

ヒアルロン酸の細胞機能修飾作用に関する研究

**A Study of Modulative Effects of Hyaluronan
on Cell Functions**

当別当健司

1995

目次

要旨	和文	1
	英文	3
緒論		5
本論		7
第1章 ヒト滑膜細胞のアラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸の抑制作用		
序論		7
材料と方法		8
結果		
細胞と培養液中の [¹⁴ C]アラキドン酸代謝物		11
[¹⁴ C]アラキドン酸遊離に対するブラジキニンとヒアルロン酸の作用		11
ヒアルロン酸の濃度及び分子量依存的な [¹⁴ C]アラキドン酸遊離抑制作用		14
[¹⁴ C]アラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸とメチルセルロースの粘度の影響		16
[¹⁴ C]アラキドン酸取り込みに対するヒアルロン酸の影響		17
[³ H]ブラジキニン結合特性		17
[³ H]ブラジキニンの結合に対するヒアルロン酸の影響		19
細胞生存率及び密度に対するヒアルロン酸の影響		22
考察		22
第2章 ラット好中球によるウシ鼻中隔軟骨分解に対するヒアルロン酸の抑制作用		
序論		26
材料と方法		26
結果		
好中球による軟骨分解		30
好中球による軟骨分解の特徴		30
FMLP/cytochalasin B 刺激した好中球による軟骨分解に対するヒアルロン酸の作用		32
Opsonized zymosan 刺激した好中球による軟骨分解に対するヒアルロン酸の作用		34
TPA または A23187 で刺激した好中球による軟骨分解に対するヒアルロン酸の作用		37
[³ H]FMLP の結合に対するヒアルロン酸の影響		38

好中球の生存率に及ぼすヒアルロン酸の影響	39
考察	40
第3章 ラット好中球のスーパーオキサイド産生に対する接着表面にコートされた 免疫グロブリンG, 関節液成分及びヒアルロン酸の影響	
序論	43
材料と方法	44
結果	
IgG コート表面上での好中球の O_2^- 産生	47
IgG コート表面の関節液による二次処理が好中球の O_2^- 産生に及ぼす影響	48
好中球の O_2^- 産生特性	49
好中球の接着特性	51
ゲルろ過クロマトグラフィーによる関節液中の O_2^- 産生促進物質の分析	53
ヒアルロン酸による表面処理が好中球の O_2^- 産生及び接着に及ぼす影響	55
考察	57
結論	62
謝辞	64
引用文献	65

要旨

細胞外マトリックス成分のひとつであるヒアルロン酸は *N*-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸の繰り返し単位より成る直鎖多糖である。生体中には結合組織を中心として広く分布しているが、関節液には高濃度で存在している。炎症性関節症では関節液中のヒアルロン酸の濃度低下や低分子化が起こることが報告されている。そこで関節炎症に関連する生体現象に着目し、炎症反応におけるヒアルロン酸の役割、特にヒアルロン酸の濃度変化や分子量変化が細胞の機能に及ぼす影響について、*in vitro* モデル系を用いて検討した。本研究では、ヒト滑膜細胞のアラキドン酸遊離、ラット好中球によるウシ鼻中隔軟骨分解、及びラット好中球のスーパーオキシド (O_2^-) 産生を炎症モデルとして用いた。

1. ヒト滑膜細胞のアラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸の抑制作用

炎症とプロスタグランジンは密接に関連しており、アラキドン酸はプロスタグランジン生合成前駆体である。そこで滑膜細胞の [^{14}C]アラキドン酸標識リン脂質からの [^{14}C]アラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸の影響を検討した。ヒアルロン酸はブラジキニン刺激した標識滑膜細胞からの [^{14}C]アラキドン酸遊離を、反応後 1 h 以降抑制した。この抑制効果はヒアルロン酸濃度及び分子量に依存していたが、単に粘度のみに起因するものではなかった。ヒアルロン酸は滑膜細胞と [3H]ブラジキノンの結合に影響せず、また滑膜細胞による [^{14}C]アラキドン酸取り込みにも影響しなかった。ヒアルロン酸による [^{14}C]アラキドン酸遊離抑制は、滑膜細胞をカルシウム-イオノフォア A23187 で刺激した場合にも認められた。これらのことより、ヒアルロン酸は細胞膜におけるホスホリパーゼ活性に影響を与える可能性が示唆された。

2. ラット好中球によるウシ鼻中隔軟骨分解に対するヒアルロン酸の抑制作用

炎症性関節症の特徴である軟骨分解は、部分的には浸潤した好中球に起因する。そこで硫酸化グリコサミノグリカン遊離を指標とした好中球による軟骨分解に対するヒアルロン酸の影響を 18 h まで検討した。好中球を cytochalasin B 存在下 *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenyl-alanine (FMLP), opsonized zymosan, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) またはカルシウム-イオノフォア A23187 で刺激すると、軟骨分解は顕著に促進された。活性化された好中球による軟骨分解は、ヒアルロン酸により濃度及び分子量依存的に抑制された。Opsonized zymosan を用いた場合、低分子量ヒアルロン酸 ($M_r 2.8 \times 10^5$) は軟骨分解を抑制せず、高分子量ヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) は軟骨分解を約 2 h 遅らせる作用様式を示した。予め貪食させた好中球に対してはヒアルロン酸は抑制作用を示さなかった。ヒアルロン酸の粘性が軟骨分解抑制に重要で

あると考えられる。ヒアルロン酸の軟骨分解抑制パターンは、opsonized zymosan, TPA 及び A23187 を刺激剤として用いた場合、相互に近似していた。FMLP/cytochalasin B を用いた場合、ヒアルロン酸は軟骨分解を少なくとも 18 h 抑制した。ヒアルロン酸は好中球への [³H]FMLP の結合に影響せず、また予め FMLP で刺激した好中球に対しても軟骨分解抑制作用を示した。これらのことよりヒアルロン酸の抑制作用には、粘度に起因するものに加え、粘度以外の細胞に対する直接的な作用もあるものと推察される。

3. ラット好中球のスーパーオキシド産生に対する接着表面にコートされた免疫グロブリン G、関節液成分及びヒアルロン酸の影響

炎症性関節症において関節腔内へ浸潤した好中球の産生する活性酸素は、関節組織に対し種々の傷害を与える。関節軟骨表面には関節液中の免疫グロブリン (Ig) 沈着が認められ、接着した好中球の活性化リガンドとなっている。そこで IgG、関節液及びヒアルロン酸による好中球の接着表面処理が、接着好中球の O₂⁻ 産生に及ぼす影響について検討した。関節液中には表面にコートされた IgG と共働して、好中球の O₂⁻ 産生を促進する物質が存在することを見いだした。この O₂⁻ 産生促進物質は高分子であり、酵素処理に対する感受性よりムチン型糖鎖を持つ glycoconjugates であると推定された。IgG 及び関節液で表面コートする際にヒアルロン酸を共存させると、接着好中球の O₂⁻ 産生が抑制された。表面をヒアルロン酸前処理後、IgG 及び関節液でコートした場合、及び IgG コート表面をヒアルロン酸で後処理した場合には、高分子量ヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) のみが O₂⁻ 産生を抑制した。いずれの場合でも、接着表面をヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) で処理することによる好中球の接着抑制は認められなかった。これらのことより、ヒアルロン酸は IgG 及び関節液中の IgG 共働性 O₂⁻ 産生促進物質の表面沈着を抑制するか、あるいは表面コートされたヒアルロン酸が直接的に好中球の O₂⁻ 産生を抑制する可能性が示唆された。

以上の結果より、炎症の進展にともなう組織傷害に対して、高分子量ヒアルロン酸は組織保護的な作用を持つものと考えられる。高分子量ヒアルロン酸を生体由来抗炎症物質として位置づけることが可能である。炎症にともなう発熱や関節液中へ遊離される炎症性サイトカインは、滑膜細胞のヒアルロン酸合成を促進することが知られている。これらの現象は炎症の修復過程のひとつであり、生体の恒常性維持作用の一環であると推察される。

Summary

Hyaluronan (HA), a component of extracellular matrices, is a linear polysaccharide composed of alternating units of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid. HA is secreted from some organisms and is found in the highest concentrations in soft connective tissues, especially in joint synovial fluids. In inflammatory arthritis, the synovial HA is reduced in concentration and molecular weight. This study was undertaken to elucidate the role of HA in the synovial fluid of inflamed joints. Effects of HA with various molecular weights on some of the cell functions responsible for inflammatory arthritis were examined in this study. The attention was focused on the *in vitro* effects of HA on the release of arachidonic acid from synovial fibroblasts, neutrophil-mediated cartilage degradation, and the superoxide release from neutrophils.

1. Inhibitory effects of HA on the release of arachidonic acid from human synovial fibroblasts

Prostaglandins have been implicated in many features of inflammation. A substrate for prostaglandin biosynthesis is free arachidonic acid (AA) from phospholipids in plasma membranes. Therefore, the effects of HA on the release of AA from phospholipids, which was induced by the action of bradykinin to the synovial fibroblasts of osteoarthritic patients, were examined. HA inhibited the [¹⁴C]AA release from the prelabeled synovial cells stimulated with or without bradykinin 1 h after incubation and thereafter. The inhibitory effects of HA on the [¹⁴C]AA release were dependent on the concentration and molecular weight of HA. However, the inhibition of the [¹⁴C]AA release by HA was not merely due to the viscosity of HA. HA did not affect the specific binding of [³H]bradykinin to the cells. The [¹⁴C]AA release induced by calcium-ionophore A23187 was also inhibited by HA with a high molecular weight. In addition, HA did not affect [¹⁴C]AA uptake by the cells. These results suggest that HA with a high molecular weight suppresses the activities of membrane-associated phospholipases.

