

# Phorbol 12-myristate 13-acetateにより惹起されるコイ栓球の凝集反応に及ぼす 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine, IndomethacinおよびDibutyryl Cyclic AMPの効果

松下映夫\*<sup>1</sup>・田中竜介\*<sup>1</sup>・近藤昌和\*<sup>2</sup>・高橋幸則\*<sup>2</sup>

## Effects of 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine, Indomethacin and Dibutyryl Cyclic AMP on the Aggregations of Carp Thrombocytes induced by Phorbol 12-myristate 13-acetate

Teruo Matsushita\*<sup>1</sup>, Ryusuke Tanaka\*<sup>1</sup>, Masakazu Kondo\*<sup>2</sup> and Yukinori Takahashi\*<sup>2</sup>

Aggregation of carp (*Cyprinus carpio*) thrombocytes in comparison with that of rat platelets induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a potent activator of protein kinase C, was studied by the whole blood method using an impedance aggregometer. Carp thrombocyte aggregation, like that of rat platelets, was triggered by PMA. The aggregating responses of carp thrombocytes induced by PMA was inhibited by 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), an inhibitor of protein kinase C. These findings suggest that the activation of protein kinase C can induce fish thrombocyte aggregation, as in the case for mammalian platelets.

In addition, the effects of indomethacin, an inhibitor of cyclooxygenase, and dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP), a cell membrane permeable cyclic AMP analogue, on the PMA-induced carp thrombocyte aggregation in comparison with that of rat platelets were examined. PMA-induced thrombocyte aggregation in carp was inhibited by indomethacin, but was not inhibited by db-cAMP. These findings show that prostaglandin(s) is involved in the mechanism of PMA-induced thrombocyte aggregation as a promoting mediator, and that cyclic AMP was not involved as an inhibitory mediator. On the contrary, PMA-induced platelet aggregation in rats was inhibited by db-cAMP, but was not inhibited by indomethacin. These findings show some differences between carp thrombocytes and rat platelets in PMA-induced aggregating mechanisms.

### 1 緒 言

魚類において、哺乳類の血小板に相当する血球は栓球であり、生理的には止血に関与することが知られているが<sup>1, 2)</sup>、魚類の栓球凝集の分子メカニズムに関する研究は哺乳類に比べて遅れている。

著者らは先に、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種々の凝集惹起剤に対する反応性を検討した<sup>3)</sup>。その結果、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と略) 処理に対しては、コイ栓球ではラット血小板とは異なり、凝集反応が起こりにくいか、あるいは全く起こらず、反応性が相違することを報告した<sup>3)</sup>。さらに、アラキドン酸カスケードにおけるプロスタグランジン合成酵素 (シクロオキシゲナーゼ) を阻害するインドメタシンや、細胞膜透過性のcyclic AMP (cAMPと略) 誘導体であるN<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyryl cyclic AMP (db-cAMPと略) の前処理の効果について検討し、コイにおいても、ラット

2004年8月18日受付. Received August 18, 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).

血小板凝集と同様に、プロスタグランジンやcAMPが栓球の細胞内情報伝達メカニズムに関与していることを示した<sup>8, 9)</sup>。

タンパク質リニン酸化酵素C (protein kinase C, PKCと略) は、様々な細胞において細胞内の情報伝達のメカニズムに関与している<sup>5-7)</sup>。PKCを活性化する物質としてクロトン油 (巴豆という植物の精油) に含まれるホルボールエステル類のひとつであるphorbol 12-myristate 13-acetate (PMAと略) が知られている<sup>6-8)</sup>。哺乳類では、血液へのPMA添加により血小板凝集が惹起されることから、その凝集の分子メカニズムにおいてPKCが関与することが示されている<sup>9-12)</sup>。また、PKCの阻害作用を有する物質として1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7と略)<sup>13)</sup>が知られている。

本研究では、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、PMA処理により栓球凝集が惹起されるか否かを調べるとともに、その凝集がH-7による前処理で抑制されるか、すなわち、魚類の栓球凝集にPKCが関与しているかについて検討した。さらに、PMAによる栓球凝集に対する、インドメタシン<sup>14)</sup>やdb-cAMP<sup>15)</sup>の抑制効果の有無について調べ、これらの抑制物質の効果に、魚類と哺乳類の間で違いが認められるかについて、コイとラットの血液を用いて検討したので報告する。

## 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(株) (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

PMA, インドメタシン, db-cAMPおよびキナルジンは和光純薬(株) (大阪市中央区) より、H-7および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。

採血した血液に抗凝固剤を添加しておいても、採血後は血小板および栓球が自然凝集を起こしていくため、時間の経過にともない凝集惹起剤による凝集反応が検出しにくくなる。3時間内であれば再現性のある凝集反応が得られたことから、凝集能の測定は採血後3時間以内に行った。

### 2.4 凝集能の測定

コイ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) を用いたインピーダンス法 (Electrical impedance measurement)<sup>16, 17)</sup>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 $\mu$ 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CaCl<sub>2</sub>を10 $\mu$ l添加し、約4~6分後、インドメタシン (溶媒はDMSO), db-cAMP (溶媒は蒸留水) およびH-7 (溶媒は蒸留水) または対照用溶媒を1 $\mu$ l (DMSOの場合) または10 $\mu$ l (蒸留水の場合) 添加し、約4~6分間ブレインキュベートした。ついで、凝集刺激剤であるPMA (溶媒はDMSO) 1 $\mu$ 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:  $\Omega$ ) の変化) を経時的に記録し (PMA添加後約20分間まで)、凝集曲線を得た。

凝集能については、それぞれの凝集曲線で最大凝集が得られた時点のインピーダンス値の変化を凝集能として数値化し、その強さの程度を比較した。H-7, インドメタシンおよびdb-cAMPの凝集抑制効果については、それぞれ3匹以上のコイおよびラットの血液について検討し、その効果に再現性があることを確認した。

### 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

#### 3.1 PMAによる凝集

Fig. 1のpanel Aにラット血小板の凝集曲線の例を示した。縦軸は凝集の程度（インピーダンスの変化量： $\Delta\Omega$ ）を、横軸は血液のインキュベーション時間を示した（ただ

し、PMAを添加した時点をゼロとした）。血液が凝集しなければ時間が経過しても、インピーダンスの変化量（ $\Delta\Omega$ ）がゼロでありほぼ水平な線を描く。Ca<sup>2+</sup>添加（12分前）のみでは凝集は惹起されずほぼ水平な線を保つが、PMAの添加（ゼロ時点）により凝集反応が惹起され、時間の経過に従ってインピーダンスの変化量（ $\Delta\Omega$ ）が増大し凝集

