イヌ多形核白血球から精製した中性チオールプロテイナーゼ による IgG からの単核細胞遊走因子の生成

山 崎 和 久

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

(指導：原 耕二教授)

新潟大学歯学部口腔生化学教室

(指導：野原広美教授)

(昭和59年12月20日受付)

Production of Chemotactic Factor for Mononuclear Cells from Cleavage with Neutral Thiol Proteinase of Dog PMN Leukocyte

Kazuhisa YAMAZAKI

Department of Periodontology, Niigata University School of Dentistry

(Director : Prof. Kohji HARA)

Department of Oral Biochemistry, Niigata University School of Dentistry

(Director : Prof. Hiroyoshi NOHARA)

The purpose of this study was to explore the role of partially purified neutral thiol proteinase from dog PMN leukocyte on the production of chemotactic factor for mononuclear cells from IgG.

PMN leukocytes were obtained from heparinized blood by sedimentation with dextran and centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient. The cells were homogenized in 0.25 M sucrose and extracted with 0.01 M citrate at 4°C for 4 hours. The extracts were purified by sequential column chromatographies on DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, and Sephadex G-150, and the final preparation was purified to about 699-fold. Molecular weight of the thiol proteinase was estimated to be about 50,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteinase activity was measured using ³H-labeled casein with high specific activity as substrate. The purified neutral thiol proteinase was stimulated by 2-mercaptoethanol and dithiothreitol and inhibited almost completely by

monoiodoacetate.

IgG was purified by affinity column chromatography of gamma fraction from dog serum.

Mononuclear cells as indicators were isolated from peripheral blood by centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient and from submandibular lymph-node, and suspended at a concentration of 1×10^6 /ml in RPMI 1640 medium containing 10% heat inactivated FCS.

The assay for chemotaxis was done by modified Boyden's method using polycarbonate filter and chemotactic chamber. The upper compartment of the chamber contained 2×10^5 cells and the lower one contained digestion products of IgG by the thiol proteinase which were diluted with the same medium described above, and incubated at 37°C for 90 minutes in a 5% CO₂-atmosphere.

The results showed that chemotactic activity was elaborated by the cleavage of IgG by the neutral thiol

proteinase, and the maximal migration was obtained at 0.07 μg ~0.35 μg of the proteinase. And the migrated cells were estimated to be lymphocyte and

monocyte.

Further work is needed to clarify the role of digestion products of IgG in periodontal disease.

Key words : Polymorphonuclear leukocyte, Neutral thiol proteinase, Immunoglobulin G, Chemotactic factor for mononuclear cells

要旨 : イヌの末梢血多形核白血球より中性チオールプロテイナーゼを部分精製し、その性質について検討するとともに、IgG に作用させた結果生ずる遊走活性因子についても検討した。酵素は多形核白血球のホモジネートから、酸抽出、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過を経て 699 倍に精製された。また分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約 50,000 と推定され、至適 pH は 7~8 であった。

次にイヌのアフィニティー精製 IgG に部分精製した酵素を至適条件で作用させ、その反応液の遊走因子としての活性をイヌ末梢血単核細胞及び顎下リンパ節細胞を用いて検討した。その結果、0.07 μg から 0.35 μg の酵素を作用させた時に遊走細胞数は最大となり、膜に対する付着性から遊走細胞はリンパ球及び単球であることが示唆された。

索引用語 : 多形核白血球, 中性チオールプロテイナーゼ, 免疫グロブリン G, 単核細胞遊走因子

緒 言

リンパ球, マクロファージを始めとする単核系の細胞は宿主の免疫応答, あるいは創傷の治癒に関与しているということは多くの研究者により示されている¹⁾。一方, 歯肉炎, 歯周炎に罹患している組織には多くの細胞浸潤がみられ, 局所において種々な免疫応答が起こっていることを示唆する報告も多数ある²⁾。

また Schroeder & Page³⁾ は歯周疾患の進行を組織学的及び微細構造学的に分類して病期を分け, 組織内に浸潤している優勢な細胞群は多形核白血球, リンパ球, 形質細胞の順に移行すると述べている。

これらの浸潤細胞は, 遊走因子により局所に動員されるのであるが細菌由来の遊走因子⁴⁾, 補体由来の遊走因子⁵⁾, 免疫グロブリン由来の遊走因子⁶⁾ 及び結合組織タンパク質由来の遊走因子⁷⁾ 等の多形核白血球に対する因子についてはかなり明らかにされているが, 単核細胞の遊走因子についての報告^{8~11)} は少ない。またそれら遊走因子の局所における役割については, 未だ不明の点が多い。

