

**LOW DOSE EFFECTS OF COLCHICINE AND VINCRISTINE
ON HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTE MIGRATION
IN AN AGAROSE PLATE SYSTEM**

アガロースプレート技法によるコルヒチンおよびビンクリスチンの
ヒトの多形核白血球の遊走に及ぼす低投与量の影響

ROBERT A. CAPLAN
STUART C. FINCH, M.D.
SHOZO IIDA 飯田昭三
KYOKO OZAKI 尾崎恭子
HOWARD B. HAMILTON, M.D.



**RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION
財団法人 放射線影響研究所**

**A cooperative Japan - United States Research Organization
日米共同研究機関**

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は決して通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

放射線影響研究所(元ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足した。その経費は日米両政府の平等分担とし、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって充てる。

LOW DOSE EFFECTS OF COLCHICINE AND VINCRIStINE
 ON HUMAN POLY MORPHONUCLEAR LEUKOCYTE MIGRATION
 IN AN AGAROSE PLATE SYSTEM

アガロースプレート技法によるコルヒチンおよびビンクリスチンの
 ヒトの多形核白血球の遊走に及ぼす低投与量の影響

ROBERT A. CAPLAN¹; STUART C. FINCH, M.D.²; SHOZO IIDA (飯田昭三)¹;
 KYOKO OZAKI (尾崎恭子)¹; HOWARD B. HAMILTON, M.D.¹

Department of Clinical Laboratories¹ and Chief of Research²

臨床検査部¹ および研究担当理事²

SUMMARY

A modified agarose plate technique was used to investigate the effect of colchicine and vincristine on the migration of human polymorphonuclear leukocytes. Agarose plates were prepared by the method of Clausen, except that colchicine and vincristine were added to the nutrient medium to achieve drug concentrations of 10^{-9} to 10^{-5} M. A hexaxial reference system was devised for time-course studies of cell migration.

Three drug-related effects were observed. Loss of sharpness at the peripheral edge of cell migration was seen at colchicine concentrations of 10^{-8} M and greater, and at vincristine concentrations of 10^{-7} M and greater. Change in central cell aggregation from a disperse to a dense pattern was found at colchicine and vincristine concentrations of 10^{-7} M and greater. Time-course studies revealed significant inhibition of radial cell migration at colchicine concentrations of 10^{-7} M and greater, and at vincristine concentrations of 10^{-8} M and greater.

There is now preliminary evidence that leukocytes sequester colchicine at a concentration of approximately 10^{-7} M following a therapeutic intravenous dose. In the present study, the demonstration of migration inhibition and changes in agarose plate migration pattern at a similar drug concentration may lend support to

要約

ヒトの多形核白血球のコルヒチンおよびビンクリスチンの影響による遊走の状態を調査するためにアガロースプレートの変法を用いた。この技法は、コルヒチンおよびビンクリスチンを 10^{-9} M— 10^{-5} M の濃度になるように栄養培地に加えた以外は、Clausenの方法に準拠している。細胞遊走状態の経時変化を調査するために hexaxial 提示の方法を用いた。

その結果、薬品に関連した三つの影響が観察された。まず、 10^{-8} M あるいはそれ以上のコルヒチン濃度においては細胞の遊走の先端周辺に鮮鋭性が無くなっていること、また、ビンクリスチンにおいては 10^{-7} M およびそれ以上の濃度で同様の状態が起こることが観察された。次に、中央細胞集団は、 10^{-7} M およびそれ以上の濃度のコルヒチンおよびビンクリスチンでは、疎から密な状態になることが認められた。また経時変化調査では、 10^{-7} M およびそれ以上の濃度のコルヒチンと 10^{-8} M およびそれ以上の濃度のビンクリスチンでは、放射状細胞遊走が明らかに阻止されることが判明した。

現在、治療上の静注投与量はおよそ 10^{-7} M のコルヒチン濃度で白血球が隔離されるということがあらかじめ知らされている。今回の調査においては同じ薬品濃度でのアガロースプレートにおいて遊走が阻止され且つその型に変化が生じたことが認められたことで、

the hypothesis that the inflammatory action of colchicine in acute gouty arthritis is attributable in part to altered leukocyte mobility. The factors influencing cell migration in this system are discussed, and possible applications are considered.

INTRODUCTION

Altered polymorphonuclear (PMN) leukocyte mobility has been reported in a number of clinical and experimental settings. Mobilization of PMN leukocytes at the site of a Rebutck skin window and in the fluid medium of a forearm cup chamber is delayed and diminished in patients with acute leukemias.¹⁻³ In attractant-free slide chambers, the nondirected, random movements of individual PMN leukocytes are decreased by antimetabolic agents.^{4,5} Passage of leukocytes through a cellulose acetate hemodialysis membrane completely abolishes random migration in capillary tubes.⁶ Reductions in the directed, chemotactic movement of PMN leukocytes toward a source of attractant in the Boyden chamber has been reported in a diverse set of pathological conditions including the Chediak-Higashi syndrome, a familial chemotactic disorder, alcoholic liver disease, and diabetes mellitus.⁷⁻¹¹ Antimetabolic agents also impair chemotaxis of PMN leukocytes in Boyden chamber studies.^{5,12}

This paper utilizes a relatively new approach to the study of PMN leukocyte migration. The basic methodology is derived from an agarose plate technique first developed by Carpenter et al.¹³ for studies of guinea pig tissue cell migration. The technique was subsequently modified by Clausen¹⁴ to permit studies of human PMN leukocytes. In this latter system, cells are applied to a central well in an agarose plate and allowed to migrate radially along the interface between the nutrient agarose gel and the surface of the supporting plastic petri dish. Since the migrating cells travel through a homogeneous medium, chemotactic gradients are minimized and the observed cell movement is primarily a result of nondirected or random migration. In recent studies, presensitized lymphocytes or their soluble factors have been mixed with PMN leukocytes to detect inhibitory effects on cell movement.¹⁵⁻¹⁷ The technique has been used principally in the field of immunology as an indicator system for lymphocyte activation and lymphokine release.

急性痛風の関節炎におけるコルヒチンの炎症作用は、部分的に白血球の移動性の変化に起因するという仮説を裏付けるものである。従って、この方法における細胞遊走を左右する因子を論議し、その可能な応用面も考察した。

緒言

多くの臨床および実験研究で、多形核白血球の移動性の変化が報告されている。急性白血病の患者の場合、レバック皮膚開窓部位^{1,2}および前腕上のcup chamber³内の滲出培養液における多形核白血球の可動性は鈍く、減少している。誘引剤の入っていないslide chamberでは、抗有糸分裂剤^{4,5}によって多形核白血球の指向性のない不規則な運動が減少している。白血球は酢酸セルロース血液透析膜を通して移動するため、毛管内の不規則な遊走⁶は完全に無くなる。チエジアック・東症候群、家族性走化性疾患、アルコール性肝臓疾患、並びに、糖尿病を始めとする種々の病理学的疾患について、⁷⁻¹¹ Boyden chamber内の誘引剤に対して指向性走化性をもつ多形核白血球の移動に減少がみられることが報告されている。また、Boyden chamber調査^{5,12}では、抗有糸分裂剤によって多形核白血球の走化性が損なわれることが認められている。

本報では、多形核白血球の遊走調査のために、比較的新しいアプローチを使用する。基本的な方法は、Carpenterら¹³がモルモットの組織細胞の遊走調査のために初めて開発したアガロースプレート技法を基にしている。その後、Clausen¹⁴がこの技法を改良してヒトの多形核白血球調査に利用できるようにした。Clausenの技法では、細胞をアガロースプレート上の中央wellに入れ、プラスチックのペトリ皿の表面とアガロース・ゲル培地との間の界面に沿って、放射状に細胞を遊走させる。細胞は均質の培地を通して遊走するので、走化性変化は最小限で、観察した細胞の運動は、主として非指向性の不規則な遊走である。最近の調査では、前感作リンパ球またはその溶性因子を多形核白血球と混合し、細胞運動に及ぼす阻止効果を探知している。¹⁵⁻¹⁷ この技法は、主として免疫学の分野で、リンパ球の活性化およびリンフォカインの放出の指標として用いられてきた。

In the present study, low concentrations of colchicine and vincristine are added to the nutrient agarose gel to evaluate the effects of these antimetabolic agents on PMN leukocyte random migration. Lymphocytes are removed from the PMN leukocyte preparation at an early step to avoid extraneous inhibition. A special marking system is used to permit time-course studies of cell movement. The results obtained in this study are reproducible and compatible with other recent work, suggesting that the agarose plate technique may have further utility in studies of PMN leukocyte migration. Modifications of the agarose plate technique which create localized attractant gradients may provide a useful opportunity for comparison of both chemotaxis and random migration in the presence of antimetabolic agents.

METHODS

Sample Collection

Venous blood was drawn from the antecubital fossa through a #20 or #21 disposable needle into a sterile plastic syringe. The usual sample volume was 5 or 10 ml. The blood was delivered into a sterile glass tube, and thoroughly mixed with an equal volume of calcium- and magnesium-free Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), pH 7.2, containing 10 IU/ml sodium heparin. Cell separation procedures were then initiated promptly.

For studies of PMN leukocyte migration, blood specimens were obtained from healthy, previously informed, adult volunteers, none of whom were exposed to the atomic bombs in Hiroshima or Nagasaki. For pilot studies of PMN leukocyte isolation, blood specimens were obtained from healthy and hematologically normal members of the Adult Health Study (AHS) population in Hiroshima.

Isolation of PMN Leukocytes

Modification of Boyum-Thorsby Techniques. Boyum¹⁸ originally developed a rapid and efficient technique for isolation of granulocytes and lymphocytes from whole blood. The technique utilized dextran sedimentation of erythrocytes, followed by Ficoll-Hypaque flotation of the remaining white blood cell (WBC) supernatant to separate lymphocytes and granulocytes. Thorsby¹⁹ reversed the basic sequence in the following manner. Whole blood was diluted with saline and centrifuged through

この調査では、低濃度のコルヒチンおよびビンクリスチンをアガロース・ゲル培地に加え、このような抗有糸分裂剤がヒトのリンパ球の不規則遊走に及ぼす影響を評価する。異質物による阻止を避けるために、始めの段階で、ヒトの多形核白血球からリンパ球を取り除く。細胞運動の経時変化調査を行うために、特別な標識技法を使用する。この調査で得た結果は再現性があり、最近の他の調査結果とも一致するものであり、多形核白血球の遊走調査にアガロースプレート技法が更に利用可能であることを示唆するものである。局所的な誘引変化を作るアガロースプレート技法の変法によって、抗有糸分裂剤を用いた場合の走化性と不規則遊走の比較を行う有用な機会が得られるであろう。

方 法

標本収集

20あるいは21号の使い捨て注射針並びに無菌プラスチック注射器を使用して、正中静脈から血液を採取した。標本としての血液量は通常5ないし10mlであった。無菌のガラス管に10IU/ml ナトリウムヘパリンを加えたpH 7.2のカルシウムとマグネシウムを含まないHank's Balanced Salt Solution, 略称HBSSを血液量と同量入れ、それに血液を加えて静かに混ぜ、その後直ちに細胞分離の処理を行った。

多形核白血球の遊走調査のためには広島または長崎で原爆に被爆しなかった健康な成人志願者に前もって通知しておき、血液標本を入手した。多形核白血球の分離試験調査のためには、広島の成人健康調査対象者の中から、健康で血液学的に正常な対象者を選び出し、血液標本を入手した。

多形核白血球の分離

Boyum-Thorsby 技法の変法。

Boyum¹⁸ が、初めて全血から顆粒球とリンパ球を分離する迅速で有効な技法を開発した。この技法は、赤血球のデキストラン沈降を利用し、リンパ球と顆粒球を分離するために、残りの白血球の上清液をFicoll-Hypaqueで懸濁した。Thorsby¹⁹ は、次のようにこの基本順序を逆にした。まず、全血を食塩水で希釈し、それからFicoll-Hypaqueで遠心分離し、

Ficoll-Hypaque to collect lymphocytes. The remaining cell button, composed of erythrocytes and granulocytes, was resuspended in autologous, single-strength plasma or serum. Granulocytes were then harvested from the resulting cell suspension by dextran sedimentation. The overall cell yields in this system were comparable to those reported by Boyum. Thorsby's protocol offers some practical advantages in that prompt separation of lymphocytes from whole blood minimizes lymphocyte-erythrocyte clumping and potential lymphocyte-granulocyte interaction.

A disadvantage inherent in Thorsby's method is the requirement for fresh autologous plasma during dextran sedimentation. This reduces the potential cell yield available from an initial volume of whole blood. To maximize cell recovery from the small blood volumes which were used in the present study, a modification of Thorsby's method was devised. In place of fresh autologous plasma, the diluted autologous plasma remaining as a supernatant after lymphocyte flotation was salvaged and used for dextran sedimentation. With appropriate adjustments in the volume and concentration of the sedimentation solution, the final dextran concentration used by Thorsby (1%) was achieved. The final plasma concentration in the modified system was within the range of 12% to 17%. This was comparable to the plasma concentration present in a dextran sedimentation system optimized for leukocyte yield by Skoog and Beck.²⁰ A pilot study with the modified technique demonstrated that values for granulocyte yield, purity, and viability were comparable to those originally reported by Thorsby (Table 1). The details of the separation procedure are presented below.

Step 1. Separation of lymphocytes by Ficoll-Conray flotation.

Stock solutions of 9% Ficoll-400 (Pharmacia, Sweden) and 33.4% Conray-400 (sodium iothalamate; Mallinckrodt, USA) were prepared in distilled water and sterilized by suction through 0.22 μ filter units (Falcon Plastics, USA). The solutions were stored at 4°C. A working solution of specific gravity 1.077 was prepared by mixing 10 parts Ficoll stock with 24 parts Conray.

