原 著

ウシおよびヒト血小板 α 顆粒内血管透過性
因子の生化学的検討芦原 義弘* 井村 稷二* 干川 就可*
新野 史* 白澤健二郎*Studies on biochemical analysis of vascular permeability
factors from bovine and human platelet α -granulesYoshihiro ASHIHARA*, Joji IMURA*, Nariyoshi HOSHIKAWA*,
Hitoshi NIINO* and Kenjiro SHIRASAWA*

Key words: platelet α -granule acid extract, vascular permeability
factor (VPF), biochemical analysis of platelets, human
and bovine platelets

Vascular permeability factor (VPF) was extracted from human and bovine platelet α -granules and partially purified by ion exchange and gel filtration chromatographies. Human and bovine VPFs were cationic proteins, and these isoelectric points were 9.2 and 8.8, respectively, by electric-focusing technique. The human VPF was mainly localized into the fraction of approximate Mw. of 30,000 by gel filtration (G-75). On the other hand, the bovine VPF was localized into the fraction, an estimated Mw. 140,000 by gel filtration (S-300). After purification by G-75 gel filtration, permeability activity of bovine VPF was 1,300 μ l/mg of protein. The stability of VPFs was also studied after a variety of treatments. These VPFs were activated at 50-60°C and extremely stable to a temperature up to 80°C. They were also stable on exposure to acid or alkaline (pH 1.3-12), but inactivated by pepsin or 2-mercaptoethanol treatment.

* 杏林大学医学部病理学第一講座〔〒181 三鷹市新川 6-20-2〕, The First Department of Pathology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan.

はじめに

血管透過性因子には炎症惹起物質としてセロトニンやヒスタミンのような化学物質、キニン、ロイコトリエンのようなペプチド、およびプラスミン、カリクレイン等のプロテアーゼが知られている¹⁾。

Packham ら²⁾は、ヒトおよびブタの血小板にトロンビン、あるいはコラーゲンを作用させて放出反応を惹起させ、その上清成分が同様に炎症反応を誘発することを示した。

その後 Nachman ら^{3,4)}は、ヒトの血小板 α 顆粒の酸抽出液中の塩基性蛋白にセロトニンとは異なる血管透過性亢進能を持つ因子があることを示した。われわれは、ヒトおよびウシの血小板 α 顆粒抽出液を用い、その透過性亢進能を検索して来た^{5,11)}が、今回、この抽出液に存在する本因子の分離、精製を試み、生化学的性質を比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 血管透過性因子 (VPF) の調整

1) ウシおよびヒト濃縮血小板の調整

一回の実験について、抗凝固剤 (EDTA 2 Na) を最終濃度で 0.01 M を含むウシ血液 10 l を Nightmage 遠心機 (大阪ミドリ十字社) により遠心 (615 xg, 4 min.) し、大部分の赤血球を除去した。さらに、遠心法 (1,500xg, 10 min.) により濃縮血小板を調整し、Itoh ら⁸⁾の方法により、1 mM EDTA 添加リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) にて洗浄し、他の血球を含まないウシ濃縮血小板を得た。

ヒト濃縮血小板 (日本赤十字血液センター製) に関しては、1 mM EDTA 添加 PBS にて 2 回洗浄して使用した。

2) α 顆粒分画の調整および酸抽出

濃縮血小板を超音波破碎装置 (大岳製作所) にて 150 W, 60 sec. でモホジェネートしたのち、連続蔗糖密度勾配法 (30-60 %) にて超遠心分離 (約 100,000 xg, model L 8-80 : Beckman) し、 α 顆粒分画を得た^{3,7)}。この分画を PBS にて一夜透析したのち、遠心 (2,500 xg, 15 min.) を行い、ペレットにした。これを Na-

chman ら^{3,4)}の方法に準じて、0.2 N 硫酸溶液にて抽出し、0.5 M リン酸三カリウム水溶液で中和したのち、PBS にて透析して、ウシ血小板 α 顆粒酸抽出液 (BPAE) およびヒト血小板 α 顆粒酸抽出液 (HPAE) を得た。

3) VPF の分離、精製、蛋白定量およびその他の処理

BPAE および HPAE に関して、DEAE イオン交換クロマトグラフィーののち、ゲルろ過 (Sephadex G-75, Sephacryl S-300) を行い部分精製 VPF を得た。この試料について、Folin-Lowry⁹⁾に従って蛋白定量を行った。さらに、BPAE および HPAE の熱処理 (25, 40, 50, 60, 80, 100°C, 30 min.) と Leabach⁹⁾らに準じた等電点電気泳動を行った。BPAE に関しては、56°C, 30 min. 処理した後、Sephadex G-75 にてゲルろ過を行った。

