

BINDING OF N-FORMYL-METHIONYL-LEUCYL-PHENYLALANINE WITH HUMAN
T LYMPHOCYTES, NON-T LYMPHOCYTES, AND MONOCYTES

ヒトTリンパ球、非Tリンパ球及び単球に対する
N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanineの結合

KAZUO SUZUKI, Ph.D. 鈴木和男
SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. 笹川澄子
MARIKO WATANABE, B.S. 渡辺万里子
CHRISTINA SWENSON, B.S.
TOSHIO FUJIKURA, M.D. 藤倉敏夫



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 not 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。業績報告書は通例の誌上发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。その経費は日米両国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。



BINDING OF N-FORMYL-METHIONYL-LEUCYL-PHENYLALANINE WITH HUMAN T LYMPHOCYTES, NON-T LYMPHOCYTES, AND MONOCYTES

ヒトTリンパ球, 非Tリンパ球及び単球に対する
 N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine の結合

KAZUO SUZUKI, Ph.D. (鈴木和男); SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. (笹川澄子);
 MARIKO WATANABE, B.S. (渡辺万里子); CHRISTINA SWENSON, B.S.;
 TOSHIO FUJIKURA, M.D. (藤倉敏夫)

Department of Pathology
 病理部

SUMMARY

It has been reported that chemoattractant N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe) binds with human polymorphonuclear leukocytes (PMN), but its binding with human lymphocytes is about one-tenth of that with PMN. In the present study it was, however, demonstrated that when the concentration of fMet-Leu-Phe and culture time were increased, its binding with human lymphocytes and adherent mononuclear cells was enhanced 100 and 400 times over that with PMN, respectively. The peptide bound with T lymphocytes and non-T lymphocytes. The number of receptors for fMet-Leu-Phe on lymphocytes as determined by Scatchard analysis was 5×10^6 sites per cell and was 50 times greater than that of PMN.

INTRODUCTION

N-formyl-methionyl-leucyl- ^3H phenylalanine (fMet-Leu- ^3H Phe), a chemotactic peptide, binds with human PMN.¹ fMet-Leu-Phe chemotactically attracts PMN^{1,2} and the binding of this peptide with PMN accelerates the liberation of lysosomal enzymes such as lysozyme and β -glucuronidase.^{3,4} On the other hand, the binding of fMet-Leu- ^3H Phe with purified human lymphocytes is low,¹ and this peptide hardly binds with lymphocytes obtained from the guinea big spleen.⁵ Recently the peptide has been reported to enhance locomotion of human lymphocytes.⁶ It has been reported that

要約

走化性物質であるN-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe) はヒト多核白血球 (PMN) に結合するが、ヒトリンパ球への結合はPMNの場合の約10分の1であることが報告されている。本研究においてfMet-Leu-Pheの濃度及び培養時間を増加させると、ヒトリンパ球への結合がPMNの100倍、吸着性単核細胞への結合が400倍に高まることが認められた。このペプチドはTリンパ球及び非Tリンパ球とも結合した。Scatchardプロットにより求めたリンパ球のfMet-Leu-Pheへのリセプター数は 5×10^6 個/細胞でPMNのリセプター数よりも50倍多かった。

緒言

走化性ペプチドであるN-formyl-methionyl-leucyl- ^3H phenylalanine (fMet-Leu- ^3H Phe) はヒトPMNに結合する。¹ PMNはfMet-Leu-Pheに対して走化性を示し、^{1,2} このペプチドがPMNに結合することによってリゾチーム、 β グルクロニダーゼなどのライソゾーム酵素の遊離が促進される。^{3,4} しかし、fMet-Leu- ^3H Pheのヒト精製リンパ球への結合性は低く、¹ モルモットの脾臓から取り出したリンパ球に対してもこのペプチドはほとんど結合しない。⁵ 最近、このペプチドがヒトリンパ球の遊走を高めることが報告された。⁶ fMet-Leu-PheはPMNと同様

fMet-Leu-Phe binds with PMN as well as with human monocyte-like cell strain U937.⁷ When this monocyte-like cell is pretreated with lymphokines, it binds with fMet-Leu-[³H]Phe to accelerate the liberation of lysozyme and β -glucuronidase.⁷ fMet-Leu-[³H]Phe binds with activated macrophages in the abdominal cavity of guinea pigs treated with oyster glycogen and chemotactically attracts these macrophages.⁵ However, it has not yet been demonstrated that fMet-Leu-[³H]Phe can bind with macrophages or monocytes of the human peripheral blood.

