

# ヒト好塩基球 — 肥満細胞系から放出される proteoglycan の抗凝固活性に関する研究

## 第 2 編

### ヒト好塩基球の抗凝固活性について

岡山大学医学部第2内科教室（主任：木村郁郎教授）

津 田 隆 史

（昭和62年1月20日受稿）

**Key words :** human basophil  
proteoglycan  
anticoagulant activity

#### 緒 言

好塩基球と肥満細胞はともに細胞内に meta-chromasia を呈する好塩基性の顆粒を有することを特徴とする。またその細胞表面には IgE 抗体を結合し、生体内に侵入してきたアレルゲンと反応して、histamine 等種々の mediator を放出することなど形態学的にも機能的にも極めてよく似ている。そのために以前よりその異同が問題にされてきた。ヒト好塩基球はその起源が骨髓細胞であることはよく知られており、好中球、好酸球、単球と共通の前骨髓球に由来する<sup>1)</sup>。また、肥満細胞も前駆細胞が骨髓細胞由来で、同一の precursor から結合組織肥満細胞と粘膜肥満細胞とに分化することがマウスの実験で証明されている<sup>2-6)</sup>。ヒトの場合も同様に骨髓から血液を経由して分化するものと推定されている。しかしながら電顕による形態学的検討において、この二つの細胞の間には明らかな相違が示されている<sup>7)</sup>。さらに mediator の産生及び放出の点でも基本的な違いがみられている<sup>8)</sup>。一方、好塩基球及び肥満細胞の細胞内顆粒に存在する proteoglycan は、protease などの蛋白とイオン結合して存在し、刺激をうけると他の mediator と共に細胞外に放出される点で近似したものであるが、その役割や差異については

不明な点が多い。

著者は本論文第1編でヒト肺より単離した肥満細胞を用いて、Anti-IgE あるいは Ca-ionophore A23187 で刺激された時放出される proteoglycan に抗凝固活性が存在し、その活性は肥満細胞中に含まれる heparin proteoglycan であることを示した。これにより即時型アレルギー反応での局所炎症の遷延化を阻止していることが推測された。結合組織あるいは粘膜に固着して存在する肥満細胞に対して、流血中を移動する好塩基球中に存在する proteoglycan にも同様の性質が存在するか否かは興味のあるところである。そこで著者は、ヒト末梢血より分離した好塩基球に IgE 依存性の特異的刺激として受身感作後 Anti-IgE で刺激した場合と、非特異的刺激として Ca-ionophore A23187 で刺激した場合に放出される proteoglycan の抗凝固活性について検討した。また刺激された好塩基球から放出される proteoglycan の組成についても検討を加えた。

#### 材 料 と 方 法

##### 1. 材料

ヒト好塩基球は、後述の方法により正常人及び慢性骨髓性白血病患者の末梢血より分離して実験に供した。検討に用いた試薬は下記の如くで

ある。

MaCoy's 5A medium, Hank's balanced salt solution (HBSS) (Grand Island Biological Co., Grand Island, NY) penicillin G potassium, streptomycin sulfate (明治製薬) sodium [<sup>35</sup>S] sulfate (Amersham International plc, Buckinghamshire, England) rabbit anti-human IgE serum (Anti-IgE) (Behringwerke AG, Marburg, West Germany) calcium ionophore A23187 (Ca-ionophore A23187), 6-aminohexanoic acid, benzamidine hydrochloride, bovine serum albumin (BSA), chondroitin sulfate type A (whale cartilage), chondroitin sulfate type B (porcine skin), chondroitin sulfate type C (shark cartilage), porcine intestinal heparin, Hypaque-Ficoll SG 1.077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) Sephadex G-25, blue dextran (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) Dowex AG 1-X2 (100-200 mesh), Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) carbazole (石津製薬) heparinase, chondroitin ABC lyase, chondroitin AC lyase, chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfatase (生化学工業) cetylpyridinium chloride (東京化成工業) antitrombin III (AT III), H-D-phenylalanyl-L-pipecolyl-L-arginyl-p-nitroanilide (S-2238), thrombin (AB Kabi, Stockholm, Sweden) Azure-A, octylamine, phenol (半井化学薬品)

#### 1) 好塩基球の分離と proteoglycan の標識

Metcalf らの方法<sup>9)</sup> に準じて行った。すなわち、正常人より血液200ml を ACD-A 液で採血し、IEC (International Electric Co., U.S.A.) 社製 DPR 6000 遠沈機で3,500g, 5分間遠沈して白血球濃厚分画を約20ml分離した。また好塩基球増多を伴う慢性骨髄性白血病 (CML) 患者より静脈血20ml を1/7容の3.8%クエン酸ナトリウムで採血し、90分間室温に静置後、白血球層を分離した。それぞれの多白血球分画を400g, 22°C, 5分間遠沈して上清の血小板を除去した。それらを Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> を含まない Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) に再浮遊させ、10ml の

Hypaque-Ficoll に重層し、600g, 22°C, 40分間遠沈した。好塩基球を含む単核球層を回収し、HBSS にて2回洗浄後、MaCoy's 5A Medium (5u/ml の penicillin G と 100μg/ml の streptomycin を含む) に浮遊させた。得られた好塩基球は、木村らの好塩基球-好酸球同時直接算定液<sup>10)</sup> で染色後、Fuchs-Rosenthal 計算盤にて総好塩基球数を算定した。

好塩基球 $10^{6-7}$ 個細胞あたり0.5-1mCi/50ml の [<sup>35</sup>S] sulfate を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター (95% air, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) で18時間培養した。培養後、free の [<sup>35</sup>S] sulfate を除く目的で細胞を HBSS で6回洗浄後回収し、後の実験に使用した。なおCML 患者より得た好塩基球は [<sup>35</sup>S] sulfate の標識と、anti-thrombin 活性の測定に用いた。また正常人より得た好塩基球は anti-thrombin 活性、metachromatic substance, histamine の測定に用いた。

