

SUPPRESSION AND RECOVERY OF LYSOSOMAL ENZYME RELEASE AND  
SUPEROXIDE ANION PRODUCTION FROM HUMAN POLYMORPHONUCLEAR  
LEUKOCYTES AFTER EXPOSURE TO *N*-FORMYL-METHIONYL-LEUCYL-  
PHENYLALANINE: RECOVERY OF SENSITIVITY TO CYTOCHALASIN B

*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine 処理によるヒト多形核  
白血球のライソゾーム酵素放出とスーパーオキシド産生の  
抑制と回復: サイトカラシン B に対する感受性の回復

KAZUO SUZUKI, Ph.D. 鈴木和男

TATSUICHIRO SAKATANI, M.D. 坂谷達一郎

SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. 笹川澄子

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 TR 18-83

## ACKNOWLEDGMENT

### 謝 辞

Appreciation is expressed to Dr. Anthony V. Pisciotta, Vice-Chairman, RERF, and Dr. Ryoji Matsuura, Department of Pediatrics, Hiroshima University School of Medicine, for their kind guidance and assistance throughout this study.

この研究を通じて御指導，御助力いただいた Anthony V. Pisciotta 放影研副理事長及び広島大学医学部小児科学教室の松浦良二博士に謝意を表する。

## 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，日米研究職員，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もので，その経費は日米両政府の平等分担により，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運営されている。

**SUPPRESSION AND RECOVERY OF LYSOSOMAL ENZYME RELEASE AND  
SUPEROXIDE ANION PRODUCTION FROM HUMAN POLYMORPHONUCLEAR  
LEUKOCYTES AFTER EXPOSURE TO *N*-FORMYL-METHIONYL-LEUCYL-  
PHENYLALANINE: RECOVERY OF SENSITIVITY TO CYTOCHALASIN B**

*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine 処理によるヒト多形核  
白血球のライソゾーム酵素放出とスーパーオキシド産生の  
抑制と回復: サイトカラシン B に対する感受性の回復

KAZUO SUZUKI, Ph.D. (鈴木和男)<sup>1</sup>; TATSUICHIRO SAKATANI, M.D. (坂谷達一郎)<sup>1,2</sup>;  
SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. (笹川澄子)<sup>1</sup>; TOSHIO FUJIKURA, M.D. (藤倉敏夫)<sup>1</sup>

*Departments of Pathology<sup>1</sup> and Medicine<sup>2</sup>*

病理部<sup>1</sup> 及び臨床部<sup>2</sup>

**SUMMARY**

With the simultaneous addition of *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe) and cytochalasin B to polymorphonuclear leukocytes (PMN), release of lysosomal enzymes, including myeloperoxidase (MPO),  $\beta$ -glucuronidase, and lysozyme, and production of superoxide anion ( $O_2^-$ ) were induced. However, when PMN were exposed to fMet-Leu-Phe prior to cytochalasin B exposure, the activity was low and then gradually increased with extension of exposure time to fMet-Leu-Phe. The enzyme release was lowest when the exposure time was 15-30 sec, it being less than 50% of the initial level resulting when both reagents were added simultaneously. The time required for the decreased value to recover to more than 90% of the initial level was five minutes for MPO, and three minutes each for  $\beta$ -glucuronidase and lysozyme. Since the recovery of the experimentally reduced enzyme release was significantly inhibited by  $10^{-4}$  M colchicine pretreatment, it is suggested that the recovery may be influenced by the behavior of microtubules. When PMN were exposed in advance to fMet-Leu-Phe, velocity of  $O_2^-$  production, which is determined by the reduction of cytochrome c, decreased. Its recovery pattern was similar to that for the enzyme release recovery. These results indicate

**要約**

多形核白血球 (PMN) は *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe) と サイトカラシン B の同時添加によりライソゾーム酵素; ミエロペーオキシダーゼ (MPO),  $\beta$  グルクロニダーゼ, リゾチームの放出並びにスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 産生が誘発された。しかし, PMN に サイトカラシン B を添加する以前に fMet-Leu-Phe で 暴露するとこれらの活性は低く, 暴露時間が延びると次第に増加した。酵素放出の値は fMet-Leu-Phe の暴露時間が 15-30 秒では最低値を示し, 両薬剤同時添加の場合最初の値と比較して 50% 以下であった。減少した値が 90% 以上に回復するのに要する時間は MPO では 5 分,  $\beta$  グルクロニダーゼで 3 分, リゾチームで 3 分であった。この酵素放出の低下の解除が  $10^{-4}$  M コルヒチン処理で有意に阻害されたので, この解除に微小管の動態が関与していることが示唆される。また, シトクロム c の還元により測定した  $O_2^-$  産生の速度も, あらかじめ PMN を fMet-Leu-Phe に 暴露すると酵素放出同様の低下と回復が認められた。これら

that when PMN are exposed in advance to fMet-Leu-Phe, sensitivity to cytochalasin B is decreased once and recovers again. It had been reported that sensitivity to cytochalasin B in PMN, pretreated with fMet-Leu-Phe, remains inhibited and cannot be recovered. But this study proved that inhibited sensitivity can be recovered. This strongly suggests that PMN, exposed once to chemoattractants while migrating in an inflammatory site, can recover its function adequately.

## INTRODUCTION

When stimulated by chemotactic factors, PMN migrate to inflammatory sites, where phagocytosis and bacteria killing take place. During phagocytosis, PMN release lysosomal enzymes and consume oxygen rapidly. Consumed oxygen is primarily changed into oxygen radicals.  $O_2^-$ , one of these oxygen radicals, and lysosomal enzymes are able to kill invaders such as bacteria, fungi, and viruses.<sup>1-8</sup> Moreover, it is assumed that MPO oxidizes and damages the surface of bacteria in the presence of  $H_2O_2$  and halides.<sup>9,10</sup>

Chemotactic peptides such as fMet-Leu-Phe induce in vitro migration of PMN.<sup>11-14</sup> In the presence of cytochalasin B, fMet-Leu-Phe is known to induce  $O_2^-$  production and lysosomal enzyme release from PMN.<sup>15-17</sup> Cytochalasin B is believed to convert PMN into secretagogous cells.<sup>17</sup>

However, when PMN in vitro are stimulated in advance by chemotactic factors, the addition of cytochalasin B does not induce enzyme release and  $O_2^-$  production. In other words, prior exposure of PMN to chemotactic factors decreases its sensitivity to cytochalasin B. This phenomenon, designated as "desensitization", was first reported by Henson et al<sup>18</sup> in the study of lysosomal enzyme release by C5a. Subsequently, Showell et al<sup>19</sup> confirmed this for lysosomal enzyme release by fMet-Leu-Phe. Kitagawa et al<sup>20</sup> and Kitagawa and Takaku<sup>21</sup> also confirmed the development of desensitization in  $O_2^-$  production. If this phenomenon occurs generally, it is difficult for  $O_2^-$  production and lysosomal enzyme release from PMN to develop in inflammatory sites. Recently, they have reported that prior exposure of PMN to fMet-Phe suppresses  $O_2^-$  production, but the suppression can be removed by applying concanavalin A or wheat germ agglutinin.

の結果はPMNがあらかじめfMet-Leu-Pheに暴露されるとサイトカラシンBに対する感受性が低下するが、再びその感受性が回復することを示している。あらかじめfMet-Leu-Pheで処理したPMNはサイトカラシンBに対する感受性が抑制されたままで回復しないとこれまで報告されてきたが、本研究において、抑制された感受性は回復することが明らかとなった。このことは炎症局所で遊走中にいったん走化性物質で暴露されたPMNが十分機能を発揮できることを強く示唆している。

## 緒言

PMNは走化因子によって刺激されると炎症部位へ遊走し、食作用及び殺菌を行う。食作用中にPMNはライソゾーム酵素を放出し、急速に酸素を消費する。消費された酸素は主にラジカル酸素に変わる。これらのラジカル酸素のうちの一つである $O_2^-$ 及びライソゾーム酵素はバクテリア、菌類及びウイルスのような侵入物に対し殺傷能力がある。<sup>1-8</sup>更に、MPOは過酸化水素やハロゲン化物の存在下ではバクテリアの表面を酸化し、損傷する。<sup>9,10</sup>

fMet-Leu-Pheのような走化ペプチドはPMNの試験管内遊走を誘発する。<sup>11-14</sup>fMet-Leu-PheはサイトカラシンBの存在下ではPMNからの $O_2^-$ の産生及びライソゾーム酵素放出を誘発することが知られている。<sup>15-17</sup>すなわちサイトカラシンBはPMNを分泌細胞に変えようと考えられている。<sup>17</sup>

しかしながら、PMNを試験管内であらかじめ走化因子で刺激した場合、サイトカラシンBを添加しても酵素放出及び $O_2^-$ 産生を誘発しない。換言すれば、PMNを走化因子にあらかじめ暴露しておくことPMNのサイトカラシンBに対する感受性が低下する。"脱感作"と呼ばれるこの現象は、C5aによるライソゾーム酵素放出の研究において最初にHensonら<sup>18</sup>によって報告された。その後、Showellら<sup>19</sup>は、fMet-Leu-Pheによるライソゾーム酵素放出でこのことを確認した。Kitagawa<sup>20</sup>ら及びKitagawaとTakaku<sup>21</sup>も $O_2^-$ 産生における脱感作の発現を確認した。この現象が一般的に起こった場合、 $O_2^-$ の産生及びPMNからのライソゾーム酵素放出が炎症部位において発生することは困難である。最近になって、彼らはPMNをあらかじめfMet-Pheに暴露しておくこと $O_2^-$ の産生が抑制されるが、その抑制はコンカナバリンA又は小麦胚芽凝集素を添加すれば解除されると報告している。したがって、脱感作

Therefore, it is necessary to investigate the conditions for desensitization and for its recovery.