The present study was undertaken to determine whether binding of fMet-Leu-[³H]Phe with lymphocytes and adherent mononuclear cells in the human peripheral blood could be detected by increasing the concentration of fMet-Leu-[³H]Phe and by extending the incubation time.

MATERIALS AND METHODS

fMet-Leu-[³H]Phe (46.4 Ci/mmol, New England Nuclear Co., Boston, Massachusetts) and unlabeled fMet-Leu-Phe (Peptide Institute Protein Research Foundation, Osaka, Japan) were purchased. Lymphoprep (Nyegaard Co., Oslo, Norway), a mixture of sodium metrizoate and Ficoll, was used to isolate mononuclear cells and PMN. Dextran T-500 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and RPMI-1640 medium and fetal bovine serum (FBS) (GIBCO Laboratories, New York) were purchased.

Lymphocytes, adherent mononuclear cells, and PMN were prepared from heparinized peripheral blood (20 units/ml blood, 10-20 ml) from healthy human volunteers. Blood was centrifuged on Lymphoprep density gradient using the method of Boyum.⁸ Pellets, containing erythrocytes and PMN, were diluted with 1.5% (w/v) dextran in Hank's balanced salt solution (HBSS); using a volume equal to the original blood volume. The erythrocytes were allowed to settle at an angle of 60° for 45-60 minutes at 4°C. The mononuclear cell fraction obtained from the Lymphoprep gradient and the supernatant containing PMN in dextran were each washed three times with HBSS having a volume three times the original blood volume by centrifugation at 450 × g for 10 minutes at 20°C. The mononuclear cells and PMN were each resuspended in HBSS. To separate the lymphocytes from the adherent mononuclear cells, the mononuclear cells were

ヒト単球様細胞株U937とも結合することが報告されている。⁷ この単球様細胞をあらかじめリンホカインで処理しておく、fMet-Leu-[³H]Pheと結合してリゾチーム及び β -グルクロニダーズの遊離を促進する。⁷ fMet-Leu-[³H]Pheはオイスターグリコゲンで処理したモルモットの腹腔内で活性化マクロファージと結合し、そのマクロファージは走化性を示す。⁵ しかし、fMet-Leu-[³H]Pheがヒト末梢血中のマクロファージや単球と結合することは認められていない。

本研究では、fMet-Leu-[³H]Pheとヒト末梢血中のリンパ球及び吸着性単核球との結合がfMet-Leu-[³H]Pheの濃度及び培養時間を増加させることによって測定できるかどうかを検討した。

材料及び方法

fMet-Leu-[³H]Phe (46.4 Ci/mmol, New England Nuclear Co., Massachusetts 州 Boston 市) と無標識の fMet-Leu-Phe (蛋白質研究奨励会, 大阪) を購入した。メトリゾエートナトリウムと Ficoll の混和溶液であるリンホブレップ (Nyegaard Co., Norway, Oslo 市) は単核細胞と PMN を分離するのに使用した。Dextran T-500 (Pharmacia, Sweden, Uppsala 市) と RPMI-1640 培養液及びウシ胎児血清 (GIBCO 研究所, New York) を購入した。

リンパ球、吸着性単核球及び PMN は健康人から得たヘパリン添加末梢血 (20 単位/ml 血液, 10~20 ml) から調整した。血液は Boyum の方法⁸ を用いてリンホブレップの密度勾配で遠心した。赤血球と PMN を含むペレットは出発血液量と同量の 1.5% (w/v) dextran-Hank 平衡塩類溶液 (HBSS) で希釈した。赤血球は 4°C で 60° に傾け、45~60 分間放置した。リンホブレップ勾配で得られた単核細胞分画及び PMN を含む dextran 中の上清は出発血液量の 3 倍量の HBSS で 3 回、450 × g 10 分間の遠心により 20°C で洗浄した。単核球と PMN をそれぞれ HBSS 中に懸濁した。吸着性単核球からリンパ球を分離するために、