#### 2) 放出反応実験

本論文第1編に記した方法と同様に行なった。すなわち [<sup>35</sup>S] 標識好塩基球及び非標識好塩基球約 $7.5 \times 10^6$ 個を2ml の Tyrode 緩衝液に再浮遊させ、アレルギー患者から採取した高IgE血清を終濃度1,000U/ml となるように添加して受身感作をおこなった。受身感作後、終濃度1/25 の Anti-IgE を加え、37°C, 30分間加温して放出を惹起した。また終濃度1μg/ml の Ca-ionophore A23187 を添加し、37°C, 20分間加温して放出を惹起した。それぞれを、上清と細胞成分沈渣とに分離し、非標識好塩基球より得た細胞成分沈渣は1ml の Tyrode 緩衝液に再浮遊させ、凍結融解を6回繰り返した後、500g, 5分間遠沈して細胞成分沈渣抽出液を得た。

#### 3) 分析方法

##### i) 抗凝固活性, metachromatic substance, および histamine の測定

本論文第1編に記した方法と同様に行なった。すなわち、抗凝固活性は、Lasser らの方法<sup>11)</sup> に準じて発色合成基質 S-2238 を用いて anti-thrombin heparin 様活性 (anti-thrombin 活性と略す) として測定した。metachromatic substance の測定は、Jaques らの方法<sup>12)</sup> と Parekh らの方法<sup>13)</sup> を改変して Azure-A を用

いておこなった。histamine の測定は、Shore の方法<sup>14)</sup> に準じて行ない Technicon 社の自動分析装置にて測定した<sup>15)</sup>。

#### ii) ウロン酸の定量<sup>16)</sup>

75  $\mu$ l の検体と 450  $\mu$ l の濃硫酸を混和し、20 分間沸騰水中で加熱後、流水で冷却した。次いで 20  $\mu$ l の 0.1% カルパゾールを添加して 2 時間静置後、535nm で吸光度を測定した。

#### iii) 蛋白の定量

Bradford の色素結合法<sup>17)</sup> を利用する Bio-Rad 蛋白測定法を用いて測定した。

#### 4) [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan の抽出

放出反応実験にて、[<sup>35</sup>S] 標識好塩基球を Anti-IgE で刺激して得られた上清に、2ml の 1M NaCl (0.05M Na acetate, 0.01M EDTA, 0.1M 6-aminohexanoic acid, 0.005M benzamidine HCl を含む) (1M NaCl 液) を加えた。また細胞成分沈渣は、同液 2ml に再浮遊させた後、凍結融解を 6 回繰り返し、500g, 5 分間遠沈し、上清に細胞成分沈渣抽出液を得た。さらに、それぞれの上清を 10,000g, 40 分間遠沈して、その上清に [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan を抽出した。取込まれていない [<sup>35</sup>S] sulfate を除くために、溶出用緩衝液 (1M NaCl 液) にて平衡された Sephadex G-25 (column size 0.9 $\times$ 15 cm, flow rate 1.5ml/hr) にてゲル濾過をおこない、[<sup>35</sup>S] 標識検体を分画回収した。

また、この [<sup>35</sup>S] 標識分画をさらに精製するために、1M NaCl を含む 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) にて平衡された Dowex AG 1-X2 (column size 1.0 $\times$ 10 cm) にてイオン交換クロマトグラフィーをおこなった。[<sup>35</sup>S] 標識検体は、3M NaCl を含む 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) で溶出され、これを分画回収した。

それぞれの [<sup>35</sup>S] 標識検体を -50 $^{\circ}$ C にて保存し、以下の実験に使用した。

#### 5) glycosaminoglycan (GAG) 分解酵素の影響

Sephadex G-25 にてゲル濾過され、分画回収された [<sup>35</sup>S] 標識検体を、0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) にて 24 時間透析した。300  $\mu$ l の [<sup>35</sup>S] 標識検体と、200  $\mu$ l の 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (0.1M NaCl, 0.1% bovine serum albumin を

含む, pH 7.0) を 300  $\mu$ l の GAG 分解酵素 (heparinase 6U/ml, chondroitin ABC lyase 0.6U/ml, chondroitin AC lyase 0.6U/ml, chondroitin-4-sulfatase 0.6U/ml, chondroitin-6-sulfatase 0.6U/ml) と 37 $^{\circ}$ C, 6 時間加温した。尚、対照として 300  $\mu$ l の 0.05M Tris-HCl 緩衝液を加えた。

#### 6) 抽出時および GAG 分解酵素処理後の [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan の測定

Shimada らの方法<sup>18)</sup> に準じて行なった。すなわち、0.1ml の [<sup>35</sup>S] 標識検体と、0.5ml の 1% cetylpyridinium chloride (CPC) とを混和し、37 $^{\circ}$ C, 1 時間加温後、2,000g, 30 分間遠沈して沈渣を得た。この CPC-GAG 複合体を 0.1ml の 4M NaCl に溶解し、1.4ml の 80% エタノールを加えて精製 GAG を得た。これを再度 0.4ml の水に溶解し、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

## 結 果

### 1. 好塩基球の分離

得られた好塩基球の絶対数は正常人で  $(8.9 \pm 4.6) \times 10^6$  個、purity は  $6.2 \pm 1.7\%$  (mean  $\pm$  se, n=11), CML 患者で絶対数  $(1.4 \pm 0.3) \times 10^7$  個、purity は  $52.1 \pm 6.9\%$  (mean  $\pm$  se, n=3) であった。

