腹腔マクロファージによる LTs 産生

——特に LTA_4 から LTC_4 への転換段階についての検討——

阿部正義・恒松英明・川添 康・中島道夫・重松信昭*

Synthesis of leukotrienes by peritoneal macrophages: Especially, the stage of conversion of LTA_4 to LTC_4 Generation of subclasses of leukotrienes (LTs) from peritoneal macrophages of rat under stimulation of calcium ionophore A23187 *in vitro* is strongly influenced by the time elapsed after the intraperitoneal injection of thioglycollate medium. Peritoneal macrophages collected from mouse, rat, and guinea pig three days after the injection showed specific difference in the generation of LTs under the ionophore stimulation. That is, peritoneal macrophages of mouse and rat produced significant amount of LTC_4 and LTB_4 while those of guinea pig produced only LTB_4 . Enzyme solutions from macrophages of the three species converted DNCB to a colored product in the presence of glutathione, while only those of mouse and rat converted LTA_4 to LTC_4 in the presence of glutathione. These results suggest that macrophages of guinea pig lack “ LTC_4 synthetase” and also that this enzyme is different from the usual GSH S-transferases. On the basis of the enzyme activity, the subcellular distribution of LTC_4 synthetase of mouse is concluded that it is present mainly in the precipitate of $10^5 \times g$ centrifugation. This enzyme activity can be solubilized by Triton X-100.

Masayoshi Abe・Hideaki Tsunematsu・Yasushi Kikawaze・

Michio Nakashima・Nobuaki Shigematsu*

* Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University

key words: leukotrienes, conversion, macrophage, enzyme, specificity

ロイコトリエン (LT) は、種々の哺乳動物の組織および細胞で合成され、アラキドン酸のリポキシゲナーゼによる一連の代謝産物である^{1,2)}。LT は、その構造により大きく二つに分類される。すなわち、スルフィドペプチド LTs (LTC_4 , D_4 , E_4) とジハイドロキシ LTs (LTB_4 etc) である。

前者は、平滑筋の収縮作用^{3,4)} および血管透過性亢進作用⁵⁾ を示し、アレルギー反応との関連が考えられ、後者は多核白血球や単球の遊走を惹起し⁶⁾、急性および慢性炎症への関与が示唆されている。LTs は、シクロオキシゲナーゼ系における不安定中間代謝産物である PGG_2 および PGH_2 に相当する、 LTA_4 を介して LTC_4 または LTB_4 へ代謝が進むものと考えられる⁷⁾。

この二つの過程で働く LTA_4 hydrolase⁸⁾ ならびに LTC_4 synthetase⁹⁾ に関して、現在、精力的に研究が進められている。本研究では、マウス、ラット、モルモットの3種の動物の腹腔マクロファージについて、LTs 産生を検討したので報告する。

材料と方法

(1) HPLC の条件

逆相の HPLC は Novapack C_{18} (Waters 社, $0.39 \times$

15 cm) カラムを用い、アセトニトリル/メタノール/水/酢酸 (33.6/5.4/61.1 v/v) の移動相を用いて行った¹⁰⁾。順相の HPLC は、Radialpack (Waters 社, 0.8×10 cm) カラムを用い n-ヘキサン/イソプロパノール/酢酸 (95/5/0.01 v/v) の移動相で行った¹⁰⁾。分離検出には RCM-100 システムを用い、流速を前者は 1 ml/min、後者では 4 ml/min で行い、280 nm での吸光度をモニターした。

合成 LTC_4 , D_4 , E_4 は、武田薬品研究所の寺尾博士より、 LTB_4 ならびに LTA_4 メチルエステルは小野製薬研究所の戸田博士より提供を受けた。

(2) 細胞標本の作製

雄性的ラット (S-D 系, 体重 250~300 g), マウス (ICR 系, 20~25 g) およびモルモット (ハートレイ系, 300~400 g) を使用した。ラットおよびモルモット腹腔内には、それぞれ 20 ml, マウスには 2 ml の 2.5% チオグリコレート培地を注入し、3日後に瀉血により致死させ、腹腔内を1%ヘパリンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS pH 7.5) で洗って細胞を採取した。

ラットの場合には、さらに注入後4時間、1, 7, 14日のものからも、同様に細胞を採取した。細胞を含んだ洗浄液を $220 \times g$ ($4^\circ C$) で10分間遠心し、細胞を沈殿させ十分に洗浄した。10%胎児ウシ血清を含んだイーグル MEM に細胞を浮遊させ、プラスチック製ペトリ皿に移し、5% CO_2 通気下2時間 $37^\circ C$ でインキュベ