Diluted blood in aliquots of 10 ml was carefully layered over 3 ml Ficoll-Conray working solution in 15 ml conical centrifuge tubes. The tubes were spun at 400 g for 20

リンパ球を収集した。赤血球および顆粒球から成る残りの細胞の固形部分は、自己由来単一力価血漿または血清で再懸濁した。それから、デキストラン沈降によって生じた細胞懸濁液から顆粒球を採取した。この方法で得た細胞総量は Boyum が報告した量に匹敵するものであった。Thorsby の技法は、全血からリンパ球を迅速に分離するために、リンパ球と赤血球の凝集を最小限に押さえ、リンパ球と顆粒球の相互作用の可能性を最小限にするという実用的な利点がある。

Thorsby の技法の短所は、デキストラン沈降の際に、新鮮な自己由来血漿が必要なことである。これによって、利用可能な細胞量が最初の全血量からいくらか失われる。今回の調査では、使用する少量の血液からの細胞の回収を最大限にするために、Thorsby の技法を改良した。すなわち、新鮮な自己由来血漿の代わりに、リンパ球を懸濁した後に上清液として残る希釈された自己由来血漿を回収し、デキストラン沈降に使用した。沈降液の量や濃度を適当に調整して、Thorsby が使用した最終デキストラン濃度 (1%) を得た。この変法技法における血漿の最終濃度は 12% から 17% の間であった。これは、Skoog および Beck²⁰ がリンパ球量を最大限にするように開発したデキストラン沈降技法の血漿濃度に匹敵する。変法技法を用いた試験調査で判明した顆粒球の量、純度、および生育力の値は、Thorsby が最初に報告した値に匹敵する (表 1)。分離作業の詳細は以下に示す通りである。

第一段階. Ficoll-Conray 液の懸濁によるリンパ球の分離

9% の Ficoll-400 溶液 (Pharmacia 社製, スウェーデン) と 33.4% の Conray-400 溶液 (ナトリウム iothalamate; Mallinckrodt 社製, 米国) の原液を蒸留水で希釈し、0.22 μ filter unit (Falcon Plastics 社製, 米国) を通して吸引し、滅菌した。溶液は 4°C において保存した。Ficoll 溶液と Conray 溶液を 10 対 24 の割合で混合して比重 1.077 の working solution を作った。

15 ml の円錐形の遠心試験管に入れた 3 ml の Ficoll-Conray working solution の上に 10 ml の希釈した血液標本を注意深く重層し、この試験

TABLE 1 COMPARISON OF MODIFIED TECHNIQUE WITH ORIGINAL THORSBY TECHNIQUE FOR ISOLATION OF GRANULOCYTES

表 1 顆粒球の分離に関する変法技法と最初の Thorsby 技法との比較

Technique	Mean granulocyte harvest/ml whole blood (10^6 cells)	Cell yield (%)	Purity of granulocyte preparation (%)	RBC:WBC ratio	Viability (%)
Modified	2.04 \pm 0.39	49.49 \pm 9.89	96.84 \pm 1.44	1.91 \pm 0.67	98.35 \pm 1.91
Thorsby	—	50	97.99	1.0 — 5.0	98 — 100

In the modified technique, salvaged autologous plasma was used during dextran sedimentation in place of fresh autologous plasma or serum. Solution volumes and concentrations were adjusted to optimize the final dextran and plasma concentrations. Granulocyte counts were performed in an Improved Neubauer Counting Chamber (25 trials). Cell yield was calculated from independently obtained white blood cell counts and differentials (13 trials). Purity of the granulocyte preparations was assessed by examination of May-Giemsa stained smears (25 trials). Red blood cell contamination was determined concomitantly with granulocyte counts (25 trials). Viability was determined by trypan blue dye exclusion (10 trials). Values obtained for the Thorsby technique are reproduced from Vox Sanguinis 13:194-206, 1967.

変法技法では、デキストラン沈降の際に、新鮮な自己由来血漿または血清の代わりに回収した自己由来血漿を使用した。沈降液の量および濃度は、デキストランおよび血漿の最終濃度ができるだけ完全になるように調整した。Neubauer 改良計算盤を使用して顆粒球数を計算した(25回)。細胞量は、個別に入手した白血球数およびその分類像から算定した(13回)。顆粒球標本の純度は May-Giemsa 染色塗抹標本によって評価した(25回)。赤血球の汚染は顆粒球数算定に付随して決定した(25回)。生育力はトリパン・ブルー色素排除テストで測定した(10回)。Thorsby 技法の値は、Vox Sanguinis 13:194—206, 1967から引用したものである。

minutes at 4°C. After centrifugation, diluted plasma was present as a supernatant at the top of each tube; erythrocytes and granulocytes were found as a cell pellet within the Ficoll-Conray layer at the bottom. Lymphocytes were suspended in a turbid ring at the interface between the plasma and Ficoll-Conray layers.

With a sterile Pasteur pipette, approximately 5 ml of plasma supernatant was aspirated and transferred to a sterile glass tube. The lymphocytes were similarly collected and used in other studies. The remaining plasma and Ficoll-Conray solutions were withdrawn and discarded. Special care was taken to avoid aspiration of the granulocyte-rich cell layer present at the upper edge of the cell pellet.

Step 2. Isolation of granulocytes by dextran sedimentation.

Dextran T-500 (MW 500,000; Pharmacia, Sweden) was dissolved in HBSS, pH 7.2, to

管を重力 400 g 4°Cで20分間遠心した。遠心分離後、各管の上層部に希釈された血漿が上清液として残り、下層部の Ficoll-Conray 層内に赤血球および顆粒球が細胞の凝集球として残った。血漿と Ficoll-Conray 層との境界面に混濁状の環としてリンパ球が浮遊した。

無菌のパスツール・ピペットを使用して約 5 ml の血漿上清液を吸引し、無菌のガラス管に移し替えた。リンパ球も同様に採取し、他の調査に使用した。残りの血漿および Ficoll-Conray 混合液は回収し廃棄した。この際、細胞凝集球の上層端に存在する顆粒球の多い細胞層を吸引しないように特に注意を払った。

第2段階。デキストラン沈降による顆粒球の分離。

デキストラン T-500 (MW 500,000; Pharmacia 社製、スエーデン)を pH 7.2 の HBSS に溶解さ

give a 3% weight/volume solution. To adsorb granulocyte toxins which may be present in some dextran lots, the solution was passed through 5 mm of compacted activated charcoal.²¹ Gross impurities were cleared by filtration through a #47 Whatman filter and the solution was then sterilized by suction through a 0.22 μ filter unit. The sterilized solution was stored at 4°C.

The red blood cell (RBC)-granulocyte pellet remaining at the bottom of each centrifuge tube was resuspended with autologous salvaged plasma and 3% dextran solution to give a 1:1:1 ratio of pellet, salvaged plasma, and dextran solution. With a sterile wide-tipped Pasteur pipette, the contents of each tube were thoroughly mixed. Special attention was given to the removal of bubbles and foam that appeared during the mixing process, as persistence of these markedly increased erythrocyte contamination of the granulocyte-rich supernatant. The tubes were placed on a 60° incline and transferred to a 4°C refrigerator for 30 minutes of sedimentation. In a series of preliminary trials, it was found that shorter sedimentation periods gave higher granulocyte yields, but also resulted in unacceptable levels of erythrocyte contamination (RBC:WBC ratio greater than 10:1). Longer periods of sedimentation reduced erythrocyte contamination as well as granulocyte yield. Similar observations have been reported by Skoog and Beck²⁰ and Klein et al.²² In the present study, a 30-minute sedimentation period provided an acceptable compromise between erythrocyte contamination and leukocyte loss. This choice was particularly convenient in that a sharp supernatant-erythrocyte interface formed after approximately 25 minutes, and thus served as a good visual reminder of near completion of the sedimentation process.

The granulocyte-rich supernatant was collected with a sterile Pasteur pipette. The cells were washed twice by centrifugation through 10 ml HBSS at 250 g for 10 minutes at room temperature. No more than two washes were performed at this step, as granulocytes subjected to repeated centrifugation often showed microscopic clumping of cells. Once present, cell clumping could not be reversed by vigorous agitation, and preparations containing clumped cells displayed markedly

せ、3%の重量/容量(w/v)液を作った。デキストラン分に存在する可能性のある顆粒球が毒素を吸着するために、この溶液を5mmの高密度の活性炭に通した。²¹粗大な不純物はWhatman濾紙47号で濾過することによって取り除き、0.22 μ 濾過装置で溶液を吸引し滅菌した。滅菌した溶液は4°Cで保存した。

各遠心試験管の底に残っている赤血球-顆粒球の凝集球を自己回収血漿と3%のデキストラン溶液で再懸濁する。凝集球、回収血漿、およびデキストラン溶液の割合は1:1:1になるようにした。先の太い無菌のパスツール・ピペットを使用して、各試験管の内容物をよく攪拌した。攪拌する段階で顆粒球の多い上清液の赤血球が著しく多く混入するので、その残存として現れる泡や泡沫を取り除くことに特に注意を払った。試験管は60度の傾斜に置いてから、4°Cの冷蔵庫に移し30分間静置沈降させた。一連の予備実験では、沈降時間が短いほど顆粒球収量は大きくなるが、赤血球の混入度もまた許容できないほど高くなることが判明した(赤血球対白血球の比率が10:1よりも高くなった)。沈降時間が長くなると顆粒球収量ばかりでなく、赤血球の混入も少なくなった。これと同様の観察結果がSkoogとBeck²⁰およびKleinら²²によって報告されている。今回の調査では、沈降時間が30分の時、赤血球の混入と白血球の減少が許容できる割合となった。沈降後約25分すると、上清液と赤血球の間に明確な界面が形成され、沈降過程も最終段階に近付いたことがはっきりと目に見えるようになるので、30分という時間設定は特に好都合であった。

無菌のパスツール・ピペットを使用して、顆粒球の多い上清を採取した。10mlのHBSS液に細胞を加え、室温、250gの重力で、10分間の遠心分離を2回繰り返し、細胞の洗浄を行った。顕微鏡観察をすると、何度も繰り返して遠心分離を受けた顆粒球には細胞の凝集が見られることがよくあるので、この段階では2回以上の洗浄は行わなかった。一度細胞の凝集ができると、その後いくら攪拌しても元にもどすことはできないし、凝集した細胞を含む標本のアガロース

decreased migration on agarose plates. Granulocyte preparations exhibiting cell clumping were not considered suitable for use.

Absolute and Differential Cell Counts

Autologous washed cells were pooled and re-suspended to a total volume of 2 ml in HBSS. Two drops of each cell suspension were individually counted in the central square of an Improved Neubauer Counting Chamber and the average cell harvest (granulocytes recovered/ml whole blood) was calculated. RBC contamination was determined concomitantly by duplicate erythrocyte counts.

To assess mononuclear cell contamination, one drop of granulocyte suspension was mixed with one drop of heat-inactivated fetal calf serum (GIBCO, USA) and a drop of the resulting solution was placed on a clean slide and gently spread over a 1 to 2 cm² surface with the tip of a pipette. Great care was taken in spreading, as the washed cells seemed to have fragile membranes which rupture easily when spread by conventional techniques. The slide preparations were air-dried at room temperature and then fixed by 30-second immersion in ice-cold 1:1 acetone and distilled water. The fixed preparations were air-dried and stained for 30 seconds in full-strength May-Grünwalds-Lösung (Merck), 1 minute in half-strength May-Grünwalds-Lösung, and 5 minutes in Giemsa (Merck). Adequate staining of nuclei and cytoplasm was achieved with this method, but cytoplasmic granules did not stain well in all preparations and the sub-populations of basophils and eosinophils were not always distinguishable from each other or from PMN leukocytes. Prior exposure of the cells to heparin may have been responsible for this difficulty. A differential count of granulocytes and mononuclear cells was made by microscopic examination of 200 stained cells under oil.

For calculation of cell yield, routine WBC counts and differentials were performed on whole blood specimens by the Hematology Laboratory. The theoretical granulocyte yield was calculated from Laboratory data as the product of the total WBC count and the percent of PMN leukocytes. Percent cell yield was taken from the ratio of actual granulocyte harvest (corrected for mononuclear cell contamination) to theoretical granulocyte yield. Over-

プレート上の遊走は著しく低下する。従って、細胞の凝集ができた顆粒球の標本は使用には適さないとと思われる。

遊離細胞数および分類細胞数

自己洗浄細胞を集め、総量 2 ml の HBSS 液で再懸濁した。各細胞の懸濁液から 2 滴ずつ採取し、Neubauer 改良計算盤の中央の正方形の中に入れて細胞数を計算し、平均細胞収量(回収顆粒球/全血 ml)を算定した。これに付随して、赤血球の混入は赤血球数を 2 回ずつ算定し決定した。

単核細胞の混入度を評価するために、顆粒球の懸濁液 1 滴を加熱によって不活性化されたウシ胎児血清 (GIBCO 社製, 米国) 1 滴と混合し、得られた溶液 1 滴を清潔なスライドガラスに載せ、ピペットの先を使って静かに広げていき、1-2 cm² の大きさにした。洗浄した細胞は、通常の技法で広げると簡単に破れる脆弱な膜を持っているので、引き伸ばす際には非常に注意を払った。このスライド標本を室温で空気乾燥させ、アセトン対蒸留水の比率が 1:1 の冷却溶液に 30 秒間浸して固定した。固定した標本は空気乾燥させ、May-Grünwalds-Lösung (Merck 社製) の原液で 30 秒間、次に半分濃度の May-Grünwalds-Lösung 染剤で 1 分間、最後に Giemsa (Merck 社製) 染剤で 5 分間染色した。この方法によって、細胞核と細胞質の染色は十分に行えたが、細胞質顆粒は全標本を通じてあまり良く染色できなかった。また、好塩基性および好酸性の小個体群は、個体群相互の区別がつかない場合や、多形核白血球と区別がつかない場合があった。これは実験前の段階で、細胞にヘパリンが混入されたことに起因する現象かもしれない。顆粒球および単核球の分類数は、染色した細胞 200 個を油浸装置の下で顕微鏡検査することによって得た。

細胞収量を算定するために、血液学検査室で全血標本の通常白血球数およびその分類像を計算した。顆粒球の理論収量値は、検査室の資料から白血球の総数と多形核白血球の百分率との積として算定した。細胞収量の百分率は、実際の顆粒球数(単核細胞混入を是正したもの)と顆粒球の理論収量値の比から割り出した。細胞質顆粒の染色が最適でなかったため

estimation of cell yield by eosinophils and basophils which may have been indistinguishable from PMN leukocytes because of suboptimal staining of cytoplasmic granules was estimated as 3%.