歯周疾患においてもこれらの遊走因子が作用していると考えられるが, 現在までのところ歯垢(プラーク)あるいは口腔細菌の中の遊走因子についての報告^{12,13)} が大部分であり, 炎症局所での細胞の動員機構について検討したものはない。

今回著者は, イヌの多形核白血球中に IgG を分解する酵素を見出し, その性質を明らかにすると共に, その蛋白分解酵素による処理の結果として単核細胞に対する IgG 由来の遊走活性因子の生成を認めたのでこれについ

て報告するとともに歯周疾患における意義についても考察してみたい。

材料および方法

1. 試薬および材料

³H-Formaldehyde は New England Nuclear から, Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), Pepstatin A, N α -p-tosyl-L-lysine-chloromethylketone (TLCK), Antipain, Elastatinal は SIGMA から, 又 Monoiodoacetate, N-ethylmaleimide は和光純薬から購入し, E-64-c については花田和紀博士(大正製薬総合研究所)より供与された。

2. イヌ多形核白血球からの中性チオールプロテイナーゼの精製

1) 多形核白血球抽出液の調整

多形核白血球はネンブータル全身麻酔下 (0.3 ml/kg) で左右総頸動脈より heparin 処理を施して採取した全血液より分離した。すなわち採取した血液に 5% (w/v) dextran を含む 0.85% NaCl 溶液を等量加え, 静かに混和した後室温で 1 時間静置した。大部分の赤血球は沈殿し, 多形核白血球を含む血漿が上層に残った。更にこの上層から多形核白血球を Ficoll-Hypaque 法¹⁴⁾ によりリンパ球, 単球から分離した。多形核白血球画分を生理食塩水で洗い, わずかに残っている赤血球を低張溶血で取り除き, 再び生理食塩水で洗った後, 細胞数を算定した。

10⁸ 個当たり 1 ml の 0.25 M sucrose を加えて氷冷下で 15 分間ホモゲナイズした。生じたホモジネートに 9 倍量の 0.01 M citrate (pH 2.8) を加えて 4°C にて 4 時間振

盪抽出を行い、 $25,000\times g$ で20分間遠心し、上清を70%飽和硫酸アンモニウムで塩析した。なお以下の操作は 4°C の低温室で行った。 $70,000\times g$ で45分間遠心後、沈渣を2 mM 2-mercaptoethanol, 0.2 mM EDTA を含む0.02 M phosphate buffer (pH 7.2) に溶解し、同bufferに対して20時間透析した。透析終了後 $3,000\times g$ で10分間遠心して不溶性成分を取り除き、多形核白血球抽出液とした。

2) カラムクロマトグラフィー

調整した白血球抽出液は DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50, Sephadex G-150 を用いて順次分画した。

3. 蛋白分解能の測定

部分精製した酵素の蛋白分解能は Rice ら¹⁵⁾の方法により ^3H -formaldehyde でラベルした casein を基質として行った。

反応液全量 $100\ \mu\text{l}$ 中に次のものを含む。 $0.1\ \text{M}$ phosphate buffer (pH 7.2) $50\ \mu\text{l}$, 5% NaCl $5\ \mu\text{l}$, $1\ \text{mM}$ 2-mercaptoethanol, $2\ \text{mM}$ EDTA をそれぞれ $1\ \mu\text{l}$, 及び酵素溶液。これを 25°C で20分間インキュベートした後、 ^3H -casein 溶液 $5\ \mu\text{l}$ ($65,000\ \text{cpm}$) を加え 37°C で90分間インキュベートした。反応終了後、等量の20% trichloroacetate (TCA) を加えて激しく攪拌し、 0°C で1時間放置した。その後 $10,000\times g$ で10分間遠心、上清の $100\ \mu\text{l}$ をジオキサン系シンチレーター液 $10\ \text{ml}$ に加えて放射活性を Packard model 3320 液体シンチレーションカウンターで測定した¹⁶⁾。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Weber & Osborn の方法¹⁷⁾に準じて行った。濃縮ゲルは2.5% acrylamide, 0.625% bis-acrylamide のものを用い、分離ゲルは10% acrylamide, 0.27% bis-acrylamide を用いた。泳動 buffer には $0.025\ \text{M}$ Tris-glycine- 0.1% SDS (pH 8.3) を使用し、定電流にて泳動を行った。泳動終了後、ゲルを取り出し通法により coomassie brilliant blue で染色した。