### 2. Anti-IgE および Ca-ionophore A23187 刺激に対する好塩基球からの放出反応 (表 1)

Anti-IgE および Ca-ionophore A23187 刺激により誘導される好塩基球の脱顆粒反応に際して放出される histamine や metachromasia を呈する物質と一緒に、抗凝固活性を有する物質が放出されるか否かについて検討した。いずれの活性も、Anti-IgE および Ca-ionophore A-23187 刺激後の上清中の活性と細胞成分沈渣抽出液中の活性より遊離率 (%) として示した。Anti-IgE の刺激により好塩基球からは上清中に metachromatic substance は  $37.8 \pm 5.2\%$ , histamine は  $7.8 \pm 0.8\%$  が検出されたが、発色合成基質 S-2238 で測定した anti-thrombin 活性は検出されなかった。また Ca-ionophore A23187 の刺激に対しても好塩基球からは anti-thrombin 活性は検出されなかった。CML 患者より分離した

表1 Anti-IgE および Ca-ionophore A23187 で刺激した時のヒト好塩基球より放出された anti-thrombin 活性, metachromatic substance, histamine の遊離率 (%)

| Stimulus          | Percent release                 |                         |           |
|-------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------|
|                   | Anti-thrombin activity (S 2238) | Metachromatic substance | Histamine |
| Anti-IgE (1 : 25) | Not detected                    | 37.8 ± 5.2              | 7.8 ± 0.8 |
| A 23187 (1 μg/ml) | Not detected                    | —                       | —         |

$$\text{percent release} = \frac{\text{supernatant content}}{\text{supernatant} + \text{sediment content}} \times 100$$

$\bar{x} \pm se$ : mean ± standard error

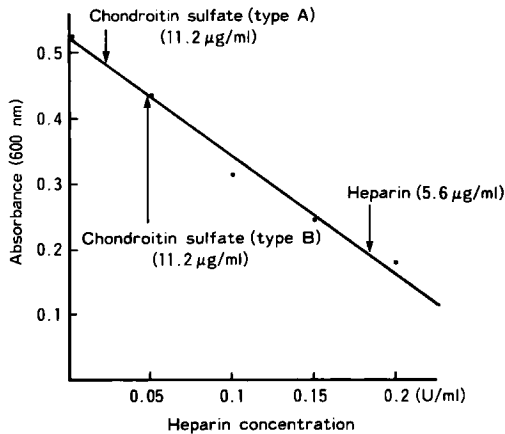


図1 市販の heparin, chondroitin sulfate type A 及び type B の Azure-A による metachromasia の比較

好塩基球にも同様に anti-thrombin 活性は認められなかった。

### 3. porcine intestinal heparin, chondroitin sulfate type A, chondroitin sulfate type B の Azure-A による metachromasia の検討 (図1)

市販の porcine intestinal heparin 及び chondroitin sulfate type A, type B の metachromasia を測定した。Azure-A を用いた metachromasia の標準曲線は, porcine intestinal heparin を 0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.15 U/ml, 0.2 U/ml に希釈して作製した。図1に示すように, chondroitin sulfate type A の 11.2 μg/ml は 0.022 U/ml, chondroitin sulfate type B の

11.2 μg/ml は 0.048 U/ml, porcine intestinal heparin の 5.6 μg/ml は 0.184 U/ml の heparin 濃度に相当する metachromasia を呈した。

### 4. Anti-IgE 刺激に対する好塩基球からの [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan の放出反応 (図2)

標識された好塩基球を細胞数より3群 (1 × 10<sup>7</sup>個, 2 × 10<sup>7</sup>個, 3 × 10<sup>7</sup>個) に分けて, 受身感作後, 終濃度 1/25 量の Anti-IgE を添加し, 放出された [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan ([<sup>35</sup>S] glycosaminoglycan: <sup>35</sup>S-GAG と略す) を測定した (図2, A)。

遊離率 (%) には変化がみられなかったが, 細胞数の増加に比例して <sup>35</sup>S-GAG 量の放出は増加した。また, 細胞数を一定 (1 × 10<sup>7</sup>個) にして, 添加する Anti-IgE の量を変えると, 添加量の増加にともない遊離率は一定 (約50%) ながらも <sup>35</sup>S-GAG 量の放出は増加した (図2, B)。

### 5. [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan の抽出 (図3, 図4)

約 7.5 × 10<sup>6</sup> 個の [<sup>35</sup>S] 標識好塩基球を Anti-IgE で刺激し, 得られた上清に 1 M NaCl 液を加え, また細胞成分沈渣には 1 M NaCl 液を加えて凍結融解した後, これらを超遠沈して, その上清に [<sup>35</sup>S] proteoglycan を抽出した。取込まれていない [<sup>35</sup>S] sulfate から分離するために Sephadex G-25 にてゲル濾過を行なった (図3 A, B)。図3, A には上清中に放出された, また図3, B には細胞成分沈渣中に残った [<sup>35</sup>S] 標識検体の溶出パターンを示す。ともに blue dextran のピークに一致する高いピークが得られ, この

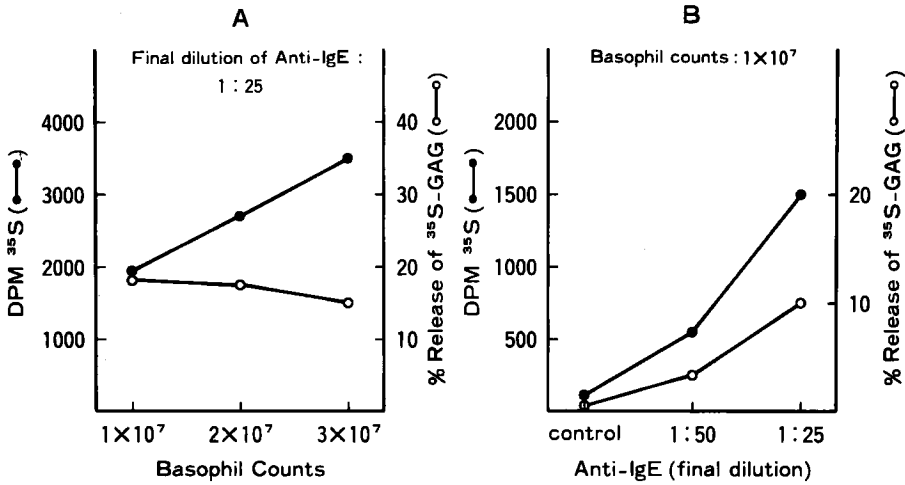


図2 Anti-IgE刺激した時のヒト好塩基球より放出された [<sup>35</sup>S] 標識検体中の proteoglycan の遊離率 (%)