Viability Testing

Trypan blue (Chroma-Gesellschaft, Germany) was diluted in HBSS to make a 0.5% w/v solution and filtered through #47 Whatman paper to remove gross impurities. One drop of cell suspension was mixed with one drop of trypan blue, and a drop of the resulting solution was placed in an Improved Neubauer Counting Chamber. After 5 minutes, 200 cells were inspected. Cells which excluded dye were counted as viable; those showing diffuse cytoplasmic staining or dark nuclear staining were counted as nonviable.

Agarose Plate Preparation and Use

Medium constituents. Nutrient agarose medium containing 1% agarose (tissue culture-1 grade; Nakarai Chemicals, Japan), single-strength Tissue Culture Medium 199 (Nissui Seiyaku, Japan), 10% horse serum (GIBCO, USA), 100 IU penicillin G/ml and 100 μ g streptomycin/ml (Meiji Chemicals, Japan) was prepared by the method of Clausen.¹⁴ In addition, colchicine (Lilly, USA) and vincristine (Oncovin; Lilly, USA) were added to give final drug concentrations of 10^{-9} to 10^{-5} M. Special attention was given to the pH of the medium, which required adjustment with approximately 0.5 mg NaHCO_3 /ml to achieve a final value of 7.2.

Plate preparation. Molten agarose medium at 45C was delivered in 9 ml aliquots into 5.5 cm diameter sterile plastic petri dishes (Falcon Plastics, USA) and allowed to solidify at room temperature. The plates were then hardened for 1 hour at 4C. A sharp metal template with a 2 mm diameter bore was attached to a low vacuum and used to cut holes in the hardened agarose. The plates were then placed in a humidified 5% CO_2 chamber at 37C and allowed to equilibrate for at least 2 hours. Plates containing colchicine were protected from direct light during preparation to minimize the formation of the inactive photoisomer, lumicolchicine.²³ Colchicine stock solutions were stored in foil-wrapped glass containers.

To perform time-course studies of PMN leukocyte migration, the advancing edge of cell

に、多形核白血球と区別がつかない可能性のある好塩基性および好酸性による細胞収量の過大評価は3%と推定された。

生育力検査

HBSS液でトリパン・ブルー(Chroma-Gesellschaft社製, ドイツ)を希釈して0.5%のw/v液を作り, Whatman濾紙47号を使用してこの溶液を濾過し, 粗大な不純物を取り除いた. 細胞懸濁液1滴をトリパン・ブルー1滴と混合し, 得られた溶液1滴をNeubauer改良計算盤に置いた. 5分後, 細胞200個を検査した. 染料の入っていない細胞は生育力があるとみなされたが, 細胞質に散在性の染色や核に暗色の染色を受けた細胞は生育力がないとみなした.

アガロースプレートの作成とその使用

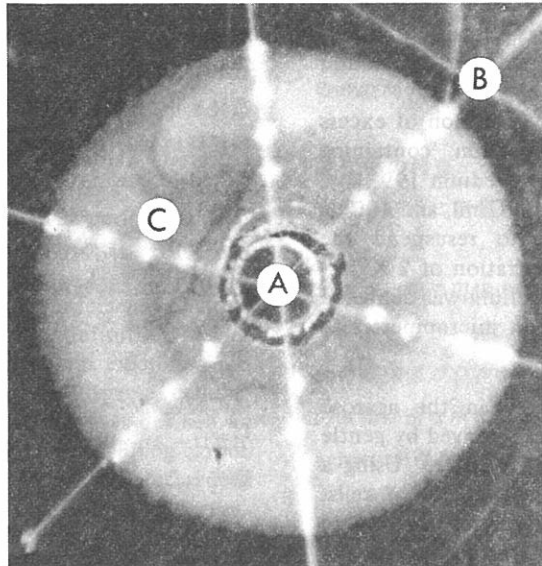
培地の成分. Clausen¹⁴の方法に従って, 1%のアガロース(組織培養-1等級; Nakarai社製, 日本), 単一カ価の組織培養地199(白水製薬社製, 日本), 10%のウマ血清(GIBCO社製, 米国), 100IUのペニシリンG/mlおよび100 μ gのストレプトマイシン/ml(明治化学工業社製, 日本)から成るアガロース培地を用意した. これに, 最終薬品濃度が 10^{-9} から 10^{-5} Mになるように, コルヒチン(Lilly社製, 米国)とビンクリスチン(Oncovin, Lilly社製, 米国)を別々に加えた. 約0.5mgの NaHCO_3 /mlで調整して培地の最終pH値が7.2になるように特に注意を払った.

プレートの作成. 45°CのMoltenアガロース培地9mlを, 直径5.5cmの無菌のプラスチック・ペトリ皿(Falcon Plastics社製, 米国)に入れ, 室温で凝固させた. こうしてできたプレートを更に1時間4°Cで保存し, 凝固させた. 直径2mmの鋭利な金属の型抜を低真空装置に取り付け, それを用いて固くなったアガロースに穴を作った. その後, プレートを37°C 5% CO_2 の高湿恒温器の中に置き, 少なくとも2時間, 平衡に保った. 不活性な光学異性体lumicolchicine²³の形成を最小にするために, コルヒチンを含むプレートには作成の際, 直射光を当てなかった. コルヒチンの原液はガラスの容器に入れ, アルミ箔で包んで保存した.

多形核白血球遊走の経時変化調査を行うために, 特

FIGURE 1 FIXED AND STAINED AGAROSE PLATE MIGRATION PATTERN OF HUMAN PMN LEUKOCYTES, WITH HEXAXIAL REFERENCE SYSTEM

図1 hexaxial 提示方式による固定、染色したアガロースプレート上のヒトの多形核白血球の遊走像



Agarose plates were prepared by the method of Clausen,¹⁴ with the addition of colchicine and vincristine to give drug concentrations of 10^{-9} to 10^{-5} M. A hexaxial reference system was drawn on the outer surface of the plates for time-course studies. At selected intervals, the plates were inspected and the advancing border of cell migration was marked. At the completion of the incubation period, the radii of migration at each time interval were measured and averaged. A. Central well. B. One component of the hexaxial reference system. C. Mark indicating the position of the advancing cell border at a selected time interval (Magnification 10X).

アガロースプレートを Clausen¹⁴ の方法によって用意し、薬品濃度が 10^{-9} - 10^{-5} M になるようにコルヒチンおよびビンクリスチンを加えた。経時変化調査のために、プレートの外表面に hexaxial 提示方式で線を引いた。定めた時間をおいてプレートを検査し、細胞運動の前進辺縁に印をつけた。培養期間が完了した時点で、各期間における遊走の半径を測定し、平均値を算定した。A. 中央の well. B. hexaxial 提示方式の一系. C. 定めた期間における細胞の前進辺縁の位置を示す印。(倍率10倍)。

movement was marked along a specially devised set of lines. After holes were cut in the hardened agarose, the undersurface of each plastic plate was inscribed with a hexaxial reference system, as shown in Figure 1. The tip of a #23 hypodermic needle and a transparent glass slide were used. Plates were carefully checked after inscription of the lines to be certain that spacing was uniform and that the origin of the six resultant radii was located at the center of the agarose well. If these conditions were not fulfilled, the reference system was not considered satisfactory for use and a new set of lines was drawn over another agarose well.

別に考案された一組の線に沿って、細胞運動の前進辺縁に印をつけた。固まったアガロースプレートに穴を作った後、図1に示すように、各プラスチック・プレートの底面を hexaxial 提示方式により彫った。この際皮下用針23号の先と透明なガラス・スライドを使用した。線を彫った後、プレートを注意深く調べ、線間隔が均一で6本の軸線半径の原点がアガロース well の中央部にあることを確認した。このような条件が満たされなかった場合には、その提示は使用に適してないとし、他のアガロース well に新しい線を描いた。

Application of cells to plates. Cells which had been previously washed and counted were pelleted by centrifugation at 250 g for 10 minutes at room temperature. Supernatants were inspected for signs of cell clumping (threadlike material, turbid appearance). If these were present, the preparation was discarded; otherwise, the supernatant was removed by suction through a Pasteur pipette and the tubes were briefly inverted to permit evaporation of excess moisture. Agarose-free medium containing single-strength Tissue Culture Medium 199, 10% horse serum, 100 IU penicillin G/ml, and 100 μ g streptomycin/ml was used to resuspend the PMN leukocytes to a concentration of 2×10^8 cells/ml. The resuspension medium was delivered through clean BB constriction micropipettes to insure accuracy.

Moisture which had collected in the agarose wells during equilibration was removed by gentle suction through a fine-tipped pipette. Using a clean constriction pipette for each set of cells, aliquots of 2×10^6 PMN leukocytes in a volume of 10 μ l were delivered in duplicate to the agarose wells.

Plate incubation and time-course studies. After application of cells, the plates were promptly covered and returned to the 5% CO₂ humidified chamber for 18 hours of incubation at 37°C. During this period, cells migrated radially in the potential space between the agarose medium and the inner surface of the plates.

For time-course studies of leukocyte migration, plates marked with the hexaxial reference system were briefly withdrawn from the incubator at intervals of 1, 3, 6, 12, and 18 hours. At each time point, the location of the advancing edge was marked along the 6 axes of the reference system. Precision in marking was achieved by the use of an inverted light microscope and a #23 hypodermic needle positioned on a fulcrum. The impression of the needle tip on the under-surface of the plastic petri dish created a permanent record of the progression of PMN leukocyte movement (Figure 1).

Fixation and staining. After 18 hours, the agarose plates were removed from the incubator and covered with 5 ml fixative (3:1 absolute methanol and glacial acetic acid). As the fixative permeated the agarose gel, the phenol red indicator present in the tissue culture

プレートへの細胞注入。前もって洗浄し数を算定した細胞を 250 g の重力、室温で 10 分間遠心分離し小球形にした。細胞の凝集(糸のようなもので、混濁状をしている)ができていいる徴候があるかどうか上清液を調べた。凝集ができていいる場合には、その標本は捨て、そうでない場合には、パスツール・ピペットで上清液を吸引して取り除き、余分の水分を蒸発させるために管をしばらく伏せた。単一力価の組織培養地 199, 10% のウマ血清, 100IU のペニシリン G/ml, および 100 μ g のストレプトマイシン/ml から成るアガロースを加えない培地を使用して、濃度が 2×10^8 細胞/ml になるように多形核白血球を再懸濁した。再懸濁した培地は、正確を期すために清潔な先のとがった BB マイクロピペットを使用して注入した。

先の細いピペットを使用して、平衡にしていた間にアガロース well にたまった水分をゆっくりと吸引し除去した。各組の細胞ごとに清潔な先のとがったマイクロピペットを使って、 2×10^6 の多形核白血球の 10 μ l を検体一定量とし、アガロース well 二つに分注した。

プレート培養および経時変化調査。細胞を注入した後のプレートは即座にふたをし、5% CO₂ の高湿恒温器の中にもどし、37°C で 18 時間培養した。この間に細胞は、アガロース培地とプレートの内側表面の間の空間を放射状に遊走した。

白血球遊走の経時変化調査のために、1, 3, 6, 12, 並びに 18 時間の間隔をおいて、hexaxial 提示の方式で印を付けたプレートを培養器から手早く取り出した。各時間ごとに前進辺縁の位置を、提示方式の 6 本の軸線に沿って印を付けた。印を正確につけるために、倒立光学顕微鏡と支持台に取り付けた皮下用針 23 号を使用した。プラスチック・ペトリ皿の下表面に針の先で付けた圧痕によって、多形核白血球の移動の進行状態が永久に記録できた(図 1)。

固定と染色。18 時間後、アガロースプレートを培養器から取り出し、5 ml の固定液(無水メタノール 3 に対し氷酢酸 1 の割合)を分注した。固定液がアガロース・ゲルを浸透するにつれて、組織培養地

medium turned from a pink-orange hue to bright yellow. When the entire thickness of gel was yellow in color (approximately 20 minutes), fixation was considered complete. The agarose medium was detached by freeing the rim of each gel with a thin glass coverslip, and then inverting the plate. The fixed cells remained attached to the plates and were stained with Giemsa for 10 minutes.

Examination of migration patterns. Detailed studies of cell distribution patterns were made under the light microscope. The peripheral edge of cell migration was examined for the presence of a sharp or irregular border. The distinction between these two types of borders was obvious and did not require formal definition. The central area of cell migration was examined for the presence of a dense or disperse cellular pattern. Dense cellular packing was defined as the presence of a touching or overlapping carpet of cells; disperse cellular packing was defined as the absence of a touching or overlapping carpet. When disperse cellular packing extended outwards for distances greater than 25% of the total migration radius, a pattern of "central dispersion" was said to exist. When disperse cellular packing was confined to less than 25% of the total migration radius, the pattern was described as one of "central density". For graphic displays of cell distribution, stained plates were passed across the 2 mm aperture of a densitometer (Fujiox model FD-AIV).

