好中球の食作用促進因子 (PSF) の作用機序

石橋芳雄・山下辰久*

Mechanism of action of phagocytosis-stimulating factor (PSF) The effects of PSF on PMN functions, such as O_2^- generation, chemotaxis, adherence, enzyme release, were studied. The PSF, capable of stimulating the phagocytosis by PMNs, did not affect chemotaxis, adherence and enzyme release. Only O_2^- generation from PMNs was significantly increased in the initial phase of phagocytosis, and this stimulation of O_2^- generation was completely paralleled with the stimulation of phagocytosis by PSF. Resting PMNs hardly generated the O_2^- by PSF treatment, suggesting that PSF does not affect the O_2^- forming system directly. PSF did not affect the Fc receptor mediated phagocytosis, whereas PSF enhanced the ingestion phase, but not attachment phase, of C3b receptor mediated phagocytosis by PMNs, suggesting that PSF may modulate the C3b receptor function of PMNs specifically. PSF generated from guinea-pig PMNs enhanced the phagocytosis by rabbit PMNs, and rabbit PMN-produced PSF accelerated the phagocytosis by guinea-pig PMNs, indicating that PSF is not specific for animal species.

Yoshio Ishibashi・Tatsuhisa Yamashita

Department of Physiological Chemistry, Juntendo University, School of Medicine

好中球の食作用は、感染に対する生体防御機構においてもっとも重要な機能の一つである。筆者らは、異物を貪食した好中球から、好中球の食作用を促進する因子：phagocytosis-stimulating factor (PSF) が産生されることを見だし、その物理的性質などについてすでに報告した¹⁾。しかしながら、PSF による食作用促進の機序についてはまだ明らかにしていない。

一方、好中球の食作用は走化性、ガラス粘着能、脱顆粒など他の好中球機能と密接に関連しあっていることが知られており²⁻⁴⁾、PSF が食作用だけでなく、他の好中球機能にも影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで今回は、種々の好中球機能に及ぼす PSF の影響について調べ、さらにその関連性も踏まえて、PSF による好中球の食作用促進機序について検討した。

材料と方法

(1) 好中球の調製

モルモット腹腔にグリコーゲン溶液を注射し、得られた浸出液より好中球を調製した⁵⁾。

(2) オプソニン化 zymosan の調製

① 補体オプソニン化 zymosan……モルモット新鮮血清に zymosan を 8 mg/ml の割合で加え、37°C 30 分間処理した後、ハンクス液 (HBSS) で 2 回洗浄した¹⁾。

② IgG 感作 zymosan……zymosan 0.5 mg に対し、8 mg の human albumin を加え、これに 80 mg の N-cyclo-hexyl-N'-[2-(4-morpholinyl)-acetyl] -carbo-diimide-methyl-p-toluolsulfonate を加え、PBS で全量 2.65 ml とし、室温で 3 時間作用させることによって zymosan に human albumin を結合させた。この zymosan (0.5 mg/ml) 0.1 ml にウサギ抗ヒトアルブミン血清 0.1 ml を加え、PBS で全量 1 ml とし、37°C 30 分間処理することにより IgG 感作 zymosan を得た。

(3) PSF の調製¹⁾

好中球 (1×10^7 /ml) に同種新鮮血清によりオプソニン化した zymosan (1 mg/ml) を加え、37°C で 1 時間培養した後、貪食白血球を超音波破砕し、その上清を 80°C 30 分間処理した後、Sephadex G-100 のゲル濾過により、分子量約 18,000 の分画を得、これを部分精製 PSF として用いた。

(4) 貪食能の測定

カバーガラス (10×22 mm) に好中球 (2×10^5 cells) の monolayer を作製し、これにオプソニン化した zymosan を 1:1 の割合で加え、37°C で貪食させ、経時的に monolayer をメタノール固定、Wright-Giemsa 染色した後、鏡検して好中球の付着率および貪食率を求めた。