The suppression and recovery of both lysosomal enzyme release and velocity of  $O_2^-$  production by prior exposure of PMN to fMet-Leu-Phe are reported here.

## MATERIALS AND METHODS

fMet-Leu-Phe was purchased from Protein Research Foundation, Osaka. 4-Methylumbelliferone and 4-methylumbelliferyl-B-D-glucuronide (Koch-Light Laboratories Ltd., England) were dissolved with ethylene glycol monomethylether. Cytochalasin B, cytochrome c, and dried *Micrococcus lysodeikticus* were purchased from Sigma Chemical, St. Louis. Dextran (MW 200,000; Nakarai Co., Kyoto) was dissolved with Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS). Human placental lysozyme (The Green Cross Corporation, Osaka) was used as a standard.

**Preparation of PMN.** After 20 U/ml of healthy peripheral blood was heparinized, PMN were obtained in the same procedure as reported previously.<sup>22</sup> A PMN concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml of Hank's balanced salt solution (HBSS) was employed.

**Prior Exposure of PMN to fMet-Leu-Phe and Enzyme Release.** After 200  $\mu$ l of PMN suspension was prewarmed at 37°C for 10 minutes, 2  $\mu$ l of  $10^{-3}$  M fMet-Leu-Phe was added to the suspension. Subsequently, 2.5  $\mu$ g/ml of cytochalasin B was added, varying the time of addition from 0 to 15 minutes. MPO,  $\beta$ -glucuronidase, and lysozyme were released during incubation at 37°C for three minutes following the addition of cytochalasin B. The release of MPO,  $\beta$ -glucuronidase, and lysozyme reached a plateau in two minutes and, with a 3-minute incubation, conditions were stable for its release. The plastic tube containing the PMN suspension was immersed in ice for approximately 10 sec. Immediately, the suspension was centrifuged at  $1,500 \times g$  at 4°C for one minute to obtain its supernatant and cell pellet. The pellet was preserved at -20°C before homogenization. The cell pellet was homogenized with 0.1% Triton X-100 contained in HBSS. The homogenate was used for MPO assay. The remaining homogenate was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 20 minutes at 4°C and the

及びその回復のための条件を研究することが必要である。

本報では、PMNのfMet-Leu-Pheでの前処理によるライソゾーム酵素放出及び $O_2^-$ 産生速度の抑制及び回復について述べる。

## 材料及び方法

fMet-Leu-Pheは蛋白質研究奨励会(大阪)から購入し、4-methylumbelliferone及び4-methylumbelliferyl-B-D-glucuronide(英国Koch-Light研究所)をethylene glycol monomethyletherに溶解した。サイトカラシンB、シトクロムc及び乾燥*Micrococcus lysodeikticus*はSigma Chemical社(St Louis)から購入した。Dextran(MW 200,000; 半井化学薬品, 京都)をDulbecco 燐酸緩衝食塩水(PBS)で溶解した。リゾチーム標準品としてヒト胎盤由来のもの(ミドリ十字社, 大阪)を用いた。

**PMNの作成.** 健康な末梢血20U/mlにヘパリン添加した後、前報と同様の手順でPMNを得た。<sup>22</sup> PMN濃度は $2 \times 10^6$ 個/ml Hank平衡化塩類溶液(HBSS)を用いた。

**PMNのfMet-Leu-Pheでの前処理及び酵素放出.** PMN浮遊液200 $\mu$ lを37°Cで10分間加温後、 $10^{-3}$  M fMet-Leu-Phe 2 $\mu$ lを添加した。次に2.5 $\mu$ g/mlのサイトカラシンBを添加するまでの時間を0~15分間までと変えて添加した。サイトカラシンBを添加し37°Cで3分間加温後、MPO、 $\beta$ グルクロニデース及びリゾチームを放出させた。それらの放出は2分間で一定値に達し、3分間加温すると放出状態が安定した。PMN浮遊液を入れたプラスチックチューブを約10秒間氷中に漬けた。その直後に浮遊液を4°C、 $1,500 \times g$ で1分間遠心し、上清液と細胞ペレットを得た。ホモジナイズするまでペレットは-20°Cに保存した。細胞ペレットは、0.1% Triton X-100を含むHBSSでホモジナイズした。そのホモジネートをMPOアッセイに用いた。残りのホモジネートを4°C、 $10,000 \times g$ で20分間遠心

supernatant was used for  $\beta$ -glucuronidase and lysozyme assay. MPO,  $\beta$ -glucuronidase, and lysozyme were assayed by the methods described previously.<sup>22,23</sup>

**Prior Exposure of PMN to fMet-Leu-Phe and  $O_2^-$  Production.** The method of  $O_2^-$  production was essentially the same as that of Kitagawa et al.<sup>20</sup> After 500  $\mu$ l of PMN suspension was put into a plastic cuvette and prewarmed at 37°C for 10 minutes, 430  $\mu$ l of HBSS and 50  $\mu$ l of 1.32 mM cytochrome c were added to the suspension. After adding 10  $\mu$ l of  $10^{-3}$  M fMet-Leu-Phe, 10  $\mu$ l of 2.5  $\mu$ g/ml of cytochalasin B was added between 0 and 15 minutes later.

**Colchicine Treatment.** Before exposing PMN to fMet-Leu-Phe, colchicine or lumicolchicine was added to the PMN suspension, and pre-warming the PMN suspension was begun to observe the colchicine effects. Lumicolchicine was prepared by the method of Wilson and Friedkin.<sup>24</sup> Colchicine ( $10^{-2}$  M, 1 ml) dissolved with 95% ethanol was placed in a quartz cuvette under ultraviolet source (Toshiba GL-15). Completion of the reaction was determined by ultraviolet spectra.

## RESULTS

**Recovery of Sensitivity to Cytochalasin B on Lysosomal Enzyme Release.** After prior exposure of PMN to fMet-Leu-Phe for a given time, cytochalasin B was added to the PMN to release lysosomal enzymes. The activities of released MPO,  $\beta$ -glucuronidase, and lysozyme changed with the time of exposure to fMet-Leu-Phe prior to the addition of cytochalasin B (Figures 1A-C). MPO release showed a minimum value by a 15-sec fMet-Leu-Phe treatment and recovered after 2-minute treatment (Figure 1A).  $\beta$ -Glucuronidase release also showed a minimum value by a 15-sec treatment and recovered after three minutes (Figure 1B). The profile of lysozyme release was similar to that of  $\beta$ -glucuronidase release, reflecting the recovery of the sensitivity (Figure 1C). The recovery level of MPO release was lower than that following simultaneous addition of fMet-Leu-Phe and cytochalasin B, although the recovery for  $\beta$ -glucuronidase release exceeded that following simultaneous addition. Inversely, the recovery rate for MPO release was faster than that for  $\beta$ -glucuronidase or lysozyme. Within one minute of prior exposure of fMet-Leu-Phe, the release

し、上清液は $\beta$ グルクロニデース及びリゾチームのアッセイに用いた。MPO,  $\beta$ グルクロニデース及びリゾチームのアッセイを前報で述べた方法で行った。<sup>22,23</sup>

