

EFFECT OF COLCHICINE ON THE MIGRATION OF
HUMAN LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS UNDER AGAROSE

ヒトリンパ球 subpopulation の
アガロース下遊走に及ぼすコルヒチンの影響

JOHN A. PINKSTON, M.D.

STUART C. FINCH, 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

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

We wish to acknowledge the excellent technical assistance of Mr. Shozo Iida, and to thank Dr. William J. Schull for his assistance with the statistical analysis.

技術面での優れた援助をいただいた飯田昭三氏と、統計解析に助力をいただいた William J. Schull 博士に謝意を表する。

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放射線研業績報告書集

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.

放射線研業績報告書は、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半等分担とし、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。

EFFECT OF COLCHICINE ON THE MIGRATION OF HUMAN LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS UNDER AGAROSE

ヒトリンパ球 subpopulation の
アガロース下遊走に及ぼすコルヒチンの影響

JOHN A. PINKSTON, M.D.¹, STUART C. FINCH, M.D.²

Department of Medicine¹, Vice-Chairman and Chief of Research²

臨床部¹, 及び副理事長・研究担当理事²

SUMMARY

The effect of colchicine on the random migration of human peripheral blood mononuclear cells under agarose gel was studied. Separated T cell and nonrosetting sheep red blood cell fractions were incubated in the presence of colchicine at concentrations ranging from 10^{-8} M to 10^{-2} M, and then allowed to migrate for 72 hours. Significant inhibition of migration was not observed at colchicine concentrations less than 10^{-3} M. At 10^{-3} M, significant impairment of both T cell ($P < .01$) and nonrosetting cell ($P < .001$) migrations was observed. At 10^{-2} M colchicine, migration was completely inhibited. Enhancement of migration of any type of human mononuclear cells by colchicine was not observed at any concentration. The results were consistent with the hypothesis that microtubules are not required for the random migration of these cells.

INTRODUCTION

Colchicine, a microtubule disrupting agent, has been shown to affect the motility of certain human leukocytes in vitro. It has been reported to inhibit granulocyte chemotaxis¹⁻⁴ and chemokinesis,^{3,5} but to have little effect on random migration.^{3,4} In contrast, colchicine has been reported to enhance the motility of monocytes,⁶ cultured B lymphocytes,⁷ and human peripheral blood T and B lymphocytes.⁸ Most prior studies of colchicine effects on leukocyte migration have used the Boyden chamber,⁹ or similar microfilter techniques.

要約

アガロース培地下におけるヒト末梢血単核球の不規則遊走に及ぼすコルヒチンの影響を調べた。分離したT細胞及び非ロゼットヒツジ赤血球細胞分画を 10^{-8} M ないし 10^{-2} M の濃度のコルヒチンの中で培養し、72時間遊走させた。コルヒチン濃度 10^{-3} M 未満では有意な遊走阻害は見られなかった。濃度 10^{-3} M ではT細胞 ($P < .01$) 及び非ロゼット細胞 ($P < .001$) ともに有意な遊走障害が認められた。濃度 10^{-2} M では遊走は完全に阻止された。いかなる濃度においても、すべてのヒト単核球は遊走促進を示さなかった。この結果は、これら細胞の不規則遊走に微小管は必要ないという仮説と一致する。

緒言

微小管を破壊させる作用を持つコルヒチンが、特定のヒト白血球の試験管内運動に影響を及ぼすことが認められている。コルヒチンは顆粒球の走化性¹⁻⁴ 及び化学運動性^{3,5} を阻害するが、不規則遊走にはほとんど影響を及ぼさないこと^{3,4} が報告されている。一方、単球、⁶ 培養Bリンパ球、⁷ 及びヒト末梢血T及びBリンパ球⁸ の運動を促進することが報告されている。コルヒチンの白血球遊走に及ぼす影響に関するこれまでの調査の多くでは、Boyden chamber⁹ 若しくは同様のマイクロ・フィルター技法が用いられていた。

Preliminary experiments in our laboratory previously had failed to demonstrate any enhancement of lymphocyte migration in the presence of colchicine by an agarose plate technique.¹⁰ In addition to confirming these early results, we wished to examine the effects of a broader range of colchicine concentrations on lymphocyte subpopulation migration using the agarose plate method.