A: 1 × 10<sup>7</sup>, 2 × 10<sup>7</sup>, 3 × 10<sup>7</sup> 個の好塩基球に終濃度 1/25 量の Anti-IgE を添加した時

B: 1 × 10<sup>7</sup> 個の好塩基球に終濃度 0, 1/50, 1/25 量の Anti-IgE を添加した時

●—●: Anti-IgE 刺激によりヒト好塩基球より放出された <sup>35</sup>S-GAG 量 (DPM)

○—○: Anti-IgE 刺激によりヒト好塩基球より放出された <sup>35</sup>S-GAG の遊離率

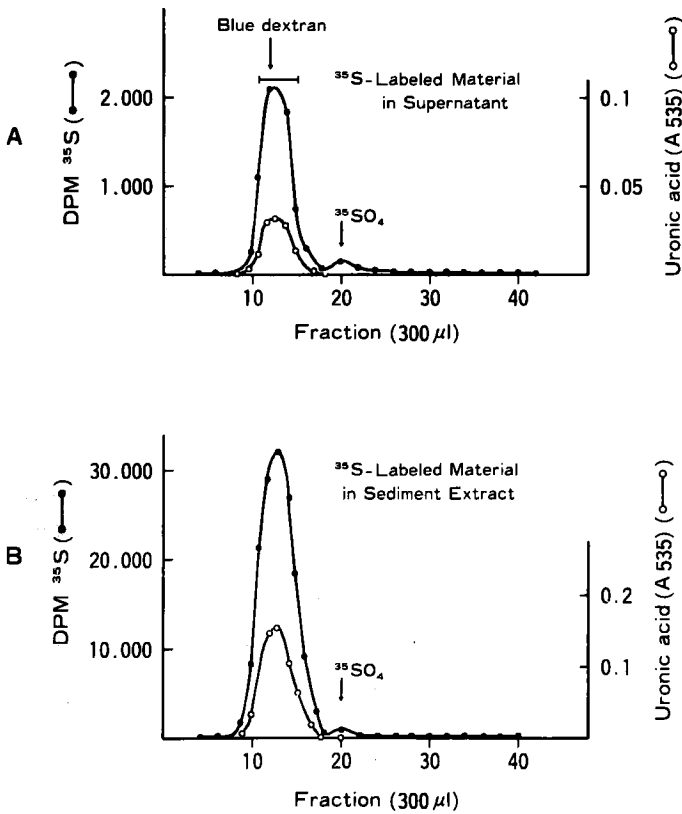


図3 Anti-IgE で刺激された [<sup>35</sup>S] 標識好塩基球より上清中に放出された、および細胞成分沈渣中に残存する [<sup>35</sup>S] 標識検体の Sephadex G-25 による溶出パターン

A: 上清中に放出された [<sup>35</sup>S] 標識検体

B: 細胞成分沈渣中に残存する [<sup>35</sup>S] 標識検体

Column: 0.9 × 15 cm

Elution buffer: 1 M NaCl containing 0.05 M Na acetate, 0.01 M EDTA, 0.1 M 6-amino-hexanoic acid and 0.005 M benzamidine HCl

Flow rate: 1.5 ml/hr

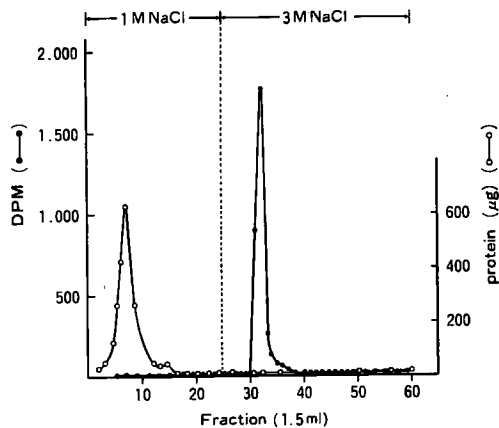


図4 Sephadex G-25 により溶出された [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan (Fraction 10-16) の Dowex AG1-X2 によるイオン交換クロマトグラフィー Column:  $1.0 \times 10\text{ cm}$   
 Equilibration buffer: 0.01M Tris-HCl buffer containing 1M NaCl (pH 9.0)  
 Elution buffer: 0.01M Tris-HCl buffer containing 3M NaCl (pH 9.0)  
 Flow rate: 1.5ml/hr

ピークは分画液中のウロン酸含量のピークとも一致するため標識された proteoglycan と考えられた。その後方に free の [ $^{35}\text{S}$ ] sulfate のピークがみられた。各々 No.10-16までの分画をプールして保存し、以後の実験に使用した。

Sephadex G-25 でゲル濾過された [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan をさらに精製するために、上記保存検体内、上清中に放出された [ $^{35}\text{S}$ ] 標識検体を Dowex AG 1-X2 によるイオン交換クロマトグラフィーを行なった (図4)。混入蛋白は 1M NaCl で溶出、洗浄され、 [ $^{35}\text{S}$ ] 標識検体は 3 M NaCl で溶出されるので proteoglycan であることが確認された。