Measurement of migration patterns. For time-course studies of cell migration, plates were mounted in a portable 35 mm slide projector and viewed against a white background at 20X magnification (planimetry). Measurements were made to the nearest millimeter. The hexaxial reference system provided a set of 6 radii for each migration pattern. Since cells from each individual were studied in duplicate, the average radius of migration for a given time point and drug concentration was taken as the arithmetic mean of 12 migration radii. To facilitate graphical representation, drug effects were expressed in terms of percent migration inhibition (%MI). For a given individual, i , percent migration inhibition was defined as

$$\%MI = 100 \cdot \left(1 - \frac{dR_{c,t}}{R_t} \right)$$

where $dR_{c,t}$ was the average radius of migration in drug-containing medium at a given concentra-

に投入したフェノール赤指示薬の色調が桃橙色から明るい黄色に変わるのでゲル全体が黄色になった時(約20分)、固定は完了したものと考えた。薄い覆いガラスで各ゲルの縁を外してアガロース培地をはがした後プレートを逆きにした。固定した細胞はプレートにくっ付いたままで残るのでこれを Giemsa 染色液で10分間染色した。

遊走像の検査. 光学顕微鏡を使用して、細胞の分布像を詳細に調査した。細胞遊走の先端部である辺縁が鮮鋭であるか、または不規則であるかを調べた。この2種類の辺縁の区別は明らかで、特別な定義を必要としなかった。細胞遊走の中央部に密、または疎の細胞像が存在するかどうかについて調べた。細胞の凝集が密な所には細胞の touching or overlapping carpet が存在していると定義し、細胞の凝集が疎な所には touching or overlapping carpet が存在していないと定義した。総遊走半径の25%以上の距離にわたって、細胞の凝集が疎の状態では広がっている場合には、“中央疎像”が存在するとした。疎の状態の細胞凝集が総遊走半径の25%以下に限られる場合には像は“中央密像”であると記述した。細胞分布を図表化するために、染色したプレートを2mm口径の濃度計(Fujiox FD-AIV型)を横切るように動かした。

遊走像の測定. 細胞遊走の経時変化調査のために、プレートを携帯用の35mmスライド用幻灯機に載せ、白を背景として20倍の倍率で観察した。測定はミリメートルの単位まで行った。hexaxial提示の方式によって、各遊走像に6本の半径が一組として得られる。各人から取った細胞は、それぞれ2個ずつ調査を行ったので、各観察時点と各薬品濃度における遊走平均半径は12の遊走半径の算術平均として算定した。図表化を簡単に行うために薬品効果を遊走阻止百分率(%MI)で表した。すなわち、任意の個人*i*に対する遊走阻止百分率を

と定義した。但し $dR_{c,t}$ は、任意の時間*t*における任意の濃度*c*の薬品を含む培地中の遊走半径の平均

tion c and time t , and ${}_0R_t$ was the average radius of migration in parallel drug-free medium at time t . For a given drug and set of individuals studied, a group average, $\%MI_{c,t}$, was defined as

$$\%MI_{c,t} = \frac{\sum (\%MI_i)_{c,t}}{N}$$

where c and t identify the specified drug concentration and time interval, and N represents the number of individuals studied. These average values of percent migration inhibition were plotted as a family of concentration curves, with $\%MI$ as ordinate and time as abscissa.

Statistical Analysis

Pattern studies. In studies of central and peripheral migration patterns, the outcome could be dichotomized in the following manner:

Peripheral edge pattern:	sharp 鮮鋭性がある
先端像:	not-sharp (irregular) 鮮鋭性がない (不規則)
Central cell pattern:	dense 密
中央細胞像:	not-dense (dispersed) 密でない (疎)

The central and peripheral patterns were thus individually suited to two-way independence testing. Since the trial conditions and total number of outcomes were both fixed by experimental design, Fisher's exact test was chosen as the appropriate method of analysis. Central and peripheral pattern frequencies at each drug concentration were compared with the pattern frequencies observed in drug-free medium. P-values were read directly from a table of the hypergeometrical distribution, prepared for independence testing.²⁴ Double-tailed P-values less than 0.05 were considered significant.

Time-course studies. Average radii of migration were calculated as described above. For each time interval and drug concentration, the average radius of migration in drug-free medium was paired by individual with the average radius of migration in drug-containing medium. The paired t-test was then applied. Values of t were computed on a preprogrammed Olivetti calculator, using the mean of sample differences. One less the number of pairs was chosen as df . Single-tailed P-values less than 0.05 were considered significant.

であり、 ${}_0R_t$ は、時間 t における薬品を加えない同様の培地中の遊走半径の平均である。ある薬品濃度に対する任意の調査対象者におけるグループ平均 $\%MI_{c,t}$ は

と定義した。但し、 c および t は特定の薬品濃度並びに時間、 N は調査対象者数を示す。このような遊走阻止百分率の平均値は、 $\%MI$ を縦軸とし、時間を横軸とした濃度曲線の族として図表化した。

統計的解析

遊走像調査. 中央および先端の遊走像調査では、結果を次のような方法で2分した。

従って、中央および先端の遊走像はそれぞれ両側独立検定に適合した。試験条件および検査の総数は、両方とも実験計画法によって定めたため、解析には Fisher の exact 検定を適当な方法として選択した。各薬品濃度における中央および先端の遊走像の型別頻度を薬品を加えない培地で観察した遊走像の型別頻度と比較した。P値は、独立検定²⁴用に用意された超幾何学的分布の表から直接読み取った。両側 P値が0.05未満の場合有意とみなした。

経時変化調査. 遊走の平均半径は上記のように算定した。各時間および各薬品濃度における薬品を加えない培地中の平均遊走半径を薬品を加えた培地中の平均遊走半径と、個別に組み合わせた。ついで、対 t 検定を行った。 t 値は前もってプログラムを組み込んだ Olivetti の計算機を使用し、サンプル差の平均値を利用して算定した。対の数より1を引いたものを自由度とした。片側 P値が0.05未満の場合、有意とみなした。

RESULTS

Gross Migration

The gross migration pattern of human PMN leukocytes is altered at low concentrations of colchicine and vincristine.

Examination of agarose plates with the unaided eye and at low-power magnification revealed significant drug-related changes in migration pattern. On drug-free plates, the peripheral margin of cell migration appeared sharp and well-demarcated, while the coating of cells in the central area of these plates usually appeared thin and uneven. The converse was observed for agarose plates containing colchicine and vincristine at concentrations of 10^{-8} to 10^{-7} M and greater. On these drug-containing plates, the peripheral edge of cell migration was irregular and poorly-defined, while the central area most often appeared to be evenly filled.

Alterations in migration pattern were also evident from densitometer tracings. The sharp peripheral borders seen on drug-free plates appeared as steeply descending lines at the edges of the tracings; the uneven central area of these plates produced gentle tapering of lines in the internal core. In the presence of colchicine and vincristine, these slope configurations were reversed. A gently tapered line was seen at the outer edges of the tracing, while a sharp internal core was present. The densitometer changes thus paralleled the central and peripheral visual findings.

The characteristic patterns of PMN leukocyte migration on drug-free and drug-containing plates are shown in Figure 2.

Central and Peripheral Migration Patterns

Changes in central and peripheral migration patterns are related to changes in the density of cell aggregation.

At high-power magnification, the individual cells present at the center and periphery of the migration plates were visualized. On drug-free plates, the cells at the peripheral margins were closely packed, whereas cells in the central area were loosely aggregated. Converse findings were observed on plates containing colchicine and vincristine at concentrations of 10^{-8} to 10^{-7} M and greater. On these drug-containing plates, cells at the peripheral edge of migration were

結 果

肉眼的遊走像

ヒトの多形核白血球の肉眼で見える遊走像は低濃度のコルヒチンおよびビンクリスチンで変化した。

肉眼および低い倍率でアガロースプレートを検査した結果、遊走像に薬品に関連のある有意な変化が認められた。薬品を加えないプレートでは、細胞遊走の先端周辺に鮮鋭性があり、境界が鋭利であったがプレートの中央部の細胞層は、普通、薄くてまばらのように見えた。薬品濃度が 10^{-8} — 10^{-7} M以上のコルヒチンおよびビンクリスチンを含むアガロースプレートでは、これと逆の現象が観察された。これらの薬品を含むプレートでは、細胞遊走の先端は不規則で境界がはっきりとしていなかったが、中央部はおおよそのところ、一応密であるように見えた。

遊走像の変化は濃度計の記録からも明らかであった。薬品を加えないプレート上に見られる鋭利な先端の境界部は、濃度計の記録図では端にあつて、急降下の線として描かれていた。同プレートのまばらな中央部は、内核でなだらかな下降線となっていた。コルヒチンおよびビンクリスチンを加えたプレートではこの傾斜像は逆になった。なだらかな下降の線が記録図の外端に見られ、鮮明な内核が存在した。このように、濃度計の変化は中央部や先端部の肉眼所見と一致した。

薬品を加えた場合と加えない場合のプレート上の多形核白血球の特徴的遊走像を図2に示した。

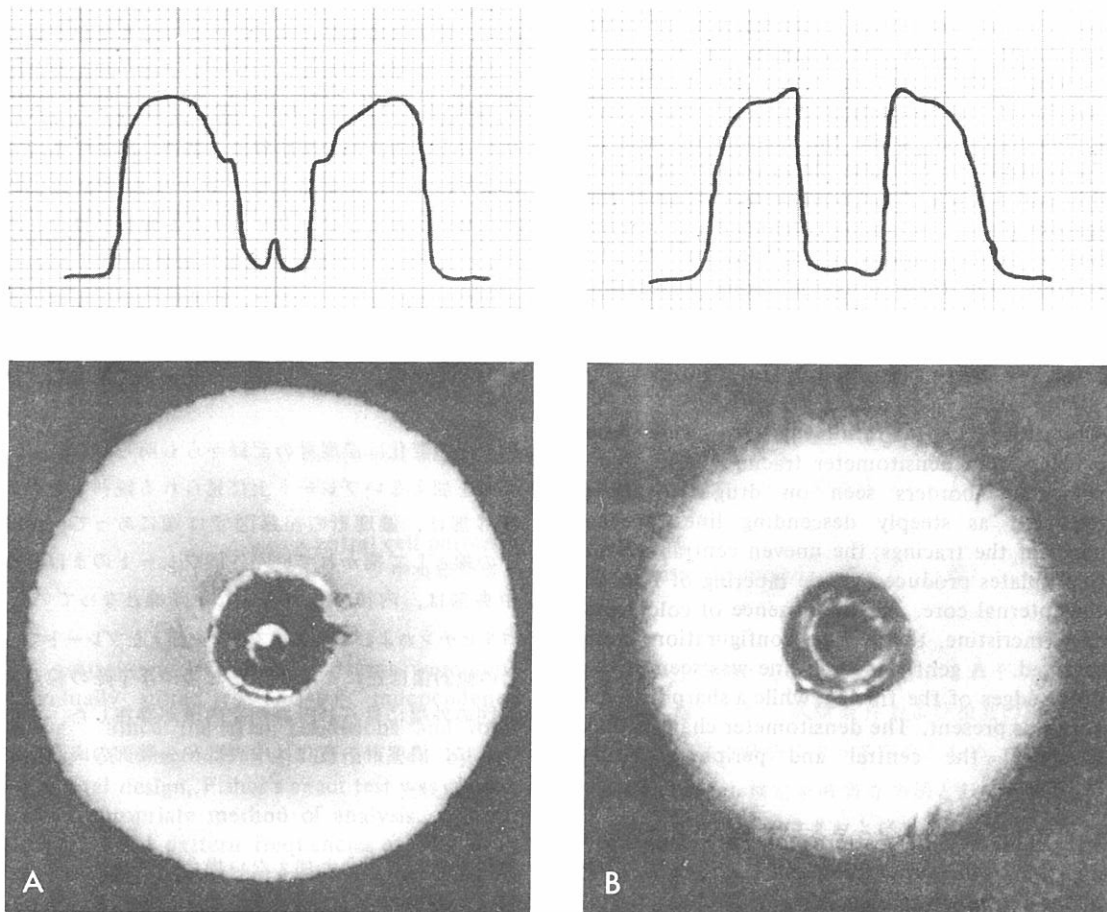
中央部および先端部の遊走像

中央部および先端部の遊走像の変化は細胞凝集の密度の変化に関係する。

高倍率にした時に、遊走プレートの中央部および先端部に存在する個々の細胞が観察できた。薬品を加えないプレートでは、先端部の細胞は凝集していたが、中央部の細胞は散在していた。薬品濃度が 10^{-8} — 10^{-7} M以上のコルヒチンおよびビンクリスチンを含むプレートでは、これと逆の現象が観察された。このような薬品を含むプレートでは、遊走の先端部の細胞

FIGURE 2 DRUG-INDUCED CHANGES IN THE AGAROSE PLATE MIGRATION PATTERN AND DENSITOMETER PROFILE OF PMN LEUKOCYTES

図2 アガロースプレート上の遊走像における薬品誘発性の変化および多形核白血球の濃度計による側面図



A. In drug-free medium, migrating cells form a sharp peripheral margin and a thinly coated central area. The densitometer scan shows abruptly descending lines at the peripheral margins and gradually tapered lines in the central areas of the plate. B. In medium containing colchicine or vincristine at 10^{-8} to 10^{-7} M, migrating cells form an irregular peripheral margin and a thickly coated central area. The densitometer tracing shows gradually tapered lines at the peripheral margins and abruptly descending lines in the central areas (Plate magnification 10X. Dark-field illumination).

