プロスタグランディンの白血球遊走に及ぼす影響

渡辺幸市・村上正志・古川泰正・吉川敏一・竹村周平・近藤元治*

Effects of prostaglandins on chemotaxis The effects of prostaglandins on human polymorphonuclear leukocytes (PMN) migration were studied *in vitro* by agarose plate method. None of the prostaglandins tested, including PGE_1 , E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ and thromboxane B_2 (TxB_2) were chemotactic in concentrations ranging from 0.5 to 10 μg . However, pretreatment of PMN with PGE_1 and $\text{PGF}_{2\alpha}$ for 30 minutes at 0°C inhibited the chemotaxis induced by zymosan activated human serum as well as spontaneous migration of PMN, while pretreatment with TxB_2 enhanced these reactions. These findings suggested that in some forms of inflammation, prostaglandins may play a controlling role in leukocytes migration. The inhibition or enhancement of PMN migration was not directly related to the changes of intracellular cyclic AMP levels by prostaglandins.

Koichi Watanabe • Masashi Murakami • Yasumasa Furukawa •
Toshikazu Yoshikawa • Shuhei Takemura • Motoharu Kondo*

*The First Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine

最近プロスタグランジン (PG) の白血球遊走に及ぼす影響が注目されている。各種 hydroxy-eicosatetraenoic acid (HETE, 5, 8, 9, 11, 12)¹⁾, 12 L-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid (HHT)²⁾ および leukotriene B_4 ³⁾ はそれ自身白血球遊走作用を有することが知られている。しかしながら PGE_1 , E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ および TxB_2 の白血球遊走に及ぼす影響については、実験に用いた動物、白血球の種類あるいは測定条件などの違いにより、一定の結果が得られていない。そこで今回われわれは、これらプロスタグランジンを用い、ヒト白血球 (好中球) 遊走に及ぼす影響につき検討した。

材料と方法

(1) 材料

PGE_1 , E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ および TxB_2 1 アンプル 100 μg をそれぞれ少量のエチルアルコールで溶解し、TCM 199 で希釈して使用した。実験に用いたこれら PG の終濃度は、1 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$ (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 10 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 100 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$ (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とした。また、この際、PG を含まぬコントロールバッファーにも当量のエチルアルコールを用い、エチルアルコールの実験結果に及ぼす影響を除いた。

方法

(1) 遊走能検査

白血球遊走能検査はアガロース法を用いた。アガロース法は、Nelson ら⁴⁾の変法⁵⁻⁷⁾に準じて施行した。

① アガロースプレート

アガロースプレートに直径 2 mm の穴を 2 mm 間隔で直線上に 3 個作製した。これを 1 プレートに放射上に 8 系列作製し、1 プレートで 4 個の同一検体と 4 個の同一対照を観察した。

② 遊走因子

遊走因子としては、ザイモザン処理活性化血清を用いた。すなわち、生理食塩水で 3 回洗浄したザイモザン 20 mg を健康人血清 1 ml と 37°C , 1 時間反応後、遠沈して得た上清を用いた。

③ 好中球浮遊液

好中球は、健康人へパリン血 5 ml を 3 % デキストラン生食液 1 ml に 45 分間混和静置後、上清をリンホプレップ 3 ml 上に静かに重層し、1,000 rpm, 30 分間遠心分離して得た。沈渣中に混在する少量の赤血球を 0.87 % NH_4Cl で溶血処理し、TCM 199 で 2 回洗浄し、 $2 \times 10^6/\text{ml}$ の好中球浮遊液を作成した。つぎにこの好中球浮遊液を遠沈し、上清を捨て、好中球沈渣に各種濃度 (1 μg , 10 μg , 100 μg) の PGE_1 あるいは E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$, TxB_2 含有 TCM 199 2 ml を加え、 0°C 30 分間反応させ、PG 処理好中球浮遊液を作成した。この際、PG 処理による細胞の生死の確認のため、PG 処理好中球浮遊液の一部

* 京都府立医科大学第一内科学教室

表 1 プロスタグランディンの白血球遊走に及ぼす影響

	control	PGE ₁			PGE ₂			PGF _{2α}			TxB ₂		
		1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100μg/2ml
spontaneous migration	0.78	0.77	0.75*	0.69*	0.80	0.78	0.73*	0.76	0.75*	0.74*	0.81	0.77	0.86*
chemotaxis	1.75	1.73	1.68*	1.61*	1.75	1.70	1.71	1.72	1.62*	1.68*	1.78	1.73	1.85*

