マウス腹腔マクロファージの付着,伸展 あるいは貪食と,プロスタグランジン I2 及び トロンボキサン A2 産生に関する研究

甲第1号

小山岩雄

マウス腹腔マクロファージの付着,伸展 あるいは貪食と,プロスタグランジン L2 及び

トロンボキサン A2 産生に関する研究

小山岩雄

	Vhr
1	

緒 論	1
 第1章 マウス腹腔マクロファージの調製とマクロファージ 内 6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ 量の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3
第2章 刺激剤投与により誘導されたマウス腹腔マクロ ファージ内 6-keto-PGF _{1α} および TXB ₂ 量の変化	14
第3章 In vitro におけるマウス腹腔マクロファージからの 6-keto-PGF _{1α} および TXB ₂ 放出についての検討	21
第1節 マクロファージの付着, 伸展現象と 6-keto-PGF _{1α} および TXB ₂ 放出の関係	21
第2節 ザイモサンによるマクロファージからの 6-keto- PGF _{1α} および TXB ₂ 放出の促進	27
総 括	37
謝 辞	38
参考文献	40

este de la companya d

アラキドン酸カスケードにおけるプロスタグランジン (prostaglandin, 以下 PG と略す)類, トロンボキサン (thromboxane, 以下 TX と略す)類,およびロイコトリエン (leukotriene, 以下 LT と略す)類は種々の組織や細胞に分布し、様々な生理活性を示している¹⁾。リン脂質, 特にホスファチジルコリンからホスホリパーゼ A₂によりアラキドン酸が遊離し、リポキシゲナ ーゼ等の作用により LT 類が生合成される²⁾。従来からアナフィラキシー発症時に肺で作られ、 気管支平滑筋を強く収縮させる物質を SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis)³⁾ と 呼んでいるが、実はこれは LTC₄、LTD₄ および LTE₄ であることが最近確認された⁴⁻⁶⁾。一方 遊離されたアラキドン酸はシクロオキシゲナーゼにより PGG₂ および PGH₂ へと代謝され、さ らに種々のイソメラーゼあるいはシンテターゼ類により PG 類および TX 類が生合成される。 これらの PG 類および TX 類の中で特に PGI₂⁷⁰ および TXA₂⁸⁰ は PGE あるいは PGF_{2α} に比べ数10倍高い血小板凝集あるいは平滑筋収縮に対する反応を示すが⁹⁻¹³⁾、非常に不安定でそ れぞれ安定代謝産物である 6-keto-PGF_{1α}¹⁴⁾および TXB₂⁸⁰へ変換されることが知られている。

最近,この PGI₂ および TXA₂ の炎症への関与が注目されている¹⁵⁻¹⁷⁾。炎症は細胞の損傷に 始まり、白血球、マクロファージ等の浸潤へと続く一連の生体防御反応である。この炎症部位に 浸潤する種々の細胞は様々なメディエーター(リンホカイン、キニン等)を産生することが知ら れている¹⁸⁾。PGI₂ は慢性炎症巣の血管透過性を著しく亢進させる作用を持ち¹⁹⁾、また TXB₂ に は白血球誘引作用がある²⁰⁾。Humes ら²¹⁾は *in vitro* でマウス腹腔マクロファージに起炎剤で あるザイモサンを作用させると、PGE₂ および 6-keto-PGF₁^α は放出されるが、TXB₂ は検出 されなかったと報告している、一方室田ら²²⁾は流動パラフィンで誘導されたモルモット腹腔マク ロファージには TXB₂ 合成能があると報告している。このようにマクロファージにおける TXB₂ 産生について一定の結論は得られていない^{21,23,24)}。しかしながら上に述べた知見から、PG 類が 炎症の推移と何らかの関係があるものと思われる。しかし PG 類がどのようなきっかけにより産 生されるのか、またそれが炎症にとってどのような重要な役割を果しているかは、現在解明され ていない。さらにマクロファージは抗原性を有する異物を貪食すると、その情報を抗体産生細胞 へ伝達する役割や、異物を消化分解するなど種々の作用を持つ興味深い細胞である。

そこで本研究ではマクロファージが種々の作用を示すとき、マクロファージでの PG 類産生が どのように変化するのか解明する目的でマウス腹腔マクロファージを用いて、6-keto-PGF₁ および TXB₂の産生を中心に検討を行った。6-keto-PGF₁ および TXB₂の測定はラジオイムノ アッセイにて行ったが、この測定法のうち、抗体結合標識抗原と遊離標識抗原との分離法に改良

- 1 -

を加え、さらにマクロファージ試料については抽出操作を必要とせず、直接ラジオイムノアッセ イにて測定可能であることを確認した。また *in vivo* で刺激剤により誘導されたマクロファー ジ内 6-keto-PGF₁^a および TXB^a 量は常在 (resident) マクロファージと比較して変化が認め られ、この変化が腹腔浸出細胞の中でマクロファージに特有であることを確認した。そこで常在 マクロファージを取り出し、*in vitro* で種々の検討を行った結果、腹腔浸出細胞からマクロフ ァージを分離調製する際に、マクロファージから 6-keto-PGF₁^a および TXB^a が放出されるこ とを知り、この両物質の放出にマクロファージのガラス表面 への付着 (adhesion) および伸展 (spreading) が直接的に関与することを明らにかした。 このマクロファージの付着、 伸展とい う現象についてはシリコン処理したガラス皿あるいはテフロン膜との関係についての検討を行い、 マクロファージの伸展と 6-keto-PGF₁^a および TXB^a の放出との間に興味ある関係を見出した。 また *in vitro* でマクロファージにザイモサンを作用させたときの 6-keto-PGF₁^a および TXB^a 放出について検討した結果、この両物質の産生の初期、すなわちリン脂質からのアラキドン酸の 遊離の調節にホスホリパーゼ A^a が関与し、さらにこの反応は細胞内サイクリック AMP(cyclic AMP, 以下 cAMP と略す)により調節されていることが、ハイドロコーチゾンなどを使用し た酵素の阻害実験から明らかとなった。

第 1 章

マウス腹腔マクロファージの調製とマクロファージ内 6-keto-PGF1a および TXB2 量の測定

マクロファージ内 6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ 量の測定にあたり, ラジオイムノアッセイに 用いる抗 6-keto-PGF_{1α} および抗 TXB₂ 抗血漿を作成した。その抗体の特異性, およびマクロ ファージ内 6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ を直接ラジオイムノアッセイによって定量できるか否 かについて検討を行った。PG 類のラジオイムノアッセイでの抗体結合標識抗原と遊離標識抗原 との分離法には二抗体法²⁵⁾あるいはデキストラン炭末法²⁶⁾が良く使用されているが,本実験では 細胞培養等の研究に用いられているセルハーベスター (LM-101, Labo Mash, ラボサイエンス 社)の性能上の特徴をラジオイムノアッセイに応用した。その結果, この方法により短時間で多 数の試料の分離操作ができ, PG 類の測定が可能であることが示された。

マウス腹腔浸出細胞から腹腔マクロファージを分離する方法にはマクロファージがガラス表面 等に付着する性質を利用した付着法²⁶⁻²⁸⁾,あるいは密度勾配遠心分離法²⁹⁻³¹⁾が広く使用されてい る。本研究では短時間で処理できるガラス付着法によりマクロファージを分離調製した。そのマ クロファージ試料調製の過程で細胞の取り扱い方,たとえば付着したマクロファージをガラス表 面から剝がす操作がマクロファージにとって物理的な影響となり,PG 類の産生を刺激すること が判った。

and the second statement

〔実験材料および方法〕

抗 6-keto-PGF_{1a} および抗 TXB₂ 抗血漿の作成および標識抗原

6-keto-PGF_{1α} あるいは TXB₂ を Axen の方法³²⁾にしたがってウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, 以下 BSA と略す, Sigma 社) に結合させて免疫用の抗原を作成した。すな わちジメチルホルムアミド 0.5 ml に溶解した 2.8 mg の 6-keto-PGF_{1α} に N', N'-カルボニ ルジイミダゾールを 1.5 mg 加え, これを 0.75 ml に 10 mg の BSA を含む 水溶液に 滴加し た。この反応液を一夜放置した後,透析しさらに凍結乾燥して 6-keto-PGF_{1α}-BSA 結合物を作 成した。TXB₂ についても 6-keto-PGF_{1α} の場合と同様の操作を行い, TXB₂-BSA 結合物を作 成した。6-keto-PGF_{1α}-BSA あるいは TXB₂-BSA 結合物をウサギ1匹当たり約1 mg になる ように生理食塩水に溶解し、フロイントの完全アジェバントと混合し、エマルジョンとしてウサ

— 3 —

ギの足蹠部に数個所に分けて免疫した。2週間間隔で数回の免疫を行った後、ウサギの頸動脈よ りヘパリンを添加した遠心管に全採血し、3000 rpm で10分間遠心分離を行い、抗 6-keto-PGF₁ あるいは抗 TXB₂ 抗血漿を得た³⁶⁾。

標識抗原には ³H-6-keto-PGF_{1α} あるいは ³H-TXB₂ (125 あるいは 120 mCi/mmol, New Ergland Nuclear 社)を用いて, 0.9% 食塩含有ホウ酸緩衝液, 0.02 M, pH 8.0 により, 用時 希釈しラジオイムノアッセイに使用した。

抗体の力価および特異性の検討

6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ のラジオイムノアッセイで用いる 試薬の調製あるいは 試料の希 釈には、上記の緩衝液を使用した。また抗血漿の希釈液には 0.01% ウサギ γ -グロブリンを含む 緩衝液を用いた。抗体力価の測定は抗血漿を希釈し、希釈した抗血漿と標識抗原との結合率から 求めた。約5000 cpm の ³H-6-keto-PGF_{1α} と 50% 結合³³⁾を示す抗 6-keto-PGF_{1α} 抗血漿の希 釈度は 500 倍であった。また同様に操作して行った抗 TXB₂ 抗血漿については 1000 倍の希釈が 50%結合を示し、それぞれ希釈した抗血漿をラジオイムノアッセイに使用した。

抗 6-keto-PGF_{1α} 抗血漿の特異性の検討は 8 H-6-keto-PGF_{1α}一抗 6-keto-PGF_{1α} 抗血漿 反応系に構造上交叉反応が考えられる PG を主として Table-1 に示す PG をそれぞれ加え, 後述する二抗体法により抗血漿と標識抗原の結合に対する, 添加した PG の 50% 阻止濃度を求 めた。そしてこの反応系での 6-keto-PGF_{1α} の 50% 阻止濃度を 100 として, それぞれの PG あ るいはアラキドン酸の 50% 阻止濃度から 交叉反応率を求めた。 抗 TXB₂ 抗血漿につい て も抗 6-keto-PGF_{1α} 抗血漿の場合と同様に反応を行い, 交叉反応率を求めた。

二抗体法による測定

この二抗体法に使用する第二抗体はモルモットをウサギ γ-グロブリンで免疫して得られた抗体を用いた。抗体価測定の結果,このラジオイムノアッセイ系ではこの抗体を 20 倍に希釈して使用することとした。

小試験管に試料,約5000 cpm の³H-6-keto-PGF_{1a},および抗 6-keto-PGF_{1a} 抗血漿をそれ ぞれ 0.05 ml 入れ,37°C で 1 時間インキュベート後,第二抗体を 0.05 ml 加え,4°C で一夜放 置した。標準曲線の作成には試料の代わりに 1 ml 中に 0.05~5.0 ng を含む標準 6-keto-PGF_{1a} 溶液 0.05 ml を加えて同様に操作した。そして 4°C,3000 rpm で 15 分間遠心して生じた沈殿 物を 0.2 ml の緩衝液で洗滌し,再び同じ条件で遠心分離を行った。この操作をさらに 1 回くり 返し行い,得られた沈殿物を 0.1 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウムに溶解し,さらに 0.9 ml の蒸 留水を加えた。このうちの 0.8 ml を PPO: 4.0 g および POPOP: 0.1 g を 1 l のトルエンに 溶かし,さらに 0.5 l の Triton X-100 (New England Nuclear 社)を加えたシンチレーター 10 ml に加えて混合し,液体シンチレーションカウンター (LSC-703, Aloka 社) にて放射活性 を測定した。TXB₂の測定についても 6-keto-PGF₁%の場合と同様に操作を行った。

セルハーベスターを用いた沪過法による測定

マイクロプレート (F, A/S Nunc 社)の穴 (全容量 0.3 ml) に試料あるいは 1 ml 中に 0.05 ~5.0 ng を含む標準 6-keto-PGF_{1a} 溶液,約 7000 cpm の ³H-6-keto-PGF_{1a},および抗 6keto-PGF_{1a} 抗血漿をそれぞれ 0.05 ml 入れ,4°C で一夜放置した。そしてセルハーベスター (LM-101, Labo Mash, ラボサイエンス社)を用いて,抗体結合標識抗原と遊離標識抗原との 分離を行った。すなわち反応液を吸引沪過して Labo Mash 用フィルター上に抗体結合 ³H-6keto-PGF_{1a} を沪取し,緩衝液で5 秒間洗滌,さらにひき続き 20 秒間吸引しながら乾燥した。 PPO: 4.0g および POPOP: 0.1g を 1*l* のトルエンに溶かしたシンチレーター 3 ml にこの フィルターを入れ,液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。TXB₂ の測定に ついても 6-keto-PGF_{1a} の場合と同様に操作を行った。