* 九州大学医学部胸部疾患研究施設

ートした。器壁付着細胞をラバーポリースマンで剥がして回収し、タイロッド液 (NaCl 8.0, KCl 0.2, MgCl_2 0.1, NaHPO_4 0.05, NaHCO_3 1.0, グルコース 1.0 g/l) に浮遊させ、マウスの場合を除いて 5×10^7 細胞ずつ試験管に分注し、各 9 ml に調製した。トリパンプルー排泌試験で調べたマクロファージの生存率は、95%以上であった。細胞の分類はギムザ染色し、光顕で行った。

(3) 酵素液の調製

腹腔内細胞の沈殿を溶血のため、0.83% NH_4Cl /170 mM, Tris-HCl (9/1 v/v) に浮遊させ、10分間 37°C でインキュベートさせた。その後、緩衝液 [NaCl 137, KCl 2.6, NaHPO_4 0.36, 4-(2-ハイドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸 (Hepes) 10, EDTA 1 mM, pH 7.0] に浮遊させ、氷冷下超音波破碎した。

その懸濁液を 4°C で20分間 $1500 \times g$ で遠心し、沈殿と上清を得た。沈殿物中の酵素活性は10% Triton X-100 をゆっくりと加えて可溶化させ (Triton X-100 の最終濃度は0.3% となるように希釈)、これを $10 \times 10^6 \times g$ で60分間遠心して得た上清について調べた。

(4) 細胞からの LTs の生成

L-システイン 1 ml (50 mM) を細胞の入った試験管に添加し (最終濃度 5 mM), 37°C で3分間ブレインキュベート後カルシウムイオノフォア A23187 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え、さらに20分間インキュベートした。4倍量の冷エタノールを加えて反応を停止させ、 4°C で2時間静置後10分間 $900 \times g$ で遠心し、上清を減圧下で乾固させた。残渣に0.1 N NaOH を1 ml 加え、 37°C で30分間インキュベートし、蒸留水 10 ml を加えて希釈後1N HCl で中和した。溶液をアンバーライト XAD-8 のカラム (1 $\times$ 4 cm) に通して LTs を吸着させ、これから80%エタノールで溶出させた。溶出液を乾固し、残渣を0.1 ml の逆相-HPLC の移動相 0.1 ml に溶解し、このうち20 μl を逆相-HPLC で展開させた。

合成品の LTC_4 , D_4 , E_4 , および B_4 を用いて以上の操作を行った場合の回収率は、おのおの約51, 41, 43, 55%であった。LTB₄ 画分を分取し、逆相移動相の pH を変えて (酢酸 0.02 v/v, pH 5.6) にアンモニア水で調製) 再注入し、LTB₄ 画分を再分取してジアゾメタンでエステル化し、LTB₄ メチルエステルとして順相-HPLC に導入した。

(5) GSH S-transferase 活性

Habig と Jakoby の方法に従い¹¹⁾、各酵素液 50 μl について、pH 6.5 の緩衝液 [50 mM Hepes, 50 mM 4-メルホリニエタンスルホン酸 (Mes)] 中 30°C で活性の測定を行った。

基質としては 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) (1 mM) を用い、グルタチオン還元型 (GSH) (1 mM) との反応を起こさせ、二波長分光光度計 (日立557型) を

用いて 340 nm での吸光度の時間変化を観測した。

(6) LTC_4 synthetase 活性

LTA_4 メチルエステル 37.5 μg に 100 μl のテトラヒドロフランと 5 μl の 0.1 M 水酸化リチウムを加え、室温で48時間反応させて LTA_4 をケン化し、減圧下で乾固して LTA_4 リチウム塩を得た。これはアルゴン雰囲気下 -80°C で保存し、使用に際し 10 mg/ml のウシ血清アルブミンを含んだ PBS 450 μl を加えて溶解させた^{12,13)}。