P<0.05, n=5

を採り、トリパンブルー染色した。また一部は、ライトギムザ染色して、この好中球浮遊液に含まれる好中球のパーセントを算出した。

なお対照好中球も、PG を含まぬ TCM 199 2 ml に浮遊させ、同様に 0°C、30 分間 incubate して、実験に用いた。

④ 手技と測定

アガロースプレートの直線上の 3 つの穴の中央に PG 処理好中球浮遊液および対照好中球浮遊液 5 μl を注入した。chemotaxis は、直線上の 3 つの穴の外側に遊走因子、内側に TCM 199 をそれぞれ 5 μl ずつ注入し測定した。spontaneous migration の測定は、両側の穴に TCM 199 を 5 μl ずつ注入した。また PG の白血球遊走作用 (chemoattractant) の有無は、中央の穴に対照好中球、内側の穴に TCM 199、外側の穴に 0.5~10 μg 濃度の PG を注入して判定した。これらのプレートを 37°C、2 時間 CO₂ incubator 内で反応させたのち、メタノールで固定し、検鏡遊走距離を測定した。遊走距離の測定は、chemotaxis, spontaneous migration とも中央の穴の辺縁より遊走した好中球の先頭から 3 番目の細胞までの距離を測定した。

(2) 白血球細胞内 cyclic AMP

PG による白血球遊走能の変化が、細胞内 cyclic AMP に基づくものかどうか検討した。白血球細胞内 cyclic AMP の測定は、 2×10^6 /ml の好中球浮遊液 1 ml を遠沈後、上清を捨て、好中球沈渣を 6% トリクロール酢酸 0.5 ml で 2 回遠沈処理し、上清をラジオイムノアッセイで測定した。

成 績

(1) PG の好中球への影響

健康人へパリン血より、デキストラン、リンホブレップを用いて得られた好中球浮遊液は、ライトギムザ染色にて 90% 以上の好中球を含んでいた。またトリパンブルー染色にて、PG 処理による細胞活性低下は認められなかった。

(2) PG の白血球遊走因子作用

PGE₁, E₂, F_{2α}, および TxB₂ いずれも 0.5~10 μg の濃度において、それ自身白血球遊走作用を有しなかった。

(3) PG の spontaneous migration および chemo-

図 1 プロスタグランジンによる白血球細胞内 cyclic AMP の変化

taxis に及ぼす影響

対照好中球の spontaneous migration の遊走距離は、平均 0.78 mm, chemotaxis の遊走距離は平均 1.75 mm であった。PG 処理による変化は、PGE₁ 1 μg で spontaneous migration 0.77 mm, chemotaxis 1.73 mm とやや低下したが、有意差は認めなかった。しかし、E₁ 10 μg, 100 μg 処理により spontaneous migration 0.75 mm, 0.69 mm, chemotaxis 1.68 mm, 1.61 mm と有意に低下した。PGE₂ 処理では、1 μg, 10 μg で spontaneous migration 0.8 mm, 0.78 mm, chemotaxis 1.75 mm, 1.7 mm と有意差は認めなかった。しかし 100 μg の濃度で spontaneous migration 0.73 mm と spontaneous migration のみ有意に低下した。PGF_{2α} 処理では、1 μg で変化なく、10 μg, 100 μg の濃度で spontaneous migration 0.75 mm, 0.74 mm, chemotaxis 1.62 mm, 1.68 mm と有意に低下した。Tx B₂ 処理では、1 μg, 10 μg で spontaneous migration, chemotaxis とも有意差は認めなかったが、100 μg の濃度で spontaneous migration 0.86 mm, chemotaxis 1.85 mm と他の PG と異なり、逆に有意に上昇した (表 1)。

(4) PG による白血球細胞内 cyclic AMP の変化

PGE₁ のすべての濃度、PGE₂ の 10 μg, 100 μg および PGF_{2α} の 100 μg の濃度で白血球細胞内 cyclic AMP を有意に上昇させた。逆に PGF_{2α} の 1 μg, 10 μg, TxB₂ の 10 μg の濃度で逆に有意に低下させた。Tx B₂ 100 μg ではわずかながら有意に上昇させた (図 1)。

考 案

PG と白血球遊走の関係については、現在までに幾多の報告がみられる。最初に PG と白血球遊走の関係について検討したのは Kaley⁹⁾ で、1971年 PGE₁ がウサギ腹腔内白血球に対して遊走作用 (chemoattractant) を有すると報告している。しかし、この作用はヒト白血球に対しては認められず⁹⁻¹²⁾、ヒトにおいては、PGE₂、F_{2α} によりヒト白血球 chemotaxis の亢進作用が報告された^{10,11)}。その後 Kitchen ら¹³⁾は、TxB₂ がヒト白血球 (単球) およびラット腹腔内白血球に対して遊走作用を有すると報告した。しかし Goetzl ら²⁾は、TxB₂ にはヒト白血球 (好中球) に対し遊走作用を認めておらず、その代謝産物である HHT に白血球遊走作用を認めている。さらに PGE₂ に関しては、先ほどの McClatchey ら¹⁰⁾の報告とは逆に chemotaxis を抑制すると報告している²⁾。