マウス腹腔マクロファージ試料の調製

6-7週令の ICR 系雄マウス(日本クレア)を頸動脈の切断により脱血致死させた後,ただ ちにマウス1匹当たり Eagle Minimum Essential Medium No.3 (以下 MEM 培地と略す, 日水製薬)3ml を腹腔内に注射した。 腹部を数回もんだ後, 腹部を切開し, ピペットを挿入し て MEM 培地を回収することにより, 腹腔浸出細胞を採取した。無処理マウスでは通常1匹当 たり3×10⁶ 細胞が得られた。約30匹のマウスから採取した腹腔浸出細胞を 100×g で8分間遠 心して細胞を沈殿させ、上清を捨てた後、1 ml あたり3×10⁶ 細胞になるように MEM 培地に 縣濁した。 この細胞縣濁液の 1 ml を径 35 mm のガラスペトリ皿に入れ, 37°C, 5 %CO₂ 含 有空気中で10, 20, 40, 60, 90, 120 及び180 分間インキュベートし, ガラス表面に付着した細 胞をマクロファージとした。所定の時間インキュベート後, ガラス非付着細胞は MEM 培地を ガラス面に吹きつけることによって洗滌除去し、マクロファージ monolayer を得た。このペト リ皿に 0.5 ml の MEM 培地を入れ, ラバーポリスマンを用いてマクロファージを剝がし取り, マクロファージ懸濁液とした。これをソニケーター (Sonifier B-12, Branson Sonic Power 社) を用いて, 氷冷下で 30W, 1秒間の超音波処理を5回行い, 4°C, 3000 rpm で15分間遠心分 離して,上清を PG 測定用試料とした。測定は直接ラジオイムノアァセイによって行った。 また上記に示したマクロファージ試料の調製法において, PG 類の産生を抑制する 目的 で, Chart 1-1 に示す調製法の(Ⅰ)から(Ⅳ)までの各段階に、最終濃度 0.1 mM になるように インドメタシン³⁴⁾(Sihma 社)を添加した。 すなわち(I)腹腔浸出細胞をペトリ皿内でイン

キュベートする前, (Ⅱ) ガラス表面に付着したマクロファージを剝がし取る前, (Ⅲ) 剝がし取

— 5 —

Chart 1-1 Stages in preparation of macrophage samples ICR male mice \downarrow Peritoneal exudate cell suspension $\downarrow \leftarrow (I)$ Indomethacin Incubation for 1 hr $\downarrow \leftarrow (II)$ Indomethacin Macrophage suspension $\downarrow \leftarrow (II)$ Indomethacin Sonication $\downarrow \leftarrow (IV)$ Indomethacin Centrifugation \downarrow Supernatant \longrightarrow Sample

ったマクロファージ懸濁液を超音波処理する前,さらに(N)超音波処理したマクロファージ溶 液を遠心する前,のそれぞれの段階にインドメタシンを加えた。そしてインドメタシンを添加し ないで調製したマクロファージ試料の 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 量と比較検討した。測定値 は 10⁶ 細胞当たりの ng で示した。なお ガラス付着細胞中のマクロファージの純度については, Wright 液 (和光純薬)を用いて細胞を染色して顕微鏡で観察し,ガラス付着細胞数に対するマ クロファージ数の比率で表わした。

マクロファージ試料についてラジオイムノアッセイにより求めた直接法による値と部分精製後 に測定した値の比較

室田ら³⁵⁾は PG 類を定量する場合に, PG 類を抽出分離し, 定量している。ラジオイムノア ッセイによりマクロファージ試料をこの方法にしたがって部分精製した場合と, 直接, 測定した 場合とを比較検討した。 PG 類の部分精製の方法としては, マクロファージ試料を 0.1 N 塩酸 で pH 3.0 に調節した後, 試料の3倍容の酢酸エチルにより3回抽出し, この酢酸エチル液を減 圧留去した。この残査を少量のエタノールに溶解し, エタノールの最終濃度が5%になるように 緩衝液を加えて, ラジオイムノアッセイ用の試料とした。なおこの抽出方法による回収率は60~ 70%であった。

また直接ラジオイムノアッセイで測定し、6-keto-PGF₁^{α} および TXB₂ 量がそれぞれ 4.6 および 2.5 ng/ml であるマクロファージ試料に、1 ml 当たり 0.25~10 ng の 6-keto-PGF₁^{α} あ

-6-

るいは TXB₂ を添加し、その測定値が添加量を加算した値として得られるか否か検討した。

〔結果〕

ラジオイムノアッセイ:その抗体の特異性と測定値の信頼性

ウサギを免疫して得た抗 6-keto-PGF₁^{α} および抗 TXB₂ 抗血漿によるラジオイムノアッセイ で、二抗体法による測定の結果、6-keto-PGF₁^{α} および TXB₂ ともに 0.05 ml 当たり 50 pg、 すなわち 2.7×10⁻⁹M から測定可能であった。この両抗血漿の抗体特異性を Table 1-1 に示す。 なおこの表は当研究室の山上による結果³⁶⁾であり、その特徴的な部分を引用すると、抗 TXB₂ 抗血漿は 15-keto-PGF₂^{α} と約3%の交叉反応を示したが、他の PG に対しては抗 6-keto-PG F₁^{α} 抗血漿の場合と同様に、1%以下の交叉反応率で、両抗血漿とも特異性の高い抗体であった。

Community in	pq requ 50% in	ired for hibition	relative cross- reaction(%)*		
Compounds	anti-6- keto-PGF ₁	anti–TXB ₂	anti-6- keto-PGF _{1a}	anti- TXB_2	
6-keto-PGF1a	190	>500×10 ³	100	<0.05	
TXB_2	$>500\times10^{3}$	230	<0.05	100	
PGE ₂	70×10^{3}	350×10^{3}	0.27	0.07	
PGD ₂	$>500 \times 10^{3}$	30×10^{3}	<0.05	0.77	
$PGF_{1\alpha}$	50×10^{3}	$>$ 500 \times 10 ³	0.38	<0.05	
$PGF_{2\alpha}$	$>500\times10^{3}$	$>$ 500 \times 10 ³	<0.05	<0.05	
15-keto-PGF _{2α}	$>500 \times 10^3$	8×10^{3}	<0.05	2.89	
13, 14–dihydro–15–keto–PGF $_{2\alpha}$	$>500\times10^{3}$	$>$ 500 \times 10 ³	<0.05	<0.05	
13, 14–dihydro–PGF _{2α}	100×10^{3}	$>$ 500 \times 10 ³	0.19	<0.05	
arachidonic acid	$>500 \times 10^{3}$	$>500 imes10^3$	<0.05	<0.05	

Table 1-1 Specificity of anti-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ and anti-TXB₂ antibodies

*Specificity of each antiplasma expressed as a relative cross-reaction is derived from the data in columns one and two.

著者が行ったセルハーベスターを用いて抗体結合標識抗原と遊離標識抗原とを沪過により分離 する方法と、山上の行った二抗体法とを比較するため、両測定法で得られた 6-keto-PGF₁ α の 標準曲線を Fig. 1-1 に示す。この沪過法で得られた結果は二抗体法と同等の感度を有し、さら に各濃度での抗原抗体結合率は両測定法ともにほとんど同値を示した。各濃度における両測定法 の抗原抗体結合率の相関係数を求めると 0.997 であり、両者の間に非常に高い相関性が認められ た。TXB₂ についても 6-keto-PGF_{1 α}の場合と同等の結果および相関性が得られた。マクロフ



Fig. 1–1 Standard curves of 6-keto-PGF_{1 α} obtained by radioimmunoassay. @: the double antibody method; \bigcirc : the filtration method using the Cell Harvester.

次にマクロファージ試料を抽出などの操作を行わず,直接測定し,その結果の信頼性を検討した。6-keto-PGF₁ および TXB₂ をそれぞれ 4.6 および 2.5 ng/ml 含む試料に対して,既知濃度の 6-keto-PGF₁ あるいは TXB₂ を添加したとき得られた測定値をもととして計算した回収率を Table 1-2 に示す。6-keto-PGF₁ は1ml 当たり5~15 ng, TXB₂ は1ml 当たり 3~13 ng の間でほぼ 100% の回収率であった。 測定値を y, 添加量を x として一次回帰分析を行うと, 6-keto-PGF₁ については y=1.05 x +4.4(r=0.997, n=7), TXB₂ については y=1.05 x +2.5(r=0.997, n=7) という結果が得られた。また同一試料について, 酢酸エチルにより抽出した試料の測定値を回収率を用いて換算して得た値と,直接測定した値との間の相関係数を求めた結果, 0.86(n=6) というほぼ満足できる相関性が認められた。

- 8 -

6-keto-PGF1«	6-keto-	PGF _{1α}	TXB ₂		
or TXB_2 (ng/ml) calculation recovery* (ng/ml) (%)		calculation (ng/ml)	recovery* (%)		
0	4.6		2.5	0.2 ×-	
0.25	4.6	94.8	2.6	94.5	
⁶ 0.5	······	94.1	3.0	100	
1.0	5.6	100	े 3.5	100	
2.5	7.0	98.6	5.1	102	
5.0	9.4	97.9	7.6	101	
10.0	15.0	103	13.0	104	

Table 1-2 Recovery of 6-keto-PGF_{1 α} or TXB₂ in macrophage samples

*Recovery of 6-keto-PGF_{1 α} or TXB₂ is expressed as the percentage that the calculated values are of full potential values of the samples.

マクロファージの調製について

腹腔浸出細胞中のマクロファージ数を計測する目的で,1ml 当たり3×10⁶ 細胞を含む腹腔浸 出細胞懸濁液を1mlペトリ血に入れ,一定時間インキュベート後,ガラス非付着細胞を洗滌除 去し,ガラス表面に付着したマクロファージ数を血球計算板を用いて測定した。結果は Fig. 1-2に示す。ガラス表面に付着したマクロファージ数はインキュベート 60 分後までは増加したが, それ以降 180 分後まではマクロファージ数はほとんど変化なくプラトーで,その数は 1.5×10⁶ 細胞であった。図示していないが,24時間後のマクロファージ数は 1.4×10⁶ 細胞で,その間の 変化はほとんど認められなかった。すなわち腹腔浸出細胞中,約50% がマクロファージであり, さらにそれを Wright 染色した結果,各時間で得られたガラス付着細胞のうちマクロファージ の純度は 95% 以上であった。以上の結果から,マクファージを調製するためのインキュベート 時間は 1時間で十分であることが判った。

ー般に細胞培養を長時間行う場合,栄養源として培養液に血清を添加して行っている。今回, ウシ胎児血清を10%になるように MEM 培地に添加した場合と添加しない場合について,腹腔 浸出細胞を1時間インキュベートし,マクロファージ数,マクロファージ内 6-keto-PGF₁ お よび TXB₂ 量を比較検討した結果,1時間のインキュベートではマクロファージ数,6-keto-PGF₁ および TXB₂ 量に血清添加の有無による差が認められなかった。したがって以後の実験 では、血清を添加しない条件でインキュベートを行った。

- 9 --



Fig. 1-2 Total number of adherent macrophages during incubation of peritoneal exudate cells. Peritoneal exudate cells (3×10^6) were incubated in a glass petri dish at 37°C in 5% CO₂ in air for the time indicated in figure. Removing non-adherent cells at each time, macrophages were then obtained. Each point represents the mean of 3 experiments.

