

インターロイキン-1の副腎髄質カテコール アミン遊離抑制作用

宮 迫 隆 典

Inhibition by Interleukin-1 of Catechol-amine Release from Adrenal Chromaffin Cells

Takanori Miyasako

(平成7年4月26日受付)

緒 言

内分泌、神経系及び免疫系は、ストレスを始めとする外部及び内部環境からの各種刺激に対し、内部環境の恒常性を保つ調節系をなしている。従来、これらはそれぞれに独立して役割を分担していると考えられてきたが、近年、これらの系はお互いに密接に関連し、相互作用を及ぼし合い（クロストーク）ながら、統合して生体調節系として働いていることが重要視されてきている。例えば内分泌系と神経系においては、視床下部を介した相互作用はよく知られている¹⁾。

一方、免疫系はそれ自身が自己制御機能を持つ閉じた系と考えられていたが、内分泌系及び神経系が免疫機能に影響を及ぼすことが明らかにされてきている。視床下部-下垂体-副腎系はストレスに対応する最も良く知られた内分泌系ネットワークとして理解されているが、副腎皮質ホルモンはリンパ球に対し強力な抑制作用を有する²⁾。逆に、感染等のストレスの場合は、免疫細胞から分泌されたサイトカインは視床下部を刺激して副腎皮質ホルモンの分泌を促すという連関がある¹⁾。

神経系と免疫系のクロストークについては、情動や心理的な要素が内分泌系はもとより免疫系にも影響を及ぼす³⁾。感覚器を通る刺激によっては視床-大脳皮質-辺縁系で情動に変換され、視床下部を経て免疫機能を修飾する経路もある。

末梢においても、重要なリンパ組織に自律神経線維の終末が分布する。胸腺に分布する自律神経の中、副交感神経はニコチン様アセチルコリン受容体を介して胸腺リンパ球の分化・増殖を促進する⁴⁾。脾臓は主に交感神経により支配され、リンパ球への直接のシナプス形成があるものと考えられている。

Besedorvsky ら⁵⁾は、ラット脾交感神経を除神経することにより、脾細胞のヒツジ赤血球に対する抗体産生能が増加することを示した。脾臓の交感神経の電気刺激はナチュラルキラー（NK）活性の低下をもたらすことや、ラット脳室内に副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）を投与すると、自律神経を介して脾臓のNK活性が低下することが報告されている⁶⁾。即ち、交感神経は白血球に対し、抑制的に支配している。

他方、マウス疼痛刺激⁷⁾や鍼刺激⁸⁾によっては脾臓リンパ球の抗体産生能は増加し、この増加は神経節遮断薬やβ遮断薬により消失することから、交感神経-副腎髄質を介し、分泌されたカテコールアミン（CA）のβ作用に基づくものとの報告がある⁷⁾。この様に、脾臓でのリンパ球の免疫活性は交感神経や副腎髄質により、抑制的に或いは促進的に調節を受けている。その他骨髄やリンパ節にも自律神経支配がある等、免疫組織にも神経支配が及んでいる。

免疫系の神経系への働きかけについては、神経が損傷を受けた場合、神経組織の周辺に出現するマクロファージがインターロイキン-1（IL-1）を分泌し、髄鞘シュワン細胞から神経成長因子（NGF）の産生を刺激し、神経の再生に寄与する⁹⁾。又、末梢免疫組織を支配する自律神経終末に対し、免疫細胞から分泌されたサイトカインが局所的に直接神経機能を修飾すると

広島大学歯学部歯科薬理学講座（主任：土肥敏博教授）本論文の一部は第36回歯科基礎医学学会総会（1994年10月、大阪市）において発表した。（歯科基礎誌 suppl. 36, 111, 1994.）

の考えがある。サイトカインは交感神経細胞の生存に影響する¹⁰⁾ことや、腫瘍壊死因子 (TNF) が頻回刺激による上頸交感神経節からの $[^3\text{H}]$ ノルアドレナリン (NA) 遊離を抑制する¹¹⁾との報告があるが、詳しいことは解かっていない。細菌やウイルス感染に際し、急性期反応としての発熱や疼痛等の中枢神経症状或いは癌、自己免疫疾患、慢性感染症、エイズ等の治療にサイトカインが用いられることがあるが、この時の傾眠、鬱状態、錯乱などの精神障害の発現はサイトカインの中枢神経系への直接作用が関与する¹²⁾。この様に、神経、内分泌、免疫の3つの系にクロストークがあり、これらの系のバランスが保たれることが重要であるが、それぞれのシステムの機能が個体の発生、成長、老化の各過程で独自に変化する。Sakuma ら¹³⁾は各種刺激に対する副腎CA分泌反応において、幼若犬は成犬に比べ感受性が高いことを示している。この様に、ストレス感受性の強い幼少期やホルモン分泌能、免疫機能の低下が著しい老年期には、これら系間のバランスが崩れ易く、ストレスへの抵抗性が減じ、疾病の誘因となり得る。以上の如く、恒常性維持にこれらの系のクロストークの重要性が認識されてきている。しかし、それら相互作用の実体とその機序については、ほとんど知られていない。

本研究は、神経系と免疫系の相互作用について、特にこれまでほとんど解かっていない免疫系の神経機能に及ぼす作用を明らかにすべく検討を企てた。副腎は各種刺激に応じて皮質からは副腎皮質ホルモンを、髄質からは CA やエンケファリンを分泌してストレスに対応する末梢での中心的器官である。従って、本研究では、サイトカインの神経伝達に対する作用について、サイトカインネットワークの中で中心的な位置を占める IL-1 を中心に副腎髄質クロマフィン細胞CA分泌に対する作用とその機序について検討した。

材料ならびに方法

I. イヌ副腎灌流実験

実験には室温 (23±3°C) で飼育した体重 6-15 Kg の健康な雑種成犬を雌雄の別なく使用した。イヌを sodium pentobarbital (30 mg/kg 静脈内投与) にて麻酔後、腹部大動脈より放血致死せしめ、両側副腎を速やかに摘出後、Robinson の方法に準拠し逆灌流を行なった^{14,15)}。灌流は100% $_2$ ガスで飽和した modified Krebs-Ringer phosphate 液 (NaCl 137.5 mM, KCl 5.5 mM, CaCl_2 1.3 mM, MgSO_4 1.38 mM, KH_2PO_4 1.38 mM, Na_2HPO_4 10.6 mM, glucose 8.5 mM, bovine serum albumin (BSA) 0.1%, pH 7.3) で水柱 60 cm 压力下 (灌流量 1.5-3.6 ml/min) に 30±1°C の条件

にて定圧灌流を行なった。灌流流出液は50%過塩素酸 (PCA) を含む試験管に15秒毎に連続的に採取し (最終 PCA 濃度, 5%), 遠心にて除タンパク後上清 0.2 ml を分取し, CA の測定に供した。

II. クロマフィン細胞を用いた実験

1. 細胞の単離法と培養法

ウシ副腎髄質クロマフィン細胞の単離は、Fenwick らの方法を改良し行なった^{16,17)}。即ち、副腎を Ca^{2+} , Mg^{2+} free-Krebs Ringer phosphate (KRP) 液 (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, CaCl_2 1.3 mM, MgSO_4 1.1 mM, Na_2HPO_4 2.15 mM, NaH_2PO_4 0.85 mM, glucose 10 mM, pH 7.4) で灌流し、血液を洗浄後、0.015% collagenase, 0.004% trypsin inhibitor, 20 unit/ml RNase I, 0.5% BSA を含む Ca^{2+} , Mg^{2+} free-KRP 液を用い 37°C で40分間循環灌流した。副腎髄質を皮質から分離、細切した後、新しい酵素液で 37°C, 20分間 O_2 を通気しながら強く振盪して細胞を単離した。単離した副腎髄質クロマフィン細胞を遠心 (10×g, 10分間) にて3回洗浄後、10%ウシ胎児血清, 100 unit/ml penicillin G, 100 μg/ml streptomycin, 0.1 mM ascorbate, 5 mM HEPES を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM 培地) 中に浮遊させた。CA 遊離実験には、培養用プラスチックシャーレ (35 mm 径) に 10^6 cells/2 ml/dish で単層培養を行なった。培養は 5% CO_2 , 95%空気とした気相下 37°C に恒温した CO_2 インキュベータ中で行ない、培養液は2-3日毎に交換した。実験には培養5-7日目の細胞を用いた。細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定には 5×10^5 cells/ml 密度の細胞浮遊液 80 ml を Erlenmeyer plastic flask に分注し、 CO_2 インキュベータ中にて 24-72時間浮遊培養した細胞を使用した。

2. CA 遊離実験

単層培養した細胞は、予め培養液を0.1% BSA を含む KRP 液と交換することにより5回洗浄し、室温にて2時間放置した後、実験に供した。新しい KRP 液あるいは前処置薬物を含む KRP 液 1 ml と交換し、37°C でプレインキュベーション後、さらに各種薬物を含む KRP 液と交換することにより反応を開始した。一定時間インキュベーションした後、反応液 0.5 ml を試験管 (50% PCA, 50 μl を含む) に分取し、除タンパク後、上清を CA 量の定量に供した。 Ca^{2+} -sucrose medium は CaCl_2 1.3 mM, BSA 0.1% を含む HEPES-Tris buffer (pH 7.3±0.1) に等張となる様に sucrose を添加した。

3. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定は、クロマフィン細胞に Ca^{2+} 感受

性蛍光色素, fura-2 を負荷し, 二波長蛍光測光の比より測定した¹⁸⁾。

浮遊培養した副腎クロマフィン細胞を NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 1.3 mM, glucose 5 mM, BSA 0.5%, HEPES-Tris buffer 10 mM (pH 7.3±0.1) を含む溶液で洗浄後, fura-2 acetoxy-methyl ester (1 μM) を含む溶液に浮遊し, 32°C で40分間インキュベーションすることにより細胞に負荷した。fura-2 を負荷した細胞を遠心 (10×g, 10分間) にて2回洗浄した後, 細胞浮遊液 (5×10⁷ cells/ml) を調整した。調整した細胞は使用時まで冷水中 (5°C) に保存した。[Ca²⁺]_i の測定には, 蛍光分光光度計 (Hitachi F2000) を用い, 細胞浮遊液 (細胞密度 3×10⁶ cells/ml) を 32°C に恒温したキュベット中でゆっくり攪拌しつつ, 二励起波長 (340 nm, 380 nm) での蛍光強度 (蛍光波長 510 nm) の比から以下の式により計算した。

$$[Ca^{2+}]_i = K_D \left[\frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \right] \cdot \frac{F_{\min}(\lambda 380) / F_{\max}(\lambda 380)}{R} \\ R = \frac{F(\lambda 340) / Z(\lambda 340)}{F(\lambda 380) / Z(\lambda 380)}$$

R_{max}: Ca²⁺ 存在下での fura-2 の飽和 R 値

R_{min}: 無 Ca²⁺ 下での fura-2 の R 値

Z: サンプルの自己蛍光

K_D: 解離定数は 224 nM を使用した (Gryniewicz ら¹⁹⁾)

Digitonin (100 μM) で細胞膜を透過性とする事により F_{max} を, アルカリ条件下 EDTA (10 mM) で Ca²⁺ をキレートすることにより F_{min} を求めた。薬物は 1–10 μl に溶解し添加した。Veratridine は ethanol に溶解し, 添加した (最終 ethanol 濃度 0.1% 以下)。細胞外液の組成を変化させるときは, 遠心 (500 ×g, 30秒) にて洗浄後, 組成を変化させた溶液に細胞を再浮遊させた。

4. Digitonin で膜透過性とした副腎クロマフィン細胞からの Ca²⁺ による CA 遊離の測定

単層培養したクロマフィン細胞を KRP 液にて洗浄後, IL-1 100 pg/ml を含む, 或いは含まない KRP 液で 37°C 30分間インキュベーションした後, 1 mM EGTA を含む Ca²⁺ free-KRP 液で2回洗浄して細胞外 Ca²⁺ を除去し, 更に Ca²⁺ free-KG medium (150 mM L-gultamic acid monopotassium salt, 10 mM PIPES, 5 mM nitrotriacetic acid, 0.5 mM EGTA, 5 mM Mg-ATP, 4.5 mM magnesium acetate, 0.2% BSA, pH 7.0) で1回洗浄後, 10 μM digitonin を含む KG medium で37°C, 5分間インキュベーションすること

により膜透過性とした。種々の Ca²⁺ 濃度の KG medium と交換することにより反応を開始した。37°C にて20分間のインキュベーション後, 反応液を分離し, 5% PCA により除タンパクした後, 上清を CA 量の定量に供した。IL-1 処置した細胞は反応終了時まで IL-1 存在下で行なった。遊離 Ca²⁺ 濃度の調整は, カルシウムイオン電極及び fura-2 により調整し, 遊離 Mg²⁺ 濃度は nitrotriacetic acid と magnesium acetate を用い 1 mM に固定した。

III. CA の定量

採取した試料の総 CA 量は, L-adrenaline (Ad) を標準とし, Euler and Lishajko²⁰⁾ の trihydroxyindole 法に従い, 蛍光的に定量した。蛍光分光光度計は Hitachi 650–10 M を用い, 起波長 450 nm, 蛍光波長 515 nm で測定した。

IV. ノルアドレナリン (NAd), アドレナリン (Ad) の定量

PCA による除タンパク液に, 内部標準として dihydroxybenzylamine を加えた後, 1 mM EDTA を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), 50 mg 酸処理アルミナ, 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.6) を加え, pH 8.6 のもとで攪拌し CA をアルミナに吸着させた。このアルミナを蒸留水で3回洗浄した後, 充分に水分を除去後 0.1 M PCA を加え CA を溶出した。この上清を孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター (ガスクロ工業 RC58) で濾過し, 電気化学検出器 (BAS LC-4B) を用いた高速液体クロマトグラフィー (日本分光 PU-980) で NAd と Ad の分離定量を行なった。分離には BAS BIOPHASE ODS IV 3 μm カラムを使用し, 移動相は 0.15 M monochloroacetic acid, 0.1 M NaOH, 2 mM EDTA と sodium octylsulfate, pH 3.0 からなり, 流速は 0.8 ml/min, 検出器電位は 0.7 Kv で使用した。

V. 統計処理

有意差の検定は Student's *t*-test により行なった。

VI. 主な使用薬物

Recombinant [E. Coli]: human sequence interleukin-1 α, recombinant [E. Coli]: human sequence interleukin-1 β, recombinant [E. Coli]: human sequence interleukin-1 receptor antagonist, recombinant [E. Coli]: human sequence TNF α (R & D systems Inc.), acetylcholine hydrochloride (第一製薬株式会社), anisomycin, cycloheximide, dexamethasone, diltiazem hydrochloride, in-

domethacin, veratridine (Sigma), bradykinin (ペプチド研究所), H-89 (生化学工業), thapsigargin (LC Service Co.), forskolin (Calbiochem), fura-2 acetoxyethyl ester (同仁化学研究所), actinomycin D, digitonin, herbimycin A, (和光純薬), staurosporine (Boehringer Mannheim), erbstatin analog (Biomol Res. Lab.). 他の一般試薬はすべて特級の試薬を用いた。

結 果

I. サイトカインの副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン (CA) 遊離に対する作用

1. 刺激誘発 CA 遊離に対する作用

イヌ摘出灌流副腎は各種薬物に反応性が高いので、まず、この標本においてサイトカインの作用を検討した。

アセチルコリン (ACh) $5 \mu\text{M}$ を30秒間適用し、15秒間隔で連続採取した時の灌流液中への CA 遊離パターンとインターロイキンの作用を図1に示す。ACh 適用後1分をピークとする CA 遊離が認められた。この CA 遊離が静止レベルに回復し、20分後にヒト組換え IL-1 α 100 pg/ml で、持続灌流下に ACh を同様に、繰り返し作用させると、ACh による CA 遊離は対照に比べ減少した。この様な IL-1 α による CA 遊離抑制は時間と共に強くなり、IL-1 α を30分間適用後、洗

浄した後も抑制は長時間持続し、210分後から回復が認められた。この様に、IL-1 α に洗浄後も長時間にわたり抑制が持続する特徴的な作用を見いだした。尚、IL-1 α は単独で挿入図に示す様に若干 CA 遊離を促進した。

図2は ACh ($5 \mu\text{M}$) を30分間隔で繰り返し添加した時の CA 遊離量を1回目の刺激に対する割合で現わしたもので、サイトカインは2回目刺激10分前から4回目の刺激終了時間まで添加している。IL-1 α , 1 β は共に長時間持続する強い抑制作用を示した。TNF α にも抑制作用が認められたが、これらに比べ弱いものであった。熱処理 (95°C , 30分) した IL-1 α は無効であった。以後の実験には主に IL-1 α を使用した。

イヌ摘出灌流副腎からの CA 刺激遊離を IL-1 が抑制することが明かとなったので、さらにその詳細について、ウシ培養クロマフィン細胞を用いて検討を加えた。IL-1 α (100 pg/ml) 30分前処置は ACh (図3A) 及び高濃度 KCl (図3B) による CA 遊離を共に抑制し、最大分泌反応も約40%抑制することを認めた。IL-1 α の CA 遊離抑制作用は内因性 IL-1 受容体阻害タンパク質により拮抗された (図3C)。

IL-1 の CA 遊離抑制作用は図1に示した様に、洗浄後も長時間持続したので、作用発現の時間についても検討した。ACh 及び高濃度 KCl による CA 遊離に対する IL-1 α の抑制作用は、いずれの場合も10分以

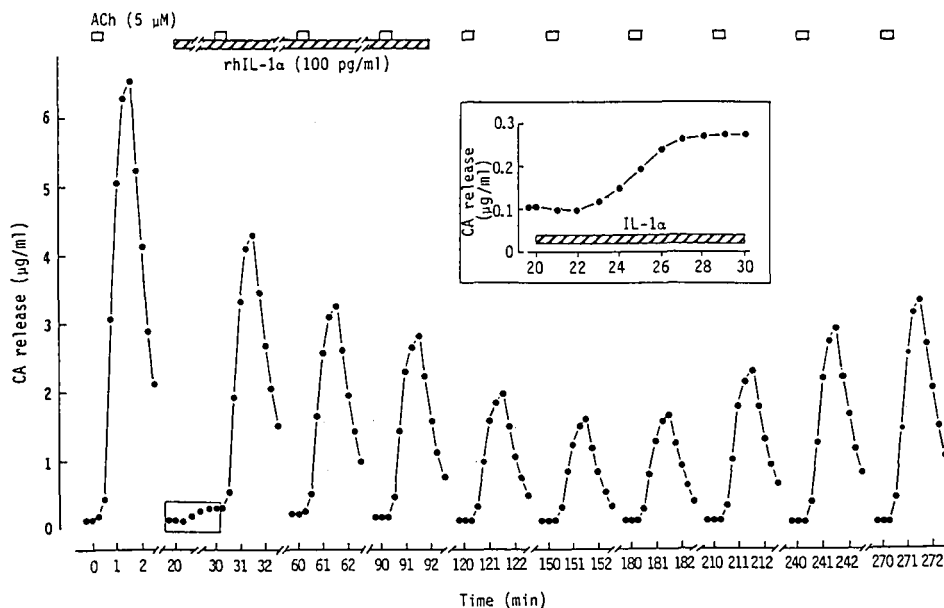


図1 イヌ摘出灌流副腎におけるアセチルコリン (ACh) 30秒間適用によるカテコールアミン (CA) 遊離経時変化と遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 α (rhIL-1 α) の影響。挿入図は IL-1 α 単独による CA 遊離を示す。

