α_1 プロテアーゼインヒビターの好中球遊走能に与える影響

——好中球リクルーメントにおける調節機序に関する考察——

青 柴 和 徹*

Effect of alpha-1-proteinase inhibitor on chemotaxis and chemokinesis of polymorphonuclear leukocytes: Its possible role in regulating PMN recruitment in humans

We examined the effects of alpha-1-proteinase inhibitor (α_1 -Pi) in physiological concentrations on polymorphonuclear leukocyte (PMN) migration *in vitro* using the multiple blind well assay system.

Alpha-1-proteinase inhibitor had both stimulatory and inhibitory effects on cell migration depending on its concentration. The inhibitor was active in 1) inducing directed locomotion (chemotaxis) in concentrations of 0.02, 0.2 mg/ml and non-directed locomotion (chemokinesis) in concentrations of 0.02, 0.2 and 2 mg/ml, with maximum potency in both cases at 0.2 mg/ml (corresponding to the normal alveolar surface level in the lung), but 2) inhibiting chemotactic responsiveness to known chemoattractants at 2 and 10 mg/ml (corresponding to normal and inflammatory blood levels, respectively) in order of potency.

These results suggest that α_1 -Pi may play a unique role in regulating inflammatory processes especially in the lung, through its stimulatory and inhibitory effects depending on its concentration.

Kazutetsu Aoshiba*

key words: alpha-1-proteinase inhibitor, chemotaxis, chemokinesis, leukocyte migration, polymorphonuclear leukocyte

血液中より組織内への好中球浸潤は、炎症を特徴づける基本的病態の一つである。好中球遊走因子として、細菌、補体、炎症細胞などに由来する種類の化学伝達物質が知られているが¹⁾、炎症部位への好中球リクルーメントが生体内でいかに調節、制御されているかについては不明である。

近年、好中球細胞膜に存在するセリンプロテアーゼの活性化が活性酸素産生、内皮細胞への粘着および遊走運動の発現に重要であること、さらにプロテアーゼインヒビターの処理により、これら細胞機能が抑制されることが指摘されているが²⁻⁴⁾、その生理学的意義は十分に理解されていない。

今回、筆者らは、生体内に広く存在するセリンプロテアーゼインヒビターである α_1 プロテアーゼインヒビター(α_1 -Pi)に注目し、生体内に存在する種々の濃度の α_1 -Pi により好中球遊走能がいかに影響を受けているかを検討した。さらに、その成績に基づき、 α_1 -Pi が炎症部位への好中球リクルーメントを調節することにより炎症過程を修飾している可能性について考察した。

方 法

ヒト α_1 Pi (血清より抽出)、ヒト recombinant C5a, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) ヒト recombinant tumor necrosis factor α (TNF α), phorbol myristate acetate (PMA), L-1-tosylamide-2-phenylethyl-chloromethyl ketone (TPCK), N- α -p-tosyl-1-lysine-chloromethyl ketone (TLCK), superoxide dismutase (SOD, ウシ赤血球より抽出)は、いずれも Sigma 社 (St. Louis, Mo) から購入した。

(1) α_1 -Pi 純度の検討

ヒト血清より抽出された市販 α_1 -Pi 製剤 (Sigma 社) の純度を検定する目的で、その一部試料をカラムクロマトグラフィーにて分析した。すなわち、実験に使用した α_1 -Pi 試料を生食に溶解 (10 mg/ml) したのち、G 2000 SWL カラム (7.6 $\times$ 300 mm) 2 本に充填し、0.1 M PBS + 0.25 M NaCl (pH 6.8) 1 ml/min で溶出した。

(2) 好中球分離

健常者 6 人より採血 (EDTA 添加) し、デキストラン (分子量 5,000,000) 添加後室温にて 45 分間静置し、赤血球を除去したのちに、percoll discontinuous gradient にて静かに重層、10 分間 400 g にて遠沈して好中球分画を得た。好中球はアルブミン (1 mg/ml) を加えた HEPES 緩衝液に浮遊し、 2×10^6 個/ml に調整後、緩衝液のみ、または α_1 -Pi (0.02, 0.2, 2, 10 mg/ml), TPCK (2, 5, 25, 50 μ M), TLCK (10, 50, 250, 500 μ M) と室温下に