PMNのfMet-Leu-Pheでの前処理及び $O_2^-$ の産生。 $O_2^-$ の産生方法はKitagawaら<sup>20</sup>の方法と本質的には同一である。PMN浮遊液500 $\mu$ lをプラスチックのキュベットに入れ、37°Cで10分間加熱後、HBSS 430 $\mu$ l及び1.32mMシトクロムc 50 $\mu$ lをその浮遊液に添加した。10<sup>-3</sup>MのfMet-Leu-Phe 10 $\mu$ lを添加した後、2.5 $\mu$ g/mlのサイトカラシンB 10 $\mu$ lを0~15分後に添加した。

コルヒチン処理。PMNをfMet-Leu-Pheに暴露する前に、コルヒチン又はルミコルヒチンをPMN浮遊液に添加し、PMN浮遊液を暖めてコルヒチンの効果を観察した。Wilson及びFriedkin法<sup>24</sup>によりルミコルヒチンを作成した。95%エタノールで溶解したコルヒチン(10<sup>-2</sup>M, 1ml)を紫外線源(東芝GL-15)下で石英キュベットに入れた。紫外線スペクトルで反応終了を決定した。

## 結 果

ライソゾーム酵素放出におけるサイトカラシンBへの感受性の回復。PMNをあらかじめ一定時間fMet-Leu-Pheに暴露した後、サイトカラシンBを添加するとライソゾーム酵素が放出された。放出されたMPO,  $\beta$ グルクロニデース及びリゾチームの活性は、サイトカラシンB添加前のfMet-Leu-Pheへの暴露時間によって変化した(図1A-C)。MPOの放出はfMet-Leu-Pheで15秒間処理したときに最低値を示し、2分間処理すると回復した(図1A)。 $\beta$ グルクロニデースの放出も15秒間処理したときに最低値を示し、3分間の処理後に回復した(図1B)。リゾチームの放出の様子も $\beta$ グルクロニデースのものと類似しており感受性の回復を反映していた(図1C)。 $\beta$ グルクロニデースの放出の回復レベルは同時添加でのレベル以上であったが、MPOの放出の回復レベルはfMet-Leu-PheとサイトカラシンBの同時添加でのレベルよりも低かった。反対に、MPO放出の回復率は $\beta$ グルクロニデースやリゾチームの場合よりも早かった。fMet-Leu-Pheに暴露してから

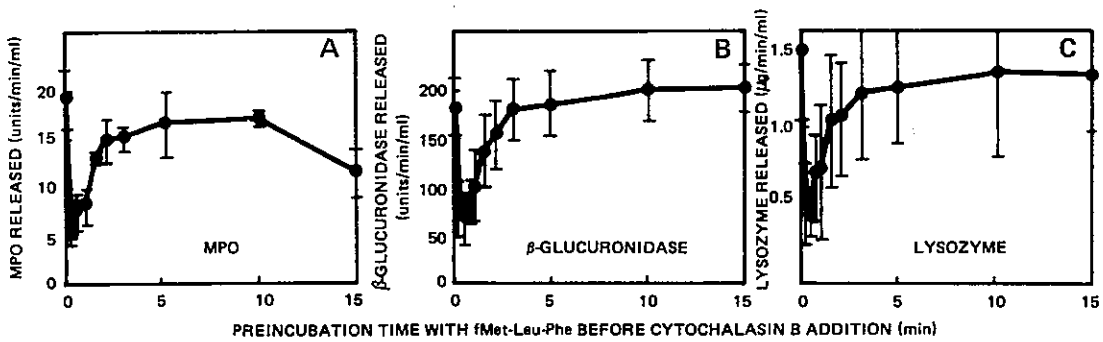


Figure 1. Preincubation effects of fMet-Leu-Phe on lysosomal enzyme release. After 200  $\mu$ l of PMN suspension was prewarmed at 37°C for 10 minutes, 2  $\mu$ l of  $10^{-3}$  M fMet-Leu-Phe was added to the suspension. Subsequently, 2.5  $\mu$ g/ml of cytochalasin B was added, varying the time of addition from 0 to 15 minutes. MPO,  $\beta$ -glucuronidase, and lysozyme were released by incubation at 37°C for three minutes after addition of cytochalasin B. Enzyme activities were determined by duplicates and expressed by mean  $\pm$  standard error in four cases. A. MPO; B.  $\beta$ -glucuronidase; C. lysozyme.

図1 ライソゾーム酵素放出に対するfMet-Leu-Pheのpreincubation効果。PMN浮遊液200 $\mu$ lを37°Cで10分間加温後、 $10^{-3}$  MのfMet-Leu-Phe 2 $\mu$ lを浮遊液に添加した。続いて、添加までの時間を0-15分間と変えて2.5 $\mu$ g/mlのサイトカラシンBを添加した。サイトカラシンBの添加後37°Cで3分間加温すると、MPO、 $\beta$ グルクロニデース及びリゾチームが放出された。酵素活性は2検体づつ測定し、4例の平均 $\pm$ 標準誤差で表した。A. MPO; B.  $\beta$ グルクロニデース; C. リゾチーム。

levels of three enzymes treated with cytochalasin B were less than 50% of the level by simultaneous addition of fMet-Leu-Phe and cytochalasin B. However, by extending the exposure time, the enzyme release gradually recovered after a five-minute incubation. It reached approximately the level released upon simultaneous addition of both reagents. These observations indicate that by extending the time of prior exposure the release activity of PMN, once suppressed by the prior exposure of fMet-Leu-Phe, was recovered.

**Cytochalasin B Effects on Maximal Production of  $O_2^-$  from PMN.** As shown in Figure 2, simultaneous addition of fMet-Leu-Phe and cytochalasin B induced  $O_2^-$  production and reached a plateau within 5-minute incubation (curve A). Also, fMet-Leu-Phe induced  $O_2^-$  production in the absence of cytochalasin B (curve B). However, the total production was 1/4 of that following the simultaneous addition of the two reagents, whereas the initial velocity was similar to that following simultaneous addition. When cytochalasin B was added to PMN 10 minutes after the addition of fMet-Leu-Phe,  $O_2^-$  production resumed (curve C). With the exclusive use of cytochalasin B,  $O_2^-$  production from PMN could not be observed (curve D). The total sum

1分以内にサイトカラシンBで処理した場合の3酵素放出レベルは、fMet-Leu-PheとサイトカラシンBを同時添加した場合に比べて50%以下であった。しかしながら、暴露時間を延長することにより、酵素放出は5分間の加温後、徐々に回復し、両試薬を同時添加した場合の放出レベルとほぼ同じレベルにまで達した。これらの所見により、暴露時間を延長すると、前もってfMet-Leu-Pheへの暴露によりいったん抑制されたPMNの放出活性が再び回復したことが判明した。

PMNからの $O_2^-$ の最大産生量へのサイトカラシンBの影響。図2に示すように、fMet-Leu-PheとサイトカラシンBの同時添加により、 $O_2^-$ の産生が誘発され、加温5分以内に一定値に達した(曲線A)。また、サイトカラシンBが存在しない場合でもfMet-Leu-Pheにより $O_2^-$ の産生が誘発された(曲線B)。しかしながら、総産生量は、両試薬の同時添加後のその1/4であったが、初速度は同時添加後のそれに類似していた。PMNにfMet-Leu-Pheを添加して10分後にサイトカラシンBを加えたところ $O_2^-$ の産生が再開した(曲線C)。サイトカラシンBのみを用いた場合は、PMNからの $O_2^-$ の産生は観察されなかった(曲線D)。fMet-Leu-Pheのみを用いた場合の $O_2^-$

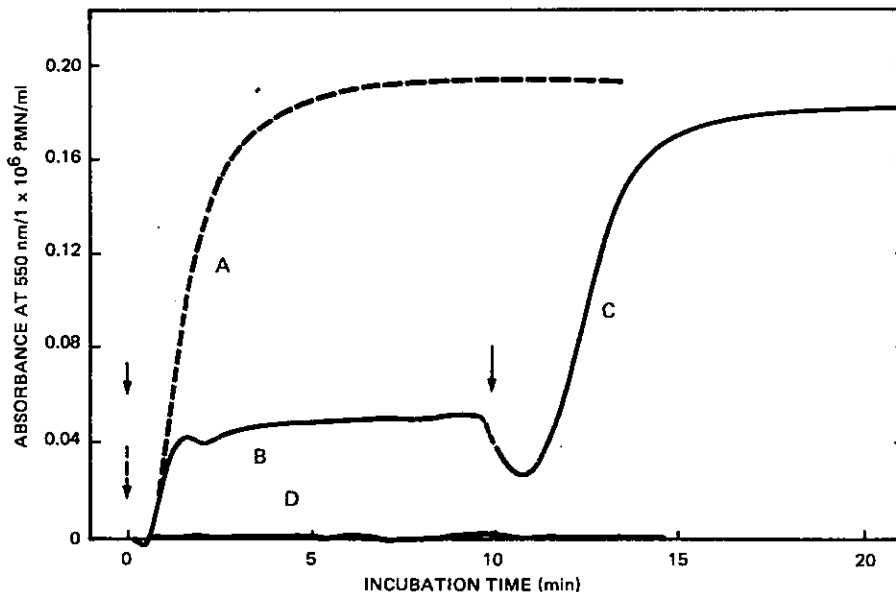


Figure 2.  $O_2^-$  production of PMN stimulated by the simultaneous or sequential addition of stimuli. Cell concentrations used were  $1 \times 10^6$  cells/ml. Curve A: fMet-Leu-Phe ( $1 \times 10^{-5} M$ ) and cytochalasin B ( $2.5 \mu g/ml$ ) was simultaneously added. Curve B: fMet-Leu-Phe ( $1 \times 10^{-5} M$ ) only was added. Curve C: cytochalasin B ( $2.5 \mu g/ml$ ) was sequentially added after a 10-minute incubation with fMet-Leu-Phe. Curve D: cytochalasin B only was added. Arrows indicate time of addition of fMet-Leu-Phe and/or cytochalasin B.