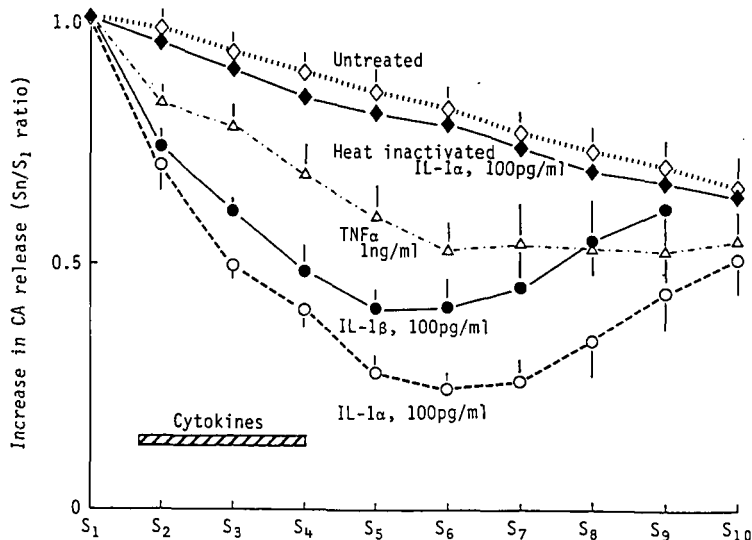


図2 イヌ摘出灌流副腎における ACh (5 μ M) による CA 遊離に対する各種サイトカインの影響

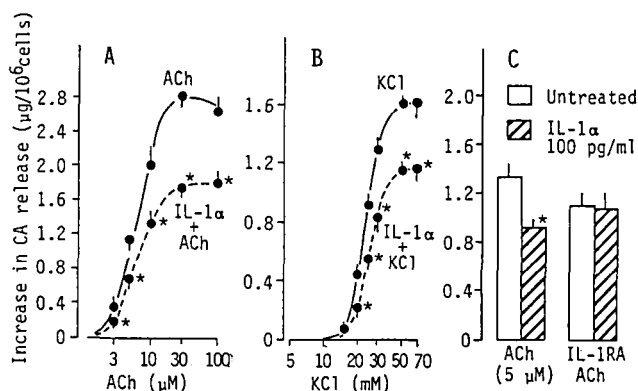


図3 ウシ培養副腎髄質クロマフィン細胞における ACh (A) 及び高濃度 KCl (B) による CA 遊離の IL-1 α による抑制並びに IL-1 受容体阻害蛋白質 (IL-1RA) による拮抗 (C)

IL-1 α は30分前に処置した *P<0.01.

上の潜時の後に発現し、以後前処置時間と共に抑制作用が強くなった (図4)。以上の様に、IL-1 は単独では僅かに CA 遊離を促進するに過ぎないが、刺激誘発 CA 遊離を強く抑制すること、その作用は IL-1 受容体を介して発現し、作用発現に時間を要すること、又、洗浄後も長時間持続することが明かとなった。

2. CA 含量及び Ad/NAd 分泌割合に及ぼす影響

IL-1 による抑制は CA の生合成を抑制した結果なのか、又、クロマフィン細胞には Ad 及び NAd 含有細胞が存在するが、いずれかの細胞に特異的に作用が発現しているかどうかについて検討した。

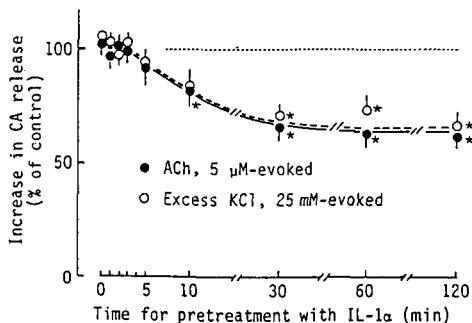


図4 ウシ培養副腎髄質クロマフィン細胞における刺激誘発 CA 遊離の IL-1 α 抑制の前処置時間の影響 *P<0.01.

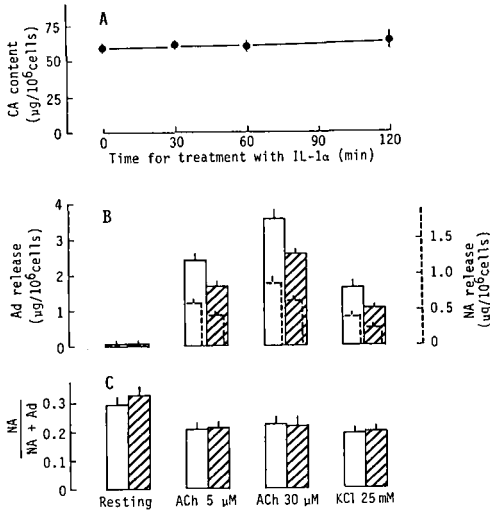


図5 CA含量及びアドレナリン(Ad)とノルアドレナリン(NA)分泌割合に及ぼすIL-1 α の影響 □ Control; ▨ IL-1 α , 100 pg/ml, A含量, B Ad(実線)とNA(破線)遊離, C NA/Ad ratio

IL-1 α を処置した細胞と処置しない細胞の total CA 含量において、IL-1 α の処置による変化は認められなかった(図5A)。又、AdとNAdの分泌量を高速液体クロマトグラフィーにより分別定量した。その結果、分泌割合はIL-1 α によって変化しなかった(図5B, C)。従って、IL-1 α による遊離抑制はCA生合成の抑制によるのではなく、又、AdとNAdの分泌割合を変化させるものではなかった。

II. 細胞内遊離Ca²⁺濃度に対するIL-1の作用

副腎クロマフィン細胞からのCA遊離には細胞内遊離Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)が上昇することが必須である。そこで、IL-1の[Ca²⁺]_iに及ぼす影響について検討を加えた。

IL-1 α (100 pg/ml) は単独で軽度のゆっくりとした持続性の[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした。AChを添加すると一過性の大きな[Ca²⁺]_i上昇と、それに続く持続した上昇が認められるが、IL-1 α 5分前処置細胞では、処置しない細胞に比べ[Ca²⁺]_i上昇は若干抑制された(図6)。

IL-1 α を30分間前処理した細胞においては、AChによる[Ca²⁺]_i上昇は顕著に抑制された。KClによる[Ca²⁺]_i上昇に対してもIL-1 α は同様に抑制し、約50%まで抑制した(図6)。

IL-1の[Ca²⁺]_i上昇抑制に対する濃度作用曲線に関しては、IL-1 α はACh 5 μ M, 15 μ M, KCl 17 mM

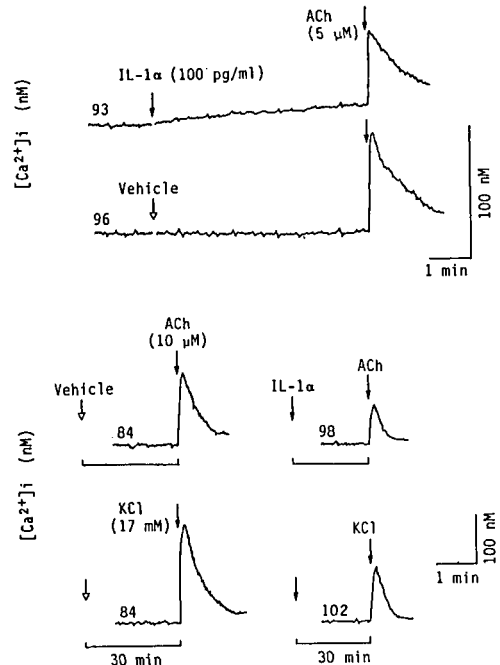


図6 ウシ培養副腎髄質クロマフィン細胞におけるACh及び高濃度KClによる細胞内遊離Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)上昇に及ぼすIL-1 α の影響

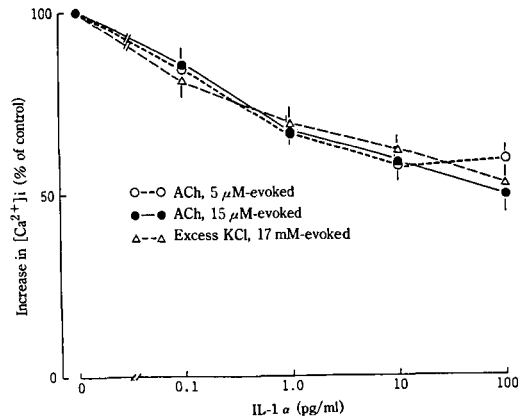


図7 ウシ培養副腎髄質クロマフィン細胞における刺激誘発[Ca²⁺]_i上昇に対するIL-1 α 抑制の濃度作用曲線

のいずれにおいても同様に0.1 pg/mlから濃度依存的に抑制した(図7)。

IL-1の[Ca²⁺]_i抑制に対する時間依存性に関しては、作用発現までに数分の潜時を必要とし、時間と共にその作用は強くなった(図8)。この様に、IL-1のCA遊離抑制作用と[Ca²⁺]_iに対する作用動態はよく一致しており、[Ca²⁺]_i上昇阻害が関与することが示

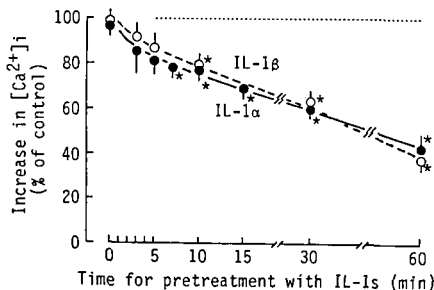


図8 IL-1 α 及び1 β のACh誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇抑制における前処置時間の影響 * $P < 0.01$.