2. Inhibitory effects of HA on neutrophil-mediated cartilage degradation

Inflammatory joint diseases are characterized by the degradation of articular cartilages, which is partly mediated by neutrophils accumulating at inflamed sites. The effects of HA on neutrophil-mediated degradation of the cartilage were examined for up to 18 h in a coculture system of rat peritoneal neutrophils with the cartilage of bovine nasal septa. The release of sulfated glycosaminoglycans from the cartilage was markedly enhanced by the neutrophils which were activated with either *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP) combined with cytochalasin B, opsonized zymosan, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) or calcium-ionophore A23187. However, HA inhibited the cartilage degradation by the activated neutrophils. The inhibitory effects were dependent on the concentration and molecular weight of HA. When the neutrophils were incubated with opsonized zymosan, HA with a higher molecular weight (M_r 2.0×10^6) inhibited the cartilage degradation for an incubation period of up to 2 h, but HA with a lower molecular weight (M_r 2.8×10^5) did not elicit significant inhibition on the cartilage degradation for up to 18 h. HA did not suppress the cartilage degradation by the neutrophils which were prestimulated with opsonized zymosan. The increased viscosity with molecular weight of HA may play a role in inhibiting the

activation of neutrophils by opsonized zymosan. The inhibitory pattern of HA on the cartilage degradation stimulated with opsonized zymosan was essentially similar to those with TPA and A23187, as a stimulating agent of neutrophils. When FMLP/cytochalasin B was used to stimulate the neutrophils, HA samples (having different molecular weights) inhibited the neutrophil-mediated cartilage degradation for not less than 18 h of incubation. HA did not affect the binding of [³H]FMLP to the cells. In addition, HA inhibited the cartilage degradation by the neutrophils preincubated with FMLP/cytochalasin B. These results suggest that the inhibitory effects of HA on the cartilage degradation by the neutrophils are not only due to an increased viscosity of the medium, but also due to a direct modulation of cell functions.

3. Effects of surface coatings with immunoglobulin G, synovial fluid and HA on the superoxide production by adherent neutrophils

In inflammatory arthritis, oxygen radical derivatives, which were produced by activated neutrophils in inflamed joint, play a major role in the generation of joint tissue injury. Immunoglobulins in synovial fluid are trapped in the superficial layers of articular cartilage in inflamed joint. The trapped immunoglobulins on the cartilage surface activate the neutrophils attached to the surface. The effects of surface treatment with IgG, synovial fluid and HA on the production of superoxide anion (O_2^-) were examined with the adherent neutrophils. IgG and synovial fluids from patients with inflammatory joint disease synergistically enhanced the O_2^- production by the adherent rat peritoneal neutrophils. A gel filtration study indicated that the neutrophil-stimulating substance in the synovial fluid was a large molecular substance and was inactivated by digestion with both proteinases and *O*-glycanase, indicating a glycoconjugate with a mucin-type sugar chain.

When the surfaces were treated with IgG and syovial fluid in the presence of HA, HA decreased O_2^- release levels from the adherent neutrophils. The surface treatment with HA having a high molecular weight ($M_r 2.0 \times 10^6$) prior to treating with IgG and synovial fluid resulted in an inhibition of the O_2^- production by the adherent cells on the surface. The O_2^- production in response to the surface-coated IgG was also inhibited by subsequent surface-coating with HA of $M_r 2.0 \times 10^6$. The number of surface-adherent cells was unchanged after the surface treatment with HA of $M_r 2.0 \times 10^6$ in all cases. These results suggest that (1) HA inhibits the surface-depositions of IgG and the synovial fluid component, resulting in an inhibition of the O_2^- production and, (2) the surface-coated HA with a high molecular weight directly affects on the adherent neutrophils, resulting in an inhibition of the O_2^- production by the cells.

Results obtained in this study conclude that HA with a high molecular weight elicits a tissue protective function against the tissue damage induced by inflammation. HA with a large molecule may be considered as an endogeneous anti-inflammatory substance. It has been reported that HA synthesis in human synovial cells is stimulated with inflammatory cytokines in synovial fluids and hyperthermia in the inflammatory reaction. These phenomena seem to be a natural recovery process from inflammation, and HA plays an important role in cellular homeostasis.

緒 論

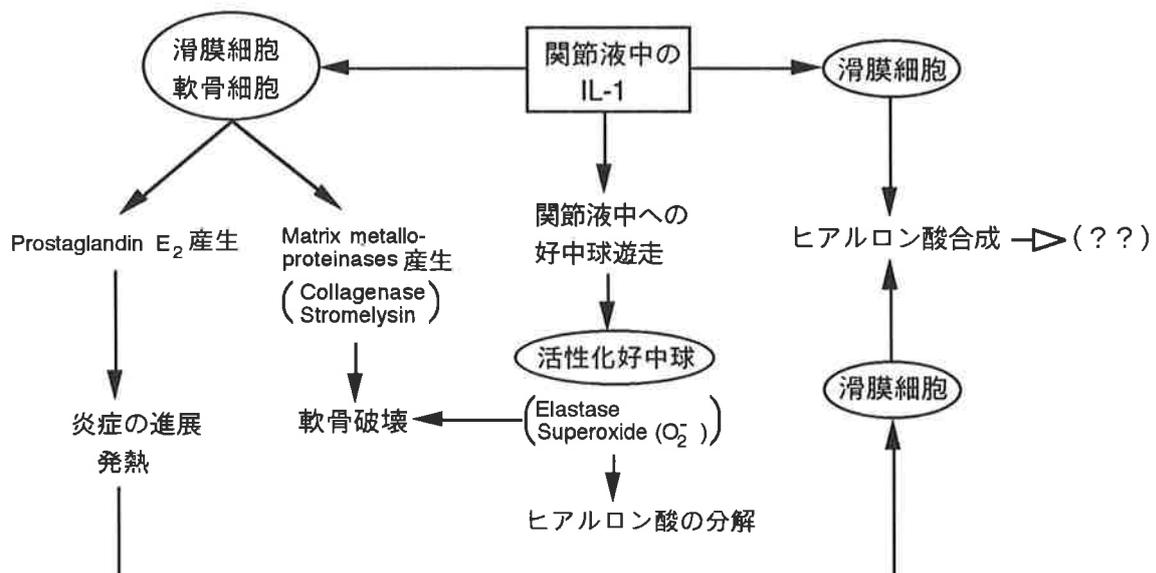
生体反応の根源は個々の細胞の生理機能にある。細胞自身は生体中でコラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン及び構造糖タンパク質を主要なものとする細胞外マトリックスに接触、支持されており、細胞と細胞外マトリックスの相互作用に基づく生体反応について幅広い研究が行なわれている。細胞と細胞外マトリックスの相互作用には、細胞外マトリックス生合成に影響することによる細胞から細胞外マトリックスへの作用と、細胞骨格と会合している細胞膜上のレセプターを介する細胞外マトリックスから細胞への作用が考えられており、細胞外マトリックスの挙動は細胞機能と密接に関連するものとされている [1-3]。

細胞外マトリックス成分のひとつであるヒアルロン酸は *N*-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸の繰り返し単位より成る直鎖多糖である。生体中には結合組織を中心として広く分布しており、特に臍帯、関節液、軟骨、硝子体及び皮膚には高濃度で存在している [4]。高分子量のヒアルロン酸は水溶液中でゲル状となり、高い粘性を与える [5]。この性質は組織に流体力学的な強度を付与したり、水分保持や浸透圧の調整など生体機能の維持に重要とされている [4, 6, 7]。また溶液中でヒアルロン酸分子鎖の形成する3次元ネットワークはフィルター機能を有し、細胞や巨大分子の移動を制限することが示されている [4, 8, 9]。従来、本多糖の機能はこのようにその物理的性質と関連づけられてきたが、細胞に対する直接的な生理機能についてはほとんど関心が払われてこなかった。しかしながら近年、細胞表面上にヒアルロン酸と結合するタンパク質 (レセプター) が発見され [10-14]、ヒアルロン酸の細胞機能に対する研究は急速に進展してきた。

骨と骨を連結する部位が関節である。骨の末端は軟骨で被覆され、関節全体は関節包で包まれている。軟骨と軟骨の間には関節液が満たされており、ヒアルロン酸はその主要な構成成分のひとつである。関節包の最も内側は滑膜細胞で覆われており、関節液のヒアルロン酸はこの滑膜細胞で合成されている [15]。ヒアルロン酸合成酵素は細胞膜に存在し、細胞膜で合成されたヒアルロン酸は細胞外へと運ばれる [16]。慢性関節リウマチは滑膜組織に生じる炎症を特徴とする関節疾患であり [17]、変形性関節症でも二次的に滑膜炎が発生する [18]。このような関節では関節液中のヒアルロン酸は濃度低下や低分子化を起こし、これに付随して関節液の粘度が低下することが報告されている [19]。また炎症性関節症の関節液中には種々の炎症メディエーターが検出されるが、インターロイキン-1 はその中でも重要なもののひとつである [20, 21]。インターロイキン-1 は滑膜細胞や軟骨細胞のマトリックス分解酵素産性を促進し関節の破壊に深く関与するが [20, 21]、その一方で滑膜細胞のヒアルロン酸合成を促進することが報告されている [22-24]。また炎症は通常発熱を伴

うが、滑膜細胞のヒアルロン酸合成は温度の上昇によっても促進されることが報告されている[25].
 このような現象は生体の恒常性維持に関連し、炎症の修復過程のひとつではないかと考えることができる(下図参照). しかしながら関節炎症とヒアルロン酸の関わりについて、細胞レベルでの理解は進んでいない. そこで関節炎症に伴う生体现象に着目し、ヒアルロン酸の役割、特にヒアルロン酸の濃度変化や分子量変化が細胞の機能に及ぼす影響について、*in vitro* モデル系を用いて検討した.