5. 遊走能の測定

1) 基質としてのイヌ IgG の精製

イヌ全血清から塩析により γ -globulin 画分を得た。さらに抗イヌ IgG 家兔血清 (IgG 画分) を固定化させた Sepharose 4B のアフィニティーカラムを用いて精製イヌ IgG を得た。

2) 指示細胞の調整

指示細胞としてイヌ末梢血単核細胞と顎下リンパ節細胞を用いた。

末梢血単核細胞は以下のようにして調整した。heparin 処理を施した真空採血管を用いてイヌ後肢伏在静脈より採血し、生理食塩水で2倍に希釈した後に Ficoll-Hypaque 法を用いて通法によりリンパ球層を取り出した。phosphate buffered saline (PBS pH 7.2) で2度洗浄後、加熱非働化してある fetal calf serum (FCS) 10% を含む RPMI 1640 培地に $1\times 10^6/\text{ml}$ になるように浮遊させた。

顎下リンパ節細胞は以下のようにして調整した。ネンブータル全身麻酔下にて顎下リンパ節を摘出し、RPMI 1640 培地中で結合繊維膜を除去した。ピペッティング操作を数回行ってからナイロンメッシュを通し、PBS で2回洗浄後同様に浮遊させた。

3) 遊走活性因子の調整

終濃度 $0.1\ \text{M}$ の phosphate buffer (pH 7.2) 中に $0.007\ \mu\text{g}$ から $2.8\ \mu\text{g}$ までの酵素と 2-mercaptoethanol, EDTA をそれぞれ終濃度 $1\ \text{mM}$, $2\ \text{mM}$ になるように加え、 25°C で20分間インキュベートした。これにさらに精製したイヌ IgG $200\ \mu\text{g}$ を加えて 37°C で3時間反応させ、遊走活性の測定に供した。対照として酵素, IgG, 及び酵素と IgG を除いた反応液も同時にインキュベートした。

4) 遊走活性の測定

Boyden の方法¹⁸⁾に準じて行った。すなわち、バイオラド社製ブラインドウェルチャンバーを使用し、下室には先に調整した遊走活性因子を $30\ \mu\text{l}$ 含む 10% FCS 加 RPMI 1640 培地 $200\ \mu\text{l}$, 上室には指示細胞 2×10^5 個を入れ、上下室の境界にはバイオラド社製ユニポアメンブレンフィルター (直径 $13\ \text{mm}$, 厚さ $10\ \mu\text{m}$, ポアサイズ $5\ \mu\text{m}$) をはさんだ。チャンバーの上をアルミ箔で被い、5% CO_2 -95% 気相中で90分間インキュベートした後、通法に従って固定、ギムザ染色を行い、フィルターの下面まで遊走した細胞の数を顕微鏡下で400倍に拡大して算定した。なお、1検体当たり10視野を調べ、その平均値で示した。また下室内にまで遊走した細胞も回収して算定した。

6. タンパク質の定量

タンパク質の定量は Lowry らの方法¹⁹⁾で行った。

成 績

1. イヌ多形核白血球からの中性チオールプロテイナーゼの部分精製

成犬1頭から得られた多形核白血球抽出液を DEAE-

Fig. 1: DEAE-Sephadex column chromatography. The acid extract from dog PMN leukocytes (127 mg) in 0.02 M sodium phosphate buffer containing 2 mM 2-mercaptoethanol and 0.2 mM EDTA was applied to a DEAE-Sephadex A-50 column (1.6×15 cm). Elution buffer was (a) 0.02 M sodium phosphate buffer containing 2 mM 2-mercaptoethanol and 0.2 mM EDTA (pH 7.2), (b) 0.1 M NaCl in the same buffer, (c) a 220 ml of 0.1~0.5 M NaCl linear gradient in the same buffer. Fractions were collected in 4 ml. ●—● Absorbance at 280 nm; ○—○ Thiol proteinase activity; NaCl concentration.