A. 薬品を加えない培地では、遊走細胞は鮮鋭性のある先端部および層の薄い中央部を形成する。濃度計観察では、先端部に急降下の線が見られ、プレートの中央部になだらかな下降の線が認められた。B. 薬品濃度が 10^{-8} — 10^{-7} Mのコルヒチンまたはビンクリスチンを含む培地では、遊走細胞は不規則な先端部および層の厚い中央部を形成する。濃度計の記録では、先端部になだらかな下降の線が見られ、中央部に急降下の線が見られた(プレートの倍率10倍、暗視野法)。

loosely scattered, while those present in the central area were tightly packed. Photomicrographs showing these differences in cell aggregation are presented in Figure 3.

To ascertain that the observed differences in cell aggregation were not artifacts of fixation and staining, agarose plates were examined under an inverted light microscope immediately after completion of the 18-hour incubation period. The same patterns of peripheral and central cell aggregation were observed in these untreated preparations as in the plates described here.

Drug-related Changes in Migration Pattern

Drug-related changes in leukocyte migration patterns are reproducible, and first appear at concentrations of 10^{-8} to 10^{-7} M.

The reproducibility of central and peripheral changes in migration pattern was investigated at colchicine and vincristine concentrations of 10^{-9} to 10^{-5} M. PMN leukocytes from seven individuals were tested in duplicate on a full series of colchicine-containing plates; leukocytes from five individuals were similarly tested with vincristine. Parallel trials in drug-free medium were also performed. The frequency of pattern change at each drug concentration was determined and compared with the results of the drug-free trials. Significance was assessed by applying Fisher's exact test.

In colchicine-containing medium, irregularity of the peripheral margin first appeared at a concentration of 10^{-8} M; in vincristine-containing medium, irregularity first appeared at 10^{-7} M. At the concentrations studied here, change in the peripheral migration pattern occurred as an "all or none" phenomenon. The frequency of peripheral pattern change was statistically significant at colchicine concentrations of 10^{-8} M and greater, and at vincristine concentrations of 10^{-7} M and greater.

In contrast to the abrupt changes seen in peripheral migration pattern, the changes observed in central migration pattern were graduated. In drug-free medium, approximately 30% of all migration patterns demonstrated central density. With rising drug concentration, this percentage also increased, reaching 100% at a colchicine concentration of 10^{-7} M and a vincristine concentration of 10^{-6} M. The frequency of central density was significantly

は散在し、中央部の細胞は凝集していた。このような細胞凝集における差を示す顕微鏡写真を図3に示した。

観察した細胞凝集の差が固定や染色による人工産物でないことを確認するために、18時間の培養が完了後、直ちに倒立光学顕微鏡を使用してアガロースプレートを検査した。うえに記述したプレートと同様の先端部、中央部における細胞の凝集型が無処理の標本にも観察された。

遊走像における薬品誘発性変化

白血球の遊走像における薬品誘発性の変化は再現性があり、 10^{-8} — 10^{-7} Mの濃度の時に初めて出現する。

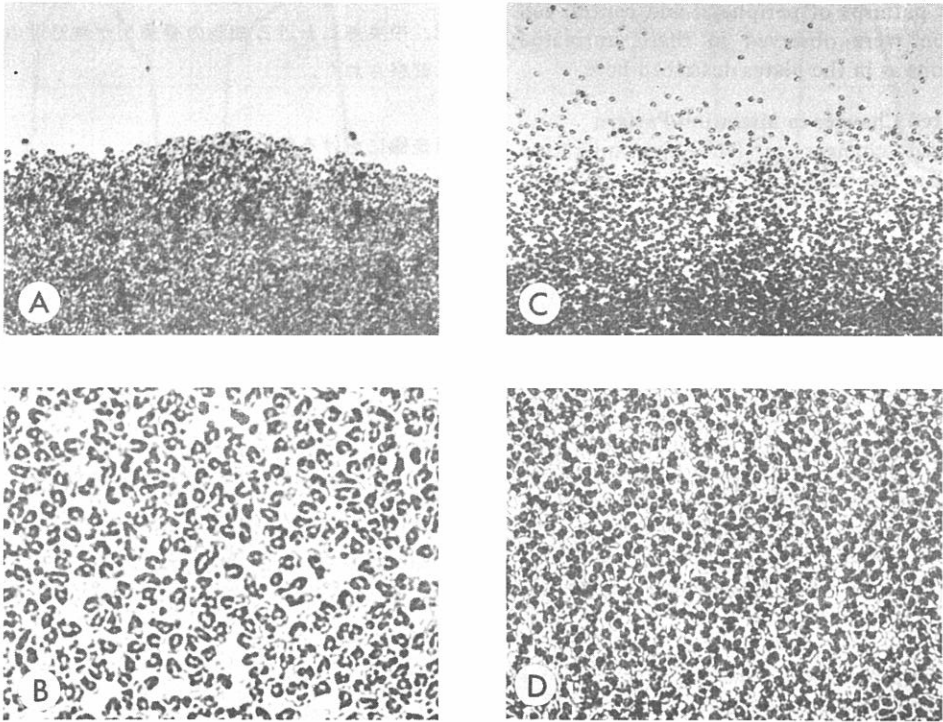
コルヒチンおよびビンクリスチンの濃度が 10^{-9} — 10^{-5} Mの時の遊走像の中央部および先端部における変化の再現性について調査した。7人から採取した多形核白血球をコルヒチンを含むプレート上で2回ずつ検査し；同様に、5人から採取した白血球をビンクリスチンで検査した。薬品を加えない培地でも同様の検査を行った。各薬品濃度における遊走像変化の頻度を測定し、薬品を加えない場合の結果と比較した。Fisherのexact検定法を利用して有意性を評価した。

コルヒチンを含む培地では、先端部の不規則性は 10^{-8} Mの濃度の時に初めて出現し、ビンクリスチンを含む培地では、 10^{-7} Mの濃度の時に初めて出現した。ここで行った調査における濃度では、先端部における遊走像の変化は「有あるいは無」現象として起こった。先端部における遊走像の変化の頻度は、コルヒチン濃度が 10^{-8} M以上およびビンクリスチン濃度が 10^{-7} M以上の時に、統計的に有意であった。

先端部における遊走像の変化が急速であったのに対し、中央部における遊走像の変化は緩やかであった。薬品を加えない培地では全遊走像中約30%が中央部が密であった。薬品濃度が高くなるにつれて、この割合も大きくなり、コルヒチン濃度 10^{-7} Mおよびビンクリスチン濃度 10^{-6} Mの時に100%に達した。中央部が密である頻度は、コルヒチンおよびビンクリス

FIGURE 3 CELL AGGREGATION IN CENTRAL AND PERIPHERAL AREAS
OF AGAROSE MIGRATION PLATES

図3 アガロース遊走プレートの中央部および先端部における細胞凝集

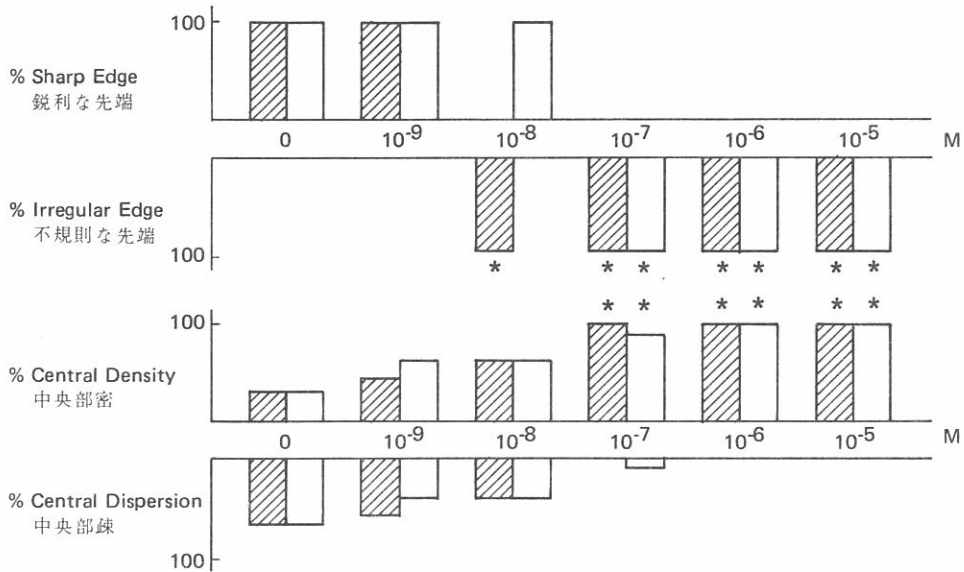


In drug-free medium, the cells forming the peripheral edge are densely packed (A), whereas those present in the central region are loosely aggregated (B). This pattern is reversed in 10^{-8} to 10^{-7} M containing medium, in which the peripheral edge (C) shows loose aggregation of cells and the central region displays dense cellular packing (D). (Peripheral edge magnification 160X. Central area magnification 400X.

薬品を加えない培地では、先端部を形成する細胞は凝集しているが(A)、中央部に存在する細胞は散在している(B)。濃度 10^{-8} — 10^{-7} Mの薬品を含む培地ではこれと逆の像が見られる。すなわち先端部では細胞が散在し(C)、中央部では細胞が凝集している(D)のが認められる。(先端部の倍率 160倍、中央部の倍率 400倍)。

FIGURE 4 PMN LEUKOCYTE MIGRATION PATTERNS AT VARYING CONCENTRATIONS OF COLCHICINE AND VINCRIStINE

図4 コルヒチンおよびビンクリスチンの各濃度における多形核白血球の遊走像



The migration patterns of PMN leukocytes were studied at colchicine and vincristine concentrations of 10^{-9} to 10^{-5} M. Cells from seven individuals were tested in duplicate in colchicine-containing media; cells from five individuals were similarly tested with vincristine. A tabulation was made of the central and peripheral distribution of cells at each drug concentration. Findings were expressed as percent of trials showing a specified cell distribution pattern. Significance was assessed by applying Fisher's exact test.

Hatched bars represent colchicine trials; open bars represent vincristine trials. An asterisk (*) is used to note drug concentrations at which the observed migration pattern differed significantly ($2P < 0.05$) from that of the drug-free trials.

コルヒチンおよびビンクリスチンの濃度が 10^{-9} - 10^{-5} Mの時の多形核白血球の遊走像を調査した。7人から採取した細胞をコルヒチンを含む培地で2回ずつ検査し、同様に、5人から採取した細胞をビンクリスチンで検査した。各薬品濃度における細胞の中央部および先端部の分布状況を表にあらわした。特定の細胞の分布型を示した検査の百分率で所見を表した。Fisherのexact検定法を利用して有意性を評価した。

斜線はコルヒチン検査を示し、白棒はビンクリスチン検査を示す。観察した遊走像が薬品を加えなかった場合の像と有意な差 ($2P < 0.05$)を示す薬品濃度に星印(*)を付けた。

increased at colchicine and vincristine concentrations of 10^{-7} M and greater.

Figure 4 summarizes the observed changes in PMN leukocyte migration patterns in the presence of colchicine and vincristine at concentrations of 10^{-9} to 10^{-5} M.

Colchicine and Vincristine

Colchicine and vincristine inhibit leukocyte radial migration at drug concentrations of 10^{-8} to 10^{-7} M.

チンの濃度が 10^{-7} M以上の時に有意に増大した。

図4では、コルヒチンおよびビンクリスチンの濃度が 10^{-9} - 10^{-5} Mの時、多形核白血球の遊走像に観察された変化を要約した。

Colchicine and Vincristine

コルヒチンおよびビンクリスチンは、薬品濃度が 10^{-8} - 10^{-7} Mの時に白血球の放射状の遊走を阻止する。

Time-course studies of PMN leukocyte migration were conducted at colchicine and vincristine concentrations of 10^{-9} to 10^{-5} M. Eight individuals were studied in duplicate on a full series of colchicine-containing plates; five individuals were similarly studied with vincristine. Parallel time-course studies in drug-free medium were also performed. For each drug and drug concentration, the average radius of migration was paired by time interval with values from the drug-free trials. Statistical significance was assessed by applying the paired t-test. Drug effects were graphically displayed in terms of percent migration inhibition.

The effect of colchicine on radial migration of PMN leukocytes is shown in Figure 5. The predominant action of the drug was inhibitory, with significant migration inhibition first appearing at 6 hours in 10^{-7} M medium. An interesting feature of the colchicine studies was the variation in drug effect with time. At concentrations of 10^{-9} and 10^{-8} M, a small but significant stimulating effect was found in the first hour; thereafter, no significant stimulation was observed. Additionally, at drug concentrations of 10^{-7} M and greater, migration inhibition showed a tendency to peak at 6 hours. At the 3- and 12-hour intervals, only four migration patterns were available for measurement at drug concentrations of 10^{-9} to 10^{-6} M. The sample size was thus too small at these points for accurate t-testing, but the values for migration inhibition were included on the graphs as they were consistent with the observed trends.

Migration inhibition in the presence of vincristine is shown in Figure 6. As in the colchicine trials, the predominant drug effect was inhibitory. A tendency toward peak migration inhibition at 6 hours was also seen. Unlike the colchicine trials, however, there was no significant stimulation of leukocyte migration at low doses. Migration inhibition at vincristine concentrations of 10^{-6} M and greater was far more pronounced than at equimolar concentrations of colchicine.

