PAF 精製用イムノアフィニティーミニカラムを 活用した PAF の測定

—— thapsigargin による PAF 産生亢進と dexamethasone の効果 ——

渡邊雅子・渡邊孝則・山田将輝^{*1)}, 高萩英邦^{*2)}

無江季次^{*3)}, Lawrence Levine^{*4)}, 大内和雄^{*1)}

Determination of platelet activating factor using immunoaffinity mini-columns —Stimulation of platelet activating factor production by thapsigargin and effects of dexamethasone—

Thapsigargin, a hexaoxygenated tetraacylated sesquiterpene lactone isolated from the roots of *Thapsia garganica* L., is one of non-TPA type tumor promoters that stimulate prostaglandin E₂ production at very low concentrations and induce inflammation when applied topically. Effects of thapsigargin on platelet activating factor (PAF) production by rat peritoneal macrophages were examined. Levels of PAF in the conditioned medium and in the cells were determined by radioimmunoassay after extraction of PAF using immunoaffinity mini-columns. It was demonstrated that thapsigargin at concentrations of 3 to 100 ng/ml stimulated production of cell-associated PAF when measured 10 min after incubation. Levels of PAF in the conditioned medium were less than the detectable amount.

The stimulative effect by thapsigargin reached a plateau at a concentration of 30 ng/ml. Time course experiments revealed that the levels of cell-associated PAF showed a peak 10 to 15 min after incubation with thapsigargin at a concentration of 30 ng/ml. The levels were then declined until 40 min after incubation. When macrophages were preincubated for 3 h with dexamethasone at concentrations of 0.01, 0.1 and 1 μ g/ml, thapsigargin (30 ng/ml)-stimulated PAF production in the cells at 10 min were decreased. However, the maximum inhibition was about 50% even at 1 μ g/ml of dexamethasone. These data suggest that by treatment with

thapsigargin, PAF is partly produced through formation of lyso-PAF by activated phospholipase A₂ since dexamethasone shows partial inhibition of thapsigargin-induced PAF production, and thapsigargin-stimulated PAF production may partly account for proinflammatory activity of thapsigargin.

Masako Watanabe • Takanori Watanabe •
Masateru Yamada^{*1)}, Hidekuni Takahagi^{*2)},
Suetsugu Mue^{*3)}, Lawrence Levine^{*4)},
Kazuo Ohuchi^{*1)}

key words : platelet activating factor, thapsigargin,
immunoaffinity mini-column, macrophage,
dexamethasone

血小板活性化因子 (PAF) にはきわめて強い起炎作用があるが, 炎症反応にどれほど密接に PAF が関与しているかについては, PAF 拮抗薬を用いた研究からある程度の推測が行われている。たとえば, ラットのアレルギー性気管支炎モデルにおける好中球の浸潤は数種類の PAF 拮抗薬で抑制される^{1,2)}ため, PAF がなんらかのかたちで *in vivo* における好中球浸潤に係わっていることは間違いないものと思われる。実際, *in vitro* の系でも PAF は好中球に対する強い走化活性を示すし, thrombin や histamine 刺激による好中球の血管内皮細胞への接着亢進は PAF 拮抗薬によって抑制される³⁾。また, モルモットにおいてもアレルギー機序による好酸球の気道への浸潤を PAF 拮抗剤が抑制することが報告されている^{4,5)}。

一方, 炎症局所の渗出液あるいは浸潤細胞中に存在する PAF 量について測定することは, 炎症反応における PAF の関与について明確にするために必要なことである。生体試料中の PAF の測

^{*1)} Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University 東北大学薬学部生化学講座

^{*2)} Analytical and Metabolic Research Laboratories, San-kyo Co. Ltd. 三共株式会社分析代謝研究所

^{*3)} College of Medical Sciences, Tohoku University 東北大学医療技術短期大学部

^{*4)} Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, MA, 02254, USA

図1 Chemical structure of thapsigargin

図2 Chemical structure of BN 52179

定法として bioassay 法, radioimmunoassay 法および GC-MS 法があるが, いずれも試料の前処理(clean-up 操作)が大変であるために PAF の測定は容易ではない。

最近, 筆者らは, 抗 PAF 抗体を Sepharose 4B に固定してミニカラムに充填し, PAF 精製用のイムノアフィニティーミニカラムを開発することに成功した⁶⁾。このカラムを用いることにより, 生体試料中の PAF の部分精製を簡便に行うことができるようになり, 数種類の生体試料中の PAF の測定に活用している。