Fig. 2: CM-Sephadex column chromatography. The concentrated active fraction from DEAE-Sephadex column chromatography (20 mg) in 0.02 M sodium citrate buffer containing 2 mM 2-mercaptoethanol and 0.2 mM EDTA was applied to a CM-Sephadex C-50 column (1.2×6.5 cm). Elution buffer was (a) 0.02 M sodium citrate buffer containing 2 mM 2-mercaptoethanol and 0.2 mM EDTA (pH 5.0), (b) a 74 ml of 0~0.5 M NaCl linear gradient in the same buffer. Fractions were collected in 0.8 ml. ●—● Absorbance at 280 nm; ○—○ Thiol proteinase activity; NaCl concentration.

Fig. 3: Gel filtration on Sephadex G-150. The concentrated active fraction from CM-Sephadex column chromatography (2.3 mg) was applied to a column (1.0×76 cm). Elution buffer: 0.02 M sodium phosphate buffer containing 2 mM 2-mercaptoethanol and 0.2 mM EDTA (pH 7.2). Flow rate: 24 ml/hour. Fractions were collected in 0.6 ml. ●—● Absorbance at 280 nm; ○—○ Thiol proteinase activity. a: blue dextran, b: bovine serum albumin, c: ovalbumin, d: chymotrypsinogen A.

Sephadex A-50 カラム (1.6×15 cm) を用いて分画した結果は Fig. 1 に示してある。カラムは 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.2 mM EDTA を含む 0.02 M phosphate buffer (pH 7.2) 及び 0.1 M NaCl 濃度勾配で溶出した。Fig. 1 に示すごとくチオールプロテイナーゼ活性は 0.1 M NaCl 溶出画分に認められた。この部分を 70% 飽和硫酸アンモニウムで濃縮し、2 mM 2-mercaptoethanol, 0.2 mM EDTA を含む 0.02 M citrate buffer (pH 5.0) に溶解し、同 buffer に対して充分透析した。この時点でのタンパク量は 20 mg であった。これを更に CM-Sephadex C-50 カラム (1.2×6.5 cm) で分画した。その結果チオールプロテイナーゼ活性は Fig. 2 に示す位置に溶出された。活性を持つ画分を 70% 飽和硫酸アンモニウムで濃縮し、2 mM 2-mercaptoethanol, 0.2 mM EDTA を含む 0.02 M phosphate buffer に対して透析した後に、同 buffer で平衡化した Sephadex G-150 カラム (1.0×76 cm) で分画した (Fig. 3)。

一連の精製過程でタンパク量は 365 mg から 0.13 mg になったが、一方比活性は 0.07 unit/μg から 49.7 unit/μg へと 699 倍に上昇した。また全活性は 25550 unit から 6461 unit になった (Table 1)。

このようにして精製された酵素に対する種々の阻害剤

Table 1 Purification of neutral thiol proteinase

Fraction	Total protein (mg)	Specific activity (unit/ μ g)	Total activity (unit)	Purification (fold)
Crude extract	365	0.07	25550	1
pH 2.8/As-70.	127.7	0.17	21303	2.5
DEAE-Sephadex A-50	20.0	0.38	7600	5.4
CM-Sephadex C-50	2.3	3.11	7153	43.3
Sephadex G-150	0.13	49.7	6461	699

1 unit of activity=that hydrolyzing 1 n mol ³H-casein for 1 min.

Table 2 Effects of activators and inhibitors on neutral thiol proteinase from dog PMN leukocytes

Effector	Final conc. (mM)	Relative activity (%)
none		100
Iodoacetate	50	3.2
	10	8.5
	1	23.2
E-64-c	1	66.1
	0.3	100.2
TLCK	1	100.2
	0.1	85.2
Antipain	1	32.4
	0.1	93.2
N-ethylmaleimide	1	106.4
	0.1	105.7
PMSF	1	94.7
Elastatinal	1	112.1
Pepstatin A	1	96.3
DTT	5	135.4
	1	173.2
2-mercaptoethanol	1	157.9

20 μ g of Sephadex G-150 fraction was used for the proteinase assay in the presence of indicated concentration of effectors. The 100% activity was 2,000cpm/tube.