さらに、BPAE および HPAE について、trypsin, pepsin, papain, phospholipase-A₂, -C, -D, neuraminidase, β -galactosidase による酵素処理 (酸抽出液 200 μ g 当たり 10 μ g, 37°C, 30 min.) および 2-mercaptoethanol 処理 (10 mM, 37°C, 30 min.) を行った。

また、VPF の酸およびアルカリに対する安定性を調べる目的で、 α 顆粒抽出液を中性条件で得るため、超遠心分離によって得られた α 顆粒を PBS に懸濁し、4°C で超音波破碎 (150 W, 120 sec.) した。これを、遠心 (1,000 xg, 30 min.) し、その上清を PBS で一夜透析し、ウシ血小板 α 顆粒溶解抽出液 (BPLe) およびヒト血小板 α 顆粒溶解抽出液 (HPLe) を得た。これらの各試料について種々の pH 処理を行った (pH 1.3-12, 37°C, 30 min.)。

2. 炎症活性部位の観察

1) 実験動物

血管透過性の測定に関しては、前日背皮の剃毛を行った無麻酔下の日本白色種ウサギを用いた。

2) 浸出液の定量法

予め 2.5 % Evans 青 (1.0 ml/kg) を耳辺縁静脈より注入し、30 min. 経過したウサギ背皮内に 0.1 ml 宛部分精製 VPF (蛋白含量 : 200 μ g/ml), あるいはその他の処理を行った試料

Fig. 1 Elution patterns of HPAE (A) and BPAE (B) by DEAE ion exchange chromatography. The elution was carried out with 0.01 M phosphate buffer pH 8. The permeability activity (PA) is shown by stippled bars.

Fig. 2 Rabbit dorsal skin 1 hour after injection of the fractionated BPAE by DEAE ion exchange chromatography. Marked blueing is obvious only in the injected site of P-1 fraction, though very mild in P-2 and P-3 fractions or almost none in PBS.

を注射した。対照実験には、各試料の希釈に用いた PBS を用いた。さらに 1 時間放置したのち、炎症部位において血管外に浸出した Evans 青をクロマトスキャナー（島津製作所）を用い、ジグザグスキャンニングにより、当該浸出斑の 620 nm における反射強度を測定した⁵⁾。この際、浸出した色素を Udaka らの方法¹⁰⁾により foramide で抽出し、620 nm における吸収を測定した。

3) VPF の比活性の測定

各試料（表 1）の注射 30 分前に、ウサギ耳辺縁静脈内に ¹²⁵I-bovine serum albumin (NEM Research Products) 30 μ Ci を注射した。各試料の注射後 60 分に当該部皮膚を、直径 16 mm

の円形パンチによりおのおの採取し、Auto Well Gamma System JDC-752 (Aloka) にて、その放射活性を測定した。対照を PBS とし、実験前後の単位血漿中の放射活性から、採取部当りの浸出液量を算出し、活性単位は蛋白 1 mg の浸出液量 (μ l) として表示した。

II. 実験成績

BPAE および HPAE から DEAE イオン交換クロマトグラフィーでパス分画 (P-1) および吸着分画 (P-2, P-3) を得た（図 1）。このそれぞれの分画をウサギ背皮に注射すると、パス分画では 10 数分後から肉眼的に認められる強い青色斑を形成し、このものに VPF が存在す

Fig. 3 Gel filtration of the pass fraction (P-1) of HPAE (A) and BPAE (B) on DEAE ion exchange chromatographic column by Sephadex G-75. The elution was carried out with 0.05 M acetate buffer containing 0.1 M NaCl, pH 2. The permeability activity is shown by stippled bars.

