

## 好中球の刺激に伴う活性酸素生成と その刺激物特異性について

高橋龍太郎\*・倉繁 迪\*・岡添陽子\*・枝重圭祐\*\*

土屋正彦\*\*\*・友田三保\*\*\*・内海耕慥\*

(高知医科大学・\*生物学教室, \*\*附属動物実験施設・\*\*\*麻酔学教室)

## Active Oxygen Generation by Stimulated Neutrophils and Its Stimulus Specificity.

Ryutaro TAKAHASHI\*, Michi KURASHIGE\*, Yoko OKAZOE\*, Keisuke  
EDASHIGE\*\*, Masahiko TSUCHIYA\*\*\*, Miho TOMODA\*\*\* and Kozo UTSUMI\*

(\*Department of Medical Biology, \*\*Institute for Experimental animals

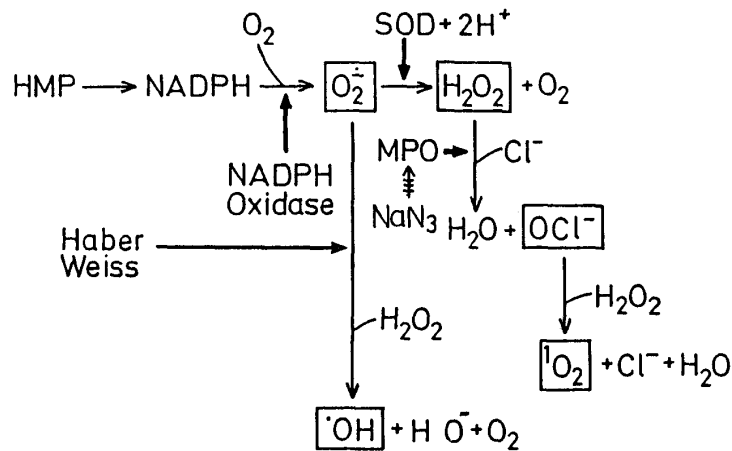
and \*\*\*Department of Anesthesiology, Kochi Medical School, Kochi 781-51 Japan)

**Abstract.** Upon interaction with soluble or particulate matter, neutrophils produce active oxygen species. Since luminol-dependent chemiluminescence (CL) in neutrophils can be blocked by azide, an inhibitor of myeloperoxidase activity, it has been believed to reflect the peroxidase-catalyzed reaction.

The sensitivity of CL to superoxide dismutase (SOD) was very high when the cells were stimulated with formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) but not by phorbol myristate acetate (PMA) or opsonized zymosan (OZ). Luminol-dependent CL can be blocked by azide when neutrophils were stimulated by OZ or PMA. In contrast, the inhibitory action of azide was not observed in the case of stimulation by FMLP. These results were also supported to the measurement of  $H_2O_2$  in suspending medium: when cells were stimulated by arachidonic acid, PMA and OZ, hydrogen peroxide production by neutrophils were increased by addition of superoxide dismutase (SOD) or azide. Furthermore, stimulation-dependent CL, especially by FMLP, was increased by vanadate. In this case, vanadate was reacting with  $O_2^-$  to yield an oxidant capable of initiating a free radical chain oxidation of NADPH. Thus, the oxidant species and the enzymatic pathway of the phagocytic cells following of their respiratory burst by various stimuli are distinctly different from one stimuli to another.

### 〈緒言〉

好中球は刺激物に依存して種々の活性酸素を生成し、殺細胞機能を始め、種々の生物作用を示すことはすでに多くの研究者により研究されてきた<sup>1-3)</sup>。その初期反応は NADPH oxidase の活性化に伴うスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) の生成と考えられ、その酵素的あるいは非酵素的反応に伴い、 $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ 等の活性酸素も生成されると考えられている<sup>4)</sup>。近年これら活性酸素生成量を測定する方法として、活性酸素の持つ微弱な化学発光 (CL) をルミノール発光に変換増幅して測定する方法が臨床研究において一般に使用されるようになった<sup>5)</sup>。しかも、このルミノール CL は Fig.1 の□で囲み表示した  $O_2^-$  を含め、他の  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ 等の活性酸素分子種をも反映することが支持されている。従ってこの方法は活性酸素全体を計測する方法としては、NBT や Ferricytochrome c (Cyt. c) の還元による  $O_2^-$ 測定<sup>6)</sup>と比較して、その測定値の意味もまた大きい。しかも、好中球の NADPH oxidase 活性化に伴う  $O_2^-$ 生成量は刺激物により著しく異なり、かつ生成される活性酸素の分子種もその複雑な反応系のため刺激物により著しく異なるものと考えられる。しかしこれら分子種の解析については尚十分な研究は行われてはいない。