本研究は, 起炎作用がある thapsigargin(TG, 図1)について着目し, TG に PAF 産生促進作用があるかどうか検討した。

TG は, 植物 *Thapsia garganica* L.(Apiaceae) の根から分離されたもので, 肥満細胞の脱顆粒反応を促進させる作用がある^{7,8)}。また, マウス皮膚の2段階発癌モデルにおける non-TPA type の発癌プロモーターでもあり⁹⁾、筆者らは, TG には他の発癌プロモーターと同様に, きわめて微量で細胞のアラキドン酸代謝を亢進させる作用があることを報告している^{10,11)}。

材料と方法

(1) PAF 精製用イムノアフィニティーミニカラムの作製⁶⁾

PAF の誘導体である BN 52179(図2)をウシ血清アルブミンに結合してウサギを免疫し, 得られた IgG を Sepharose 4B に結合して懸濁液を調製した。これをプラスチック製ミニカラム(bed volume: 高さ 2.0 cm×直径 0.8 cm)に充填し, 使用前に 25 mM sodium phosphate buffer(pH 6.9)で洗浄した。

(2) ラット腹腔マクロファージの採取と培養
soluble starch と bacto peptone それぞれ 5% ずつ含む水溶液をオートクレーブ滅菌し, ラット(Sprague-Dawley 系, 雄)体重 100 g 当り 10 ml を腹腔に注入し, 4 日後に腹腔浸潤細胞を採取した^{10,11)}。血球計算盤によりマクロファージを計数し, 4 ml の Eagle's MEM(+10% calf serum)中に 6×10^6 個のマクロファージを懸濁し, 直径 60 mm のプラスチックディッシュ内で 2 hr 培養した。ついで, ディッシュ内を Eagle's MEM で 3 回洗浄し, non-adherent cells を洗い出した。adherent cells は 4 ml の Eagle's MEM(+10% calf serum)中で 20 hr 培養後, 再びディッシュ内を Eagle's MEM で 3 回洗浄し, つづいて各種濃度の TG(LC Services)を含む 4 ml の Eagle's MEM(+0.1% (w/v) bovine serum albumin, BSA, essentially fatty acid-free, Sigma)で培養した。

dexamethasone(DEX)の効果を検討する場合は, TG 存在下で培養する 3 hr 前に各種濃度の DEX を含む Eagle's MEM(+10% calf serum)で培養し, ディッシュを洗浄後, 同濃度の DEX と 30 ng/ml の TG を含む Eagle's MEM(+0.1% BSA)4 ml で 10 分間培養した。

(3) clean-up 操作⁶⁾

培養終了後, 培養液は $1,600 \times g$, $4^\circ C$ で 5 min 遠心して上清を採取した。ディッシュ内は Eagle's MEM で 3 回洗浄したあと, 2% 酢酸を含むメタノール溶液 2.5 ml を添加して細胞を剝離した。

培養液画分および細胞画分には, 回収率補正のためにそれぞれ $3.0 \times 10^{-3} \mu Ci$ の $[^3H]$ PAF(120 Ci/mmol, Du Pont/New England Nuclear)を添加した。それぞれの画分から総脂質を Bligh &

図3 Inhibition of $[^3\text{H}]$ PAF binding to BN 52179 antibody by L-PAF(●), BN 52179 (○), D-PAF(△) and D, L-lyso PAF(■) 16,000 cpm $[^3\text{H}]$ PAF added; 4,000 cpm specifically bound. One hundred-fold diluted IgG was used.

図4 Elution profiles of $[^3\text{H}]$ PAF and $[^3\text{H}]$ lyso-PAF

$[^3\text{H}]$ PAF and $[^3\text{H}]$ lyso-PAF were dissolved in 20% (v/v) methanol solution in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) and were applied to the immunoaffinity mini-column, then the column was washed with 3-ml portion of water containing indicated concentrations of methanol.

The radioactivity in each fraction was measured and recoveries of $[^3\text{H}]$ PAF(■) and $[^3\text{H}]$ lyso-PAF(□) were calculated.

Shaded columns and open columns represent the cumulative recoveries of $[^3\text{H}]$ PAF and $[^3\text{H}]$ lyso-PAF, respectively.

Dyer の方法¹²⁾に準じて抽出し、溶媒を乾固後、残渣を20%メタノール含有 25 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) に溶解した。この溶液を前もって同一 buffer で洗浄しておいたミニカラム

図5 Effects of various concentrations of thapsigargin on PAF production by rat peritoneal macrophages

Macrophages (6×10^6 cells) were incubated at 37°C for 10 min in 4 ml of Eagle's MEM (+0.1% BSA) containing indicated concentrations of thapsigargin. PAF levels in the cells are shown. PAF levels in the conditioned medium were less than the detectable amount. Values are the means $\pm$ SEM of 4 dishes. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs thapsigargin 0 ng/ml.