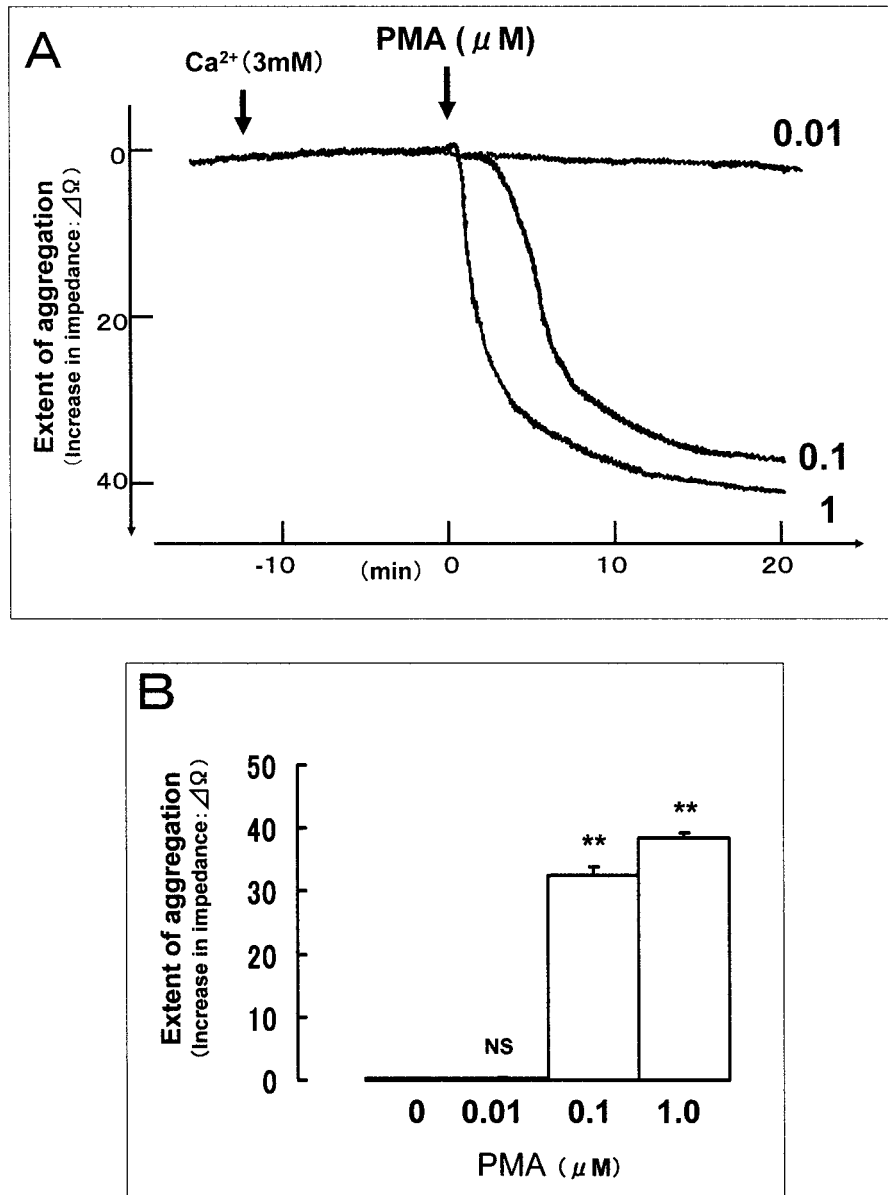


Fig. 1. Typical rat platelet aggregation curves (panel A) and concentration-dependent increase in aggregation (panel B), obtained with PMA (0.01~1  $\mu\text{M}$ ) induction. Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 37°C for about 12 min and PMA (0.01, 0.1, 1  $\mu\text{M}$ ) was then added at the time indicated (panel A). The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of PMA (panel B). Each column and vertical bar represent the mean and the standard deviation of 2-4 determinations, respectively. \*\*P < 0.01 vs 0  $\mu\text{M}$  PMA. NS means not significant vs 0  $\mu\text{M}$  PMA.

曲線が得られる。凝集曲線の最大インピーダンスの変化量 ( $\Delta\Omega$ ) を凝集能の強さとして数値化し, panel BにそれぞれのPMA濃度における凝集能の強さを示した(以下, Fig 2 ~ Fig 8についても同様にpanel Aに凝集曲線の例, panel Bに数値化データを示す)。ラットでは, PMAにより濃度依存的な血小板凝集が惹起された (Fig. 1 panel A

and B)。なお, 0.1および1  $\mu\text{M}$ のPMA添加により血小板の凝集が惹起されたが, 0.01  $\mu\text{M}$ では惹起されなかった。一方, コイでは1および10  $\mu\text{M}$ のPMA添加により栓球の凝集が惹起されたものの, 0.1  $\mu\text{M}$ では惹起されなかった (Fig. 2 panel A and B)。ラット血小板凝集と同様に, PMAは濃度依存的にコイの栓球の凝集を惹起するが, 凝