図2 刺激剤の同時又は経時添加により刺激されたPMNの $O_2^-$ 産生。細胞濃度  $1 \times 10^6$  個/ml を用いた。曲線A: fMet-Leu-Phe ( $1 \times 10^{-5} M$ ) とサイトカラシンB ( $2.5 \mu g/ml$ ) との同時添加。曲線B: fMet-Leu-Phe ( $1 \times 10^{-5} M$ ) のみ添加。曲線C: fMet-Leu-Phe で10分間加温後サイトカラシンB ( $2.5 \mu g/ml$ ) を添加。曲線D: サイトカラシンBのみ添加。矢印はfMet-Leu-Phe ないしサイトカラシンBの添加時を示す。

of  $O_2^-$  produced by the exclusive use of fMet-Leu-Phe and that produced 10 minutes thereafter by the addition of cytochalasin B was determined. This total sum was almost the same as the amount produced by the simultaneous addition of fMet-Leu-Phe and cytochalasin B (curve A). These results suggest that PMN, after undergoing prior exposure to fMet-Leu-Phe, maintain sensitivity to cytochalasin B. These results are different from those of other reports which indicated that when PMN were exposed in advance to fMet-Leu-Phe, their response to cytochalasin B was desensitized. This difference is considered to occur because sensitivity of PMN to cytochalasin B changes according to the length of time PMN are exposed to fMet-Leu-Phe.

Maximal  $O_2^-$  production was determined by varying the fMet-Leu-Phe exposure time for the PMN over the following intervals: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 300, 600, and 900 sec

産生量と、サイトカラシンBを添加して10分後の産生量との合計量を測定した。この合計量はfMet-Leu-Phe とサイトカラシンBを同時添加した場合の産生量とほぼ同じであった(曲線A)。これらの結果から、あらかじめfMet-Leu-Pheで処理した場合でもPMNはサイトカラシンBへの感受性を維持していることが示唆される。これらの結果は、PMNをあらかじめfMet-Leu-Pheに暴露すると、PMNのサイトカラシンBに対する反応の感受性が低下するという他の報告結果とは異なる。この相違は、サイトカラシンBに対するPMNの感受性が、PMNがfMet-Leu-Pheに暴露される時間によって異なることより生ずると考えられる。

$O_2^-$ の最大産生量を、PMNのfMet-Leu-Pheへの暴露時間を0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 300, 600及び900秒と変えて測定した(表1)。図3に示す



(Table 1). As shown in Figure 3, the  $O_2^-$  production gradually decreased with the extension of the time between fMet-Leu-Phe and cytochalasin B exposures. Especially, for the 90-sec exposure interval, very low  $O_2^-$  production could be found during the five minutes immediately following the addition of cytochalasin B. However, by extending the time of prior exposure, the production gradually recovered. When cytochalasin B was added to the PMN 600 sec after fMet-Leu-Phe exposure,  $O_2^-$  production reached a level equal to that resulting from the simultaneous addition of fMet-Leu-Phe and cytochalasin B.

**Recovery of Sensitivity to Cytochalasin B on Velocity of  $O_2^-$  Production from PMN.** As shown in Figure 3,  $O_2^-$  production consists of two phases having each maximal velocity. The initial phase represents the  $O_2^-$  production induced by fMet-Leu-Phe and the secondary phase, that by fMet-Leu-Phe and adding cytochalasin B. When cytochalasin B was added to the PMN 10 minutes after prior fMet-Leu-Phe exposure, the maximal velocity of the secondary phase was approximately the same as that of the initial phase.

ように、 $O_2^-$  の産生量は fMet-Leu-Phe とサイトカラシン B への暴露の間隔が延長されるにつれて徐々に減少した。特に、暴露時間が90秒の場合、サイトカラシン B の添加直後の5分間の  $O_2^-$  産生量は非常に低かった。しかしながら、前処理の時間を延長すれば、産生は徐々に回復した。fMet-Leu-Phe に暴露して600秒後に PMN にサイトカラシン B を添加すると、 $O_2^-$  の産生量は、fMet-Leu-Phe とサイトカラシン B の同時添加により得られた結果と同レベルに達した。

PMN からの  $O_2^-$  産生の速度におけるサイトカラシン B に対する感受性の回復。図3に示すように、 $O_2^-$  の産生は、各々最大速度をもつ2相から成る。最初の相は fMet-Leu-Phe によって誘発された  $O_2^-$  産生量を表し、第2相は fMet-Leu-Phe 及びサイトカラシン B の添加によるものを表している。あらかじめ fMet-Leu-Phe に10分間暴露した後、PMN にサイトカラシン B を加えると、第2相の最大速度は最初の相のそれとほぼ同じであった。

TABLE 1 PREINCUBATION EFFECTS OF fMET-LEU-PHE ON TOTAL  $O_2^-$  PRODUCTION FROM PMN

表1 fMet-Leu-Phe での前保温培養が、PMN からの総  $O_2^-$  産生に及ぼす効果

Preincubation Time (sec)	Total $O_2^-$ Production (nmol/min/ $1 \times 10^6$ PMN) <sup>†</sup>
0	27.0 ± 0.82
15	23.2 ± 0.55 *
30	19.4 ± 0.61 **
45	15.2 ± 0.93 **
60	16.8 ± 0.64 **
90	17.7 ± 0.40 **
120	16.0 ± 0.64 **
180	17.7 ± 0.15 **
300	18.9 ± 1.12 **
600	19.2 ± 0.49 **
900	21.0 ± 0.76 **

Reduced cytochrome c;  $E_{A550} = 21.0$

還元シトクロム c:  $E_{A550} = 21.0$ .

<sup>†</sup> Value expressed as mean ± standard error in three cases.

3例における平均±標準誤差として表された値。

\*Significantly lower ( $P < 0.05$ ) than the value in controls (preincubation 0 sec).

対照群 (preincubation 時間 0 sec) の値よりも有意に ( $P < 0.05$ ) 低い。

\*\*Significantly lower ( $P < 0.01$ ) than the value in controls (preincubation 0 sec).

対照群 (preincubation 時間 0 sec) の値よりも有意に ( $P < 0.01$ ) 低い。

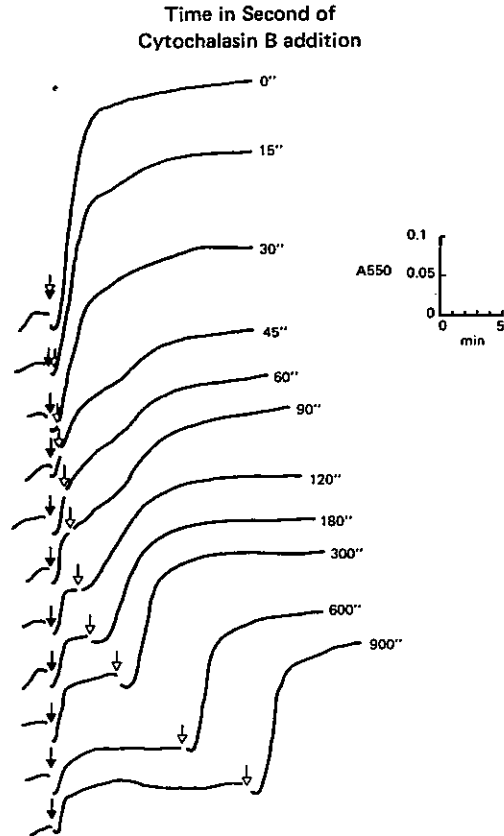


Figure 3. Effect of time lag between addition of fMet-Leu-Phe and cytochalasin B on  $O_2^-$  production from PMN. Cell concentrations were  $1 \times 10^6$  cells/ml. Closed arrows show the time fMet-Leu-Phe ( $1 \times 10^{-5} M$ ) was added and open arrows show the time cytochalasin B ( $2.5 \mu g/ml$ ) was added.

