血管内皮細胞を介する好中球遊走における 血小板活性化因子の役割解析

渡邊雅子・工藤道子・高尾 直^{*1)}, 無江季次^{*2)}, 大内和雄^{*1)}

Analysis of roles of platelet activating factor in neutrophil transendothelial migration

In an air pouch type allergic inflammation model in rats, PAF antagonists inhibit neutrophil migration into the pouch fluid although levels of PAF in the pouch fluid are less than the detectable amount. To clarify roles of PAF in neutrophil migration, effects of PAF antagonists (CV-6209, L-652, 731, Y-24180) on transendothelial migration of neutrophils were examined *in vitro*. Histamine and thrombin stimulated LTB₄-induced transmigration of neutrophils through the confluent monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Treatment with PAF antagonists selectively inhibited the histamine- and thrombin-induced transendothelial migration, suggesting that PAF plays some significant roles in endothelial cell recognition by neutrophils.

Treatment of HUVEC with TNF- α or IL-1 β induced neutrophil adherence to HUVEC monolayer and expression of adhesion molecules, such as ICAM-1, ELAM-1 or GMP-140. However, PAF antagonists showed no effect on the cytokine-induced neutrophil adherence to HUVEC nor the expression of these adhesion molecules. Furthermore, histamine- and thrombin-induced neutrophil adherence to HUVEC was inhibited by PAF antagonists without altering the expression of these adhesion molecules.

Transendothelial migration of neutrophils was not inhibited by antibodies to GMP-140 and ELAM-1, but was completely inhibited by an antibody to LFA-1 β . An antibody to ICAM-1 partially inhibited the transendothelial migration of neutrophils.

These results suggest that PAF produced by HUVEC plays important roles in signaling for neutrophil adherence to endothelial cells without affecting the expression of these adhesion molecules.

Masako Watanabe・Michiko Kudoh
Sunao Takao^{*1)}, Suetsugu Mue^{*2)}
Kazuo Ohuchi^{*1)}

key words : platelet activating factor, adhesion molecules, endothelial cells

好中球浸潤を一つの特徴とするラットのアレルギー性空気嚢型炎症モデルは、あらかじめラットを抗原蛋白質 (ABA-AcBSA) で感作し、背部皮下に作成した空気嚢 (air pouch) 内に抗原液を注入して、アレルギー反応に基づく炎症反応を誘発するモデルである¹⁾。

感作群では、抗原液注入直後に肥満細胞の脱顆粒によるヒスタミン放出に基づく一過性の血管透過性亢進が起こり、その後、48時間にかけて pouch 内液中に浸潤する顆粒球数は経時的に増加する。一方、無感作ラットの air pouch 内に抗原液を注入した場合のヒスタミン放出は、感作群にくらべるときわめてわずかであり²⁾、また、顆粒球浸潤は炎症誘発後4時間までアレルギー群と同様に上昇するが、その後の浸潤は弱くなる。

アレルギー性炎症の誘発により浸潤する顆粒球は90%以上が好中球であり、抗原刺激後4時間以降の好中球浸潤は、血小板活性化因子 (PAF) の特異的拮抗薬を抗原刺激時に静脈注射あるいは pouch 内に局所投与すると用量依存的に抑制される^{3,4)}。

一方、無感作ラットの air pouch 内に抗原液を注入して引き起こされる4時間後以降の弱い好中球浸潤は、PAF 拮抗薬の投与によってまったく抑制されない。

PAF は好中球に対してきわめて強い走化性を示す物質であるため、ラットのアレルギー性炎症モデルにおいて PAF が走化性因子として関与している可能性について解析した。

その結果、pouch 内液中の PAF 量は、ウサギ

^{*1)} Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University 東北大学薬学部生化学講座

^{*2)} College of Medical Sciences, Tohoku University 東北大学医療技術短期大学部

洗浄血小板を用いたバイオアッセイ法で検出限界以下であり³⁾, PAF の前駆体あるいは代謝物である lyso-PAF レベルも低かった³⁾. さらに, 多くの炎症性細胞では, PAF は種々の刺激により産生されても細胞外へはほとんど遊離しないため, ラットのアレルギー性炎症モデルでは PAF が走化性因子として作用している可能性はきわめて低いものと思われる.

前述したように, PAF 拮抗薬は, アレルギー性炎症における好中球浸潤を抑制する. PAF が走化性因子として作用していないとすると, PAF 拮抗薬が PAF に対する好中球の遊走を抑制し, それによって炎症モデルにおける好中球浸潤を抑制するという考えは成立しなくなる.