ることが確認された。これに対し、吸着分画 (P-2, P-3) は極く軽度の青色斑を形成するに過ぎず、PBS では全く見られなかった (図 1, 2)。

また、BPAE 及び HPAE の等電点電気泳動による測定ではウシ VPF (BVPF) は pI 8.8 に、ヒト VPF (HVPF) では pI 9.2 に認めた。

BPAE のパス分画は、G-75 のゲルろ過によりボイド分画に最も強い血管透過性亢進能を示し、このものは Sephacryl S-300 によるゲルろ過では分子量 14 万を示した。分子量 3 万付近の分画では、ボイド分画の 20 % の活性を示した。一方、HPAE のパス分画の G-75 ゲルろ過により得られた試料は、分子量 3 万付近で主な透過性亢進を惹起し、ボイド分画は分子量 3 万付近の分画の約 30 % の活性を示した (図 3)。

おのおのの精製過程における比活性は BPAE では 5.50 $\mu\text{l}/\text{mg}$ の活性を示し、HPAE は 1,500 $\mu\text{l}/\text{mg}$ の活性であった。最終的に Sephadex G-75 ゲルろ過により BVPF は 2.4 倍 (1,300 $\mu\text{g}/\text{mg}$) に精製された。HVPF はイオン交換により 1.2 倍 (1,800 $\mu\text{g}/\text{mg}$) に精製された (表 1)

VPF の熱安定性に関しては、ウシ、ヒトと

Fig. 4 Effects of heat treatments on the activity of VPFs. Twenty μg of VPF was incubated at each temperature for 30 minutes.

もに 40°C, 30 min. の処理により、透過性亢進能は 4°C 保存のものに比較して 40 % に低下した。しかし、50–60°C の熱処理では、逆に BVPF では 2.5 倍、HVPF では 4 倍に増強し、いずれも 80°C までその透過能は保持されていた (図 4)。

また、BPAE は 56°C, 30 min. の処理でボイド分画の透過活性が減少し、活性の主なピークは分子量 3 万付近に強く認められた。

BPLE および HPLE を用いた VPF の酸、アルカリに対する安定性試験では、pH 1.3–

Table 1 Specific activity of VPFs

Samples from	Bovine (μ l/mg)	Human (μ l/mg)
Acid Extract	550	1,500
DEAE Pass	1,200	1,800
Sephadex G-75	{ 1,300 (Void)	—

9.0, 30 min. の処理ではほとんど活性の低下はみられず、強アルカリ (pH 12) の処理でも 50 % の活性が保持されていた。

BVPF および HVPF の酵素処理に対する安定性は、両者とも neuraminidase, β -galactosidase や phospholipase-A₂, -C, -D には安定であった。しかしながら、pepsin および 2-mercaptoethanol 処理ではほぼ完全に失活した。

III. 総括および考察

ウシおよびヒト血小板由来 VPF は、それぞれ pI 8.8, pI 9.2 の塩基性蛋白であり、何れもウサギ背皮に注射すると、1-3 分の早期よりはじまり、徐々に増強する炎症を惹起する⁵⁾¹¹⁾¹²⁾。

BVPF は、G-75 ゲルろ過でボイド分画に主に含まれ、また分子量 3 万付近の分画にも透過活性を示した。さらに、56°C, 30 min. 加熱処理にて活性のピークが分子量 3 万付近に強く見られた。この結果から、ウシでは少なくとも 2 種類の VPF が含まれることが明らかで、高分子 VPF は分子量 3 万の成分を含む可能性が強い。一方、ヒトにおいては Nachman らの報告³⁾と一致して、分子量 3 万の分画に強い透過活性を認め、ボイド分画にはウシにおけるような強い活性は示さなかった。

酸による粗抽出のみでは、BPAE は HPAE の約 3 分の 1 の比活性を示したが、これは他の蛋白成分を BPAE が多く含むものと考えられる。また、G-75 によるゲルろ過ではウシの場合、ほとんどの蛋白成分がボイド分画に溶出されるため他の精製が必要とされる。また、ヒトに関しては精製に多量の血小板が必要とされ、ゲルろ過では蛋白定量並びに比活性を示すには至らず、今後の研究に期待したい。

また、ウシ、ヒト VPF は 50-60°C の熱処理により、その活性が何れも増強されたが、これは本因子が加熱処理により構造変化をきたすた

めか、あるいは、本因子に対する抑制因子がこの処理により除去されるために起こるものと推察される。また、本因子は 2-mercaptoethanol のような SH 還元剤、あるいは pepsin 分解により容易に失活するが、neuraminidase のような糖関連酵素および phospholipase 等のリン脂質関連酵素には影響されない。したがって、本因子はジスルフィド結合を含むペプチド鎖がその炎症惹起作用に関与するものと考えられる。

最近、われわれはヒト VPF が透過活性をもつのみでなく細胞増殖促進能を有し、酵素処理および熱処理に対する安定性、さらに分子量等の点でもヒト血小板由来成長因子 (PDGF) とよく類似することを示した¹²⁾。しかしながら、ヒト VPF は、PDGF と比較し、酸性側で極めて安定であることからみて、その透過性亢進に関しては活性部位が異なることが示唆される。

