ヒト末梢血好中球からの血小板活性化因子産生に及ぼす プロスタグランジン E_1 の影響

市川裕三・溝口靖紘・木岡清英・小林絢三^{*1)}、留河キヨ子・森沢成司^{*2)}、山本祐夫^{*3)}

Effect of prostaglandin E_1 on the production of platelet-activating factor from human neutrophils

We examined the effect of prostaglandin E_1 (PGE_1) on the production of platelet-activating factor (PAF) from human neutrophils. PGE_1 was shown to significantly suppress the production of PAF from human neutrophils in a dose-dependent manner.

This result suggests that PGE_1 may have some influence on an inflammatory or immunological reaction by the suppression of PAF production.

Yuzo Ichikawa・Yasuhiro Mizoguchi・Kiyohide Kioka・Kenzo Kobayashi^{*1)},

Kiyoko Tomekawa・Seiji Morisawa^{*2)}, Sukeo Yamamoto^{*3)}

^{*1)} The Third Department of Internal Medicine

^{*2)} The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School

^{*3)} Osaka Socio Medical Center Hospital

key words: platelet-activating factor, prostaglandin E_1 , human neutrophils

血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF) は、炎症反応の誘導や免疫応答の調節に関与する chemical mediator であり¹⁾、血小板活性化作用²⁾のみでなく、血管透過性の亢進³⁾、好中球およびマクロファージの凝集や脱顆粒などの促進⁴⁾を促す活性を示す。また、PAF は、平滑筋収縮作用⁵⁾、血圧降下作用⁶⁾などを示し、臨床的には気管支喘息をはじめとするアレルギー性疾患、エンドトキシンショック、消化管出血などの多彩な病態に関与する可能性が示唆されている⁷⁻⁹⁾。

最近、PAF と他の炎症反応や免疫反応に係わる chemical mediator との関連が注目され、leukotriene C_4 (LTC_4) が血管内皮細胞からの PAF 産生を増強すること¹⁰⁾、また、PAF による好中球の凝集反応や放出反応の一部は、 LTB_4 や 5-HETE の産生を介することなどが示唆されている¹¹⁾。このように、アラキドン酸代謝のリポキシゲナーゼ系産物と PAF の関係については検討されているが、シクロオキシゲナーゼ系の代謝産物である prostaglandin (PG) と PAF の関係については、ほとんど研究されていない。

筆者らは、ヒト末梢血好中球を用い、 PGE_1 の PAF 産生に及ぼす影響を調べて PG と PAF の関係を検討した。

方 法

(1) ヒト末梢血好中球の分離

ヒト末梢血からの好中球の分離は、以下に述べる方法

により行った。すなわち、肘静脈からヘパリン加静脈血 20 ml を採取し、3% デキストランを含む生理食塩水 40 ml を加えて、120分間静置した。その後、白血球層を分離して Ficoll-Conray 重層遠心法によって好中球を含む分画を分取した。このようにして得た好中球を Hanks' 液にて1回、Tyrode 液にて1回遠心洗浄したあと、Tyrode 液に浮遊させて細胞濃度を 2×10^6 cells/ml に調整した。

(2) 好中球からの PAF 産生誘導と抽出

上述のようにして調製した好中球浮遊液に種々の濃度の PGE_1 を加えて 37°C で一定時間培養したあと、calcium ionophore (CaI) A 23187 (Sigma 社) $1 \mu\text{g/ml}$ を加えて、 37°C で10分間培養した。 PGE_1 としては小野薬品工業より供与された G-511 を用いた(図1)。培養後、2.5倍容の氷冷メタノールおよび1.5倍容の蒸留水を加えて反応を停止させた。これを超音波処理したあと、Pinckard ら¹²⁾の方法に準じてメタノール：クロロホルム：水 (10:19:26 V/V) で抽出し、クロロホルム層を採取した。このクロロホルム層を窒素ガス存在下で蒸発乾固し、2 ml のエタノールに溶解して、PAF 活性測定用の試料とした。