resuspended in RPMI-1640 medium containing 20% heat-inactivated FBS at a concentration of approximately 5×10^6 cells/ml and cultured in a plastic dish (3 cm in diameter, Falcon #3001) in 5% CO_2 at 37°C for two hours, after which the lymphocytes were collected by a transfer pipet. The dish was washed twice with 0.6 ml of the 37°C RPMI-1640 medium. The cells obtained by the wash were combined with the initial collection of lymphocytes. The adherent mononuclear cells were recovered after incubation at 37°C for 30 minutes in 2 mM EDTA in Dulbecco's phosphate-buffered saline. The lymphocytes and adherent mononuclear cells were washed twice with 6 ml of HBSS by centrifugation at $350 \times g$ for 10 minutes at 4°C . Each was resuspended in HBSS. Contamination of monocytes into lymphocytes was less than 1%.

Lymphocyte fraction at concentration of approximately 5×10^6 /ml was mixed with equal volume of 0.1% sheep red blood cells (SRBC) suspended in FBS at 4°C . After centrifuged at $50 \times g$ for five minutes, the mixture was incubated in an ice bath for one hour to make rosette formation. The cell suspension was diluted with HBSS, using a volume equal to the initial suspension. Rosetting cells (T lymphocytes) were separated from nonrosetting cells (non-T lymphocytes) by Lymphoprep gradient. SRBC were eliminated from T lymphocyte fraction by exposure to distilled water (2 ml) for 20 sec. T lymphocytes and non-T lymphocytes were washed three times by 6 ml of HBSS.

For binding assay fMet-Leu- ^3H Phe (34 nM) and cells were incubated in $220 \mu\text{l}$ of HBSS for 17 hours (unless specified otherwise) at 37°C . Unlabeled fMet-Leu-Phe ($50 \mu\text{M}$) was added to the mixture to detect nonspecific binding. The incubation was terminated by vacuum filtration of the mixture through a glass fiber filter. The filters were rapidly washed for 30 sec, twice with 0.9% saline, dried, and placed into scintillation vials. Soluene-350 0.15 ml, was added to the vials. After one hour, 5 ml of scintillation cocktail containing 0.4% 2,5-diphenyloxazole and 0.01% 1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene in toluene was added and the vials were counted. Specific binding was defined as the total amount of fMet-Leu- ^3H Phe bound minus the non-specific binding. Values of binding in all figures and tables refer to specific binding. Each sample was assayed in triplicate.

20%の熱非動化 FBS を含む RPMI-1640 に単核細胞を約 5×10^6 細胞/ml の濃度で再懸濁し、プラスチックシャーレ (直径 3 cm, Falcon #3001) に入れた。5% CO_2 37°C の条件で 2 時間培養した後リンパ球をピペットで集めた。プラスチックシャーレは 37°C の RPMI-1640 培養液 0.6 ml で 2 回洗った。洗浄によって得られた細胞は最初に集めたリンパ球と合わせた。吸着した細胞は Dulbecco のリン酸緩衝生理食塩水に溶かした 2 mM EDTA を加えて 37°C で 30 分間保温した後回収した。リンパ球と吸着単核細胞は 6 ml の HBSS を使い、 $350 \times g$, 10 分間、 4°C で遠心し、2 回洗浄した。それぞれ HBSS に再懸濁した。単球のリンパ球への混入は 1% 未満であった。

約 5×10^6 /ml の濃度のリンパ球分画を 4°C で、FBS 中に懸濁した同量の 0.1% のヒツジ赤血球 (SRBC) と混合した。混合液を $50 \times g$ で 5 分間遠心した後、氷槽で 1 時間培養してロゼットを形成させた。細胞懸濁液を出発懸濁液と同量の HBSS で希釈した。リンホブレップ密度勾配法を用いてロゼット細胞 (T リンパ球) と非ロゼット細胞 (非 T リンパ球) を分離した。蒸留水 (2 ml) に 20 秒間当てて SRBC を T リンパ球分画から排除した。T リンパ球と非 T リンパ球をそれぞれ 6 ml の HBSS で 3 回洗浄した。