**Fig.1.** A possible mechanism of reactive oxygen production from superoxide anions.  $O_2^-$ , superoxide ; SOD, superoxide dismutase ; MPO, myeloperoxidase ;

本研究では、好中球の生成するこれら活性酸素分子種の刺激物特異性に注目し、種々の解析を試み、興味ある事実を明らかにしたので報告する。

### 〈材料と方法〉

**好中球：**モルモット腹腔内に生食に溶解した2%カゼインを体重の1/10量を注入し、16時間後に細胞を採取し、Krebs-Ringer-phosphate (KRP)にて2回洗滌し4℃に保存し、実験に供し

た<sup>7)</sup>。

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成**：SOD inhibitable O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成の測定は前報に従った<sup>8)</sup>。即ち40 $\mu$ M Cyt. c, 10mM グルコース, 1 mM CaCl<sub>2</sub>を含む37°CのKRP液 (pH7.4) に好中球 (5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ml) を懸濁し, Cyt. cの還元に伴う540nmの吸光度 (A<sub>550-540</sub>) の増大より測定した。尚, O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成量はCyt. cの分子吸光度21.0mM<sup>-1</sup>, cm<sup>-1</sup>より求めた。また測定は反応液を攪拌する装置を持つ島津二波長分光光度計 (UV-300) にて測定した。

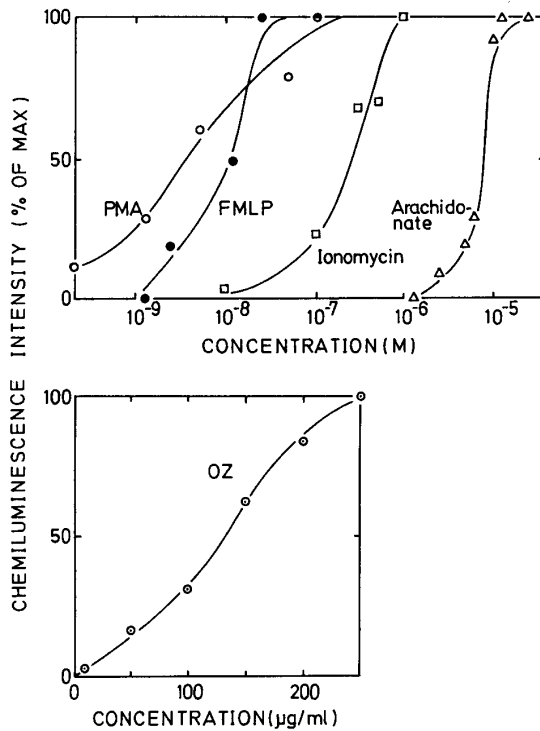
**ルミノール CL**：ルミノールのCLの測定はAllenの方法<sup>5)</sup>に従った。即ち100 $\mu$ M ルミノール, 10mM グルコース, 1 mM CaCl<sub>2</sub>を含む37°CのKRP (pH7.4) に好中球 (5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ml) を懸濁し, マグネティックスターラーにて攪拌しながらルミノールCLの測定をJASKO. Ca<sup>++</sup> analyzer type CA200 (equalin CLモード) にて測定した。また測定されるCLのカーブは微分値を示すため, 単位時間内のCL量は測定された時間内に示されるCLカーブの面積計算より求めた。

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はAndreae<sup>9)</sup>及びRoots<sup>10)</sup>らの方法に従った。即ち4 $\mu$ M scopoletin, 50nM horse radish peroxidaseを含むKRP (pH7.4) に10mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>を添加し, 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mlの好中球を懸濁し, 360nmの励起光にて得られる450nmの蛍光量を, 島津分光光度計 (RH250) にて測定した。反応は37°Cで攪拌条件下に行った。