MATERIALS AND METHODS

Agarose A-45 (agarose) was obtained from Nakarai Chemicals, Ltd., Kyoto; Medium RPMI 1640 (RPMI) from Nissui Seiyaku Co., Ltd., Tokyo; sheep red blood cells (SRBC) from the Japanese Biological Materials Center, Tokyo; pooled human serum (PHS) as Pentex from Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana; and colchicine, from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka. Plastic petri dishes, 60 × 15 mm, were purchased from Falcon, Oxnard, California, Ficoll-400 (Ficoll) from Pharmacia, Uppsala, Sweden, and Conray 400 (Conray) from Daiichi Seiyaku Co., Tokyo.

The agarose plate technique for studying of lymphocyte migration has been previously reported.¹⁰ Heparinized venous blood was obtained from several healthy adult volunteers, and the mononuclear fraction was isolated by Ficoll density centrifugation using the Boyum technique.¹¹ T cell separation was accomplished by SRBC rosetting, using a modification of the method of Greaves and Brown.¹² Both the T cell fraction, and the remaining mononuclear cell fraction consisting mostly of B cells and monocytes (nonrosetting fraction), were adjusted to a concentration of 1×10^6 cells/10 μ l in RPMI. Cell viability was greater than 97% by trypan blue exclusion.

Agarose media supplemented with 20% PHS was prepared as previously described,¹⁰ and colchicine was added to achieve concentrations ranging from 10^{-8} M to 10^{-2} M. The agarose was poured into the plastic petri dishes and hardened by refrigeration. A linear series of holes 3 mm in diameter, the edges of which were 4 mm apart, were punched in the agarose using a stainless template. A 10 μ l aliquot (1×10^6 cells) of either T or nonrosetting cells was introduced into each well, and the plates incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator for 72 hours. In some studies, plates were removed at various

当検査室が先に行った予備実験では、アガロース平板法を使用した場合、コルヒチン存在下では、リンパ球遊走の促進は認められなかった。¹⁰ 本調査では、これらの検査結果を確認し、更に、幅広い濃度のコルヒチンを使用した場合に、そのリンパ球 subpopulation 遊走に及ぼす影響をアガロース平板法を用いて調べたいと考えた。

材料及び方法

使用材料及びその購入先は下記のとおりである：アガロース A-45 (アガロース) - 半井化学薬品, 京都; RPMI-1640 培地 (RPMI) - 日水製薬, 東京; ヒツジ赤血球 (SRBC) - 日本生物材料センター, 東京; Pentex としてプールしたヒト血清 (PHS) - Miles Laboratories, Inc., Indiana 州 Elkhart 市; コルヒチン - 和光純薬工業, 大阪; 60×15mm のプラスチックペトリ皿 - Falcon, California 州 Oxnard 市; Ficoll-400 (Ficoll) - Pharmacia, スウェーデン Uppsala 市; Conray 400 (Conray) - 第一製薬, 東京。

リンパ球遊走検査に用いるアガロース平板法については先に報告した。¹⁰ 数人の健康成人より得たヘパリン加静脈血から Boyum 法¹¹ による Ficoll 濃度遠心分離で単核球分画を単離した。T 細胞の分離は Greaves と Brown の技法¹² の変法を使用し, SRBC ロゼットによって行った。T 細胞分画及びほとんど B 細胞と単球から成っている残りの単核球分画 (非ロゼット分画) の双方を RPMI 中の濃度 1×10^6 個/10 μ l に調整した。細胞の生存率はトリパン・ブルー排除検査で測定した結果 97% 以上であった。

前報で述べた方法¹⁰ に従って, 20% PHS を加えたアガロース培地を作り, コルヒチンを濃度が 10^{-8} M から 10^{-2} M になるように加えた。アガロースをプラスチックのペトリ皿に注ぎ, 冷蔵して固めた。ステンレスの型抜きでアガロース上に一直線に 4 mm 間隔で直径 3 mm の穴をあけた。T 細胞か非ロゼット細胞のどちらかを 10 μ l (1×10^6 個) ずつ各試料孔に分注し, その平板を 5% CO₂ incubator に入れ, 37°C で 72 時間培養した。一部の実験では, 平板を

intervals during incubation and the distance from the edge of each well to the leading front of the migrating cells was measured with an inverted microscope using an ocular eyepiece grid. The distance was measured in four directions, and the results averaged. The plates were removed after 72 hours and fixed with Carnoy's solution for 30 minutes, then the agarose was removed and the plates stained with Wright-Giemsa stain.