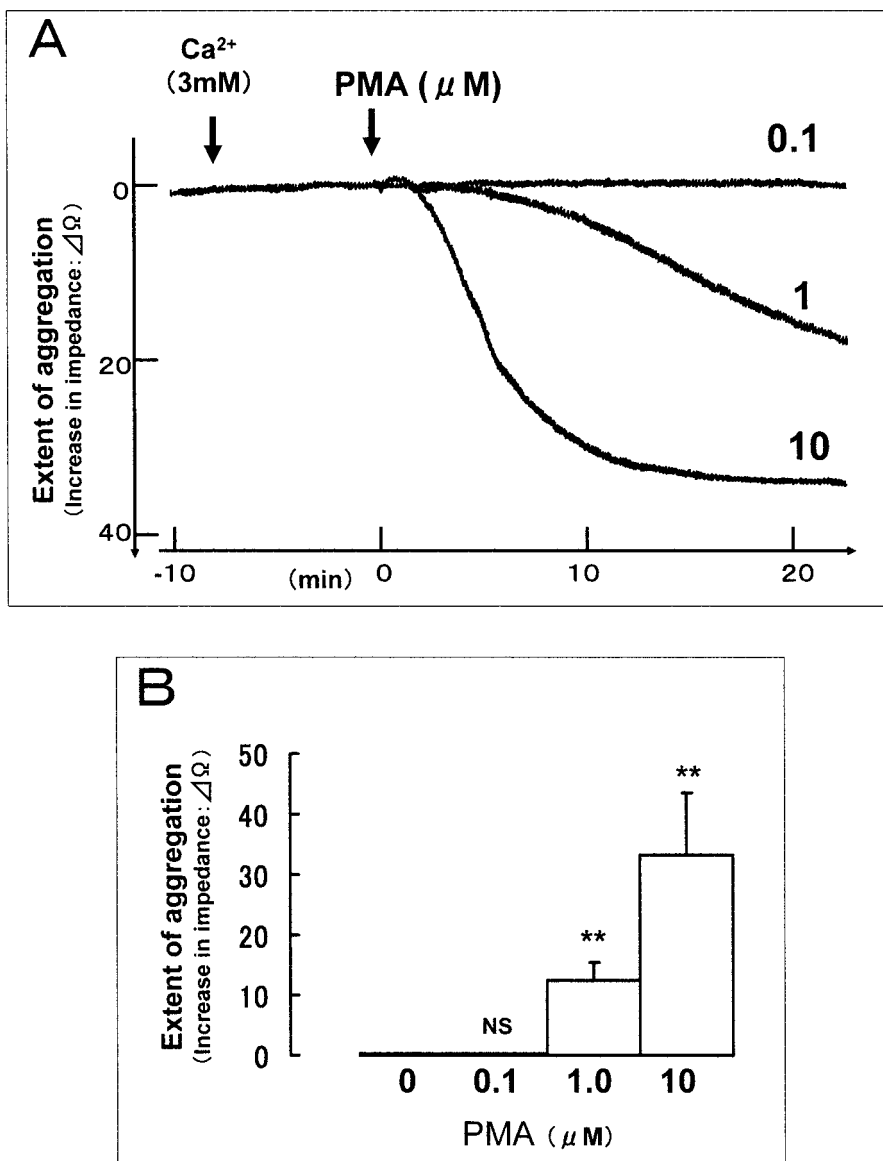
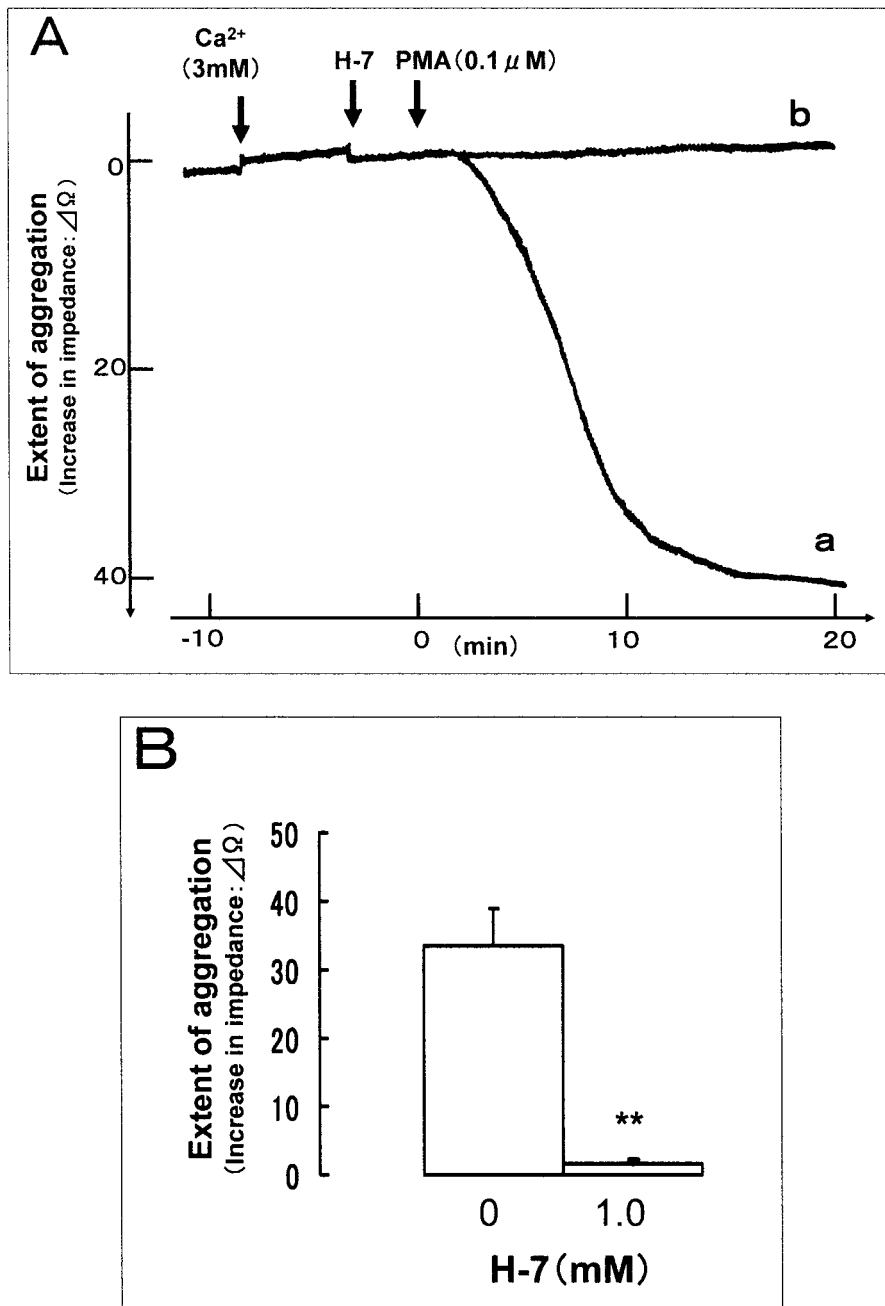


Fig. 2. Typical carp thrombocyte aggregation curves (panel A) and concentration-dependent increase in aggregation (panel B), obtained with PMA (0.1~10  $\mu\text{M}$ ) induction. Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM  $\text{CaCl}_2$  (added) at 25°C for about 8 min and PMA (0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) was then added at the time indicated (panel A). The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of PMA (panel B). Each column and vertical bar represent the mean and the standard deviation of 2-4 determinations, respectively. \*\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{M}$  PMA. NS means not significant vs 0  $\mu\text{M}$  PMA.

集を惹起する濃度はコイの場合にラットよりも高い濃度を必要とすることが明らかとなった。したがって、以下に示すH-7、インドメタシンおよびdb-cAMPの凝集抑制効果の検討においては、ラットおよびコイの場合、それぞれ0.1および1  $\mu$ MのPMAを用いることとした。

### 3.2 PMAによる凝集反応に及ぼすH-7前処理の効果

ラットの血小板凝集は1 mMのH-7による前処理で完全に抑制された (Fig. 3)。同様に、コイの栓球凝集も1 mMのH-7により完全に抑制された (Fig. 4)。



**Fig. 3.** Typical rat platelet aggregation curves, obtained with PMA ( $0.1 \mu\text{M}$ ) induction (panel A), and the effect of H-7 treatment on PMA-induced platelet aggregation (panel B).  
 Panel A: Rat platelets were pre-incubated with 3 mM  $\text{CaCl}_2$  (added) at  $37^\circ\text{C}$  for about 3 min in the presence of vehicle (distilled water) or H-7 (1 mM), and PMA ( $0.1 \mu\text{M}$ ) was then added at the time indicated. a: vehicle, b: H-7 (1 mM)  
 Panel B: The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of PMA. Each column and vertical bar represent the mean and the standard deviation of 2-4 determinations, respectively. \*\* $P < 0.01$  vs  $0 \mu\text{M}$  H-7 (vehicle).