マクロファージ試料の調製過程におけるインドメタシンの影響

非ステロイド系抗炎症薬であるインドメタシンはシクロオキシゲナーゼを阻害し、PG 類の生 合成を抑制することが知られている³⁴⁾。今回、マウスより採取した腹腔浸出細胞からマクロファ ージを調製する過程で、Chart 1-1 に示す各段階でインドメタシンを添加して試料を調製し、こ のインドメタシンの添加が試料中の 6-keto-PGF₁^a および TXB₂ 量にどのように影響している かについて検討した。その結果は Fig. 1-3 に示すように、マクロファージを取り扱う操作によ ってはそれが刺激となり、測定結果に大きな相違が見られた。腹腔浸出細胞のインキュベート前 のインドメタシンの添加、すなわち第 I 段階の添加では、マクロファージの 6-keto-PGF₁^a お よび TXB₂ 量はそれぞれ 3.5 および 1.8ng であった。6-keto-PGF₁^a についてみると、第 I お よび第 II 段階の間で、また第 II および第 II 段階の間で有意に増加したが、それ以後はインドメタ シン無添加の場合に比べて、大きな変化は認められなかった。一方 TXB₂ については、第 II 段 階は第 I 段階と比べて量的に有意な差が認められなかったが、第 III 段階では有意に増加し、以後 大きな変化はなかった。この結果はマクロファージが超音波処理により破壊される前まで、PG 類の産生が持続し、破壊されると合成能も消失することを示唆している。さらにガラス表面に付

-10 -

着したマクロファージを剥がし取った後に,インドメタシンを添加してもその効果がないことを 示している。言い換えるとマクロファージをガラス表面から剝がす という 物理的刺激によって PG 類が多量に合成されることを示している。これらの結果から,以後インドメタシンの添加は 第 II 段階, すなわちマクロファージを剝がし取る前に行った。この段階でのインドメタシンの添 加は,マクロファージと刺激剤あるいは抑制剤との関係を検討する上で最適と考え,以後この方 法にしたがって試料を調製した。



Fig. 1-3 Effects of indomethacin on the amounts of 6-keto-PGF_{1a} and TXB₂ in preparating samples. Indomethacin at a final concentration of 0.1mM was added before (I) incubation, (II) suspension, (II) sonication, and (IV) centrifugation in the preparation of samples. "Non" indicates no-addition of indomethacin. Each column is expressed as mean±standard deviation (N=3). \Box : 6-keto-PGF_{1a}, \blacksquare : TXB₂, M ϕ : macrophages. *: p < 0.001 (when compared with I by Student's t-test) **: p < 0.01, ***: p < 0.001 (when compared with II by Student's t-test)

マクロファージ内 6-keto-PGF₁^α および TXB² 量を測定する場合の細胞の調製法およびラジ オイムノアッセイ法について検討した。PG 類の定量はバイオアッセイ法³⁷⁾, ガスクロマトグラ フィー/質量分析法³⁸⁾等で行われているが, 微量の生体試料を多数測定する方法としてはラジオイ ムアッセイ法が最も便利と考えられる。Levine ら²⁵⁾が二抗体法によるラジオイムアッセイ法を PG類の定量に応用して以来, 数多くのPG類のラジオイムアッセイ法が報告されている。Salmon ³⁹⁾の報告では抗 6-keto-PGF₁^α 抗体と種々の PG との交叉反応率は PGE 類および PGF 類に 対して5~10% であったが, 他の主な PG および PG 代謝物とは1%以下 であった。一方 Mitchell⁴⁰⁾ は抗 6-keto-PGF₁^α 抗体のそれは1%以下の交叉率であったことを報告している。 また Tai ら⁴¹⁾は抗 TXB² 抗体の特異性について, 主な PG および PG 代謝物と0.01% 以下 の交叉率であったことを報告している。著者の使用した抗 6-keto-PGF₁^α および TXB² 抗抗血 漿は, これらの報告とほぼ同等の交叉率であり, 感度もほとんど同等であることから, 6-keto-PGF₁^α および TXB² の定量に十分使用できると考える。

Salmon³⁹⁾, Mitchell⁴⁰⁾, および Tai ら⁴¹⁾は抗体結合標識抗原と遊離標識抗原との分離にデキ ストラン炭末法を使用している。この方法は炭末が抗体結合標識抗原を吸着せず、遊離標識抗原 だけを吸着するという性質を応用したものであるが、炭末を入れてから上清を分離するまでの時 間を一定にしなければならないことから、一度に多数の試料の測定は困難である。またタンパク 質濃度や塩濃度の変化により、遊離標識抗原の炭末への吸着が影響されるなど、経験と再現性に 問題がある。一方二抗体法にはその問題はなく再現性はよいが,第二抗体の使用,遠心分離と洗 滌のくり返しなどの煩雑な操作はまぬがれない。Deheny ら42)は PGF2a のラジオイムアッセイ で、抗体結合標識抗原と遊離標識抗原の分離にゲル沪過法を使用した。この方法で行うと一試料 について約3分で分離できると報告している。今回、セルハーベスターを用いた沪過法は二抗体 法と同感度で(Fig. 1-1), 標識抗原の分離を簡単に行え, 煩難な操作を必要としない。さらに マイクロプレートを用いると、約4分で96試料の分離が完了する。 セルハーベスターに用いる Labo Mash 用フィルターはトルエン系シンチレーターに入れると透明になるので、そのまま測 定可能である。さらにフィルターからシンチレーターへの抗体結合標識抗原の溶出がほとんどな いことから、測定後フィルターを取り出し、シンチレーターのカウントが低値の間は、何回も使 用できる。またミリポアフィルターを用いた沪過法によるラジオイムノアッセイ法43)も報告され ているが、ミリポアフィルターに比べ、この Labo Mash 用フィルターははるかに安価である。 以上の利点から、簡単な吸引沪過により標識抗原の分離が行えるセルハーベスターを用いたラジ オイムノアッセイ法は PG 類に限らず、他の物質のラジオイムノアッセイにも応用できると考 える。

一般に臓器中の PG 量を測定するには, 妨害物質等の存在が考えられるので, 抽出分離を必要としているが,本研究に用いたマウス腹腔マクロファージ試料については, 抽出操作を必要とせず, 直接測定可能であることが確認された (Table 1-2)。

マクロファージ試料を調製する過程で、避けられない物理的刺激、たとえばマクロファージを ガラス表面から剥がし取る操作で、マクロファージの PG 類産生能が高められることを確認した が (Fig. 1-3)、このことは PG 類研究を行うにあたって考慮しなければならない重要なことと 思われる。すなわちその定量には十分な配慮のもとに調製されたマクロファージ試料を用いて行 わなければならない。

-13-

第 2 章

刺激剤投与により誘導されたマウス腹腔マクロファージ内 6-keto-PGF1α および TXB2 量の変化

ラット背部にカラゲニンを投与し、5日後からの肉芽腫形成に伴い、浸出液中の6-keto-PG $F_{1\alpha}$ 量は減少し、TXB2量は増加するという変化を室田らは報告している¹⁷⁾。本章ではマウス腹 腔マクロファージを用い、上述の炎症例で見られた 6-keto-PGF₁ および TXB2量の変化が炎 症に特有なものであるか否かを 検討した。常在および誘導マクロファージの 6-keto-PGF₁ および TXB2量について比較検討した結果、刺激刺の投与により 誘導されたマクロファージと対 照群との間に 6-keto-PGF₁ および TXB2量の変化が見られ、この変化は腹腔浸出細胞の中で はマクロファージだけに認められた。

〔実験材料および方法〕

マウス腹腔マクロファージの調製

6-7週令の ICR 系雄マウス1群6匹に各種刺激剤を腹腔内に注射し、4日後に採取した腹 腔浸出細胞を個体ごとに1mlの MEM 培地に懸濁し、ガラスペトリ皿に移して以後、前章(5 頁)に記した方法によりマクロファージを調製した。またガラス非付着細胞については、腹腔浸 出細胞をインキュベート後、非付着細胞を試験管へ移し、100×g で8分間遠心して細胞を集め、 最終濃度 0.1 mM インドメタシン含有 MEM 培地 0.5 ml に懸濁した。それ以後の操作はマク ロファージの場合と同様に、超音波処理して PG 類測定用の非付着細胞試料を調製した。刺激 剤には 0.1 ml 中に 20 および 200 μ g を含むザイモサン (Sigma 社), 0.1 ml 中に 50 μ g を含 む *E. coli* (0111; B 4) 由来のリボ多糖 (lipopolysaccharide, 以下 LPS と略す, Difco 社), 1 ml の3%チオグリコレート (Difco 社),および 0.1 ml の 0.5% ラテックス (Difco 社) を 使用した。なおザイモサンは1 ml 当たり 20 mg になるように生理食塩水に懸濁し、これを 30 W、1秒間、5回の超音波処理 (Sonifier B-12, Branson Sonic Power 社) し、3000 rpm で 10分間遠心分離を行い、さらに1回洗滌したものを用時希釈して使用した。またザイモサン投与 群については、インドメタシンの効果を検討する目的で、ザイモサン 200 μ g とインドメタシン 1.5 mg/kg 体重を同時に腹腔内注射し、4日後に腹腔浸出細胞を取り出し、マクロファージ試 料を調製した。 6-keto-PGF₁ および TXB₂ 量の測定は前章(4頁)に示した二抗体法によるラジオイムノアッセイにて行った。

各種刺激剤の効果

各種刺激刺を投与し、4日後のマウス腹腔マクロファージ数とマクロファージ内 6-keto-PG F_{1a} および TXB₂ 量を Fig. 2-1 に示す。LPS あるいはラテックス処理により誘導されたマクロファージ数におよぼすその LPS あるいはラテックス処理による影響については対照群の 1.5×10⁶ 細胞と比べ変化が認められなかったが、ザイモサンおよびチオグリコレート群ではそれぞれ 7.2×10⁶ および 1.8×10⁷ 細胞と著しく増加した。マクロファージ内 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 量については 10⁶ 細胞当たり対照群で 6-keto-PGF_{1a}: 16.2 ng, TXB₂: 1.4 ng であった。ザイモサンおよびチオグリコレート群での 6-keto-PGF_{1a} 量については, それぞれ 1.1 および 1.8 ng と著しく減少したのに対し, TXB₂ 量については, それぞれ 2.7 および 2.3 ng と有意に増加した。一方 LPS 群では 6-keto-PGF_{1a} 量は 2.0 ng と著しく減少したが, TXB₂ 量 は 1.3 ng であり, 対照群と有意な差は見られなかった。 ラテックス群では 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 量ともに対照群と比べ変化が認められなかった。以上の結果から, ザイモサンは刺激性があり, その存在が細胞の内部あるいは外部でも染色により確認が可能であることから, 以後これを主に用いて実験を行った。

ザイモサンによる 6-keto-PGF₁^a および TXB₂ 量の変化

ザイモサンを 20 あるいは 200 µg を腹腔内に 投与し、4日後に採取した細胞について検討し た。Fig. 2-2 に示すように、腹腔浸出細胞数の変化については、対照群で 3.7×10⁶、ザイモサ ン 20 µg 投与群で 6.5×10⁶、200 µg 投与群で 1.0×10⁷細胞と増加が認められた。この腹腔浸 出細胞をガラスペトリ皿で 1時間インキュベートして、マクロファージと非付着細胞とに分離す ると、非付着細胞数には変化は見られなかったが、マクロファージ数には腹腔浸出細胞数と平行 した増加が認められた。この結果はザイモサン投与により、腹腔浸出細胞の中で特にマクロファ ージが誘導されたことを示している。腹腔浸出細胞をインキュベートして得られたマクロファ ージが誘導されたことを示している。腹腔浸出細胞をインキュベートして得られたマクロファ ージについては、対照群、ザイモサン 20 および TXB² 量を Fig. 2-3 に示す。まずマクロファ ージについては、対照群、ザイモサン 20 および 200 µg 投与群で 10⁶細胞当たり の 6-keto-PGF_{1^a}量はそれぞれ 20.8、7.7 および 2.2 ng と減少した。TXB²量はそれぞれ 1.2、1.9 お よび 3.0 ng となり、ザイモサン 20 µg 投与群では対照群と比べて有意な差は認められな かっ たが、200 µg 投与群では有意に増加した。一方非付着細胞内の 6-keto-PGF_{1^a} および TXB²量



Fig. 2-1 Effects of different kinds of irritants on the amounts of 6-keto-PGF_{1 α} and TXB₂ in macrophages. Six mice per group were i.p. injected with 200 μ g of zymosan (Zym), 50 μ g of LPS, 1 ml of 3 % thioglycollate (Thio), or 0.1 ml of 0.5 % latex 4 days before. Each column represents mean \pm standard error (N=6). \Box : 6-keto-PGF_{1 α}, \blacksquare : TXB₂, M ϕ : macrophages. *: p < 0.05, **: p < 0.01 (when compared with control by Student's t-test)



Fig. 2-2 Effects of zymosan on number of macrophages. Six mice per group i.p. injected with 20 or $200\mu g$ of zymosan 4 days before. Macrophages or non-adherent cells were obtained by incubation of peritoneal exudate cells for 1 hr. Each point represents mean±standard error (N=6). $\bigcirc -\bigcirc$: peritoneal exudate cells; $\bigcirc -\bigcirc$: macrophages; $\bigcirc \cdots \bigcirc$: non-adherent cells.