The stained image was displayed on a ground glass screen using a projector which provided 20-fold magnification, and the distance from the edge of the well to the advancing front of cells was measured. For a single well, the distance in four directions was measured and averaged. Control studies using T and nonrosetting cells, as well as studies in the presence of various concentrations of colchicine were performed in triplicate using three wells, and the results averaged as the endpoint for each study. Statistical analysis was performed using the Student's t test.

RESULTS

Effect of 10^{-8} M - 10^{-4} M Colchicine. The effects of colchicine at concentrations ranging from 10^{-8} M to 10^{-4} M on T cell migration are shown in Table 1, and on nonrosetting cell migration in Table 2. For both T and nonrosetting cells, no definite effect was observed following 24, 48, or 72 hours of incubation. At 10^{-4} M, however, a suggestive ($.10 > P > .05$) effect was noted for T cells at 48 and 72 hours, and for nonrosetting cells at 72 hours of migration. The migration distance at 72 hours for untreated T cells averaged $1.13 \pm .18$ mm, and $0.90 \pm .30$ mm for cells treated with 10^{-4} M colchicine, an inhibition of 20.4%. For nonrosetting cells, the migration distances at 72 hours for untreated cells averaged $1.72 \pm .27$ mm, and for cells treated with 10^{-4} M colchicine $1.29 \pm .46$ mm, an inhibition of 25.0%.

Effect of 10^{-3} M and 10^{-2} M Colchicine. The effect of 10^{-3} M and 10^{-2} M colchicine on T and nonrosetting cell migrations following 72 hours of incubation is shown in Table 3. At 10^{-3} M, significant impairment of both T cell ($P < .01$) and nonrosetting cell ($P < .001$) migrations was observed. The average migration distance for the untreated T cells was $1.27 \pm .39$ mm, and for the 10^{-3} M treated cells was $0.82 \pm .39$ mm, an inhibition of 35.4%. For untreated nonrosetting

色々な培養時間で取り出し、グリッドの入った接眼レンズを装着した倒立顕微鏡で各試料孔の端から遊走細胞の先端までの距離を4方向別に測定し、その結果の平均を求めた。平板は72時間後に取り出し、Carnoy液で30分間固定した後、アガロースを除去し、Wright-Giemsa染色した。

すりガラスのスクリーン上にプロジェクターを用いて20倍の倍率で染色像を投写し、試料孔の端から最も遠くまで遊走した細胞の先端までの距離を測定した。1個の試料孔につき4方向の距離を測定して平均値を求めた。種々の濃度のコルヒチンだけではなく、T細胞及び非ロゼット細胞を対照として用いた検査でも、3個の試料孔につき3回検査を行い、各検査結果を平均してそれぞれの最終値とした。統計解析はStudentのt検定を用いて行った。

結果

10^{-8} M ~ 10^{-4} M濃度のコルヒチンの影響。 10^{-8} Mから 10^{-4} Mの濃度のコルヒチンがT細胞の遊走に及ぼす影響を表1に、非ロゼット細胞の遊走に及ぼす影響を表2に示した。T細胞と非ロゼット細胞の双方とも、24時間、48時間及び72時間培養では明らかな影響は認められなかった。しかし、濃度 10^{-4} Mでは、48時間及び72時間遊走させたT細胞と72時間遊走させた非ロゼット細胞に示唆的な($.10 > P > .01$)影響が認められた。未処理T細胞の72時間での遊走距離は平均 $1.13 \pm .18$ mm、 10^{-4} Mのコルヒチンを加えた場合は平均 $0.90 \pm .30$ mmで阻害率20.4%であった。非ロゼット細胞ではコルヒチンを加えない細胞の72時間での遊走距離は平均 $1.72 \pm .27$ mm、 10^{-4} Mのコルヒチンを加えた場合は $1.29 \pm .46$ mmで、阻害率は25.0%であった。

10^{-3} M ~ 10^{-2} M濃度のコルヒチンの影響。 10^{-3} Mから 10^{-2} Mの濃度のコルヒチンがT細胞及び非ロゼット細胞の72時間遊走に及ぼす影響を表3に示した。コルヒチン濃度 10^{-3} Mでは、T細胞($P < .01$)及び非ロゼット細胞($P < .001$)の双方に有意な遊走障害が認められた。未処理T細胞の平均遊走距離は $1.27 \pm .39$ mm、 10^{-3} Mのコルヒチンを加えた場合は $0.82 \pm .39$ mmで、阻害率は35.4%であった。未処理

