質部での本酵素活性値の低下を認め、また皮質 neuron より astrocyte における低下が著明であったと述べている。我々の結果では、EEG 上発作波を認めた2例では対照群に比し活性値が低下しており、ともにほぼ2 µM Pi/mg protein/hr の値を示していたが、発作なしの群においては対照群に近い値を示した例、発作

ありの群と同程度の値を示した例、より低値を示した例と一定せず、さまざまであった。本酵素活性値の低下の程度と焦点形成との関わり合いが今後の検討課題となるものと思われる。

また、本酵素活性の低下が発作に結び付くとの説もある^{3,19)}。Grisar ら³⁾はネコの大脳皮質に cold injury によるてんかん焦点を作製し、対照群においては細胞外 K⁺ が高濃度になっても glia の本酵素活性値が上昇しつづけるのに比べ、焦点部 glia においては低い K⁺ 濃度で活性が飽和されることを報告しており、glia における V_{max}, K_a 値の低下による細胞外液中 K⁺ イオン([K⁺]_o)の急激な上昇に対する調節の欠如が考えられるとしている。我々の例においては K_a 値に有意な差は認められなかったが V_{max} は腫瘍化に伴い低下しており、cortex を neuron, glia, および microvessel の3部に分離すると、ことに glia 成分における活性値の低下が著しかった。このような脳腫瘍においては、glia の変化に基づき膜酵素である Na⁺-K⁺ATPase の活性が低下し、細胞外液中の K⁺ イオンの clearance が十分でなく、[K⁺]_o が上昇し、これが neuron を脱分極させて発作の生じやすい環境を形成していると言いうことができよう。

本論文の要旨は、第24回日本神経学会(1983年5月、京都)ならびに第26回日本神経化学会(1983年11月、大阪)において発表された。また、本研究の一部は昭和58年度文部省科学研究費補助金一般研究 B(No. 58480306)の援助により行われた。

文 献

- 1) Brendel K, Meezan E, Carlson EC: Isolated brain microvessels: A purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. *Science* 185: 953-955, 1974
- 2) Escueta AVD, Horan MP: *Antiepileptic Drugs; Mechanism of Action*. New York, Raven, 1980, pp 85-126
- 3) Grisar T, Franck G, Escueta AVD: *Advances in Neurology, vol 34*. New York, Raven, 1983, pp 199-208
- 4) Grisar T, Frere JM, Franck J: Effect of K⁺ ions on kinetic properties of the (Na⁺, K⁺)-ATPase (EC3.6.1.3.) of bulk isolated glial cells, perikarya and synaptosomes from rabbit brain cortex. *Brain Res* 165: 87-103, 1979
- 5) Henn FA, Haljanäe H, Hamberger A: Glial cell fraction: Active control of extracellular K⁺ concentration. *Brain Res* 43: 437-443, 1972
- 6) Jordan JE, Grice T, Mishra SK, Desai D: Acute chlordecone toxicity in rats: A relationship between tremor and ATPase activities. *Neurotoxicology (Park Forest II)* 2: 355-364, 1981
- 7) Knowles AF, Kaplan NO: Variable ATPase composition of human tumors plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 99: 1443-1448, 1981

- 8) Knowles AF, Leis JF, Kaplan NO: Isolation and characterization of plasma membranes from transplantable human astrocytoma, oat cell carcinomas, and melanomas. *Cancer Res* 41: 4031-4039, 1981
- 9) Laws ER, O'Connor JS: ATPase in human brain tumors. *J Neurosurg* 33: 167-171, 1970
- 10) Lesin E, Denver MBS: ATPase activity in discharging cortical lesions induced by freezing. *Arch Neurol (Chicago)* 16: 321-325, 1967
- 11) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 12) Mandel P, Stefanovic V, Hermetet JC, Ebel A: The (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity in brain of quaking mice. *Experientia* 32: 77-79, 1976
- 13) Marichich ES, Nasello AG: Epilepsy and adenosine-triphosphate (ATP): Effect of electrical stimulation and high potassium perfusion on hippocampal ATP content. *Brain Res* 57: 409-416, 1973
- 14) 永田 豊, 御子柴克彦, 塚田裕三: 密度勾配遠沈法による白鼠大脳皮質からの分離細胞群の生化学的研究. *神経化学* 9: 122-125, 1970
- 15) 中村道徳: 磷酸の比色定量法. *日農化会誌* 24: 1-5, 1950
- 16) Nakamura M, Mori K: Colorimetric determination of inorganic phosphorus in the presence of glucose-1-phosphate and adenosine triphosphate. *Nature* 182: 1441, 1958
- 17) Pedley TA, Fisher RS, Futamachi KJ, Prince DA: Regulation of extracellular potassium concentration in epileptogenesis. *Fed Proc* 35: 1254-1259, 1976
- 18) Rapport RL, Harris AB, Friel PN, Ojemann GA: Human epileptic brain. *Arch Neurol (Chicago)* 32: 549-554, 1975
- 19) Rapport RL, Harris AB, Lockard JS, Clark AF: Na⁺-K⁺-ATPase in serially excised segments of epileptic monkey cortex. *Epilepsia* 22: 123-127, 1981
- 20) Tan Ü, Marangoz C, Senyuva F: Electrocticographic effects of topically applied ouabain, epinephrine and bicuculline. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 226: 21-29, 1977

〔別刷請求先：〒852 長崎市坂本町7-1, 長崎大学脳神経外科, 三宅仁志〕