* Department of Medicine 1, Tokyo Women's Medical College 東京女子医科大学第一内科学教室

て30分間インキュベートした。インキュベート後の好中球生存率は、トリパンブルー法で95%以上であり、細胞膜破壊の指標となる細胞浮遊液上清中 LDH 活性も上昇していないことを確認した。

(3) 好中球遊走能の測定

好中球遊走能は48穴マイクロモタキンスチャンパー(Neuroprobe®)を用い、Fall らの方法⁵⁾に準じて行った。すなわち、チャンパーの上室(50 μ l)にはプロテアーゼインヒビターで処理した好中球浮遊液(2×10^6 /ml), 下室(25 μ l)には実験の目的に応じて化学遊走物質あるいは α_1 -Pi を入れ、両室をポリカルボネートフィルター(PVP-free, Neuroprobe®)で境したあと、37°C 5% CO₂ 下に30分間インキュベートを行った。フィルターをDiff Quick 液(国際試薬®)にて固定染色したあと、フィルター下面に遊走した細胞数を1,000倍率のもと顕微鏡で5視野数え、その平均値を求めた。実験項目はつぎの二つにわけた。

① プロテアーゼインヒビターが、化学遊走物質による chemotaxis に影響を与えるか。

チャンパーの上室には各種濃度の α_1 -Pi(0.02, 0.2, 2, 10 mg/ml), TPCK(2, 5, 25, 50 μ M), TLCK(10, 50, 250, 500 μ M)溶液あるいはこれらインヒビターを添加しない溶液中に好中球を浮遊させ、下室には化学遊走物質としてfMLP(10^{-7} M), C5a(10^{-7} M), TNF α (10/ml), PMA(10^{-9} M)を入れた。プロテアーゼインヒビターの効果は、インヒビターを添加していない好中球遊走数に対する比率(%)として求めた。

② α_1 -Pi 自体の好中球遊走作用

Checkerboard 法⁶⁾により α_1 -Pi が好中球に対し、chemotaxis(α_1 -Pi 濃度勾配に沿った方向性のある運動)または chemokinesis(濃度勾配が存在しないときの方向性を持たない運動)作用を示すか否かについて検討した。すなわち、緩衝液のみまたは α_1 -Pi(0.02, 0.2, 2, 10 mg/ml)をチャンパーの上・下室に入れ、異なる濃度勾配を作製し、遊走数を数えた。結果は、両室に α_1 -Pi を含まないチャンパーの遊走数に対する比率(%)として求めた。

なお、活性化好中球からスーパーオキシドが産生され、 α_1 -Pi が酸化されることにより遊走能が変化した可能性を否定するために、好中球浮遊液に SOD(0.2 mg/ml)を加えて上記と同様の実験

図1 市販 α_1 -Pi 製剤(Sigma 社)の純度の検討
G 2000 SWL カラムクロマトグラフィーの結果を示す。

を併せて行った。

(4) 統計解析

結果は mean $\pm$ SE としてあらわし、Wilcoxon-Signed-rank test で $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

(1) α_1 -Pi 純度

カラムクロマトグラフィーにて市販の α_1 -Pi 製剤中には95%以上の高純度で α_1 -Pi が含まれていた(図1)。同剤中には37 mg/mg の微量アルブミンが含まれていたが、最終的に 1 mg/ml のアルブミンを加えた HEPES 液に溶解後実験に用いたため、混入アルブミンが実験結果に及ぼす影響は無視しうると考えられた。

(2) プロテアーゼインヒビターの化学遊走物質による chemotaxis に対する影響

α_1 -Pi, および合成プロテアーゼインヒビターである TPCK, TLCK は、fMLP(10^{-7} M), C5a(10^{-7} M), TNF α (1 u/ml)および PMA(10^{-9} M)による chemotaxis を濃度依存性に抑制した(図2)。 α_1 -Pi の場合、各遊走物質による chemotaxis は、2, 10 mg/ml で濃度依存性に抑制されたが(抑制率: 2 mg/ml, 41~61%, 10 mg/ml, 44~91%), 0.02, 0.2 mg/ml では有意な変化は認められなかった。