TABLE 1 HUMAN T CELL MIGRATION AS A FUNCTION OF TIME AND COLCHICINE CONCENTRATION

表1 培養時間及びコルヒチン濃度の関数としてのヒトT細胞遊走

	Control	Colchicine Concentration				
		$10^{-8}M$	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$10^{-4}M$
24 Hours						
Subjects	6	5	5	6	6	5
Range (mm)	1.05 - 0.45	1.20 - 0.45	1.00 - 0.50	1.00 - 0.45	1.00 - 0.20	1.05 - 0.30
Mean \pm SD	0.76 \pm 0.26	0.69 \pm 0.32	0.83 \pm 0.20	0.80 \pm 0.23	0.75 \pm 0.29	0.70 \pm 0.33
P value		.7 > P > .6	.8 > P > .7	.9 > P > .8	.9 > P > .8	.7 > P > .6
48 Hours						
Subjects	6	5	6	6	6	6
Range (mm)	1.40 - 0.95	1.50 - 0.90	1.55 - 0.35	1.50 - 0.70	1.50 - 0.70	1.20 - 0.70
Mean \pm SD	1.16 \pm 0.17	1.17 \pm 0.27	1.14 \pm 0.43	1.11 \pm 0.30	1.13 \pm 0.28	0.96 \pm 0.20
P value		P > .9	P > .9	.8 > P > .7	.9 > P > .8	.1 > P > .05*
72 Hours						
Subjects	6	6	5	6	6	6
Range (mm)	1.40 - 0.90	1.50 - 0.88	1.55 - 1.05	1.50 - 0.70	1.30 - 0.75	1.30 - 0.75
Mean \pm SD	1.13 \pm 0.18	1.14 \pm 0.27	1.27 \pm 0.21	1.07 \pm 0.33	1.08 \pm 0.23	0.90 \pm 0.30
P value		P > .9	.3 > P > .2	.7 > P > .6	.7 > P > .6	.1 > P > .05*

*Suggestive 示唆的

TABLE 2 HUMAN NONROSETTING MONONUCLEAR CELL MIGRATION AS A FUNCTION OF TIME AND COLCHICINE CONCENTRATION

表2 培養時間及びコルヒチン濃度の関数としてのヒト非ロゼット単核球遊走

	Control	Colchicine Concentration				
		$10^{-8}M$	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$10^{-4}M$
24 Hours						
Subjects	6	5	6	6	6	6
Range (mm)	1.75 - 0.65	1.75 - 0.75	2.00 - 0.85	2.00 - 0.70	1.75 - 0.70	1.75 - 0.65
Mean \pm SD	1.28 \pm 0.40	1.20 \pm 0.41	1.28 \pm 0.46	1.33 \pm 0.51	1.28 \pm 0.44	1.15 \pm 0.48
P value		.8 > P > .7	P > .9	.9 > P > .8	P > .9	.7 > P > .6
48 Hours						
Subjects	6	5	6	6	6	6
Range (mm)	2.00 - 1.00	1.80 - 0.85	2.00 - 0.85	2.00 - 0.75	2.00 - 0.70	2.00 - 0.70
Mean \pm SD	1.57 \pm 0.35	1.38 \pm 0.43	1.45 \pm 0.42	1.44 \pm 0.42	1.41 \pm 0.48	1.28 \pm 0.47
P value		.5 > P > .4	.7 > P > .6	.6 > P > .5	.6 > P > .5	.3 > P > .2
72 Hours						
Subjects	6	5	6	6	6	6
Range (mm)	2.00 - 1.40	1.90 - 1.00	2.00 - 1.00	2.00 - 1.00	2.00 - 0.75	2.00 - 0.75
Mean \pm SD	1.72 \pm 0.27	1.48 \pm 0.37	1.58 \pm 0.34	1.44 \pm 0.38	1.50 \pm 0.45	1.29 \pm 0.46
P value		.3 > P > .2	.5 > P > .4	.2 > P > .1	.4 > P > .3	.1 > P > .05*

*Suggestive 示唆的

TABLE 3 EFFECT OF COLCHICINE ON HUMAN T CELL AND NONROSETTING MONONUCLEAR CELL MIGRATION FOLLOWING 72 HOURS OF INCUBATION