関節炎と Interleukin-1 (IL-1)



本論

第1章 ヒト滑膜細胞のアラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸の抑制作用

序論

疼痛は変形性膝関節症の主要な症状のひとつである。ステロイド性及び非ステロイド性抗炎症薬を用いる変形性膝関節症の化学療法は、二次的に生じた滑膜炎に起因する疼痛の緩和を目的としている [26,27]。炎症により組織が傷害されると組織より種々の化学物質が遊離される。この中で、ブラジキニン₁は極めて強力な発痛作用を有する [28,29]。ブラジキニン₁は9個のアミノ酸より成るペプチドで、細胞表面上のブラジキニンレセプターに結合し、ホスホリパーゼ-A₂及び-Cを同時に活性化する [30,31]。これらのホスホリパーゼは細胞膜リン脂質を加水分解し、直接的あるいは間接的にアラキドン酸を遊離させる [32]。また、カルシウム-イオノフォア A23187は細胞内カルシウム濃度を直接上昇させることによりホスホリパーゼA₂を活性化することが知られている [33]。ブラジキニン₁に誘発される疼痛は、末梢組織痛覚レセプターの感受性を上げるプロスタグランジンE₂により増強される [34]。シクロオキシゲナーゼ産物の生成には予めアラキドン酸が遊離されることが必要であるので [35,36]、細胞膜リン脂質からのアラキドン酸遊離と、炎症反応の主徴候のひとつである疼痛は密接に関連しているものと考えられる。近年、変形性膝関節症患者の関節腔内へヒアルロン酸を投与する臨床試験において、ヒアルロン酸の鎮痛効果が示されている [37,38]。しかしながらその作用機構は明らかではない。そこでヒト滑膜細胞を用いて、エイコサノイド生合成前駆体であるアラキドン酸の遊離に対するヒアルロン酸の作用を検討した。滑膜細胞のアラキドン酸遊離を促進させる手段として、細胞膜レセプターを介して作用するブラジキニンと、レセプターの介在しないA23187を用いた。この結果、いずれの場合もヒアルロン酸は濃度及び分子量に依存して滑膜細胞のアラキドン酸遊離を抑制することが示された。しかしながらヒアルロン酸によるアラキドン酸遊離抑制は、単にヒアルロン酸の粘度のみに起因するものではなかった。さらに、ヒアルロン酸は滑膜細胞によるアラキドン酸取り込みには影響を与えず、またブラジキニンとそのレセプターの結合にも影響しなかった。これらの結果より、ヒアルロン酸は細胞膜におけるホスホリパーゼ活性発現に影響する可能性が示唆された。

材料と方法

ヒアルロン酸

エンドトキシンを含まない4種類の分子量の異なるヒアルロン酸(粘度平均分子量 M_r 2.0×10^6 , 1.4×10^6 , 9.8×10^5 及び 2.8×10^5)は *Streptococcus zooepidemicus* の培養上清より精製され[39], 資生堂医薬品研究所より提供された。ブタ皮膚由来のヒアルロン酸(M_r $4.0 \sim 6.0 \times 10^4$) 及びヒト臍帯由来のヒアルロン酸(M_r $0.8 \sim 1.2 \times 10^6$) は生化学工業より購入した。

滑膜細胞

滑膜は関節症治療のための手術時に変形性関節症患者の膝より採取し, 周辺組織を除いた後さらに $1 \sim 2 \text{ mm}^2$ の断片とした。滑膜断片は培養ディッシュに付着させ, 約5分間放置後, 20% 非働化ウシ胎児血清(FBS; Flow laboratories, U.S.A.), 100 U/ml ペニシリン(明治製菓)及び $100 \mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン(明治製菓)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; Flow laboratories, U.S.A.)を添加し, 5% CO_2 , 37°C で培養した。滑膜断片よりディッシュに付着して周囲に広がった細胞は, 形態的に線維芽細胞様であった。この細胞は0.25%トリプシン(Flow laboratories, U.S.A.)で剥離した後, 6穴または24穴培養プレートに $1.4 \sim 2.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で播種し, 10% FBSを含むDMEM中でコンフルエントになるまで培養した。実験には4~7回継代した細胞を使用した。

滑膜細胞からのアラキドン酸遊離

24穴プレートで培養した滑膜細胞は, 10% FBSを含むDMEM中 [$1\text{-}^{14}\text{C}$]アラキドン酸 ($1.0 \sim 2.2 \text{ kBq}/0.5 \text{ ml/well}$, $1.9 \sim 2.0 \text{ GBq/mmol}$, New England Nuclear, U.S.A.)で 37°C , 24 h 標識した。標識滑膜細胞はFBSを含まないDMEM 1.0 mlで3回洗浄後, 分子量の異なるヒアルロン酸(0.25, 0.5, 1.0 及び 1.5 mg/ml) 存在下または非存在下で, プラジキニン ($10 \mu\text{M}$, Bachem, U.S.A.)または A23187 ($1 \mu\text{M}$, Sigma Chemical, U.S.A.)を添加した10% FBSを含むDMEM (0.5 ml/well) 中で3 h 培養した。培養液の粘度が及ぼす影響を検討するため, 他の培養系においてメチルセルロース (0.4, 1.5 及び 4.0 mg/ml , 東京化成)を添加した。培養終了後, 培養液を採取し, 細胞は $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -不含 phosphate-buffered saline (PBS) 0.5 mlで2回洗浄した。洗浄液は培養液と混合し, 混入の可能性のある剥離細胞または細胞断片を除去するため, 室温で $2000 \times g$, 15 min 遠心した。この上清を取り, 放射活性を液体シンチレーションカウンター(アロカ LSC-700)で測定した。

滑膜細胞をヒアルロン酸 (1.5 mg/ml , M_r 2.0×10^6) により前処理することによるアラキドン酸遊

離に対する影響を次の方法で検討した。先ず滑膜細胞のウェルを3群に分けた。第1群はヒアルロン酸を添加した10% FBSを含むDMEM (0.5 ml/well) 中で48 h前培養した。後半24 hには $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸 (1.6 kBq) を加え細胞を標識した。第2群はヒアルロン酸及び $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸を含む同一の培養液で24 h前培養した。第3群はヒアルロン酸無添加とし, $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸のみ加えて24 h培養した。これらのヒアルロン酸処理及び無処理の標識滑膜細胞はDMEM 1.0 mlで3回洗浄後、ブラジキニン (10 μM) を添加した10% FBSを含むDMEM (0.5 ml/well) 中で45 min培養した。ブラジキニンを添加しないコントロールは各群ごとに設定した。培養終了後、培養液中へ遊離した放射活性を測定した。

滑膜細胞へのアラキドン酸の取り込み

24穴プレートでコンフルエントとなった滑膜細胞を、ヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, M_r 2.0×10^6) 存在下または非存在下、10% FBSを含むDMEM中で $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸 (1.2 kBq/0.5 ml/well) とともに、時間を変えながら5% CO_2 , 37°Cで培養した。培養終了後、培養液中に残存する放射活性を測定した。

細胞及び培養液中の脂質分析

総脂質はFolchらの方法 [40] により塩酸酸性下で抽出した。6穴プレートで $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸による標識を行なった滑膜細胞はセルスクレーパーにより剥離し、少量の希塩酸を含むメタノール/クロロホルム混液 (1/2, v/v) により脂質を抽出した。培養液は1 M HClによりpH 3とし、約8倍量のメタノール/クロロホルム混液 (1/2, v/v) により脂質を抽出した。得られた有機溶媒相は窒素気流中で乾固させ、クロロホルムに溶解した後、薄層クロマトグラフィー (シリカゲル 60, Merck, Germany) により分析した。展開溶媒として、細胞抽出物中のリン脂質、アラキドン酸、ジアシルグリセロール及びトリアシルグリセロールを分離するため、石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸 (50/50/1, v/v) を用いた。培養液抽出物中のアラキドン酸の分析にはクロロホルム/メタノール (93/7, v/v) を用いた。各試料とも脂質標準品を担体として展開した。ヨウ素蒸気で着色した脂質スポットをかき取り、シンチレーションカクテル (クリアゾール, ナカライテスク) と混合後、放射活性を測定した。

滑膜細胞へのブラジキニンの結合

結合実験緩衝液には、0.1% NaN_3 , 0.2 mM bacitracin (Sigma Chemical, U.S.A.), 0.1 mM captopril

(Sigma Chemical, U.S.A.), 0.01 mM phosphoramidon (和光純薬), 1.0 mM dithiothreitol (和光純薬)及び0.1% 脂肪酸不含ウシ血清アルブミン (コスモバイオ)を添加した $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -含有 PBS (pH 7.4) を用いた [41-43]. 6 穴プレートで培養した滑膜細胞は 1.0 ml のこの緩衝液で 3 回洗浄後, 直ちにブラジキニン結合実験に供した. 滑膜細胞に, ヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, $M_r 2.0 \times 10^6$) 及び非標識ブラジキニン (5 μM , Peninsula Laboratories, U.S.A.) 存在下または非存在下, [2,3-prolyl-3,4- $^3\text{H}(\text{N})$]-ブラジキニン (0.7~35 nM, 3774 GBq/mmol, New England Nuclear, U.S.A.) を含む結合実験緩衝液 0.5 ml を添加し, 37°C で 1~180 min インキュベートした. インキュベート後, 細胞を結合実験緩衝液 1.0 ml で 3 回洗浄し, 少量の 2 M NaOH で可溶化及び 2 M HCl による中和後, 放射活性を測定した. 一部の滑膜細胞についてはヒアルロン酸前処理を行なった. 先ず細胞を, ヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, $M_r 2.0 \times 10^6$) を添加した 10% FBS を含む DMEM (0.5 ml/well) 中で 37°C, 30~180 min 培養した. 培養終了後, 細胞は結合実験緩衝液で洗浄し, ブラジキニン結合実験に供した.

[^3H]ブラジキニンの特異的結合量は, 全結合量から非特異的結合量 (5 μM 非標識ブラジキニン存在下で測定したもの) を差し引いて算出した.

一部の実験では滑膜細胞のブラジキニンレセプターサブクラスを明らかにするため, [^3H]ブラジキニンの結合に対する [Lysyl]-, [Thi 5,8 , D-Phe 7]-, [D-Arg 0 , Hyp 3 , Thi 5,8 , D-Phe 7]-, 及び [des-Arg 9]-ブラジキニン (いずれも Peninsula Laboratories, U.S.A.) の影響を検討した.

粘度測定

ヒアルロン酸 (1.5 mg/ml) とメチルセルロース (0.4, 1.5 及び 4.0 mg/ml) は 10% FBS を含む DMEM に溶解した. これらの多糖溶液の粘度 (mPA \cdot S で表示) は, 校正した回転型粘度計 (東京計器) を用い 37°C で測定した. 分子量 2.0×10^6 , 1.4×10^6 , 9.8×10^5 及び 2.8×10^5 の微生物由来のヒアルロン酸 (1.5 mg/ml) の粘度はそれぞれ 14.5, 8.1, 3.8 及び 1.8 mPA \cdot S であった. ブタ皮膚由来及びヒト臍帯由来のヒアルロン酸 (1.5 mg/ml) はそれぞれ 1.1 及び 5.1 mPA \cdot S となった. メチルセルロースの粘度は, 0.4, 1.5 及び 4.0 mg/ml でそれぞれ 3.1, 7.6 及び 12.9 mPA \cdot S であった. 培養液の粘度は 0.6 mPA \cdot S であった.

