

コラーゲンにより惹起されるコイ栓球凝集反応のDibutyryl Cyclic AMPによる抑制

松下映夫*¹・田中竜介*¹・近藤昌和*²・高橋幸則*²・
宮本美津子*³・車谷 元*³

Dibutyryl Cyclic AMP Inhibits Carp Thrombocyte Aggregation

Teruo Matsushita*¹, Ryusuke Tanaka*¹, Masakazu Kondo*²,
Yukinori Takahashi*², Mitsuko Miyamoto*³ and Hajimu Kurumatani*³

Carp (*Cyprinus carpio*) thrombocyte aggregation was examined by the whole blood method using an impedance aggregometer. Thrombocyte aggregation, induced in the carp by collagen, was inhibited by N⁶,O²-dibutyryl adenosine 3':5'-cyclic monophosphoric acid (dibutyryl cAMP), a cell membrane permeable cyclic AMP analogue. This suggests cyclic AMP to be an important inhibitory mediator of fish thrombocyte functions, such as aggregation, as is the case for mammalian platelets.

1 緒 言

魚類においては哺乳類の血小板に相当するのは栓球であり、生理的には止血に関与することが知られているが^{1,2)}、魚類の栓球凝集の分子メカニズムについては哺乳類の場合と比較するとあまり研究があまり進んでいない。CyclicAMP (cAMP) は細胞内シグナル伝達分子の一つで、合成酵素であるアデニレートシクラーゼの活性化や代謝酵素のホスホジエステラーゼの阻害により細胞内レベルが上昇し、種々の細胞機能の調節に関わっている³⁾。哺乳類の血小板ではcAMPはタンパク質リン酸化を促進し最終的に細胞内の遊離カルシウムイオン動態に影響を与え、血小板が活性化されて起こる凝集反応に対し、抑制性に関与することが知られている³⁾。N⁶,O²-dibutyryl cyclicAMP (db-cAMP) は細胞膜を透過できるcAMPの誘導体で、細胞外に加えることにより細胞内cAMPを上昇させたと同じ効果を引き起こすことができ、哺乳類の血小板において凝

集反応を抑制することが報告されている⁴⁻⁶⁾。

われわれは前報⁷⁾で、魚類であるコイの栓球と哺乳類であるラットの血小板の凝集惹起剤に対する反応性を検討し、コラーゲン処理により両者共通して凝集反応が惹起されるが、アラキドン酸およびアデノシン5'-二リン酸 (ADP) に対してはコイ栓球では凝集反応が非常に起こりにくいか、あるいは全く起こらず、反応性の違いが存在することを報告した。本研究においては、魚類の栓球凝集の分子メカニズムの一端を明らかにするために、哺乳類の血小板と共通にコラーゲンに対する凝集反応性を示すコイの栓球において、哺乳類の血小板の場合と同様にdb-cAMPの前処理によりコラーゲン惹起凝集反応が抑制されるか否かについて検討した。また、哺乳類の血小板でのdb-cAMPによる凝集抑制作用は既に報告⁴⁻⁶⁾されているが、自家実験でこれを確認する目的で、ラットを用いコラーゲン凝集に対する作用を併せて検討した。

2004年1月14日受付. Received January 14, 2004.

- * 1 水産大学校食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).
- * 2 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).
- * 3 東レ(株)医薬研究所 (Pharmaceutical Research Laboratories, Toray Industries Inc., 1111 Tebira, Kamakura, Kanagawa 248-8555, Japan).

2 材料および方法

2.1 実験動物

コイは水産大学校小野臨湖実験実習場（山口県宇部市）より搬入し、水温25℃で飼育されたもの（体重500-1000g）を実験に供した。ラットはWistarラット（オス、10-14週齢）をセアック吉富㈱（福岡県築上郡）より購入し、室温23-26℃で飼育したもの（体重400-600g）を実験に供した。

2.2 試薬

コラーゲン（馬の腱由来、タイプI）はモリヤ産業㈱（東京都杉並区）より、db-cAMPおよびキナルジンは和光純薬㈱（大阪府中央区）より、クエン酸ナトリウムはSIGMA-ALDRICH（St. Louis, USA）より購入し実験に用いた。

2.3 採血

コイをキナルジン20ppmによって麻酔し尾柄部血管より注射器（10mlの注射筒、19ゲージ注射針）を用いて約9mlを採血した。なお、注射筒内には3.8%クエン酸ナトリウム含有生理食塩水（1ml）をあらかじめ加えておき、血液の凝固を防止した。

