貪食白血球により産生される食作用促進因子

石橋芳雄・山下辰久*

The phagocytosis-stimulating factor produced by phagocytosing neutrophils The extract obtained from phagocytosing neutrophils enhanced the phagocytic activity of neutrophils. The generation of phagocytosis-stimulating factor (PSF) by neutrophils reached the maximum at 60 min after the start of phagocytosis. The PSF activity was found in a Sephadex G-100 fraction containing molecular weight of approximately 18,000 daltons. PSF was stable to heating at 80°C for 30 min but destroyed completely at 100°C for 30 min. PSF was inactivated by tryptic or chymotryptic digestion, indicating its protein nature. PSF was present in the granular fraction of phagocytosing neutrophils, and the generation of this factor was inhibited by cytochalasin B and colchicine, but not by cycloheximide, suggesting that the generation of PSF by neutrophils would result from the activation of PSF-precursor in the granules through the fusion of phagosomes with lysosomes.

Yoshio Ishibashi・Tatsuhisa Yamashita
Laboratory of Physiological Chemistry Juntendo, University

好中球は、炎症応答において重要な役割を演じており、好中球の食作用は走化性とならんでもっとも重要な機能の一つである。炎症応答に介在するメディエータは数多く知られており、さらに近年、好中球から産生される物質が好中球の走化性^{1,2)}あるいはリンパ球の幼若化³⁾に影響を及ぼし、炎症応答を調節することが多数報告されているが、好中球の食作用に関与するものはほとんど知られていない。

筆者らは、新たに炎症応答を調節する因子として、貪食白血球により産生され、好中球の食作用を促進する因子—phagocytosis-stimulating factor (PSF)—の存在を見だし、その作用および分子的性状などについて検討した。

材料と方法

(1) 好中球の調製

好中球は Yamashita⁴⁾らの方法により得られた。すなわち、グリコーゲン刺激により得られたモルモット腹腔滲出液を低張処理により混在した赤血球を除去した後、ハンス液 (HBSS) で2回洗浄したものをを用いた。

(2) 食作用促進因子 (PSF) の調製

好中球浮遊液 $1 \times 10^7/\text{ml}$ に同種新鮮血清によりオプソニン化した zymosan を 1 mg/ml の割合に加え 37°C で培養し、一定時間後に HBSS で洗浄した後、貪食白血球を超音波破碎し、その上清を PSF を含む粗抽出液とした。

(3) 食作用の測定

食作用の測定は monolayer を用いて行った。すなわち、20% 不活化血清を含む HBSS に懸濁した好中球 2×10^6 をガラス試験管 ($15 \times 120 \text{ mm}$) に入れ、 37°C 60 分間放置後、HBSS で洗浄して非付着細胞を除去することによって monolayer を作製し、これに zymosan を 2×10^6 加え全量を 1 ml とし、 37°C の恒温水槽中で食菌させ、一定時間後にその一滴を血算盤にとり、食細胞外の zymosan の数を測定して食菌率を求めた。

(4) PSF のゲル濾過

粗抽出液を PBS (pH 7.2) で平衡にした Sephadex G-100 のカラム ($2.5 \times 45 \text{ cm}$) にかき、PBS で 10 ml/hr の流速で流出させた。これを 2.0 ml ずつに分画し、各分画ごとに 280 nm の吸収を測定した。なお分子量マーカーとしてウシ血清アルブミン (分子量 67,000)、卵白アルブミン (分子量 45,000) およびミオグロビン (分子量 17,800) を用いた。

(5) 酵素に対する感受性

種々の酵素による PSF の処理は Cahall⁵⁾らの方法を用いて行った。すなわち、 80°C 30 分間の熱処理を行った粗抽出液に $250 \mu\text{g/ml}$ のトリプシンあるいはキモトリプシンを加え、それぞれ pH 8.6、pH 8.0 で 37°C 10 時間反応させた後、2倍量の Soybean trypsin inhibitor を加えて反応を止めた。

また、ノイラミナーゼ処理は、抽出液に $250 \mu\text{g/ml}$ のノイラミナーゼを加え、 37°C 10 時間反応させた後、 56°C 30 分間の熱処理で反応を止めた。DNase および RNase 処理は、抽出液に $60 \mu\text{g/ml}$ の DNase あるいは RNase をそれぞれ加え、 27°C 10 時間反応させて行っ

* 順天堂大学医学部生理化学教室

表 1 effect of the neutrophil extract on phagocytosis by neutrophils

	zymosan opsonization	phagocytosis (%)	
		10 min	60 min
control	+	16.6 ± 3.29	57.4 ± 2.99
	-	5.2 ± 0.40	5.4 ± 2.80
extract-treated neutrophils	+	34.1 ± 4.10	57.8 ± 3.32
	-	5.8 ± 0.53	7.3 ± 1.40