500 μl の酵素液と 100 μl の 15 mM GSH を混合して、 37°C で1分間インキュベートしたものに LTA_4 液 50 μl (150 μM) を加えて10分間インキュベートした。反応は、4倍量の冷エタノールを加えることにより停止させた。これを 4°C で2時間静置した後、 $1,500 \times g$ で10分間遠心して上清を取り、それを乾固して 0.1 ml の逆相移動相に溶かし、そのうち 20 μl を HPLC に導入した。HPLC 分取液の平滑筋収縮作用はモルモット回腸片を用い、クレブス-ヘンゼライト液 (NaCl 122, KCl 6, CaCl_2 2.5, MgCl_2 1.2, NaHCO_3 15.5, グルコース 11.5 mM) 5 ml を入れた筋浴槽中 37°C で観測した。筋浴中に逆相移動相を0.5%の割合で添加しても、回腸片の有意な収縮が惹起されないことは確認しておいた。

結 果

マウス、ラット、モルモットの腹腔内にチオグリコレート培地を注入し、炎症を起こさせ、3日後に採取した細胞の90%以上はマクロファージであった。マウスから採取した細胞をカルシウムイオノフォアで刺激すると、図1に示したように、 LTC_4 , D_4 , および B_4 ($\text{C}_4 > \text{B}_4$) の産生が認められた。 LTC_4 ならびに D_4 のピークは、分取して uv スペクトルおよびモルモットの回腸片を用いた SRS-A 活性検査によって同定した。

LTB₄ 画分は、メチルエステル化した後、順相の HPLC で調べたところ、単一のピークを示し、さらに、溶出時間も標準品のそれと一致したことから、同定した。ラットの腹腔マクロファージも同様に、 LTC_4 , B_4 , D_4 を産生したが、この場合 LTC_4 と B_4 の量はほぼ同じであった (図1)。メチルエステル化された B_4 画分は、マウスの場合と同様に単一のピークを示した。

一方、モルモットのマクロファージでは C_4 , D_4 , および E_4 のピークは認められず、弱い B_4 のピークのみが認められた。イオノフォア刺激のかわりに、アラキドン酸を 10 μM 添加しても、同様に B_4 産生は有意に増加したが、 C_4 , D_4 , E_4 の産生は認められなかった。

酵素活性を調べる実験においては、 A_4 が生理的条件下では、半減期30秒と不安定なために LTA_4 メチルエステルをケン化し、その溶液を調製後ただちに用いた。

図2は、 A_4 の逆相-HPLC である (移動相: $\text{CH}_3\text{CN}/$

図 1
reversed-phase HPLC
profiles of LTs generated
from the peritoneal
macrophages from mou-
se (2.5×10^7 cells) and
rat (5×10^7 cells) when
stimulated with A23187
($5 \mu\text{g/ml}$)
The colum used was
Novapak, C_{18} and the
solvent was acetonitrile/
methanol / water / acetic
acid(33. 6/5. 4/61/1 v/v)
adjusted to pH 5.6 with
triethylamine. The flow
rate was 1 ml/min and
uv absorption was moni-
tored at 280 nm.

0.01 M $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$, 40/60 v/v を 1M H_3BO_3 で pH 10 に調製). 4 個の主なピークからなっており, 4 番目のピークを分取して uv スペクトルを測定した結果, 281 nm に吸収極大を持つトリエン化合物であることが推定された. また, これを酸性溶液にして測定すると, 10 nm だけ短波長側への吸収極大の移動がみられたことから A_4 画分であることを確認した.

そこで, この A_4 ケン化液を基質として, 酵素液中の LTC_4 synthetase 活性および DNCB を基質として GSH S-transferase 活性を調べた. マウス細胞からの酵素液は A_4 をよく C_4 に転換した. また, ラットの場合も弱いながら活性を示した. 一方, モルモットからの酵素液は DNCB に対しては強い活性を示したが, 検出可能量の $\text{A}_4 \rightarrow \text{C}_4$ の転換はみられなかった(表 1).

チオグリコレート培地注入後の時間経過に伴う細胞数の変化は図 3 に示した. 注入して 4 時間後の採取で量が増えはじめ, 24 時間後で最大に達して以後減少し, 14 日後には, ほぼ非刺激の場合と同数になった.

採取された細胞の組成は, 非刺激では, マクロファージが大多数であったが, 4, 24 時間後では多形核白血球が主となり, 3 日以降マクロファージ数が回復してきた. 器壁付着細胞は 3 日後のものでは, 90% 以上がマクロファージであったが, 4 および 24 時間後のものでは, 多形核白血球およびリンパ球が 50% 前後混入していた. 採取した細胞を, それぞれイオノフォア刺激すると, 経過時間の違いにより 産生された LTs のサブクラスは大きく異なった.