fMet-Leu- ^3H Phe (34 nM) と細胞は $220 \mu\text{l}$ の HBSS 中で 17 時間 (特定しなければ) 37°C で培養した。非特異的結合を探知するために無標識の fMet-Leu-Phe ($50 \mu\text{M}$) を混合液中に加えた。グラスファイバー濾紙で吸引濾過することによって培養を終了させた。濾紙は 0.9% 食塩水で 30 秒間 2 回急速洗浄し、乾燥させ、シンチレーション・バイアル中に入れた。0.15 ml の Soluene-350 を加えた。1 時間後、0.4% の 2,5-ジフェニルオキサゾールと 0.01% の 1,4-ビス [2-(5-フェニルオキサゾイル)]-ベンゼンをトルエン中に含むシンチレーションカクテルを加え、バイアルをカウントした。特異結合は fMet-Leu- ^3H Phe の総結合量から非特異結合を差し引いたものとした。すべての図表中の結合値は、特異結合で示されている。各サンプルは 3 点ずつ測定した。

TABLE 1 fMet-Leu-[³H] Phe BINDING WITH LEUKOCYTES
 表1 fMet-Leu-[³H] Phe の白血球との結合

Cell	Number of Samples	Number of Cells × 10 ⁵	Binding Activity (fmol) Mean ± SE
Lymphocytes	17	2	61.0 ± 7.2
Adherent Mononuclear	10	2	255.0 ± 33.0
Mononuclear*	18	2	94.0 ± 7.6
PMN	17	2	0.6 ± 0.4
	15	4	3.8 ± 1.2
	4	8	10.7 ± 5.9
	10	20	17.7 ± 5.9

*Lymphocytes + Adherent Mononuclear Cells リンパ球+吸着性単核球

RESULTS

An appropriate number of cells were cultured with fMet-Leu-[³H]Phe to determine whether fMet-Leu-[³H]Phe would bind with lymphocytes and adherent mononuclear cells in human peripheral blood. The binding of fMet-Leu-[³H]Phe with both lymphocytes and adherent mononuclear cells was observed (Table 1). Comparison of the binding activity per 2×10^5 cells with lymphocytes and PMN shows that binding was approximately 100 times higher with lymphocytes than with PMN. Similarly, binding with adherent mononuclear cells was approximately 4 times higher than that with lymphocytes, and 400 times higher than that with PMN. At the peptide concentration of 34 nM, adherent mononuclear cells showed greater binding per 2×10^5 cells than lymphocytes, this being followed by PMN.

Since the greater binding of fMet-Leu-[³H]Phe with lymphocytes and adherent mononuclear cells than with PMN was assumed to be related to culture time, lymphocytes and PMN were cultured for 1 hour and 17 hours, respectively, and the binding for each time period was examined. In the 17-hour culture, binding of this peptide with lymphocytes was found to be 14.4 times higher than that in the 1-hour culture, with adherent mononuclear cells being 19.9 times higher and with total mononuclear cells 21.3 times higher (Table 2). No clear difference in the binding with 2×10^5 PMN could be detected between 17-hour and 1-hour cultures, but an increment in binding with PMN was observed

結果

ヒト末梢血中のリンパ球及び吸着性単核球に fMet-Leu-[³H]Phe が結合するか否かを検討するために適当量の細胞を fMet-Leu-[³H]Phe の存在下で培養した。リンパ球と吸着性単核球の双方とも fMet-Leu-[³H]Phe と結合した(表1)。 2×10^5 細胞当たりのリンパ球と PMN の結合を比較すると、リンパ球への結合は PMN への結合のおよそ100倍であった。同様に、吸着性単核球の結合はリンパ球よりも約4倍、PMN よりも400倍高かった。34nM のペプチド濃度では、吸着性単核球は 2×10^5 細胞当たりの結合がリンパ球より高く、PMN が2番目に高い結合を示した。

リンパ球及び吸着性単核球の fMet-Leu-[³H]Phe への結合が PMN よりも高いのは培養時間と関係があると考えられたので、リンパ球と PMN をそれぞれ1時間及び17時間培養し、各時間における fMet-Leu-[³H]Phe の結合について検討した。リンパ球においてはこのペプチドの結合は17時間培養では1時間培養の約14.4倍、吸着性単核球では約19.9倍、総単核球では21.3倍であった(表2)。PMN (2×10^5 細胞)においては17時間培養と1時間培養による明らかな差は見られなかったが、細胞数と培養時間