#### 6. [ $^{35}\text{S}$ ] 標識好塩基球 proteoglycan の GAG 分解酵素に対する影響 (図5)

Anti-IgE で刺激された好塩基球より放出された [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan を同定する目的で、各種 GAG 分解酵素に対する反応性を検討した。すなわち、Sephadex G-25 でゲル濾過された上清及び細胞成分沈渣中の [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan (No.10-16分画) を 24 時間透析後、heparinase, chondroitin ABC lyase, chondroitin

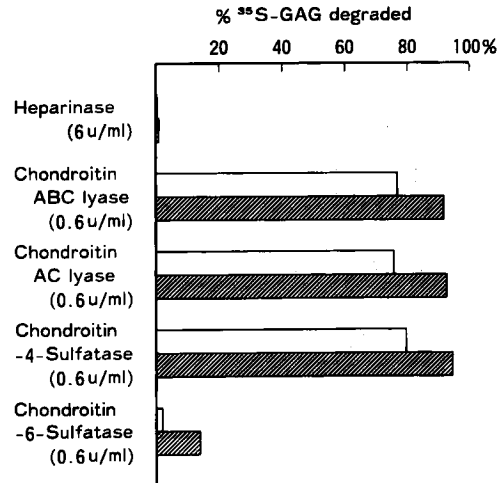


図5 Sephadex G-25 で溶出された [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan に対する GAG 分解酵素の影響

□: Anti-IgE 刺激後、受身感作好塩基球より上清中に放出された [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan

▨: Anti-IgE 刺激後、受身感作好塩基球の細胞成分沈渣中に残存した [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan

GAG 分解酵素により変性分解した [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan は、約 2,000 DPM の [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan と各 GAG 分解酵素と反応させた後に残存する  $^{35}\text{S}$ -GAG を cetylpyridinium chloride と結合させ、測定後逆算して求めた。

AC lyase, chondroitin-4-sulfatase, chondroitin-6-sulfatase とそれぞれ反応させた。反応後、CPC を添加し、GAG 分解酵素によって分解されずに残った [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan と CPC の複合体を形成させ、これを再度溶解して液体シンチレーションカウンターにて測定した。結果は、対照に比較しての分解率 (%) で表した。上清及び細胞成分沈渣中の [ $^{35}\text{S}$ ] 標識 proteoglycan の各 GAG 分解酵素による分解率はそれぞれ、heparinase では 0%, 1%, chondroitin ABC lyase では 77%, 92%, chondroitin AC lyase では 76%, 93%, chondroitin-4-sulfatase では 80%, 95%, chondroitin-6-sulfatase では 2%, 14%, であった。

#### 考 按

正常人の末梢血より分離された好塩基球を受

身感作の後, Anti-IgE で刺激した場合も Ca-ionophore A23187 で刺激した場合もともに抗凝固活性の放出は認められなかった(表1). 正常人の末梢血より好塩基球を精製することは困難で, 今回も purity は  $6.2 \pm 1.7\%$  と低かった. しかし本論文第1編で行なったヒト肺肥満細胞での検討で, 細胞数  $5 \times 10^6/2$  ml 個で Anti-thrombin 活性及び Anti-FXa 活性の両者の抗凝固活性が認められており, その1.5倍の細胞数 ( $7.5 \times 10^6$  個/2 ml) で検出されなかったもので, 好塩基球からの抗凝固活性の放出はなかったと考えられる. しかも Anti-IgE で刺激した時の好塩基球からの metachromatic substance あるいは histamine の遊離率は, ヒト肺肥満細胞と同様な値で認められている(表1). このことは逆に抗凝固活性を持たない metachromasia を呈する物質が放出されたことを示しており, これを検討するためにまず市販の chondroitin sulfate type A, chondroitin sulfate type B 及び porcine intestinal heparin の一定量に対する Azure-A の metachromasia を測定した(図1). porcine intestinal heparin  $5.6 \mu\text{g/ml}$  は  $0.184$  U/ml の標準 heparin 濃度に相当する metachromasia を呈し, chondroitin sulfate type A 及び type B はその倍量の  $11.2 \mu\text{g/ml}$  でそれぞれ  $0.022$  U/ml,  $0.048$  U/ml の標準 heparin 濃度に相当する metachromasia を呈した. つまり, heparin より高濃度を必要とするが, chondroitin sulfate type A 及び type B はともに Azure-A と親和性を持ち metachromasia を呈することが示された. 従来より Azure-A による metachromasia を用いて細胞内 heparin を定量する方法がなされていたが<sup>13)</sup>, 例えばラット<sup>19)</sup> あるいはヒト肥満細胞<sup>20)</sup> のように, 細胞内 proteoglycan のほとんどすべてが heparin であるような組成の分析されたものに限って使用されるべきであろう.

次に, 好塩基球から放出される proteoglycan を分析するために, CML 患者の末梢血から精製した好塩基球を [<sup>35</sup>S] sulfate で標識した. まず [<sup>35</sup>S] 標識された好塩基球から, 刺激によって [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan が実際に放出されるかどうかを調べる目的で, 細胞数により3群に分け,