ラットの場合, 非刺激では C_4 , $\text{D}_4(\text{C}_4 > \text{D}_4)$, B_4 を産生した(図 4 a). 4 および 24 時間後では, B_4 産生はあまり影響されていないが, C_4 および D_4 に相当するピ

表 1 comparison of GSH S-transferase and “ LTC_4 synthetase” activity among mouse, rat, and guinea pig

species	GSH S-transferase (nmol/mg protein/min)	LTC_4 synthetase (pmol LTC_4 /mg protein/min)
mouse	$42.5 \pm 1.9(3)$	$19.7(2)$
rat	$9.93 \pm 0.74(3)$	$1.57(2)$
guinea pig	$52.0 \pm 1.7(3)$	not detected(2)

Values are expressed as mean $\pm$ SEM for GSH S-transferase and the mean of the two aliquots for “ LTC_4 synthetase”. Number in parentheses indicates number of aliquots. Procedures of enzyme preparations, saponification of LTA_4 methyl ester, and assay for GSH S-transferase and “ LTC_4 synthetase” activities are mentioned in materials and methods.

ークは明らかに減少した(図 4 b).

一方, 3 日後になると C_4 および D_4 の産生は非刺激よりも増加し, かつ $\text{C}_4 > \text{D}_4$ であった(図 4 b). 7 日後では産生パターンは非刺激の場合にもどった(図 4 d). 図 5 は, C_4 ならびに D_4 のピーク高を B_4 のピーク高で割った比率を時間に対して, プロットしたものであり, 変化の様子がよくわかる.

マウスのマクロファージホモジュネートを用いて, LTC_4 synthetase の分布を調べた結果, 10 万 $\times$ g 超遠心の沈渣中に大部分の活性があることがわかった. 一方, DNCB と GSH の抱合反応でみた GSH S-transferase 活性は, 主として上清に認められた(未発表データ).

图 2 After saponification of LTA₄ methyl ester by the procedure in the method, 5 μ l was injected into the RP-HPLC.

The column used was Novapak, C₁₈ and the solvent was acetonitrile/0.01 M Na₂B₄O₇ (40/60 v/v) adjusted to pH 10.0 with 1 M N₃BO₃. The numbered peaks were collected and uv spectrum of each peak was monitored. The uv spectrum of the peak 4 corresponds to the known one of intact LTA₄. After treatment of acid the uv maximum shifted to 271 nm from 280 nm.

图 3 a : time course of cell numbers per a rat. Total cell numbers harvested from peritoneal cavities of untreated rats or ones at various times after the injection of thioglycollate medium were divided by numbers of rat used.
b : differentiation of the peritoneal cells at each time after the injection by light microscopy using Giemsa's stain.
c : differentiation of the adherent cells at each time after the injection. After the incubation of peritoneal cells for 2 hours, the adherent cells were recovered. Others are the same as in (b).

図4 reversed-phase HPLC profiles of LTs generated from the peritoneal adherent cells (5×10^7) harvested from the untreated rats (a), at 4 hours (b), 3 days (c), and 14 days (d) after the injection of thioglycollate medium
Others are the same as in Fig. 1.

考 察

3種の動物の腹腔マクロファージがイオノフォア刺激によって産生する LTs のサブクラスの相対量に顕著な種差があることが認められたが、なかでもモルモットにおいてスルフィドペプチド LTs 産生が認められなかったことは、この動物が I 型アレルギーのモデルとしてながく用いられてきた¹⁴⁾ことから考えると、意外な結果であった。その理由は、スルフィドペプチド LTs は、これまでアレルギー反応との関連性が示唆されていたからである。

一方、モルモットにおいても、LTB₄ の産生は認められるので、5-lipoxygenase が存在することは明らかである。したがって、スルフィドペプチド LTs を産生しないということは、A₄→C₄ の転換酵素(LTC₄ synthetase)の欠損または内在性の阻害剤によって阻害されることを想定させる^{15,16)}。

このことは、マクロファージを破碎して調製したそれぞれの酵素液によって、A₄→C₄ 転換を行わせた結果により確認された。すなわち、マウス、ラットからの酵素液は、程度の差はみられるが、LTA₄ を C₄ に転換したが、モルモットからの酵素液では、その転換は認められなかった。

酵素の同定については、A₄→C₄ の過程が A₄ のエポキシド基に GSH が抱合される反応であるため、従来より肝臓その他でよく研究されている GSH S-transferase が、LTC₄ synthetase として働いているものと推定された。しかし、今回の実験で明らかとなったように、DNCB と GSH との抱合でみた GSH S-transferase 活性と A₄→C₄ 転換活性は動物種差および局在部位に顕著な差異があり(表1)、同一の酵素ではないと考えられる。

図5 ratios of peak heights of LTC₄ and LTD₄ to that of LTB₄ at various times after the injection

Values are expressed as mean $\pm$ s.e.m. on several RP-HPLC chromatograms of extracts obtained from equal numbers of aliquots. Numbers of aliquots used were more than 3 at all times.