(3) PAF 活性の測定

PAF 活性の測定は、モルモット洗浄血小板の凝集を用いるバイオアッセイによって行った。すなわち、Benveniste ら¹³⁾の方法に準じて、モルモット洗浄血小板浮遊液を調製したあと、adenosine diphosphate (ADP) および thromboxane (TXA_2) による血小板凝集を除外するため、creatine phosphate, creatine phosphokinase および indomethacin を洗浄血小板に添加した。

^{*1)} 大阪市立大学医学部第三内科教室

^{*2)} 同 第一生化学教室

^{*3)} 大阪社会医療センター

図1 chemical structure of prostaglandin E₁

その後、洗浄血小板に PAF 標準品または PAF 活性測定試料を加えて最大凝集率を測定した。標準品の最大凝集率から標準曲線を作成しておき、これをもとに PAF 活性測定試料中の PAF 濃度を決定した。

(4) 統計学的検討

実験データの統計処理は Student's t-test を用いて行った。

結果

(1) PGE₁ の PAF 産生に及ぼす影響

ヒト末梢血好中球に各種濃度の PGE₁ を加えて 30 分間培養した。培養後、CaI A 23187 を加えて 10 分間培養し、PAF 産生量を測定した。その結果、図 2 に示すように、PGE₁ 0.01, 0.1, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ を加えて培養した場合の PAF 産生は、非添加の場合にくらべて、それぞれ $86.5 \pm 5.3\%$ ($P < 0.05$), $77.8 \pm 6.1\%$, $67.3 \pm 11.1\%$, $57.1 \pm 10.9\%$ ($P < 0.01$) ($n=5$) であり、いずれも有意な低下を認めた。つぎに、ヒト末梢血好中球を 1 $\mu\text{g/ml}$ の PGE₁ 存在下または非存在下で、一定時間培養後、CaI を添加して培養し産生される PAF 活性の変化を検討した。

その結果、図 3 に示すように、PGE₁ を添加して 30 分間培養した場合にもっとも強く PAF 産生は抑制され、それ以上培養した場合、PGE₁ 添加群と非添加群の PAF 産生量の差は減少していくことが認められた。なお、実験に使用した濃度の PGE₁ を先に述べた方法にて、メタノール：水：クロロホルム抽出して得られたサンプルは、PAF 標準品による血小板凝集に影響を及ぼさなかった。

考察

PGE₁ は、血管拡張作用¹⁴⁾、細胞保護作用¹⁵⁾などのほかに、抗炎症作用や免疫抑制作用¹⁶⁾を有することが報告されている。

今回、筆者らは、PGE₁ が、炎症反応や免疫応答の mediator である PAF の産生を濃度依存的に抑制することを示した。LT が PAF の産生を増強し、PAF が LT の産生を増強することから、LT と PAF の間には positive feedback loop が存在することが示唆されるが、今回の結果より PGE₁ は PAF 産生を negative に制御

図2 effect of PGE₁ on PAF production

PGE₁ significantly suppressed the production of PAF from human neutrophils dose-dependently.

図3 effect of PGE₁ on PAF production

PGE₁ (1 $\mu\text{g/ml}$) most significantly suppressed the production of PAF from human neutrophils when incubated for 30 min.

することにより、炎症反応を修飾する可能性が考えられた。

しかし、有意な PAF 産生の抑制がみられる PGE₁ の濃度は、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以上と高濃度であり、今回観察された PGE₁ の作用は、生理作用よりむしろ薬理作用であると考えられた。PGE₁ の PAF 産生抑制の機序については明らかではない。

ionophore 刺激による PAF 産生の過程で、Ca²⁺ の細胞内流入による phospholipase A₂ の活性化が重要な役割を果たすと考えられている¹⁷⁾。PGE₁ は、cAMP の上昇を介して細胞内 Ca²⁺ 濃度に変化を起こすことが報告されており¹⁸⁾、今回観察された PAF 産生の抑制も、このような細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化によるものかもしれない。また、30 分間の培養によってもっとも強く PAF 産生が抑制されるという点については、PGE₁ が培養 30 分以上になると代謝分解されてしまう可能性や、PGE₁ によって引き起こされる細胞内変化が、30 分以上になると回復する可能性が考えられるが、この点については今後