はマクロファージ内のそれと比べて少量であり,また対照群とザイモサン群との間に,両物質の 存在量の変化は認められなかった。

次にザイモサン 200 μ g を用いて経日的に検討した。Table 2-1 に示すように,その変化は投 与1日後から認められた。すなわちガラス付着細胞数は対照群と比べ,投与1日および4日後で 5ないし4倍に増加しており,7日後でも約3倍の存在が認められた。6-keto-PGF₁ 量につい ては,7日後までは対照群の約 1/10~1/20 に減少し,TXB2 量は7日後で対照群の約4倍に増 加した。投与30日後では,対照群と比べて細胞数,6-keto-PGF₁ および TXB3 含量ともに大 きな変化は認められず,投与7日後までに見られた影響は,ほぼ回復していた。

 $(383) = e^{2} \alpha (100) e^{-2} \alpha (10$

- 17 -



Fig. 2-3 Effects of zymosan on the amounts of 6-keto-PGF_{1a} and TXB₂ in cells. Each column represents mean \pm standard error (N=6). \Box : 6-keto-PGF_{1a}, \blacksquare : TXB₂, M ϕ : macrophages, NAC: non-adherent cells. *: p < 0.05, **: p < 0.01 (when compared with 0 μ g of zymosan by Student's t-test)

Table 2-1 Time course of the amounts of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ and TXB $_2$ in macrophages stimulated with zymosan

Days after the stimulation	Number of cells $(\times 10^6)$	$6-keto-PGF_{1\alpha}$ (ng/10 ⁶ cells)	TXB ₂
0	1.67 ± 0.25	20.8 ± 2.1	1.2±0.2
1	9.20±2.88	1.6 ± 0.5^{d}	1.5 ± 0.2
4	8.07 ± 0.71	2.2 ± 0.6^{d}	3.0 \pm 0.6 ^{b)}
7	4.37 ± 1.10	1.0 ± 0.1^{d}	4.2±0.9°
0 ^{<i>a</i>)}	1.56 ± 0.32	10.2 ± 1.5	1.5 ± 0.1
30	2.04 ± 0.41	8.9 ± 1.5	2.2±0.2 ^e)

a) This 0 time represents controls 30 days older after zymosan was intraperitoneally injected.

b)p $\langle 0.05, c \rangle p \langle 0.01, d \rangle p \langle 0.001$ (when compared with 0 day by Student's t-test) e)p $\langle 0.05$ (when compared with 0^{a} day by Student's t-test)

インドメタシンとザイモサンの同時投与の効果

抗炎症薬であるインドメタシンとザイモサンを同時にマウス腹腔内に注射し、4日後のマクロ ファージ内 6-keto-PGF₁ α および TXB₂ 量について検討した。Fig. 2-4 に示すように、マク ロファージ数についてみると、インドメタシンとザイモサン同時投与群とザイモサン群との間に 変化は認められなかった。しかし 6-keto-PGF₁ α および TXB₂ 量については、ザイモサンの投 与により、対照群と比べ 6-keto-PGF₁ α 量は約 1/6 に減少し、TXB₂ 量は約 1.5 倍の増加とい



Fig. 2-4 Effects of indomethacin on macrophagos stimulated with zymosan. Six mide per group were i.p. injected with 1.5 mg/kg weight of indomethacin (Indo) and/or $200\mu g$ of zymosan (Zym) 4 days before. Each column and point represents mean \pm standard error (N=6). \Box : 6-keto-PGF_{1 α}, \blacksquare : TXB₂, M ϕ : macrophages. *: p < 0.01 (when compared with control by Student's t-test)

う変化を示したのに対し、インドメタシンをザイモサンと同時投与すると、TXB2 量については 有意な差は認められなかったが、6-keto-PGF₁ α 量の変化は約 60% 抑制された。この結果から、 インドメタシンとザイモサンの同時投与により、ザイモサンによるマクロファージ数の増加反応 は抑制できなかったが、インドメタシンが 生体内でマクロファージの 6-keto-PGF₁ α 量の変化 に影響を及ぼしていることが示された。

〔考 察〕

マウス腹腔マクロファージ内 6-keto-PGF₁^α および TXB₂ 量について検討した結果, 6-keto -PGF₁^α については他の報告者^{21,23,24}と同じように, TXB₂ については室田らの説²²⁾と同じく, 腹腔マクロファージに存在することが確かめられた。起炎剤であるザイモサンをマウス腹腔内に 投与することにより, マクロファージ内の 6-keto-PGF₁^α 量は減少し, TXB₂ 量は増加すると いう結果が得られ,室田らのラットカラゲニン肉芽腫形成に伴う変化¹⁷⁾とも一致した。一方 LPS 群ではザイモサン及びチオグリコレート群とは異なり, TXB₂ 量は対照群と変化が認められなか った。この結果は LPS が直接マクロファージに作用する⁴⁴⁾ほかに, 骨髄由来リンパ球の活性化 物質, すなわち B細胞マイトジェン⁴⁵⁾であることに関係があるとも考えられるが, この点につい てはさらに検討が必要である。

ザイモサンとは異なり、マクロファージに貪食されても代謝・分解を受けないラテックスを投 与した場合のマクロファージ内 6-keto-PGF₁^a および TXB₂ 量は対照群と比べて変化が認めら れなかった。この結果は異物を単に貪食したマクロファージと、貪食後消化、分解あるいは刺激 性を減弱させる等の必要がある物質を処理する場合のマクロファージとの反応性の差を示す結果 とも考えられる。またザイモサンを投与した場合の非付着細胞内 6-keto-PGF₁^a および TXB₂ 量に変化は認められなかったことから、6-keto-PGF₁^a と TXB₂ 量の変化はザイモサンなどに よる誘導マクロファージに特徴的であると考えられる。したがって刺激剤で誘導されたマクロフ ァージに認められる 6-keto-PGF₁^a 量の減少、TXB₂ 量の増加という変化は、異物処理上ある いは炎症の過程に意義あるものと思われる。

第 3 章

In vitro におけるマウス腹腔マクロファージからの 6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ 放出についての検討

第1節 マクロファージの付着,伸展現象と 6-keto-PGF₁a および TXB₂ 放出の関係

マウス腹腔浸出細胞の中で、マクロファージには 6-keto-PGF₁ および TXB₂ を生合成する 能力があることを前章で述べたが、一般に細胞内で PG 類が産生されると、それは細胞外へ放出 されるといわれている⁴⁶⁾。そこで腹腔マクロファージを *in vitro* 系に移し、マクロファージの 特徴であるガラス表面等に付着し、伸展する状態と 6-keto-PGF₁ および TXB₂ の放出につい て検討した。その結果、マクロファージからのこれら放出量と伸展したマクロファージ数の増加 との間に、高い相関性があることを明らかにした。またマクロファージが付着するが、伸展でき ない条件、すなわちシリコン処理したガラス表面、あるいはテフロン膜上でマクロファージをイ ンキュベートした実験から、マクロファージの付着、伸展と 6-keto-PGF₁ および TXB₂ 放出 との関係がさらに明白になった。

〔実験材料および方法〕

腹腔浸出細胞およびマクロファージのインキュベート

腹腔浸出細胞懸濁液は第1章(5頁)に示した方法により調製し、この1mlをガラスペトリ 皿に移し、37°C、5% CO₂含有空気中でインキュベートした。1時間後ガラス非付着細胞を MEM 培地を用いて洗滌除去し、新たに1ml の MEM 培地をペトリ皿に加え、付着している マクロファージをさらに1時間インキュベートした。腹腔浸出細胞あるいはマクロファージ monolayer としてから、さらにインキュベートした培地を遠心管に移して、4°C、1500 rpm で 10分間遠心分離し、その上清中の 6-keto-PGF₁₀ および TXB₂量をセルハーベスターを用いた 沪過法によるラジオイムノアッセイにより測定した。また物質表面の性質とマクロファージの付 着、伸展との関係を検討する目的で、シリコン処理⁴⁷⁾したガラスペトリ皿、あるいはペトリ皿を テフロン膜(Teflon FEP film、100 A、40 W、Dupon 社)⁴³⁾でおおい、その上で腹腔浸出細胞 をインキュベートした。また2価カチオンとマクロファージの付着あるいは伸展との関係を検討 する目的で,最終濃度が10 mM になるように ethylene diamine tetra acetic acid (以下 EDT Aと略す,和光純薬)を MEM 培地に添加し,腹腔浸出細胞をインキュベートした。なおマク ロファージの生存率は,トリパンブルー排除試験により求めた。所定の時間マクロファージをイ ンキュベートした後,培地を除き,0.16%トリパンブルー液をペトリ皿に加え,5分以内に顕微鏡で観察し,物質表面に付着している細胞数に対するトリパンブルー非染色細胞数の比率で表わ した。

マクロファージの伸展度の判定

腹腔浸出細胞を所定の時間インキュベートした後,ガラス非付着細胞を洗滌除去し,ペトリ皿 1枚につき500個以上のガラス付着細胞を顕微鏡で観察した。伸展の判定は細胞の短径に対し, 長径が2倍以上の値を示したマクロファージを伸展マクロファージとして数え,全マクロファー ジ数に対する比率で表わした。

〔結 果〕

マクロファージの伸展とマクロファージからの 6-keto-PGF1a および TXB1 放出

3×10⁶ の腹腔浸出細胞を 37°C, ガラスペトリ皿で 10, 20, 40, 60, 90, 120 および 180 分間 インキュベートし,非付着細胞を洗滌除去した後,それぞれの時間で観察された伸展マクロファ ージの比率を Fig. 3-1 に示す。伸展マクロファージは 3 時間までは,インキュベート時間に比 例して増加したが, Table 3-1 に示すように, 24 時間後ではほぼ全マクロファージが伸展して いた。なおこのインキュベートの間のマクロファージの生存率は 98% 以上であった。

インキュベートの中の腹腔浸出細胞から MEM 培地への 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出 量を Fig. 3-2 に示す。6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ ともに実線で示してあるが,たとえば 6keto-PGF_{1a} についてみると,インキュベート1時間で 20.1 ng, 2時間で 42.3 ng,および 3時 間で 64.4 ng とインキュベート時間に比例した放出が認められた。このような反応を示す腹腔浸 出細胞のインキュベートを1時間行った後,マクロファージと非付着細胞とに分離し,それぞれ を MEM 培地にてさらに 1時間インキュベートした。Fig. 3-2 のカッコ内の数字はこの分離後 の再インキュベートの時間を表わしており,マクロファージをインキュベートした場合の 6-ke to-PGF_{1a} および TXB₂ の測定値は点線で示してある。マクロファージの インキュベートでは 腹腔浸出細胞のインキュベートの場合とほぼ同等の 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出量を示し た。一方非付着細胞のインキュベートについては細胞数を 5×10⁶ 個にして測定したが, 6-keto -PGF_{1a} および TXB₂ ともに検出されなかった。以上の結果から, 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ ないTXB₂ の放出は腹腔浸出細胞の中では、マクロファージに由来するものと考えられる。マクロファージ

-22 -



Fig. 3-1 Increase of spreading macrophages during incubation of peritoneal exudate cells. Peritoneal exudate cells were incubated in glass petri dishes for the time indicated in figure and macrophages at each time then obtained. The precentage of spreading macrophages among glass adherent cells at each time was recorded by microscopy. Each point represents mean \pm standard deviation (N=3).

1 <u></u>	Spreading	6-keto-PGF _{1α}	TXB ₂
	(%)	$(ng/10^6 \mathrm{M}\phi)$	·
1 hr	34.6	20.8 ± 3.6	1.8±0.2
$24 hr^{a}$	96.9	1.8 ± 0.4^{b}	n.d. ^{c)}

Table 3-1 Releases of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ and TXB_2 from macrophages

incubated for 1 or 24 hr and a state state

a) Peritoneal exudate cells were incubated for 1 hr, macrophages were then obtained and further incubated for 24 hr. One ml of fresh M EM medium was poured to macrophages and incubated for 1 hr.
b)p(0.001 (when compared with 1 hr by Student's t-test)

c) not detectable, $M\phi$: macrophages.



Fig. 3-2 Releases of $\frac{1}{6}$ -keto-PGF₁ α and TXB₂ into medium during incubation of peritoneal exudate cells (solid lines) and macrophages (dotted lines) obtained by incubation of peritoneal exudate cells for 1 hr. The time indicated in parentheses represents the time of macrophage incubation. Each point represents mean \pm standard deviation (N=3). \odot : 6-keto-PGF₁ α , \odot : TXB₂. M ϕ : macrophages.