(5) 好中球機能の測定

好中球の O_2^- 生成は、SOD で阻害されうる cytochrome C の還元を OD 550 nm で測定することにより

* 順天堂大学医学部生理学教室

表 1 effect of PSF on O_2^- generation from PMNs

	opsonized zymosan	cytochrome C reduced (nmoles/ 10^7 cells)	
		5 min	30 min
control	+	11.87 ± 0.08	28.95 ± 3.44
	-	0	4.76
PSF-treated PMNs	+	18.78 ± 0.06	31.53 ± 4.08
	-	0	4.19

表 2 effect of PSF on chemotaxis of PMNs

attractant	migration distance (μ m)	
	control PMNs	PSF-treated PMNs
HBSS	11.78 ± 1.24	12.23 ± 1.45
zymosan activated serum	77.48 ± 5.42	71.43 ± 5.26
<i>E. coli</i> extract	80.90 ± 4.70	75.90 ± 5.26
PSF	11.70 ± 1.65	11.40 ± 1.54

表 3 effect of PSF on enzyme release from PMNs

	opsonized zymosan	enzyme release (%)			
		β -glucuronidase		lysozyme	
		10 min	60 min	10 min	60 min
control	+	1.39 ± 0.06	8.85 ± 2.07	1.49 ± 0.08	47.00 ± 0.37
	-	1.25 ± 0.18	4.25 ± 0.49	2.45 ± 0.46	20.16 ± 2.02
PSF-treated PMNs	+	1.57 ± 0.27	8.69 ± 1.33	2.84 ± 1.17	48.27 ± 1.33
	-	1.36 ± 0.18	4.41 ± 0.20	1.45 ± 0.73	15.93 ± 1.53

表 4 effect of PSF on antibody-dependent phagocytosis by PMNs

	phagocytosis (%)	
	10 min	60 min
control	12.2 ± 1.15	34.2 ± 4.23
PSF-treated PMNs	10.1 ± 2.88	34.9 ± 4.31

表 5 kinetic studies of phagocytosis-stimulating activity of PSF

	ingestion (%)	attachment (%)
control	22.57 ± 3.50	11.75 ± 2.32
PSF-treated PMNs	32.78 ± 5.09	6.20 ± 0.72

ingestion and attachment were estimated at 10min after the start of phagocytosis.

行った⁶⁾。また好中球の走化性は、Boyden chamber 法により^{5,7)}、ガラス粘着能はガラス表面に付着した細胞の蛋白含量を Lowry 法⁸⁾によりそれぞれ測定し、また脱顆粒は β -glucuronidase および lysozyme の release⁹⁾を指標として判定した。

結 果

(1) 好中球機能に及ぼす PSF の影響

① O_2^- 生成に及ぼす PSF の影響 ……好中球の貪食に伴う O_2^- 生成は、PSF によりその初速度が促進された (表 1)。しかしこれは PSF による食作用促進の経時的变化と一致し¹⁾、また resting cell の O_2^- 生成は PSF により活性化されないことから、この結果は PSF による O_2^- forming system の直接的な活性化というよりは、むしろ貪食能の亢進に伴って起こった結果と考えられる。

② 好中球の走化性に及ぼす PSF の影響 ……走化性因子として zymosan activated serum、あるいは *E. coli* の抽出液のいずれを用いた場合にも PSF は好中球の走化性に影響を及ぼさず、また PSF 自身も走化性因

子としての作用は認められなかった (表 2)。

③ 好中球の脱顆粒に及ぼす PSF の影響 ……好中球中の貪食に伴う β -glucuronidase, lysozyme の release は PSF によって影響されなかった。また resting cell に PSF を作用させても、どちらの酵素とも有意な release は起こらなかった (表 3)。

(2) PSF の作用様式の検討

PSF は C3b receptor を介した食作用を促進することを筆者らはすでに報告している¹⁾。そこで、今回はさらに Fc receptor を介した食作用に及ぼす PSF の効果を検討した (表 4)。その結果、IgG で感作した zymosan の食作用は、PSF により促進されないことが明らかになった。