細胞生存率及び密度の測定

6 穴プレートで培養した滑膜細胞の培養液を, 分子量の異なるヒアルロン酸 (1.5 mg/ml) を添加した 10% FBS を含む DMEM (2.0 ml/well) と交換した. 滑膜細胞は 5% CO_2 , 37°C でさらに 48 h 培養した. 培養終了後 0.25% トリプシンを加え, 37°C, 10 min 処理することにより細胞を剥離した.

細胞懸濁液は10% FBSを含むDMEMと混合し、 $100\times g$, 10 min遠心した。沈澱した細胞は10% FBSを含むDMEM 0.25 mlに再懸濁し、血球計算盤により細胞数を計測した。細胞生存率はトリパンブルー排除法により評価した。

統計解析

結果は平均 \pm 標準偏差で示した。同一のヒアルロン酸濃度におけるヒアルロン酸分子量差に対する統計学的有意差は、対応のない Student's *t*-検定により評価した。

結果

細胞と培養液中の [14 C]アラキドン酸代謝物

滑膜細胞を [14 C]アラキドン酸 (6.3×10^4 dpm) で 24 h 標識すると、 4.7×10^4 dpm の標識アラキドン酸が細胞に取り込まれた。細胞に取り込まれた [14 C]アラキドン酸のうち 87% (4.1×10^4 dpm) は [14 C]リン脂質、7.9% (3.7×10^3 dpm) は [14 C]トリアシルグリセロールであった。 [14 C]ジアシルグリセロール及び [14 C]アラキドン酸量は無視し得るものであった (いずれも 1000 dpm 以下)。標識滑膜細胞をブラジキニン ($10\ \mu\text{M}$) または A23187 ($1\ \mu\text{M}$) 存在下、あるいは非存在下 (コントロール) で 3 h 培養した場合、取り込まれた標識アラキドン酸の遊離はブラジキニンで最大 (11.3%) となり、コントロールでは 5.5%、A23187 では 9.7% であった。培養液中へ遊離した全放射活性に対する遊離 [14 C]アラキドン酸量は、ブラジキニン刺激で 82.2%、A23187 刺激で 77.2%、刺激剤無添加 (コントロール) で 64.1% となった。従って滑膜細胞からの [14 C]アラキドン酸遊離は、主としてホスホリパーゼによるリン脂質の加水分解により開始されるものと考えられる。

[14 C]アラキドン酸遊離に対するブラジキニンとヒアルロン酸の作用

標識滑膜細胞からの [14 C]アラキドン酸遊離におけるブラジキニン用量依存性を調べた結果を Fig. 1 に示した。培養時間は 3 h とした。標識アラキドン酸遊離は $10\ \mu\text{M}$ ブラジキニンで最大に達した。

標識滑膜細胞を、ヒアルロン酸 ($1.5\ \text{mg/ml}$, $M_r\ 2.0\times 10^6$) 存在下または非存在下、 $10\ \mu\text{M}$ ブラジキニン添加または無添加で培養した。滑膜細胞からの [14 C]アラキドン酸遊離タイムコースは 6 h まで調べた (Fig. 2)。ブラジキニン無添加でも滑膜細胞は自発的に [14 C]アラキドン酸を遊離したが、

ブラジキニンを添加すると培養後 15 min で顕著な [14 C]アラキドン酸遊離が認められた。ブラジキニン刺激した細胞からの [14 C]アラキドン酸遊離量は無刺激細胞のそれに比較し、培養後 30 min 及び 3 h でそれぞれ 3.8 倍及び 2.2 倍となった。一方、ヒアルロン酸を共存させると、細胞からの [14 C]アラキドン酸遊離はブラジキニンの存在にかかわらず培養後 1 h で抑制された。

ヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, M_r 2.0×10^6) で前処理した標識滑膜細胞を、ブラジキニン (10 μ M) 添加または無添加で 45 min 培養した。この培養時間は、ヒアルロン酸が存在した場合でも [14 C]アラキドン酸遊離が抑制されないことより決定した (Fig. 2)。細胞からの [14 C]アラキドン酸遊離はヒアルロン酸前処理により抑制され、その効果は前処理時間に依存した (Table 1)。

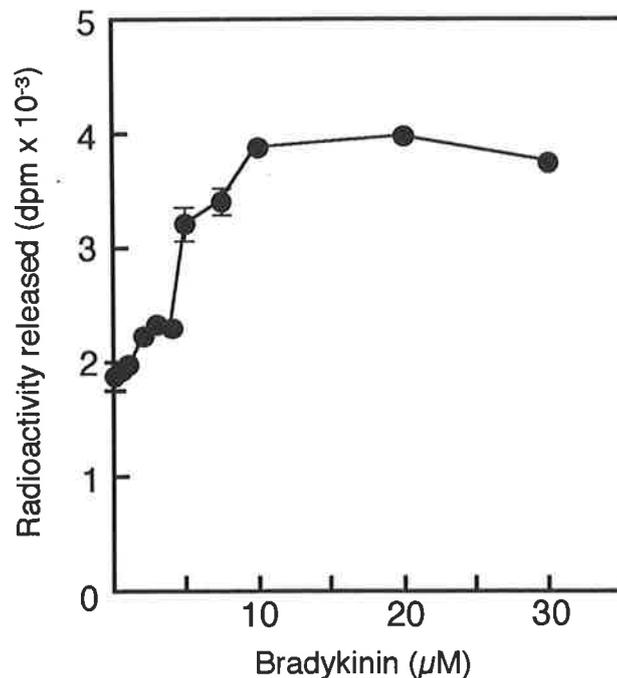


Fig.1. [14 C]Arachidonic acid release from prelabeled synovial cells in response to varying concentrations of bradykinin. Cells were exposed to various concentrations of bradykinin at 37°C for 3 h. Each point represents the mean \pm S.D. of three separate experiments.

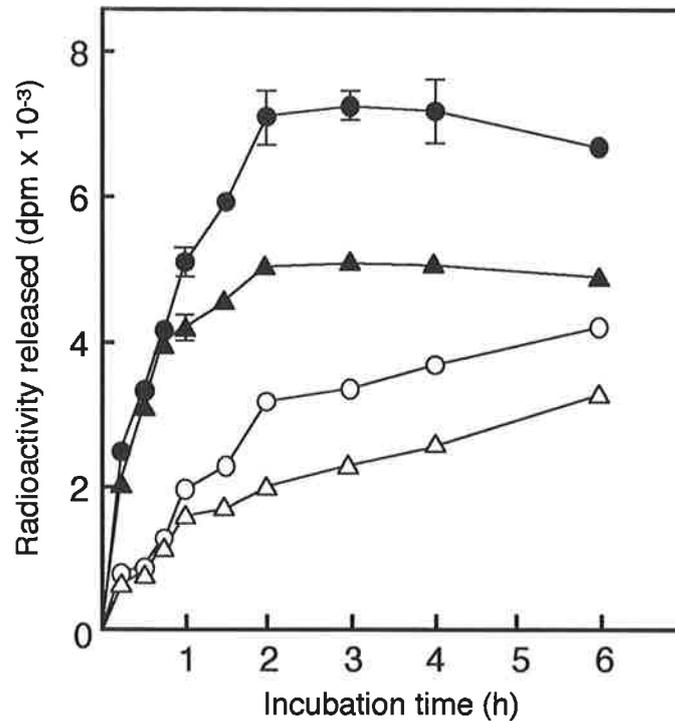


Fig.2. Effects of bradykinin and hyaluronan (HA) on the kinetics of [¹⁴C]-arachidonic acid release. Pre-labeled synovial cells were incubated with (●,▲) or without (○,△) bradykinin (10 μM) in the presence (▲,△) or absence (●,○) of 1.5 mg/ml HA (M_r 2.0 × 10⁶) at 37°C. After subjecting the media to different incubation periods, radioactivity in the medium was determined. Each point represents the mean ± S.D. of three or four separate experiments.

Table 1. Effect of preincubation with hyaluronan (HA) on bradykinin-induced [¹⁴C]arachidonic acid release from synovial cells

Preincubation time (h)	Radioactivity released (dpm × 10 ⁻³)		
	Control	+ Bradykinin	Relative to control
0	1.16 ± 0.01	5.09 ± 0.32	4.39
24	1.38 ± 0.07	4.51 ± 0.09	3.26
48	1.48 ± 0.10	4.41 ± 0.12	2.98

Pre-labeled synovial cells preincubated with 1.5 mg/ml HA (M_r 2.0 × 10⁶) were exposed to bradykinin (10 μM) at 37°C for 45 min. Each value represents the mean ± S.D. of three separate experiments.