を24時間インキュベートした後, 培地を交換して新しくし, さらに1時間インキュベートを行い, その1時間の間に放出された 6-keto-PGF₁ 量を求めたところ, 始めの1時間インキュベートで 20.8 ng であったのに比べ, 1.8 ng と著しく放出量が減少しており, TXB₂ については検出されなかった (Table 3-1)。

マクロファージを長時間インキュベートした場合,伸展したマクロファージ数の増加と PG 類の放出量との平行関係は認められなかったが,インキュベートを始めて 10 分後から 3 時間後までは,6-keto-PGF₁ および TXB2 放出と伸展マクロファージ数の増加は,インキュベート時

間と比例して認められた。そこで Fig. 3-1 および2の結果から,両者の間の相関係数を求めると, 6-keto-PGF₁ については 0.96, TXB₂ については 0.98 という高い相関性が認められた。

マクロファージの伸展そして 6-keto-PGF_{1 α} および TXB₂ 放出とマクロファージ付着面との 関係

マクロファージからの 6-keto-PGF₁^α および TXB₂ 放出とマクロファージの付着,伸展との 関係をさらに検討する目的で,腹腔浸出細胞をシリコン処理したガラスペトリ皿,あるいはテフ ロン膜上で1時間インキュベートした。Table 3-2 に示すように、シリコン処理ペトリ皿,およ びテフロン膜上で腹腔浸出細胞をインキュベートした場合は,無処理ガラスペトリ皿の場合と同 等の付着細胞数を示したが,無処理ペトリ皿で認められたマクロファージの伸展は 34.4% であ ったのに対し、シリコン処理ペトリ皿及びテフロン膜上では、それぞれ 3.6 及び 3.2% と著しく 低下した。この条件下での 6-keto-PGF₁^α および TXB₂ 放出量は無処理ペトリ皿群でのそれぞ れ 29.9 および 2.1 ng に比べ、シリコン処理ペトリ 皿群ではそれぞれ 8.5 および 1.4 ng,テフ ロン膜群ではそれぞれ 9.2 および 1.2 ng と低値を示した。4°C の無処理ペトリ皿で腹腔浸出細 胞をインキュベートした場合でも、付着細胞数には変化が認められなかったが、マクロファージ の伸展は 1.8% であり、6-keto-PGF₁^α および TXB₂ はともに検出されなかった。この 4°C で インキュベートしたマクロファージを 37°C に温度を上げて 1時間インキュベートしたところ、 伸展は 33.5%、6-keto-PGF₁^α および TXB₂ 放出量はそれぞれ 25.6 および 1.9 ng となり、 37°C の無処理ペトリ皿群で見られた伸展の割合、また 6-keto-PGF₁^α および TXB₂ 放出量と、 ほぼ同等の結果が得られた。

Table 3-2 Effects of the various surface to which macrophages adhered and of incubation at 4°C on releases of 6-keto-PGF₁ $_{\alpha}$ and TXB₂

	and the second			A REAL PROPERTY AND A REAL	
	Vesselsa	$\begin{array}{c} \text{Adherent cells} \\ (\times 10^6) \end{array}$	Spreading (%)	6-keto-PGF _{1α} (ng/10 ⁶	TXB_2
Gla	ss dishes (GD)	1.45 ± 0.06	34.4	29.9±5.7	$2.1{\pm}0.3$
Silic	con-coated GD	1.51 ± 0.09	3.6	8.5±0.5°	1.4 ± 0.2^{b}
Tef	lon sheets over	GD 1.47±0.05	3.2	9.2 ± 1.8^{c}	$1.2{\pm}0.1^{o}$
GD	at 4°C	1.42 ± 0.02	1.8	n.d. ^{<i>d</i>}	, a nîd. ™ 0 %

a)Peritoneal exudate cells were incubated for 1 hr at 37°C in various vessels and likewise at 4°C in glass dishes.
b)p<0.05, c)p<0.01 (when compared with GD by Student's t-test)
d)not detectable, Mø : macrophages

マクロファージの伸展に対する EDTA の影響

細胞の運動機能に 2 価カチオンの必要性が知られている⁴⁹⁾。またマクロファージのガラス表面 での伸展は Mg⁺⁺存在下で観察される⁵⁰⁾。このような知見から, EDTA を培地に加えてマクロ ファージの伸展の状態, また 6-keto-PGF₁^α および TXB₂ 放出について検討した。 Table 3-3 に示すように, EDTA 群は付着細胞数について対照群と変化が認められなかったが, 伸展マク ロファージは対照群の 36.7% に対し, 2.8% と EDTA 処理により著しく減少した。 またマク ロファージからの 6-keto-PGF₁^α 放出量は 23.4 から 7.7 ng へ, TXB₂ 量は 2.4 から 1.5 ng へ と EDTA 処理により有意に減少した。

Table 3-3 Effects of EDTA on incubation of peritoneal exudate cells

Treatment ^{a)}	Adherent cells $(\times 10^6)$	Spreading (%)	6-keto-PGF _{1α} (ng/10 ⁶	$\begin{array}{c} \mathrm{TXB}_2\\ \mathrm{M}\phi) \end{array}$
Control	$1.38 \pm 0.06 \\ 1.35 \pm 0.05$	36.7	23. 4 ± 0.6	2.4 \pm 0.1
EDTA		2.8	7. 7 ± 0.4^{b}	1.5 \pm 0.1 ^{b)}

a)Peritoneal exudate cells were incubated for 1 hr with or without EDTA. b)p $\langle 0.001$ (when compared with control by Student's t-test). M ϕ : macrophages

〔考 察〕

マクロファージは in vitro で化学的あるいは物理的刺激により,活性化され,リンホカイン 等の種々の物質を産生する⁵¹⁻⁵⁶⁾。本節の実験において,マクロファージがガラス表面に付着した 後,伸展する現象がマクロファージ自身にとって形態の変化,これは一種の物理的刺激と呼んで もよいと考えるが,これが原因となり,6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ が放出されることを確認 した。Fig. 3-2 に示したように,腹腔浸出細胞のインキュベート,ゼロ時間の培地上清中に 6keto-PGF_{1a} および TXB₂ が検出されなかったこと,シリコン処理ペトリ皿及びテフロン膜上 でほとんど伸展していないマクロファージからの 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出量は無処理 ペトリ皿の場合に比べ,少量であったこと (Table 3-2),さらに EDTA 処理でマクロファージ の伸展を抑制すると,6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出も加制されたこと (Table 3-3)から, 37°C で無処理ペトリ皿でマクロファージがまずガラス表面に付着後,伸展する結果,現われてくる現 象と考えられる。すなわちマクロファージが物質表面に付着し伸展すると,マクロファージの細 胞膜の流動性が変化し、ホスホリパーゼ A₂ の活性化につながり、アラキドン酸の遊離、さらに PG 類が生合成されると考えられる。他の因子,たとえば代表的なリンホカイン50の関与につい ても考慮しなければならないが、腹腔浸出細胞中に存在するリンパ球からリンホカインが放出さ れたとしても1時間以内にその作用が現われることはないので58,その影響はないと考えられる。

本実験ではさらにマクロファージのインキュベート初期にインキュベート時間と 6-keto-PG F_{1a} および TXB₂ 放出量との間に平行関係が認められたことから、マクロファージと相互作用 する物質との関係を PG 類放出という観点から行う実験には、今回のマクロファージのインキュ ベートはよい実験系になると考える。今までのマクロファージでの PG 類代謝に関する多くの研 究はプレラベル法、すなわち ¹⁴C-フラキドン酸をマクロファージに取り込ませて標識し、目的 の反応を行ったときに ¹⁴C-PG 類が生合成され放出という過程が一般的に用いられ ている⁵⁹⁹。 さらにマクロファージを 16-24 時間血清添加培地で培養後、実験に用いるため、測定までに時間 と経費を要し、ときには培養中に汚染等の危険性も考えられる。今まではマクロファージとして 分離した初期の変化については、ほとんど検討されていない。今回のこのマクロファージのイン キュベートで行った PG 類の放出に関する実験系では、マクロファージの長時間の培養を必要と せず、1時間の反応で実験結果が得られ、さらに操作が簡単なことから、今後利用価値があると 思われる。

第2節 ザイモサンによるマクロファージからの 6-keto-PGF₁ および TXB。放出の促進

In vitro でマクロファージにザイモサンを作用させると、 PG 類が放出されることはよく知 られている^{22,23,60,61)}。このザイモサンによるマクロファージからの PG 類放出はマクロファージ によるザイモサン貪食とは直接関係せず、マクロファージの細胞膜とザイモサン粒子との接触と いう相互作用によるという報告がある^{62,63)}。また種々の PG はアデニルシクラーゼを活性化し、 細胞内 cAMP 量を上昇させることが知られており⁶⁴⁻⁶⁸⁾, PGE₁ については細胞内 cAMP 量の 増加により、マクロファージのザイモサン貪食が抑制されるという報告がある⁶⁹⁾。一方マウス腹 腔マクロファージには3種のホスホリパーゼ, すなわち Ca⁺⁺ 依存性 pH 8.5 で活性を示すホス ホリパーゼ A₂, Ca⁺⁺ 非依存性 pH 4.5 で活性を示すホスホリパーゼ A₂, およびホスホリパ ーゼCが存在することが報告されている⁷⁰⁾。以上の知見から、マクロファージ膜とザイモサン粒 子との相互作用と、マクロファージからの 6-keto-PGF1a および TXB2 放出との関係について、 Ca および Mg イオン, EDTA, テオフィリン, ハイドロコーチゾンなどの影響を検討した。 その結果、マクロファージがザイモサンを貪食する場合、マクロファージ膜とザイモサン粒子と の接触という相互作用は、まず Ca⁺⁺ 依存性のホスホリパーゼ A2 に影響を及ぼし、アラキド ン酸の遊離、ひき続き PG 類の生合成及び放出現象をひき起こし、さらにその PG がアデニルシ クラーゼを介して細胞内 cAMP 量に変化を及ぼし、最終的には cAMP によりマクロファージ 膜とザイモサン粒子との相互作用が調節されていると考えられる結果が得られた。

-27 -

〔実験材料および方法〕

マクロファージのインキュベートの条件

前節 (24 頁) に記した方法により 調製したマクロファージに 2,20 および 200 µg のザイモサ ン,5×10⁶ 個のヒツジ赤血球 (日本バイオテスト研究所), あるいは 最終濃度 0.05% のラテッ クスを加えて 1時間インキュベートした。またマクロファージにザイモサン 200 µg を作用させ たときの 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出とザイモサン 貪食におよぼす因子について検討した。 すなわちインドメタシン³⁴⁾, あるいはハイドロコーチゾン⁷¹⁾(Sigma 社) を少量のエタノールに 溶解して,最終濃度 0.1 mM になるように培地中に添加した。なおハイドロコーチゾンは作用 発現までの時間を考慮して⁷²⁾, インキュベート時間を 1 および 2 時間行った。また Ca⁺⁺ および Mg⁺⁺ の 2 価カチオンの関与を 検討する目的で, 0.9% 食塩含有リン酸緩衝液 0.15M, pH7.2 (phosphate buffered saline, 以下 PBS と略す) に Ca⁺⁺ あるいは Mg⁺⁺ を最終濃度 0.5 mM になるように添加して実験を行った。さらに EDTA あるいはテオフィリン (Sigma 社) を最 終濃度 10 mM になるように, マクロファージのインキュベートに添加した場合の細胞内 cAMP 含量に対する両薬物の影響について検討した。

マクロファージのザイモサン貪食およびザイモサン付着の測定

マクロファージによるザイモサン貪食の測定は、まずマクロファージにザイモサン 200 µg を 加えて1時間インキュベートを行った後、70% エタノールで3分間固定し、0.5% 過ヨウ素酸を 15分間作用させ、Schiff の試薬でザイモサンを染色した⁶²⁾。そしてペトリ皿1枚につき 500 個 以上のマクロファージを顕微鏡で観察し、深紅色に染色されたザイモサン粒子2個以上を摂取し たマクロファージをザイモサン貪食マクロファージとし、その細胞数の全マクロファージ数に対 する比率で表わした。一方マクロファージへのザイモサン粒子の付着を求める目的で、サイトカ ラシンB⁷³⁾を作用させ、マクロファージのザイモサン貪食を抑制した。サイトカラシンBはジメ チルスルホオキシドに溶解し、2µg を実験に使用した。マクロファージ膜へザイモサンが付着 しているという判定は、Schiff の試薬で染色されたザイモサン粒子3個以上がマクロファージ 膜に付着してロゼットを形成しているマクロファージをザイモサン付着マクロファージとし、そ の細胞数の全マクロファージ数に対する比率で表わした。

cAMP 測定とマクロファージ試料の調製

マクロファージのインキュベートに種々の薬物を加えて1時間反応後, MEM 培地にてマクロファージを洗滌した。5%トリクロロ酢酸⁷⁴⁾ 1ml をペトリ皿に入れ, マクロファージをラバー

ポリスマンを用いて剥がし, 氷冷下で 30 W, 1 秒間, 5 回の超音波処理を行った。これを 4°C で 15 分間, 3000 rpm で遠心分離して上清をとり, 水飽和ジエチルエーテルにより, トリクロロ 酢酸を抽出した。そして試料液を乾燥後, 0.1 ml の酢酸緩衝液, 0.05 M, pH 6.2 に溶解して, 測定用試料とした。

cAMP 量の測定は 6-keto-PGF₁^a および TXB₂ のラジオイムノアッセイと同様にセルハー ベスターを用いた沪過法によって行った。試薬の希釈液には上記の酢酸緩衝液を用いた。試料あ るいは1ml 中に 0.1~100 pmol 含む標準 cAMP 溶液,約 10,000 cpm の ³H-cAMP(50 Ci/ mmol, New England Nuclear 社) および 100 倍希釈の抗 cAMP 抗血清のそれぞれ 0.05 ml をマイクロプレートにとり、4°C で1時間放置した。反応後セルハーベスターを用いて抗体結 合 ³H-cAMP をフィルター上に沪取し、放射活性を測定した。なおこの cAMP 量の測定につ いても、二抗体法とセルハーベスターを用いた沪過法とで精度および感度を比較検討した結果、 標準曲線については両測定法の間の相関係数が 0.997 という高い相関性が見られた。