To explore the possibility of physiochemical deterioration of colchicine and vincristine as a factor in the apparent reversibility of migration inhibition at late time intervals, agarose plates containing 10^{-8} M colchicine and 10^{-7} M vincristine were prepared in the usual manner and stored for 18 hours at 37°C in a humidified

コルヒチンおよびビンクリスチンの濃度を 10^{-9} — 10^{-5} Mにして、多形核白血球の遊走の経時変化調査を行った。8人から採取した細胞を、コルヒチンを含むプレートで2回ずつ検査し、同様に5人から採取した細胞をビンクリスチンで検査した。薬品を加えない培地でも同様の経時変化調査を行った。各薬品および各濃度について、遊走の平均半径と薬品を加えなかった場合の平均半径とを時間別に組み合わせた。一対 t 検定を行って統計的有意性を評価した。薬品の影響は遊走阻止の百分率で図に示した。

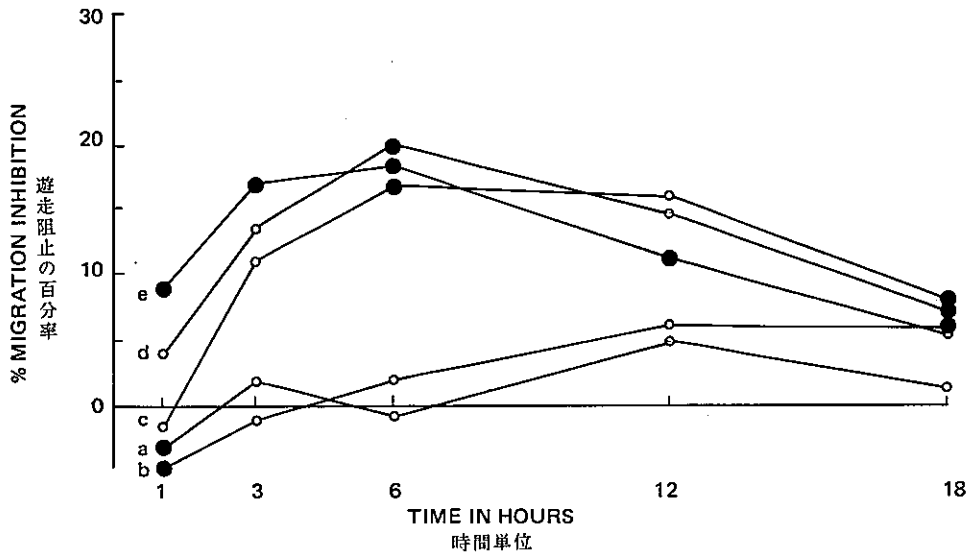
コルヒチンの多形核白血球の放射状遊走に与える影響を図5に示した。この薬品の主な作用は阻止で、有意な遊走阻止が初めて出現したのは、 10^{-7} Mの濃度の培地で6時間経過した時であった。コルヒチン調査の興味深い特徴は、時間と共に薬品の影響が変化することであった。 10^{-9} および 10^{-8} Mの濃度では、1時間目に、小さくはあるが有意で刺激的な影響が認められた。その後、有意な刺激は観察されなかった。さらに 10^{-7} M以上の濃度では、6時間目に遊走阻止がピークに達する傾向を見せた。3時間目および12時間目では、 10^{-9} — 10^{-6} Mの濃度における測定可能な遊走像は4例しかなかった。これら二つの時点におけるサンプル数は非常に少なく、正確な t 検定を行うことはできなかったが、遊走阻止の値は、観察傾向と一致するものであったのでグラフに記入した。

ビンクリスチンを加えた場合の遊走阻止を図6に示した。コルヒチンの場合と同様、主な薬品影響は阻止であった。ビンクリスチンの場合も6時間後に遊走阻止がピークに達する傾向がみられた。しかしながら、コルヒチンの場合とは違って、薬品濃度が低い場合には白血球の遊走に有意な刺激は認められなかった。濃度 10^{-6} M以上のビンクリスチンにおける遊走阻止は等濃度のコルヒチンにおける遊走阻止よりも遥かに顕著であった。

遅い時間に遊走阻止を可逆する因子としてコルヒチンおよびビンクリスチンが生理化学的に崩壊するのではないかをみるために、いつもの要領で濃度 10^{-8} Mのコルヒチンおよび濃度 10^{-7} Mのビンクリスチンを用意し、5% CO_2 高湿恒温器の中に入れ、37°Cで18時間保存した。ついで、プレートに白血球を入れ

FIGURE 5 TIME-DEPENDENT EFFECT OF COLCHICINE ON PMN LEUKOCYTE MIGRATION

図5 時間の経過に伴うコルヒチンの多形核白血球の遊走に及ぼす影響



At intervals of 1, 3, 6, 12, & 18 hrs, the average radius of cell migration was measured in media containing colchicine at concentrations of (a) 10^{-9} , (b) 10^{-8} , (c) 10^{-7} , (d) 10^{-6} , & (e) 10^{-5} M. For each of the eight individuals studied, parallel measurements in drug-free media were also obtained. Differences between the average radius of migration in drug-containing & drug-free media were expressed in terms of average percent migration inhibition (see text).

To assess the significance of drug-related changes in migration radii, the average radius of migration in drug-free media was matched by individual to the average radius of migration in drug-containing media at each time interval and concentration. The paired t-test was then applied. Significant outcome ($P < 0.05$) is indicated in the figure by use of a black dot (●).

1, 3, 6, 12, 18時間ごとに、細胞遊走の平均半径をコルヒチン濃度 (a) 10^{-9} , (b) 10^{-8} , (c) 10^{-7} , (d) 10^{-6} , (e) 10^{-5} Mの培地で測定した。調査を行った8名それぞれについて、同様の測定を薬品を加えない培地でも行った。薬品を加えた培地と加えない培地の正均遊走半径の差を遊走阻止の平均百分率で示した(本文参照)。

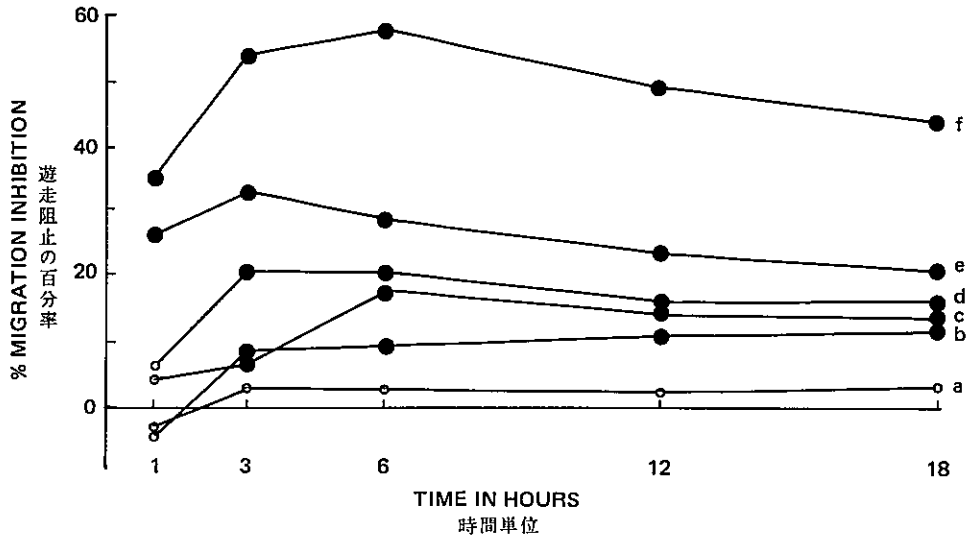
遊走半径の薬品関連変化の有意性を評価するために、薬品を加えない培地における平均遊走半径を、各時間、各濃度ごとに個別に、薬品を含む培地における平均遊走半径と比較した。ついで一対t検定を行った。有意な結果($P < 0.05$)は黒丸で(●)、図に示した。

5% CO₂ chamber. The plates were then charged with leukocytes and returned to the CO₂ chamber for an additional 18 hours of incubation. At the end of this period, the migration patterns were examined and typical irregularities in the peripheral cell edge were found. Since the threshold effect of these drugs was preserved over time, it seemed reasonable to exclude physiochemical decay as a major factor in the decline of migration inhibition beyond the 6-hour interval. It was not possible to make direct comparisons of migration inhibition in

CO₂ 高湿恒温器にもどして、さらに18時間培養した。この培養時間完了後に遊走像を検査し、先端部の細胞に典型的な不規則性があるのを認めた。これらの薬品の閾値効果は長時間にわたって継続するものであるので、生理化学的崩壊を6時間を超える期間における遊走阻止低下の主要因子として考えない方が合理的であるように思われた。18時間以上にわたって培地を保存すると、カビの生育や乾燥がしばしば起

FIGURE 6 TIME-DEPENDENT EFFECT OF VINCRIStINE ON PMN LEUKOCYTE MIGRATION

図6 時間経過に伴うビンクリスチンの多形核白血球の遊走に及ぼす影響



At intervals of 1, 3, 6, 12, & 18 hrs, the average radius of cell migration was measured in media containing vincristine at concentrations of (a) 10^{-9} , (b) 10^{-8} , (c) 10^{-7} , (d) 10^{-6} , (e) 5×10^{-6} , & (f) 10^{-5} M. For each of the five individuals studied, parallel measurements in drug-free medium were also obtained. See text and Figure 5 for explanation of percent migration inhibition and significance tests.

1, 3, 6, 12, 18時間ごとに、細胞遊走の平均半径をビンクリスチン濃度 (a) 10^{-9} , (b) 10^{-8} , (c) 10^{-7} , (d) 10^{-6} , (e) 5×10^{-6} , (f) 10^{-5} Mの培地で測定した。調査を行った5名それぞれについて、同様の測定を薬品を加えない培地でも行った。遊走阻止百分率および有意性検定については、本文および図5を参照されたい。

fresh vs aged media, as storage for periods longer than 18 hours was frequently associated with mold growth and desiccation.

DISCUSSION

Colchicine and vincristine belong to a class of antimetabolic agents known as the antitubulins.²⁵ Physicochemical studies have demonstrated that these drugs act in vitro by binding to tubulin, a protein dimer present in microtubules.²⁶⁻²⁸ Evidence has accumulated to suggest that the antitubulins also act on microtubules in vivo. Using polarized light microscopy, Inoue²⁹ made an early report of the disruptive action of colchicine on the mitotic spindle present in the oocyte of the marine worm *C. pergamentaceus*. Malawista et al³⁰ extended these studies to demonstrate the disruptive action of other antitubulins (vinblastine, vincristine, colcemid, pod-

このので、新しい培地と古い培地における遊走阻止を直接比較することは不可能であった。

考 察

コルヒチンおよびビンクリスチンは antitubulin²⁵ として知られている抗有糸分裂剤の類に属する。これらの薬品は試験管内で微細管に存在する蛋白二量体, tubulin と結合して作用することが生理化学的調査で証明されている。²⁶⁻²⁸ また, antitubulin が生体内の微細管状物質に作用することを示唆する証拠も集まっている。偏光光学顕微鏡検査を利用して, Inoue²⁹ はコルヒチンが海虫, *C. pergamentaceus* の卵母細胞に存在する有糸分裂紡錘に及ぼす破壊作用について初期の報告をした。ついで, Malawista ら³⁰ がこの調査を拡大して, その他の antitubulin (vinblastine, ビンクリスチン, colcemid, podophyllotoxin, および

phyllotoxin, and griseofulvin) on the mitotic spindle in the oocyte of *P. gouldi*. Especially compelling findings have come from electron microscope (EM) studies. Microtubules are no longer evident in EM sections of human PMN leukocytes which have been pretreated with colchicine at concentrations of 2.5×10^{-5} M and greater.³¹ In similar EM studies, pretreatment of leukocytes with vincristine and vinblastine at concentrations of 10^{-5} M has been associated with the appearance of unusual crystalline lattices composed of microtubule-like units.³²

The antitubulins have been reported to alter or inhibit cell mobility in several experimental systems. In mouse peritoneal macrophages, Bhisey and Freed³³ noted a loss of gliding movements in cells exposed to colchicine at 10^{-5} M and vinblastine at 10^{-6} M. Spooner et al³⁴ observed abnormal movement of cultured glial cells at a colchicine concentration of 10^{-6} M. In human PMN leukocytes, Ramsey and Harris⁴ found decreases in the rate of individual cell movement at 10^{-3} M colchicine and 10^{-5} M vincristine. Demecolcine, a colchicine derivative, inhibited chemotaxis of human PMN leukocytes at a concentration of 10^{-8} M in a Boyden chamber study.⁵ A similar study by Caner¹² demonstrated decreased chemotaxis of leukocytes in the presence of 10^{-7} M colchicine. Some workers have been hesitant to attribute changes in cell mobility directly to antimicrotubular effects, as near normal or normal locomotion was observed at colchicine concentrations sufficient to disrupt microtubules.^{4,34} It is interesting to note, however, that higher concentrations of antitubulins were required to demonstrate inhibitory effects in experimental systems which examined the motion of individual cells. In Boyden chamber experiments, in which the behavior of a cell population was measured, lower concentrations of antitubulins were associated with significant inhibition of movement. The difference may thus be partially attributable to sample size and the sensitivity of study techniques. Chemotaxis itself may be more susceptible to antitubulin effects than simple random migration.⁵

The study of Caner¹² occupies an important position in the literature on the antitubulins, as it affords plausible evidence for an anti-inflammatory action of colchicine in gout. At present, the pathogenesis of acute gouty arthritis is

griseofulvin) が *P. gouldi* の卵母細胞の有糸分裂紡錘に及ぼす破壊作用を証明した。さらに、電子顕微鏡 (EM) 調査により特に強力な所見が得られた。濃度 2.5×10^{-5} M 以上のコルヒチンで前もって処理したヒトの多形核白血球の電子顕微鏡用切片では、微細管は明らかではなかった。³¹ 同様の電子顕微鏡研究では、白血球を濃度 10^{-5} M のピンクリスチンおよび vinblastine で前もって処理することが微細管様の unit³² からなる珍しい結晶格子の出現に関係のあることが認められた。