に負荷したあと、50%メタノールを含む H_2O 5 ml でカラムを洗浄した。ついで80%メタノールを含む H_2O 5 ml を流して PAF を溶出させた。溶出液は乾固させ、残渣を0.05%の Tween 20 を含む 50 mM の sodium phosphate buffer (pH 6.3) に溶解した。この溶液の一部は PAF の radioimmunoassay に使用し、一部は放射能測定に用い全操作過程の回収率を補正した。

(4) PAF の radioimmunoassay

PAF の radioimmunoassay は Du Pont/New England Nuclear 社の Platelet Activating Factor $[^{125}\text{I}]$ -RIA kit を用いて行った。本キットの PAF 抗体の交差反応性および測定方法はキットに添付されている Instruction Manual に記載されている。

結 果

(1) 抗 BN 52179 抗体の PAF に対する交差反応性⁶⁾

図3に示すように、抗 BN 52179 抗体は $[^3\text{H}]$ PAF と結合し、その結合は微量の BN 52179 で抑制されるだけでなく、cold PAF によっても強

図6 Time course of thapsigargin-induced PAF production by rat peritoneal macrophages

Macrophages (6×10^6 cells) were incubated at 37°C for indicated periods in 4 ml of Eagle's MEM (+0.1% BSA) with (●) or without (○) thapsigargin at a concentration of 30 ng/ml. PAF levels in the cells are shown. Values are the means $\pm$ SEM of 4 dishes.

く抑制された。しかし、lyso-PAF ではほとんど抑制されなかった。したがって、抗 BN 52179 抗体は PAF に対して親和性があるが、lyso-PAF には親和性がないことが示された⁶⁾。

(2) イムノアフィニティーミニカラムによる PAF の部分精製⁶⁾

20%メタノールを含む 25 mM の sodium phosphate buffer (pH 6.9) に一定量の [^3H] lyso-PAF と [^3H] PAF を溶解してカラムに負荷したあと、図4に示すようにメタノールの濃度を stepwise に高めた H_2O おおの 3 ml でカラムを洗浄し、おおののフラクション中の放射能を測定した。その結果、[^3H] lyso-PAF は 20~40%メタノールフラクションに溶出され、[^3H] PAF は 60~70%メタノールフラクションに溶出された⁶⁾。

したがって、以後の実験において PAF を試料から部分精製する場合には、試料をカラムに負荷し、メタノールを 50%含む H_2O 5 ml でカラムを洗浄したあと、メタノールを 80%含む H_2O 5 ml で PAF を溶出させた。イムノアフィニティーミニカラムによる PAF の部分精製操作における回収率は約 80%であった⁶⁾。

図7 Effects of dexamethasone on thapsigargin-induced PAF production by rat peritoneal macrophages

Macrophages (6×10^6 cells) were preincubated for 3 h at 37°C in 4 ml of Eagle's MEM (+0.1% BSA) containing indicated concentrations of dexamethasone. Cells were then washed 3 times with Eagle's MEM and further incubated for 10 min at 37°C in 4 ml of Eagle's MEM (+0.1% BSA) containing 30 ng/ml of thapsigargin and indicated concentrations of dexamethasone. PAF levels in the cells are shown. Values are the means $\pm$ SEM of 4 dishes. Statistical significance: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs thapsigargin-treated control.

(3) thapsigargin の PAF 産生亢進作用

ラット腹腔マクロファージを各種濃度の TG を含む Eagle's MEM (+0.1% BSA) 中で 10 min 培養し、培養液中および細胞中の PAF 量について測定した。その結果、図5に示すように、TG は細胞内の PAF 産生を濃度依存的に亢進する作用があることが明らかになった。なお、その作用は 30 ng/ml の濃度以上でプラトーに達した。

一方、培養液中の PAF 量は検出限界に達しなかった ($< 20 \text{ pg}$)。つぎに 30 ng/ml の TG 存在下でマクロファージを経時的に培養し、細胞内 PAF 量について測定した。その結果、細胞内 PAF 量は培養開始後 10~15 min に最大になり、以後時間とともに減少した(図6)。培養 40 min 後においても培養液中の PAF 量は検出限界に達しなかった。

(4) dexamethasone の効果

ラット腹腔マクロファージを各種濃度の dexamethasone (DEX) 存在下で 3 hr 培養したあと洗浄し、30 ng/ml の TG と各種濃度の DEX 存在