腹腔刺激から細胞採取までの時間を種々変化させた場合、細胞の種別の増減がラットの場合を例として確認されたが、主としてマクロファージからなる器壁付着細胞を分離して、イオノフォア刺激を行った場合、LTs サブクラスの産生が採取時相により大きく変動したことは、特に興味ぶかい結果であった。このことは、大部分がマクロファージであるとはいえ、少数部分の混入細胞の量

が時相によって変化しているためと疑う余地もあるが、産生の大きな変動を説明するには十分といえず、やはり同一種の細胞であっても、活性化の状態の違いによって、LTs 産生もまたかわってくるものと考えられる。

LTC₄ および LTB₄ が、cyclooxygenase 系における PGG₂ および PGH₂ に相当する、不安定中間代謝物 LTA₄ を介して、おのおの LTC₄ synthetase⁹⁾ ならびに LTA₄ hydrolase⁶⁾ によって形成される経路⁷⁾ を想定すると、以下のことが帰納される。すなわち、LTs 代謝において LTA₄ がきわめて重要な役割を演じており、細胞の種類および活性化の状態によって、LTC₄ synthetase と LTA₄ hydrolase の両者はおのおの独立して活性化される。

また、先に述べたように、LTC₄ synthetase は GSH S-transferase とは異なる酵素であることが示唆されたことから、LTC₄ synthetase のみを特異的に阻害する阻害剤の開発は、肝臓における解毒機構に影響することなく、アレルギー反応だけを特異的に抑制する画期的な薬物の登場に、道を拓く可能性を秘めている。

文 献

- 1) Samuelsson, B., Borgeat, P., Hammarstrom, S., Murphy, R.C.: Prostaglandins 17: 785-787, 1979.
- 2) Samuelsson, B., Hammarstrom, S.: Prostaglandins 19: 645-648, 1980.
- 3) Hedqvist, P., Dahlen, S.E., Gustafsson, L., Hammarstrom, S., Samuelsson, B.: Acta Physiol. Scand. 110: 331-333, 1980.
- 4) Sirois, P., Roy, S., Tetrault, J.P., Borgeat, P., Picard, S., Corey, E.J.: Prostaglandins Med. 7: 327-340, 1981.
- 5) Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E., Hammarstrom, S., Lindgren, J.A., Samuelsson, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3887-3891, 1981.
- 6) Goetzl, E.J., Pickett, W.C.: J. Exp. Med. 153: 482-487, 1981.
- 7) Samuelsson, B.: Science 220: 568-575, 1983.
- 8) Radmark, O., Shimizu, T., Jornvall, H., Samuelsson, B.: J. Biol. Chem. 259: 12339-12345, 1984.
- 9) Bach, M.K., Brashler, J.R., Morton, D.R.: Arch. Biochem. Biophys. 230: 455-465, 1984.
- 10) Abe, M., Kawazoe, Y., Shigematsu, N.: Anal. Biochem. 144: 417-422, 1985.
- 11) Habig, W.H., Habst, M.J., Jakoby, W.B.: J. Biol. Chem. 249: 7130-7139, 1974.
- 12) Fitzpatrick, F.A., Morton, D.R., Wynalda, M. A.: J. Biol. Chem. 257: 4680-4683, 1982.
- 13) Maycock, A.L., Anderson, M.S., DeSousa, D. M., Kuehl, F.A.: J. Biol. Chem. 257: 13911-13914, 1982.
- 14) Brockelhurst, W.E.: J. Physiol. 151: 416-435, 1960.
- 15) Abe, M., Kawazoe, Y., Tsunematsu, H., Shigematsu, N.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 127: 15-23, 1985.
- 16) Abe, M., Kawazoe, Y., Shigematsu, N.: Jap. J. Inflammation 4: 459-460, 1984.