数例の実験方法で antitubulin が細胞運動を変化させたり阻止したりすることが報告されている。Bhisey および Freed³³ は二十日鼠の腹膜のマクロファージを検査した結果、濃度 10^{-5} M のコルヒチンおよび濃度 10^{-6} M のビンブラスチンで処理した細胞に滑走運動の低下を認めた。Spooner ら³⁴ は、コルヒチン濃度が 10^{-6} M の時に培養した神経膠細胞が異常な運動をすることを観察した。Ramsey および Harris⁴ は、ヒトの多形核白血球を検査した結果、コルヒチン濃度が 10^{-3} M およびピンクリスチン濃度が 10^{-5} M の時に個々の細胞運動の率が低下することに気付いた。Boyden chamber 調査⁵ を行ったところ、コルヒチンの誘導体 demecolcine は、濃度が 10^{-8} M の時にヒトの多形核白血球の走化性を阻止した。Caner¹² は同様の調査で、コルヒチン濃度が 10^{-7} M の時に白血球の走化性が低下し始めることを論証した。微細管を破壊するのに十分な濃度のコルヒチンで正常または正常に近い移動が観察されたところから、細胞運動の変化を、直接、抗微細管効果に帰することに躊躇する科学者もいる。^{4,34} しかしながら、個々の細胞の運動を検査する実験方法で阻止効果を論証するためには、antitubulin の濃度を高くする必要があるということは興味深い。細胞群の行動を測定するための Boyden chamber 実験では、低濃度の antitubulin が有意な運動の阻止に関係していた。この差異は、部分的にはサンプル数、および検査技術の感度に起因するものかもしれない。走化性自体は、単一の不規則遊走⁵ よりも antitubulin の影響に対して感受性が強いかもしれない。

Caner の調査¹² は、痛風におけるコルヒチンの抗炎症作用についてもっともらしい証拠を提供するという点で、antitubulin 関係の文献の中で重要な位置を占めている。現在、急性痛風関節炎の発病は、滑液中

understood as a process requiring the presence of monosodium urate crystals in the synovial fluid, phagocytosis of urate crystals by PMN leukocytes, and acceleration of the inflammatory cycle by the metabolic products of the inflammatory reaction.³⁵⁻³⁸ Pharmacological studies have shown that a therapeutic intravenous injection of colchicine produces a transient plasma level of approximately 10^{-8} M.³⁹ Additionally, there is some preliminary evidence to suggest that leukocytes sequester colchicine intracellularly at drug levels of approximately 10^{-7} M for at least 24 hours following a therapeutic intravenous dose.⁴⁰ Colchicine inhibits phagocytosis, lysosomal release, and cellular respiration, but these effects have not been demonstrated at concentrations as low as those detected after a therapeutic dose.⁴¹⁻⁴³ Caner's finding of decreased PMN leukocyte chemotaxis at 10^{-7} M thus provides at least one possible mechanism for colchicine action which is consistent with present distribution studies. The numerous sol-to-gel transformations required during cell chemotaxis may render the PMN leukocyte especially susceptible to colchicine effects.⁴⁴

The present study also provides evidence for antitubulin effects on cell locomotion. In the presence of colchicine and vincristine at concentration of 10^{-8} to 10^{-7} M, the central and peripheral patterns of cell distribution are altered, and time-course studies of cell migration reveal an inhibitory effect. The finding of migration inhibition at a colchicine concentration of 10^{-7} M is of special interest in that it confirms Caner's observation with an independent technique and provides further evidence for colchicine action at therapeutic levels.

Colchicine and vincristine produced generally similar effects on PMN leukocyte migration in the agarose plate system. A striking difference was noted, however, in the degree of migration inhibition produced at 10^{-5} M. At this concentration, the peak value for migration inhibition in the presence of colchicine was approximately 20%, whereas the peak value with vincristine was nearly 60%. Colchicine binds tubulin in a weak and reversible manner while the binding of vincristine to tubulin is comparatively strong.^{27,45,46} The two antitubulins also occupy different binding sites on the tubulin dimer.²⁷ The differences in migration inhibition may thus be related to physicochemical dis-

の単ナトリウム尿酸塩結晶, 多形核白血球による尿酸塩結晶の食作用, および炎症反応の代謝生成物による炎症周期の促進等を必要とする一過程として理解されている。³⁵⁻³⁸ 薬理学調査では, コルヒチンを治療用に静注すると濃度約 10^{-8} M の一時的な血漿ができることが明らかにされている。³⁹ さらに, コルヒチンを治療用に静注した後, 少なくとも24時間は薬品濃度約 10^{-7} M の段階で白血球がコルヒチンを細胞内で孤立させると示唆する予備的な証拠がある。⁴⁰ コルヒチンは食作用, ライソゾームの放出, および細胞の呼吸を抑制するが, 治療用量程度の, 低い濃度ではこれらの影響は認められていない。⁴¹⁻⁴³ 従って, コルヒチン濃度が 10^{-7} M の時に多形核白血球の走化性が低下するという Caner の所見からは, 今回の分布調査と一致するコルヒチン作用の機序が少なくとも一つ得られる。細胞の走化性を示すには, 数多くのソルからゲルへの変換が必要であるので, 多形核白血球がコルヒチンの影響に対して取り分け強い感受性をもつのかもかもしれない。⁴⁴

今回の調査では, また, antitubulin が細胞移動に及ぼす影響についての証拠も得られる。濃度 10^{-8} - 10^{-7} M のコルヒチンおよびピンクリスチンを加えると, 細胞分布の中央部および先端部の遊走像が変化し, 細胞遊走の経時変化調査によって阻止効果が明らかにされる。コルヒチン濃度が 10^{-7} M の時の遊走阻止の所見は, 独立技法を用いた Caner の観察結果を確認し, 治療レベルでのコルヒチン作用に対してさらに証拠を与えるという点で特に興味をひくものである。

アガロースプレート技法を用いた場合, コルヒチンとピンクリスチンは多形核白血球の遊走に対して大体同じような影響を及ぼした。しかしながら, 濃度が 10^{-5} M の時の遊走阻止の程度には著しい差異が認められた。この濃度のコルヒチンを加えた場合の遊走阻止の最高値は約20%, 同濃度のピンクリスチンを加えた場合の最高値はほぼ60%であった。コルヒチンと tubulin の結合は弱く, 可逆的であるが, ピンクリスチンと tubulin の結合は比較的強い。^{27, 45, 46} この二つの antitubulin では, また, tubulin 二量体²⁷ における結合部位も異なる。従って, 遊走阻止の差は, これらの化合物と微細管構造物との相互作用に

similarities in the interaction of these compounds with microtubular substructures.

A noteworthy aspect of the time-course studies was the tendency for migration inhibition to peak after 3 to 6 hours of incubation. Creasy and Chou⁴⁷ reported that colchicine enters sarcoma 180 cells very rapidly, reaching a maximum intracellular concentration at 20 minutes. In human leukocytes, Ertel and Wallace⁴⁰ found peak drug levels 10 minutes after administration of an intravenous dose. Intracellular binding to microtubular protein, however, apparently proceeds at a slower rate, requiring 4 to 5 hours to reach a maximum in human KB cells incubated in the presence of 10^{-5} M colchicine.⁴⁵ A reasonable synthesis of these observations is that colchicine distribution occurs first as a rapid phase of cellular uptake and second as a slower phase of intracellular equilibration with microtubular binding sites. The time-course observations presented here suggest that colchicine effects may proceed in parallel with the events of the second distribution phase.

In studies of the frog melanocyte, Malawista⁴⁴ demonstrated that colchicine effects were a function of drug concentration and length of exposure. It was thus initially anticipated that time-course studies of colchicine and vincristine would show most pronounced migration inhibition at the more distant time intervals. This, however, was not observed. A possible explanation may be exhaustion of drug stores in the central region of the agarose medium, caused by repeated passage of cells through this area. Cells which leave the central well at an early time pass through the central region when its drug content is highest and thus receive the greatest exposure. These cells probably experience the greatest degree of migration inhibition and may well be responsible for the dense cellular carpet which appears in the central region of drug-containing plates. Conversely, cells which leave the central well at later times may experience relatively little drug exposure during the first few millimeters of travel. This population of less affected cells may account for the diminution of migration inhibition which occurs at later time intervals. They may also comprise the population of farthest-moving cells which form the irregular border on drug-containing plates. Other mechanisms which may contribute to the diminution of migration inhibition are

おける生理化学的差異に関係するものかもしれない。

経時変化調査で注目すべき点は、培養後3時間から6時間たった時に遊走阻止がピークに達する傾向を示したことである。Creasy および Chou⁴⁷ は、コルヒチンが肉腫180の細胞に浸入する時間は極めて早く、20分後には細胞内の濃度が最高に達すると報告した。Ertel および Wallace⁴⁰ は、ヒトの白血球ではコルヒチンを静注後、10分で薬品濃度が最高になることを発見した。しかしながら、微細管蛋白質との細胞内結合は比較的ゆっくりと進むようで、濃度 10^{-5} Mのコルヒチンで培養したヒトのKB細胞では最高値に達するのに4時間から5時間が必要である。⁴⁵ これらの観察結果を総合すると、コルヒチンの分布は最初、細胞吸収の迅速な相として現れ、次に、微細管結合部位との細胞内平衡の比較的ゆっくりした状態で現れると考えるのが妥当である。ここで行った経時変化調査の観察結果から、コルヒチンの影響は第二の分布相の事象と平行して進む可能性のあることが示唆される。

蛙の黒血球を調査した結果、Malawista⁴⁴ は、コルヒチンの影響は薬品濃度と薬品に被曝した期間の関数であることを論証した。従って、最初、コルヒチンとビンクリスチンの経時変化調査では薬品を受ける期間が長いほど、明白な遊走阻止が認められるだろうと予想された。しかしながらこれは観察されなかった。この説明としては、アガロース培地中央部を細胞が繰り返し通過することによって、中央部の薬品貯蔵量が枯渇したことが考えられる。早い時期に中央wellを出発する細胞は、薬品含有量が最大の時に中央部を通過するので、薬品を受ける量が最も大きい。これらの細胞は恐らく遊走阻止を最大に受けられるので、これらの細胞が薬品を加えたプレートの中央部に密な細胞群として出現する原因となるのもっともである。逆に、遅い時期に中央wellを出発する細胞は、遊走ははじめの2-3mmで受ける薬品量が比較的少ない、比較的遅い時期に出現する遊走阻止の下降現象は、このような薬品の影響の比較的少ない細胞群に起因するものかもしれない。薬品を加えたプレート上に、不規則な境界を形成する最も遠くまで遊走する細胞群も遅い時期に出現すると考えられる。遊走阻止低下の原因となるその他の機能

reversibility of drug binding and cell repair mechanisms. The irregular peripheral margins and dense central regions may also represent innately resistant and susceptible subpopulations of PMN leukocytes.

An unexpected finding in the present study was the small but significant stimulation of PMN leukocyte migration which appeared during the first hour of incubation at colchicine concentrations of 10^{-9} and 10^{-8} M. Significant stimulation did not occur at any other time interval or concentration of colchicine, or in any trial with vincristine. Contamination seems unlikely as an explanation, as several fresh preparations of colchicine were used during the study. The purity of the pharmaceutical preparation itself has been previously established.³⁹ No similar reports have been encountered in the literature, and the observation presently remains as an unexplained curiosity.

Leukocyte locomotion in most experimental systems is described as either chemotactic or random. The Boyden chamber technique is generally regarded as the standard method for studying chemotaxis.⁴⁸ Commonly accepted methods for assessment of random migration include the capillary tube technique of Ketchel and Favour⁴⁹ and leukocyte penetration of a Millipore filter in the absence of a chemotactic stimulus in the lower compartment of a Boyden chamber. Recently, random walk models for independent cell movement have been described and applied to experimental systems. Gail and Boone⁵⁰ reported that the motion of individual mouse fibroblasts in tissue culture conformed with statistical expectations for random particle motion on a plane; similar results were obtained by Peterson and Noble⁵¹ in a study of PMN leukocyte movement using a modified slide chamber. The latter investigators suggested that it may be inaccurate to refer to methods such as the capillary tube technique and Millipore filter penetration as true measures of random cell movement unless appropriate statistical tests can be applied.