ラットをエーテル麻酔下で頸動脈にポリエチレンチューブ（内径15mm）のカニューレを挿入し約10-15mlの血液を試験管内に採取した。試験管内に1/9容の3.8%クエン酸ナトリウム含有生理食塩水を加えて血液の凝固を防止した。

採取したコイおよびラットの血液は室温に置き、凝集能の測定は採血後3時間以内に行った。採血した血液に抗凝固剤を添加しても、採血後は血小板および栓球が自然凝集を起こし消費されていくため、時間が経過すると凝集惹起剤による凝集反応が検出しにくくなるが、3時間内であれば比較的再現性のある凝集反応が得られるためである。

2.4 凝集能の測定

コイの栓球およびラット血小板凝集の測定はChrono-log社（Haverton, PA, USA）の全血凝集計（Whole blood aggregometer ; 560-VS型）を用いインピーダンス法（Electrical impedance measurement）^{8,9)}によって行った。なお、測定温度はコイおよびラットの場合にそれぞれ25および37℃で行った。

血液1000 μ lを入れたキュベットを凝集計に装着し、レコーダーの基線が安定した後に、300mMのCaCl₂を10 μ l添

加し、約4-6分後db-cAMPまたは対照用溶媒（蒸留水）を10 μ l添加し約4-6分間プレインキュベートした。その後、凝集刺激剤であるコラーゲン（10 μ l）を加えて凝集を惹起し、凝集の程度（インピーダンス（単位： Ω ）の変化）を経時的に記録し凝集曲線を得た。凝集能の値として、凝集曲線の最大凝集が得られた時点の値（最大インピーダンス）を採用した。なお、凝集惹起剤のコラーゲンはSKF緩衝液に溶解して反応系に添加した。

2.5 統計処理

比較する群間の等分散を確認し、t-検定を実施した。

3 結果

コイの栓球凝集とラットの血小板凝集は全血へのコラーゲンの添加により惹起され、いずれの場合にも1 μ g/mlの濃度以上で凝集反応が認められることを前報⁷⁾で報告した。今回の実験では、この実験条件を用いてdb-cAMP前処置の効果を検討した。

コイの栓球において、コラーゲン（1 μ g/ml）で惹起された凝集反応は10mMのdb-cAMPの前処置により抑制された。Fig. 1はその典型的な凝集曲線の例である。上段が対照として溶媒を前処置した場合であり、下段がdb-cAMPを前処置した場合である。db-cAMPの前処置によりコラーゲン添加後の凝集が減弱している。Fig. 2にコラーゲンで惹起されるコイの栓球凝集に対するdb-cAMP

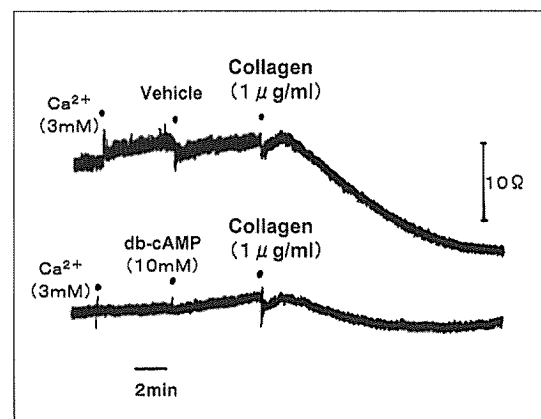


Fig. 1. Typical carp thrombocyte aggregation curves, obtained with collagen (1 μ g/ml) induction, and the effects of dibutyl cyclic AMP (db-cAMP) treatment on collagen-induced thrombocyte aggregation. Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl₂ (added) at 25 $^{\circ}$ C for 4-6 min in the presence of vehicle (distilled water) or db-cAMP (10mM) and collagen (1 μ g/ml) was then added at the time indicated.

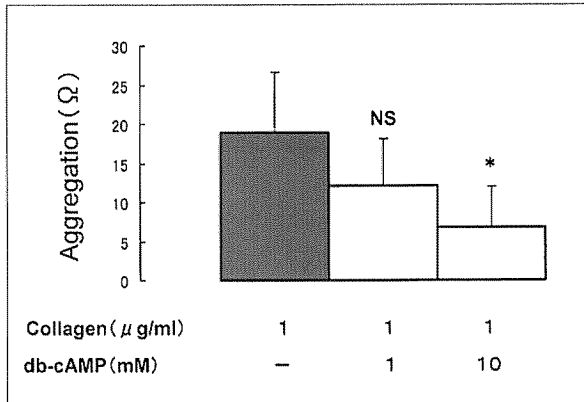


Fig. 2. Effect of dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) treatment (1~10mM) on carp thrombocyte aggregation induced by collagen (1 μg/ml). Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl₂ (added) at 25°C for 4-6 min in the presence of vehicle (distilled water) or db-cAMP (1, 10mM) and collagen (1 μg/ml) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of collagen. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 2-5 determinations, respectively. *P<0.05 vs vehicle control. NS means not significant vs vehicle control.