### 3.3 PMAによる凝集反応に及ぼすインドタシン前処理の効果

インドメタシン (30, 100  $\mu$ M) による前処理では, ラットの血小板凝集は全く抑制されなかった (Fig. 5)。一方, コイの栓球凝集は100  $\mu$ Mインドメタシンの前処理により, 明らかな抑制 (約50~60%抑制) が認められた (Fig. 6)。

### 3.4 PMAによる凝集反応に及ぼすdb-cAMP前処理の効果

ラットの血小板凝集は1 mMのdb-cAMPの前処理によりほぼ完全に抑制された (Fig. 7)。一方, コイの栓球凝集は1 mM のdb-cAMPの前処理では全く抑制されなかった (Fig. 8)。

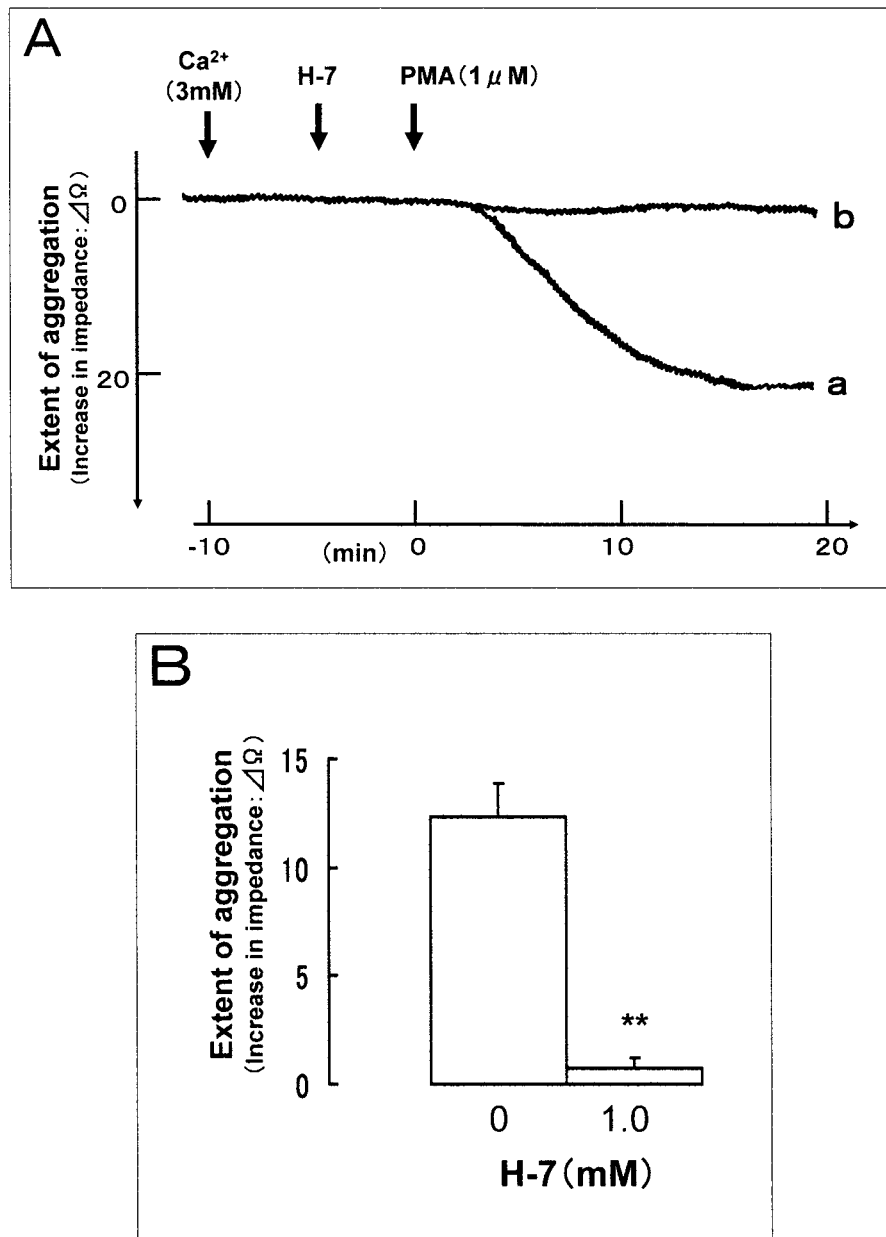


Fig. 4. Typical carp thrombocyte aggregation curves, obtained with PMA (1  $\mu$ M) induction (panel A), and the effect of H-7 treatment on PMA-induced thrombocyte aggregation (panel B).

Panel A: Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 25°C for about 5 min in the presence of vehicle (distilled water) or H-7 (1 mM), and PMA (1  $\mu$ M) was then added at the time indicated. a: vehicle, b: H-7 (1 mM)

Panel B: The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of PMA. Each column and vertical bar represent the mean and the standard deviation of 2-3 determinations, respectively. \*\*P < 0.01 vs 0  $\mu$ M H-7 (vehicle).

