第 18 回 日本臨床薬理学会 1997 年 12 月 11~12 日 東京

レーザー光散乱を利用した凝集能の測定による 薬効評価 (II) : 白血球凝集への応用

丹 羽 雅 之^{*1} 松 野 浩 之^{*1} 小 澤 修^{*1}
植 松 俊 彦^{*1} 河 野 健 一^{*2} 長 嶋 悟^{*2}
金 丸 光 隆^{*2}

はじめに

好中球はその活性化に伴い遊走能、食食能、活性酸素種の産生、酵素放出反応の亢進と同時に凝集反応を伴うことが知られている。近年その凝集への各種接着因子の関与が明らかとなるとともに白血球の血栓形成への影響、血小板との相互作用等が注目されている。さらにヒト好中球機能は種々病態で変動し、薬物によっても多大な影響を受けることが知られ、好中球凝集能の測定は薬効評価・病態解析にも有用と考えられる。しかしながら好中球の凝集反応の解析には Bone の方法 すなわち可視光線を用いた濁度測定装置 (いわゆる血小板凝集測定装置) を用いることが多く、多くの問題点を含んでいる。最近、レーザー光を用いた散乱光測定による血小板凝集測定装置 (以下レーザー凝集測定器) が開発され、測定感度が高いこと、異なるサイズの凝集塊をモニターできることなどその有用性が評価されている¹⁾。そこで、本装置の応用として各種刺激に伴い生ずる好中球の凝集測定を試み、従来の Bone の方法と比較検

討した。

方 法

健常成人男子より静脈血をクエン酸 (3.15%, volume 10%) 採血し、155g、12 分間遠心分離を行って多血小板血漿 (PRP) を除去後、デキストラン-Ficoll 法により好中球を分離した²⁾。好中球数は Hank's balanced salt solution (HBSS) にて懸濁後セルカウンターを用いて計測した。好中球刺激物質として N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) ならびに phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用いた。好中球浮遊液 ($5 \times 10^6/\text{ml}$) に刺激剤を添加し、小粒子 ($\sim 30\mu\text{m}$, S-size)、中粒子 ($30 \sim 50\mu\text{m}$, M-size)、大粒子 ($50\mu\text{m} \sim$, L-size) のサイズの異なる凝集塊の数をレーザー凝集測定器にてモニターすると同時に、濁度の変化を透過度 (%T) として求め (Bone の方法) 比較した。なお、凝集抑制薬の実験においては、刺激剤添加 5 分前に薬物を加えた。

結 果・考 察

Protein Kinase C の活性化剤である PMA 刺激に伴い好中球は粒子径の順に凝集塊が形成されることが確認された。すなわち刺激直後より S-size、M-size、L-size

^{*1} 岐阜大学医学部薬理学
〒500-8705 岐阜市司町 40

^{*2} 志都呂クリニック

の順に凝集塊を形成した。一方、走化性因子である fMLP 刺激によっては、主に S-size ($\sim 30\mu\text{m}$) のみの凝集が観察された。いずれの刺激によっても好中球の数ならびに刺激剤の濃度に依存した凝集が観察された。本凝集は EGTA の添加により強く抑制されることから細胞外のカルシウムの存在が必須であること、PMA の不活性異性体である 4α -PMA によっては凝集がほとんど惹起されないことから、特異性の高い凝集であることが示唆された。さらに cytochalasin B 存在下 fMLP 刺激を加えることにより、fMLP 単独刺激に比べ M-size の凝集塊のみが増加したことから phospholipase D 刺激に伴う凝集は、PMA や fMLP とは凝集塊の形成状況が異なることが示唆された。一方、従来の濁度法で同様にして好中球凝集を検討したところ、PMA 刺激で最高 40% 程度、fMLP 刺激では 10-20% 程度の変動が認められたに過ぎず、特に凝集に対する抑制作用を評価するには不十分と考えられた。

ついで、レーザー凝集測定器を用い、好中球凝集に対する好中球抑制性物質の影響を検討した。fMLP 刺激にともなう好中球凝集に対し、好中球の内因性の活性化抑制物質と考えられている cyclicAMP (膜透過型の dibutyryl cyclic AMP を使用) 処置は軽度ながら用量作用的な凝集抑制作用を示した。一方、好中球の活性酸素産生阻害作用ならびに好中球アポトーシス形成を強く阻害するプロテアーゼ阻害剤 (TPCK) 処理によっては凝集抑制は認められなかった。なお、PMA 刺激による好中球凝集に対してはいずれの薬物処置によっても抑制作用は観察されなかった。

結 論

以上よりレーザー凝集測定器は血小板のみならず白血球における凝集能ならびにその抑制作用を評価する上でも優れており、

好中球機能を抑制する薬物の評価法としての有用性が示唆された。

参考文献

- 1) Tohgi H. Takahashi H. Watanabe K. Kuki H. Shirasawa Y. Development of large platelet aggregates from small aggregates as determined by laser-light scattering: effects of aggregant concentration and antiplatelet medication. *Thromb. Haemost.* 75: 838-43, 1996.
- 2) Niwa M. Al-Essa L.Y. Kohno K. Kanamori Y. Matsuno M. Abe A. Uematsu T.: The loss of rhGCSF and rhTNF- α priming effects on superoxide-generating response in exudated neutrophils is associated with decrease of their receptors affinities. *J. Immunol.* 157: 4147-4153, 1996.