唆された。

III. IL-1のCA遊離抑制作用の機序

1. Ca^{2+} チャンネルの関与について

IL-1のCA遊離抑制作用に Ca^{2+} 動態に対する作用が示唆されたので、 Ca^{2+} チャンネルの関与について検討した。

IL-1 α の30分前処置は Ca^{2+} -ionophoreであるionomycinによるCA遊離は阻害しなかった。 Na^+ -ionophoreであるveratridineによるCA遊離に対しては抑制を認めた。この抑制作用は、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害剤diltiazem 30 μM 存在下では消失した(図9)。このことから電位依存性 Ca^{2+} チャンネル(VOC)の関与が示唆される。そこで他のイオンチャンネルの関与を排除する為、外液に Ca^{2+} のみを含むmedium中でのAChによるCA遊離に対するIL-1の作用を調べた。この目的のために、 Ca^{2+} 以外の陽イオンを含まないsucrose等で等張としたmediumを用いた。AChはこのmedium中でもCA遊離を引き起こし、IL-1 α はこの条件下でもAChの作用をnormal medium中と同程度に抑制作用を示した(図9)。

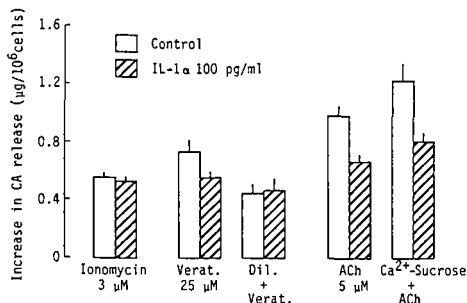


図9 IL-1 α のCA遊離抑制に対する各種処置の影響 IL-1 α は30分前に処置した。

Verat.: veratridine; Dil.: diltiazem, 30 μM

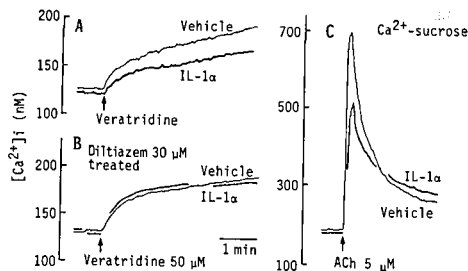


図10 ベラトリジンによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対するIL-1 α の作用(A)とそれに対するジルチアゼムの影響(B)及び Ca^{2+} -蔗糖溶液中でのAChによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対するIL-1 α の作用(C)

この時の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を図10に示す。veratridineはゆっくりと長時間持続する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした(図10A)。IL-1 α の30分前処置は、veratridineによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制した。Diltiazem存在下でのveratridineによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対してはIL-1 α は抑制しなかった(図10B)。 Ca^{2+} -sucroseとしたmedium中でのAChによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はIL-1 α により抑制された(図10C)。これらの成績はIL-1 α によるCA遊離抑制の結果と良く相関していた。これらのことを併せ考えると、IL-1はVOCを通る Ca^{2+} 流入を阻害することにより $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制し、その結果CA遊離を抑制している可能性が考えられる。

一方、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には、VOC以外の Ca^{2+} チャンネルを通る Ca^{2+} 流入、或いは細胞内 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 動員も関与する。そこで、これらの系に対するIL-1の作用を検討した。Bradykininはクロマフィン細胞においても、bradykinin受容体に作用してphosphatidylinositol(IP_3)代謝回転を促進し、その結果産生するイノシトール(1,4,5)三リン酸(IP_3)により、細胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を遊離することが知られている。Bradykininは、 Ca^{2+} を除去したmedium中において一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こした。IL-1 α の30分前処置は、bradykininの作用に影響を及ぼさなかった(図11)。Caffeineは、 IP_3 感受性プールとは別の Ca^{2+} プールから、 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release(CICR)機構を促進して、 Ca^{2+} を動員することが知られている。このcaffeineによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対してもIL-1 α は影響を及ぼさなかった(図11)。近年、細胞外 Ca^{2+} の流入機構としてVOCとは別に、細胞内 Ca^{2+} プールの Ca^{2+} が減少することが引き金となって細胞膜 Ca^{2+} 流入機構を活性化して、 Ca^{2+} 流入を引き起こすという考えが提唱されている。Thapsigarginは Ca^{2+} プールの膜 Ca^{2+} -ATPaseを特異的に阻害し、プールへの Ca^{2+}

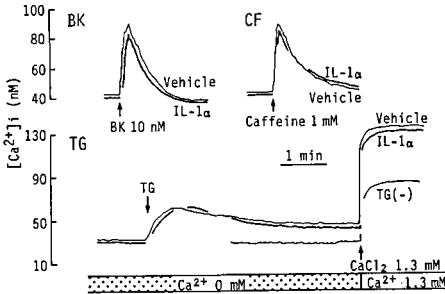


図11 細胞外 Ca^{2+} 除去溶液中でのブラジキニン (BK)、カフェイン (CF) およびタプシガルジン (TG) による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する IL-1 α の影響並びに $CaCl_2$ 添加による Ca^{2+} 流入に対する IL-1 α の影響

取り込みを抑制して、プール内 Ca^{2+} を枯渇させることが知られている。 Ca^{2+} を除去した medium 中で thapsigargin を作用させると、ゆっくりとした $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が見られ、やがて元のレベルにまで低下した。この後、 $CaCl_2$ を medium に添加すると、thapsigargin を作用させない細胞に比べ、作用させた細胞では $[Ca^{2+}]_i$ は大きく上昇した。これは Ca^{2+} 流入を反映していると考えられる。このような Ca^{2+} 流入に対し、IL-1 α は影響を及ぼさなかった (図11)。従って、IL-1 α はこれら細胞内 Ca^{2+} 動員系及び Ca^{2+} 流入機構には作用しないものと思われる。

$[Ca^{2+}]_i$ 上昇以後の開口分泌に至る過程に、IL-1 が作用する可能性について検討した。Digitonin で細胞膜透過性とした細胞で、medium 中の Ca^{2+} 濃度を 20 nM から 5 μ M まで変化させると、約 1 μ M をピークとする CA 遊離が観察された。IL-1 α を前処置した後、digitonin で膜透過性とした細胞においても、この直接 Ca^{2+} により引き起こされる CA 遊離の濃度作用曲線は影響されなかった (図12)。

2. IL-1 受容体と共役する情報伝達系について

IL-1 受容体のシグナル伝達機構に関しては未だ明かではないが、最近、細胞膜 GTP 結合タンパク質を介する系、チロシンキナーゼを介する系等いくつかの系が考えられている。そこで、これらの系の関与について検討した。

Cyclic AMP 依存性プロテインキナーゼ (PK-A) 阻害剤 H-89、プロテインキナーゼ C (PK-C) 阻害剤 staurosporine、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤 dexamethasone、及びシクロオキシゲナーゼ阻害剤 indomethacin の IL-1 の CA 遊離抑制作用に対する影響を検討したが、いずれも阻害を認めなかった (図13)。

次にチロシンキナーゼの関与について、チロシンキ

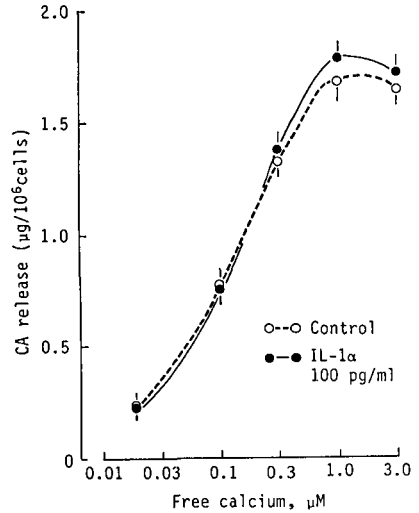


図12 ジグトニン処置膜透過性クロマフィン細胞において Ca^{2+} によって誘発される CA 遊離に対する IL-1 α の影響
IL-1 α は30分前処置

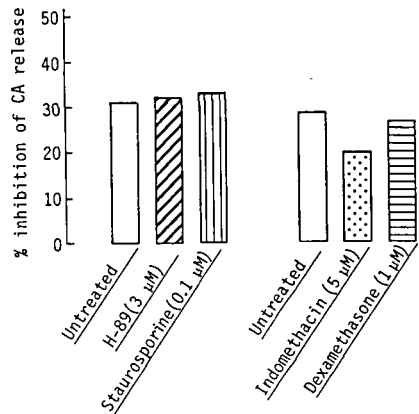


図13 プロテインキナーゼ阻害剤、インドメサシン及びデキサメサソンの IL-1 α による ACh 誘発 CA 遊離抑制に対する影響
H-89、スタウロスポリン、インドメサシンは IL-1 α 処置30分前に、デキサメサソンは90分前処置し、IL-1 α は ACh (5 μ M) の30分前に処置した。

ナーゼ阻害剤 erbstatin analog と herbimycin A を用いて検討した。ACh (5 μ M) 及び高濃度 KCl (25 mM) 刺激による CA 遊離の IL-1 α による抑制に対し、erbstatin は効果が認められなかったが、より特異的な阻害剤である herbimycin A により reverse された (図14)。従って、チロシンキナーゼによるリン酸化が関与する可能性が示唆された。