の前処置の効果について、db-cAMP量（濃度）と凝集の強さの関係を示した。db-cAMPの凝集抑制作用は1mMでは有意な抑制を示さないが、10mMのdb-cAMPにより有意な抑制を示し、用量（濃度）依存性の抑制効果が認められた。

ラットの血小板凝集においてもコイの場合と同様の結果が得られた。Fig. 3に凝集曲線の例（上段が対照として溶媒を前処置した場合、下段がdb-cAMPを前処置した場合）を示した。Fig. 4にはコラーゲンで惹起されるラットの血小板凝集に対するdb-cAMPの前処置の効果について、db-cAMP量（濃度）と凝集の強さの関係を示した。本実験で得られたラットにおけるdb-cAMPの血小板凝集抑制作用は、凝集測定法などの実験条件は多少異なるが、既に報告されている結果⁴⁻⁶⁾とほぼ一致するものであった。

4 考察

魚類の栓球凝集の分子メカニズムの一端を明らかにするために、コイの栓球が、哺乳類の血小板の場合と同様にdb-cAMPの前処理によりコラーゲン惹起凝集反応が抑制されるか否かについて「全血凝集インピーダンス法」^{8,9)}を用いて検討した。

哺乳類で繁用される「Bornの比濁法」^{9,10)}は試料として

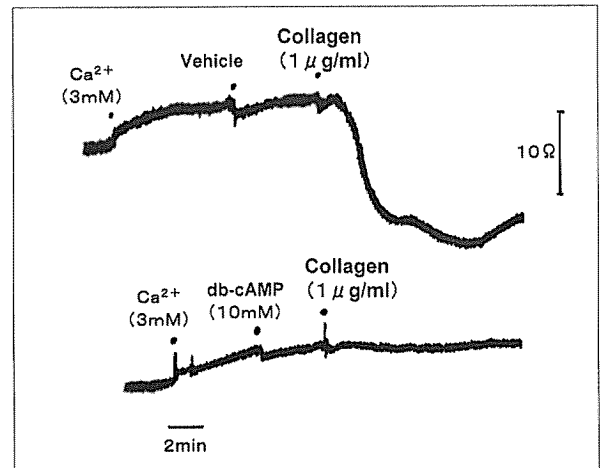


Fig. 3. Typical rat platelet aggregation curves, obtained with collagen (1 μg/ml) induction, and the effects of dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) treatment on collagen-induced platelet aggregation. Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl₂ (added) at 37°C for 4-6 min in the presence of vehicle (distilled water) or db-cAMP (10mM) and collagen (1 μg/ml) was then added at the time indicated.

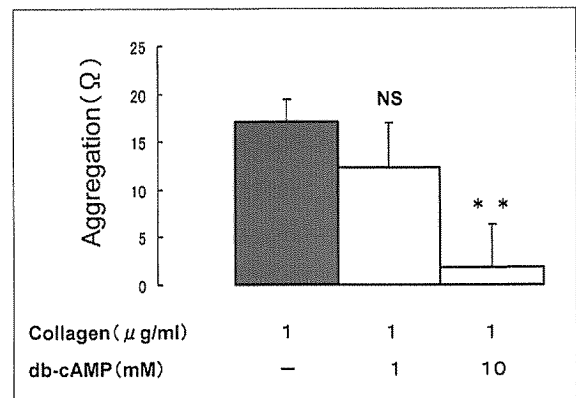


Fig. 4. Effect of dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) treatment (1~10mM) on rat platelet aggregation induced by collagen (1 μg/ml). Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl₂ (added) at 37°C for 4-6 min in the presence of vehicle (distilled water) or db-cAMP (1, 10mM) and collagen (1 μg/ml) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum impedance change induced by the addition of collagen. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 3-6 determinations, respectively. **P<0.01 vs vehicle control. NS means not significant vs vehicle control.