An interesting consideration raised by the present study is whether the agarose plate technique involves PMN leukocyte chemotaxis or random migration. An element of outward chemotaxis may exist by virtue of design, as the presence of a central well and the repeated passage of cells through the central area may create a local

としては、薬品結合の可逆性および細胞回復機能がある。不規則な先端部および密集した中央部は、また生来の耐性および感受性のある多形核白血球小群を示すものかもしれない。

今回の調査で予期していなかった所見として、濃度 10^{-9} および 10^{-8} M のコルヒチンで培養した場合に、最初の 1 時間に小さいが有意な多形核白血球遊走の刺激が起こったことが挙げられる。その他の期間のその他のコルヒチン濃度、またビンクリスチンではどの場合でも、有意な刺激は起こらなかった。調査では新鮮なコルヒチンの標本を使用したので、この原因が混入にあるとは思われない。薬品の純粋度については前もって確認済みである。³⁹ 文献にも似たような報告はなかった。従って、この観察結果は、現在のところ説明できない奇妙な現象のままに残されている。

ほとんどの実験方法における白血球の移動は走化性または不規則と記述されている。Boyden chamber 技法は一般に、走化性を調査する標準方法⁴⁸と考えられている。不規則遊走を評価するための方法として一般に認められているのは、Ketchel と Favour の毛管技法⁴⁹ および Boyden chamber の下の仕切りに走化性の刺激剤を入れないで Millipore filter の白血球浸透を調査する方法である。近年、独立細胞運動の不規則な移行模型が記述され、種々の実験に適用されている。Gail および Boone⁵⁰ は、組織培養における個々の鼠線維芽細胞の運動が、平面上の不規則な粒子運動の統計的期待値と一致すると報告した。同様の結果が、Peterson および Noble⁵¹ の変型 slide chamber を使用した多形核白血球の遊走調査でも得られた。Peterson および Noble は、適当な統計的検定が適用できなければ、毛管技法や Millipore filter 浸透法等の技法を不規則な細胞運動の真の測定法と呼ぶのは的確ではないかもしれないと示唆した。

今回の調査で、アガロースプレート技法には多形核白血球の走化性が関与するのか、それとも不規則な遊走が関与するのかという興味深い考察が持ち出された。中央部の well の存在や中央部を細胞が繰り返し通過することによって、栄養培地が局所的に不足するので、そのために外への走化性の要素が存在

deficit of nutrient medium. These two factors may account for the dispersion of cells observed in the central region of drug-free plates. Factors favoring random migration include presuspension of leukocytes in a nutrient medium of composition similar to that of the agarose gel, and application of cells to plates of homogeneous composition. Additionally, recent studies in our laboratory have afforded evidence that our agarose plate system enhances random migration over chemotaxis (Finch, personal communication). When a diffusible chemotactic agent (AB serum) is placed in a well near a migrating disc of leukocytes, the cell border nearest the chemotactic agent is drawn outward. The extent of this outward attraction is the same in agarose medium prepared either with horse serum or heat-inactivated fetal calf serum. In the absence of a chemotactic agent, however, cell migration in agarose medium prepared with heat-inactivated fetal calf serum is much less than that observed in medium prepared with horse serum. Similar results have been obtained by Clausen.¹⁴ It would thus appear that random migration makes the major contribution to the cell movement observed in the agarose plate system utilizing horse serum.

The agarose plate technique described here might be well suited for additional studies. A logical extension of the present work would be an evaluation of agarose plate migration characteristics of PMN leukocytes from individuals receiving therapeutic doses of colchicine and vincristine. Concomitant determination of the intracellular concentration of colchicine in the PMN leukocytes of these individuals would represent an important adjunct study, as the investigation performed by Ertel and Wallace⁴⁰ only considered colchicine concentration in the WBC population as a whole and did not include any functional correlates. Studies of PMN leukocyte chemotaxis in an agarose plate system containing colchicine and vincristine would also be of interest. Mobilization of the marginal pool of leukocytes with epinephrine or the marrow reserves with corticosteroids would provide important cell populations for comparative study.^{52,53}

An interesting attribute of the agarose plate system is that the migration pattern is spread two-dimensionally along a gradient potentially composed of cells with the most active migration at the periphery and the least active migration in

しているのかもしれない。これら二つの要因によって、薬品を加えない培地の中央部に観察された細胞の散在が説明できるかもしれない。不規則な遊走を示す要因には、アガロース・ゲルに似た成分からなる栄養培地に白血球を前もって懸濁し、その細胞を均質の成分からなるプレートに適用することが挙げられる。さらに、放影研の検査室で行った最近の調査では、アガロースプレート技法によって、走化性よりも不規則な遊走が高められるという証拠が得られた (Finch, 私信)。拡散性の走化剤 (AB血清) を白血球の遊走板近くの well に置くと、走化剤に最も近い所にある細胞の境界が外部に引き寄せられる。外部に引き寄せられる程度は、ウマ血清で用意したアガロース培地も、加熱によって不活性化したウシ胎児血清で用意したものと同じである。しかしながら走化剤を加えない場合には、加熱によって不活性化したウシ胎児血清で用意したアガロース培地における細胞遊走は、ウマ血清で用意した培地で観察される遊走よりもはるかに少ない。Clausen の調査でも同様の結果が得られた。¹⁴ 従って、ウマ血清を使用するアガロースプレート技法で観察される主な細胞運動は不規則遊走であると思われる。

ここで記述したアガロースプレート技法は他の調査にも適したものである。今回の研究を論理的に展開すれば、コルヒチンおよびピンクリスチンを治療用に受けた個人から採取した多形核白血球のアガロースプレート上の遊走の特徴を評価できるであろう。Ertel および Wallace⁴⁰ が行った調査では、白血球群におけるコルヒチンの濃度を全濃度として考え、相互関係のある要因を考慮に入れなかったため、このような対象者から採取した多形核白血球におけるコルヒチンの細胞内濃度を決定することは重要な付随調査となる。コルヒチンとピンクリスチンを同時に含むアガロースプレート技法における多形核白血球の走化性調査も興味深いものである。エピネフリンを加えた場合の白血球の辺縁プールの動員および副腎皮質ステロイドを加えた場合の骨髄貯蔵によって、比較調査のために重要な細胞群が提供されるであろう。^{52, 53}

アガロースプレート技法の興味深い特質は、遊走像が細胞の形成していく遊走段階に沿って二元的に広がっていて、その細胞の最も活発な遊走が先端部に、

the central area. Differential staining techniques may reveal some histochemical distinctions in the populations spread along this gradient. The effect of phagocytosis upon cell migration might be assessed by mixing cells which have ingested a readily identifiable material with an autologous set of control cells, and then mapping the distribution of each group on the resulting migration pattern.

最も不活発な遊走が中央部に見られることである。鑑別染色法を用いれば、この遊走につれて広がる細胞群の組織化学的な特徴が明らかにされるかもしれない。細胞遊走に対する食作用の影響は、容易に確認できる物質を摂取した細胞と対照となる自己由来細胞を混合し、次に各組の分布状況を結果として生ずる遊走像の上に図で示すことによって評価できる。

REFERENCES

参考文献

1. PERILLIE PE, FINCH SC: The local exudative cellular response in leukemia. *J Clin Invest* 39:1353-7, 1960
2. BOGGS DR: The cellular composition of inflammatory exudates in human leukemias. *Blood* 15:466-75, 1960
3. PERILLIE PE, NOLAN JP, FINCH SC: Studies of the resistance to infection in diabetes mellitus: Local exudative cellular response. *J Lab Clin Med* 59:1008-15, 1962
4. RAMSEY WS, HARRIS A: Leukocyte locomotion and its inhibition by antimetabolic drugs. *Exp Cell Res* 82:262-70, 1972
5. BANDMAN U, RYDGREN L, NORBERG B: The difference between random movement and chemotaxis. Effects of antitubulins on neutrophil granulocyte locomotion. *Exp Cell Res* 88:63-73, 1974
6. HENDERSON LW, MILLER ME, HAMILTON RW, NORMAN ME: Hemodialysis leukopenia and polymorphomobility - a possible correlation. *J Lab Clin Med* 85:191-7, 1975
7. CLARK RA, KIMBALL HR: Defective granulocyte chemotaxis in the Chediak-Higashi syndrome. *J Clin Invest* 50:2645-52, 1971
8. MILLER ME, NORMAN ME, KOBLENZER PJ, SCHONAUER T: A new familial defect in neutrophil movement. *J Lab Clin Med* 82:1-8, 1973
9. DEMEO AN, ANDERSEN BR: Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients. *N Engl J Med* 286:735-40, 1972
10. MOWAT AG, BAUM J: Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 284:621-7, 1971
11. MILLER ME, BAKER L: Leukocyte functions in juvenile diabetes mellitus: Humoral and cellular aspects. *J Pediatr* 81:979-82, 1972
12. CANER JEZ: Colchicine inhibition of chemotaxis. *Arthritis Rheum* 8:757-64, 1965
13. CARPENTER RR, BARSALES PB, GANCHAN RP: Antigen-induced inhibition of cell migration in agar gel, plasma clot, and liquid media. *J Reticuloendothel Soc* 5:472-83, 1968
14. CLAUSEN JE: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium. *Acta Allergol (Kbh)* 26:56-80, 1971

15. GAINES JD, ARAUJA FG, KRAHENBUHL JL, REMINGTON JS: Simplified in vitro method for measuring delayed hypersensitivity to latent intracellular infection in man (Toxoplasmosis). *J Immunol* 109:179-82, 1972
16. ASTOR SH, SPITLER LE, FRICK OL, FREEDENBERG NH: Human leukocyte migration inhibition in agarose using four antigens: Correlation with skin reactivity. *J Immunol* 110:1174-9, 1973
17. CLAUSEN JE: Migration inhibitory effect of cell-free supernatant from mixed human lymphocyte cultures. *J Immunol* 108:453-9, 1972
18. BOYUM A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21 (Suppl 97):77-89, 1968
19. THORSBY E: Cell specific and common antigens on human granulocytes and lymphocytes as demonstrated with cytotoxic heteroantibodies. *Vox Sang* 13:194-206, 1967
20. SKOOG WA, BECK WS: Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 11:436-54, 1956
21. MARTIN SP, GREEN R: Methods for the study of surviving leukocytes. A. Preparation of cell suspension. In *Methods in Medical Research*. Ed by Warren JV, Vol 7. Chicago, Year Book Publishers, 1958. pp 136-41
22. KLEIN E, ERIDANIS S, DJERASSI I, RESNICK R: A simple method for the separation of leukocytes from whole blood. *Am J Clin Pathol* 29:550-2, 1958
23. ERTEL NH, WALLACE SL: Purification of colchicine, its photoisomer(s), and some congeners by paper and thin-layer chromatography. *Biochem Med* 4:181-92, 1970
24. DIEM K, LENTNER C: *Scientific Tables*. Basle, Ciba-Geigy, 1973. pp 109-23
25. MARGULIS L: Colchicine-sensitive microtubules. *Int Rev Cytol* 34:333-61, 1973
26. BRYAN J: Definition of three classes of binding sites in isolated microtubule crystals. *Biochemistry* 11:2611-6, 1972
27. BORISY GG, TAYLOR EW: The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-³H to cellular protein. *J Cell Biol* 34:525-33, 1967
28. ADELMAN MR, BORISY GG, SHELANSKI MC, WEISENBERG RC, TAYLOR EW: Cytoplasmic filaments and tubules. *Fed Proc* 27:1186-93, 1968
29. INOUE S: The effect of colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle. *Exp Cell Res* 2(Suppl 2):305-18, 1952
30. MALAWISTA SE, SATO H, BENSCH KG: Vinblastine and griseofulvin reversibly disrupt the living mitotic spindle. *Science* 160:770-1, 1968
31. MALAWISTA SE, BENSCH KG: Human polymorphonuclear leukocytes: Demonstration of microtubules and effect of colchicine. *Science* 156:521-2, 1967
32. BENSCH KG, MALAWISTA SE: Microtubule crystals: A new biophysical phenomenon induced by vinca alkaloids. *Nature* 218:1176-7, 1968
33. BHISEY AN, FREED JJ: Ameboid movement induced in cultured macrophages by colchicine or vinblastine. *Exp Cell Res* 64:419-29, 1971
34. SPOONER BS, YAMADA KM, WESSELLS NK: Microfilaments and cell locomotion. *J Cell Biol* 49:595-613, 1971

35. MCCARTY DJ, HOLLANDER JL: Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern Med* 54:452-60, 1961
36. FAIRES JS, MCCARTY DJ: Acute arthritis in man and dog produced by intrasynovial injection of sodium urate crystals. *Clin Res* 9:329, 1961
37. MCCARTY DJ JR: Phagocytosis of urate crystals in gouty synovial fluid. *Am J Med Sci* 243:288-95, 1962
38. SEEGMILLER JE, HOWELL RR, MALAWISTA SE: The inflammatory reaction to sodium urate. Its possible relationship to the genesis of acute gouty arthritis. *JAMA* 180:469-75, 1962a
39. WALLACE SL, OMOKOKU B, ERTEL NH: Colchicine plasma levels: Implications as to pharmacology and mechanism of action. *Am J Med* 48:443-8, 1970
40. ERTEL NH, WALLACE SL: Measurement of colchicine in urine and peripheral leukocytes. *Clin Res* 19:348, 1971
41. SEEGMILLER JE, HOWELL RR, MALAWISTA SE: A mechanism of action of colchicine in acute gouty arthritis. *J Clin Invest* 41:1399, 1962b
42. MALAWISTA SE, BODEL P: Dissociation by colchicine of phagocytosis per se from increased oxygen consumption in human leukocytes. *J Clin Invest* 45:1044, 1966
43. RAJAN KT: Lysosomes and gout. *Nature* 210:959-60, 1966
44. MALAWISTA SE: On the action of colchicine. The melanocyte model. *J Exp Med* 122:361-83, 1965
45. TAYLOR EW: The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and binding of ³H-colchicine. *J Cell Biol* 25:145-60, 1967
46. WILSON L: Properties of colchicine binding protein from chick embryo brain. Interactions with vinca alkaloids and podophyllotoxin. *Biochemistry* 9:4999-5007, 1970
47. CREASY WA, CHOU TC: The binding of colchicine by sarcoma 180 cells. *Biochem Pharmacol* 17:477-81, 1968
48. KELLER HU, HESS MW, COTTIER H: Physiology of chemotaxis and random motility. *Semin Hematol* 12:47-57, 1975
49. KETCHEL MM, FAVOUR CB: The acceleration and inhibition of migration of human leukocytes in vitro by plasma protein fractions. *J Exp Med* 101:647-63, 1955
50. GAIL MH, BOONE CW: The locomotion of mouse fibroblasts in tissue culture. *Biophys J* 10:980-93, 1970
51. PETERSON SC, NOBLE PB: A two-dimensional random walk analysis of human granulocyte movement. *Biophys J* 12:1048-55, 1972
52. SAMUELS AJ: Primary and secondary leukocyte changes following the intramuscular injection of epinephrine hydrochloride. *J Clin Invest* 30:941-7, 1951
53. BISHOP CR, ATHENS JW, BOGGS DR, WARNER HR, CARTWRIGHT GE, WINTROBE MM: Leukokinetic studies. 8. A non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *J Clin Invest* 47:249-60, 1968