### 〈結果と考察〉

#### 好中球刺激応答性 O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成とルミノール CL の刺激物特異性

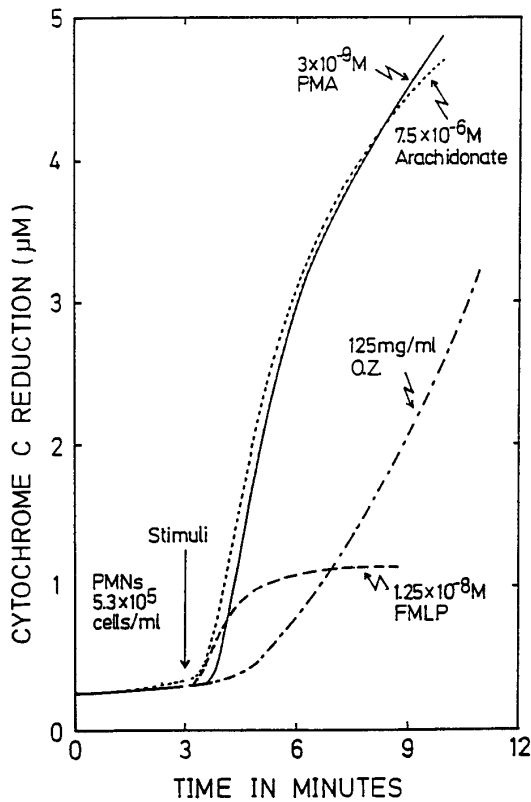
好中球は種々の物質により刺激される。例えば Chemotactic peptide (FMLP) は細胞膜表面受容体に結合し, PMA は PKC を活性化し, アラキドン酸 (AA) は膜攪乱により, オプソナイズトチモーザン (OZ) は食作用により, それぞれ活性酸素生成を促進する<sup>11)</sup>。しかもその促進作用は NADPH oxidase の活性化による O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成を始め, 種々の活性酸素分子種の生成を行うが, 刺激物により生成される活性酸素分子種は著しく異なる。今ルミノール CL で測定される好中球の種々活性酸素生成の刺激物濃度依存度を示すと, Fig. 2 のようであり, それらの ED<sub>50</sub> を求めてみると, PMA, FMLP, Ionomycin, AA, OZ でそれぞれ 3 $\times$ 10<sup>-9</sup>M, 1.25 $\times$ 10<sup>-8</sup>M, 5 $\times$ 10<sup>-7</sup>M, 7.5 $\times$ 10<sup>-6</sup>M, 125 $\mu$ g/ml であった。Fig. 3 はそれぞれの ED<sub>50</sub> に近い濃度の刺激物処理による一定時間内における Cyt. c 還元量で測定される O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成を示すが, O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成量とその時間的依存性は刺激物で著しく異なる。同じ様な現象はルミノール CL で測定される活性酸素量においても同様である (Fig. 4) が, 今その両者について比較検討すると Fig. 5 のごとく, Cyt. c 還元で測定される O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成とルミノール CL で測定される活性酸素量の間には全く相関性は認められない。



**Fig.2.** Dose dependent curves of stimulation-dependent luminol CL from neutrophils.

Guinea pig neutrophils ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in the medium of Krebs-Ringer-phosphate solution (pH7.4) containing 10mM glucose, 1mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $100 \mu\text{M}$  luminol. Luminol CL was detected by  $\text{Ca}^{++}$ -analyzer (type CA200, CL mode).

PMA, phorbol myristate acetate; FMLP, formylmethionyl-leucyl-phenylalanine; OZ, opsonized zymosan;