〔結 果〕

マクロファージ膜とザイモンサン粒子との相互作用とマクロファージからの 6-keto-PGF₁^{α} および TXB₂ 放出

まずマクロファージに種々の粒状物質を作用させたときの 6-keto-PGF1a および TXB2 放出 の検討を行った。ザイモサン、ヒツジ赤血球あるいはラテックスをマクロファージに加えて1時 間インキュベートしたときの 6-keto-PGF1α および TXB2 放出量を Fig. 3-3 に示す。ザイモ サンの添加量を増加させた場合、6-keto-PGF₁ および TXB2 の放出が著しく促進され、 ザイ モサン 200 µg 添加群では対照群に比べ,約5倍の増加を示した。ヒツジ赤血球およびラテック ス群では Fig. 3-3 で使用した量の10倍量を用いても、対照群と有意な差は認められなかった。 これらの結果から、マクロファージはザイモサンのような刺激性を示す生理活性物質の影響によ り、6-keto-PGF1。および TXB2 の放出が促進されると考えられる。 なおこの実験系を用いて のザイモサンによる、6-keto-PGF1a および TXB2 放出の傾向は、 プレラベル法での報告⁵⁹⁾と 一致し、さらにマクロファージのザイモサン貪食と PG 類の放出は直接関係しないという報告⁶²⁾ とも一致した。すなわち Table 3-4 に示すように、マクロファージにザイモサン 200 µg を加 えて1時間反応させたときの,ザイモサン貪食および付着の状態を示すマクロファージはそれぞ れ 37.0 および 7.5% であったが, サイトカラシンBを加えて反応させると, ザイモサンを貪食 したマクロファージは全く検出されず、ザイモサンだけを作用させたときのザイモサンの貪食お よび付着の状態のマクロファージの合計, 44.5% とほぼ同等の 46.2% という付着が認められた。 一方ザイモサンにより促進された 6-keto-PGF₁ および TXB₂ 放出は、サイトカラシンBによ

- 29 -



Fig. 3-3 Effects of different kinds of particles on release of 6-keto-PGF₁ and TXB₂ from macrophages. Macrophages obtained by incubation of peritoneal exudate cells for 1 hr were exposed to 2.0, 20 or 200 μ g of zymosan, 5×10⁶ of sheep red blood cell (SRBC), or 0.1 ml of 0.5% latex. Each column represents mean \pm standard deviation (N=3). \Box : 6-keto-PGF₁, \blacksquare : TXB₂, M ϕ : macrophages. *: p<0.01, **: p<0.001 (when compared with control by Student's t-test)

りマクロファージのザイモサン貪食を抑制しても、放出量はさら 増加した。このサイトカラシ ンBによる放出量の増加反応については、さらに検討が必要であるが、以上の結果から、マクロ ファージにザイモサンを作用させたときの 6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ の放出は、マクロファ ージのザイモサン貪食と直接関係せず、マクロファージ膜とザイモサン粒子との接触という相互 作用によると考えられる。

Treatments ^a	Phagocytosis (percent	Adherence age)	6-keto-PGF ₁ ^α (ng/1	TXB_2
Control	<u>. A</u> dhe tueschi ere	9206	22.4±2.7	1.8 ± 0.2
Cytochalasin B			24.8 ± 4.1	2.1 ± 0.2
Zymosan	37.0	7.5	74.5 ± 7.7^{d}	4.0 ± 0.1^{d}
Zymosan + Cytochalasin	B n.d. ^{<i>c</i>)}	46.7	108 ± 14.0^{e}	5.1 \pm 0.3 ^{f)}

Table 3-4 Effects of cytochalasin B on macrophages

a)Cytochalasin B and/or zymosan were added to macrophages and incubated for 1 hr.

b) no occurrence. c) not detectable. $M\phi$: macrophages.

d) $p\langle 0.001$ (when compared with control by Student's t-test)

e) $p\langle 0.05, f \rangle p\langle 0.01$ (when compared with zymosan by Student's t-test)

マクロファージ膜とザイモン粒子との相互作用に及ぼすハイドロコーチゾンの影響

マクロファージ膜とザイモサン粒子との相互作用と 6-keto-PGF1a および TXB。放出との間 に、どのような因子が関係しているかを解明する目的で、アラキドン酸カスケードに関係する酵 素の阻害剤をマクロファージのインキュベートに 添加し, 6-keto-PGF1a および TXB2 放出量 を測定した。Table 3-5 に示すように、対照群に比ベインドメタシン群では 6-keto-PGFia お よび TXB₂ 放出はそれぞれ約 1/5 および 1/2 に抑制された。一方ハイドロコーチゾン群では1 時間反応させた場合は、 対照群に比べて大きな変化は認められなから たが、 2 時間反応させる と、対照群において見られる1時間反応から2時間反応の間に放出される 6-keto-PGF1a および TXB₂の増加分がほぼ完全に抑制された。このことはハイドロコーチゾンの処理1時間で、マク ロファージに対して効果を現わし、これらの放出を抑制する作用が発現したと考えられる。マク ロファージにザイモサンを作用させて促進された 6-keto-PGF1 および TXB2 放出も, インド メタシンあるいはハイドロコーチゾンにより著しい抑制が認められた。このときのマクロファー ジのザイモサン貪食については、ザイモサン群では 38.5% であったが、これにインドメタシン を作用させてもその影響は認められなかった。一方ザイモサンを2時間反応させた群では63.0% であるのに対し、ハイドロコーチゾンを同時に作用させると、2時間反応では39.2%を示し、 約 20% に相当する貪食が抑制された。 またこの実験系にサイトカラシンBを 加えてインキュベ ートを行い、マクロファージのザイモサン付着の割合に対するインドメタシンあるいはハイドロ コーチゾンの作用を検討した。ザイモサンとハイドロコーチゾンの同時処理群の1時間反応と2 時間反応とを比較すると、ザイモサン群で見られた付着の割合の増加は認められず、ザイモサン 貪食の場合と同様な結果が得られた。以上の結果から、マクロファージ膜とザイモサン粒子との 接触という相互作用がひき金となって, マクロファージ膜の酵素系に変化 を生 じ, 結 果 的 に

 $6-keto-PGF_{1\alpha}$ および TXB₂ の放出が促進されたと考えられる。

Treatments ^{a)}	Reaction time(hr)	Phagocytosis A (percenta	dherence ^{b)} age)	$\begin{array}{c} \text{6-keto-PGF}_{1\alpha} \text{TXB}_2 \\ (\text{ng}/10^6 \text{M}\phi) \end{array}$		
Control	1	()		22.5 ± 3.9	1.7 ± 0.0	
	2			47.3 ± 1.7^{d}	$2.7{\pm}0.3^{d}$	
Indomethacin(IM)	1			4.1 ± 0.4^{d}	$0.8 {\pm} 0.0^{d}$	
Hydrocortisone(HC)	1	_		22.1 ± 4.5	1.7 ± 0.0	
	2			$19.9\pm$ 2.4	1.5 ± 0.2	
Zymosan	1	38.5	44.5	112 ± 9.5^{e}	6.3±0.3 ^{e)}	
	2	63.0	68.8	218 ± 3.0^{f}	10 ± 0.3^{f}	
Zymosan+IM	1	38.6	42.2	4.6 ± 1.2^{f}	0.9±0.1 ^f	
Zymosan+HC	1	40.0	45.6	88.3±21.0	5.7±0.7	
	2	39.2	47.3	115 ± 16.0	6.4 ± 0.4	

Table 3-5 E	Effects of	indomethacin	or	hydrocortisone	on	macrophages
-------------	------------	--------------	----	----------------	----	-------------

a)Indomethacin or hydrocortisone and/or zymosan were added to macrophages and incubated for 1 or 2 hr.

b)Adherence was estimated in the presence of cytochalasin B.

c) no occurrence. $M\phi$: macrophages.

d p = 0.01, e p = 0.001 (when compared with control for 1 hr by Student's t-test).

f)p $\langle 0.001$ (when compared with zymosan for 1 hr by Student's t-test).

マクロファージ膜とザイモサン粒子との相互作用におよぼす2価カチオンの影響

マクロファージに ザイモサン 200µg を加え, さらに最終濃度 10 mM になるように EDTA を加えて1時間インキュベートし, EDTA と反応する2価カチオンとマクロファージとの関係 について検討した。Table 3-6 に示すように, 6-keto-PGF1^a および TXB² 放出に対しては,

Treatments ^a)	Phagocytosis Adl (percentag	nerence ^{b)} e)	6-keto-PGF _{1α} (mg/10 ⁶	$\begin{array}{c} \mathrm{TXB}_{2}\\ \mathrm{M}\phi) \end{array}$	cAMP (pmol/3×10 ⁶ М¢)
Control	c)		20.3 ± 1.2	1.8 ± 0.1	2.5 ± 0.3
EDTA	, <u> </u>		23.8 ± 3.7	1.6 ± 0.5	4.7±0.2 ^{e)}
Zymosan	40.8	47.9	79.0 \pm 11.0 ^d	5.8 ± 0.1^{e}	4.0 ± 0.3^{d}
Zymosan+EDTA	2.2	23.6	23.5 ± 3.2^{f}	2.1 ± 0.2^{g}	5.2 ± 0.6^{d}

Table 3-6 Effects of EDTA on incubation of macrophages

a)EDTA and/or zymosan were added to macrophages and incubated for 1 hr.

b)Adherence was estimated in the presence of cytochalasin B.

c) no occurrence. $M\phi$: macrophages.

d) $p\langle 0.01, e \rangle p\langle 0.001$ (when compared with control by Student's t-test).

f)p $\langle 0.01, g \rangle$ p $\langle 0.001$ (when compared with zymosan by Student's t-test).

EDTA 処理群は対照群と比べて有意な差は認められなかったが、ザイモサンにより促進された 6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ 放出は、ザイモサンとの同時処理群で対照群レベルにまで抑制さ れた。ザイモサン貪食についてみると、ザイモサン群の 40.8% に対し、EDTA 同時処理により、 2.2% と著しく抑制され、サイトカラシンB処理によるザイモサン付着の割合についても、47.9 % から 23.6% へと抑制された。

さらに 2 価カチオンの影響を直接確かめる目的で、PBS を用いてマクロファージのインキュ ベートを行い、Ca⁺⁺ あるいは Mg⁺⁺ のザイモサン貪食におよぼす影響を検討した。Table 3-7 に示すように、Ca⁺⁺ お よび Mg⁺⁺ 両イオンが存在しない場合にザイモサンを作用させると、 MEM 培地でインキュベートした場合とは異なり、6-keto-PGF₁^a および TXB₂ 放出の著しい 促進は認められず、マクロファージのザイモサン貪食も 1.8% と著しい低値を示した。Ca⁺⁺ 添 加群では 6-keto-PGF₁^a および TXB₂ 放出量はザイモサン群に比べ約 4 倍の増加を示したが、 ザイモサン貪食は 5.3% であった。一方 Mg⁺⁺ 添加群ではこれら放出量は対照群と比べて変化 が認められなかったが、ザイモサン貪食は 30.5% と MEM 培地の場合に近い貪食の割合を示し た。Ca⁺⁺ お よび Mg⁺⁺ 同時添加群では MEM 培地の場合に近い貪食の割合を示し た。Ca⁺⁺ お よび Mg⁺⁺ 同時添加群では MEM 培地の場合に近い貪食の割合を示し だ。 TXB₂ 放出量であり、そして同等のザイモサン貪食を示した。 すなわちマクロファージ膜と ザイモサン粒子との 相互作用については、Mg⁺⁺ 依存性であり、6-keto-PGF₁^a および TXB₂ 放出に関する酵素系の活性化には Ca⁺⁺ の必要性が考えられる結果が得られた。

Treatments ^{a)}	Phagocytosis (%)	6-keto-PGF _{1α} (ng/10 ⁶ Ι	TXB_{2} $M\phi$)
Control	b)	10.8 ± 0.2	$1.4{\pm}0.1$
Zymosan	1.8	15.2 ± 1.4^{c}	1.9 ± 0.1^{d}
Zymosan+Ca ⁺⁺	5.3	48.6 ± 3.3^{e}	5.9 ± 0.1^{e}
$Zymosan + Mg^{++}$	30.5	13.9 ± 2.1	1.3 ± 0.1
$Zymosan + Ca^{++} \& Mg^{++}$	36.0	77.5 ± 4.5^{e}	7.2 ± 0.4^{e}

Table 3-7 Effects of bivalent cations on macrophages exposed to zymosan

a)Ca⁺⁺ or Mg⁺⁺ was added to macrophages exposed to zymosan and incubated for 1 hr in PBS.

b) no occurrence. $M\phi$: macrophages.

c)p $\langle 0.05, d \rangle$ p $\langle 0.01$ (when compared with control by Student's t-test).

e)p $\langle 0.001$ (when compared with zymosan by Student's t-test).