及び活性化剤の作用は Table 2 にまとめてある。チオールプロテイナーゼ阻害剤の中では monoiodoacetate の作用が最も強く、50 mM で約 97%，10 mM で 91.5%，1 mM でも約 77% の阻害が認められた。E-64-c は 1

Fig. 4 : Effect of pH on neutral thiol proteinase activity. The Sephadex fraction was assayed. The following buffers were used at a final concentration of 0.05 M : citrate-phosphate buffer pH 3~pH 6, (x); sodium phosphate buffer pH 6~pH 8 (o); Tris-HCl buffer pH 8~pH 10 (●).

mM の濃度で約 34% の阻害が認められたが 0.3 mM ではほとんど効果がなかった。また TLCK の阻害活性もわずかであったが antipain は 1 mM で 68% の阻害を示した。

一方 dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol は酵素活性を上昇させ、特に DTT は 1 mM の濃度で 73% の活性の上昇を示した。

酵素の pH に依存した活性の変化は Fig. 4 に示してある。pH 7 から pH 8 の間で活性はピークを示し、pH 4 以下及び pH 10 以上では著明に低下した。

Fig. 5 は精製の各段階における酵素標品の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像である。Sephadex G-150 によるゲルろ過後の最終標品では、明らかな一本のバンドとわずかに染色される数本のバンドが認められ

Fig. 5 : Electrophoretic patterns of proteinase preparations at each purification step.

- a : crude extract of dog PMN leukocytes
- b : acid extract
- c : CM-Sephadex fraction
- d : Sephadex G-150 fraction

Fig. 6 : Enhancement of migration of dog peripheral blood mononuclear cell (a) and lymphnode cell (b) by the action of neutral thiol proteinase on IgG. The reaction conditions were described under “Materials and Methods”.

Table 3 Number of migrated cells to lower compartment of chamber

amount of enzyme used for the cleavage of IgG (μg)	number of cells ($\times 10^3$)	
	peripheral blood mononuclear cell	lymphnode mononuclear cell
0	6	10
0.007	6	18
0.035	18	18
0.07	26	20
0.35	32	26
0.7	24	12
1.4	22	12
2.8	14	10

た。分子量マーカーの易動度より主要なバンドの分子量は約 50,000 と推定された。またデンシトメトリーから約 67% の純度と計算された。

2. 遊走試験

末梢血単核細胞及び顎下リンパ節細胞の遊走試験の結

果は Fig. 6 に示してある。IgG に作用させる酵素量の増加に伴い、いずれの指示細胞も遊走する細胞数の割合が増加し、末梢血単核細胞では 0.35 μg 、顎下リンパ節細胞では 0.07 μg の酵素を加えた反応液を遊走活性因子とした場合に最高値を示し、それ以上の酵素量では逆に

遊走細胞数は減少した (Table 3)。

考 察

古くから白血球が細菌などに向かって遊走して行く事実や、炎症局所に集積する現象は広く知られていたが、この遊走を起こさせる物質の化学的性状や作用機作については殆ど知られていなかった。しかし、*in vitro* での遊走因子の解析を可能にする新しい方法¹⁸⁾が開発されて以来、多くの事実が明らかとなってきた。

歯周疾患と関連した遊走因子についてもいくつかの報告^{12,13,20,21)}があるが、多くはプラークあるいは細菌体由来の物質に対する多形核白血球の遊走を検索したものである。歯肉炎の初期には、多数の多形核白血球が局所に浸潤してくるが、炎症の進展に伴ってリンパ球へと移行することが知られている³⁾。ところが、宿主の免疫応答に大きく関与していると考えられる細胞を誘導する物質、あるいは炎症の過程において発現し、作用する遊走因子についての研究はほとんど見あたらない。

以前に著者は²²⁾、イヌに実験的に歯肉炎を発生させ、その進展に伴う歯肉中の中性チオールプロテイナーゼの活性を経時的に測定し、炎症の進展に伴ってその活性が上昇することを示した。

一方、Higuchi ら^{23,24)}はウサギ多形核白血球の SH-dependent protease が IgG, IgM を分解することにより、リンパ球に対する遊走因子を生ずることを示した。また、Kobayashi ら²⁵⁾は cathepsin B1 が多形核白血球に対して遊走因子となると報告している。このように細胞に含まれる酵素と内因性の遊走因子との関わりについて論じている報告もある。今回、著者は以上の結果をふまえ、多形核白血球からリンパ球への移行にいかなる因子が関与するかを検索した。