そこで, 好中球遊走以前の過程, すなわち, 好中球の血管内皮細胞認識(接着)の過程, ならびに血管内皮細胞層を介する好中球の遊走(transendothelial migration)の過程における PAF の関与について, 血管内皮細胞の培養系を用いて検討した.

方 法

(1) ヒト血管内皮細胞の採取および培養

0.25% trypsin-0.01% EDTA 処理によりヒト臍帯静脈から血管内皮細胞を採取し, 初代は 20% FBS 添加 199 培地(+1% Amphotericin B 溶液), 2 代目は 10% FBS 添加 199 培地(+1% Amphotericin B 溶液, heparin 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ECGS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で培養した. 予めコラーゲン(高研, Cellgen, 中性, E'MEM 培地)でコートした transwell (12-well 用, Costar, poresize 3.0 μm), あるいは 24-well マルチディッシュ(Costar)に 2 代目血管内皮細胞の confluent monolayer を形成させ実験に用いた.

(2) ラット腹腔好中球の採取と ^{51}Cr 標識

ラットの腹腔に 1% カゼイン溶液を注入し(120 ml/kg), 15 時間後に腹腔浸潤細胞を回収した. 洗浄後, 0.25% BSA(fatty acid-free)を含む 199 培地に懸濁し, ^{51}Cr 溶液(NEN, $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$)を添加して, 5% CO_2 -95% O_2 存在下 60 分間振盪培養した. 洗浄後, 0.25% BSA(fatty acid-free)を含む 199 培地で 3×10^6 cells/250 μl の濃度の細胞浮遊液を調製した.

(3) 血管内皮細胞層に対する好中球接着の測定(図 1 a)

24-well マルチディッシュに形成させたヒト血管内皮細胞の confluent monolayer に, ^{51}Cr で標識したラット腹腔好中球浮遊液(3×10^6 個/250 μl)を添加し, ただちに 2 培濃度の薬物を含む 0.25% BSA-199 培地 250 μl を添加してよく振り混ぜ, 5% CO_2 存在下, 37°C で 20 分間静置培養した. 培養終了後, 氷冷した 199 培地で洗浄し, 接着しなかった好中球を洗い出した. ついで, 500 μl の 0.1N NaOH を加えて血管内皮細胞と接着好中球を回収し, γ カウンターで放射活性を測定した.

(4) 血管内皮細胞層を介する好中球遊走の測定(図 1 b)

予め transwell 下室に各薬物溶液 1.5 ml を分注し, 血管内皮細胞の confluent monolayer を形成させた 12-well 用 transwell をセットした. transwell カップ内(上室)に ^{51}Cr 標識ラット腹腔好中球浮遊液(3×10^6 個/250 μl)を添加し, ただちに 2 培濃度の薬物を含む 0.25% BSA-199 培地 250 μl を添加してよく振り混ぜ, 5% CO_2 存在下, 37°C で 60 分間静置培養した.

培養終了後, 氷冷した 199 培地でカップ内を洗浄し, 接着しなかった好中球を洗い出した. カップの外液を全量回収し, 放射活性を測定して, 血管内皮細胞層を通過した遊走好中球数の指標とした.

(5) 内皮細胞上の接着分子の測定

各種薬物を添加して一定時間後に内皮細胞を回収し, それぞれの接着分子に対する抗体を用いて血管内皮細胞表面の接着分子発現をフローサイトメトリーにより解析した.

結 果

(1) トロンビン, ヒスタミンによる好中球の transendothelial migration の増強と PAF 拮抗薬による抑制

図 2 a, b に示すように, transwell 上室にトロンビン(1U/ml)を添加した場合, あるいは下室に走化性因子として LTB_4 ($3 \times 10^{-8}\text{M}$)を添加した場合, とともに血管内皮細胞層を通過して下室へ遊走する好中球数は増加した. また, 上室にトロンビン, 下室に LTB_4 を同時に添加すると, 下室へ

図 1 培養血管内皮細胞への好中球接着と血管内皮細胞層を通過する好中球遊走の実験方法

遊走する好中球数はさらに増加した。このような系で transwell 上室と下室に PAF 拮抗薬 L-652, 731 ($3 \times 10^{-7}M$) あるいは CV-6209 ($3 \times 10^{-8}M$) を添加すると、下室に LTB₄ を添加した場合の好中球遊走は抑制されなかったが、上室にトロンビン、下室に LTB₄ を同時に添加した場合の好中球遊走は下室に LTB₄ を添加した場合のレベルにまで抑制された。すなわち、上室に添加したトロンビンの作用は、PAF 拮抗薬によって打ち消される