ヒアルロン酸の濃度及び分子量依存的な [¹⁴C]アラキドン酸遊離抑制作用

標識滑膜細胞に種々の濃度で分子量の異なるヒアルロン酸 (M_r 2.0×10^6 , 1.4×10^6 , 9.8×10^5 及び 2.8×10^5) を添加し、ブラジキニン ($10 \mu\text{M}$) 存在下 3 h 培養した。ヒアルロン酸は滑膜細胞からの [¹⁴C]アラキドン酸遊離を $0.5 \sim 1.5 \text{ mg/ml}$ の範囲で濃度依存的に抑制した (Fig. 3)。高分子量のヒアルロン酸は低分子のものに比べ、強い [¹⁴C]アラキドン酸遊離抑制作用を示した。ブラジキニン濃度を、[¹⁴C]アラキドン酸遊離促進作用の飽和する $10 \mu\text{M}$ 以上 (Fig. 1) としてヒアルロン酸の影響を検討した。ヒアルロン酸は分子量 2.0×10^6 と $0.8 \sim 1.2 \times 10^6$ のものを用い、3 h 培養した。ブラジキニン $10 \mu\text{M}$ を添加したときに認められるヒアルロン酸の [¹⁴C]アラキドン酸遊離抑制パターンは、ブラジキニン濃度を $20 \mu\text{M}$ 及び $30 \mu\text{M}$ へ上げてても変化しなかった (Fig. 4)。またこの場合も、 $0.25 \sim 1.0 \text{ mg/ml}$ の範囲で高分子量のヒアルロン酸は低分子のものに比べ、強く [¹⁴C]アラキドン酸遊離を抑制した。標識滑膜細胞を A23187 ($1 \mu\text{M}$) で 3 h 刺激した場合もヒアルロン酸は [¹⁴C]アラキドン酸遊離を濃度依存的に抑制し、その作用は高分子量のものに強く認められた (Fig. 5)。

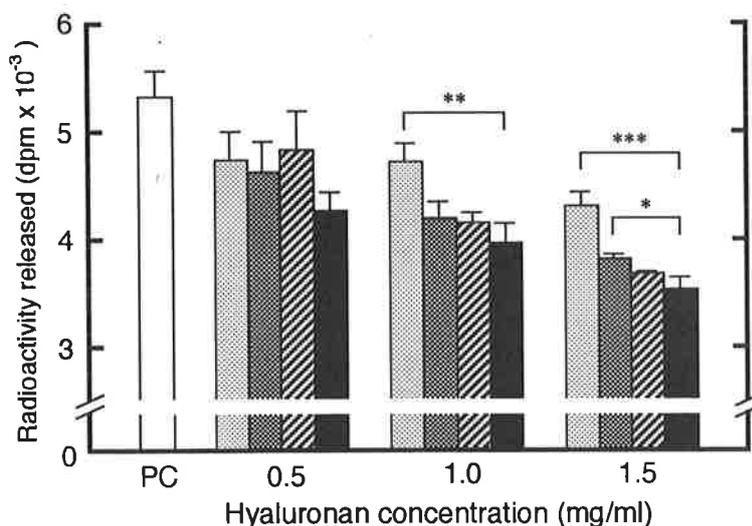


Fig.3. Effects of varying the molecular weight of hyaluronan (HA) on bradykinin-induced [¹⁴C]arachidonic acid release. Pre-labeled synovial cells were exposed to bradykinin ($10 \mu\text{M}$) at 37°C for 3 h in the absence (PC: positive control) or presence of HA of different molecular weights (\square : 2.8×10^5 , \square : 9.8×10^5 , \square : 1.4×10^6 , \blacksquare : 2.0×10^6) at 0.5, 1.0, and 1.5 mg/ml. Each column represents the mean \pm S.D. of three separate experiments. Statistical significance, evaluated by the unpaired Student's *t*-test, are $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**), and < 0.001 (***) .

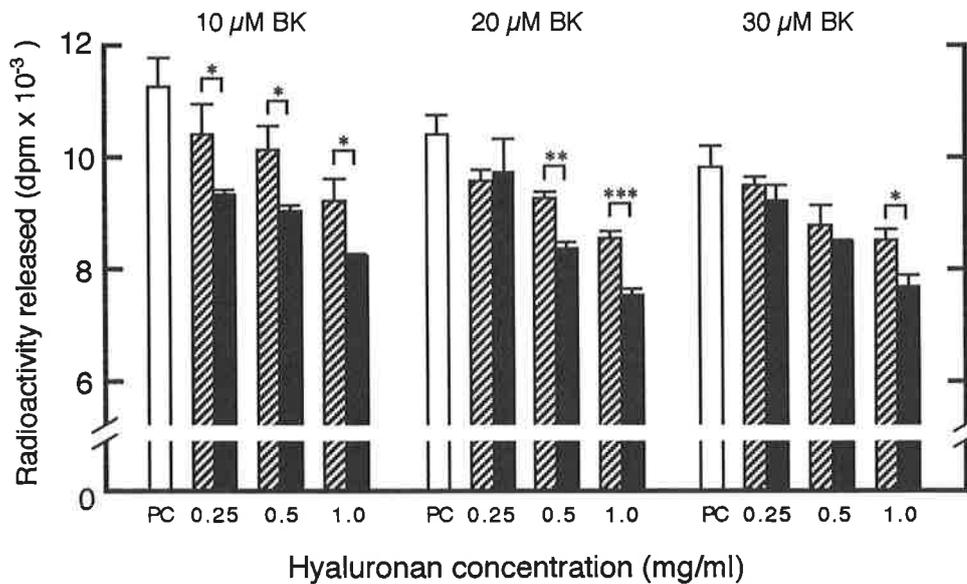


Fig.4. Effects of hyaluronan (HA) on [¹⁴C]arachidonic acid release in response to various concentrations of bradykinin (BK). Pre-labeled synovial cells were exposed to 10, 20, and 30 μM BK at 37°C for 3 h in the absence (PC: positive control) or presence of HA of different molecular weights (▨: 0.8 ~ 1.2 x 10⁶, ■: 2.0 x 10⁶) at 0.25, 0.5, and 1.0 mg/ml. Each column represents the mean ± S.D. of three separate experiments. Statistical significance, evaluated by the unpaired Student's *t*-test, are *p* < 0.05 (*), < 0.01 (**), and < 0.001 (***).

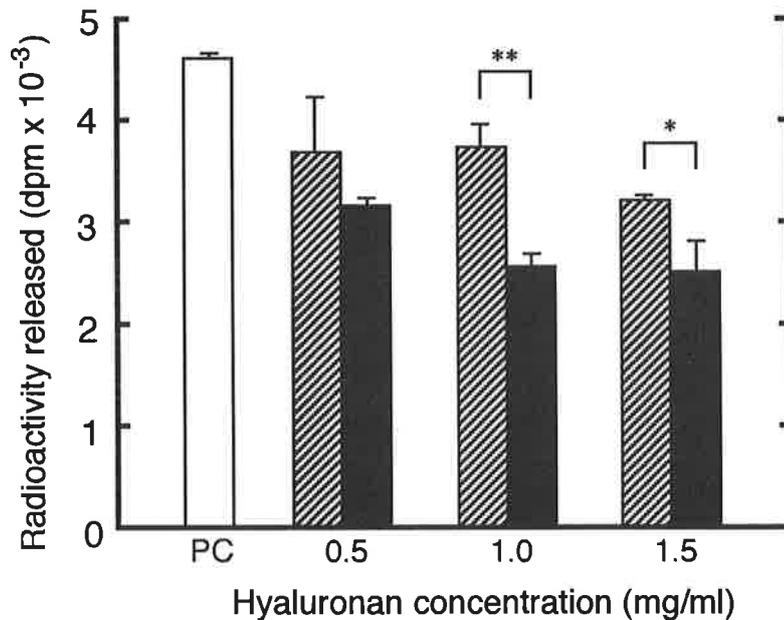


Fig.5. Effects of hyaluronan (HA) on A23187-induced [¹⁴C]-arachidonic acid release. Pre-labeled synovial cells were exposed to A23187 (1 μM) at 37°C for 3 h in the absence (PC: positive control) or presence of HA of different molecular weight (▨: 0.8 ~ 1.2 x 10⁶, ■: 2.0 x 10⁶) at 0.5, 1.0, and 1.5 mg/ml. Each column represents the mean ± S.D. of three separate experiments. Statistical significance, evaluated by Student's *t*-test, are *p* < 0.05 (*) and < 0.01 (**).

[¹⁴C]アラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸とメチルセルロースの粘度の影響

標識滑膜細胞を、異なる分子量のヒアルロン酸 (1.5 mg/ml) 及びメチルセルロース (0.4, 1.5 及び 4.0 mg/ml) 存在下または非存在下、ブラジキニン (10 μ M) 添加または無添加で 3 h 培養した。これらの多糖溶液の粘度と [¹⁴C]アラキドン酸遊離量の関係を Fig. 6 に示した。8.1 mPA \cdot S 以下の粘度では、[¹⁴C]アラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸とメチルセルロースの抑制作用は明らかに異なっていた。特にブラジキニン存在下で顕著であった。メチルセルロースは 0.4 mg/ml (3.1 mPA \cdot S) 及び 1.5 mg/ml (7.6 mPA \cdot S) では粘度の増加にもかかわらず [¹⁴C]アラキドン酸遊離抑制作用を示さなかったのに対し、ヒアルロン酸は効果的に [¹⁴C]アラキドン酸遊離を抑制した。しかしながら 12.9 mPA \cdot S 以上の粘度では、[¹⁴C]アラキドン酸遊離量におけるヒアルロン酸とメチルセルロースの差はほとんど認められなかった。

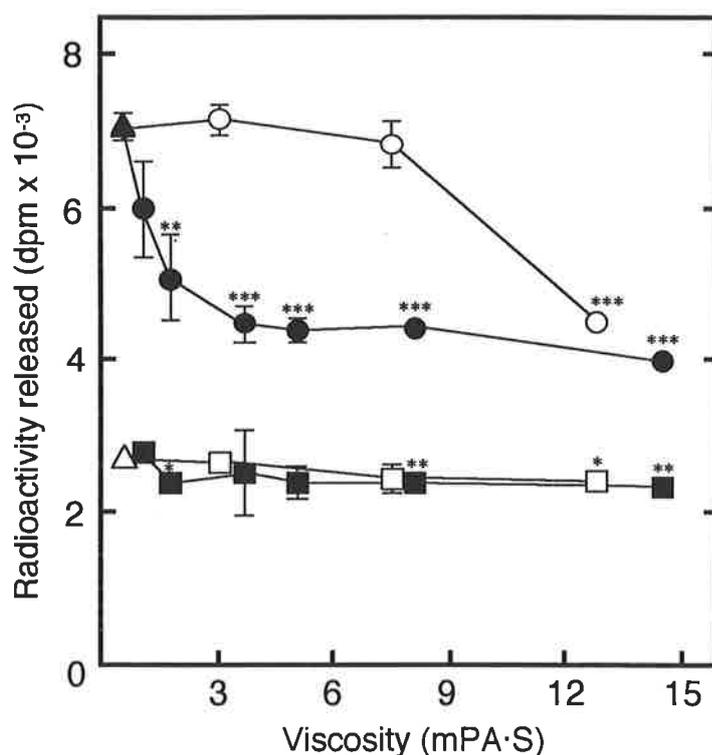


Fig.6. Effects of varying the viscosity of hyaluronan (HA) and methyl cellulose (MC) samples on bradykinin-induced and spontaneous [¹⁴C]-arachidonic acid releases. Pre-labeled synovial cells were incubated with (●,○,▲: positive control) or without (■,□,△: negative control) bradykinin (10 μ M) at 37°C for 3 h in the absence (▲,△: controls) or presence of HA (●,■) of different molecular weights at 1.5 mg/ml or MC (○,□) at 0.4, 1.5, and 4.0 mg/ml. Each point represents the mean \pm S.D. of three separate experiments (except the positive control: n=9). Significant differences of $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**), and < 0.001 (***) were values compared to each control.