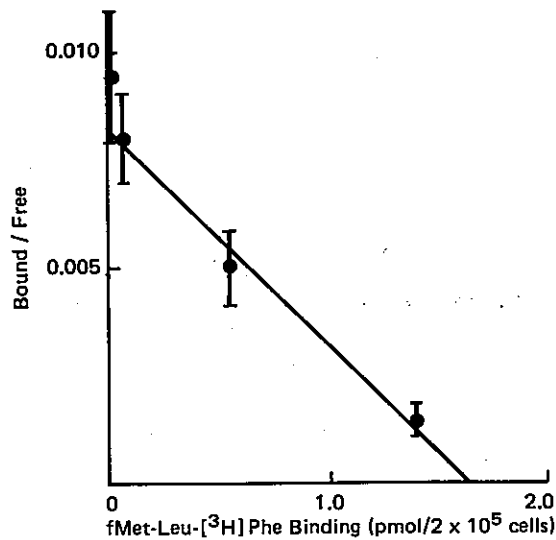


Figure 1. Scatchard analysis of fMet-Leu- $[^3\text{H}]$ Phe binding with human lymphocytes. The equilibrium dissociation constant (K_D) and number of receptor sites per cell were calculated from the slope and x-intercept, respectively.

図1 fMet-Leu- $[^3\text{H}]$ Phe のヒトリンパ球との結合の Scatchard プロット。平衡解離定数 (K_D) は傾きから、細胞 1 個当たりのリセプター数は X 切片からそれぞれ計算した。

TABLE 2 fMet-Leu- $[^3\text{H}]$ Phe BINDING WITH LEUKOCYTES OVER INCUBATION TIME
表 2 fMet-Leu- $[^3\text{H}]$ Phe の培養時間による白血球との結合

Cell	Number of Samples	Number of Cells $\times 10^5$	Binding Activity (fmol) Mean \pm SE	
			1 hour	17 hours
Lymphocytes	6	2	4.1 \pm 1.4	59.0 \pm 11.4
Adherent Mononuclear	5	2	11.0 \pm 2.2	219.0 \pm 40.0
Mononuclear	6	2	4.7 \pm 1.2	100.0 \pm 19.1
PMN	6	2	Not detectable	
	6	4	3.6 \pm 0.8	2.2 \pm 1.3
	4	20	6.6 \pm 3.1	23.2 \pm 14.6

by increasing the number of cells and by extending the culture period (Table 2).

The number of receptors per lymphocyte and dissociation constant (K_D) were calculated by Scatchard analysis (Figure 1).⁹ The number of receptors on lymphocytes in the peripheral blood was 5×10^6 per cell and the value of K_D was 9×10^{-7} M.

を増加することによって結合の増加が見られた (表 2)。

リンパ球 1 個当たりのリセプター数と解離定数 (K_D) は Scatchard プロット⁹ により求めた (図 1)。末梢血リンパ球 1 個当たりのリセプター数は 5×10^6 で、 K_D 値は 9×10^{-7} M であった。

TABLE 3 fMet-Leu-[³H] Phe BINDING WITH T AND NON-T LYMPHOCYTES
表3 fMet-Leu-[³H] Phe のTリンパ球及び非Tリンパ球との結合

Cell	Number of Samples	Number of Cells × 10 ⁵	Binding Activity (fmol) Mean ± SE
T Lymphocytes	4	2	8.6 ± 4.8
Non-T Lymphocytes	4	2	101.1 ± 40.1

TABLE 4 fMet-Leu-[³H] Phe BINDING AT LOW CONCENTRATIONS WITH LYMPHOCYTES AND MONONUCLEAR CELLS

表4 fMet-Leu-[³H] Phe の低濃度におけるリンパ球及び単核球との結合

Cell	Number of Samples	Number of Cells × 10 ⁵	Concentration (nM)	Binding Activity (fmol) Average
Lymphocytes	2	2	4.3	12
			8.5	27
Mononuclear	2	2	4.3	10
			8.5	22

On the other hand, binding of fMet-Leu-[³H] Phe with human T lymphocytes and non-T lymphocytes was examined. The peptide bound approximately 10 times higher with non-T lymphocytes than with T lymphocytes (Table 3).