結果が得られた。

同様の結果は、トロンビンのかわりにヒスタミン ($1 \times 10^{-5}M$) を用いた場合にも観察された (data not shown)。

(2) 血管内皮細胞における接着分子, ICAM-1 および ELAM-1 の発現誘導に対する PAF 拮抗薬の作用

好中球浸潤には、炎症局所で産生されるサイトカインによって血管内皮細胞上に誘導される

図2 トロンビンによる好中球の transendothelial migration の増強と PAF 拮抗薬による抑制

血管内皮細胞の confluent monolayer を形成させた transwell の上室にトロンビン (1 U/ml) と ⁵¹Cr 標識好中球, 下室に LTB₄ (3×10⁻⁸ M) を添加し, 5% CO₂ 存在下, 37°C で 60 分間静置培養し, 下室に遊走した好中球の割合を測定した. PAF 拮抗薬 CV-6209 あるいは L-652,731 は transwell 上室と下室に添加した.

*** P<0.001 vs. corresponding control.

ICAM-1 や ELAM-1 が関与する可能性がある. そこで, 血管内皮細胞培養系で TNF- α あるいは IL- β により発現が誘導される ICAM-1 および ELAM-1 について, これらの発現に対する各種 PAF 拮抗薬の作用を検討した. その結果, TNF- α (0.1 ng/ml) あるいは IL- β (10 U/ml) を培養系に添加して 4 時間後の ICAM-1 あるいは ELAM-1 の発現誘導は, 同時に添加した PAF 拮抗薬 (CV-6209, Y-24180, L-652,731) により, まったく影響されなかった (図 3).

(3) 好中球接着に対する血管内皮細胞上の ICAM-1, ELAM-1 発現の影響と PAF 拮抗薬の作用

血管内皮細胞を IL-1 β (30 U/ml) あるいは TNF- α (0.1 ng/ml) で, 予め 4 時間培養し, ICAM-1 および ELAM-1 を発現させた後, ヒスタミン (10⁻⁵ M) あるいはトロンビン (1 U/ml) 存在下で ⁵¹Cr 標識好中球と 20 分間培養した. また, ⁵¹Cr

標識好中球と培養する間, PAF 拮抗薬 Y-24180 (1×10⁻⁸ M) を共存させ, 好中球の血管内皮細胞への接着に対する PAF 拮抗薬の作用について検討した (図 4).

その結果, IL-1 β あるいは TNF- α で前処理すると, ヒスタミンやトロンビンで刺激をしなくても好中球の接着は有意に亢進した. また, ヒスタミン刺激, あるいはトロンビン刺激による好中球の接着亢進は, 血管内皮細胞を IL-1 β あるいは TNF- α で前処理しておくとともに亢進した. このような系で PAF 拮抗薬 Y-24180 を添加すると, IL-1 β あるいは TNF- α で前処理した場合もしない場合も, ヒスタミンあるいはトロンビンによる接着亢進のみが抑制された. IL-1 β あるいは TNF- α で前処理した後, ヒスタミンあるいはトロンビンで刺激をしない場合の好中球接着亢進は PAF 拮抗薬ではまったく抑制されなかった.

(4) ヒスタミン, トロンビンによる血管内皮細胞上の GMP-140 の誘導に対する PAF 拮抗薬の作用

血管内皮細胞をヒスタミン (1×10⁻⁵ M) あるいはトロンビン (1 U/ml) 存在下で培養すると, 20 分以内に内皮細胞上に GMP-140 が発現される. このような系でヒスタミンあるいはトロンビンとともに PAF 拮抗薬を添加し, 20 分後の GMP-140 発現に対する作用を調べたところ, CV-6209 (3×10⁻⁸ M), Y-24180 (1×10⁻⁸ M) あるいは L-652,731 (3×10⁻⁸ M) を添加しても GMP-140 の発現誘導はまったく抑制されなかった (図 5).

(5) 好中球の transendothelial migration に対する接着分子抗体の作用

Transwell 上室にトロンビン (1 U/ml), 下室に走化性因子として LTB₄ (3×10⁻⁸ M) を添加して, 60 分間培養したときの血管内皮細胞層を通過する好中球遊走は, 上室に抗ヒト GMP-140 抗体 (WGA-1, 1:300, 宝酒造) を添加してもまったく抑制されなかった.