[¹⁴C]アラキドン酸取り込みに対するヒアルロン酸の影響

ヒアルロン酸が培養液中へ遊離された [¹⁴C]アラキドン酸の滑膜細胞への再取り込みを促進させることにより、培養液中の遊離 [¹⁴C]アラキドン酸レベルを低下させている可能性が考えられる。このため滑膜細胞の [¹⁴C]アラキドン酸取り込みに対するヒアルロン酸の影響を検討した。細胞は、ブラジキニンに誘導された [¹⁴C]アラキドン酸遊離に対して最大の抑制効果を与えたヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, M_r 2.0×10^6) 存在下または非存在下、細胞からの [¹⁴C]アラキドン酸遊離レベルに比べ過剰量である 0.6 nmole の [¹⁴C]アラキドン酸 (7×10^4 dpm) とともに培養した。この結果、ヒアルロン酸は 22 h まで細胞への [¹⁴C]アラキドン酸取り込み量に影響しなかった (Table 2)。

Table 2. Effects of hyaluronan (HA) on incorporation of labeled arachidonic acid (AA) in synovial cells

Time (h) after incubation	Residual radioactivity in medium (dpm $\times 10^{-4}$)		
	Control (without HA)	Incubation with HA	n
0	6.95	6.94	2
2	5.78 \pm 0.09	5.74 \pm 0.03	3
6	4.29 \pm 0.04	4.55 \pm 0.09	3
22	2.59 \pm 0.01	2.62 \pm 0.01	3

Confluent synovial cells were incubated with [¹⁴C]AA (7×10^4 dpm) in the presence (1.5 mg/ml) or absence (control) of HA (M_r 2.0×10^6). At the end of incubation, the residual radioactivity was measured. Each value represents the mean \pm S.D. (except 0 h).

[³H]ブラジキニン結合特性

滑膜細胞への [³H]ブラジキニン結合タイムコースを 180 min まで調べた (Fig. 7)。ブラジキニンレセプターに対して親和性の異なるサブタイプの存在が示されている [17,20] ことより、添加する [³H]ブラジキニンは低濃度 (0.7 nM) と高濃度 (35 nM) で検討したが、いずれも全結合は反応後 60 min で平衡に達した。これよりブラジキニン結合実験は原則的に 60 min の反応時間で行なった。添加する [³H]ブラジキニン濃度を変化させた場合、滑膜細胞への [³H]ブラジキニンの特異的な結合が認められ、およそ 10 nM でリガンドの特異的結合が飽和した (Fig. 8)。特異的結合データを Scatchard 分析すると、滑膜細胞のブラジキニン結合部位は 1 種類と考えられ、平衡解離定数(Kd) は 0.78 nM, 全結合部位数 (Bmax) は $7.6 \text{ fmole}/10^5 \text{ cells}$ となった (Fig. 8 Inset)。これは細胞当たり 9×10^4 結合部位数に相当する。

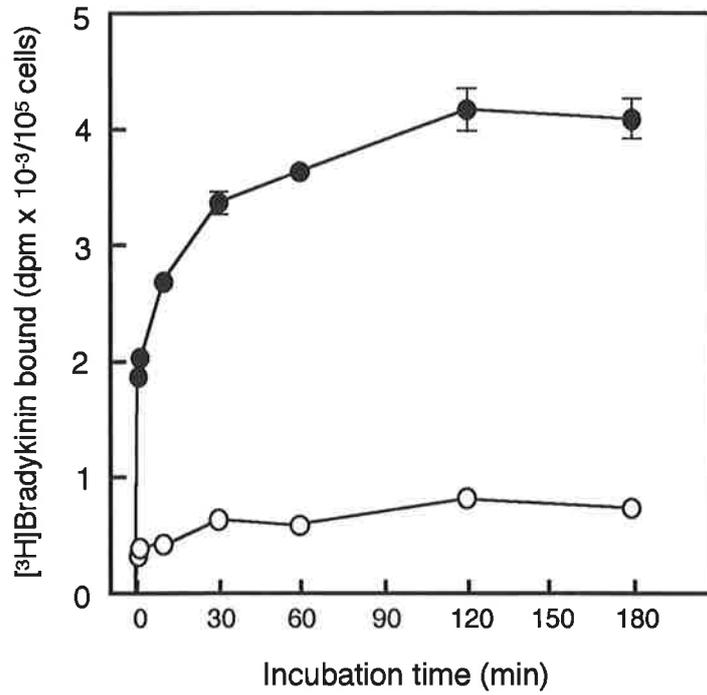


Fig.7. Time course of [³H]bradykinin (BK) binding by synovial cells. Cells were incubated with 0.7 nM (O) or 35 nM (●) of [³H]BK at 37°C. Each point represents the mean ± S.D. of three separate experiments.

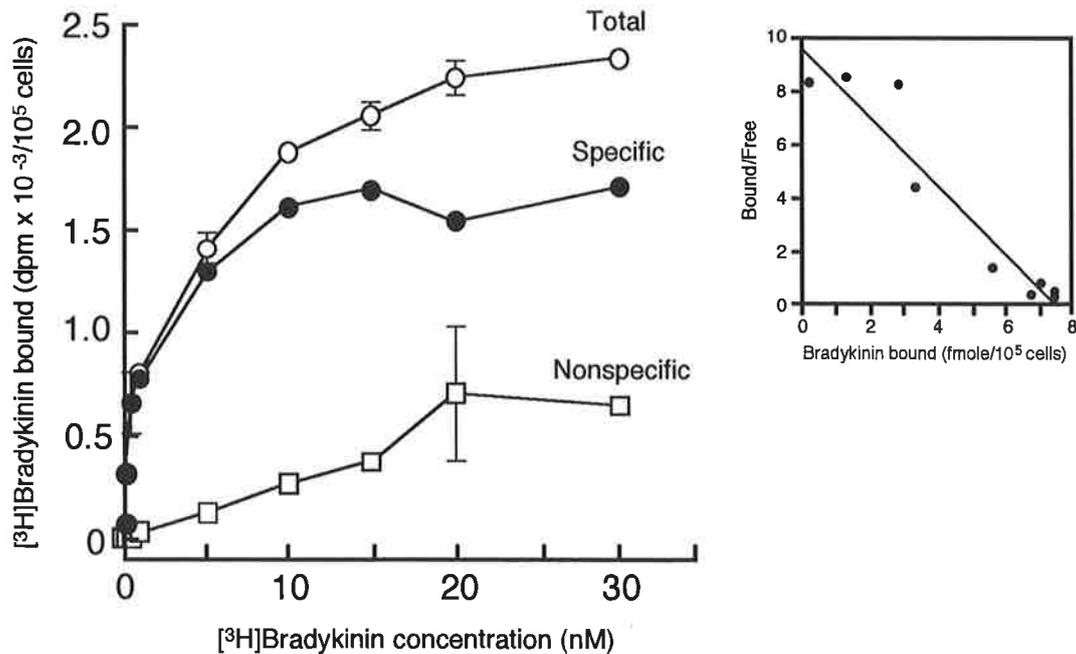


Fig.8. Binding of [³H]bradykinin (BK) to synovial cells. Increasing concentrations of [³H]BK were incubated with cells at 37°C for 60 min. Specific [³H]BK binding is defined as the difference between binding in the absence (total) and presence (nonspecific) of 5 μM unlabeled BK. Each point represents the mean ± S.D. of three separate experiments. Inset represents Scatchard transformation of the specific binding data.

ブラジキニン結合部位の特異性を調べるため、ブラジキニンレセプター-アゴニスト及び-アンタゴニストを用いて、滑膜細胞への $[^3\text{H}]$ ブラジキニン結合に対する競合効果を検討した(Fig. 9)。滑膜細胞は濃度を変えたアゴニストまたはアンタゴニスト存在下、3 nM $[^3\text{H}]$ ブラジキニン(この濃度では非特異的結合を無視し得る; Fig. 8)とともに 37°C , 60 min インキュベートした。 $[\text{Lysyl}]$ -ブラジキニンは強く $[^3\text{H}]$ ブラジキニンの結合を阻害し、その作用は未標識ブラジキニンと同等であった。また B_2 -ブラジキニンレセプターアンタゴニストである $[\text{Thi}^{5,8}, \text{D-Phe}^7]$ -ブラジキニン及び $[\text{D-Arg}^0, \text{Hyp}^3, \text{Thi}^{5,8}, \text{D-Phe}^7]$ -ブラジキニンも結合阻害作用を示した。しかしながら B_1 -ブラジキニンレセプターアゴニストである $[\text{des-Arg}^9]$ -ブラジキニンはほとんど競合効果を示さなかった。これらの結果より、滑膜細胞のブラジキニンレセプターは B_2 クラスに属するものと考えられる[41-45]。

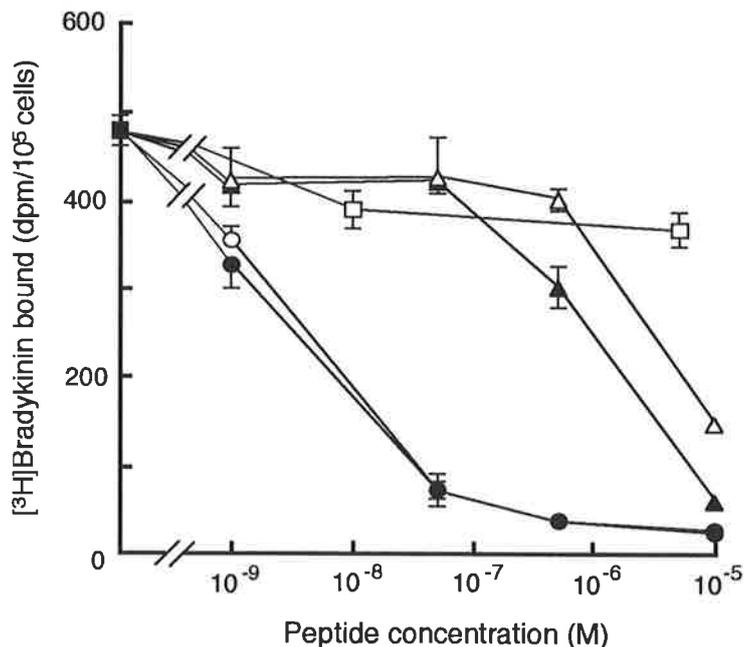


Fig.9. Competition of binding of $[^3\text{H}]$ bradykinin (BK) to synovial cells by BK analogues. Cells were incubated at 37°C for 60 min with 3 nM $[^3\text{H}]$ BK and varying concentrations of unlabeled BK (●), $[\text{Lysyl}]$ -BK (○), $[\text{D-Arg}^0, \text{Hyp}^3, \text{Thi}^{5,8}, \text{D-Phe}^7]$ -BK (▲), $[\text{Thi}^{5,8}, \text{D-Phe}^7]$ -BK (△), and $[\text{des-Arg}^9]$ -BK (□). Each point represents the mean \pm S.D. of three separate experiments.