表3 72時間培養したヒトT細胞及び非ロゼット単核球遊走に及ぼす
コルヒチンの影響

	Control	Colchicine Concentration			
		10^{-8} M	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-2} M
T Cells					
Subjects	9	6	6	5	5
Range (mm)	2.00 - 0.75	1.50 - 1.10	1.45 - 0.60	1.50 - 0.55	**
Mean \pm SD	1.27 \pm 0.39	1.20 \pm 0.22	1.09 \pm 0.31	0.82 \pm 0.39	**
P value		.6 > P > .5	.2 > P > .1	.01 > P > .001*	
Nonrosetting Mononuclear Cells					
Subjects	9	7	7	5	5
Range (mm)	2.40 - 1.50	2.40 - 1.70	2.40 - 1.90	1.65 - 1.00	**
Mean \pm SD	2.03 \pm 0.30	2.10 \pm 0.25	2.09 \pm 0.30	1.26 \pm 0.28	**
P value		.6 > P > .5	.6 > P > .5	P < .001*	

*Significant 有意

**No detectable migration 探知可能な遊走なし

cells, the average migration distance was $2.03 \pm .30$ mm, and for the 10^{-3} M treated cells, was $1.26 \pm .28$ mm, an inhibition of 37.9%. Concurrent studies with 10^{-8} M and 10^{-4} M colchicines again revealed no significant inhibitory effect, consistent with the results presented in Tables 1 and 2. At 10^{-2} M colchicine, motility appeared completely inhibited, and no migration was observed in any of the preparations.

Microscopic Observations of Stained Preparations. Nonspecific esterase stain studies have revealed that as many as 20% of the cells in the non-rosetting cell preparations are monocytes.¹⁰ To determine whether colchicine exerted a selective inhibitory effect on lymphocyte or monocyte migration, the stained nonrosetting cell preparations following 72 hours of incubation were microscopically examined. In control and colchicine preparations from 10^{-8} M to 10^{-3} M, phagocytic cells and cells with a monocytoïd appearance were evenly distributed throughout the migration zones, with no evidence of a selective inhibitory effect. Monocytoïd and phagocytic cells were also seen evenly distributed among the lymphocytes which had remained in the wells. At 10^{-2} M colchicine, no cells were observed outside of the wells.

非ロゼット細胞の平均遊走距離は $2.03 \pm .30$ mm, 10^{-3} M のコルヒチンを加えた場合は $1.26 \pm .28$ mm で、阻害率は 37.9% であった。 10^{-8} M と 10^{-4} M のコルヒチンを同時に用いて検査を行ったところ、有意な阻害影響は認められず、表 1 及び表 2 に示した結果と一致した。コルヒチン濃度 10^{-2} M では、遊走は完全に阻止され、いずれの標本においても遊走は見られなかった。

染色した標本の顕微鏡による観察。非特異性エステラーゼ染色で調べると、非ロゼット細胞標本中の細胞の 20% が単球であった。¹⁰ コルヒチンがリンパ球若しくは単球の遊走に対して選択的な阻害効果を有するか否かを調べるために、72時間培養した非ロゼット細胞の染色標本の検鏡を行った。対照標本及び 10^{-8} M から 10^{-3} M までの濃度のコルヒチン標本においては、食作用細胞及び単球様細胞は遊走範囲全般にわたり均等に分布し、選択的阻害効果の所見は認められなかった。単球様及び食作用細胞は試料孔中に残存していたリンパ球の中においても均等に分布しているのが認められた。コルヒチン濃度 10^{-2} M では試料孔の外側には細胞は見られなかった。

DISCUSSION

The results of these studies indicate that the random migration of T lymphocytes and non-rosetting mononuclear cells in the agarose system is not significantly inhibited by colchicine concentrations of 10^{-4} M or less. At 10^{-4} M colchicine, some evidence of impairment of both T and nonrosetting cell migrations was manifest, although the inhibition was only of borderline significance ($.10 > P > .05$) and not consistently observed in all the groups treated with this dose. At 10^{-3} M colchicine, significant impairment of both T cell ($P < .01$) and nonrosetting cell ($P < .001$) migration was observed. At 10^{-2} M colchicine, no out-migration of cells was observed in any of the preparations.