受身感作の後 Anti-IgE を添加して放出を惹起した. 図2, A に示すように遊離率(%)には変化がみられなかったが細胞数の増加に比例して <sup>35</sup>S-GAG 量が増加した. また図2, B に示すように細胞数を一定にして, 添加する Anti-IgE 量を変えると, 添加量の増加にともない放出される <sup>35</sup>S-GAG 量は増加し, 一定の遊離率を示した. これは細胞内で産生された proteoglycan が Anti-IgE の刺激で一定の遊離をし, しかもそれは刺激 (Anti-IgE) の強さに依存していることがうかがわれた. この放出された [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan をさらに検討するために, 細胞内に残存している [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan と同様に Sephadex G-25 でゲル濾過したところ, 両者ともウロン酸のピークに一致し, proteoglycan であることが確認された(図3, A, B). 放出された [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan をさらに Dowex AG 1-X2 でイオン交換クロマトグラフィーを行なうと [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan は 3 M NaCl で溶出され, proteoglycan が標識されていることが確認された(図4). 次に Sephadex G-25 でゲル濾過後の, 放出されたあるいは細胞内に残存した [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan を GAG 分解酵素と反応させ, その感受性を検討した. 図5に示すように, 放出された proteoglycan も細胞内に残存している proteoglycan も同様の結果で, heparinase には分解されず, chondroitin ABC lyase, chondroitin AC lyase, chondroitin-4-sulfatase によって分解され, chondroitin-6-sulfatase によって僅かに分解された. chondroitin ABC lyase は chondroitin sulfate type A, type B と type C を分解するが heparin は分解しない. また chondroitin AC lyase は chondroitin sulfate type A と type C を分解するが type B と heparin は分解しない. chondroitin-4-sulfatase と chondroitin-6-sulfatase はそれぞれ chondroitin sulfate type A と type C を分解するが heparin と chondroitin sulfate type B は分解しない. したがって好塩基球で産生あるいは放出される proteoglycan はそのほとんどが chondroitin sulfate type A であることが示された. ここで用いた好塩基球は purity が  $52.1 \pm 6.9\%$  ( $n=3$ ) で他はリンパ球であった.

リンパ球には [ $^{35}\text{S}$ ] sulfate が取込まれないことが示されており<sup>21)</sup>, 放出された proteoglycan は好塩基球由来であることに問題はない. ただ [ $^{35}\text{S}$ ] 標識した好塩基球は CML 患者から採取されているため, 正常好塩基球との異同が問題となるかもしれない. しかし, 採血された CML 患者は "blast crisis" の状態ではなく, したがって得られた好塩基球は好塩基性顆粒と分葉核をもつ成熟型のもので未熟型のは認められず, 光顕的には正常好塩基球と区別できなかった.

Olsson ら<sup>22)</sup> は CML 患者から得た好塩基球内には heparin 及び種々の chondroitin sulfate が含まれており, それには抗凝固活性が存在することを示した. また Galli ら<sup>23)</sup> は CML 患者の好塩基球内には 75% の chondroitin sulfate type A と type C, 9% の chondroitin sulfate type B, 16% の heparin sulfate が含まれると報告した. しかし Metcalfe ら<sup>9)</sup> は 3 人の CML 患者の好塩基球内の proteoglycan を分析し, 92% が chondroitin sulfate type A, 6% が chondroitin sulfate type C, 2% が二硫化二単糖類で, 抗凝固活性は認められなかった. これらの研究では抗凝固活性は感度の低い部分トロンボプラスチン時間を用いて測定しており, この方法では好塩基球内に存在する proteoglycan の抗凝固活性を論ずることは不適格である. 著者は極めて感度の高い発色合成基質を用いる精製系で測定したが, CML 患者由来の好塩基球内にも, 放出された proteoglycan にも抗凝固活性は検出されなかった.

以上の結果より, ヒト好塩基球から放出される proteoglycan は主に chondroitin sulfate type A から成り, ヒト肺肥満細胞で分析された heparin proteoglycan とは異なっている. 組織に固着している肥満細胞が IgE を介する即時型過敏反応において放出する heparin は, fibrin の形成を阻止することによって潜在的に重要な役割をしているのかもしれない. それに対して流血中を移動する好塩基球は IgE を介する反応において抗凝固活性の放出が見られなかった. このことはそれぞれの細胞の局在環境において妥当なことなのかもしれない. なぜなら, 以前より血管内凝固特に血管壁の内腔表面の血栓形

成の阻止には, 内皮細胞膜の表面の proteoglycan の関与が報告され<sup>24, 25)</sup>, 事実, これは血液の流動性を維持するために重要な働きをしているらしい. このメカニズムを研究する過程で, 内皮細胞表面は最も重要な活性化凝固因子である thrombin を血中から除去し, thrombin と AT III の反応を促進することが示されてきた<sup>26)</sup>. そしてこの thrombin の急速な阻害には thrombin が内皮細胞の高親和性結合部位と結合し, また内皮細胞の AT III cofactor が抗凝固性 proteoglycan である heparin や heparan sulfate と共に機能する必要がある<sup>26-28)</sup>. そして細胞表面の heparan sulfate が一部では thrombin の内皮細胞への高親和性結合部位であることが示されている<sup>18)</sup>. またラットの後足を thrombin と AT III で灌流することによって, Marcum ら<sup>29)</sup> は thrombin-AT III 複合体形成が 10-20 倍上昇し, heparin 様物質がこの活性に対して影響をもつとしている. このように血管内皮細胞表面上に存在する heparin 様物質は抗凝固性に対して重要な役割を演じている. また一方では thrombin と内皮細胞との反応で, 他の生物学的影響がこれを修飾している. なかでも thrombin とその内皮細胞表面の cofactor である thrombomodulin との複合体による protein C の活性化が知られており, この反応により活性化された protein C は, Factor Va, Factor VIII a を不活性化することで凝固抑制的に働く<sup>30)</sup>. このように血管内皮細胞表面が抗凝固性, 抗血栓性に働いていることが解明されてきたが, 血漿中にも強力な凝固阻止物質である AT III や heparin cofactor II などが存在している. 故に好塩基球から放出される proteoglycan が抗凝固活性を持たないことは, この細胞の環境からは合目的であるのかもしれない.