(3) α_1 -Pi 自体の好中球遊走活性

(1) chemokinesis: Checkerboard (表1)において上下室濃度差のない A₁₋₄ の遊走数は chemoki-

nesis をあらわしている。A₁(0.02 mg/ml), A₂(0.2 mg/ml), A₃(2 mg/ml)の遊走数はコントロール A に比較して有意に増加しており、その程度は A₂>A₁≒A₃ であったことから、0.02, 0.2, 2 mg/ml の α₁-Pi は、好中球の chemokinesis を促進させ、その活性は 0.2 mg/ml においてもっとも高度であり、0.02 mg/ml と 2 mg/ml ではほぼ同等であることが知られた。一方、A₄の遊走数はコントロールと同様の値を示すことから、10 mg/ml では chemokinesis 活性がないことが示された。

② chemotaxis: 上下室間に濃度勾配を有するチャンバーの遊走数は chemotaxis 活性を反映す

図2 プロテアーゼインヒビターの化学遊走物質による chemotaxis に対する影響

A: α₁-Pi. B: TPCK. C: TLCK

α₁-Pi は、2 mg/ml および 10 mg/ml では濃度依存性に chemotaxis を抑制したが(P<0.05), 0.02 mg/ml および 0.2 mg/ml では変化を認めなかった。

る。表における遊走数を比較すると B(上室 0 mg/ml, 下室 0.02 mg/ml)は B'(上室 0.02 mg/ml, 下室 0 mg/ml)より高値を示し、同様に C(上室 0 mg/ml, 下室 0.2 mg/ml)は C'(上室 0.2 mg/ml, 下室 0 mg/ml)より高値であることから、0.02, 0.2 mg/ml の α₁-Pi には chemotaxis 活性のあることが知られた。さらに、F(上室 0.02 mg/ml, 下室 0.2 mg/ml)は F'(上室 0.2 mg/ml, 下室 0.02 mg/ml)に比して高値を示した。chemokinesis 活性は 0.02 mg/ml よりも 0.2 mg/ml のほうが高度であることから、上記 F>F'の結果は chemokinesis 活性の差に基づくものではなく、chemotaxis 活性が 0.02 mg/ml に比し、0.2 mg/ml により強いことを示唆している。

一方、D(上室 0 mg/ml, 下室 2 mg/ml), D'(上室 2 mg/ml, 下室 0 mg/ml)間、および E(上室 0 mg/ml, 10 mg/ml), E'(上室 10 mg/ml, 下室 0 mg/ml)間の遊走数には差がないことから、2 および 10 mg/ml では chemotaxis 活性がないことが知られた。

以上の結果は、SOD にて処理した好中球においても、同様であった。

チャンバーの下室に 0.2 mg/ml α₁-Pi または 10⁻⁷M fMLP を入れた際の遊走細胞数の絶対値

表 1 α_1 -Pi 自体の好中球遊走活性の検討(Checkerboard 法)

		upper well(mg/ml)				
lower well(mg/ml)	0(buffer)	0(buffer)	0.02	0.2	2	10
		100A	135 $\pm$ 19B'	183 $\pm$ 40C'	112 $\pm$ 40D'	68 $\pm$ 20E'
	0.02	216 $\pm$ 40B	251 $\pm$ 65A ₁	333 $\pm$ 97F'	237 $\pm$ 47E'	158 $\pm$ 59
	0.2	787 $\pm$ 280C	948 $\pm$ 291F	977 $\pm$ 288A ₂	878 $\pm$ 277	792 $\pm$ 227
	2	195 $\pm$ 45D	253 $\pm$ 64	294 $\pm$ 56	222 $\pm$ 33A ₃	190 $\pm$ 55
	10	83 $\pm$ 28E	119 $\pm$ 38	159 $\pm$ 42	143 $\pm$ 37	125 $\pm$ 51A ₄

P<0.05 : A vs A₁₋₃, B vs B', C vs C', F vs F'

not significant: A vs A₄, D vs D', E vs E'