下で 10 min 培養して細胞中および培養液中の PAF 量を測定した。

その結果, TG 刺激により細胞内 PAF 量はいちじるしく上昇し, その上昇は $0.01 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の DEX で前処理することにより有意に抑制された(図 7)。 $0.1 \mu\text{g/ml}$ の DEX による PAF 産生抑制率は約 50%で, DEX の濃度を $1 \mu\text{g/ml}$ にしても抑制が増強されることはなかった。なお, 培養液中の PAF 量はいずれの群においても検出されなかった。

考 察

PAF を生体試料から簡単に部分精製するために, PAF に親和性を示す抗体を用いてイムノアフィニティーミニカラムを開発し⁹⁾, これを活用することにより生体試料中の PAF の測定を試みた。たとえば細胞培養液あるいは炎症性滲出液を直接カラムに負荷した場合, はじめに 50%メタノールでカラムを洗浄し, ついで 80%メタノールで PAF を溶出させるので, カラムのなかで試料中の蛋白質がメタノールによって変性してカラムが詰まるためカラムを繰り返し使用している間に流速がきわめてわるくなる。そのため, 試料を直接カラムに負荷することはしないで, Bligh & Dyer による方法¹²⁾で総脂質を抽出してからカラムに負荷したほうがカラムの再利用のためによい。

なお, 本カラム使用後は 100%メタノール, ついで H_2O それぞれ 10 ml で洗浄後, 25 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) でカラムを満たして 4°C で保存しておけば, 20 回以上は使用可能である。

TG は 10 ng/ml の濃度でマクロファージのアラキドン酸代謝を亢進させる作用がある^{10,11)}。このようにきわめて微量で細胞のアラキドン酸代謝を亢進させる作用があることは, マウス皮膚の 2 段階発癌モデルにおける他の発癌プロモーターと同様である。マウス皮膚の 2 段階発癌モデルにおける発癌プロモーターには protein kinase C (PKC) を活性化作用のある 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), teleocidin, aplysiatoxin, および PKC を活性化作用のない palytoxin, okadaic acid, staurosporine など

があり, 前者は TPA type の発癌プロモーター, 後者は non-TPA type の発癌プロモーターとして分類されている。TG は後者に属する発癌プロモーターである。

ヒト好中球¹³⁾やラット胸腔単核球¹⁴⁾において, TPA が PAF 産生を促進することはすでに報告されている。イムノアフィニティーミニカラムを用いて部分精製したあと radioimmunoassay で測定する方法により, 筆者らも 10 ng/ml の濃度の TPA がラット腹腔マクロファージの PAF 産生を促進することを認めている⁶⁾。

このように, TPA と同様に non-TPA type の発癌プロモーターである TG にも微量で PAF 産生促進作用があることから, 発癌プロモーターの起炎作用にはアラキドン酸代謝亢進のほかに PAF 産生亢進も関わっている可能性があることが示唆された。今後, TPA や TG 以外の発癌プロモーターにも PAF 産生亢進作用があるかどうか検討する必要がある。

ステロイド性抗炎症薬 DEX が PAF 産生を抑制することはすでに報告されており^{15,16)}, その作用機序としては PAF の生合成経路の一つである remodeling 系¹⁷⁾において DEX が phospholipase A_2 を間接的に抑制し, その結果 PAF の前駆体である lyso-PAF 量が低下するためであることが示唆されている。また, PAF は 1-alkyl-2-acetyl-glycerol に cholinephosphotransferase が作用することにより, コリンリン酸が導入される経路, すなわち de novo 系¹⁸⁾によっても合成される。

TG による prostaglandin E_2 産生亢進は $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{ M}$ の DEX で 3 h 前処理することにより無刺激群のレベルにまで低下する(未発表)が, TG による PAF 産生亢進は同様の DEX 処理によって約 50%しか抑制されない(図 7)。

したがって, TG による PAF 産生亢進は, remodeling 系と de novo 系の両経路を介して引き起こされていることが示唆された。前述したように, TG には PKC を活性化作用はないため, TG は TPA による PAF 産生亢進機序とは異なる機序で PAF 産生亢進を引き起こしていることになる。