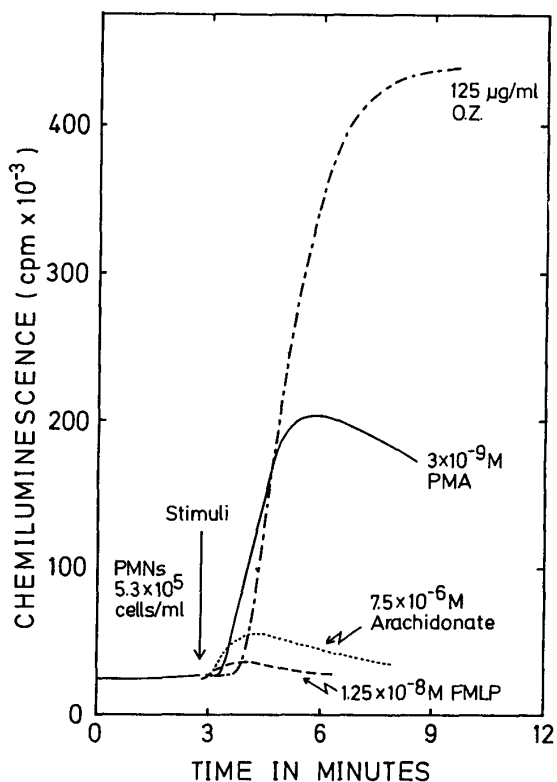


**Fig.3.** Superoxide generation of guinea pig neutrophils by the treatment with various stimuli.

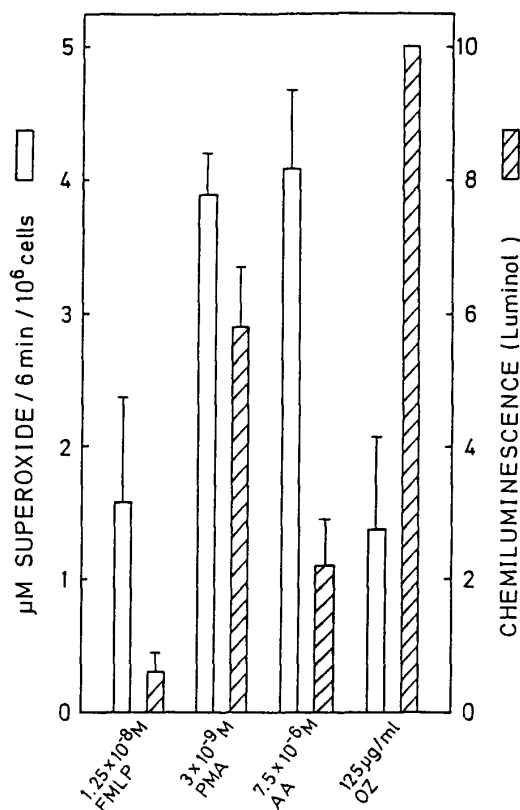
Neutrophils ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in the medium of Krebs-Ringer-phosphate solution (pH7.4) containing  $40 \mu\text{M}$  ferricytochrome c, 10mM glucose, 1mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.1mM  $\text{NaN}_3$ .

The rate of cytochrome c reduction was measured at 550nm with reference wave length of 540nm. The rate of superoxide generation was calculated from the absorption change using the molar extinction coefficient of 21,000. Concentrations of used stimuli were  $\text{ED}_{50}$  for luminol CL.

Each concentrations were indicated in the figure.



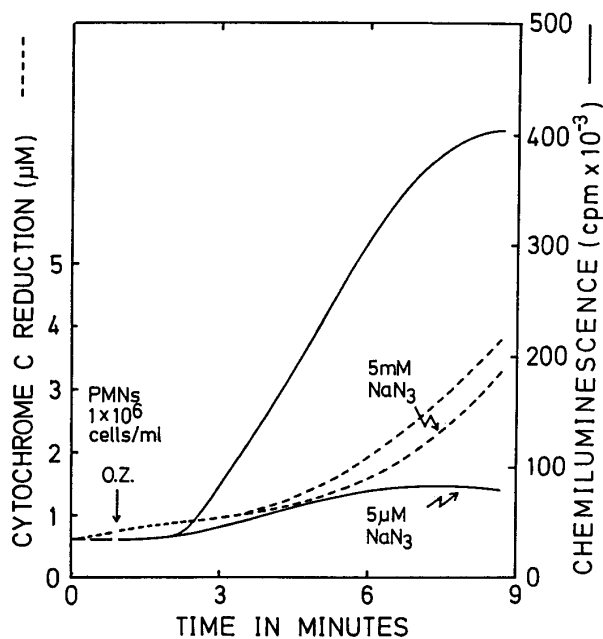
**Fig.4.** Luminol CL of guinea pig neutrophils induced by various stimuli. Experimental conditions were as described in Fig.2. Concentrations of used stimuli were ED<sub>50</sub> for luminol CL.



**Fig.5.** Relation between O<sub>2</sub><sup>-</sup> measured by Cyt. c reduction and active oxygen by luminol CL generated by various stimuli in neutrophils. O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation per unit period was compared with the luminol CL intensity as voluntary unit under the same condition as in Fig.3. The traces of CL were evaluated by calculating the area after 6 min. The arbitrary unit of CL corresponds to the relative area of integral CL when the area of OZ is fixed as 10.