それではこの好塩基球の主たる役割は何であろうか. これについては heparin 以外の mediator の遊離が問題となる. 特に neutrophil chemotactic factor (NCF), eosinophil chemotactic factor (ECF), platelet-activating factor (PAF) や leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) などを遊離することによって, 反応局所へ好中球, 好酸球などを遊



走, 集合させ, 局所での反応で中心的な役割を担う leukotriene C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) を遊離させることにより, 遅発型アレルギー反応に関与している可能性が高い。なかでも好塩基球は, IgE レセプターを介して惹起される即時型反応以外に, 特に IgG レセプターに関連して発現する遅発型反応を繰り返して惹起する役割を有しているように思われる。好塩基球のアレルギー反応修復への関与についてはなお不明な点が多く, 今後の検討にまちたい。

### 結 語

即時型アレルギー反応において好塩基球から放出される proteoglycan の抗凝固活性の有無を解明する目的で, 正常人および CML 患者より採取したヒト好塩基球を用いて検討し, 以下の結果を得た。

1) 正常人血液 200ml を遠沈して, また CML 患者血液 20ml を静置して白血球濃厚分画を得, それぞれを Hypaque-Ficoll を用いた比重遠沈法にて精製し, ヒト好塩基球を得た。得られた好塩基球の絶対数は正常人で  $(8.9 \pm 4.6) \times 10^6$  個, purity は  $6.2 \pm 1.7\%$  (mean  $\pm$  se,  $n=11$ ), CML 患者で絶対数  $(1.4 \pm 0.3) \times 10^7$  個, purity は  $52.1 \pm 6.9\%$  (mean  $\pm$  se,  $n=11$ ) であった。

2) 正常人より分離された好塩基球を Anti-IgE あるいは Ca-ionophore A23187 で刺激した時, 抗凝固活性の放出は検出されなかった。しかし Anti-IgE で刺激した時, metachromatic substance および histamine の遊離率はそれぞれ  $37.8 \pm 5.2\%$ ,  $7.8 \pm 0.8\%$  であった。

3) CML 患者より分離された好塩基球を [<sup>35</sup>S] sulfate で標識し, Anti-IgE で刺激した時, 放

出される, また細胞内に残存している [<sup>35</sup>S] 標識検体を Sephadex G-25 でゲル濾過したところウロン酸のピークに一致する [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan が抽出された。この Sephadex G-25 でゲル濾過された放出 [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan は Dowex AG 1-X2 のイオン交換クロマトグラフィーにより 3M NaCl で溶出され, proteoglycan であることが確認された。放出または細胞内に残存している [<sup>35</sup>S] 標識 proteoglycan を種々の glycosaminoglycan 分解酵素と反応させると, 分解率はそれぞれ, heparinase で 0%, 1%, chondroitin ABC lyase で 77%, 92%, chondroitin AC lyase で 76%, 93%, Chondroitin-4-sulfatase で 80%, 95%, chondroitin-6-sulfatase で 2%, 14% であった。

以上の結果よりヒト好塩基球を Anti-IgE で刺激した時に放出される proteoglycan はそのほとんどが chondroitin sulfate type A であり, 抗凝固活性は検出されなかった。ヒト肺肥満細胞から放出される heparin proteoglycan がその抗凝固活性によって即時型過敏反応における histamine を主とする組織内炎症の遷延防止にかかわっていると推測されるのに対して, 好塩基球のこの性質はそれぞれの細胞環境における合目的性を示唆していると考えられ, むしろ heparin 以外の mediator 即ち NCF, ECF, PAF, LTB<sub>4</sub> などの遊離による遅発型反応を主とするアレルギー反応に関与している可能性がある。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表するとともに, 終始御懇篤なる御指導を賜った林 久智講師に深謝いたします。

### 文 献

1. Parwaresch M R: The human blood basophil, morphology, origin, kinetics; Function and Pathology. Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg, New York (1976) pp. 1 - 120.
2. Kitamura Y, Shimada M, Hatanaka K and Miyano Y: Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature* (1977) 268, 442-443.
3. Kitamura Y, Go S and Hatanaka K: Decrease of cells in W/W<sup>v</sup> mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* (1978) 52, 447-452.
4. Hatanaka K, Kitamura Y and Nishimune Y: Local development of mast cells from bone marrow-