DISCUSSION

It was observed in this study that fMet-Leu-[³H] Phe bound with lymphocytes and adherent mononuclear cells in the human peripheral blood. These binding activities were higher than that of PMN. According to Williams et al.¹ the binding of mononuclear cells was 29% that of PMN (per mg of protein) and the binding of purified lymphocytes was reduced to 11% that of PMN. However, from Table 4, it was estimated that the binding of lymphocytes with fMet-Leu-[³H] Phe is 10-20 fmol/2 × 10⁵ cells at the concentration of about 6 nM which Williams et al used. From Tables 2 and 4, the activity can be calculated to be 1 fmol/2 × 10⁵ lymphocytes in 1-hour culture and this value is consistent with that reported by Williams et al.¹ These results indicate that fMet-Leu-[³H] Phe can bind with lymphocytes and adherent mononuclear cells by increasing the fMet-Leu-[³H] Phe concentration and by extending the culture time. We,

一方, fMet-Leu-[³H] Phe のヒトTリンパ球と非Tリンパ球への結合も調べた。このペプチドの非Tリンパ球への結合は, Tリンパ球への結合よりも約10倍高かった(表3)。

考 察

本研究において, fMet-Leu-[³H] Phe がヒト末梢血中のリンパ球及び吸着性単核球に結合することが観察された。この結合活性はPMNの結合活性よりも高い値を示した。Williamsら¹は, 単核球がPMNの29%しか結合せず(mg蛋白質当たり), 精製リンパ球はPMNの11%しか結合しなかったと報告した。しかし, 表4から, fMet-Leu-[³H] Phe の濃度をWilliamsらの用いた約6nMにした場合, リンパ球の結合は10~20fmol/2 × 10⁵リンパ球と推定された。表2及び4から, 1時間培養での結合活性は1fmol/2 × 10⁵リンパ球となり, この数値はWilliamsら¹の報告と一致する。これらの結果は, fMet-Leu-[³H] Phe の濃度を増加させ, 培養時間を増加させれば, リンパ球及び吸着性単核球にfMet-Leu-[³H] Phe が結合し得ることを示している。したがって,

therefore, assume that the difference between the conclusion reported by Williams et al and those of the present study is attributable to the increase in fMet-Leu-[³H]Phe concentration and culture time.

fMet-Leu-[³H]Phe bound with both T lymphocytes and non-T lymphocytes (Table 3). These results strongly suggest a close relationship to the recent observation that fMet-Leu-Phe enhances the locomotion of human lymphocytes.⁶ From the foregoing relationship between lymphocytes and fMet-Leu-Phe, it can be readily assumed that this peptide acts as a chemotactic peptide to lymphocytes as well.

Binding of fMet-Leu-[³H]Phe with PMN increased with increasing number of cells in both 1-hour and 17-hour cultures. The binding with 20×10^5 PMN in 17-hour culture was several times higher than that in 1-hour culture. These results suggest that this increment of the binding activity with culture time is due to fMet-Leu-[³H]Phe incorporation into the cells. Abita and Morgat¹⁰ have reported that when fMet-Leu-Phe is bound with PMN and washed in a medium at 37°C, the remaining amount of fMet-Leu-Phe is slightly greater than the nonspecific binding, suggesting a certain amount of the peptide is incorporated into the cells.

The number of binding sites for fMet-Leu-[³H]Phe on PMN was approximately 1×10^5 per cell in 17-hour culture. This value is within the range of 2,000-250,000 reported by Snyderman and Pike.¹¹ The number of binding sites on lymphocytes was 5×10^6 as shown in Figure 1, indicating that affinity of lymphocytes for fMet-Leu-[³H]Phe was less than that of PMN. This is in agreement with the findings of Williams et al¹ that binding activity in the purified lymphocytes preparation was too low to characterize and could be due to low affinity binding.