は、それぞれ160 $\pm$ 30.5 個/視野, 98.5 $\pm$ 20.2 個/視野(P<0.05)であり, 0.2 mg/ml α_1 -Pi の chemotaxis 活性は10⁻⁷M fMLP のそれを上回るものと考えられた。

考 察

α_1 -Pi は、0.02~10 mg/ml の範囲において濃度に応じて好中球遊走能に異なった影響を与えることが示された。すなわち、低濃度域では chemokinesis (0.02, 0.2, 2 mg/ml) と chemotaxis (0.02, 0.2 mg/ml)を誘導し、その活性はともに0.2 mg/ml において最大であった。一方、高濃度域(2, 10 mg/ml)においては、濃度依存性に化学遊走物質による好中球 chemotaxis を抑制した。

高濃度域の α_1 -Pi による chemotaxis 抑制作用については、合成プロテアーゼインヒビターである TPCK, TLCK でも同様に抑制したことから、その抗プロテアーゼ活性が関与しているものと考えられる。非特異的な細胞障害による可能性も考えられるが、好中球を最大濃度(10 mg/ml)の α_1 -Pi でインキュベートしたあともトリパンブルーによる生存率および細胞上清 LDH 活性に変化がないことから、否定的である。

一方、抗プロテアーゼ活性の失われた酸化型、あるいはエラスターゼ結合型の α_1 -Pi に chemokinesis, chemotaxis 活性のあることが知られている^{7,8)}。したがって、筆者らの研究でみられた低濃度域の α_1 -Pi による好中球遊走能活性化の機序には、抗プロテアーゼ活性の関与は少ないと考えられる。

本研究の成績は、従来報告と一部異なっている。従来報告は、筆者らの用いた α_1 -Pi 濃度に比しより低濃度について検討したものであるが、

本研究で示されたごとく α_1 -Pi は濃度に応じて異なる作用を有することから、成績の相違点の解釈には、用いられた濃度差の影響を考慮する必要がある。

Goetzl⁴⁾ および Stockley⁷⁾ らは、それぞれ0.001 mg/ml, 0.002 mg/ml の低濃度で好中球の chemotaxis を抑制したと報告しているが、筆者の研究では、その10倍から100倍に相当する0.02 mg/ml, 0.2 mg/ml においてもその抑制作用が認められなかった。その理由としては、0.02 および0.2 mg/ml は好中球遊走能(chemotaxis と chemokinesis)に対する刺激濃度であることから、たとえ同濃度に化学遊走物質に対する chemotaxis 抑制作用があったとしても、同時に chemokinesis 作用をも誘導するため好中球運動を亢進させ、結果として α_1 -Pi の持つ抑制作用が打ち消された可能性が考えられる。

Hakansson ら⁹⁾ および Goetzl⁴⁾ は、本研究の結果と同様に、それぞれ0.2 mg/ml のみ、または0.1 mg/ml 以下の濃度範囲において chemokinesis を生じさせると述べている。しかし、これらの研究ではさらに高い血中に相当する α_1 -Pi 濃度での検討はなされていない。

一方、Ganda ら⁸⁾ および Stockley ら⁷⁾ は、本研究の結果と異なり、 α_1 -Pi には chemoaxis や chemokinesis 活性は認められないとしている。しかし、彼らが検討した濃度は、3 $\times$ 10⁻⁶mg/ml および 5 $\times$ 10⁻⁶~5 $\times$ 10⁻³mg/ml と本研究での濃度に比してきわめて低く、遊走刺激濃度に達していないことが推察される。

0.02~10 mg/ml の濃度域において α_1 -Pi が好中球遊走能に対して低濃度では刺激性、高濃度では抑制性の二相性の作用を有することは炎症部位

への好中球リクルーメントの調節機序を考えるうえで興味深い。本研究で検討した α_1 -Pi 濃度を生体内濃度と対比させると、0.2 mg/ml は正常肺胞液(alveolar surfacelayer fluid)¹⁰⁾、2 mg/ml は正常血液、10 mg/ml は炎症時に増加した血液中濃度に相当している。