多形核白血球は多くの酵素を持っていることが知られている。例えば cathepsin D, β -glucuronidase, acid phosphatase は細胞内消化に関与しており、elastase, collagenase は結合組織破壊に関与していると言われている。今回著者が部分精製した酵素は上に挙げたものとは分類上異なる thiol proteinase と呼ばれるもので、DTT, 2-mercaptoethanol により活性が上昇し、monoiodoacetate で阻害される性質を持っていた。またこの酵素は IgG を分解することを示唆する結果が得られたが、他の IgG 分解酵素とは異なる性質を示した。

Ishikawa ら²⁶⁾はヒトの多形核白血球より IgG を分解する中性の protease を部分精製したが、それは cysteine

で活性が上昇したもののエラスターゼ様の酵素であると述べており、エラスターゼ阻害剤である elastatinal によって阻害が認められなかった著者の酵素とは異なるものであった。また推定分子量も Ishikawa らの分離したものは約 25,000 であったのに対し、著者のそれは約 50,000 であった。Menninger ら²⁷⁾は cathepsin B1 が IgG を分解することを示したが、cathepsin B1 は中性以上の pH ではほとんど活性がなく、また TLCK により殆ど 100% 阻害されるのに対し、著者の場合は阻害が比較的弱かったということ、及び分子量の相違から cathepsin B あるいは cathepsin L 等とも異なるものであることが示された。

酵素活性の測定には、既報²²⁾のごとく ³H-formaldehyde で標識した casein を使用したが、この方法は非常に高い感度を持つ。また精製過程ではタンパク質を始めとする多数の物質が混在しており、従来の吸光度による測定法では不可能であったためでもある。現在種々の合成基質の利用が可能になったが、今回は使用しなかったものでそれによる性質の比較はできなかった。

部分精製した酵素の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるパターンは Fig. 5 に示した通りであり、ほぼ単一のバンドとなっていたのでイヌ IgG の分解に用いることとした。基質を IgG とした理由は次の通りである。歯肉炎の初期においては、他の部位の非特異的炎症と同様、滲出性炎であり、この時期は血清由来の成分が多量に歯肉組織に滲出している。すなわち血清 IgG も局所に多量に存在していると考えられ、事実山下は²⁸⁾実験的に起こした歯肉炎初期の歯肉 IgG は大部分が血清由来であると述べている。また歯肉結合組織はコラーゲン及びプロテオグリカンによって構成されているが、多形核白血球が浸潤細胞の主体を占める初期病変においては結合組織破壊がわずかであるという事実を考慮に入れた。

イヌ IgG は血清の γ -フラクションよりアフィニティーカラムを用いて精製したものであり、免疫学的には単一の標品となっていたが電気泳動による分析では尚単一でなく、他のタンパクの混在が認められた。しかし、混在している IgG 以外の低分子物質の単核細胞遊走に及ぼす影響については、IgG のみを遊走活性因子として用いた場合についても検討しており、対照実験の値とほぼ同じであったことから、この実験結果には大きな影響を及ぼさなかったと考えられる。

実際に遊走活性を示す IgG 由来のフラグメントがどのような構造であるのかについての検索は今回は行ってい

ないが, Higuchi ら²⁴⁾は IgG の Fc 部由来のフラグメントがラットの spleen cell に対して活性を持ち, Fab 部にはその作用がなく, また non-adherent cell ではなく, adherent cell (B-cell) に効果があったと述べている。著者の予備的実験でイヌの末梢血より Ficoll-Hypaque 法を用いて分離した細胞をやはり adherent cell と non-adherent cell に分けて補体成分に対する遊走活性を調べた結果, 分離した細胞の adherent : non-adherent の比が約 1 : 2 であるのに対し, 遊走細胞数は約 20 : 1 であった。また Falk ら²⁹⁾によればヒトの末梢血より Ficoll-Hypaque 法で分離した細胞のうちで遊走活性因子に反応する細胞集団は 20~40% であり, それらは複数の遊走活性因子に対して反応すると述べている。

IgG 分解に用いる酵素量を変えて kinetics をとった場合, 遊走細胞の数は酵素量の増加に伴って増加し, 末梢血単核細胞, 顎下リンパ節細胞とも 0.07 μ g から 0.35 μ g の間の酵素量でピークとなり, それ以上では減少する傾向を示した。Ogawa ら¹¹⁾も N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), Lipopolysaccharide (LPS) で活性化した血清を遊走活性因子として kinetics をとりヒト単核細胞の遊走を調べ, 活性のピークを認めている。この理由は生成した遊走因子 (chemotactic fragment) に構造上の変化が起こり, その活性が低下した, つまりフラグメントの中の遊走活性因子としての機能を発現する構造がプロテイナーゼの量が増えたために分解された可能性が考えられる。