このように、PG と白血球遊走の関係については、実験に用いた動物、白血球の種類、PG の濃度あるいは測定条件の違いなどにより、若干矛盾した結果が得られている。ただ検査法としては、いずれの報告も Boyden が開発した millipore filter 法¹⁴⁾およびその改良法が用いられている。millipore filter 法は、2室間に挿入された filter 内を通過した白血球をカウントする検査法で、その終果判定には熟練と経験を要し、また白血球が filter 内の pore をくぐり抜けるために、PG 処理による白血球細胞膜の可塑性の変化も考慮されねばならない。

そこで今回われわれは、遊走能測定法として操作が簡単で、定量化、再現性に優れ、PG による膜の可塑性の変化を無視できるアガロース法を用い、ヒト白血球 (好中球) 遊走に及ぼす PG の影響につき検討した。

PGE₁、E₂、F_{2α} および TxB₂ いずれも 10 μg までの濃度において、それ自身白血球遊走作用 (chemoattractant) は認めなかった。この結果は、Boyden 法による諸家の報告と同様であった。spontaneous migration、chemotaxis に及ぼす影響については、PGE₁、F_{2α} 10 μg、100 μg の濃度で、両者ともに抑制された。PGF_{2α} による chemotaxis の抑制は、諸家の報告と逆の結果であった。PGE₂ は 100 μg の濃度で spontaneous migration のみ抑制した。TxB₂ に関しては、100 μg の濃度で spontaneous migration および chemotaxis とともに亢進した。PGE₂、TxB₂ の結果も若干以前の報告と異なるものであった。その原因として、測定法、用いた PG の濃度、白血球の種類の違いが考えられた。

つぎに、これらの PG による白血球遊走の変化が、白血球細胞内 cyclic AMP に由来するものかどうか検討した。白血球細胞内 cyclic AMP は、PGE₁ の 1 μg、10 μg、100 μg、PGE₂ の 10 μg、100 μg、PGF_{2α} の 100 μg の濃度で有意に上昇し、PGF_{2α} の 1 μg、10 μg と

TxB₂ の 100 μg の濃度で逆に有意に低下した。細胞内 cyclic AMP の上昇は、一般に白血球の運動や遊走を低下させる¹⁵⁾。

そこで PG による白血球遊走能と PG による細胞内 cyclic AMP との関係を見た。PGE₁ の 10 μg、100 μg、E₂ の 100 μg および F_{2α} の 100 μg の高濃度では、cyclic AMP の上昇が、白血球遊走低下に関与していると考えられた。しかし、その他の濃度においては、必ずしも cyclic AMP と白血球遊走能の間には一定の傾向がみられなかった。すなわち PGF_{2α} では 10 μg の濃度で、cyclic AMP は有意に低下するが、白血球遊走も有意に低下した。逆に TxB₂ 100 μg の濃度では、cyclic AMP はわずかながら有意に上昇するが、白血球遊走は亢進していた。また PGE₁ の 1 μg、E₂ の 10 μg では cyclic AMP は有意に上昇し、PGF_{2α} の 1 μg あるいは TxB₂ 10 μg の濃度では逆に有意に低下するが、これらの濃度においては、いずれも白血球遊走には変化がみられなかった。したがってこの PG による白血球遊走の変化は、細胞内 cyclic AMP に基づくものでなく、cyclic AMP 以外の他の因子の関与が示唆された。

つぎに、この PG と白血球遊走の関係を、生体内での炎症反応にあてはめて考えてみる。生体内に炎症が発現すると、白血球は炎症局所に遊走し、異物を貪食、殺菌、除去しようと働く。一方 PG もその炎症局所において産生され、炎症の発症、進展に重要な役割を果たすことが知られている。今回の実験結果をあわせ考えると、この炎症局所で産生される PG が炎症巣に向かう白血球遊走に多大な影響を及ぼし、白血球遊走を modulate しているものと考えられる。すなわち PGE₁、E₂、F_{2α} は抑制的に作用し、TxB₂ は逆に促進的に働くものと推察される。またこれら PG のほかに、炎症局所に集まった白血球や血小板、あるいはマスト細胞などからは、各種 HETE、leukotriene が産生され、これらにはいずれもそれ自身強い白血球遊走作用が認められている¹⁻³⁾。