炎症局所における PAF の産生亢進を効率よく抑制するためには, 炎症局所における PAF 産生

亢進機序について詳細に解明する必要があると思われる。

文 献

- 1) Watanabe, M., Arakida, Y., Tanabe, J., Sugidachi, A., Hirasawa, N., Mue, S., Ohuchi, K.: Pharmacological analysis of neutrophil chemotactic factor production by leucocytes and roles of PAF in allergic inflammation in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1994(in press).
- 2) Watanabe, M., Sugidachi, A., Omata, M., Hirasawa, N., Mue, S., Tsurufuji, S., Ohuchi, K.: Possible role for platelet-activating factor in neutrophil infiltration in allergic inflammation in rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92 : 396-403, 1990.
- 3) Watanabe, M., Yagi, M., Omata, M., Hirasawa, N., Mue, S., Tsurufuji, S., Ohuchi, K.: Stimulation of neutrophil adherence to vascular endothelial cells by histamine and thrombin and its inhibition by PAF antagonists and dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 102 : 239-245, 1991.
- 4) Coyle, A. J., Urwin, S. C., Page, C. P., Touvay, C., Villain, B., Braquet, P.: The effect of the selective PAF antagonist BN 5201 on PAF- and antigen-induced bronchial hyper reactivity and eosinophil accumulation. *Eur. J. Pharmacol.* 148 : 51-58, 1988.
- 5) Lellouch-Tubiana, A., Lefort, J., Simon, M. T., Pfister, A., Vargaftig, B. B.: Eosinophil recruitment into guinea pig lungs after PAF-acether and allergen administration. *Am. Rev. Resp. Dis.* 137 : 948-954, 1988.
- 6) Watanabe, M., Watanabe, N., Hirasawa, N., Mue, S., Muramatsu, S., Matsushita, Y., Takahagi, H., Braquet, P., Broquet, C., Levine, L., Ohuchi, K.: Preparation of immunoaffinity mini-columns for the analysis of platelet activating factor (PAF) in biological samples. *J. Chromatogr.* 597 : 309-314, 1992.
- 7) Rasmussen, U., Christensen, S. B., Sandberg, F.: Thapsigargin and thapsigarginine, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta Pharm. Suec.* 15 : 133-140, 1978.
- 8) Ohuchi, K., Takahashi, C., Hirasawa, N., Watanabe, M., Fujiki, H., Tsurufuji, S.: Stimulation of histamine release and arachidonic acid metabolism in rat peritoneal mast cells by thapsigargin, a non-TPA-type tumor promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1003 : 9-14, 1989.
- 9) Hakii, H., Fujiki, H., Suganuma, M., Nakayasu, M., Tahira, T., Sugimura, T., Scheuer, P. J., Christensen, S. B.: Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12 *O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 111 : 177-181, 1986.
- 10) Ohuchi, K., Sugawara, T., Watanabe, M., Hirasawa, N., Tsurufuji, S., Fujiki, H., Sugimura, T., Christensen, S. B.: Stimulation of arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages by thapsigargin, a non-(12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (TPA)-type tumor promoter. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113 : 319-324, 1987.
- 11) Ohuchi, K., Sugawara, T., Watanabe, M., Hirasawa, N., Tsurufuji, S., Fujiki, H., Christensen, S. B., Sugimura, T.: Analysis of the stimulative effect of thapsigargin, a non-TPA-type tumour promoter, on arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 94 : 917-923, 1988.
- 12) Bligh, E. G., Dyer, W. J.: A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 : 911-917, 1959.
- 13) Leyravaud, S., Bossant, M. J., Joly, F., Bessou, G., Benveniste, J., Ninio, E.: Biosynthesis of paf-acether X. Phorbol myristate acetate-induced paf-acether biosynthesis and acetyltransferase activation in human neutrophils. *J. Immunol.* 143 : 245-249, 1989.
- 14) Hayashi, M., Imai, Y., Oh-ishi, S.: Effects of some inhibitors on platelet-activating factor production in rat pleural cells by stimulation with phorbol myristate acetate. *Jap. J. Inflammation* 9 : 377-381, 1989.
- 15) Benhamou, M., Ninio, E., Salem, P., Hieblot, C., Bessou, G., Pitton, C., Liu, F. T., Mencia-Huerta, J. M.: Decrease in IgE Fc receptor expression on mouse bone marrow derived mast cells and inhibition of paf-acether formation and of β -hexosaminidase release by dexamethasone. *J. Immunol.* 136 : 1385-1392, 1986.
- 16) Fradin, A., Rpothhut, B., Poincelot-Canton, B., Errasfa, M., Russo-Marie, F.: Inhibition of eicosanoid and PAF formation by dexamethasone in rat inflammatory polymorphonuclear neutrophils may implicate lipocortin's. *Biochim. Biophys. Acta* 963 : 248-257, 1988.
- 17) Wykel, R. L., Malone, B., Snyder, F.: Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J. Biol. Chem.* 255 : 10256-10260, 1980.
- 18) Renooij, W., Snyder, F.: Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor and hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 663 : 545-556, 1981.