前田ら³⁰⁾は歯周疾患患者歯肉より抽出液を調整し, その中の遊走因子について検索し, 単核, 多形核白血球に対する遊走活性の主体は IgG 由来の物質が演じていると述べている。その中で IgG 由来の遊走因子を生成するものが何であるかについては言及していなかったが, 本研究では, イヌ多形核白血球より分離部分精製した分子量約 50,000 の中性チオールプロテイナーゼが IgG を分解することにより末梢血単核細胞, 顎下リンパ節細胞に対して遊走活性を持つ物質が生成されることが示された。両者の遊走因子が共通の性質を持つかどうかについては今後の検索が必要である。

またメンブレンフィルター下面に付着した細胞は単核と考えられるが, フィルターの孔を突き抜けて下室内にまで遊走した細胞 (リンパ球と考えられる) についても算定した (Table 3)。これらは 10^3 から 10^4 の範囲であり, フィルター下面の細胞と同様, いずれの指示細胞も 0.07 μ g から 0.35 μ g の酵素量でピークとなった。このようにイヌ多形核白血球の中性チオールプロテイナーゼ

が IgG を分解して生ずる遊走活性因子は単核にもリンパ球にも作用することが示唆された。

末梢血単核細胞と顎下リンパ節細胞でフィルター下面に付着した遊走細胞数にかなり大きな差が出たがこれは末梢血に比して顎下リンパ節の中の単核を含む割合が低いためと思われる。

今後は歯周疾患における中性チオールプロテイナーゼの役割, 及び実際の歯周炎の場において IgG 由来の遊走因子の生成に関与しているのかどうかを検索することが重要な課題となろう。

結 論

今回, 著者は歯肉炎における浸潤細胞の多形核白血球から単核細胞への移行の機構を解明するための基礎的研究として以上に述べた方法で行い, 以下の知見を得た。

1. イヌの末梢血多形核白血球は, 分子量約 50,000, DTT, 2-mercaptoethanol で活性化され, moniodoacetate で不活化される至適 pH 7~8 の中性チオールプロテイナーゼを含むことが示された。
2. 分離部分精製した酵素と IgG を反応させた結果, Ficoll-Hypaque 法で分離した末梢血単核細胞及び顎下リンパ節細胞に対して遊走活性を持つことが示された。
3. IgG と反応させる酵素量が増えるのに伴い, 遊走細胞数は増えたが, 一定以上酵素量が増えると逆に遊走細胞数は減少した。
4. 生成した遊走因子は遊走細胞のメンブレンフィルターに対する付着性から, 単核及びリンパ球に対して効果があることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました原 耕二教授, 野原広美教授に感謝申し上げますと共に, 本研究の遂行に際して御援助および御協力いただきました本学口腔生化学教室員ならびに保存学第 2 教室員の皆様に深謝いたします。

また, 貴重な試薬を供与していただきました大正製薬総合研究所の花田和紀博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Cohn, Z.A.: The structure and function of monocytes and macrophages. Adv. Immunol., 9 : 163-214, 1968.