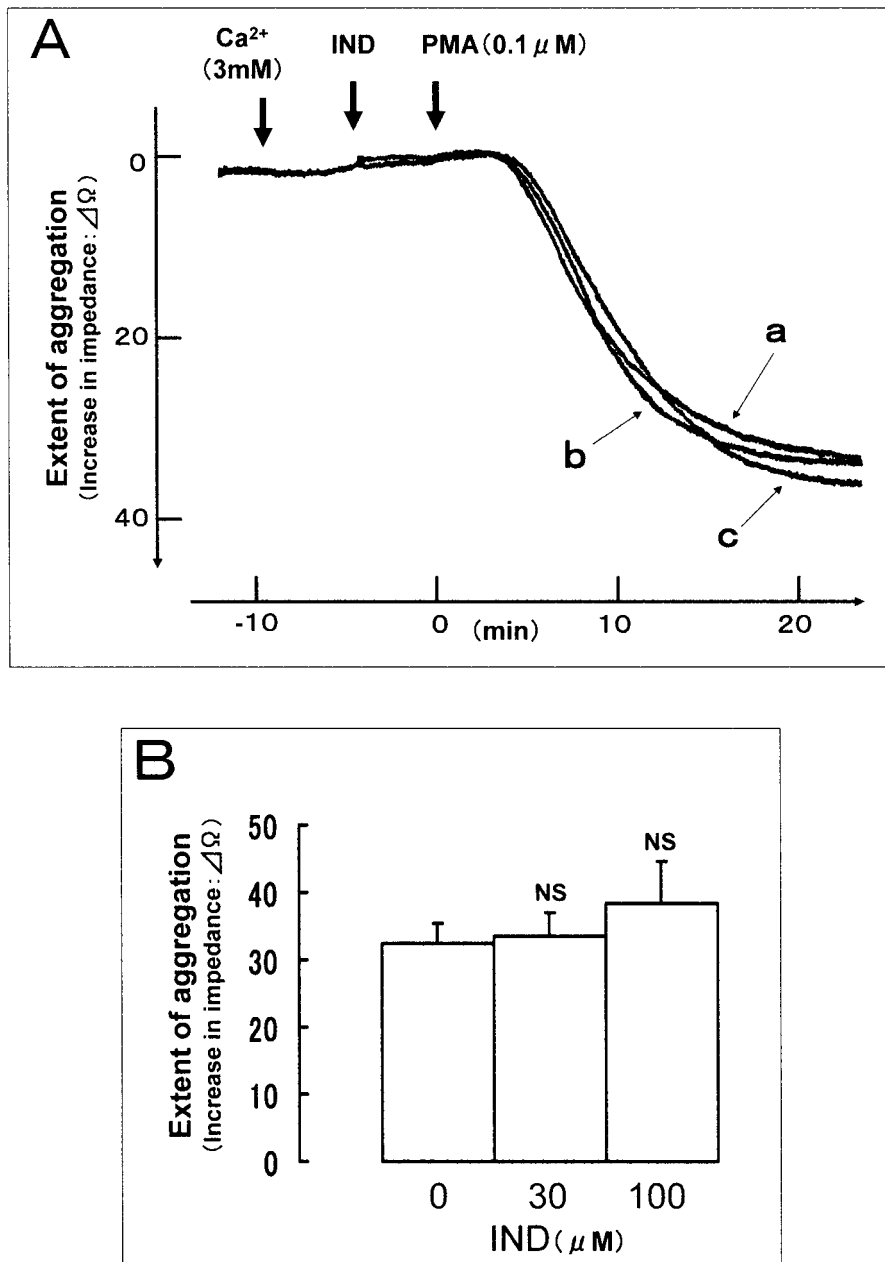
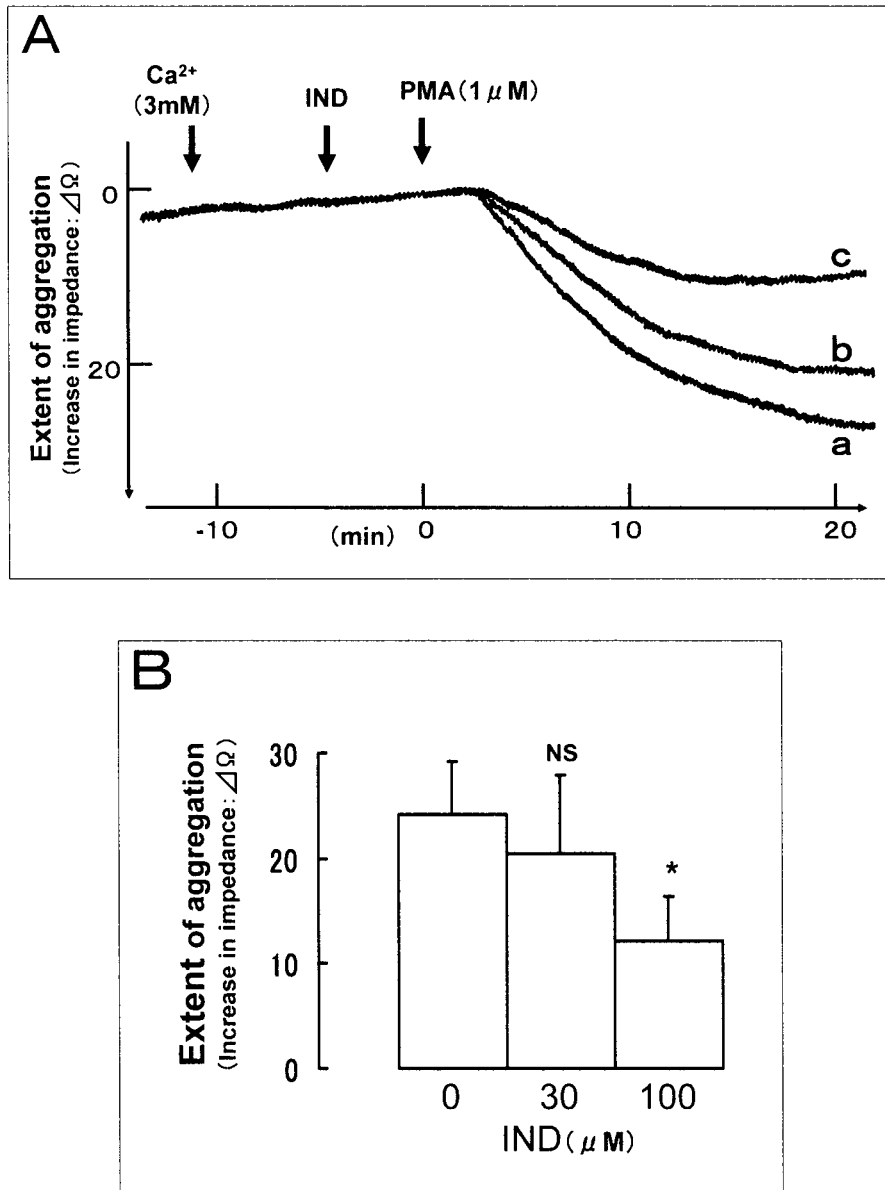


Fig. 5. Typical rat platelet aggregation curves, obtained with PMA (0.1  $\mu\text{M}$ ) induction (panel A), and the effect of indomethacin (IND) treatment on PMA-induced platelet aggregation (panel B).

Panel A: Rat platelets were pre-incubated with 3 mM  $\text{CaCl}_2$  (added) at 37°C for about 5 min in the presence of vehicle (DMSO) or IND (30, 100  $\mu\text{M}$ ), and PMA (0.1  $\mu\text{M}$ ) was then added at the time indicated. a: vehicle, b: IND (30  $\mu\text{M}$ ), c: IND (100  $\mu\text{M}$ )

Panel B: The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of PMA. Each column and vertical bar represent the mean and the standard deviation of 2-5 determinations, respectively. NS means not significant vs 0  $\mu\text{M}$  IND (vehicle).



**Fig. 6.** Typical carp thrombocyte aggregation curves, obtained with PMA (1  $\mu\text{M}$ ) induction (panel A), and the effect of indomethacin (IND) treatment on PMA-induced thrombocyte aggregation (panel B).  
 Panel A: Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM  $\text{CaCl}_2$  (added) at 25°C for about 5 min in the presence of vehicle (DMSO) or IND (30, 100  $\mu\text{M}$ ), and PMA (1  $\mu\text{M}$ ) was then added at the time indicated. a: vehicle, b: IND (30  $\mu\text{M}$ ), c: IND (100  $\mu\text{M}$ )  
 Panel B: The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of PMA. Each column and vertical bar represent the mean and the standard deviation of 3-6 determinations, respectively. \* $P < 0.05$  vs 0  $\mu\text{M}$  IND (vehicle). NS means not significant vs 0  $\mu\text{M}$  IND (vehicle).