図3 PMNからの $O_2^-$ 産生に対するfMet-Leu-Pheの添加とサイトカラシンBの添加の時間間隔の効果。細胞濃度は $1 \times 10^6$ 個/ml。黒矢印はfMet-Leu-Phe( $1 \times 10^{-5} M$ )添加時を、白矢印はサイトカラシンB( $2.5 \mu g/ml$ )添加時を示す。

Figure 4 shows that the recovery of the maximal velocity of  $O_2^-$  production depends on the time from prior exposure of PMN to fMet-Leu-Phe to the addition of cytochalasin B. The velocity in the secondary phase could not be observed during one minute after the addition of cytochalasin B. However, by extending the time of the prior fMet-Leu-Phe exposure to 2, 3, 5, and 10 minutes, the maximal velocity in the secondary phase increased successively. After 10-minute exposure, the velocity recovered to more than 60% of the maximal velocity in the initial phase. These results indicate that the suppression of the maximal velocity in the secondary phase is due to fMet-Leu-Phe and it disappears with the extension of exposure time.

図4は、 $O_2^-$ 産生の最大速度の回復は、PMNのfMet-Leu-Pheでの前処理からサイトカラシンBの添加までの時間に依存することを示している。第2相の速度はサイトカラシンBの添加後1分間は観察されなかった。しかしながら、fMet-Leu-Pheでの前処理時間を2、3、5及び10分間に延長することにより、第2相の最大速度は経時的に上昇した。10分間暴露した後では、速度は最初の相の最大速度の60%以上にまで回復した。これらの結果により、第2相における最高速度の抑制はfMet-Leu-Pheによるもので、暴露時間の延長とともに解除されることが示唆される。

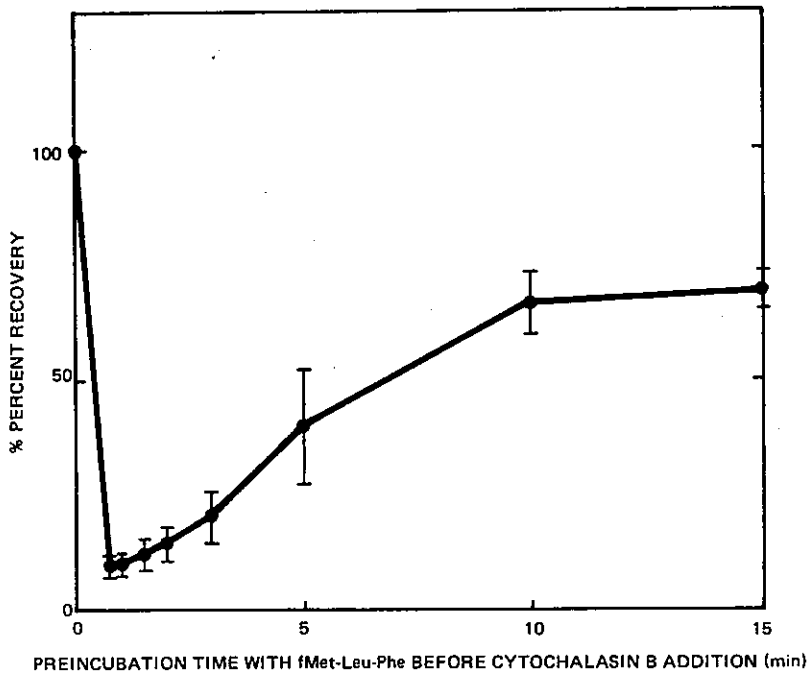


Figure 4. Recovery of sensitivity to cytochalasin B on maximal velocity of  $O_2^-$  production. Cytochalasin B-induced  $O_2^-$  production was expressed by percent recovery. The value was calculated as the ratio of cytochalasin B-induced  $O_2^-$  production to that caused by simultaneous addition of both reagents to PMN. The value is expressed as mean  $\pm$  standard error, determined in four cases.

図4  $O_2^-$  産生の最大速度におけるサイトカラシンBに対する感受性の回復。サイトカラシンBにより誘発された  $O_2^-$  産生は回復パーセントで表した。その値は、PMNに fMet-Leu-Phe とサイトカラシンBを同時添加した場合の  $O_2^-$  の産生量に対する、サイトカラシンBにより誘発された  $O_2^-$  の産生量の比として算出した。値は4例で測定した平均 $\pm$ 標準誤差として表した。

The effect of fMet-Leu-Phe concentration in producing maximal velocities was highest at the  $10^{-5}$  M concentration in the presence of cytochalasin B ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ), both for the initial and secondary phases (Table 2).

**Colchicine Effects on the Recovery of Sensitivity to Cytochalasin B in Lysosomal Enzyme Release.** Prior exposure of fMet-Leu-Phe temporarily suppressed enzyme release. Depending on the extended exposure time the suppression disappeared. Whether this phenomenon was due to the activity of the cytoskeleton was examined using inhibitory effects of colchicine on an assembly of microtubules.<sup>25</sup> When fMet-Leu-Phe and cytochalasin B were added simultaneously, colchicine ( $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M) did

最大速度が生じる際の fMet-Leu-Phe 濃度の効果は両相においてサイトカラシンB ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ) の存在下では濃度  $10^{-5}$  M で最大であった(表2)。

ライソゾーム酵素放出におけるサイトカラシンBに対する感受性の回復へのコルヒチンの効果。fMet-Leu-Phe で前処理すると酵素の放出は一時的に抑制された。暴露時間の延長に依存して抑制が解除された。この現象が細胞体質によるものかどうかを、コルヒチンの微小管の集合への抑制効果を用いて調べた。<sup>25</sup> fMet-Leu-Phe とサイトカラシンBを同時添加した場合、コルヒチン ( $10^{-4}$  及び  $10^{-5}$  M) は

TABLE 2 O<sub>2</sub><sup>-</sup> PRODUCTION FROM PMN IN VARIOUS fMet-LEU-PHE CONCENTRATIONS  
表2 異なる fMet-Leu-Phe 濃度における PMN からの O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生

fMet-Leu-Phe Concentration (M)	Maximal Velocity of O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Production ( $\Delta A_{550}/\text{min}$ , mean $\pm$ SE) <sup>†</sup>		
	fMet-Leu-Phe-Induced	CB-Induced <sup>a</sup>	Simultaneous Addition <sup>b</sup>
10 <sup>-8</sup>	0.040 $\pm$ 0.010	0	0.051 $\pm$ 0.018
10 <sup>-7</sup>	0.066 $\pm$ 0.009	0.017 $\pm$ 0.006*	0.134 $\pm$ 0.026
10 <sup>-6</sup>	0.085 $\pm$ 0.009*	0.061 $\pm$ 0.019*	0.144 $\pm$ 0.026*
10 <sup>-5</sup>	0.098 $\pm$ 0.005**	0.079 $\pm$ 0.017**	0.175 $\pm$ 0.027*

<sup>†</sup> Value expressed by mean  $\pm$  standard error in three cases.

3例における平均 $\pm$ 標準誤差として表された値。

a Cytochalasin B-induced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production after pretreatment in various fMet-Leu-Phe concentrations for 10 minutes at 37°C. Cytochalasin B was used at a concentration of 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

異なる濃度の fMet-Leu-Phe で 37°C で 10 分間前処理した後の、サイトカラシン B により誘発された O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生。

サイトカラシン B は濃度 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のものを用いた。

b fMet-Leu-Phe and cytochalasin B (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

fMet-Leu-Phe 及びサイトカラシン B (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

\* Significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the value in 10<sup>-8</sup> M fMet-Leu-Phe.

10<sup>-8</sup> M fMet-Leu-Phe の値よりも有意に ( $P < 0.05$ ) 高い。

\*\* Significantly higher ( $P < 0.01$ ) than the value in 10<sup>-8</sup> M fMet-Leu-Phe.