肺胞液中の 0.2 mg/ml の α_1 -Pi は高度の chemotaxis, chemokinesis 活性を有する濃度である。したがって、本濃度においては、肺血管内から肺胞内への好中球遊出を促進し、さらに肺胞腔内での遊走を亢進させ、細菌などの外敵に対する防御能として合目的な作用を有している可能性がある。一方、血中の 2 mg/ml の α_1 -Pi は chemotaxis を抑制する濃度であることから、逆に好中球の血管外遊走を抑止していると考えられる。

以上のように、血液、肺胞液中の α_1 -Pi 濃度差に基づいた遊走能に対する相反する作用が正常時における肺胞内への好中球リクルーメントの調節に関与している可能性が考えられる。

一方、細菌感染などによりもたらされた肺炎炎症部位では、血管透過性の亢進により、 α_1 -Pi の肺胞液濃度は血中濃度に近づくと予想される。したがって、炎症時には、肺胞液中 α_1 -Pi の遊走刺激活性は低下すると同時に、chemotaxis 抑制作用の出現により炎症巣への過剰な好中球集積を抑制し、好中球による組織障害への進展を防御している可能性がある。

また、肝内合成亢進のため血中濃度が高くなった α_1 -Pi は、より強力な chemotaxis 抑制作用を示し、その結果、好中球の過剰な血管外への遊走を抑制するものと推察される。

α_1 -Pi 欠損症患者において、感染刺激がみられないにもかかわらず、肺胞内の好中球数が増加していることが報じられている¹¹⁾。血中の低い α_1 -Pi 濃度は好中球に対する chemotaxis 抑制作用を低下させると同時に遊走活性を逆に亢進させると考えられる。本症患者における成績は、筆者らの *in vitro* における成績から推定される α_1 -Pi の好中球リクルーメントに対する調節機能が *in vivo* レベルでも作用しうる査証のひとつと考えられる。

このような α_1 -Pi の濃度依存性の好中球遊走能に対する刺激性、抑制性の特異な二相性作用により、生体内における好中球リクルーメントならび

に炎症過程が修飾している可能性が考えられた。

稿を終えるに当たり、ご指導ご校閲いただいた東京女子医科大学第一内科滝沢敬夫教授に深謝いたします。また、研究や論文作成のご指導を賜った第一内科永井厚志講師、衛生学公衆衛生学教室石原陽子講師に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Zigmond, S.H.: Chemotactic response of neutrophils. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1: 451-453, 1989.
- 2) Shasby, M.: Antioxidant activity of some anti-proteinases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131: 293-294, 1985.
- 3) Smith, C.W., Hollers, J.C., Patrick, R.A. et al.: Motility and adhesiveness in human neutrophils: effects of chemotactic factors. *J. Clin. Invest.* 63: 221-229, 1979.
- 4) Goetzl, E. J.: Modulation of human neutrophil polymorphonuclear leucocyte migration by human plasma alphaglobulin inhibitors and synthetic esterase inhibitors. *Immunology* 29: 163-174, 1975.
- 5) Falk, W., Goodwin, Jr., R.H., Leonard, E.J.: A 48 well-microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol. Methods.* 33: 239-247, 1980.
- 6) Zigmond, S.H., Hirsch, J.G.: Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.* 137: 387-410, 1973.
- 7) Stockley, R.A., Shaw, J., Afford, S.C. et al.: Effect of alpha-1-proteinase inhibitor on neutrophil chemotaxis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2: 163-170, 1990.
- 8) Banda, M.J., Rice, A.G., Griffin, G.L.: The inhibitory complex of α_1 proteinase inhibitor and human leukocyte elastase is a neutrophil chemoattractant. *J. Exp. Med.* 167: 1608-1615, 1988.
- 9) Hakansson, L., Venge, P.: Partial characterization and identification of chemokinetic factors in serum. *Scand. J. Immunol.* 18: 531-537, 1983.
- 10) Wewers, M.D., Casolaro, M.A., Sellers, S.E. et al.: Replacement therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. *N. Engl. J. Med.*, 316: 1055-1062, 1987.
- 11) Morrison, H.M., Kramps, J.A., Burnett, D. et al.: Lung lavage fluid from patients with α_1 -proteinase inhibitor deficiency or chronic obstructive bronchitis: anti-elastase function and cell profile. *Clinical Science* 72: 373-381, 1987.