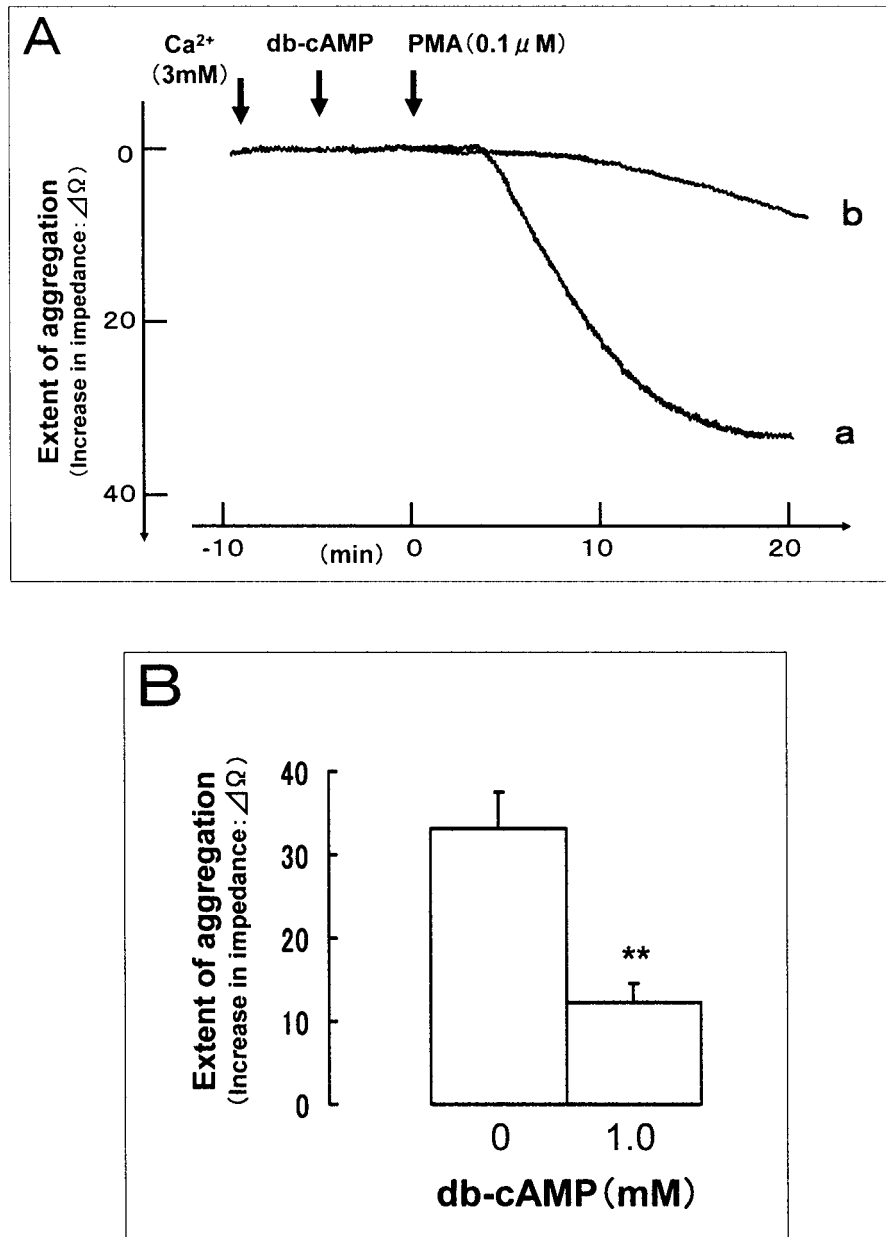


Fig. 7. Typical rat platelet aggregation curves, obtained with PMA ( $0.1 \mu\text{M}$ ) induction (panel A), and the effect of db-cAMP treatment on PMA-induced platelet aggregation (panel B).

Panel A: Rat platelets were pre-incubated with 3 mM  $\text{CaCl}_2$  (added) at  $37^\circ\text{C}$  for about 5 min in the presence of vehicle (distilled water) or db-cAMP (1 mM), and PMA ( $0.1 \mu\text{M}$ ) was then added at the time indicated. a: vehicle, b: db-cAMP (1 mM)

Panel B: The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of PMA. Each column and vertical bar represent the mean and the standard deviation of 4 - 6 determinations, respectively. \*\* $P < 0.01$  vs  $0 \mu\text{M}$  db-cAMP (vehicle).

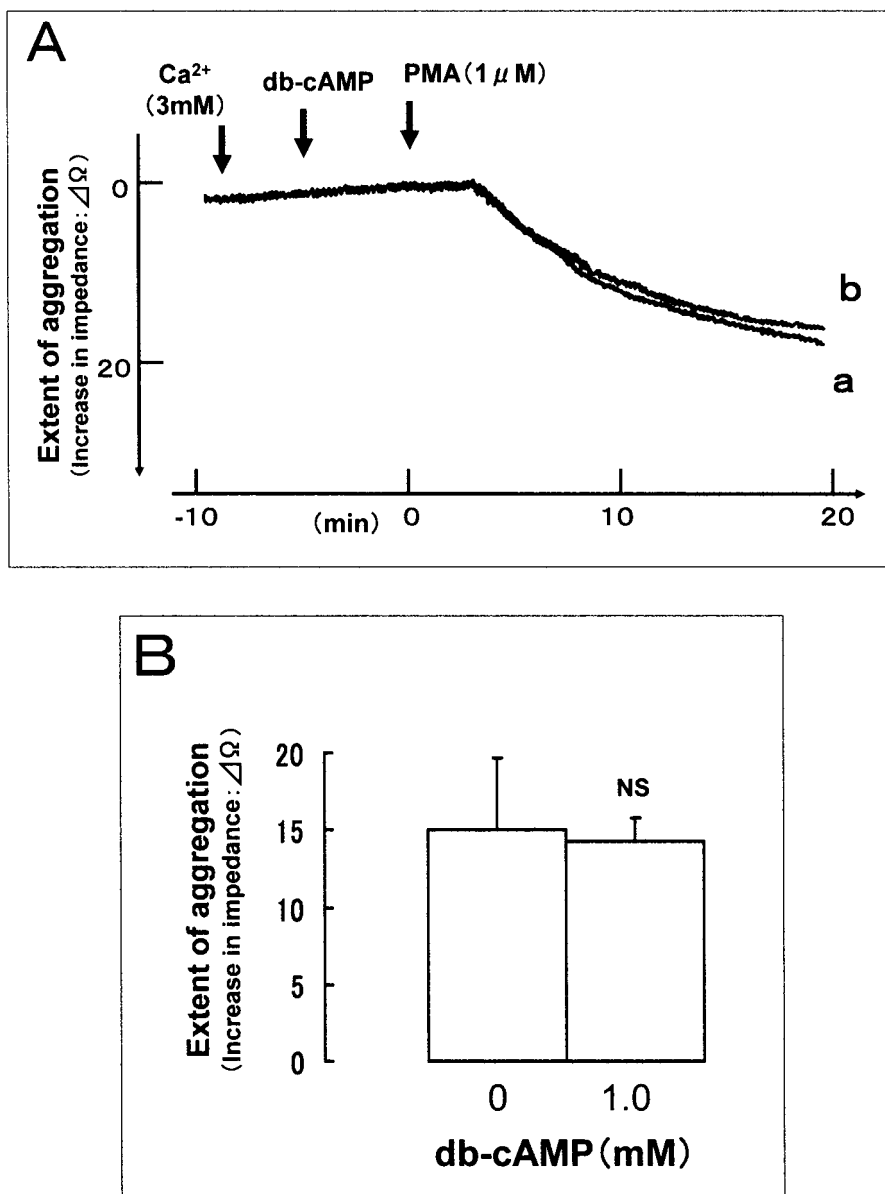


Fig. 8. Typical carp thrombocyte aggregation curves, obtained with PMA ( $1 \mu\text{M}$ ) induction (panel A), and the effect of db-cAMP treatment on PMA-induced thrombocyte aggregation (panel B).

Panel A: Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM  $\text{CaCl}_2$  (added) at  $25^\circ\text{C}$  for about 5 min in the presence of vehicle (distilled water) or db-cAMP (1 mM), and PMA ( $1 \mu\text{M}$ ) was then added at the time indicated. a: vehicle, b: db-cAMP (1 mM)

Panel B: The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of PMA. Each column and vertical bar represent the mean and the standard deviation of 3-6 determinations, respectively. NS means not significant vs  $0 \mu\text{M}$  db-cAMP (vehicle).