- derived precursors in the skin of mice. *Blood* (1979) **53**, 142-147.
5. Kitamura Y, Matsuda H and Hatanaka K: Clonal nature of mast-cell clusters formed in W/W<sup>v</sup>mice after bone marrow transplantation. *Nature* (1979) **281**, 154-155.
  6. Kobayashi T, Nakano T, Nakahata T, Asai H, Yagi Y, Tsuji K, Komiyama A, Akabane T, Kojima S and Kitamura Y: Formation of mast cell colonies in methylcellulose by mouse peritoneal cells and differentiation of these cloned cells in both the skin and the gastric mucosa of W/W<sup>v</sup>mice; Evidence that a common precursor can give rise to both "connective tissue-type" and "mucosal" mast cell. *J Immunol* (1986) **136**, 1378-1384.
  7. Dvorak A, Galli S, Schulman E, Lichtenstein L and Dvorak H: Basophil and mast cell degranulation. Ultrastructural analysis of mechanism of mediator release. *Fed Proc* (1983) **42**, 2510-2515.
  8. Fox C C, Kagey-Sobotka A, Schleimer R P, Peters S P, MacGlashan D W Jr and Lichtenstein L M: Mediator release from human basophils and mast cells from lung and intestinal mucosa. *Int Archs Allergy Appl Immunol* (1985) **77**, 130-136.
  9. Metcalfe D D, Bland C E and Wasserman S I: Biochemical and functional characterization of proteoglycans isolated from basophils of patients with chronic myelogenous leukemia. *J Immunol* (1984) **132**, 1943-1950.
  10. 木村郁郎, 谷崎勝朗: 好塩基球および好酸球の適切な同時直接算定法の考案とその臨床的評価. *医学のあゆみ* (1969) **69**, 25-28.
  11. Lasser E C, Lang J H, Curd J G, Cochrane C G, Lyon S G, Howard M M, Hamblin A E and Revak S D: The plasma contact system in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* (1983) **72**, 83-88.
  12. Jaques L B and Wollin A: A modified method for the colorimetric determination of heparin. *Canad J Pharmacol* (1967) **45**, 787-794.
  13. Parekh, A C and Glick D: Studies in histochemistry. Lxv. heparin and hexosamine in isolated mast cells; Determination, intracellular distribution, and effects of biological state. *J Biol Chem* (1962) **237**, 280-286.
  14. Shore P A, Burkhalter A and Cohn V H Jr: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* (1959) **127**, 182-186.
  15. Siraganian R P: Refinements in the automated fluorometric histamine analysis system. *J Immunol Methods* (1975) **7**, 283-290.
  16. Bitter T and Muir H M: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* (1962) **4**, 330-334.
  17. Bradford M M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) **72**, 248-254.
  18. Shimada K and Ozawa T: Evidence that cell surface heparin sulfate is involved in the high affinity thrombin binding to cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* (1985) **75**, 1308-1316.
  19. Schiller S and Dorfman A: The isolation of heparin from mast cells of the normal rat. *Biochem Biophys Acta* (1959) **31**, 278-280.
  20. Metcalfe D D, Lewis R A, Silbert J E, Rosenberg R D, Wasserman S I and Austen K F: Isolation and characterization of heparin from human lung. *J Clin Invest* (1979) **64**, 1537-1543.
  21. Dvorak A M, Galli S J, Marcum J A, Nabel G, Simonian H D, Goldin J, Monahan R A, Pyne K, Cantor H, Rosenberg R D and Dvorak H F: Cloned mouse cells with natural killer function and cloned suppressor T cells express ultrastructural and biochemical features not shared by cloned

- inducer T cells. *J Exp Med* (1983) **157**, 843–861.
22. Olsson I, Berg B, Fransson L A and Norden A: The identity of the metachromatic substance of basophils leukocytes. *Scand J Haematol* (1970) **7**, 440–444.
  23. Galli S J and Dvorak H F: Basophils and mast cells; Structure, function, and role in hypersensitivity; in *Cellular, Molecular, and Clinical Aspects of Allergic Disorders*. Gupta and Good eds, Plenum Medical Book Co., New York (1979) pp 1 –53.
  24. Kirk J E: Anticoagulant activity of human arterial mucopolysaccharides. *Nature* (1959) **184**, 369–370.
  25. Gore I and Larkey B J: Functional activity of aortic mucopolysaccharides. *J Lab Clin Med* (1960) **56**, 839–846.
  26. Lollar P and Owen W G: Clearance of thrombin from circulation in rabbits by high-affinity binding sites on endothelium. Possible role in the inactivation of thrombin by antithrombin III. *J Clin Invest* (1980) **66**, 1222–1230.
  27. Shifman M A and Pizzo S V: *In vivo* metabolism of reversibly inhibited  $\alpha$ -thrombin. *Biochem Pharmacol* (1983) **32**, 739–741.
  28. Shifman M A and Pizzo S V: The *in vivo* metabolism of antithrombin III and antithrombin III complexes. *J Biol Chem* (1982) **257**, 3243–3248.
  29. Marcum J A, Mckenney J B and Rosenberg R D: Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to the endothelium. *J Clin Invest* (1984) **74**, 341–350.
  30. Esmon C T: Protein-C; Biochemistry, physiology, and clinical implications. *Blood* (1983) **62**, 1155–1158.

**Anticoagulant activity of proteoglycans released from  
human basophil-mast cell system by challenge with  
anti-IgE or Ca-ionophore A23187**

**II. Anticoagulant activity of proteoglycans released from  
isolated human basophils**

**Takashi TSUDA**

**Department of Medicine, Okayama University Medical School,**

**Okayama, 700**

**(Director: Prof. Ikuro Kimura)**

The anticoagulant activity of proteoglycans released from human basophils was evaluated. Basophils were obtained from normal donors and patients with abnormally high peripheral blood basophilia accompanying chronic myelogenous leukemia (CML) and enriched by Hypaque-Ficoll gradient sedimentation. From normal donors  $(8.9 \pm 4.6) \times 10^6$  basophils were obtained with a purity of  $6.2 \pm 1.7\%$ , and from patients with CML  $(1.4 \pm 0.3) \times 10^7$  basophils were obtained with a purity of  $52.1 \pm 6.9\%$ . Isolated basophils from normal donors, which were passive-sensitized with high IgE serum from an allergic patient and challenged with rabbit anti-human IgE or stimulated by calcium ionophore A23187, released proteoglycans which stained metachromatically with Azure A, as well as histamine. No anticoagulant activity was detected in proteoglycans released from human basophils by the amidolytic method using chromogenic substrate S-2238. Isolated basophils from patients with CML, which were labeled by [ $^{35}\text{S}$ ] sulfate, were also passive-sensitized and challenged with rabbit anti-human IgE. Released [ $^{35}\text{S}$ ] proteoglycans filtered on Sephadex G-25 were resistant to heparinase and chondroitin-6-sulfatase, and susceptible to degradation by chondroitin ABC lyase, chondroitin AC lyase and chondroitin-4-sulfatase. These findings indicate that the [ $^{35}\text{S}$ ] proteoglycans released from basophils were made up of chondroitin sulfate type A. No heparin was identified. The basophil proteoglycans had no anticoagulant activity and were different from the proteoglycans of human lung mast cells. This fact may be particularly relevant to the location of each cell.