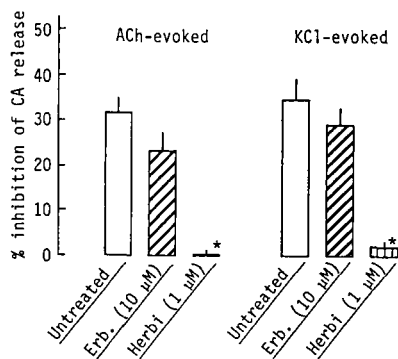


図14 IL-1 α の刺激誘発 CA 遊離抑制作用に対するチロシンキナーゼ阻害剤の影響

Erb.: erbstatin analog (▨), Herbi: herbimycin A (▤) 30分前処置 *P<0.01

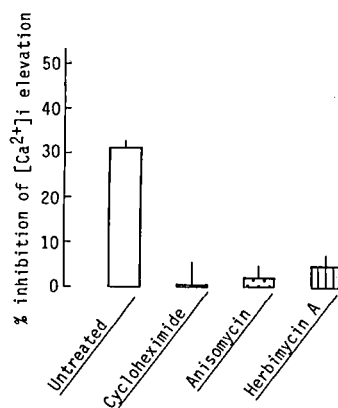


図16 タンパク質合成阻害剤及びチロシンキナーゼ阻害剤の IL-1 α による ACh (5 μ M) 誘発 [Ca²⁺]_i上昇阻害に対する作用

3. タンパク質合成の関与

IL-1 の CA 遊離抑制作用はその発現が遅く、洗浄後も持続する特徴的なものであった。又、チロシンキナーゼを介する情報伝達にはタンパク質合成を介すものが知られている。そこで、IL-1 の作用にタンパク質合成の関与を考え、タンパク質合成阻害剤の作用について検討した。タンパク質合成阻害剤 cycloheximide 及び anisomycin の 1 時間前処置により、IL-1 α の CA 遊離抑制作用は消失した。Actinomycin D では抑制されなかった (図15)。さらに、cycloheximide, anisomycin 及び herbimycin A は、IL-1 α の ACh による [Ca²⁺]_i 上昇に対する抑制作用を阻害した (図16)。従って、mRNA から急速なタンパク質合成を介し、

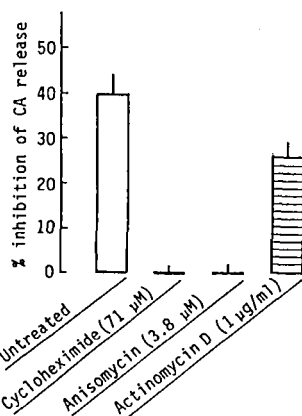


図15 タンパク質合成阻害剤及び RNA 合成阻害剤の IL-1 α による ACh 誘発 CA 遊離阻害に対する作用

薬物は IL-1 α 処置90分前に、IL-1 α は ACh (5 μ M) の30分前に処置した。

Ca²⁺ チャンネルを阻害する作用であることが示唆された。

考 察

サイトカインは当初免疫関連細胞で産生され、これら細胞間の情報伝達因子と認識されていた。その後、種類は多く発見され、産生・標的組織も広範に亘ることが明らかにされてきている。

サイトカインの神経系への作用については主に中枢神経系 (CNS) での知見に基づいている。脳にはサイトカイン受容体が存在する²¹⁾。サイトカインは視床下部からの CRF の分泌促進²²⁾、CA 分泌の促進²³⁾、ラット海馬での ACh 遊離抑制²⁴⁾、長期増強の抑制²⁵⁾、海馬ニューロンでの Ca²⁺ 電流の抑制²⁶⁾等の作用を有することが知られている。IL-1 β は海馬において過分極と神経伝達の抑制を引き起こし、この作用は γ -アミノ酪酸 (GABA) を介した抑制応答の増強による²⁷⁾ ことも報告されている。又、CNS はサイトカインにより情報を受け、視床下部—下垂体—副腎系或いは交感神経系を介して、末梢免疫系に抑制性に影響を及ぼし得る^{28,29)}。例えば、IL-1 β の脳内注入は脾臓の NAd 代謝回転の促進³⁰⁾、マクロファージや NK 細胞の活性の抑制をもたらすが^{27,30-32)}、内臓神経の切断或いは神経節遮断薬はこの抑制を阻害する³²⁾。従って、IL-1 β の作用は交感神経を介して免疫反応を抑制することが示唆される。

サイトカインの副腎髄質への作用については、IL-1 を末梢或いは脳室内に注入すると血中 CA 濃度は一過性に上昇するが、この上昇反応は脳室内投与がより効果的なため副腎髄質クロマフィン細胞への直接作用の可能性は低いとされる。Yanagihara ら³³⁾ は、ウシ副

腎クロマフィン細胞を24時間 IL-1 β と共に培養しておくとして CA 分泌を認めたとしている。Soliven and Albert¹¹⁾ は交感神経節培養細胞において、TNF α は高濃度 KCl の頻回刺激による [³H] NE 遊離を減少させたが、IL-1 β の影響は認められなかったと報告している。この様に、サイトカインの神経系に対する作用はあまり明確でない。

本研究において、ヒト組換え IL-1 α , 1 β 及び TNF α の副腎髄質クロマフィン細胞からの CA 遊離に対する作用を検討した。イヌ灌流副腎標本は、ニコチン様 ACh 受容体及びムスカリン様 ACh 受容体刺激に应答して CA を遊離すること³⁴⁾、各種神経調節因子に対する反応性が鋭敏であること、又、無傷な標本であることから、まず、この標本において検討したところ、これらサイトカインは適用直後から若干 CA 遊離を促進した。この促進作用は Yanagihara ら³³⁾ が報告しているウシ副腎クロマフィン細胞を IL-1 β と長時間培養したときにみられる medium 中の CA 濃度上昇と一致するものと思われる。しかし、その分泌反応は生理的な刺激分泌反応に比べ僅かなものである。

一方、適用後10分以上の潜時を経て、IL-1 α , IL-1 β , TNF α は ACh により誘発される CA 遊離を著明に抑制することを見いだした。この抑制作用は IL-1 α の洗浄後も長時間持続する特徴的なものであった。又、ウシ副腎髄質培養クロマフィン細胞においても、これらサイトカインにより同様な抑制作用が認められたことから、イヌ副腎に特異的なものではないこと、ACh 以外に高濃度 KCl による CA 遊離即ち、受容体刺激を介さない CA 遊離反応をも抑制したことから、ACh 受容体レベルでの作用ではなく、受容体以後の過程に対する作用であることが示された。又、IL-1 の作用は内因性 IL-1 受容体阻害タンパク質により拮抗されたことから、その作用は IL-1 受容体を介する反応であることが明らかになった。IL-1 受容体には低—中親和性 ($k_d \sim 10^{-10}$ M) と高親和性 ($k_d \sim 10^{-12}$ M) が存在し、多くの細胞では IL-1 α , 1 β 共に同一の受容体に結合する。しかし、いずれかの IL-1 により強い親和性をもつ受容体も存在する。ヒト B 細胞には IL-1 α , 1 β 共に結合する株と、IL-1 β のみを結合する株がある³⁵⁾。T 細胞では分子量 80-kDa のタイプ I 受容体、B 細胞、マクロファージでは分子量 60-kDa のタイプ II 受容体が発現し、前者は IL-1 α , 1 β に同様の親和性を持ち、後者は IL-1 β により高い親和性を有する^{36,37)}。これらの遺伝子もクローニングされ、それぞれ異なる遺伝子産物であることが明らかにされている。本研究では、IL-1 α , 1 β に同程度の抑制効果が認められ、クロマフィン細胞にはタイプ I

型受容体が発現していると考えられているが、その解析は今後の課題である。IL-1 による CA 遊離抑制は時間依存性であった。このことから IL-1 は CA 生合成を阻害して遊離の減少をもたらす可能性が考えられる。しかし、IL-1 α の処置によりクロマフィン細胞 CA 含有量に変化は認められなかった。又、Ad と NAd の分泌割合にも変化は認められなかった。従って、IL-1 は CA 生合成を抑制するのではなく、又、Ad 或いは NAd 含有細胞に特異的に作用するのではないと考えられる。

副腎髄質クロマフィン細胞においては、[Ca²⁺]_i 上昇が引き金となって CA 分泌が誘発されることは良く知られている。ACh や高濃度 KCl 刺激によって急激な一過性の [Ca²⁺]_i 上昇とそれに続く持続した上昇がみられるが、IL-1 の前処置はこの上昇を抑制した。この抑制作用の濃度依存性及び時間依存性等の特徴は、IL-1 の CA 遊離抑制のそれとよく相関していた。従って、IL-1 は [Ca²⁺]_i 上昇を抑制して CA 遊離抑制をもたらすものと考えられる。尚、IL-1 α は、単独で [Ca²⁺]_i を若干緩やかに上昇させたが、このことが僅かな CA 遊離をもたらすものと考えられる。