The concentrations of colchicine required to inhibit lymphocyte migration in these experiments were much higher than those which have previously been shown to inhibit mitosis or depolymerize microtubules. Exposure of cells to 10^{-7} M colchicine has been shown to block mitosis,¹³ and concentrations of from 10^{-7} M to 10^{-5} M have been shown to both deplete the microtubules of migrating cells^{14,15} and to induce a change from a gliding to an amoeboid type of movement.¹⁵ This suggests that microtubules are not required for the random migration of lymphocytes. Our results are consistent with previous studies which failed to demonstrate any effect of 10^{-4} M to 10^{-5} M colchicine on the migration of cultured B lymphoblasts⁷ or peripheral blood T and B lymphocytes.⁸

In our studies, the effect of colchicine on monocyte migration appeared to be similar to that observed for lymphocytes. Microscopic examination of the stained nonrosetting cell preparations revealed that phagocytic cells and cells with a monocytoïd appearance were evenly distributed throughout the migration zone in both the control and colchicine-treated samples, with no evidence of selective inhibition of enhancement of migration. Crispe⁶ also was unable to demonstrate inhibition of monocyte migration in the presence of 10^{-7} M to 10^{-5} M colchicine.

The effect of colchicine on the migration of monocytes and lymphocytes in the agarose system appears to differ from that observed in the micropore filter systems in at least one important respect. Enhanced migration of

考 察

これらの検査結果は、アガロース法におけるTリンパ球及び非ロゼット単核球の不規則遊走は、濃度 10^{-4} M以下のコルヒチンでは有意に阻害されないことを示している。濃度 10^{-4} MではT細胞及び非ロゼット細胞双方の遊走が阻害されたという若干の徴候は認められたが、その阻害の度合は極めてわずかに有意 ($.10 > P > .05$) であったにすぎず、この濃度のコルヒチンで処理した標本すべてに一致して見られたものではない。コルヒチン濃度 10^{-3} Mでは、T細胞 ($P < .01$) 及び非ロゼット細胞 ($P < .001$) の双方に有意な遊走障害が認められた。濃度 10^{-2} Mでは、どの標本においても細胞の試料孔外への遊走は見られなかった。

これらの実験でリンパ球遊走を阻害するのに必要なコルヒチン濃度は先に細胞分裂阻害や微小管の解重合に要した濃度よりはるかに高いものであった。 10^{-7} Mのコルヒチン下では細胞分裂は阻止され、 10^{-7} Mから 10^{-5} Mでは遊走細胞の微小管を減少させ、^{14,15} 遊走の形式を滑走型からアメーバ型に変えさせる¹⁵ ことも認められた。これは、リンパ球の不規則遊走に微小管は必要でないことを示唆している。本調査の結果は、 10^{-4} Mから 10^{-5} Mのコルヒチンが培養Bリンパ芽球⁷ 若しくは末梢血T及びBリンパ球⁸ の遊走に及ぼす影響の認められなかった以前の調査結果と一致している。

本調査では、コルヒチンが単球遊走に及ぼす影響はリンパ球の場合と同様と思われる。非ロゼット細胞の染色標本検鏡で、食作用細胞及び単球様細胞は対照標本及びコルヒチン処理標本の双方とも遊走範囲全般にわたって均等に分布しており、選択的阻害や遊走促進の徴候は見られなかった。Crispe⁶ もコルヒチン濃度 10^{-7} Mから 10^{-5} Mにおいて単球遊走の阻害を証明できなかった。

アガロース法の下でコルヒチンが単球及びリンパ球遊走に及ぼす影響は、少なくとも一つの重要な点で、微細フィルター法における場合と異なるようである。微細フィルター法で約 10^{-7} Mから 10^{-5} Mのコルヒ

these cells into a micropore filter in the presence of colchicine in concentrations between approximately 10^{-7} M and 10^{-5} M has been demonstrated.⁶⁻⁸ This enhanced migration has been attributed to easier penetration of the filter by the colchicine-treated cells, due to easier cell deformability from the antitubulin effects on the microtubule cytoskeleton.^{6,8} No increased cell migration was observed in any of our colchicine-treated samples. In our studies, however, the cells migrate on a flat surface through a semisolid gel of uniform consistency, and easier deformability of the cells would not necessarily be expected to result in increased migration.¹⁶