検討を要する。

いずれにせよ、PGE₁ が PAF 産生を抑制するという今回の結果は、PAF とアラキドン酸カスケードの関係や、その炎症反応における動態を調べるうえで、興味ある知見であると考えられる。

文 献

- 1) 井上圭三：炎症と血小板活性化因子。代謝 23: 891-899, 1986.
- 2) Benveniste, J., Henson, P.M., Cochrane, C.G.: Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelet. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. J. Exp. Med. 136: 1356-1377, 1972.
- 3) Humphrey, D.M., McManus, L.M., Satouchi, K., Hanahan, D.J., Pinckard, R.N.: Vasoactive properties of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and analogues. Lab. Invest. 46: 422-429, 1982.
- 4) Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Fervigni, K.S., McManus, L.M., Hanahan, D.J.: Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-*sn*-glyceryl-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor). J. Immunol. 127: 1250-1257, 1981.
- 5) Findlay, S.R., Lichtenstein, L.M., Hanahan, D.J., Pinckard, R.N.: Contraction of smooth muscle by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. Am. J. Physiol. 241: C130-137, 1981.
- 6) Blank, M.L., Snyder, F., Byers, L.W., Brooks, B., Muirhead, E.E.: Antihypertensive activity of an alkyl ether analogue of phosphatidylcholine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 1194-1204, 1979.
- 7) Morley, J., Page, C.P., Sanjar, S.: Pulmonary responses to platelet-activating factor. Prog. Resp. Res. 19: 117-123, 1985.
- 8) Terashita, Z., Imura, Y., Nishikawa, K., Sumida, S.: Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxin shock?. Eur. J. Pharm. 109: 257-261, 1985.
- 9) Rosam, A., Wallace, J.L., Whittle, J.R.: Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach. Nature 319: 54-56, 1986.
- 10) McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M.: Leukotrienes C₄ and D₄ stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2204, 1986.
- 11) Alice, H.L., Morton, D.R., Gorman, R.R.: Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine stimulates leukotriene B₄ synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest. 70: 1058-1065, 1982.
- 12) Pinckard, R.N., Farr, R.S., Hanahan, D.J.: Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released *in vivo* during IgE anaphylaxis with PAF released *in vitro* from IgE sensitized basophils. J. Immunol. 123: 1847-1857, 1979.
- 13) Camussi, G., Mencia-Huerta, J.M., Benveniste, J.: Release of platelet-activating factor and histamine. I. Effect of immune complexes, complement and neutrophils on human and rabbit mastocyte and basophils. Immunology 33: 523-534, 1977.
- 14) Weeks, J.R., Sekhar, N.C., Ducharme, D.W.: Relative activity of prostaglandin E₁, A₁, E₂ and A₂ on lipolysis, platelet aggregation, smooth muscle and the cardiovascular system. J. Pharm. Pharmac. 21: 103-108, 1968.
- 15) Robert, A., Nezamis, J.E., Phillips, J.P.: Effect of prostaglandin E₁ on the gastric secretion and ulcer formation in the rat. Gastroenterol. 55: 481-487, 1968.
- 16) Louis, M.P., Helen, R.S.: Prostaglandin and the immune response. Life Science 20: 903-914, 1977.
- 17) Chilton, F.H., Ellis, J.M., Olson, S.C., Wykle, R.L.: 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. J. Biol. Chem. 259: 12014-12019, 1984.
- 18) Feinstein, M.B., Egan, J.J., Sha'afi, R.I., White, J.: The cytoplasmic concentration of free calcium in platelets is controlled by stimulators of cAMP production (PGD₂, PGE₁, forskolin). Biochem. Biophys. Res. Commun. 113: 598-604, 1983.