10<sup>-8</sup> M fMet-Leu-Phe の値よりも有意に ( $P < 0.01$ ) 高い。

not affect the enzyme release (Tables 3 and 4). However, the recovery of sensitivity to cytochalasin B was inhibited by 10<sup>-4</sup> M colchicine pretreatment in the release of MPO and  $\beta$ -glucuronidase when PMN were exposed to fMet-Leu-Phe (Tables 3 and 4). The recovery of MPO release after fMet-Leu-Phe exposure for two and five minutes was suppressed by colchicine treatment. The recovery of  $\beta$ -glucuronidase release after fMet-Leu-Phe exposure for two minutes was suppressed by colchicine treatment. These results indicate that colchicine more strongly inhibits the recovery of MPO release than that of  $\beta$ -glucuronidase release. On the other hand, lumicolchicine did not inhibit recovery of sensitivity to cytochalasin B in both enzyme release (Tables 3 and 4). These results indicate that colchicine treatment of PMN inhibited the recovery of sensitivity to cytochalasin B in influencing the lysosomal enzyme release.

## DISCUSSION

Prior fMet-Leu-Phe exposure changed the sensitivity to cytochalasin B by influencing the velocity of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and lysosomal enzyme release. This sensitivity depended on the exposure time, showing a strong suppression within one minute, but recovering to the original level five minutes thereafter. These results suggest that bactericidal activity is suppressed while PMN are migrating towards chemotactic factors. They also suggest that bactericidal

酵素の放出に影響しなかった(表3及び4)。しかしながら、PMN を fMet-Leu-Phe に暴露すると、MPO 及び  $\beta$  グルクロニダーズの放出におけるサイトカラシン B に対する感受性の回復は 10<sup>-4</sup> M のコルヒチンでの前処理により阻害された(表3及び4)。fMet-Leu-Phe に 2 分間及び 5 分間暴露した後の MPO の放出の回復はコルヒチン処理により抑制された。fMet-Leu-Phe に 2 分間暴露した後の  $\beta$  グルクロニダーズの放出の回復はコルヒチン処理により阻害された。これらの結果により、コルヒチンは  $\beta$  グルクロニダーズの放出の回復よりも MPO の放出の回復の方をより強く阻害することが示唆される。一方、ルミコルヒチンはこれら二つの酵素放出のいずれにおいてもサイトカラシン B に対する感受性の回復を阻害しなかった(表3及び4)。これらの結果により、PMN のコルヒチン処理は、ライソゾーム酵素放出へ影響を与えてサイトカラシン B に対する感受性の回復を阻害するというのではないことが示唆される。

## 考 察

fMet-Leu-Phe での前処理が O<sub>2</sub><sup>-</sup> の産生及びライソゾーム酵素放出の速度に影響を与えてサイトカラシン B に対する感受性が変化した。この感受性は暴露時間に依存しており、1 分以内に強い抑制を示したが、その後 5 分間で最初のレベルにまで回復した。これらの結果により、殺菌活動は抑制されるが、PMN は走化因子の方へ遊走することが示唆される。また、PMN が炎症部位に到達し、走化因子への暴露

activity recovers as PMN reach the inflammatory site and the exposure time to chemotactic factors becomes longer.

時間の延長につれて、殺菌活動が回復することも示唆される。

TABLE 3 COLCHICINE EFFECTS ON RECOVERY OF MPO RELEASE  
表3 MPO放出の回復に対するコルヒチンの効果

Treatment	MPO Activity		Released MPO (% Control, Mean $\pm$ SE) <sup>†</sup>				
	0	0 (Control)	Preincubation Time with fMet-Leu-Phe (min)				
			0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
Colchicine (M)							
0	21.1 $\pm$ 4.3	100	38.2 $\pm$ 6.6	48.1 $\pm$ 14.3	75.9 $\pm$ 11.4	99.9 $\pm$ 6.5	93.9 $\pm$ 15.5
10 <sup>-5</sup>	21.5 $\pm$ 3.2	100	40.0 $\pm$ 8.1	38.9 $\pm$ 12.4	74.3 $\pm$ 7.2	102.9 $\pm$ 9.6	78.0 $\pm$ 19.0
10 <sup>-4</sup>	23.1 $\pm$ 5.4	100	31.3 $\pm$ 7.0	31.1 $\pm$ 9.9	46.2 $\pm$ 7.4*	71.9 $\pm$ 5.4**	56.4 $\pm$ 10.1
Lumicolchicine							
0		100	48.5 $\pm$ 4.1	60.7 $\pm$ 5.3	93.3 $\pm$ 4.1	90.4 $\pm$ 2.9	92.2 $\pm$ 3.4
10 <sup>-4</sup>		100	53.1 $\pm$ 4.1	59.7 $\pm$ 5.7	93.7 $\pm$ 0.8	96.4 $\pm$ 3.9	99.4 $\pm$ 1.5

<sup>†</sup> Value calculated as the ratio of activity of released MPO induced by cytochalasin B after fMet-Leu-Phe exposure to activity of released MPO induced by simultaneous addition of both reagents. Value expressed as mean  $\pm$  standard error in three cases.

サイトカラシンBとfMet-Leu-Pheの同時添加により誘発される放出MPOの活性に対するfMet-Leu-Phe暴露後のサイトカラシンB添加により誘発される放出MPOの活性の比として算出した値。3例における平均 $\pm$ 標準誤差として表した値。

\* P<0.05.

\*\* P<0.01 (t-test).

TABLE 4 COLCHICINE EFFECTS ON RECOVERY OF  $\beta$ -GLUCURONIDASE RELEASE  
表4  $\beta$ グルクロニダーズの放出の回復に対するコルヒチンの効果

Treatment	$\beta$ -Glucuronidase Activity		Released $\beta$ -Glucuronidase (% Control, Mean $\pm$ SE) <sup>†</sup>				
	0	0 (Control)	Preincubation Time with fMet-Leu-Phe (min)				
			0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
Colchicine (M)							
0	154.0 $\pm$ 49.6	100	50.2 $\pm$ 13.4	64.8 $\pm$ 14.5	98.0 $\pm$ 11.3	100.5 $\pm$ 9.4	93.9 $\pm$ 7.3
10 <sup>-5</sup>	134.9 $\pm$ 42.2	100	44.4 $\pm$ 12.2	54.8 $\pm$ 9.2	92.5 $\pm$ 8.1	96.9 $\pm$ 6.6	82.0 $\pm$ 9.4
10 <sup>-4</sup>	132.9 $\pm$ 44.2	100	33.8 $\pm$ 14.1	42.3 $\pm$ 14.7	49.1 $\pm$ 7.3**	88.5 $\pm$ 9.7	90.1 $\pm$ 10.6
Lumicolchicine							
0		100	36.2 $\pm$ 3.6	42.6 $\pm$ 1.1	72.9 $\pm$ 4.1	92.5 $\pm$ 1.3	91.0 $\pm$ 5.5
10 <sup>-4</sup>		100	37.7 $\pm$ 4.7	45.4 $\pm$ 2.0	79.6 $\pm$ 3.7	93.8 $\pm$ 3.7	92.5 $\pm$ 2.5

<sup>†</sup> Value calculated as the ratio of activity of released  $\beta$ -glucuronidase induced by cytochalasin B after fMet-Leu-Phe exposure to activity of released  $\beta$ -glucuronidase induced by simultaneous addition of both reagents. Value expressed by mean  $\pm$  standard error in three cases.

サイトカラシンBとfMet-Leu-Pheの同時添加により誘発される放出 $\beta$ グルクロニダーズの活性に対するfMet-Leu-Phe暴露後のサイトカラシンB添加により誘発される放出 $\beta$ グルクロニダーズの活性の比として算出した値。3例における平均 $\pm$ 標準誤差として表した値。

\*\* P<0.01 (t-test).

Recently, Kitagawa et al<sup>20</sup> and Kitagawa and Takaku<sup>21</sup> also reported that in  $O_2^-$  production a loss (or decrease) of sensitivity to cytochalasin B induced by chemotactic peptides was observed. Now, this loss was found to be time dependent. However, they reported an enhancement of responsiveness to concanavalin A and wheat germ agglutinin. The present study also confirmed that the decrease in sensitivity changed with time. Table 1 shows PMN hold maximal  $O_2^-$  production activity whereas the velocity was suppressed. In addition, what was clarified was that this loss recovered by extending the time of reaction with chemotactic factors (Figure 2). Optimal concentration ( $10^{-5}$  M) of fMet-Leu-Phe in maximal velocity of  $O_2^-$  production was similar to that of literatures.<sup>22</sup>

PMN pretreated with colchicine ( $10^{-5}$  and  $10^{-4}$  M) did not affect the lysosomal enzyme release at the time of simultaneous addition of fMet-Leu-Phe and cytochalasin B. However, recoveries of lysosomal enzyme release were inhibited by  $10^{-4}$  M colchicine (Tables 3 and 4). These observations show that although  $10^{-4}$  M colchicine did not directly inhibit enzyme release, it inhibited the recovery of suppression induced by fMet-Leu-Phe. The inhibitory effect of colchicine concentration may be nonspecific to the suppression of the recovery, but  $10^{-4}$  M colchicine did not affect the lysosomal enzyme release, even though the effective colchicine concentration was higher than that reported.<sup>26</sup> Lumicolchicine did not inhibit recovery of lysosomal enzyme release (Tables 3 and 4). These results strongly suggest that microtubules are related to the recovery of fMet-Leu-Phe-induced suppression of lysosomal enzyme release. Recently, Rao and Varani<sup>27</sup> have demonstrated that actin is polymerized by chemotactic peptide in rat neutrophils. This observation supports our speculations.