食作用の過程は cell に particle が付着する段階 (attachment phase) と、それについて particle を取り込む段階 (ingestion phase) の 2 段階に大別される⁹⁾。そこで PSF が食作用のどちらの段階に作用するかをつぎに検討した (表 5)。その結果、好中球によるオプソニン化 zymosan の取り込み段階は PSF により促進されたが、付着の段階には有意な差は認められなかった。

(3) PSF の種特異性の検討

モルモットの好中球にウサギの好中球から得られた PSF を作用させても、モルモットの PSF によるものと同様な食作用促進効果が認められた。このことから PSF の作用は動物種に非特異的であることが明らかになった。

考 察

従来より、好中球機能に影響を及ぼす因子は数多く知られており、それらの因子には好中球の走化性、脱顆粒、粘着能など多くの機能に広く作用する因子^{10,11)}と、ある機能のみに特異的に作用する因子^{12,13)}とが存在することが報告されている。今回、PSF は好中球の走化性、脱顆粒、ガラス粘着能にはなんら影響を及ぼさないことから、PSF は好中球の食作用のみを特異的に促進させる因子であることが明らかになった。

さらに、PSF は好中球の Fc receptor を介した食作用にはなんら影響を及ぼさないこと、また補体でオプソニン化した Zymosan を用いた食作用の Ingestion phase を促進することなどから、PSF の作用機序として、好中球の C3b receptor を介した食作用の、異物取り込み段階を特異的に促進させているものと考えられる。このような PSF の作用は、急性炎症において、好中球による迅速な異物排除に重要な役割を演じているものと思われる。

文 献

- 1) Ishibashi, Y., Yamashita, T.: Generation of a phagocytosis stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils during phagocytosis. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 64: 181-189, 1981.
- 2) Bandmann, U., Rydgren, L., Norberg, B.: The difference between random movement and chemotaxis. *Exp. Cell. Res.* 88: 63-73, 1974.
- 3) Caner, J.E.Z.: Colchicine inhibition of chemotaxis. *Arch. Rheum.* 8: 757-764, 1965.
- 4) Zurier, R.B., Hoffstain S., Weissmann, G.: Cytochalasin B.: Effect on lysosomal enzyme release from human leukocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 844-848, 1973.
- 5) Yamashita, T., Imaizumi, N., Yuasa, S.: Effect of endocellular cryoprotectant upon polymorphonuclear neutrophil function during storage at low temperature. *Cryobiology* 16: 112-117, 1979.
- 6) Takamori, K., Yamashita, T.: Biochemical properties of polymorphonuclear neutrophils from venous blood and peritoneal exudates of rabbits. *Infect. Immun.* 29: 395-400, 1980.
- 7) Zigmond, S.H., Hirsch, J.G.: Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leukocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp. Cell. Res.* 73: 383-393, 1972.
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- 9) Rabinovitch, M.: The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. *Exp. Cell. Res.* 46: 19-28, 1967.
- 10) Musson, R.A., Becker, E.L.: The inhibitory effect of chemotactic factor on erythrophagocytosis by human neutrophils. *J. Immunol.* 117: 433-439, 1976.
- 11) Hakansson, L., Hallgren, R., Venge, P.: Regulation of granulocyte function by hyaluronic acid. *In vitro* and *in vivo* effects on phagocytosis, locomotion, metabolism. *J. Clin. Invest.* 66: 298-305, 1980.
- 12) Horsmanheimo, A., Horsmanheimo, M., Fudenberg, H.H.: Effect of tuftsin on migration of polymorphonuclear and mononuclear human leukocytes in leukocyte migration agarose test. *Clin. Immun. Immunopathol.* 11: 251-255, 1978.
- 13) Bockenstedt, L.K., Goetzl, E.J.: Constituents of human neutrophils that mediate enhanced adherence to surfaces. Purification and identification as acidic proteins of the specific granules. *J. Clin. Invest.* 65: 1372-1381, 1980.