$[^3\text{H}]$ ブラジキニンの結合に対するヒアルロン酸の影響

滑膜細胞を、ヒアルロン酸(1.5 mg/ml, M , 2.0×10^6)存在下または非存在下、30 nM $[^3\text{H}]$ ブラジキニンとともにインキュベートした。滑膜細胞への $[^3\text{H}]$ ブラジキニン結合は1~180 minの範囲で調べたが、いずれの時間ポイントにおいても、ヒアルロン酸は特異的 $[^3\text{H}]$ ブラジキニン結合量に影響

しなかった (Fig. 10). また滑膜細胞をヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, M_r 2.0×10^6) で 30~180 min 前処理しても [^3H]ブラジキニン結合量に影響を与えなかった (Fig. 11). ヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, M_r 2.0×10^6) またはヒアルロン酸と同様に高粘度の溶液を与えるメチルセルロース (1.5 mg/ml) で 30 min 前処理した滑膜細胞を, さらに同濃度のこれらの多糖存在下, 8 nM [^3H]ブラジキニンとともに 60 min インキュベートした. この場合も, いずれの多糖とも [^3H]ブラジキニン結合量に影響しなかった (Table 3).

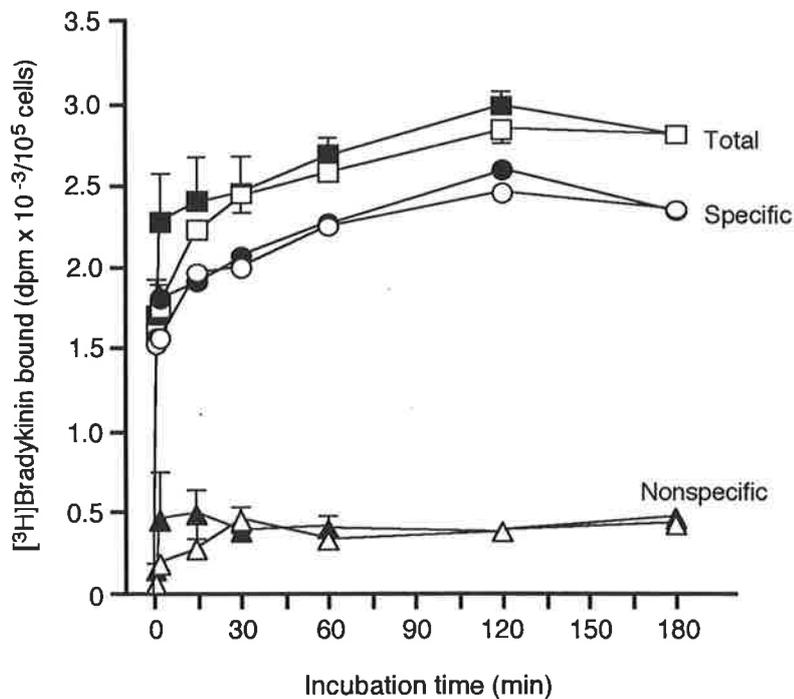


Fig.10. Effect of hyaluronan (HA) on the kinetics of [^3H]bradykinin (BK) binding to synovial cells. Cells were incubated with 30 nM [^3H]BK in the presence (■, ▲, ●) or absence (□, △, ○) of 1.5 mg/ml HA (M_r 2.0×10^6) at 37°C for the indicated periods. Specific [^3H]BK binding (○, ●) is defined as the difference between binding in the absence (total: □, ■) and presence (nonspecific: △, ▲) of 5 μM unlabeled BK. Each point represents the mean \pm S.D. of three separate experiments.

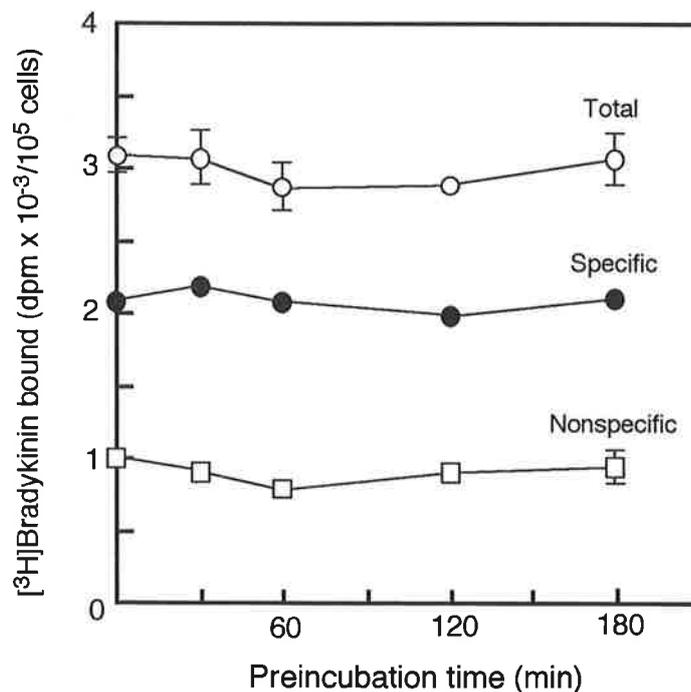


Fig.11. Effect of preincubation with hyaluronan (HA) on [³H]bradykinin (BK) binding to synovial cells. Cells preincubated with 1.5 mg/ml HA (M_r 2.0×10^6) at 37°C for the indicated periods were exposed to 30 nM [³H]BK at 37°C for 60 min. Specific [³H]BK binding is defined as the difference between binding in the absence (total) and presence (nonspecific) of 5 μ M unlabeled BK. Each point represents the mean \pm S.D. of three separate experiments.

Table 3. Comparison of [³H]bradykinin (BK) binding in hyaluronan (HA)- and methyl cellulose (MC)-treated synovial cells

Treatment	[³ H]BK binding (dpm/10 ⁵ cells)		
	Total	Non-specific	Specific
Control	2122 \pm 26	220 \pm 5	1902 [1.0] ^{a)}
HA	1996 \pm 164	212 \pm 50	1784 [0.94]
MC	2037 \pm 157	270 \pm 112	1768 [0.93]

Synovial cells were preincubated with or without 1.5 mg/ml HA (M_r 2.0×10^6) and MC for 30 min at 37°C, washed and exposed to [³H]BK (8 nM) in the presence or absence of the polysaccharides for 60 min at 37°C. Specific [³H]BK binding is defined as the difference between binding in the absence (total) and presence (nonspecific) of 5 μ M unlabeled BK. Values are the mean \pm S.D. of three separate experiments. ^{a)}Each value in square parenthesis expresses the relative ratio of specific binding to control.

細胞生存率及び密度に対するヒアルロン酸の影響

滑膜細胞を、由来及び分子量の異なるヒアルロン酸 (1.5 mg/ml) 存在下または非存在下, 48 h 培養した。いずれの場合も滑膜細胞の生存率は 98% 以上であった (Table 4)。細胞密度 (単位面積当りの細胞数) にもヒアルロン酸の影響はほとんど認められなかった (Table 4)。

Table 4. Effects of hyaluronan (HA) on the viability and the density of synovial cells

Source and M_r of HA	Viability (%)	Density (cells/cm ² × 10 ⁻⁴)
Control	98.9 ± 0.7	4.07 ± 0.16
Bacteria M_r 2.8 × 10 ⁵	98.1 ± 1.3	4.15 ± 0.72
M_r 9.8 × 10 ⁵	99.1 ± 0.7	4.08 ± 0.05
M_r 1.4 × 10 ⁶	97.9 ± 0.2	3.80 ± 0.25
M_r 2.0 × 10 ⁶	98.3 ± 1.1	4.23 ± 0.38
Pig skin M_r 4.0~6.0 × 10 ⁴	97.8 ± 0.4	3.67 ± 0.47
Human umbilical cord		
M_r 0.8~1.2 × 10 ⁶	98.6 ± 0.4	3.79 ± 0.10

Synovial cells were incubated with or without (control) 1.5 mg/ml HA of different sources and molecular weights (M_r) at 37°C for 48 h. Values are the mean ± S.D. of three or six (control) separate experiments, where each was performed in duplicate.