一方, 抗ヒト ICAM-1 抗体 (BBA4, 1:300, British Bio-technology Ltd.) を上室に添加すると, 約 50% の抑制が観察され, 抗ラット LFA-1 β 抗体 (WT-3, 1:300, 生化学工業) を添加した場合には, 好中球遊走はコントロールのレベル以下にまで抑制された (図 6 a).

図3 ICAM-1 および ELAM-1 の発現誘導に対する PAF 拮抗薬の作用

血管内皮細胞を $\text{TNF-}\alpha$ (0.1 ng/ml) あるいは $\text{IL-1}\beta$ (10 U/ml) を添加した 10% FBS-199 培地で 4 時間培養した。各 PAF 拮抗薬は $\text{TNF-}\alpha$ あるいは $\text{IL-1}\beta$ と同時に添加した。

血管内皮細胞を 0.25% トリプシン-0.1% EDTA 溶液で回収した後、抗ヒト ICAM-1 抗体あるいは抗ヒト ELAM-1 抗体を一次抗体として用い、さらに FITC 標識抗マウス IgG 抗体を二次抗体として用いて免疫染色を行い、フローサイトメトリー (Coulter 社, Epics Elite) により解析した。

*** $P < 0.001$ vs. corresponding control

$P < 0.001$ vs. none 0-control

† $P < 0.001$ vs. none histamine-Control

§ $P < 0.001$ vs. none thrombin-Control

図4 好中球接着に対する接着分子発現の影響と PAF 拮抗薬の作用

血管内皮細胞を $\text{TNF-}\alpha$ (0.1 ng/ml) あるいは $\text{IL-1}\beta$ (10 U/ml) を添加した 10% FBS-199 培地で 4 時間培養した。

さらに、ヒスタミンあるいはトロンビンに添加した 0.25% BSA-199 培地を好中球と同時に添加し、20 分間静置培養した。

接着しなかった好中球を洗い出した後、0.1N NaOH で血管内皮細胞と接着好中球を回収し、血管内皮細胞に接着した好中球の割合を測定した。PAF 拮抗薬はヒスタミンあるいはトロンビンと同時に添加した。

図5 GMP-140の発現誘導に対するPAF拮抗薬の作用

血管内皮細胞に、ヒスタミン(10^{-5} M)あるいはトロンビン(1 U/ml)を含む0.25% BSA-199培地を添加し、20分間培養した。各PAF拮抗薬はヒスタミンあるいはトロンビンと同時に添加した。血管内皮細胞を0.25%トリプシン・0.1% EDTA溶液で回収したあと、抗ヒトGMP-140抗体を一次抗体として、FITC標識抗マウスIgG抗体を二次抗体として用いて免疫染色を行い、フローサイトメトリー(Coulter社, Epics Elite)により解析した。

また、培養60分後に血管内皮細胞層に接着している好中球数は、抗ヒトGMP-140抗体(1:300)あるいは抗ヒトICAM-1抗体(1:300)の添加による影響は観察されなかった。抗ラットLFA-1 β 抗体(1:300)では、好中球接着はコントロールのレベルにまで抑制された(図6b)。

考察

トロンビンあるいはヒスタミンは、血管内皮細胞に主として細胞結合型のPAFを産生させるが⁵⁾、トロンビンあるいはヒスタミンによって亢進するヒト臍帯静脈血管内皮細胞へのラット腹腔好中球の接着は、Y-24180, CV-6209あるいはL-652,731などのPAF拮抗薬により用量依存的に抑制されることを報告した⁶⁾。

好中球は、トロンビンやヒスタミン刺激ではPAFを産生せず、また、コラーゲンコートしたdishへの好中球接着作用を示さないことから、PAF拮抗薬による好中球接着の抑制は、内皮細胞が産生するPAFになんらかの形で拮抗した結果と考えられる。また、ヒスタミン、トロンビン刺激による血管内皮細胞層を通過する好中球の遊走も、PAF拮抗薬により抑制される(図2)ことから、トロンビンあるいはヒスタミン刺激によって血管内皮細胞が産生するPAFは、血管内皮細胞