## 4 考 察

哺乳類血液の血小板凝集測定に繁用される「Bornの比濁法」<sup>16, 17)</sup>では、試料として多血小板血漿 (PRP) が用られる。しかし、魚類の栓球は哺乳類の血小板と異なり、血液中に存在する他の血球との比重の差が小さく、低回転速度の遠心分離のみでは簡単に赤血球や白血球等から分離することはできない。したがって、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ことから、魚類血液中の栓球凝集反応の測定には、「Bornの比濁法」よりも、試料として全血を用いる「全血凝集インピーダンス法」<sup>17, 18)</sup>の方が適していると考えられる。本研究では前報<sup>3, 4)</sup>と同様に、コイの栓球凝集とラットの血小板凝集の測定に「全血凝集インピーダンス法」を用いた。

動物細胞の機能は、ホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、ビタミン、および薬物など種々の生理活性物質により調節され、あるいは影響を受けている。これらの生理活性物質は多くの場合、細胞膜上に存在する受容体タンパク質に結合することが引き金となり、細胞膜で隔てられた細胞の内部では、種々の酵素の活性上昇や、ある種の活性物質が生成・代謝されるなどの、一連の変化が引き起こされる。そして最終的に、その細胞が保有する生理・薬理的な機能・反応が惹起される (例えば血小板ならば、凝集反応など)。これらの一連の細胞内の変化に関与・役割する物質や酵素などは細胞内情報伝達物質 (セカンドメッセンジャー) とよばれている。哺乳類の血液の血小板凝集反応に関与・役割する細胞内情報伝達物質として種々の物質が知られているが、プロスタグランジン類 (アラキドン酸カスケード生成物)<sup>19)</sup> やcAMP<sup>20)</sup> に加えて、PKC<sup>9-12)</sup> も重要であるとされている。しかしながら、魚類の栓球凝集のメカニズムにおけるPKCの関与・役割については報告がない。本研究において、PKCを活性化する物質であるPMAを用いて、コイの栓球凝集について、ラットの血小板凝集と対比させながら検討した。

コイの血液にPMAを添加すると栓球凝集が惹起されることが見出された。哺乳類の血液でみられる血小板凝集と同様に、魚類の栓球でもPKCを活性化することにより凝集反応が引き起こされるものと思われる。PKCを阻害する物質として報告されたH-7<sup>13)</sup>の前処理によって、PMAにより惹起されるコイの栓球凝集とラットの血小板凝集が、ともに抑制されたことから、PMAにより惹起される凝集はPKCの活性化を介して起こっている可能性が高いと考えられる。しかしながら、H-7は高濃度では非特異的にPKC以

外のタンパクリン酸化酵素 (キナーゼ) 類を抑制するため、他のキナーゼ類が凝集メカニズムに関与している可能性は完全には否定できない。

PMAにより惹起されるラットの血小板凝集はシクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメタシンの前処理では抑制されなかった。哺乳類の血小板におけるPMAによる凝集は別のシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるアスピリンによって抑制を受けないと報告されている<sup>9, 21)</sup>。コラーゲンにより惹起される血小板凝集の場合<sup>3)</sup>とは異なり、PMAにより惹起される血小板凝集のメカニズムには、アラキドン酸カスケード生成物であるプロスタグランジン類が関与していないことが今回のインドメタシンを用いたラットの血小板凝集実験の結果からも確認された。一方、PMAにより惹起されるコイの栓球凝集では、インドメタシンの前処理により抑制が認められたことから、われわれが既に報告したコラーゲン惹起コイ栓球凝集の場合<sup>3)</sup>と同様に、アラキドン酸カスケード生成物であるプロスタグランジン類がそのメカニズムに関与しているものと思われる。以上の様に、PMAにより惹起される凝集に関して、コイとラットの間では、その凝集メカニズムにおけるプロスタグランジン類 (アラキドン酸カスケード生成物) の関与の有無に違いが認められた。

さらに、PMAにより惹起されるラットの血小板凝集は、コラーゲンにより惹起される血小板凝集の場合<sup>4)</sup>と同様に、db-cAMPの前処理により抑制されたが、PMAにより惹起されるコイの栓球凝集はdb-cAMPにより抑制されず、コラーゲンにより惹起される栓球凝集の場合<sup>4)</sup>とは明らかに異なっていた。このことは、コイの栓球およびラット血小板の凝集反応のメカニズムにおいて、抑制性の細胞内情報伝達物質であるcAMPの関与の有無が異なっているものと考えられる。コイの栓球凝集とラットの血小板凝集において、PMAおよびコラーゲンにより惹起される凝集に対するインドメタシンおよびdb-cAMPの前処理の効果をTable. 1にまとめて示した。

Fig. 9のpanel Aに、ラット血小板のコラーゲン凝集およびPMA凝集のメカニズムを、これまで報告されているものに本研究の結果を加えて示した。「コラーゲン刺激 → アラキドン酸カスケード → トロンボキサン<sub>2</sub> → PKC活性化およびCa<sup>2+</sup>イオンの上昇 → 凝集反応」という一連のメカニズムが存在し、PKCの活性化はアラキドン酸カスケードの下流に存在する。したがって、PMAによりPKCを直接活性化した場合に惹起される凝集は、インドメタシンにより抑制を受けないものと考えられる。ま