Suppression occurring in both the lysosomal enzyme release and  $O_2^-$  production mentioned above does not result from the desensitization of sensitivity to cytochalasin B due to fMet-Leu-Phe. This suppression is of a transient nature and recoverable, while microfilaments are disrupted by cytochalasin B. PMN microfilaments temporarily become hard to disrupt with cytochalasin B, reaching a peak

最近になって、Kitagawaら<sup>20</sup>及びKitagawaとTakaku<sup>21</sup>も $O_2^-$ の産生において走化ペプチドにより誘発されたサイトカラシンBに対する感受性の消失(又は減少)が観察されたと報告している。本研究で我々は、この減少が時間に依存することを発見した。しかしながら、彼らが報告したのはコンカナバリンA及び小麦胚芽凝集素に対する反応性の増大であった。本研究でも、感受性の減少は経時的に変化することを確認した。表1は、PMNの $O_2^-$ の産生活動は最大であるが、その速度は抑制されていることを示している。加えて、この消失は、走化因子との反応時間を延長することによって回復することが明らかになった(図2)。 $O_2^-$ の最大産生速度に最適なfMet-Leu-Pheの濃度( $10^{-5}$  M)は文献<sup>22</sup>のそれと類似していた。

コルヒチン( $10^{-5}$ 及び $10^{-4}$  M)で前処理したPMNは、fMet-Leu-PheとサイトカラシンBの同時添加の時点ではライソゾーム酵素の放出に影響を与えなかった。しかしながら、ライソゾーム酵素放出の回復は $10^{-4}$  Mのコルヒチンによって阻害された(表3及び4)。これらの所見により、 $10^{-4}$  Mのコルヒチンは直接的には酵素放出を抑制しなかったが、fMet-Leu-Pheにより誘発された抑制の回復を阻害したことが分かる。コルヒチン濃度の阻害効果は、回復の抑制に特異的ではないかもしれないが、有効コルヒチン濃度はこれまでの報告<sup>26</sup>のものより高いにもかかわらず、 $10^{-4}$  Mのコルヒチンはライソゾーム酵素放出には影響を与えなかった。ルミコルヒチンはライソゾーム酵素放出の回復を阻害しなかった(表3及び4)。これらの結果により、微小管がfMet-Leu-Pheに誘発されたライソゾーム酵素放出の抑制の解除に関係していることが強く示唆される。最近になって、Rao及びVarani<sup>27</sup>がアクチンは、ラットの好中球中の走化ペプチドにより重合化されることを観察した。この所見は我々の推測を支持するものである。

先述のライソゾーム酵素放出及び $O_2^-$ 産生双方において生ずる抑制は、fMet-Leu-PheによるサイトカラシンBに対する感受性の脱感作の結果ではない。この抑制は一過性のもので回復可能であるが、マイクロフィラメントはサイトカラシンBによって崩壊する。PMNのマイクロフィラメントは一時的に、サイトカラシンBで崩壊させることができないくらい固くなり、30~100秒で頂点に達する。しかしなが

at 30-100 sec. However, it is believed that, with the extension of the prior fMet-Leu-Phe exposure time, the microfilaments become disruptable again. These phenomena are considered to be closely related to the movement of membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$  ions. Smolen et al<sup>28</sup> observed that membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$ , which once disappeared due to fMet-Leu-Phe treatment of PMN, recovered three minutes thereafter. It is assumed that these phenomena are closely related to the behavior of receptors for chemotactic peptides. Recently, Donabedian and Gallin<sup>29</sup> reported that when PMN were exposed in advance to fMet-Leu-Phe, receptors of fMet-Leu-Phe decreased, but if PMN were incubated with fMet-Leu-Phe for one hour, the number of receptors increased again. Their observations on the receptors appear to be contradicting the report of Abita and Morgat<sup>30</sup> that no change was detected in the number of receptors due to the prior exposure of PMN to fMet-Leu-Phe. However, in view of the transient nature of receptors,<sup>31</sup> the number of receptors counted by the method of Abita and Morgat might have been already recovered during the incubation. According to these reports, it is considered that the suppression and recovery of enzyme release and velocity of  $\text{O}_2^-$  production developing due to the prior exposure of fMet-Leu-Phe are associated with the transient decrease of receptor number and its recovery.

On the other hand, owing to the exposure of fMet-Leu-Phe, the concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in PMN cells reached a high level at 30 sec. Later, it decreased gradually and recovered to the original level five minutes after exposure.<sup>32</sup> This phenomenon is remarkably similar to the kinetics of the enzyme release and  $\text{O}_2^-$  production reported here. Further, the increase in the cellular concentration of cAMP inhibited lysosomal enzyme release.<sup>33</sup> Based on these reports, the following can be assumed: the level of cellular cAMP increases due to fMet-Leu-Phe, and enzyme release and  $\text{O}_2^-$  production decrease. With the progress of time, the concentration of cAMP subsequently recovers its original level, so that the enzyme release and  $\text{O}_2^-$  production can be obtained.

Henson et al<sup>18</sup> reported that when PMN underwent prior exposure to C5a, the release of MPO,  $\beta$ -glucuronidase, and lysozyme was

ら、fMet-Leu-Phe での前処理時間の延長に伴って、マイクロフィラメントは再び崩壊可能になるとされている。これらの現象は膜に結合した  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと深い関係があると考えられる。Smolen ら<sup>28</sup> は PMN の fMet-Leu-Phe での処理によりいったん消失した膜に結合した  $\text{Ca}^{2+}$  は、3 分後に回復したことを観察した。これらの現象は走化ペプチドのリセプターの動態と深い関係があるとされている。最近になって Donabedian と Gallin<sup>29</sup> は、PMN をあらかじめ fMet-Leu-Phe に暴露すると、fMet-Leu-Phe のリセプターは減少するが、PMN を fMet-Leu-Phe で 1 時間加温すると、リセプターの数は再び上昇することを報告した。このリセプターに関する彼らの報告は、PMN をあらかじめ fMet-Leu-Phe に暴露してもリセプター数に変化はないという Abita 及び Morgat<sup>30</sup> の報告と矛盾しているように思われる。しかしながら、リセプターの一過的な性質<sup>31</sup> を考えると、Abita 及び Morgat の方法で計数したリセプター器の数は加温中に既に回復していた可能性がある。これらの報告によれば、fMet-Leu-Phe での前処理により生じる酵素放出及び  $\text{O}_2^-$  産生の速度の抑制と解除は、リセプターの数の一時的な減少と回復に関連があると考えられる。

一方、fMet-Leu-Phe への暴露により、PMN 細胞中のサイクリックアデノシン単リン酸 (cAMP) 濃度は 30 秒で高レベルに達した。その後、漸減し、暴露後 5 分間で最初のレベルにまで回復した。<sup>32</sup> この現象は、本報で述べた酵素放出及び  $\text{O}_2^-$  産生の動態に著しく類似している。更に、cAMP の細胞濃度の上昇によりライソゾーム酵素の放出は抑制された。<sup>33</sup> これらの報告に基づいて、次のことが考えられる。fMet-Leu-Phe により、細胞 cAMP のレベルが上昇し、酵素放出及び  $\text{O}_2^-$  の産生が減少する。時の経過とともに、cAMP の濃度は最初のレベルにまで回復し、酵素の放出及び  $\text{O}_2^-$  の産生が行われる。

Henson ら<sup>18</sup> は、PMN をあらかじめ C5a に暴露した場合、MPO、 $\beta$  グルクロニダーゼ及びリゾチームの

suppressed. They considered this suppression unremovable and designated this phenomenon as desensitization. According to their report, when PMN were exposed to C5a five minutes prior to the addition of cytochalasin B,  $\beta$ -glucuronidase release was suppressed to 10% of the level observed when C5a and cytochalasin B were simultaneously added. Even by extending the prior exposure time to C5a to 15 and 30 minutes, the sensitivity to cytochalasin B was not recovered. This differs greatly from our observations. This difference may be attributable to the difference in respective, chemotactic factors involved. However, though C5a induces chemotaxis, the hypothesis that once exposed to C5a, enzyme release remains strongly suppressed does not seem to adequately explain the bactericidal activity of PMN *in vivo*. On the other hand, Showell et al.<sup>19</sup> reported a decrease in the responsiveness to cytochalasin B in the lysozyme release of rabbit PMN due to prior exposure to fMet-Leu-Phe. They observed an 80%-85% drop in lysozyme release upon 4-8 minutes of prior fMet-Leu-Phe exposure of PMN, but they did not observe recovery of the release. This is different from the present observations, and it seems attributable to the difference in source of the PMN (i.e., human vs rabbit). Actually, ED<sub>50</sub> of fMet-Leu-Phe is  $10^{-7}$  M for lysosomal enzyme release of human PMN, and less than  $2 \times 10^{-10}$  M for that of rabbit PMN, showing a large difference between them.<sup>15</sup> However, that the recovery of enzyme release cannot be observed in the rabbit PMN seems illogical because, in this sense, PMN cannot demonstrate bactericidal activity at an inflammatory site. At any rate, there are many unknown features of the activity mechanism of cytochalasin B and chemotactic factors in lysosomal enzyme release and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production.