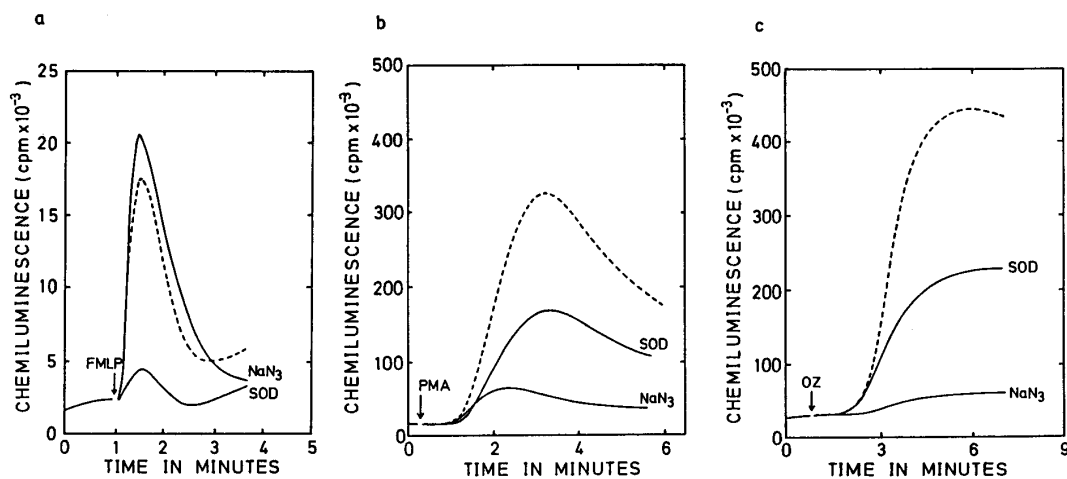
ルミノール CL で測定される好中球活性酸素量の superoxide dismutase (SOD) 及び NaN<sub>3</sub> 感受性

好中球の刺激応答性活性酸素の分子種が刺激物により著しく異なることは、刺激物によるルミノール CL の NaN<sub>3</sub> や SOD 阻害度の差からかなり詳しく分析することが可能である。



**Fig.6.** OZ-induced  $O_2^-$  generation and its susceptibility to  $NaN_3$  in guinea pig neutrophils. Experimental conditions were as described in Figs. 3 and 4 except the used cells were  $1 \times 10^6$  cells/ml.

—, CL ; - - - - , Cytochrome c reduction ;

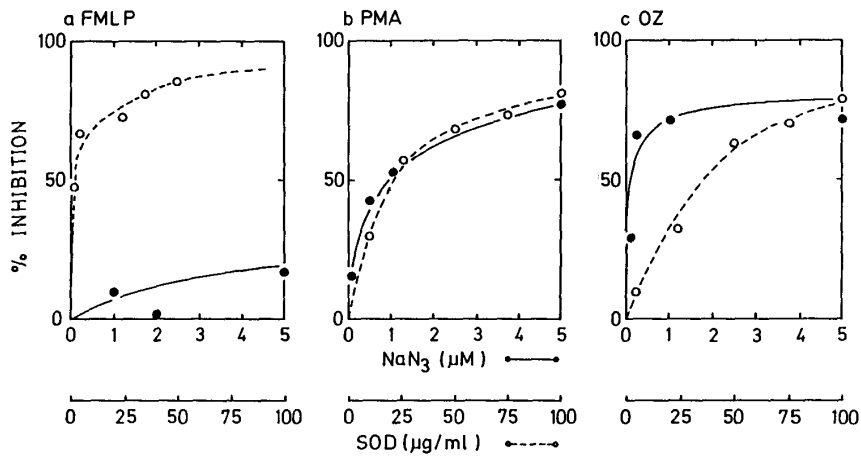


**Fig.7.** Effect of  $NaN_3$  and SOD on the stimulation-induced luminol CL from neutrophils.

Experimental conditions were as described in Fig.4

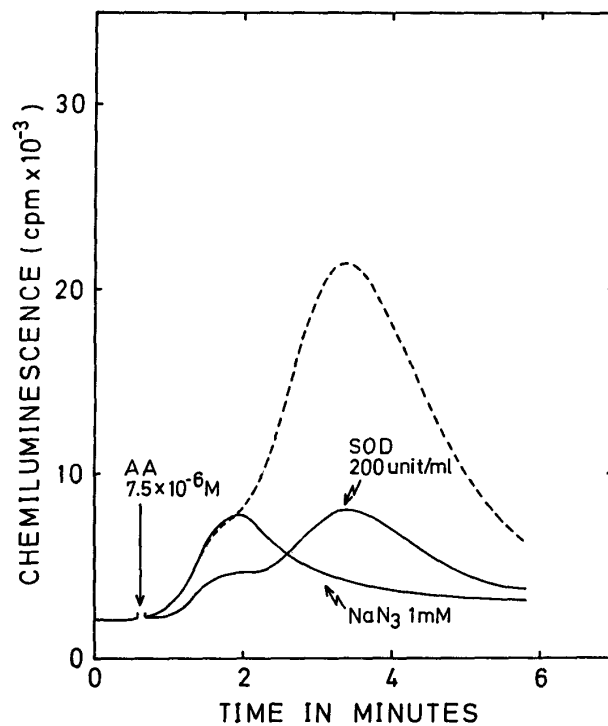
a,  $1.2 \times 10^{-8}$  M FMLP ; b,  $3 \times 10^{-9}$  M PMA ; c,  $125 \mu\text{g/ml}$  OZ