結 語

ウシおよびヒトの血小板 α 顆粒に存在する VPF は分子量がおおの 14 万、3 万と異なる塩基性の蛋白であり、両者は何れも pepsin および 2-mercaptoethanol により容易に失活し、熱処理により活性が上がることを示唆された。BVPF には分子量 3 万のものがあ、高分子量のもののは会合体を形成している可能性がある。

謝 辞

本研究に際し、貴重なヒト濃縮血小板を供与して頂いた東京都赤十字血液センター並びに Nightmage 遠心機を提供して下さいたミドリ十字社に深謝いたします。

文 献

- 1) Ryan, G.B. and Majino, G.: Acute inflammation; A review. *Am. J. Pathol.*, **86**; 185~276, 1977.
- 2) Packham, M.A., Nishizawa, E.E. and Mustard, J.F.: Response of platelets to tissue injury. *Biochem. Pharmacol.*, **17** (Suppl.); 171~184, 1968.
- 3) Nachman, R.L., Weksler, B. and Ferris, B.: Increased vascular permeability produced by

- human platelet granule cationic extract. J. Clin. Invest., **49**; 274~281, 1970.
- 4) Nachman, R.L. and Weksler, B.: The platelet as an inflammatory cell. Ann. N. Y. Acad. Sci., **201**; 131~137, 1972.
 - 5) Imura, J.: Studies on the vascular permeability factor of bovine and human platelets. Acta Pathol. Jpn., **36**; 1347~1357, 1986.
 - 6) Itoh, M., Nishimura, Y., Takenaka, O. and Inada, Y.: Measurement of clot reaction. Thromb. Diath. Haemorrh., **31**; 452~456, 1974.
 - 7) Marcus, A.J., Zucker-Franklin, D., Safier, L. B. and Ullman, H.L.: Studies on human platelet granules and membranes. J. Clin. Invest., **45**; 14~26, 1966.
 - 8) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Radall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**; 265~275, 1951.
 - 9) Leaback, D.H. and Rutter, A.C.: Polyacrylamide-isoelectric focusing. A new technique for the electrophoresis. Biochem. Biophys. Res. Commun., **32**; 447~453, 1968.
 - 10) Udaka, K., Takeuchi, Y. and Movat, H.Z.: Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **133**; 1384~1387, 1970.
 - 11) 干川就可, 井村穰二, 芦原義弘, 白澤健二郎: ウシ血小板 α 顆粒を用いての血管透過性に関する電顕的研究. 血液と脈管, **14**; 341~344, 1983.
 - 12) Imura, J., Ashihara, Y., Niino, H., Hoshikawa, N. and Shirasawa, K.: Correlative study on the vascular permeability and growth factors of human platelets. Abstracts. Thrombos. Haemostas. THHADQ, **54**; 70, 1985.

●わが国唯一の葉酸補酵素研究の完全な集大成!

葉 酸 — 基礎と臨床 —

編集 京都大学内科教授 内野治人 岐阜歯科大学内科教授 外林秀紀
専門医18氏分担執筆

A 5 判 484頁 図172 表104 定価9,800円(〒300円)

葉酸というものを通じての造血機能の研究は、臨床医のみでなく、また、医学部の基礎のみにとどまらず、生化学領域の基礎学者から、栄養学の領域まで拡大される。そして、この時点でのわが国の研究は、このような範囲にわたる広範な領域で行なわれてきており、そこで葉酸研究史をみるときに、わが国での研究の拡がりや深さを感じる。(序より)

【主要内容】

●わが国における葉酸研究の歴史 ●葉酸の基礎 (葉酸の定量法/葉酸補酵素の形態/葉酸の含量/葉酸補酵素の作用機序/葉酸補酵素の酵素的生成と相互転換) ●葉酸の臨床化学 (生体内運命/食品の葉酸測定と摂取量/食品中の葉酸のavailability/放射性同位元素を用いる葉酸測定法/正常血液葉酸値) 葉酸欠乏症 (欠乏症/シロネズミの葉酸欠乏飼料の調製法とその応用「血液学的所見」/無菌動物の葉酸代謝—葉酸代謝に対する腸内細菌の関与面—/核酸代謝からみた葉酸欠乏症) ●葉酸の臨床 (臨床応用とその展望/葉酸代謝異常症/わが国における葉酸欠乏症/葉酸利用障害/再生不良性貧血における葉酸療法に対する一考察/再生不良性貧血に対する葉酸の効果)