多血小板血漿（PRP）を用いる必要がある。哺乳類の血小板と異なり血液中に存在する種々の細胞間の大きさの差が小さく、低回転速度の遠心分離のみで簡単に赤血球や白血球等から分離することはできず、PRPに相当する多栓球血漿を調製することは非常に困難である魚類の栓球の凝集反応の検討には、「Bornの比濁法」は適しておらず、試

料として全血を用いる「全血凝集インピーダンス法」は適した測定法である。

本研究では、魚類のコイにおいてコラーゲンにより惹起される栓球凝集が、ラットなど哺乳類の場合と同様に db-cAMPにより抑制されることを見いだした。db-cAMPは細胞膜を透過できるcAMPの誘導体であり、細胞内cAMPを上昇させたと同じ効果を引き起こすことができる³⁾ので、細胞内cAMPが栓球の凝集メカニズムに抑制的に関与していることが強く示唆された。哺乳類の血小板の場合と同じように、コイの栓球細胞内でcAMPがタンパク質リン酸化を促進し、細胞内の遊離カルシウムイオン動態に影響を与え、コラーゲンなどの刺激剤で活性化されておこる凝集反応を抑制するメカニズム⁴⁻⁶⁾が存在する可能性が考えられる。

魚類の血球細胞におけるcAMPの役割について論じた報告は非常に少ない。赤血球において、アドレナリン作動性のβ受容体のアゴニストであるノルアドレナリンやインソプロテレノールの刺激、あるいは直接アデニル酸シクラーゼを活性化させるフォルスコリンの添加により、赤血球内のcAMPが上昇し、細胞膜のナトリウムイオンや水素イオンの膜トランスポートを変化させ、赤血球の膨潤化や酸素/二酸化炭素のヘモグロビンへの結合の調節等に関係すると報告されている¹¹⁻¹³⁾。魚類の栓球機能におけるcAMPの役割について論じた報告は全く無いことから、本研究は魚類の栓球におけるcAMPに関する初めての報告である。今後、栓球内のcAMPレベルの変化とその他の機能への影響について検討していく必要があると思われる。

文 献

- 1) 魚類生理学の基礎 (会田勝美編), 恒星社厚生閣, 東京都, pp. 233-249 (2002).
- 2) E. E. Stokes and B. G. Firkin: Studies of the peripheral blood of the Port Jackson shark (*Heterodontus portus-jacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. *Br. J. Haematol.*, 20, 427-435 (1971).
- 3) J. L. Daniel, B. Ashby and F. M. Pulcinelli: Platelet signaling: cAMP and cGMP. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gesele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermynen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.290-303 (2002).
- 4) M. Minkes, N. Stanford, M. M. Chi, G. J. Roth, A. Raz, P. Needleman and P. W. Majerus: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate inhibits the availability of arachidonate to prostaglandin synthetase in human platelet suspensions. *J. Clin. Invest.*, 59, 449-454 (1977).
- 5) T. Y. Wang, C. V. Hussey and J. C. Grancis: Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate and prostaglandin E 1 on platelet aggregation and shape changes. *Am. J. Clin. Pathol.*, 67, 362-367 (1977).
- 6) M. B. Feinstein and C. Fraser: Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. Inhibition by PGE 1 and dibutyryl cyclic AMP. *J. Gen. Physiol.*, 66, 561-581 (1975).
- 7) 松下映夫・田中竜介・近藤昌和・高橋幸則・宮本美津子・車谷 元: コイの栓球とラット血小板の凝集反応の比較とプロスタグランジン系物質の関与について. *水産大学校研究報告*, 52 (4), 153-159 (2004).
- 8) D. C. Cardinal and R. J. Flower: The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J. Pharmacol. Methods*, 3, 135-158 (1980).
- 9) P. Thiagarajan and K. K. Wu: In vitro assay for evaluating platelet function. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gesele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermynen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.459-470 (2002).
- 10) G. V. R. Born: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194, 927-929 (1984).
- 11) Y. Mahe, F. Garcia-Romeu and R. Motais: Inhibition of by amiloride of both adenylate cyclase activity and the Na⁺/H⁺ antiporter in fish erythrocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 116, 199-206 (1985).
- 12) S. F. Perry and S. D. Reid: The relationship between beta-adrenoceptors and adrenergic responsiveness in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and eel (*Anguilla rostrata*) erythrocytes. *J. Exp. Biol.*, 167, 235-250 (1992).
- 13) S. Thomas and S. F. Perry: Control and consequences of adrenergic activation of red blood cell Na⁺/H⁺ exchange on blood oxygen and carbon dioxide transport in fish. *J. Exp. Zool.*, 263, 160-175 (1992).