マクロファージ膜とザイモン粒子との相互作用と cAMP との関係

培地に Ca⁺⁺ および Mg⁺⁺ が存在しない場合には、マクロファージによるザイモサン付着お よび貪食が減少し、6-keto-PGF₁^a および TXB₂ の放出量もまた減少が認められた (Table 36)。このような結果を示したマクロファージの細胞内 cAMP 量について検討した結果, Table 3-6 に示すように, 対照群に比べザイモサン群で約1.5 倍に cAMP 量が増加し, ザイモサンと EDTA の同時処理群ではさらに増加した。この傾向は Smith らの結果⁶⁹⁾と一致した。一方 E DTA 群も対照群に比べ約2倍に cAMP 量が増加した。この結果は cAMP を 5'-アデノシン モノホスフェイトに変換するホスホジエステラーゼが Ca⁺⁺ 依存性であることに起因すると考え られるが, この点についてはさらに検討が必要である。しかしこれらの結果から, マクロファー ジ膜とザイモサン粒子との相互作用の減少は, 6-keto-PGF₁ および TXB₂ 放出の抑制, さら に細胞内 cAMP 量の増加につながる関係が考えられる。

そこでホスホジエステラーゼを阻害するテオフィリンの影響について検討した。Table 3-8 に 示すように、マクロファージのザイモサン貪食については、ザイモサン群の 38.2% に対し、ザ イモサンとテオフィリンの同時処理群では 2.1% と著しく減少した。サイトカラシン B処理によ るザイモサン付着の割合についても、ザイモサン貪食の場合と同様にテオフィリン同時処理によ り抑制された。このときのマクロファージから放出された 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 量はザ イモサン群のそれぞれ 80.0 および 5.0 ng に対し、テオフィリン同時処理群ではそれぞれ 12.4 および 1.2 ng となり、テオフィリン単独処理群での放出量と同等のレベルにまで減少した。こ のようにテオフィリンにより、マクロファージのザイモサン貪食および付着、さらに 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出が抑制されたが、このときの細胞内 cAMP 量はザイモサン群の 4.6 pmol に対し、テオフィリン同時処理群で 8.8 pmol と約2倍に増加した。以上の結果から、マ クロファージ膜とザイモサン粒子との 相互作用と、マクロファージからの 6-keto-PGF_{1a} およ び TXB₂ 放出との間に、細胞内 cAMP というもう一つの別の因子の関与の可能性が考えられ る結果が得られた。

Treatments ^{a)}	Phagocytosis A (percen	Adherence ^{b)} tage)	6-keto-PGF ₁ (ng/10 ⁶	$_{\alpha}^{\alpha} TXB_{2}$ M ϕ)	$\begin{array}{c} \text{cAMP} \\ (\text{pmol}/3 \times 10^6 \text{M}\phi) \end{array}$
Control	c)		20.9±2.9	1.9 ± 0.2	2.7 ± 0.2
Theophylline (TP)	2000/1940		12.4 ± 0.3^{d}	1.3 ± 0.3	7.5 ± 0.0^{f}
Zymosan	38.2	46.5	80.0 ± 8.2^{f}	5.0 ± 0.1^{f}	4.6±0.3 ^e
Zymosan+TP	2.1	6.8	12.4 ± 1.9^{g}	1.2 ± 0.2^{g}	8.8 ± 0.2^{g}

Table 3-8 Effects of theophylline on incubation of macrophages

a) Theophylline and/or zymosan was added to macrophages and incubated for 1 hr.

b)Adherence was estimated in the presence of cytochalasin B.

c) no occurrence. M ϕ : macrophages.

d)p $\langle 0.05, e \rangle$ p $\langle 0.01, f \rangle$ p $\langle 0.001$ (when compared with control by Student's t-test). g)p $\langle 0.001$ (when compared with zymosan by Student's t-test). マクロファージの貪食作用は貪食される物質のマクロファージ表面への接触から始まる。そこで起炎剤であるザイモサンをマクロファージに作用させたとき、初期に発現するであろうマクロファージによる生体防御反応の一端を解明する目的で、マクロファージからの 6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ の放出について検討した。

マウス腹腔マクロファージに in vitro でザイモサンを作用させると、 マクロファージからの 6-keto-PGF1。および TXB2 放出の促進が認められ (Fig. 3-3), この両物質の放出はマクロフ ァージのザイモサン貪食と直接関係せず、マクロファージ膜とザイモサン粒子との接触という相 互作用によることが確認された (Table 3-4)。この反応の機構を解明する目的で, まずアラキボ ン酸カスケードに注目し、これに関係する酵素の阻害剤を用いて実験を行った。ハイドロコーチ ゾンは細胞の核に作用し、ホスホリパーゼ A。阻害タンパク質, macrocortin を誘導することが 知られているが72), マウス腹腔マクロファージでもハイドロコー チ ゾン処理後1時間で, この macrocortin が誘導されたことが、間接的に示された(Table 3-5)。そしてインドメタシンおよ びハイドロコーチゾンはともに 6-keto-PGF1a および TXB2 放出を抑制したが, マクロファー ジ膜とザイモサン粒子との接触という相互作用に対しては、インドメタシンは影響をおよぼさず、 ハイドロコーチゾンにより抑制されることが本研究により明らかとなった (Table 3-5)。またこ の相互作用は EDTA 処理により (Table 3-6), さらにテオフィリン処理により (Table 3-8), 阻害され、 6-keto-PGF_{1α} および TXB。 放出も抑制された。 一方細胞内 cAMP 量が上昇する ことでホスホリパーゼ A。は阻害されることが知られており⁷⁵⁾,以上の実験結果を総合して考え ると、 マクロファージ膜とザイモサン粒子との接触という相互作用がひき金となり、 結果的に 6-keto-PGF1。および TXB。放出が促進されるが、その相互作用の初期の反応は、マクロファ ージ膜に存在するホスホリパーゼ A2 の活性化と関係があると考えられる。

またマクロファージからの 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出に対するマクロファージ膜とザ イモサン粒子との相互作用に 2 価カチオンの関与が示された (Table 3-6)。マクロファージのザ イモサン貪食は Mg⁺⁺ 存在下で観察されたが (Table 3-7), マクロファージの伸展等の機能の 発現に Mg⁺⁺ が必要である⁴⁹⁾ ということを考えると, マクロファージのザイモサン貪食の過程 に Mg⁺⁺ が不可欠であるというのも当然の現象と考えられる。しかし Mg⁺⁺ が存在し, マクロ ファージがザイモサンを貪食しても, Ca⁺⁺ が存在しなければ, 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放 出の促進は認められなかった (Table 3-7)。これらの結果は PG 類放出に関係するホスホリパ ーゼ A₂ 等の酵素の活性化に Ca⁺⁺ の必要性を裏付けるものである。

さらに細胞内 cAMP 量について検討したところ、細胞内 cAMP はマクロファージ膜とザイ

— 35 —

モサン粒子との相互作用を調節していると考えられる結果が得られた。 すなわち 細胞内 cAMP 量が上昇した場合, マクロファージによるザイモサン貪食および付着の割合が減少した (Table 3-6,8)。6-keto-PGF₁^a および TXB₂ は放出されるときはそれぞれ PGI₂ および TXA₂ とし て放出される。 PGI₂ はアデニルシクラーゼを活性化することが知られており⁶⁴⁻⁶⁸⁾, 著者もこの 実験系に PGI₂ を作用させたときに細胞内 cAMP 量が上昇することを確認している。マクロフ ァージにザイモサンを作用させた場合に cAMP 量が増加する現象は, ザイモサンによりマクロ ファージから PGI₂ が放出され, それがアデニルシクラーゼを活性化するためと考えられる。言 い換えれば, マクロファージにザイモサンが 作用し, その結果合成され, 放出された PGI₂ は cAMP 産生を介して, マクロファージのザイモサン貪食を調節している 可能性が考えられる。 一方 TXA₂ は Ca イオノフォア作用を有することから⁷⁶⁾, TXA₂ の放出は細胞内 cAMP 量の 減少をひき起こすと考えられるが, この点についてはさらに検討が必要である。

最近, 膜でのホスファチジルエタノールアミンのメチル化,あるいはホスファチジルイノシト ール代謝回転⁷⁷⁾が注目されている。すなわち何らかの刺激を受けた血小板あるいはリンパ球にお いて、ホスファチジルイノシトールの代謝回転が早まり、アラキドン酸の遊離が増加し、PG 類 が生合成される。この代謝回転にはホスホリパーゼCが関与するという⁷⁸⁾。しかしマウス腹腔マ クロファージの場合、¹⁴C-アラキドン酸をマクロファージに取り込ませると、ホスファチジルコ リンに約50%取り込まれ⁷⁹⁾、また取り込まれた¹⁴C-アラキドン酸のリン脂質からの放出の検討 では、そのリン脂質はホスファチジルコリンであり、他のリン脂質からの放出はなかったとい 5⁶²⁾、以上の知見から考えて、マウス腹腔マクロファージでのPG 類合成に関するアラキドン酸 はホスファチジルコリン由来であり、そのリン脂質からのアラキドン酸の遊離には Ca⁺⁺ 依存性 のホスホリパーゼ A₂⁷⁰⁾が関与しているものと考えられる。

 PGI_2 および TXA₂ は同じ前駆体であるアラキドン酸から 生合成され, 相反する生理活性を 示している。たとえば血管壁の損傷等で血小板では TXA₂ が生合成され, 血小板凝集および血 管平滑筋収縮を促進する¹⁰⁻¹²⁾。一方血管内皮細胞では PGI₂ が生合成され, 血小板凝集を阻止し, 血管平滑筋弛緩作用を示す^{8,9)}。 このようにこの両物質の生成の 均衡がとれて, 生体の恒常性が 成立していると考えられている。これを PGI₂—TXA₂ 陰陽説と呼んでいる⁸⁰⁾。本研究で用いた マウス腹腔マクロファージでは同一細胞種でこの両物質が生合成され, 細胞内 cAMP を介して 調節されることは,非常に興味深い。マクロファージ膜とザイモサン粒子との相互作用によるマ クロファージからの PGI₂ および TXA₂ の放出機構に他の因子, たとえば cGMP, 補体系等 の関与も考えられるので,その点についての検討, さらに PGI₂ および TXA₂ がマクロファー ジから放出された場合, 他の細胞あるいは組織に対して,生理活性上どのような影響をおよぼし ているかは、今後さらに検討を重ねたい。 総 括

炎症部位で 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ が検出されて以来,これらの前駆体で生理活性を有 する PGI₂ および TXA₂ の炎症に関する役割が注目されている。種々の刺激剤により活性化さ れたマクロファージの PG 類産生に関しては多くの報告がある。しかしマクロファージの培養お よび実験操作上の条件,あるいは異物貪食過程での PG 類の産生機構についての詳細は判ってい ない。またマクロファージに TXB₂ が存在するか否かについても結論が得られていない。そこ で著者は 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ のラジオイムノアッセイ法を用いて,マウス腹腔マクロ ファージの 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 産生あるいは放出量に関して種々の検討を行った。そ の結果,いくつかの新しい知見が得られたので,研究の成果を要約し、以下に示す。

1. 6-keto-PGF_{1α} および TXB₂ の測定にはラジオイムノアッセイ法を 用いた。 その抗原抗 体複合物の分離にセルハーベスターの機能を応用した沪過法を用いた結果,非常に短時間に分離 操作ができ,二抗体法によるラジオイムノアッセイと同等の感度および精度が得られた。

2. 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ はマウス腹腔浸出細胞の中で,特にマクロファージにより 産生される。実験操作上のことであるが,ガラス付着法により得られたマクロファージをラバー ポリスマンで剝がし取るという物理的刺激により,マクロファージの 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 産生能が高められることを明らかにした。

3. マクロファージを 37°C でガラスペトリ皿でインキュベートすると、3時間までは時間依存的に伸展するとともに、マクロファージから 6-keto-PGF₁ および TXB² が放出された。一方シリコン処理ガラスペトリ皿およびテフロン膜上では、マクロファージの伸展はほとんど認められず、6-keto-PGF₁ および TXB² 放出量も無処理ガラスペトリ皿の場合に比べ低値を示した。すなわちマクロファージの伸展という形態の変化とマクロファージからの 6-keto-PGF₁ および TXB² 放出との間に、高い相関性があることを初めて示した。

4. In vitro でマクロファージにザイモサンを作用させたときの 6-keto-PGF_{1a} および TX B₂ 放出に関係する因子について検討した結果, マクロファージ膜とザイモサン粒子との 接触は Mg⁺⁺ 依存性であった。また両物質の放出の第一段階に関係するホスホリパーゼ A₂ は Ca⁺⁺ 依 存性であることが示された。ホスホリパーゼ A₂ の 阻害物質を誘導する ハイドロコーチゾンは 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出を抑制するとともに, マクロファージによるザイモサン貪食 をも抑制することを初めて明らかにした。さらにテオフィリンによりマクロファージ内 cAMP 量を高めると、マクロファージによるザイモサン貪食、そして 6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放 出が抑制された。これらの結果から、6-keto-PGF_{1a} および TXB₂ 放出につながるマクロファ ージ膜とザイモサン粒子との反応は、ホスホリパーゼ A₂ の活性化と関係し、マクロファージの ザイモサン貪食はマクロファージ内 cAMP 産生により調節される可能性が考えられる。