Colchicine probably is generally quite toxic to many cells at concentrations at which impairment of migration was observed in our studies. At colchicine concentrations of 10^{-3} M or more, microtubules are undoubtedly affected but also there is interference with several other leukocyte functions, such as adhesiveness,¹⁷ oxygen consumption,¹⁸ and protein and nucleic acid synthesis.¹⁹

The absence of significant inhibition by approximately 10^{-5} M colchicine on the random migration of T lymphocytes and nonrosetting cells in the agarose system is in sharp contrast to the transient impairment of granulocyte migration which occurs under similar conditions.²⁰ The slowing of granulocytes in the presence of 10^{-5} M colchicine suggests some impairment of the microtubular response to chemokinetic factors²¹ in the agarose media, since the random migration of granulocytes in the absence of significant amounts of these factors is unaffected by colchicine.^{3,4} Chemokinetic factors for granulocytes are present in sera and serum albumin, and also may result from serum-agar interactions.²²⁻²⁴ Their presence is unavoidable since in the agarose system granulocyte migration does not occur in the absence of serum or serum albumin.^{25,26} Several previous studies by others have demonstrated colchicine inhibition of stimulated granulocyte random migrations.^{3,5,20}

The failure to observe microtubule-dependent activated migration of T and B lymphocytes in the present study does not necessarily indicate that this phenomenon does not occur, however. It is quite possible that other factors, not already present, if added might induce activated, microtubule-dependent migration of lymphocytes. The results do imply, however, that if

チンを使用した場合、単球やリンパ球の遊走促進が認められている。⁶⁻⁸ この遊走促進は、コルヒチンで処理された細胞のフィルターへの浸透が容易となったためと考えられ、これは微小管の細胞骨格に及ぼす抗小管作用によって細胞変形が容易になるためである。^{6,8} 本調査ではコルヒチン処理標本に細胞遊走の促進はいずれにも見られなかった。しかし、本調査では細胞は均一成分の半固体ゲルの中を平面に沿って遊走するので、細胞の変形が容易であっても、遊走促進が起こることは必ずしも期待できない。¹⁶

一般にコルヒチンは、本調査で遊走障害が認められた濃度においては多くの細胞に対して極めて毒性が強いと思われる。コルヒチン濃度 10^{-3} M以上では微小管が影響を受けるのは明らかであるが、吸着性、¹⁷ 酸素消費、¹⁸ 及び蛋白質や核酸の合成¹⁹ など幾つかの他の白血球機能をも妨害する。

10^{-5} M 程度のコルヒチン濃度でアガロース法における T リンパ球及び非ロゼット細胞の不規則遊走が有意に阻害されないのは、同じ条件で顆粒球遊走に一時的障害が起こることと際立った対照である。²⁰ 有意な量の化学運動性要因がない場合には、顆粒球の不規則遊走はコルヒチンによって影響を受けないことから、^{3,4} 10^{-5} M のコルヒチン濃度で顆粒球の遊走が遅くなるのは、アガロース培地内の化学運動性要因²¹ に対する微小管の反応が若干阻害されることを示唆する。顆粒球の化学運動性要因は血清及び血清アルブミン中にあり、血清と寒天の相互作用の結果によるものかもしれない。²²⁻²⁴ アガロース法では血清若しくは血清アルブミンがなければ顆粒球遊走は起こらないので、^{25,26} これらの要因の存在は避けられない。他の研究者も、刺激された顆粒球の不規則遊走がコルヒチンによって阻害されていると報告している。^{3,5,20}

本調査で T 及び B リンパ球の微小管依存性遊走の活性化が認められなかったことは、この現象が起こらないことを必ずしも示すわけではない。含有されていない他の要因が加えられた場合、リンパ球の微小管依存性遊走の活性化が誘発されることは十分可能である。しかし、本調査の結果から、そのような要因

such factors exist they may differ from those which stimulate granulocytes, or if already present, may require different conditions to manifest the effect. This is especially true since direction finding, or chemotaxis, by lymphoblasts appears to be colchicine-sensitive and probably microtubule-dependent,⁷ as with granulocytes.^{3,4,20}

が存在するとすれば、顆粒球を刺激する要因とは異なるものであるかもしれないし、既に含まれていれば、その影響を現すのに異なった条件が必要であるかもしれない。このことは、特にリンパ芽球による遊走方向の決定、すなわち走化性が顆粒球^{3,4,20}の場合と同様にコルヒチンに対して感受性を示し、恐らくは微小管依存性である⁷と思われることから明らかである。