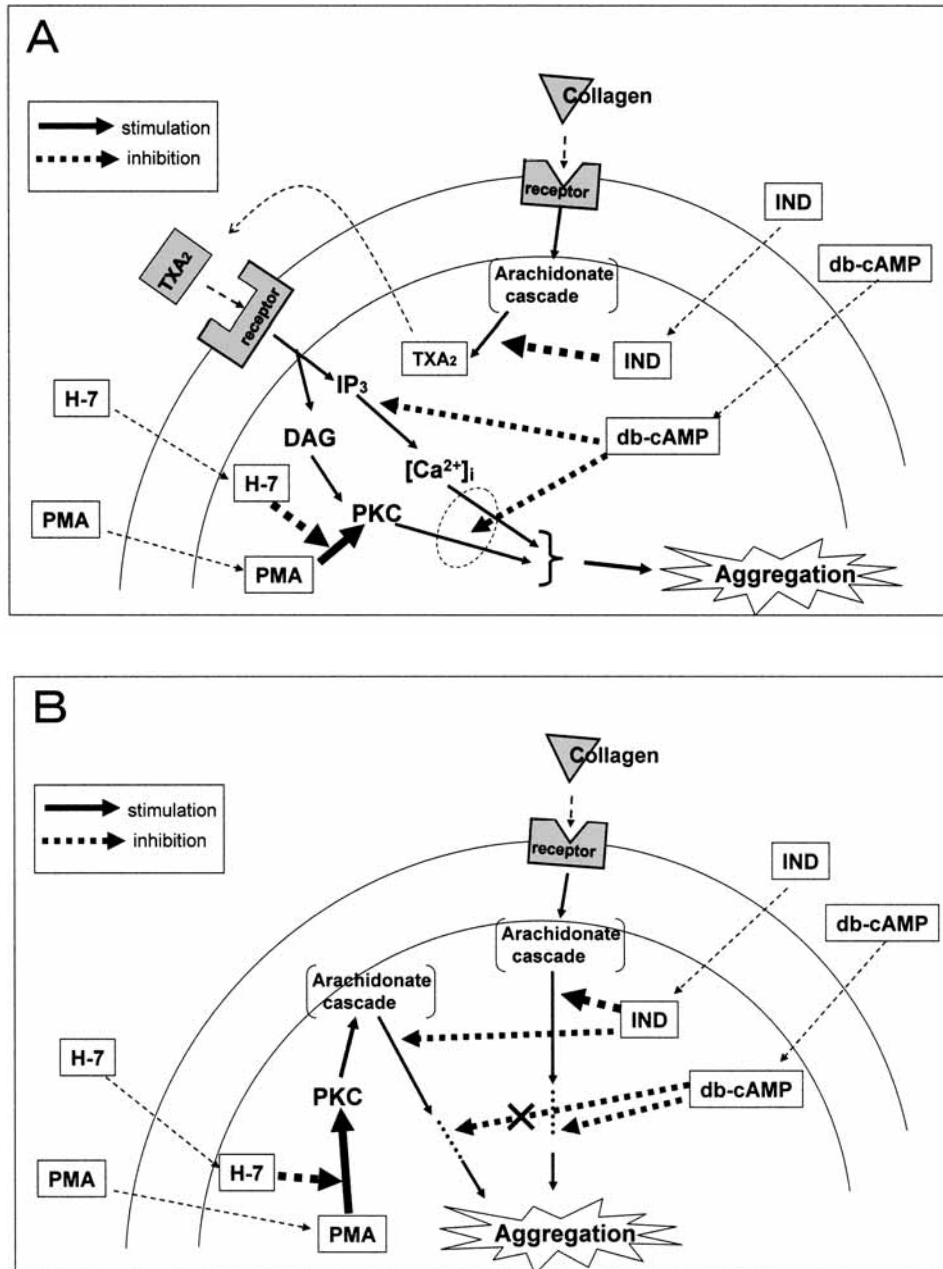


Fig. 9. Schematic presumed mechanisms of rat platelet (panel A) and carp thrombocyte (panel B) aggregations induced by PMA and collagen. Abbreviations are as follows: PMA; phorbol 12-myristate 13-acetate, H-7; 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine, IND; indomethacin, db-cAMP; dibutyryl cyclicAMP, PKC; protein kinase C, TXA<sub>2</sub>; thromboxane A<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>; inositol triphosphate, DAG; diacyl glycerol, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; intracellular free Ca<sup>2+</sup>

た, db-cAMPは最下流の「PKC活性化およびCa<sup>2+</sup>イオンの上昇 → 凝集反応」の段階に影響を与え凝集を抑制するものと考えられる。一方, コイ栓球のコラーゲンおよびPMA凝集のメカニズムについては, 本研究の結果をもとにしてFig. 9 panel Bに示すようなメカニズムが推定される。すなわち, ラットの場合同様は異なり, コラーゲン凝集とPMA凝集はそれぞれ独立したメカニズムとして存在し, 両者ともにアラキドン酸カスケードが関与していることが考えられる。ただし, アラキドン酸のプール(細胞膜の貯蔵部位)は両者で異なるため, それ以後のメカニズム経路も異なり, db-cAMPで一方は抑制され他方は抑制されないものと考えられる。

以上の様に, コイの栓球においてPMAを用いてPKCを活性化することにより凝集が惹起されること, そして, PMAにより惹起される栓球の凝集のメカニズムは, アラキドン酸カスケードおよびcAMPの関与の点において, ラットの血小板凝集のメカニズムとは異なることが明らかとなった。しかしながら, コイの血液の栓球凝集で認められたこれらの知見が魚類全体に一般化できるかどうかは今後の検討課題である。

## 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 portusjacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. *Br. J. Haematol.*, 20, 427-435 (1971).
- 3) 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).
- 4) 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。水産大学校研究報告, 52 (4), 161-164 (2004).
- 5) Y. Takai, A. Kishimoto, U. Kikkawa, T. Mori and Y. Nishizuka: Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipids-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91, 1218-1224 (1979).
- 6) M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka: Direct activation of calcium-activated, phospholipids-dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257, 7848-7851 (1982).
- 7) P. M. Blumberg, J. A. Dunn, S. Jaken, A. Y. Jeng, K. L. Leach, N. A. Sharkey and E. Yeh: Specific receptors for phorbol ester tumor promoters and their involvement in biological responses. In *Mechanisms of Tumor promotion, Vol 3* (ed. by T. J. Slaga), CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A., pp. 143-184 (1984).
- 8) E. Hecker: Isolation and characterization of cocarcinogenic principles from croton oil. *Methods Cancer*

**Table 1.** Effects of indomethacin (IND) and db-cAMP on PMA-induced or collagen-induced aggregation of carp thrombocytes or rat platelets

Inhibitor	PMA-induced aggregation		collagen-induced aggregation	
	Carp thrombocytes	Rat platelets	Carp thrombocytes	Rat platelets
IND*1	+	-	+	+
db-cAMP*2	-	+	+	+

+: inhibition, -: no effect \*1) 100  $\mu$  M, \*2) 1 mM

- Res.*, 6, 439-484 (1971).
- 9) M. B. Zucker, W. Troll and S. Belman: The tumor-promoter phorbol ester (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), a potent aggregating agent for blood platelets. *J. Cell Biol.*, 60, 325-336 (1974).
  - 10) W. Siess and E. G. Lapetina:  $Ca^{2+}$  mobilization primes protein kinase C in human platelets.  $Ca^{2+}$  and phorbol esters stimulates platelet aggregation and secretion synergistically through protein kinase C. *Biochem. J.*, 255, 309-318 (1988).
  - 11) N. Kikkawa, U. Kikkawa, K. Itoh and Y. Nisizuka: Membrane permeable diacylglycerol, its application to platelet secretion and regulation of protein kinase C. *Method Enzymol.*, 169, 430-442 (1989).
  - 12) C. S. Abrams, and M. G. Kazanietz: Platelet signaling: protein kinase C. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gresele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermylen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 272-280 (2002).
  - 13) S. Kawamoto and H. Hidaka: 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 125, 258-264 (1984).
  - 14) R. J. Gryglewski: Prostaglandin and thromboxane biosynthesis inhibitors. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 297, S85-S88 (1977).
  - 15) M. B. Feinstein and C. Fraser: Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. Inhibitor by PGE I and dibutyryl cyclic AMP. *J. Gen. Physiol.*, 66, 561-581 (1975).
  - 16) G. V. R. Born: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194, 927-929 (1984).
  - 17) P. Thiagarajan and K. K. Wu: In vitro assay for evaluating platelet function. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gresele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermylen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 459-470 (2002).
  - 18) 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).
  - 19) M. A. Packham, M. L. Rand and R. L. Kinlough-Rathbone: Aggregation. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gresele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermylen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 338-356 (2002).
  - 20) 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. Gresele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermylen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 290-303 (2002).
  - 21) 血小板活性化の生化学(日高弘義・山崎博男・大熊稔・青木延雄・蔵本淳編), 金芳堂, 京都市, pp. 93-108 (1991).