放出が抑制されると報告した。彼らはこの抑制は解除不可能と考え、これを脱感作と名付けた。彼らの報告では、サイトカラシンBを添加する5分前にPMNをC5aに暴露した場合、 $\beta$ グルクロニダーズの放出は、C5aとサイトカラシンBの同時添加の場合の10%レベルに抑制された。C5aでの前処理時間を15分から30分に延長した場合でも、サイトカラシンBへの感受性は回復しなかった。これは我々の所見とは著しく異なっている。この相違は、各関連走化因子の差異に帰因する可能性もある。しかしながら、C5aは走化性を誘発するものの、いったんC5aに暴露すると酵素の放出が強く抑制されたままになるという仮説は、*in vivo*でのPMNの殺菌活動を十分に説明しているとは思えない。一方Showellら<sup>19</sup>は、fMet-Leu-Pheでの前処理によるウサギのPMNのリゾチーム放出におけるサイトカラシンBに対する反応性の減少を報告した。彼らは、PMNをfMet-Leu-Pheで4~8分間前処理するとリゾチームの放出が80%—85%減少することを観察したが、放出の回復は観察しなかった。これは本報での所見とは異なっているが、これはPMNの採取源の相違(すなわち、ヒト対ウサギ)に帰因できるかもしれない。実際に、ヒトPMNのライソゾーム酵素放出ではfMet-Leu-PheのED<sub>50</sub>は $10^{-7}$  M、ウサギPMNのそれでは $2 \times 10^{-10}$  M以下で、両者には大きな違いがある。<sup>15</sup>しかしながら、酵素の放出の回復がウサギPMNには見られなかったのは不合理である。なぜなら、この意味では、PMNは炎症部位では殺菌活動を行えないからである。いずれにせよ、ライソゾーム酵素放出及びO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生におけるサイトカラシンB及び走化因子の作用機序には不明な特徴が数多くある。



## REFERENCES

## 参考文献

1. WEISSMANN G, KORCHAK HM, PEREZ HD, SMOLEN JE, GOLDSTEIN IM, HOFFSTEIN ST: The secretory code of the neutrophil. *J Reticuloendothel Soc* 26(Suppl):687-700, 1979
2. GOLDSTEIN I, HOFFSTEIN S, GALLIN J, WEISSMANN G: Mechanism 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
3. WEISSMANN G, ZURIER RB, HOFFSTEIN S: Leukocytes as secretory organs of inflammation. *Agents Actions* 3:370-9, 1973
4. SAGONE AL Jr, KING GW, METZ EM: A comparison of the metabolic response to phagocytosis in human granulocytes and monocytes. *J Clin Invest* 57:1352-8, 1976
5. REISS M, ROOS D: Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils. *J Clin Invest* 61:480-8, 1978
6. BABIOR BM: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 298:659-68, 1978
7. ALLEN RC, MILLS EL, McNITT TR, QUIE PG: Role of myeloperoxidase and bacterial metabolism in chemiluminescence of granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *J Infect Dis* 144:344-8, 1981
8. AMANO D, KAGOSAKI Y, USUI T, YAMAMOTO S, HAYAISHI O: Inhibitory effects of superoxide dismutases and various other proteins on the nitroblue tetrazolium reduction by phagocytizing guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 66:272-9, 1975
9. KLEBANOFF SJ: Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J Bacteriol* 95:2131-8, 1968
10. KLEBANOFF SJ: Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Semin Hematol* 12:117-42, 1975
11. SCHIFFMANN E, CORCORAN BA, WAHL SM: N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1059-62, 1975
12. ZIGMOND SH: Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* 75:606-16, 1977
13. RUSSO RG, LIOTTA LA, THORGEIRSSON U, BRUNDAGE R, SCHIFFMANN E: Polymorphonuclear leukocyte migration through human amnion membrane. *J Cell Biol* 91:459-67, 1981
14. SNYDERMAN R, GOETZL EJ: Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 213:830-7, 1981
15. SHOWELL HJ, FREER RJ, ZIGMOND SH, SCHIFFMANN 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
16. BENTWOOD BJ, HENSON PM: The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J Immunol* 124:855-62, 1980
17. ZURIER RB, HOFFSTEIN S, WEISSMANN G: Cytochalasin B: Effect on lysosomal enzyme release from human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:844-8, 1973

18. HENSON PM, ZANOLARI B, SCHWARTZMAN NA, HONG SR: Intracellular control of human neutrophil secretion. I. C5a-induced stimulus-specific desensitization and the effects of cytochalasin B<sup>1</sup>. *J Immunol* 121:851-5, 1978
19. SHOWELL HJ, WILLIAMS D, BECKER E, NACCACHE PH, SHA'AFI R: Desensitization and deactivation of the secretory responsiveness of rabbit neutrophils induced by the chemotactic peptide, formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Reticuloendothel Soc* 25:139-50, 1979
20. KITAGAWA S, TAKAKU F, SAKAMOTO S: A comparison of the superoxide-releasing response in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol* 125:359-64, 1980
21. KITAGAWA S, TAKAKU F: Effect of the chemotactic peptide on the subsequent superoxide-releasing response in human polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 128:5-8, 1981
22. SUZUKI K, SWENSON C, SASAGAWA S, SAKATANI T, WATANABE M, KOBAYASHI M, FUJIKURA T: Age-related decline in lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes after N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulation. *Exp Hematol* 11:1005-13, 1983 (RERF TR 9-82)
23. SUZUKI K, OTA H, SASAGAWA S, SAKATANI T, FUJIKURA T: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 132:345-52, 1983
24. WILSON L, FRIEDKIN M: The biochemical events of mitosis. Synthesis and properties of colchicine labeled with tritium in its acetyl moiety. *Biochemistry* 5:2463-8, 1966
25. WEISENBERG RC, BORISY GG, TAYLOR EW: The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* 7:4466-79, 1968
26. MALECH HL, ROOT RK, GALLIN JI: Structural analysis of human neutrophil migration: Centriole, microtubule, and microfilament orientation. *J Cell Biol* 75:666-92, 1977
27. RAO KMK, VARANI J: Action polymerization induced by chemotactic peptide and concanavalin A in rat neutrophils. *J Immunol* 129:1605-7, 1982
28. SMOLEN JE, EISENSTAT BA, WEISSMANN G: The fluorescence response of chlorotetracycline-loaded human neutrophils: Correlations with lysosomal enzyme release and evidence for a trigger pool of calcium. *Biochem Biophys Acta* 717:422-31, 1982
29. DONABEDIAN H, GALLIN J: Deactivation of human neutrophil chemotaxis by chemoattractants: Effect on receptors for the chemotactic factor fMet-Leu-Phe. *J Immunol* 127:839-44, 1981
30. ABITA JP, MORGAT JL: On the mechanism of human polymorphonuclear leukocyte deactivation of chemotaxis by the synthetic peptide fMet-Leu-Phe. *FEBS Lett* 111:14-8, 1980
31. SULLIVAN SJ, ZIGMOND SH: Chemotactic peptide receptor modulation in polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 85:703-11, 1980
32. MARX RS, McCALL CE, BASS DA: Chemotaxin-induced changes in cyclic adenosine monophosphate levels in human neutrophils. *Infect Immun* 29:284-6, 1980
33. ZURIER RB, HOFFSTEIN S, WEISSMANN G: Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. I. Effect of cyclic nucleotides and colchicine. *J Cell Biol* 58:27-41, 1978