REFERENCES

参考文献

1. RAMSEY WS, HARRIS A: Leucocyte locomotion and its inhibition by antimetabolic drugs. *Exp Cell Res* 82:262-70, 1972
2. CANER JEZ: Colchicine inhibition of chemotaxis. *Arthritis Rheum* 8:757-64, 1965
3. MALECH HL, ROOT RK, GALLIN JI: Structural analysis of human neutrophil migration. Centriole, microtubule, and microfilament orientation and function during chemotaxis. *J Cell Biol* 75:666-93, 1977
4. BANDMANN 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
5. PHELPS P: Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro. 2. Stimulatory effect of monosodium urate crystals and urate in solution; partial inhibition by colchicine and indomethacin. *Arthritis Rheum* 12:189-96, 1969
6. CRISPE IN: The effect of vinblastine, colchicine and hexylene glycol on migration of human monocytes. *Exp Cell Res* 100:443-7, 1976
7. RUSSELL RJ, WILKINSON PC, SLESS F, PARROT DMV: Chemotaxis of lymphoblasts. *Nature* 256:646-8, 1975
8. JARVIS SC, SYNDERMAN R, COHEN HJ: Human lymphocyte motility: Normal characteristics and anomalous behaviour of chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 48:717-29, 1976
9. BOYDEN SV: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115:453-66, 1962
10. PINKSTON JA, FINCH SC, IIDA S, CAPLAN R: An agarose plate method for the study of human T and B lymphocyte migration. *Jpn J Exp Med* 48:279-82, 1978 (RERF TR 1-78)
11. BOYUM A: Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* 4:269-74, 1974
12. GREAVES MF, BROWN G: Purification of human T and B lymphocytes. *J Immunol* 112:420-3, 1974
13. TAYLOR EW: The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. 1. Kinetics of inhibition and the binding of H³-colchicine. *J Cell Biol* 25:145-60, 1965
14. MALAWISTA SE, BENSCH KG: Human polymorphonuclear leukocytes: Demonstration of microtubules and effect of colchicine. *Science* 156:521-2, 1967
15. BHISEY AN, FREED JJ: Ameboid movement induced in cultured macrophages by colchicine or vinblastine. *Exp Cell Res* 64:419-29, 1971

16. PINKSTON JA, FINCH SC: Human T and B lymphocyte migration under agarose: Differences in the characteristics of migrating cells and migration patterns. RERF TR 3-79
17. PENNY R, GALTON DAG, SCOTT JT, EISEN V: Studies on neutrophil function. 1. Physiological and pharmacological aspects. *Br J Haematol* 12:623-32, 1966
18. MALAWISTA SE, BODEL PT: The dissociation by colchicine of phagocytosis from increased oxygen consumption in human leukocytes. *J Clin Invest* 46:786-96, 1967
19. CREASEY WA, BENSCH KG, MALAWISTA SE: Colchicine, vinblastine and griseofulvin. Pharmacological studies with human leukocytes. *Biochem Pharmacol* 20:1579-88, 1971
20. PINKSTON JA, REED R, FINCH SC: Effects of colchicine on human granulocyte random migration and chemotaxis under agarose. RERF TR 8-81
21. KELLER HU, WILKINSON PC, ABERCROMBIE M, BECKER EL, HIRSCH JG, MILLER ME, RAMSEY WS, ZIGMOND SH: A proposal for the definition of terms related to locomotion of leucocytes and other cells. *Clin Exp Immunol* 27:377-80, 1977
22. PINKSTON JA, FINCH SC: The influence of serum factors on the migration of granulocytes under agarose. (To be published)
23. KELLER HU, WISSLER JH, HESS MW, COTTIER H: Distinct chemokinetic and chemotactic responses in neutrophil granulocytes. *Eur J Immunol* 8:1-7, 1978
24. KELLER HU, HESS MW, COTTIER H: The chemokinetic effect of serum albumin. *Experientia* 33/10: 1386-7, 1977
25. NELSON RD, QUIE PG, SIMMONS RL: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol* 115:1650-6, 1975
26. REPO H: Leukocyte migration agarose test for the assessment of human neutrophil chemotaxis. 1. Effects of environmental factors on neutrophil migration under agarose. *Scand J Immunol* 6:203-9, 1977