Fig. 6 は Cyt. c の還元で測定される  $O_2^-$  とルミノール CL で測定される活性酸素の  $NaN_3$  感受性を示す。即ち OZ 刺激時に示される  $O_2^-$  形成は  $NaN_3$  で全く影響を受けないが、CL はほと



**Fig.8.** Dose dependent inhibition of stimulation-induced luminol CL from neutrophils by  $\text{NaN}_3$  and SOD.

Experimental conditions were as described in Fig.7



**Fig.9.** Effect of SOD and  $\text{NaN}_3$  on the arachidonic acid-induced luminol CL from neutrophils.

Experimental conditions were as described in Fig.8.

The added arachidonic acid was  $7.5 \times 10^{-6} \text{M}$ .

んど完全に阻害されている。今この現象をさらに詳しく解析すると、Fig.7に示されるごとく、FMLPによるCLはSOD感受性が著しく高く、SOD存在下にCLはほとんど認められない

が、 $\text{NaN}_3$ ではむしろ増大され、このCLが $\text{O}_2^-$ に強く依存していることを示唆している。これに反しOZ刺激のCLは $\text{NaN}_3$ で完全に阻害され、SODによる阻害が比較的小さく、このCLがmyeloperoxidase (MPO) 活性に関係して生成される活性酸素分子種を反映していることを示唆する<sup>12)</sup>。そしてPMAによるCLの $\text{NaN}_3$ やSODによる阻害はFMLPとOZ刺激で示された $\text{NaN}_3$ 、SODによる阻害の中間的な感受性を示しAllen<sup>9)</sup>の結果とかなり異なる(Fig. 8)。またAAは二相性の反応を示し、始めに生成される活性酸素はSODにより、次に生成するそれは $\text{NaN}_3$ に阻害され、それぞれ $\text{O}_2^-$ 、MPOに依存した活性酸素分子種の生成を示唆している(Fig. 9)。

### 好中球の刺激応答性 $\text{H}_2\text{O}_2$ 生成とそのSOD及び $\text{NaN}_3$ による促進

Fig. 1に示したごとく、好中球は刺激に応答し、種々の反応により $\text{H}_2\text{O}_2$ を生成するが、この $\text{H}_2\text{O}_2$ 生成量も刺激物に依存して、著しい差が認められる。また反応系からも予期されるごとく、SOD、 $\text{NaN}_3$ によりその生成量が増大し(Fig.10)、かつその増大量も刺激物により異なる。これらのデータは $\text{H}_2\text{O}_2$ 感受性電極で測定したTest & Weissら<sup>13)</sup>の結果と一致する。即ちFMLPによる $\text{H}_2\text{O}_2$ 生成量は極めて小さいが、他のPMA、OZにのる生成は大きく、その度合はFMLP<OZ<PMAの順であった。またPMAやOZのそれが $\text{NaN}_3$ により著しく増大され、生成される $\text{H}_2\text{O}_2$ は強くMPOによる分解を受けていることを示唆している。