表 2 enzyme sensitivity of phagocytosis-stimulating factor

	sensitivity
trypsin	+
chymotrypsin	+
neuraminidase	-
DNase	-
RNase	-

た。

(6) 細胞成分画分

細胞成分画分は、Cohn⁶⁾らの方法を用いて行った。すなわち、0.34 M sucrose に懸濁した貪食白血球をホモジナイズし、遠心操作により細胞を核成分、顆粒成分、膜成分および細胞質成分の4成分に分画した。

結果と考察

(1) 粗抽出液による好中球の食作用促進効果

オプソニン化した zymosan を用いて食作用の測定を行った場合、粗抽出液存在中での食作用は初速度において顕著な促進効果が認められた。しかしながらオプソニン化していない zymosan を用いて食作用の測定を行った場合、食作用促進効果は認められなかった(表1)。

このことより、粗抽出液下に含まれる PSF は、オプソニンによって介在される好中球の食作用を促進することが示された。

(2) 貪食白血球による PSF 産生の time course

貪食していない好中球の抽出液では PSF 活性は認められなかった。これに対して貪食白血球の抽出液には貪食の時間に伴い、PSF 活性が認められ、その促進効果は60分間でもっとも強く、120分間貪食した好中球の抽出液では逆にその活性は低下した(図1)。この120分間貪食による PSF 活性の低下は、好中球に含まれる lysosomal enzyme による PSF の分解か、あるいは inhibitor によるものであらうと考えられる。

(3) PSF の分子的性状の検討

粗抽出液を Sephadex G-100 を用いてゲル濾過したと

図 1 the time course of the generation of phagocytosis stimulating factor by neutrophils

ころ、PSF 活性は分子量約 18,000 の分画に単一のピークとして認められた。

また、PSF は 80°C 30 分間の熱処理に対しても安定であったが、100°C 30 分間の熱処理により完全に失活した。さらに PSF の種々の酵素に対する感受性を調べたところ、PSF はトリプシンおよびキモトリプシン処理により完全に失活したが、ノイラミナーゼ、DNase および RNase 処理に対しては安定であった(表2)。

このことより、PSF は分子量約 18,000 の比較的熱に安定な蛋白であることが示された。

(4) PSF 産生機序の検討

貪食白血球による PSF 産生の機序について検討した。まず、蛋白合成阻害剤である cycloheximide (20 μg/ml) 処理によっても PSF の産生は阻害されないことから、先に述べた60分間という短時間で PSF が産生されるという結果と考え合わせて、PSF の産生は新たな蛋白合成によるものではなく、おそらく PSF 前駆体の活性化によるものであらうと考えられる。また、食作用の阻害剤である cytochalasin B (5 μg/ml) あるいは微小管形成の阻害剤⁷⁾である colchicine (10⁻⁶M) 処理によって PSF の産生が阻害されることから、PSF の産生には好中球が貪食する過程と、phagosome と lysosome の微小管による translocation の二つの過程が必要であることが示唆された。

さらに、貪食白血球内で産生された PSF の細胞内局在性について検討したところ、貪食白血球の顆粒分画にもっとも強い PSF 活性が認められることから、PSF の産生機序は貪食白血球の phagosome と lysosome の fusion を介して granule に存在する PSF 前駆体が活性化されることによるものと考えられる。

PSF の生理的役割は、おそらく炎症局所に滲潤し、異物を貪食した好中球から PSF が産生され、この PSF が好中球に対する feed back activator として働き、炎症応答を調節しているものと思われ、PSF の分子的性状およびその生理作用を調べることは炎症応答の分子的調節

機構を解明するうえで、重要な手掛りを与えるものと考ええる。

文 献

- 1) Spilberg, I., et al.: J. Lab. Clin. Med. 85: 631-636, 1975.
- 2) Gordon, L.I., et al.: J. Clin. Invest. 64: 226-232, 1979.
- 3) Yoshinaga, M., et al.: J. Immunol. 124: 94-99, 1980.
- 4) Yamashita, T., et al.: Cryobiology. 14: 112-117, 1979.
- 5) Cahall, D.L., et al.: Infect. Immun. 12: 841-850, 1975.
- 6) Cohn, Z.A., et al.: J. Exp. Med. 112: 983-1004, 1960.
- 7) Malawista, S.E., et al.: J. Clin. Invest. 46: 786-796, 1967.