以上示したようにマクロファージはガラス表面,あるいはザイモサン等の異物との接触により, 形態上にも機能的にも変化を生じ,その一つとしてマクロファージからの 6-keto-PGF_{1a} およ び TXB₂ 放出が認められた。またこの放出にホスホリパーゼ A₂ あるいは cAMP が関係する ことを示したが,他の因子,たとえば cGMP,補体系等の関与も考えられ,マクロファージと 異物との接触によって始まる異物処理機構の解明を今後試みたい。

謝 辞

本研究に際し,終始御懇篤なる御指導を賜りました城西大学薬学部倉田宗司教授に衷心より感 謝の意を表します。また有益な御助言を賜りました東京都老人総合研究所薬理研究室長,室田誠 逸博士に深謝致します。さらにこの研究に御協力頂いた城西大学薬学部生理化学教室の皆様に感 謝致します。 本論文は下記に示した発表論文を参考にして作成した。

第1章に関して

●マウス腹腔マクロファージ調製時の物理的刺激と6-ケト-プロスタグランジン F_{1α} およびトロンボキサン B₂ 産生について

小山岩雄,山上治夫,桑江豊保,倉田宗司 薬学雑誌,<u>102</u>,796-799(1982) ● Cyclic AMP のラジオイムノアッセイの B/F 分離をセルハーベスターにより行う迅速簡便法 小山岩雄,桑江豊保,倉田宗司 薬学雑誌,102,695-697(1982)

第3章に関して

- Release of 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ and thromboxane B_2 from mouse peritoneal macrophages during their adhesion and spreading on a glass surface.
 - Koyama, I., Yamagami, H., Kuwae, T. and Kurata, M. Prostaglandins, 23, 777-786 (1982)
- ●ハイドロコーチゾンによるマウス腹腔マクロファージのザイモサン付着および貪食の抑制
 小山岩雄,山上治夫,桑江豊保,倉田宗司 薬学雑誌,<u>102</u>,698-700 (1982)

参考文献

- 1. 鹿取信,山本尚三,佐藤和雄 "プロスタグランジン"第1版 講談社サイエンティフィック 東京(1978)
- 2. Siegel, M. I., McConnel, R. T. & Cuatrecasa, P. Proc. Nat. Acad. Sci., <u>76</u>, 3774 (1979)
- 3. Brocklehurst, W. E. J. Physiol., 120, 16 (1953)
- Morris, H. R., Taylor, G. W., Piper, P. J. & Tippins, J. R. Nature, <u>285</u>, 104 (1980)
- Örning, L., Hammarström, S. & Samuelsson, B. Pros. Nat. Acad, Sci., <u>77</u>, 2014 (1980)
- 6. Samuelsson, B. V International Conference on Prostaglandins abstract pp. 1 (1982)
- 7. Moncada, S., Gryglewski, R. J., Bunting, S. & Vane, J. R. Nature, 263, 663 (1976)
- Hamberg, M., Svensson, J. & Samuelsson, B. Proc. Nat. Acad. Sci., <u>72</u>, 2994 (1975)
- 9. Gorman, R. R., Bunting, S. & Miller, D. V. Prostaglandins, 13, 389 (1977)
- 10. Dusting, G. J., Moncada, S. & Vane, J. R. Prostaglandins, 13, 3 (1977)
- 11. Sevensson, J. & Hamberg, M. Prostaglandins, 12, 943 (1976)
- Charo, I. F., Feiman, R. D., Detwiler, T. L., Smith, J. B., Ingerman, C. M. & Silver, M. L. Nature, 269, 66 (1977)
- Samuelsson, B. Prostaglandin endoperoxides and thromboxanes, Roles in platelets. Adv. Pharmacol. Ther., Proc. Int. Conger. Pharmacol. 7 th 4, 111 (1979)
- 14. McGuire, J. C. & Sun, F. F. Arch. Biochem. Biophys., 189, 731 (1978)
- Chang, W. C., Murota, S., Matsuo, M. & Tsurufuji, S., *Biochem. Biophys. Res.* Commun. 72, 1259 (1976)
- 16. Murota, S., Morita, I. & Abe, M. Biochim. Biophys. Acta, 479, 122 (1977)
- 17. Chang, W. C., Murota, S. & Tsurufuji, S. Biochem. Pharmacol., 27, 109 (1978)
- Weismann, G. The mediators of inflammation. ed. by Weismann, G. Plenum Press. New York, pp 2 (1974)
- 室田誠逸 "プロスタグランジンの生化学・基礎と実験"室田誠逸編 東京化学同人 東京 pp 3 (1982)
- 20. Ann Kitchen, E., Boot, J. R. & Dawnson, W. Prostaglandins, 16, 239 (1978)

- 21. Humes, J. L., Bonney, R. J., Pelus, L., Dahlgren, M. E., Sadowski, S. J., Keuhl, F. A. & Davies, P. Nature, 269, 149 (1977)
- 22. Murota, S., Kawamura, M. & Morita, I. Biochim. Biophys. Acta, 528,507 (1979)
- 23. Feuerstein, N., Foegh, M. & Ramwell, P. W. Br. J. Pharmac., 72, 389 (1981)
- 24. Bockmann, R. S. Prostaglandins, 21, 9 (1981) is contributed a proceeding of the
- 25. Levine, L. & Vanakis, H. V. Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 1171 (1971)
- Caldwell, B. V., Burstein, S., Brock, A. W. & Speroff, L. J. Clin. Endocriol. Metab., <u>33</u>, 171 (1971)
- 27. Coller, C. A., King, G. W., Hertubise, P. E., Sagone, A. L. & LoBuglio, A. F.
 J. Immunol., 111, 1610 (1973)
- Pierce, C. W. & Kapp, J. A. Immunology of the macrophages. ed. by Nelson, D.
 S. Academic Press. New York, pp 1 (1976)
- 29. Kumagai, K., Itoh, K., Himura, S. & Tada, M. J. Immunol. Methods, 29, 17 (1979)
- 30. Hammond, M. E. & Dovorak, H. F. J. Exp. Med., 136, 1518 (1972) and a contract of the second seco
- Toh, K., Yamamoto, N., Suzuki, T. & Kikuchi, K. J. Reticuloendo. Soc., 26, 273 (1979)
- 32. Axen, U. Prostaglandins, 5, 45 (1974) April 10 Joseph and 10 Joseph and 10 Joseph
- 33. Cornette, J. C., Kirton, K. T., Barr, K. L. & Fores, A. D. Clinical application in
- Kisco, New York, pp 246 (1972)
- 34. Flower, R., Gryglewski, R., Herbaczynska-Cedro, K. & Vane, J. L. Nature New Biology, 238, 104 (1972)
- □35.『森田育男,』室田誠逸, プロスタグランジン SGC-MS の医学→生化学への応用ご第1版 立松晃編 化学同人,京都 pp 135 (1980)
- 36. 山上治夫 トロンボキサン B。および 6-ケトプロスタグランジン Fac のラジオイムノア
- シリニッセイとその応用、城西大学大学院。修士論文(1979)/ Decement Lineauxの118
- 37. Bergström, S., Carlson, L. A. & Weeks, J. R. Pharmacol. Res., 20, 12 (1968)
- 38. Kelly, R. W. Anal. Chem., 45, 2079 (1974) Hooder and December 21 and december 20
- 39. Salmon, J. A. Prostaglandins, 15, 383 (1978)
 - 40. Mitchell, M. D. Prostaglandins and Medicine, 1, 13 (1978) Obtained and
 - 41. Tai, H. H. & Yuan, B. Anal. Biochem., 87, 343 (1979)
- 42. Deheny, T. P., Murdoch, W. S., Boyle, L., Walters, W. A. W. & Boura, A. L.

- A. Prostaglandins, 21, 1003 (1981)
- 43. 岡林直 サイクリック AMP "ラジオイムノアッセイ"第1版 入江実編 講談社,東京
 pp 353 (1974)
- 44. Wilton, J. M., Rosentreich, D. L. & Oppenheim, J. J. J. Immunol., 114, 388(1975)
- 45. Andersson, J., Molchers, F., Calanos, C. & Juderitz, O. J. Exp. Med., <u>137</u>, 943 (1973)
- 46, Kimze, H. & Vogt, W. Ann. N. Y. Acad. Sci., 180, 123 (1971)
- 47. 竹石桂一 代謝 13, 436 (1976)
- Meer, J. W. M., Bulterman, D., Zwet, T. L., Dlezenga-Claasen, I. & Furth, R. J. Exp. Med., <u>147</u>, 271 (1978)
- Roos, D., Bot, A. A. M., Schaik, M. L. J., Boer, M. & Daha, M. R. J. Immunol., 126, 433 (1981)
- 50. 熊谷勝男,日沼州司,マクロファージとファイブロネクチン"生体防御の機構"第2版, 東京大学出版会編,東京 pp 163 (1981)
- 51. Nathan, C. F. & Root, R. K. J. Exp. Med., 146, 1648 (1977)
- 52. Tamoto, K. & Koyama, J. J. Biochem., 87, 1649 (1980)
- 53. Pabst, M. J. & Johnston, R. B. J. Exp. Med., 151, 101 (1980)
- 54. Edelson, P. J. & Erbs, C. J. Exp. Med., 147, 77 (1978)
- 55. Morland, B. J. Reticuloendo. Soc., 26, 749 (1979)
- Walenga, R. W., Showell, H. J., Feinstein, M. B. & Becker, E. L. Life Sciences, 27, 1047 (1980)
- 57. Nathan, C. F., Karnovsky, M. L. & David, J. R. J. Exp. Med., 133, 1356(1971)
- 58. Schubert, R. D., Wong, J. & David, J. R. Cell Immunol., 55, 155 (1980)
- Bonney, R. J., Naruns, P., Davies, P. & Humes, J. L. Prostaglandins, <u>18</u>, 605 (1979)
- 60. Glatt, M., Kälin, H., Wagner, K. & Brune, K. Agents and Actions, 7, 321(1977)
- Rouzer, M., Scott. W. A., Hamill, A. L. & Cohn, Z. A. J. Exp. Med., <u>152</u>, 1236 (1980)
- 62. Hsueh, W., Kuhn, C. & Needleman, P. Biochem. J., 184, 345 (1979)
- 63. Rouzer, C. A., Scott, W. A., Kempe, J. & Cohn, Z. A. Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 4279 (1980)
- 64. Tateson, J. E., Moncada, S. & Vane, J. R. Prostaglandins, 13, 389 (1977)
- 65. Goff, A. K., Zamecnic, J., Ali, M. & Armstrong, D. T. Prostaglandins, 15, 875

(1978)

- Gorman, R. R., Hamilton, R. D. & Hopkins, N. K. J. Biol. Chem., <u>254</u>, 1671 (1979)
- 67. Laychock, S. G. & Walker, L. Prostaglandins, 18, 793 (1979)
- 68. Murota, S., Chang, W. C. & Tsurufuji, S. Adv. Inflam. Res. 1, 439 (1979)
- Smith, R. L., Hunt, N. H., Marritt, J. E., Evans, T. & Weidemann, M. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 96, 1079 (1980)
- Wightman, P. D., Humes, J. L., Davies, P. & Bonney, R. J. *Biochem. J.*, <u>195</u>, 427 (1981)
- 71. Carnuccio, R., DiRosa, M. & Persico, P. Br. J. Pharme., 68, 14 (1980)
- Blackwell, G. J., Garnuccio, R., DiRosa, M., Flower, R. J., Parente, L. & Persico, P. Nature, 287, 147 (1980)
- 73. Axline, S. G. & Reaven, E. P. J. Cell Biol., 62, 647 (1974)
- 74. Steiner, A. L., Pagliara, A. S., Chase, L. R. & Kipnis, D. M. J. Biol. Chem., <u>247</u>, 1114 (1972)
- 75. Gorman, R. R., Fitzpatrick, F. A. & Miller, O. V. Reciprocal regulation of human platelet cAMP by thromboxane A₂ and prostacyclin. Adv. in Cyclic Nucleotide Res. Reva Press, New York, Vol. 9 pp 597 (1978)
- Levy-Toledano, S., Maclouf, J., Rendu, F., Rigaud, M. & Caen, J. P. Thromb. Res., 16, 453 (1979)
- 77. Perker, C. W., Kelly, J. P., Falkenhein, S. F. & Majerus, R. W. J. ExP. Med., 149, 1487 (1979)
- Bell, R. L., Kennerly, D. A., Stanford, N. & Majerus, R. W. Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 3238 (1979)
- Bonney, R. J., Wightman, P. D., Davies, P., Sadowski, S. J., Kuehl, F. A. & Humes, J. L. *Biochem. J.*, 176, 433 (1978)
- 80. 室田誠逸 "プロスタグランジンの生化学・基礎と実験"室田誠逸編,東京化学同人,東京 pp 73 (1982)