- 2) Nisengard, R.J. : The role of immunology in periodontal disease. *J. Periodontol.*, 48 : 505-516, 1977.
- 3) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab. Invest.*, 33 : 235-249, 1976.
- 4) Adamu, S.A. and Sperry, J.F. : Polymorphonuclear neutrophil chemotaxis induced and inhibited by *Bacteroides* spp. *Infect. Immun.*, 33 : 806-810, 1981.
- 5) Wilson, D.M., Ormrod, D.J. and Miller, T.E. : Role of complement in chemotaxis : Study of a localized infection. *Infect. Immun.*, 29 : 8-12, 1980.
- 6) Yamamoto, S., Nishimura, M. and Hayashi, H. : The natural mediator for PMN emigration in inflammation. V. The site of structural change in the chemotactic generation of immunoglobulin G by inflammatory SH-dependent protease. *Immunology*, 24 : 791-801, 1973.
- 7) Postlethwaite, A.E. and Kang, A.H. : Collagen- and collagen peptide- induced chemotaxis of human blood monocytes. *J. Exp. Med.*, 143 : 1299-1307, 1976.
- 8) Ward, P.A. : Chemotaxis of mononuclear cells. *J. Exp. Med.*, 128 : 1201-1221, 1968.
- 9) Snyderman, R., Altman, L.C., Hausman, M.S. and Mergenhagen, S.E. : Human mononuclear leukocyte chemotaxis : A quantitative assay for humoral and cellular chemotactic factors. *J. Immunol.*, 108 : 857-860, 1972.
- 10) Altman, L.C., Snyderman, R., Oppenheim, J.J. and Mergenhagen, S.E. : A human mononuclear leukocyte chemotactic factor : Characterization, specificity and kinetics of production by homologous leukocytes. *J. Immunol.*, 110 : 801-810, 1973.
- 11) Ogawa, T., Kotani, S., Fukuda, K., Tsukamoto, Y., Mori, M., Kusumoto, S. and Shiba, T. : Stimulation of migration of human monocytes by bacterial cell walls and muramyl peptides. *Infect. Immun.*, 38 : 817-824, 1982.
- 12) Lindhe, J. and Socransky, S.S. : Chemotaxis and vascular permeability produced by human periodontopathic bacteria. *J. Periodont. Res.*, 14 : 138-146, 1979.
- 13) Gale, K.M., Powell, R.N. and Seymour, G.J. : The polymorphonuclear leukocyte chemotactic response to *Bacteroides melaninogenicus* 1. Effect of human serum albumin. *J. Periodont. Res.*, 18 : 119-125, 1983.
- 14) Boyum, A. : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 21 : 77-89, 1968.
- 15) Rice, R.H. and Means, G.E. : Radioactive labeling of proteins in vitro. *J. Biol. Chem.*, 246 : 831-832, 1971.
- 16) Bray, G.A. : A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.*, 1 : 279-285, 1960.
- 17) Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406-4412, 1969.
- 18) Boyden, S. : The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*, 115 : 453-466, 1962.
- 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
- 20) Helldén, L. : Monocyte chemotactic activity in human dental plaque. *J. Periodont. Res.*, 12 : 30-36, 1977.
- 21) Miller, R.L., Folke, L.E.A. and Umana, C.R. : Chemotactic ability of dental plaque upon autologous or heterologous human polymorphonuclear leukocytes. *J. Periodontol.*, 46 : 409-414, 1975.
- 22) Yamazaki, K. : Change of neutral thiol proteinase activity in dog gingiva during the progress of inflammation. *Jpn. J. Oral Biol.*, 26 : 930-940, 1984.
- 23) Higuchi, Y., Honda, M. and Hayashi, H. : Production of chemotactic factor for lymphocytes by neutral SH-dependent protease of

- rabbit PMN leukocytes from immunoglobulins, especially IgM. *Cell. Immunol.*, 15 : 100-108, 1975.
- 24) Higuchi, Y., Ishida, M. and Hayashi, H. : A lymphocyte chemotactic peptide released from immunoglobulin G by neutrophil neutral thiol protease. *Cell. Immunol.*, 46 : 297-308, 1979.
- 25) Kobayashi, K., Endo, Y., Matsuda, K., Tanaka, K. and Misaka, E. : A role of cathepsin B1 in polymorphonuclear leukocytes chemotaxis. *Life Science*, 19 : 1199-1210, 1976.
- 26) Ishikawa, I. and Cimasoni, G. : Partial purification of a neutral protease from human polymorphonuclear leukocytes and its proteolytic effect on immunoglobulin G. *Arch. Oral Biol.*, 23 : 933-940, 1978.
- 27) Menninger, H., Fehr, K., Böni, A. and Otto, K. : Digestion of human immunoglobulin G by bovine cathepsin B1. *Immunochemistry*, 13 : 633-637, 1976.
- 28) 山下 智 : イヌの実験的歯肉炎における歯肉免疫グロブリンの動態. *日歯周誌*, 24 : 249-265, 1982.
- 29) Falk, W. and Leonard, E.J. : Human monocyte chemotaxis : Migrating cells are a subpopulation with multiple chemotaxin specificities on each cell. *Infect. Immun.*, 29 : 953-959, 1980.
- 30) 前田勝正, 砥上順一, 鬼村晃太郎, 上別府敏之, 青野正男 : 歯周疾患患者歯肉における遊走活性因子について. *日歯周誌*, 24 : 436-445, 1982.
-