層を介する好中球の遊走を調節している可能性が強く示唆された。

炎症反応における顆粒球の血管外遊走には、顆粒球と血管内皮細胞の相互認識機構、すなわちそれぞれの細胞表面における接着分子の相互作用が重要であると考えられている。そこで、血管内皮細胞が産生するPAFと血管内皮細胞が発現する接着分子が、好中球の接着と遊走にどのように相互に関連するかについて解析した。

筆者らの実験系では、血管内皮細胞上のICAM-1およびELAM-1の発現量は、培養時間に関わらずヒスタミン、トロンビンあるいはPAFによって変動しなかった。炎症時の好中球浸潤は、炎症局所で産生されるサイトカインによって血管内皮細胞上に誘導されるICAM-1やELAM-1が関与する可能性がある。そこで、TNF- α あるいはIL-1 β によってICAM-1, ELAM-1を発現する血管内皮細胞培養系で、これら接着分子の発現に対する各種PAF拮抗薬の作用を検討した。

その結果、いずれのPAF拮抗薬の影響も観察されず(図3)、血管内皮細胞が産生するPAFは、少なくともICAM-1やELAM-1の量的変動には関係のないことが示唆された。

つぎに、ICAM-1, ELAM-1の接着能に血管内皮細胞が産生するPAFが関与する可能性につい

図6 好中球の transendothelial migration に対する抗接着分子抗体の作用

Transwell 上室にトロンビン(1 U/ml)と ^{51}Cr 標識好中球, 下室に LTB_4 ($3 \times 10^{-8} \text{ M}$) を添加し, 60 分間静置培養した. 下室に遊走した好中球の割合を内皮細胞層を通過した好中球の指標とした(a). また, transwell フィルターを切り取り放射活性を測定し, 接着好中球の指標とした(b). 各接着分子抗体(1:300 希釈)は上室にのみ添加した.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs. thrombin control

て検討した. 好中球接着の実験系で, 血管内皮細胞を $\text{IL-1}\beta$ や $\text{TNF-}\alpha$ で予め4時間培養すると, 接着好中球数は有意に増加した(図4). この増加は ICAM-1 の発現増強や ELAM-1 の発現誘導によるものと思われる. $\text{IL-1}\beta$ あるいは $\text{TNF-}\alpha$ 前処理後, ヒスタミンやトロンビンを添加すると, 接着好中球数はさらに増加するが, PAF 拮抗薬をヒスタミンあるいはトロンビンとともに添加すると, ヒスタミンあるいはトロンビンにより亢進した接着のみが抑制された. ICAM-1 の発現増強や

ELAM-1 の発現誘導に基づくと思われる接着好中球数の増加, すなわち $\text{IL-1}\beta$ や $\text{TNF-}\alpha$ 単独で亢進する好中球の接着は抑制されなかった(図4).

したがって, ヒスタミンやトロンビンによる好中球の接着亢進は, ICAM-1 や ELAM-1 の接着能を亢進した結果ではなく, また, ICAM-1 や ELAM-1 による接着経路と直接的に関連する可能性はきわめて小さいことが示唆された.

なお, 実験に用いたラットの腹腔好中球は, ICAM-1 に対するリガンドである LFA-1 をすでに発現しており, 今回の実験条件下では, ヒスタミン, トロンビン, LTB_4 あるいは PAF による量的変動は観察されなかった(data not shown).

LFA-1 に関しては, 種々の刺激により活性型にかわると考えられているが, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞とラット腹腔好中球の組み合わせでは, 添加した PAF はヒスタミンやトロンビンほど強い接着亢進を示さなかった⁶⁾. この理由については, 血小板凝集で観察されるように, 動物の種によって応答する PAF の分子種が異なるため, LFA-1 の活性型への変換が行われず, 接着が亢進しなかったか, あるいは, PAF は遊離型ではなく細胞結合型として存在するときに接着亢進に関与するためであることなどが考えられるが, 詳細は不明である.

また, 好中球の PAF 受容体刺激による LFA-1 の活性型変換が, 血管内皮細胞への好中球接着と遊走に必要な条件であるかについては現在検討中である.