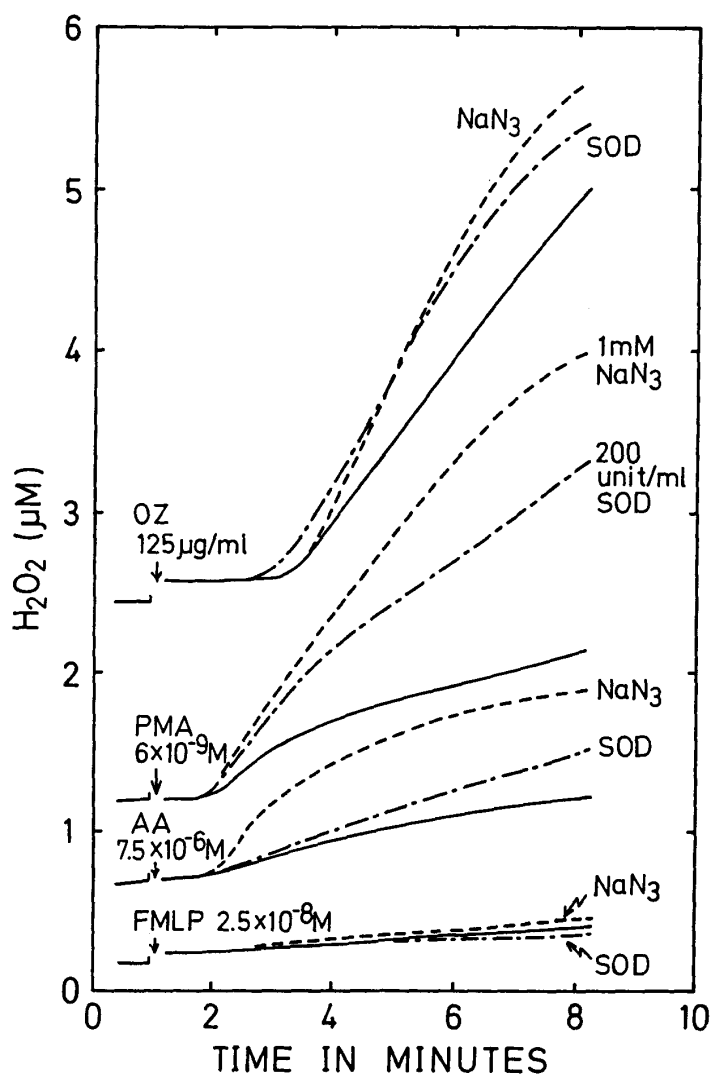
### 好中球によるルミノールCLのvanadateによる促進

vanadateはその化学構造からphosphataseの阻害作用、特にtyrosin-phosphataseの特異阻害剤として注目されている<sup>14)</sup>。しかしFridvichらはvanadateのNADPH oxidase活性促進作用の反応に注目し、それが種々の活性酸素生成の促進作用のあることを明らかにしている<sup>15,16)</sup>。事実Fig.11に示すごとくvanadateの濃度に依存してルミノールCLの増大が認められる。しかも予期されるごとく刺激物特異性が大きい。即ちvanadate濃度依存性は刺激物で著しく異なり、その促進作用はPMA<OZ<AA<FMLPの順に大きく、それが $\text{O}_2^-$ 依存性であることを示唆している。従って $\text{O}_2^-$ 生成のみを主体とするFMLPのCLはvanadateにより10倍以上促進されるが $\text{O}_2^-$ 生成につぐ、 $\text{OCl}^-$ や $^1\text{O}_2$ 生成を主体と他の刺激物によるCLに対する促進作用はそれほど大きくない。

## 〈結 論〉

好中球の刺激応答性の $\text{O}_2^-$ 生成、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 生成、ルミノール発光とその $\text{NaN}_3$ 、SOD阻害性及びvanadateによるルミノール発光増強作用から、各刺激物により活性酸素分子種やその生成量に著しい差のあることが明らかにされた。即ち、FMLPが $\text{O}_2^-$ 生成を主体とするのに対し、OZ、PMA、AAはその他の活性酸素、就中 $\text{NaN}_3$ に感受性の高いMPOの関与した $\text{OCl}^-$ や $^1\text{O}_2$ を主体とした活性酸素生成をしていることを明らかにした。





**Fig.10.** Effect of NaN<sub>3</sub> and SOD on the stimulation-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation from neutrophils.

Guinea pig neutrophils ( $2.5 \times 10^6$  cells/ml) were incubated at 37°C in the medium of Krebs-Ringer-phosphate solution (pH7.4) containing 10mM glucose, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 4μM scopoletin and 50mM horse radish peroxidase. Produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was monitored by the fluorescence intensity at 450nm under excitation light of 360nm.