Snyderman and Fudman⁵ have demonstrated the binding activity of fMet-Leu-[³H]Phe using inflammatory macrophages of guinea pigs. fMet-Leu-[³H]Phe is also known to bind with cell strain U937 activated with lymphokines.⁷ However, binding of macrophages with fMet-Leu-[³H]Phe in the peripheral blood has not been reported. The present study demonstrated that fMet-Leu-[³H]Phe bound with adherent

Williams らの報告した結論と本研究の結論が異なるのは fMet-Leu-[³H]Phe の濃度と培養時間の増加によるものと推測される。

fMet-Leu-[³H]Phe は Tリンパ球と非 Tリンパ球のいずれとも結合した (表 3)。この結果は、fMet-Leu-Phe がヒトリンパ球の遊走を増加させるという最近の観察所見⁶ との密接な関係を強く示唆している。リンパ球と fMet-Leu-Phe のこの関係から、このペプチドがリンパ球にも同様に走化性ペプチドとして作用することが容易に推測できる。

PMN においては 1 時間培養、17 時間培養ともに、fMet-Leu-[³H]Phe の結合は細胞数の増加とともに上昇した。 20×10^5 の PMN においては 17 時間培養が 1 時間培養よりも数倍結合が高く、これは、培養時間の増加に伴う結合活性の増加が、fMet-Leu-[³H]Phe の細胞への取り込みによることを示唆している。Abita と Morgat¹⁰ は、fMet-Leu-Phe を PMN と結合させて、37°C の培養液中で洗浄した場合、fMet-Leu-Phe の残余量が非特異的結合よりも若干高く、これはこのペプチドが若干量細胞中に取り込まれることを示唆していると報告している。

17 時間培養から求めた細胞当たりの PMN の fMet-Leu-[³H]Phe の結合部位数は約 1×10^5 個であり、この値は Snyderman と Pike¹¹ の報告した 2,000 ~ 250,000 の幅のうちに入る。リンパ球のリセプター数は図 1 に示したように 5×10^6 個であり、リンパ球の fMet-Leu-[³H]Phe に対する親和性は PMN より小さいことを示している。これは、精製リンパ球標本における結合活性が非常に低いために特性を調べることができない。すなわち低親和性結合によるものであろうとする Williams ら¹ の所見と一致する。

Snyderman と Fudman⁵ はモルモットの炎症性マクロファージを用いて fMet-Leu-[³H]Phe の結合活性を示した。また、U937 細胞株もリンホカインで活性化すると fMet-Leu-[³H]Phe が結合することが知られている。⁷ しかしながら、末梢血中のマクロファージの fMet-Leu-[³H]Phe との結合については報告されていない。本研究においては、fMet-Leu-[³H]Phe がヒト末梢血中のリンパ球だけでなく、

mononuclear cells (probably activated macrophages) as well as with lymphocytes in the human peripheral blood.

吸着性単核球(恐らく活性化していると思われるマクロファージ)とも結合することが明らかとなった。

REFERENCES

参考文献

1. WILLIAMS LT, SNYDERMAN R, PIKE MC, LEFKOWITZ RJ: Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1204-8, 1977
2. SHOWELL HJ, FREER RJ, SINGMOND SH, SCHIFFMAN E, ASWANIKUMAR S, CORCORAN B, BECKER EL: The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils. *J Exp Med* 143:1154-69, 1976
3. GOLDSTEIN I, HOFFSTEIN S, GALLIN J, WEISSMANN G: Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes: microtubule assembly and membrane fusion induced by a component of complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:2916-20, 1973
4. SALLY HZ: Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* 75:606-16, 1977
5. SNYDERMAN R, FUDMAN EJ: Demonstration of a chemotactic factor receptor on macrophages. *J Immunol* 124:2754-7, 1980
6. EL-NAGGAR AK, VAN EPPS DE, WILLIAMS RC Jr: Human B- and T-lymphocyte locomotion in response to casein, C5a, and f-Met-Leu-Phe. *Cell Immunol* 56:365-73, 1980
7. PIKE MC, FISCHER DG, KOREN HS, SNYDERMAN R: Development of specific receptors for N-formylated chemotactic peptides in a human monocyte cell line stimulated with lymphokines. *J Exp Med* 152:31-40, 1980
8. BOYUM A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest* 21:(Suppl)97:7, 1968
9. SCATCHARD G: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:660, 1949
10. ABITA JP, MORGAT JL: On the mechanism of human polymorphonuclear leukocyte deactivation of chemotaxis by the synthetic peptide formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *FEBS Lett* 111:14-8, 1980
11. SNYDERMAN R, PIKE MC: N-formylmethionyl peptide receptors on equine leukocytes initiate secretion but not chemotaxis. *Science* 209:493-5, 1980