一方、Ca²⁺-ionophore である ionomycin による CA 遊離は IL-1 α により抑制されなかったため、Ca²⁺ チャンネルを通る Ca²⁺ 流入或いは細胞内 Ca²⁺ プールからの遊離を抑制して、[Ca²⁺]_i 上昇を抑制するものと考えられる。Na⁺-ionophore である veratridine は緩やかな [Ca²⁺]_i 上昇と持続する CA 遊離を引き起こしたが、これは細胞内に Na⁺ が増加した結果、Na⁺-Ca²⁺ 交換反応による Ca²⁺ 流入及び脱分極による VOC の開口により Ca²⁺ 流入が促進され、[Ca²⁺]_i 上昇と CA 遊離が引き起こされるものと考えられる。IL-1 α は、veratridine のこれら反応を一部抑制したが、Ca 拮抗薬存在下で VOC 遮断下の反応、即ち、Na⁺-Ca²⁺ 交換系に基づくと考えられる反応は抑制しなかった。そこで、他のイオンチャンネルの関与を除くため、Ca²⁺-sucrose medium 中での IL-1 α の作用を検討したところ、この条件下における ACh による大きな [Ca²⁺]_i 上昇と、CA 分泌反応を有意に抑制した。これらの成績は、IL-1 α の [Ca²⁺]_i 上昇抑制が、VOC を通る Ca²⁺ 流入の抑制に基づく可能性を示唆するものである。IL-1 の Ca²⁺ 取り込みに対する作用については、海馬での Ca²⁺ 電流の抑制²⁶⁾、糸球体での ⁴⁵Ca²⁺ 取り込みの若干の抑制³⁸⁾、睪ランゲルハンス島でのグルコースによる Ca²⁺ 取り込み抑制³⁹⁾ 等が報告されている。

クロマフィン細胞における ACh による [Ca²⁺]_i 上昇にはニコチン様 ACh 受容体イオンチャンネル、

VOC等のイオンチャンネルを通るCa²⁺流入の他に、ムスカリン様ACh受容体-GTP結合タンパク質と共役したPI代謝回転の促進により生じたIP₃による細胞内Ca²⁺プールからのCa²⁺動員並びにIP₃非感受性プールからのCICRによるCa²⁺動員が関与する。IL-1の作用にこれらCa²⁺動員系に対する抑制作用が関与する可能性も考えられる。

Bradykininはウシクロマフィン細胞からのCA遊離を促進するが、この作用には特にPI代謝回転の促進が大きく関与するとされている⁴⁰⁾。Bradykininは、事実、細胞外Ca²⁺-free medium中において、一過性の[Ca²⁺]_i上昇をもたらしたが、これはIP₃による細胞内Ca²⁺動員によるものと考えられる。IL-1αの前処置細胞の条件下においても、bradykininは同様な[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした。従って、IP₃によるCa²⁺動員系には影響しないものと考えられる。

Caffeineは、クロマフィン細胞にて細胞外液Ca²⁺に依存しないCA遊離を引き起こすことが知られているが、これはcaffeineがCICRを感作し、細胞内Ca²⁺プールからCa²⁺を動員することによるものと考えられている。近年、NAD⁺から生成するcyclic ADP-riboseがCICR機構に作用し、Ca²⁺を動員することが発見され、内因性caffeine様物質、即ち、CICRの内因性アゴニストとして注目されている⁴¹⁾。クロマフィン細胞においても、cyclic ADP-riboseがCa²⁺遊離を引き起こし、生理的に機能していることが示唆されている⁴²⁾。しかし、IL-1の前処置が、caffeineによるCa²⁺動員には影響せず、IL-1はCICR機構を修飾するものではないと思われる。

近年、細胞内Ca²⁺プールからCa²⁺が遊離することが、細胞膜Ca²⁺流入を促進するとの考えが提唱されている⁴³⁾。しかし、Ca²⁺プールからのCa²⁺遊離が細胞膜Ca²⁺流入を活性化する機構は不明であった。Randriamanpita and Tsien⁴⁴⁾は、Ca²⁺プールのCa²⁺を枯渇させることにより、Ca²⁺流入を促進する物質(calcium influx factor: CIF)が産生されることを報告した。CIFは未だ同定されていないが、Ca²⁺プールとCa²⁺流入機構との関係が少しずつ明らかにされてきている。IL-1がこれらの機序に影響を及ぼし、[Ca²⁺]_i動態を調節している可能性については、thapsigarginを用いて検討した。Thapsigarginは腫瘍プロモーターの一種で、細胞内Ca²⁺プール膜Ca²⁺-ATPaseを特異的に阻害し、Ca²⁺プールへのCa²⁺の取り込みを抑制してプール内Ca²⁺を枯渇させる作用を有している⁴⁵⁾。Ca²⁺-free-mediumに浮遊したクロマフィン細胞において、thapsigarginは緩やかな[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした。この後、CaCl₂の添加

によりthapsigarginを処置しない細胞よりも大きな[Ca²⁺]_i上昇が観察された。これは即ち、Ca²⁺プールのCa²⁺が枯渇することにより促進されたCa²⁺流入を反映していると考えられる。IL-1の前処置はこのCa²⁺流入に対し影響を及ぼさなかった。以上の結果からIL-1のVOC以外のCa²⁺動員系に対する作用は認められなかった。

一方、[Ca²⁺]_i上昇以後の開口分泌にいたる過程に対しIL-1が影響する可能性については、digitonin処置により膜透過性とした細胞において、Ca²⁺によるCA遊離の濃度作用曲線にIL-1は影響を及ぼさなかった。先のionomycinによるCA遊離はIL-1αにより抑制されなかったことと併せて、IL-1のCa²⁺以降の分泌過程に対する作用は否定的であった。しかし、このような標本において、GTPγSは低濃度のCa²⁺(20 nM)によるCA遊離は促進し、200 nM以上のCa²⁺によるCA遊離は抑制するが、IL-1の前処置は、このGTPγSによる抑制を増強するという結果を得ている(未発表)。従って、IL-1にはGTP結合タンパク質を介する抑制機構を増強する作用が考えられるが、IL-1はionomycinの作用は抑制しなかったことから、無傷細胞で、はたしてGTP結合タンパク質を介して抑制的に作用しているか否かは更に検討が必要である。

IL-1受容体の細胞内シグナル伝達系については未だ明確ではないが、いくつかの系が示唆されている。マウス線維芽細胞、Swiss 3T3細胞、ヒト骨芽細胞など多くの細胞ではホスホリパーゼA₂を活性化させ、アラキドン酸カスケードを介する系の報告がされている^{22,46)}。又、いくつかの細胞においては、百日咳毒素感受性GTP結合タンパク質を介してアデニレートシクラーゼを活性化すること⁴⁷⁾や、PK-Cの活性化が報告されている⁴⁸⁾。本研究では、PK-A阻害剤H-89、PK-C阻害剤staurosporine、ホスホリパーゼA₂を阻害するdexamethasone、シクロオキシゲナーゼ阻害剤indomethacinは、いずれもIL-1の作用には影響を及ぼさなかった。海馬でのIL-1によるCa²⁺電流の抑制は、PK-Cを介するCa²⁺チャンネルへの作用と報告されており²⁶⁾、本研究結果とは異なっている。

一方、チロシンキナーゼ阻害剤erbstatinとherbimycin Aについて検討したところ、erbstatinでは効果がなかったが、より特異性の高いherbimycin Aにより、IL-1の作用はreverseされた。従って、これらの系の中ではチロシンキナーゼを介する系が関与する可能性が考えられる。チロシンキナーゼは種々のタンパク質をリン酸化するが、その結果新しいタンパク質を合成して情報を伝達する系がある。IL-1の情報発

現にもタンパク質合成を介して行なわれるものも知られている。例えば、ECV 304 細胞では、IL-1 α はシクロオキシゲナーゼ-2 mRNA 発現を促進し、その酵素活性を誘導する⁴⁹⁾。ウサギ腸管膜動脈の IL-1 による弛緩反応には新しく合成されたタンパク質が関与する⁵⁰⁾。IL-1 β はグルコースによるランゲルハンス島からのインスリン分泌を時間依存性に抑制し、この IL-1 β の作用はタンパク質合成阻害剤で拮抗される⁵¹⁾。このタンパク質合成の誘導は NO \cdot が仲介する⁵²⁾ 等がある。実際 IL-1 は種々の遺伝子の発現を誘導し、又、IL-1 受容体タイプ I は、受容体に結合した IL-1 は分解されずに核まで到達する⁵³⁾ 等遺伝子レベルで作用し得る知見がある。

本研究において、IL-1 の CA 遊離抑制、[Ca $^{2+}$] $_i$ 上昇抑制作用は、作用発現に時間を要すること、時間と共に強くなること、洗浄後も長時間持続する等の特徴を有していたが、これらはタンパク質合成を介するものである可能性を窺わせる。そこで、タンパク質合成阻害剤の影響を検討した。Cycloheximide と anisomycin はリボソーム上で mRNA からペプチド鎖の合成を阻害するが、これらによりいずれも IL-1 の抑制作用は消失した。DNA から mRNA 転写を抑制する actinomycin D では抑制されなかった。これらの結果より IL-1 の抑制作用は mRNA からのタンパク質合成を促進して行なわれることが強く示唆される。加えて、このタンパク質はこれまでの成績から VOC と相互作用を有すものと予想される。脳内に Ca $^{2+}$ influx protective protein の存在が示唆されており(私信)、本研究結果もその存在を示唆するものと思われ、今後、このタンパク質の同定が急務である。尚、クロマフィン細胞における NO \cdot の役割については、CA 分泌を促進する様に働く^{54,55)} が、これは短時における反応の場であって、IL-1 による本タンパク質誘導に NO \cdot が関与するか否かは、今後の課題として残されている。

副腎髄質クロマフィン細胞に IL-1 様物質が存在することは免疫蛍光法で示されている⁵⁶⁾。又、ラット副腎において、コリン作働性刺激やグラム陰性菌 lipopolysaccharide により IL-1 α mRNA が誘導されること⁵⁷⁾、かなりの量の IL-1 がクロマフィン細胞から遊離されること⁵⁸⁾ 等が報告されている。このことは副腎髄質から IL-1 がストレスシグナルとして CA と共に分泌されることを、他方、分泌された IL-1 が CA 遊離に長期的なネガティブフィードバック調節をかけているというモデルが考えられる。