このように PG は、炎症局所で産生され、それ自身炎症のメディエーターとして寄与するばかりでなく、炎症局所に向かう白血球遊走にも多大な影響を与え、この面からも炎症の発症、進展に働くものと考えられる。

以上 PG のヒト白血球遊走に及ぼす *in vitro* の実験成績を中心に、生体内での炎症との関係について考案した。

結 語

① PGE₁、E₂、F_{2α} および TxB₂ のヒト白血球遊走に及ぼす影響を、*in vitro* にてアガロース法を用いて検討した。

② PGE₁、E₂、F_{2α} および TxB₂ は、いずれも 0.5～

10 μg の濃度において、それ自身白血球遊走作用を有しなかった。

③ PG と白血球の前処置により白血球遊走に多大な影響が認められた。すなわち、 PGE_1 , $\text{F}_{2\alpha}$ 10 μg , 100 μg の濃度で spontaneous migration および chemotaxis ともに抑制され、 TxB_2 100 μg では逆に両者とも亢進した。

④ PG 処理により白血球細胞内 cyclic AMP は、 PGE_1 の 1 μg , 10 μg , 100 μg , PGE_2 の 10 μg , 100 μg , $\text{PGF}_{2\alpha}$ の 100 μg および TxB_2 100 μg の濃度で有意に上昇した。逆に $\text{PGF}_{2\alpha}$ の 1 μg , 10 μg , TxB_2 の 100 μg の濃度で有意に低下した。

⑤ PG による白血球遊走能の変化は、必ずしも細胞内 cyclic AMP に基づくものではなかった。

最後に稿を終わるにあたって、プロスタグランディンを提供していただいた小野製薬株式会社に深謝いたします。

文 献

- Goetzl, E.J., Sun, F.F.: Generation of unique mono-hydroxy-eicosatetraenoic acids from arachidonic acid by human neutrophils. *J. Exp. Med.* 150: 406-411, 1979.
- Goetzl, E.J., Gorman, R.R.: Chemotactic acid chemokinetics stimulation of human eosinophil and neutrophil polymorphonuclear leukocytes by 12-L-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid (HHT). *J. Immunol.* 120: 526-531, 1978.
- Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M. V., Shipley, M.E., Smith, M.J.H.: Leukotriene B_4 , a potent chemokinetics and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286: 264-265, 1980.
- Nelson, R.D., Quie, P.G., Simmons, R.L.: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *J. Immunol.* 115: 1650-1656, 1975.
- 坂野 堯, 沢野邦彦: 白血球 (食細胞) 機能検査. 遊走能 (走行能). *日本臨床* 37: 815-818, 1979.
- 辻 芳郎, 楊井正紀, 柳 忠道: 好中球機能. 1. 好中球の走化能. *臨床免疫* 13: 371-374, 1981.
- 近藤元治, 古川泰正: 好中球の遊走能検査. *臨床免疫* 26: 148-156, 1982.
- Kaley, G., Weiner, R.: Effect of prostaglandin E_1 on leukocyte migration. *Nature New Biol.* 234: 114-115, 1971.
- Walker, J.R., Smith, M.J.H., Ford-Hutchinson, A.W.: Prostaglandins and leucotaxis. *J. Pharm. Pharmac.* 28: 745-747, 1976.
- McClatchey, W., Snyderman, R.: Prostaglandins and inflammation: Enhancement of monocyte chemotactic responsiveness by prostaglandin E_2 . *Prostaglandins* 12: 415-426, 1976.
- Diaz-Perez, J.L., Goldyne, M.E., Winkelmann, R.K.: Prostaglandins and chemotaxis: Enhancement of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$. *J. Invest. Dermatol.* 66: 149-152, 1976.
- Pazzaglia, A., Barker, A., Warin, A.P., Greaves, M.W.: Failure of prostaglandins, prostaglandin metabolites and arachidonic acid to elicit chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes. *Brit. J. Dermatol.* 96: 533-536, 1977.
- Kitchen, E.A., Boot, J.R., Dawson, W.: Chemotactic activity of thromboxane B_2 , prostaglandins and their metabolites for polymorphonuclear leukocytes. *Prostaglandins* 16: 239-244, 1978.
- Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody & antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115: 453-466, 1962.
- Hill, H.R., Estenson, R.D., Quie, P.G., Hogan, N.A., Goldberg, N.D.: Modulation of human neutrophil chemotactic responses by cyclic 3', 5'-guanosine monophosphate and cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. *Metabolism* 24: 447-456, 1975.