〈参考文献〉

- 1) Babior, B.M., Kipnes, R.S. and Curntte, J.T. Biological defense mechanisms. *J. Clin. Invest.*, 52, 421-444, 1973

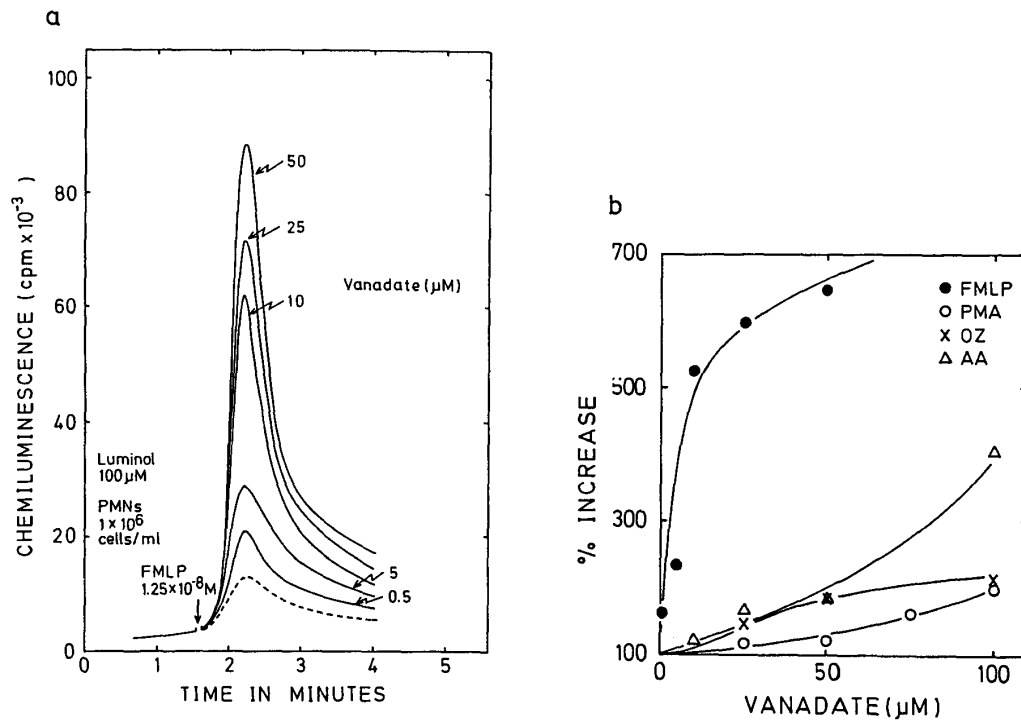


Fig.11. Stimulative effect of vanadate on the stimulation-induced luminol CL from neutrophils.

a. Effect of vanadate on the luminol CL of FMLP-stimulated neutrophils.

b. Dose dependency of vanadate for the stimulation of the luminol CL induced by various stimuli.

●—●,  $1.25 \times 10^{-8}$  M FMLP; ○—○,  $3 \times 10^{-9}$  M PMA;  
 ×—×, 125 μg/ml OZ; △—△,  $7.5 \times 10^{-6}$  arachidonic acid;

- 2) Romeo, D. *TIBS*, November, 408-411, 1982
- 3) Prince, R. and Gunson, D. *TIBS*, 12, March, 86-87, 1987
- 4) 浅田浩二, 活性酸素 (二木鋭雄, 島津弘幸編), 医歯薬出版, p33-63, 1987
- 5) Allen, R.C. *Methods in Enzymol.*, **133**, 449-493, 1986
- 6) Beauchamp, C. and Fridvich, I. *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287, 1971
- 7) Utsumi, K., Sato, E., Okimasu, E., Miyahara, M. and Takahashi, R. *FEBS Lett.*, **201**, 277-281, 1986
- 8) Morimoto, Y.M., Sato, E., Nobori, K., Takahashi, R. and Utsumi, K. *Cell Struct. & Funct.*, **11**, 143-155, 1986
- 9) Andrae, W.A. *Nature*, **175**, 859-860, 1955
- 10) Root, R.K. and Metcalf, J.A. *J. Clin. Invest.*, **60**, 1266-1279, 1977
- 11) 柿沼カツ子, 白血球と食作用 (水上茂樹, 柿沼カツ子編), 講談社, 93-124, 1979
- 12) Klebanoff, S.J. *Science*, **169**, 1095-1097, 1970
- 13) Test, S.T. and Weiss, S.J. *J. Biol. Chem.*, **259**, 399-405, 1984

- 14) Swarup, G., Cohen, S. and Garbers, D.L. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **107**, 1104-1109, 1982
- 15) Liochev, S. and Fridvich, I. *Biochem. Biophys. Acta*, **924**, 319-322, 1987
- 16) Liochev, S. and Fridvich, I. *Arch. Biochem. Biophys.*, **263**, 299-304, 1988

(1989年 9 月 6 日受理)