一方、血中には通常ごくわずかな量の IL-1 しか存在しないが、或種の条件下、例えば感染症や組織傷害(外傷や手術)時に、血中濃度が数十～数百 pg/ml に

まで高まることが知られている⁵⁹⁾。IL-1 はいくつかの細胞種で合成されるが、この場合単球やマクロファージに由来するものと思われる。この濃度は本研究で示した IL-1 が CA 遊離を抑制するのに十分な量である。従って、これら免疫関連細胞に由来するサイトカインが、副腎 CA 分泌を抑制的に調節する可能性が考えられる。或いは癌、慢性感染症やエイズのサイトカイン療法においては、投与されたサイトカインによる神経伝達の修飾が考えられる。

外科的手術などストレスの場合、副腎肥大と胸腺の萎縮が生じる。これは下垂体-副腎皮質を介して放出されるグルココルチコイドの作用が大きく関与するが、白血球には α , β 受容体が存在し、CA は一般に β 受容体を介して免疫活性を抑制するとされている。このことから、IL-1 により CA 遊離が抑制されることは免疫系の賦活をもたらす正のループが形成されると言える。しかし、ストレスの種類によっては交感神経系を介して、免疫活性を高めるとの報告がある。例えば、疼痛や鍼刺激などでは胸腺の萎縮はおこらず、抗体産性能、細胞性免疫能、NK 活性などが著しく増強される^{7,8)}。これは視床下部を介し、自律神経-副腎髄質系を賦活し CA が分泌されたことによることが考察されている。Dimsdale and Moss⁶⁰⁾ は、ヒト血中 NAd は運動負荷により正常値 (583 pg/ml) の約 3 倍にまで増加するの比べ、Ad (117 pg/ml) は約 40% 増加するに過ぎないこと、一方、会話により NAd の増加は 60% に比べ、Ad は 2 倍以上に増加することを報告している。このように、心理的ストレスにより Ad の、身体的ストレスにより NAd の血中濃度が高まる。又、副腎髄質からは CA と共に多量のエンケファリンが分泌されること、白血球にはオピオイド受容体が存在し、その細胞活性がオピオイドペプチドにより修飾される^{61,62)} 等、それらの係わり方は一樣ではない。ストレスの種類、強さ、時間、免疫反応とのタイミングなどでそれぞれの反応における相互作用が異なると思われる。

失望、悲嘆、精神的苦痛等は免疫機能の低下を、感動、悦楽等精神の高揚は免疫機能の上昇に結びつくことは、この時の血中 IgE 値から支持されている³⁾。リュウマチ、気管支喘息、糖尿病等の自己免疫疾患或いは虚血性心疾患の発症や経過にストレスや心因的要素が大きく関与するとの指摘がある。歯痛や不正咬合、不適合義歯の様に繰り返し加わるストレスは、当然免疫活性に影響を及ぼすものと考えられる。口腔領域からのストレスが特に、小児、有病者、高齢者に測り知れない影響を及ぼしていることは想像に難くない。今後、これらの関連性を定性的に又、その機序を

明らかにすることが待たれる。

他方、自己免疫疾患等免疫機能の変化が認識、情動等の中枢神経機能に影響することや、アルツハイマー病等神経細胞死へのサイトカインの役割も指摘されており、神経系と免疫系の相互作用を明らかにすることは益々重要な課題となってきた。

本研究結果は、サイトカインが神経伝達物質遊離を抑制することを示した。このことは、末梢でのサイトカインと神経伝達との役割を解明する為の一助となるばかりでなく、中枢神経系のモデルとして、その複雑なネットワークを明らかにする為に資すると思われる。又、サイトカインの作用の分子機構の解明は、その情報伝達機構に新たな展開をもたらすものと期待される。

総 括

1. インターロイキン-1 (IL-1) は副腎髄質クロマフィン細胞において刺激誘発細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇とカテコールアミン (CA) 遊離を抑制した。CA 含量、Ad/NAAd 比には影響を及ぼさなかった。

2. IL-1 の抑制作用は IL-1 受容体を介し、その発現には潜時を必要とし、長時間持続した。

3. IL-1 は Na^+ -ionophore による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と CA 遊離を抑制したが、Ca 拮抗薬存在下ではこの抑制はみられなかった。又、 Ca^{2+} -ionophore による CA 遊離は抑制しなかった。

4. IL-1 は Ca^{2+} -sucrose 溶液中においても抑制作用を示した。

5. IL-1 は細胞内 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 動員及び、受容体と共役しない Ca^{2+} 流入機構には影響を及ぼさなかった。

6. IL-1 は digitonin 処置膜透過性細胞において、 Ca^{2+} 誘発 CA 遊離には影響しなかった。

7. IL-1 の抑制作用はチロシンキナーゼ阻害剤により拮抗された。

8. IL-1 の抑制作用はタンパク質合成阻害剤の前処置により消失した。

以上、IL-1 はクロマフィン細胞において、刺激誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇及び CA 遊離を抑制し、神経伝達に抑制的に作用することを示した。この抑制は IL-1 受容体を介してチロシンキナーゼの活性化、タンパク質合成の促進をもたらし、少なくとも、細胞膜 Ca^{2+} チャンネルを抑制して発現する可能性を示唆した。

謝 辞

稿を終わるに臨み、本研究を行なう貴重な機会を与えてくださり、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜りました広島大学歯学部歯科薬理学講座土肥敏博教授に深甚なる謝意を表わします。又、本研究の遂行に際し、多大なる御配慮をいただき、又、御校閲を賜りました広島大学歯学部小児歯科学講座長坂信夫教授に深く御礼申し上げます。本論文作製にあたり御校閲をいただきました本学口腔生理学講座柴芳樹教授に深謝いたします。又、本研究の遂行に際し、一方ならぬ御指導、御協力を賜りました歯科薬理学講座森田克也講師並びに御協力いただきました元小児歯科学講座佐久間信彦博士に心から厚く御礼申し上げます。又、本研究に対して種々の御援助、御配慮を頂きました広島大学歯科薬理学講座並びに小児歯科学講座の諸先生、事務官の方に心より深謝申し上げます。尚、本研究遂行に際し、ウシ副腎を御供与いただいた広島市食肉衛生検査所並びに JA 広島経済連三次食肉加工センターに感謝いたします。

文 献

- 1) 広川勝旻：神経内分泌系による免疫機能調節；神経・内分泌・免疫系のクロストーク（広川勝旻編著）学会出版センター，東京，3-18，1993.
- 2) Munck, A., Naray-Fejes-Tóth, A. and Guyre, P.M.: Mechanisms of glucocorticoid actions on the immune system; in *Hormones and Immunity* (Berczi, I. and Kovacs, K., editors) MTP Press Ltd., Lancaster, UK, 20-37, 1987.
- 3) Kiecolt-Glaser, J.K. and Glaser, R.: Stress and immune function in humans; in *Psychoimmunology* (Ader, R., Felten, D.L. and Cohen, N., editors) Academic Press, San Diego, USA, 849-867, 1991.
- 4) Tominaga, K., Kinoshita, Y., Hato, F., Masuda, A. and Matsuyama, M.: Effects of cholinergic agonists on the proliferation and protein synthesis in a cultured thymic epithelial cell line. *Cell Mol. Biol.* 35, 679-686, 1989.
- 5) Besedovsky, H.O., del Rey, A., Sorkin, E., Da Prada, M. and Keller, H.H.: Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell. Immunol.* 48, 346-355, 1979.
- 6) Irwin, M., Hauger, R.L., Brown, M. and Britton, K.T.: CRF activates autonomic nervous system and reduces natural killer cytotoxicity. *Am. J. Physiol.* 255, R744-R747, 1988.
- 7) Fujiwara, R. and Orita, K.: The enhancement of the immune response by pain stimulation in mice. 1. The enhancement effect on PFC production via