ところで, 培養血管内皮細胞ではヒスタミンあるいはトロンビン刺激によりリモデリング経路により一過性に PAF が産生され⁷⁾, また, 刺激後2分以内に細胞表面に GMP-140 が発現する⁷⁾. その後, 対照群との差は急速に小さくなるが, 20分後においても明らかな発現量の差が認められる(data not shown). 血管内皮細胞の PAF 産生と GMP-140 の発現がきわめて似た経時変化を辿ることから, Prescott らは, 血管内皮細胞への顆粒球接着には, 血管内皮細胞が産生する PAF と血管内皮細胞上に発現する GMP-140 がたがいに密接に関わると考えているが^{8,9)}, GMP-140 の発現に直接 PAF が関わるかどうかについて明確にさ

れていない。

ヒスタミンあるいはトロンピンを添加して20分後の、培養血管内皮細胞のGMP-140発現に対するPAF拮抗薬の作用を検討した今回の結果からも、ヒスタミンあるいはトロンピン刺激で産生されるPAFは、GMP-140の発現に対して影響を与えていないことが示唆された。したがって、好中球の血管内皮細胞認識のプロセスの中で確かにPAFは関わっているものの、その作用は少なくとも接着分子であるICAM-1, ELAM-1あるいはGMP-140などの量的変化および質的变化に影響を与えた結果ではないことが示唆された。

また、GMP-140が血管内皮細胞上でPAFとともに存在することが好中球接着や遊走に必要であるならば、抗GMP-140抗体はPAF拮抗薬と同様に、好中球の血管内皮細胞への接着や内皮細胞層を介する遊走を抑制するはずである。しかし、抗GMP-140抗体はヒスタミンやトロンピンによる好中球の接着をまったく抑制しなかった(図6)。したがって、PAF拮抗薬による好中球の接着および遊走の抑制作用機序に、GMP-140の発現誘導は関係していないことが示唆された。なお、接着分子抗体による解析では、Fcレセプターを介する接着亢進を同時に測定する可能性を除くため、現在、接着分子抗体のFa, bフラグメントを調製して検討を行っている。

また、トランスウェルを用いた実験系においても抗GMP-140抗体はまったく抑制を示さず、一方、抗LFA-1抗体では遊走がほとんど抑制され(図6)、ICAM-1とLFA-1経路による細胞接着の重要性が示唆された。

ラットのアレルギー性炎症モデルにおいて、PAF拮抗薬は好中球の炎症局所への浸潤を抑制するが、その作用機序は血管内皮細胞表面におけるGMP-140, ICAM-1あるいはELAM-1などの接着分子の発現誘導や接着能を抑制するためではないことが示唆された。PAF拮抗薬は、血管内皮細胞が産生するPAFに拮抗して、これらの接

着分子とは別の経路による好中球接着を抑制したためであることも考えられ、今後さらに解析する必要がある。

文 献

- 1) Tsurufuji, S., Yoshino, S., Ohuchi, K. : Induction of allergic air-pouch inflammation in rats. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 68 : 326-331, 1982.
- 2) Ohuchi, K., Hirasawa, N., Watanabe, M., Tsurufuji, S. : Pharmacological analysis of the vascular permeability response in the anaphylactic phase of allergic inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 117 : 337-345, 1985.
- 3) Watanabe, M., Sugidachi, A., Omata, M., Hirasawa, N., Mue, S., Tsurufuji, S., Ohuchi, K. : Possible role for platelet-activating factor in neutrophil infiltration in allergic inflammation in rats. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 92 : 396-403, 1990.
- 4) Watanabe, M., Arakida, Y., Tanabe, J., Sugidachi, A., Hirasawa, N., Mue, S., Ohuchi, K. : Pharmacological analysis of neutrophil chemotactic factor production by leucocytes and roles of PAF in allergic inflammation in rats. *Br. J. Pharmacol.* 111 : 123-130, 1994.
- 5) Zimmerman, G. A., McIntyer, T. M., Mehra, M., Prescott, S. M. : Endothelial cell-associated platelet-activating factor : A novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell Biol.* 110 : 529-540, 1990.
- 6) Watanabe, M., Yagi, M., Omata, M., Hirasawa, N., Mue, S., Tsurufuji, S., Ohuchi, K. : Stimulation of neutrophil adherence to vascular endothelial cells by histamine and thrombin and its inhibition by PAF antagonists and dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 102 : 239-245, 1991.
- 7) Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., McIntyer, T. M. : Platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 264 : 17381-17384, 1989.
- 8) Hattori, R., Hamilton, K. K., Fugate, R. D., McEver, R. P., Sims, P. J. : Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J. Biol. Chem.* 264 : 7768-7771, 1989.
- 9) McEver, R. P. : Leukocyte interactions mediated by GMP-140. *Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation. Vascular Adhesion Molecules.* (ed. Cochrane, C. G., Gimbrone, Jr., M. A.), Academic Press, 1991, p 15-29.