- sympathetic nervous system *in vivo* and *in vitro*. *J. Immunol.* **138**, 3699–3703, 1987.
- 8) Lundberg, T., Eriksson, S.V. and Theodorsson, E.: Neuroimmuno-modulatory effects of acupuncture in mice. *Neurosci. Lett.* **128**, 161–164, 1991.
 - 9) Spranger, M., Lindholm, D., Bandtlow, C., Heumann, R., Gnahn, H., Näher-Noé, M. and Thoenen, H.: Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: comparison between the effects of interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* **2**, 69–76, 1990.
 - 10) Chang, J.Y., Martin, D.P. and Johnson, E.M.: Interferon suppresses sympathetic neuronal cell death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Neurochem.* **55**, 436–445, 1990.
 - 11) Soliven, B. and Albert, J.: Tumor necrosis factor modulates the inactivation of catecholamine secretion in cultured sympathetic neurons. *J. Neurochem.* **58**, 1073–1078, 1992.
 - 12) Nistico, G. and De Sarro, G.: Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain. *TINS*, **14**, 146–150, 1991.
 - 13) Sakuma, N., Nagasaka, N., Morita, K., Dohi, T. and Tsujimoto, A.: Adrenal catecholamine secretory responses in young and adult dogs. *Archs Int. Pharmacodyn. Ther.* **322**, 80–90, 1993.
 - 14) Robinson, R.L.: Stimulation of the release of catecholamine from isolated adrenal glands by tyramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **151**, 55–58, 1966.
 - 15) Tsujimoto, A., Morita, K., Nishikawa, T. and Yamada, S.: Cyclic nucleotide elevation preceding catecholamine release in isolated dog adrenals. *Archs Int. Pharmacodyn. Ther.* **245**, 262–270, 1980.
 - 16) Fenwick, E.M., Fajdiga, P.B., Home, N.B.S. and Livett, B.G.: Functional and morphological characterization of isolated bovine adrenal medullary cells. *J. Cell Biol.* **76**, 12–30, 1978.
 - 17) Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S., Kōyama, Y. and Tsujimoto, A.: Enhancement of stimulation-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells by forskolin. *J. Neurochem.* **48**, 243–247, 1987.
 - 18) Tsien, R.Y., Rink, T.J. and Poenie, M.: Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* **6**, 145–157, 1985.
 - 19) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450, 1985.
 - 20) VonEuler, U.W. and Lishajko, F.: Improved technique for the fluorometric estimation of catecholamines. *Acta Physiol. Scand.* **51**, 348–356, 1961.
 - 21) Farrar, W.L., Kilian, P.L., Ruff, M.R., Hill, J.M. and Pert, C.B.: Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J. Immunol.* **139**, 459–463, 1987.
 - 22) Rothwell, N.J.: Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *TIPS*, **12**, 430–435, 1991.
 - 23) Palazzolo, D.L. and Quadri, S.K.: Interleukin-1 stimulates catecholamine release from the hypothalamus. *Life Sci.* **47**, 2105–2109, 1990.
 - 24) Rada, P., Mark, G.P., Vitek, M.P., Mangano, R.M., Blume, A.J., Beer, B. and Hoebel, B.G.: Interleukin-1 β decreases acetylcholine measured by microdialysis in the hippocampus of freely moving rats. *Brain Res.* **550**, 287–290, 1991.
 - 25) Katsuki, H., Nakai, S., Hirai, Y., Akaji, K., Kiso, Y. and Satoh, M.: Interleukin-1 β inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol.* **181**, 323–326, 1990.
 - 26) Plata-Salamán, C.R. and French-Mullen, J.M.H.: Interleukin-1 β inhibits Ca^{2+} channel currents in hippocampal neurons through protein kinase C. *Eur. J. Pharmacol.* **266**, 1–10, 1994.
 - 27) Yu, B. and Shinnick-Gallagher, P.: Interleukin-1 β inhibits synaptic transmission and induces membrane hyperpolarization in amygdala neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 590–600, 1994.
 - 28) Rothwell, N.J.: Central effects of CRF on metabolism and energy balance. *Neurosci. Bioheav. Rev.* **14**, 263–271, 1990.
 - 29) Imura, H., Fukata, J. and Mori, T.: Cytokine and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. *Clinical Endocrinology* **35**, 107–115, 1991.
 - 30) Vriend, C.Y., Zuo, L., Dyck, D.G., Nance, D.M. and Greenberg, A.H.: Central administration of interleukin-1 β increases norepinephrine turnover in the spleen. *Brain Res. Bull.* **31**, 39–42, 1993.
 - 31) Brown, R., Zuo, L., Vriend, C.Y., Nirula, R., Janz, L., Falk, J., Nance, D.M., Dyck, D.G. and Greenberg, A.H.: Suppression of splenic macrophage interleukin-1 secretion following intracerebroventricular injection of interleukin-1 β : Evidence for pituitary-adrenal and sympathetic control. *Cell Immunol.* **132**, 84–93, 1991.
 - 32) Sunder, S.K., Becker, K.J., Cierpial, M.A., Carpenter, M.D., Rankin, L.A., Fleener, S.L., Ritchie, J.C., Simson, P.E. and Weiss, J.M.: Intracerebroventricular infusion of interleukin-1

- rapidly decreases peripheral cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 6398-6402, 1989.
- 33) Yanagihara, N., Minami, K., Shirakawa, F., Uezono, Y., Kobayashi, H., Eto, S. and Izumi, F.: Stimulatory effect of IL-1 β on catecholamine secretion from cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 81-87, 1994.
 - 34) Ohtsuki, H., Morita, K., Minami, N., Suemitsu, T., Tsujimoto, A. and Dohi, T.: Involvement of Ca²⁺ entry and inositoltrisphosphate-induced internal Ca²⁺ mobilization in muscarinic receptor-mediated catecholamine release in dog adrenal chromaffin cells. *Neurochem. Int.* **21**, 259-267, 1992.
 - 35) Benjamin, D., Wormsley, S. and Dower, S.K.: Heterogeneity in interleukin (IL)-1 receptors expressed on human B cell lines. *J. Biol. Chem.* **265**, 9943-9951, 1990.
 - 36) Dower, S.K., Kronheim, S.R., Hopp, T.P., Cantrell, M., Deeley, M., Gillis, S., Henney, C.S. and Urdal, D.L.: The cell surface receptors for interleukin-1 α and interleukin-1 β are identical. *Nature* **324**, 266-268, 1986.
 - 37) Dinarello, C.A.: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**, 1627-1652, 1991.
 - 38) Ikeda, M., Ikeda, U. and Kano, S.: Interleukin-1 suppresses mesangial cell growth via inhibition of calcium entry. *Cytokine* **3**, 131-133, 1991.
 - 39) Wolf, B.A., Hughes, J.H., Florholmen, J., Turk, J. and McDaniel, M.L.: Interleukin-1 inhibits glucose-induced Ca²⁺ uptake by islets of langerhans. *FEBS Lett.* **248**, 35-38, 1989.
 - 40) Kim, K.-T. and Westhead, E.W.: Cellular response to Ca²⁺ from extracellular and intracellular sources are different as shown by simultaneous measurements of cytosolic Ca²⁺ and secretion from bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 9881-9885, 1989.
 - 41) Galione, A.: Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and its modulation by cyclic ADP-ribose. *TIPS.* **13**, 304-306, 1992.
 - 42) Morita, K., Uchiyama, Y. and Dohi, T.: Cyclic ADP-ribose-induced calcium mobilization in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Neurosci. Res. Suppl.* **18**, S87, 1993.
 - 43) Putney, J.W.Jr.: A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1-12, 1986.
 - 44) Randriamampita, C. and Tsien, R.Y.: Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* **364**, 809-814, 1993.
 - 45) Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R. and Dawson, A.P.: Thapsigargin, a tumor promotor, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 2466-2470, 1990.
 - 46) Burch, R.M., White, M.F. and Connor, J.R.: Interleukin 1 stimulates prostaglandin synthesis and cyclic AMP accumulation in Swiss 3T3 fibroblasts: interactions between two second messenger systems. *J. Cell. Physiol.* **139**, 29-33, 1989.
 - 47) Shirakawa, F. and Mizel, S.B.: *In vitro* activation and nuclear translocation of NF- κ B catalyzed by cyclic AMP dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2424-2430, 1989.
 - 48) Rosoff, P.M., Savage, N. and Dinarello, C.A.: Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* **54**, 73-81, 1988.
 - 49) Ristimäki, A., Garfinkel, S., Wessendorf, J., Maciag, T. and Hla, T.: Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 α . Evidence for post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 11769-11775, 1994.
 - 50) Petitclerc, E., Poubelle, P.E. and Marceau, F.: Rapid protein synthesis and turnover is involved in interleukin-1-induced relaxation of the rabbit isolated mesenteric artery. Analysis of the arachidonate cascade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 1419-1425, 1994.
 - 51) Hughes, J.H., Colca, J.R., Easom, R.A., Turk, J. and McDaniel, M.L.: Interleukin 1 inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets by a process that requires gene transcription and mRNA translation. *J. Clin. Invest.* **86**, 856-863, 1990.
 - 52) Corbett, J.A., Wang, J.L., Hughes, J.H., Wolf, B.A., Sweetland, M.A., Lancaster, J.R.Jr. and McDaniel, M.L.: Nitric oxide and cyclic GMP formation induced by interleukin 1 β in islets of langerhans. Evidence for an effect or role of nitric oxide in islet dysfunction. *Biochem. J.* **287**, 229-235, 1992.
 - 53) Curtis, B.M., Widmer, M.B., DeRoos, P. and Qwarnstrom, E.E.: IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J. Immunol.* **144**, 1295-1303, 1990.
 - 54) Dohi, T., Morita, K. and Tsujimoto, A.: Effect of sodium azide on catecholamine release from isolated adrenal gland and on guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **94**, 331-335, 1983.
 - 55) Uchiyama, Y., Morita, K., Kitayama, S., Suemitsu, T., Minami, N., Miyasako, T. and Dohi, T.: Possible involvement of nitric oxide in acetylcholine-induced increase of intracellular Ca²⁺ concentration and catecholamine release in bovine adrenal chromaffin cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **65**,

- 73-77, 1994.
- 56) Schultzberg, M., Andersson, C., Undén, A., Troye-Blomberg, M., Svenson, S.B. and Bartfai, T.: Interleukin-1 in adrenal chromaffin cells. *Neuroscience* **30**, 805-810, 1989.
- 57) Andersson, C., Svenson, S.B., Van Deventer, S., Cerami, A. and Bartfai, T.: Interleukin-1 α expression is inducible by cholinergic stimulation in the rat adrenal gland. *Neuroscience* **47**, 481-485, 1992.
- 58) Bartfai, T., Andersson, C. and Bristulf, J.: Interleukin-1 in the noradrenergic chromaffin cells in the rat adrenal medulla. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **594**, 207-213, 1990.
- 59) 深田順一：免疫サイトカインによる視床下部・下垂体・副腎皮質系の制御と生体防衛. *Bio. Medica.* **7**, 1387-1391, 1992.
- 60) Dimsdale, J.E. and Moss, J.: Plasma catecholamines in stress and exercise. *TAMA* **243**, 340-342, 1980.
- 61) Weigent, D.G. and Blalock, J.E.: Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol. Rev.* **100**, 79-108, 1987.
- 62) Heagy, W., Laurance, M., Cohen, E. and Finberg, R.: Neurohormones regulate T cell function. *J. Exp. Med.* **171**, 1625-1663, 1990.