考 察

ヒアルロン酸は、ブラジキニンまたは A23187 で刺激した滑膜細胞, 及び刺激しない細胞からの [¹⁴C]アラキドン酸遊離を抑制した。細胞内アラキドン酸レベルは, アラキドン酸の細胞からの遊離と細胞膜リン脂質への取り込みの平衡により調節されることが報告されている [35]。従って, 培養液中のアラキドン酸レベルがヒアルロン酸により低下する現象について, ふたつの機構を想定できる。先ず, ヒアルロン酸は実際に滑膜細胞からのアラキドン酸遊離を抑制するというもの。次に, ヒアルロン酸は滑膜細胞のアラキドン酸再取り込みを促進するというものである。これらの可能性を検討するため, 滑膜細胞への [¹⁴C]アラキドン酸取り込みに対するヒアルロン酸の影響を調べた。この結果, ヒアルロン酸 (M_r 2.0 × 10⁶) は 1.5 mg/ml の濃度で滑膜細胞への [¹⁴C]アラキドン酸取り込みに影響しないことが示された (Table 2)。またヒアルロン酸は滑膜細胞に対して毒性を示さなかった (Table 4)。従ってヒアルロン酸による [¹⁴C]アラキドン酸遊離レベルの低下は, [¹⁴C]アラキドン酸

遊離抑制に基づくものと考えられる。

ブラジキニン刺激した滑膜細胞の [14 C]アラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸の抑制作用は、ヒアルロン酸の濃度及び分子量に依存していた (Fig. 3)。ヒアルロン酸は濃度及び分子量の増加に伴い、その水溶液の粘度が増大する [5]。 [14 C]アラキドン酸遊離は高濃度 (4.0 mg/ml) のメチルセルロースによっても抑制されることより (Fig. 6)、高分子量のヒアルロン酸の抑制効果は、部分的には粘度に起因するものと考えられる。これは、培養液の粘度が細胞表面、あるいは細胞表面に極めて近接した細胞と培養液の境界領域からのアラキドン酸分子の拡散性に影響する可能性を否定できないためである。しかしながらメチルセルロースとは異なり、ヒアルロン酸は低い粘度でも顕著な [14 C]アラキドン酸遊離抑制作用を示した。この結果より、細胞からの [14 C]アラキドン酸遊離に対するヒアルロン酸の抑制効果は、単に培養液粘度の増大による結果ではなく、粘度以外の要因が関与していることが示唆される。

[14 C]アラキドン酸遊離抑制は、ヒアルロン酸がブラジキニン分子を捕捉することにより、細胞表面上のブラジキニンレセプターへのブラジキニンの結合を阻害することでも達成される。この可能性を検討するため、滑膜細胞への [3 H]ブラジキニン結合に対するヒアルロン酸の影響を調べた。この結果、最も強く [14 C]アラキドン酸遊離を抑制するヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, M_r 2.0×10^6) を添加した場合でも、1~180 min の範囲で [3 H]ブラジキニンの結合は全く影響されなかった (Fig. 10)。このときに加えた [3 H]ブラジキニン濃度 (30 nM) は、特異的結合が既に飽和している濃度であったため (Fig. 8)、添加する [3 H]ブラジキニンを飽和結合量以下として検討した。しかしながらこの場合もヒアルロン酸は [3 H]ブラジキニン結合に影響しなかった。メチルセルロース (1.5 mg/ml) は [14 C]アラキドン酸遊離を抑制しなかったが (Fig. 6)、 [3 H]ブラジキニン結合にも影響しなかった。従って、検討した範囲での培養液の粘度はブラジキニンの細胞への結合に影響せず、またヒアルロン酸分子鎖中にブラジキニン分子が捕捉されることもないと考えられる。これらのことは、A23187を用いて、レセプターを介さずに [14 C]アラキドン酸遊離を促進させた場合でもヒアルロン酸による遊離抑制が示されること (Fig. 5)、また添加するブラジキニンを [14 C]アラキドン酸遊離促進作用が飽和する濃度以上としても、ヒアルロン酸による遊離抑制パターンに変化はないこと (Fig. 4) でも支持される。

ヒアルロン酸は滑膜細胞からの [14 C]アラキドン酸遊離に対して、ブラジキニン存在下及び非存在下いずれの場合も、培養後 45 min までほとんど影響しなかった (Fig. 2)。ヒアルロン酸が抑制効果を発揮するには、滑膜細胞とヒアルロン酸が 1 h 以上接触している必要があるものと考えられる。滑膜細胞をヒアルロン酸 (1.5 mg/ml, M_r 2.0×10^6) で 24 h または 48 h 前処理すると、ブラジキニ

ン刺激による滑膜細胞の [14 C]アラキドン酸遊離応答が低下した (Table 1). 滑膜細胞を同一のヒアルロン酸で 48 h 培養しても細胞数に変化のなかったこと (Table 4), また滑膜細胞をヒアルロン酸で前処理してもブラジキニンの結合量に影響しなかったこと (Fig. 11) を考慮すると, ヒアルロン酸による [14 C]アラキドン酸遊離抑制は, ヒアルロン酸が滑膜細胞に直接作用した結果であると考えられる.

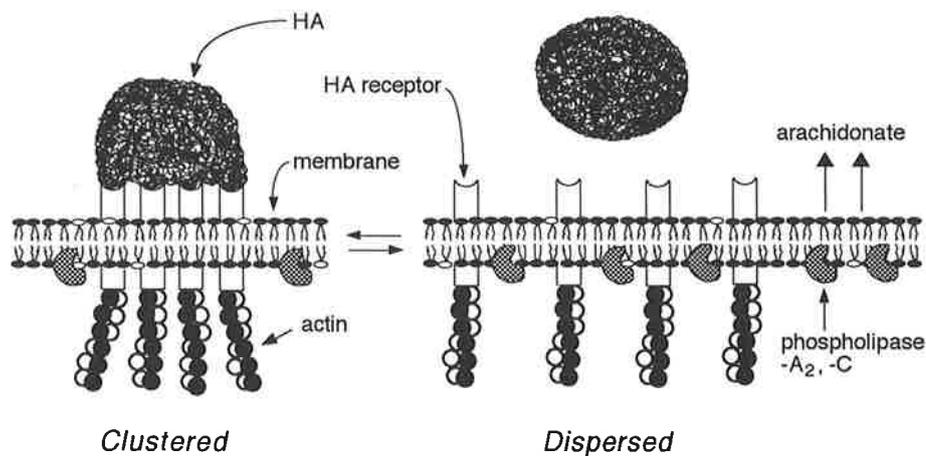
細胞膜に存在する酵素は膜流動性など細胞膜の物理的環境に影響を受けるといわれている [46,47]. 細胞膜リン脂質を基質とするホスホリパーゼ活性も, リン脂質の物理状態に起因する細胞膜微細構造の変化や細胞膜流動性の変化に影響を受けることが報告されている [48-56]. 細胞表面上にはヒアルロン酸結合タンパク質が存在するが [10-14], このタンパク質は細胞膜を貫通し, 細胞骨格と会合していることが報告されている [57-59]. 細胞表面上のこのようなタンパク質とヒアルロン酸が結合した結果, 膜流動性などの細胞膜の物理状態に影響することが予想される (Schema I 参照). ヒアルロン酸は巨大分子であるため, ひとつの分子で複数のヒアルロン酸結合タンパク質と会合するものと考えられるが, この状態は膜流動性の低下を招くことが推定される. 膜流動性の低下はホスホリパーゼ活性低下につながることを示されている [49,54]. またヒアルロン酸 (ヒト臍帯由来) は, 0.4 mg/ml でブタ膵臓由来ホスホリパーゼ A₂ の無細胞酵素反応に影響しないことが報告されている [60]. 従ってヒアルロン酸による細胞膜流動性の低下を仮定すれば, ヒアルロン酸によるアラキドン酸遊離抑制作用を説明できるものと考えられる. Underhill と Toole [10] は, 分子量 4.5×10^5 , 9.5×10^5 及び 1.3×10^6 のヒアルロン酸を用い, 線維芽細胞へのヒアルロン酸の結合親和性は分子量の増加に依存して大きくなることを報告している. またこの現象は, 分子量の増加に伴って, ひとつのヒアルロン酸分子の占有する結合タンパク質が多くなることに起因するものだとしている. この報告と, ヒアルロン酸が滑膜細胞からのアラキドン酸遊離を分子量依存的に抑制する結果とはよく一致する.

近年, インターロイキン-1 による滑膜細胞や軟骨細胞のプロスタグランジン E₂ 産生を, ヒアルロン酸が *in vitro* で抑制することが報告された [61,62]. プロスタグランジン E₂ はシクロオキシゲナーゼ産物のひとつであるが, シクロオキシゲナーゼは小胞体に存在し, 細胞膜には存在しない [63,64]. 外部より添加したヒアルロン酸は細胞膜を通過しないこと [65] より, ヒアルロン酸によるプロスタグランジン E₂ 産生抑制はシクロオキシゲナーゼに対する直接作用とは考えにくい. インターロイキン-1 によって滑膜細胞 [66-71] や軟骨細胞 [72,73] のプロスタグランジン E₂ 産生が促進される過程にはホスホリパーゼの活性化が伴うことが数多く報告されている. またプロスタグランジン E₂ などのエイコサノイド生合成は, リン脂質からの遊離アラキドン酸生成によって律速される [36,49].

これらのことを考慮すると、ヒアルロン酸が細胞膜に結合することによりホスホリパーゼの活性化が抑制され、その結果としてプロスタグランジン E₂ 産生が抑制されたことが推定される。ヒアルロン酸結合タンパク質のひとつである CD44 分子に対するモノクローナル抗体で滑膜細胞を前処理すると、サイトカインにより刺激した滑膜細胞のプロスタグランジン E₂ 産生が抑制されることが報告された [74]。この報告は、細胞膜に結合したヒアルロン酸のホスホリパーゼ活性への影響に関する仮説を支持するものと考えられる。

本研究では、ヒアルロン酸の関節組織における作用を評価するモデルとして、ヒト培養滑膜細胞を用いた。このモデルより得られた結果は、関節症患者関節液中のプロスタグランジン E₂ 量に対して、関節内投与したヒアルロン酸は抑制的であるという近年の知見 [75] と矛盾しない。関節内において高分子量のヒアルロン酸が高濃度で存在することは、滑膜細胞からのアラキドン酸遊離抑制作用に基づきプロスタグランジン E₂ 産生抑制効果をもたらし、関節炎症の鎮静化に寄与するものと考えられる。

Schema I. Interaction of HA with the cell surface



第2章 ラット好中球によるウシ鼻中隔軟骨分解に対する ヒアルロン酸の抑制作用

序論

コラーゲン及びプロテオグリカンを主要成分とする関節軟骨は骨端を被覆し、荷重より骨を保護する結合組織である。軟骨の物理的強度は、プロテオグリカンやコラーゲンの分解により著しく低下する [76, 77]。慢性関節リウマチを始めとする炎症性関節疾患は関節軟骨の分解が特徴であるが、部分的には炎症局所に集まった好中球に起因する [78-80]。好中球による軟骨分解には、主としてライソゾーム酵素、特にセリンプロテアーゼであるエラスターゼやカテプシン G が関与するといわれているが [81-84]、その機構はよく理解されているわけではない。刺激された好中球はさらに活性酸素を産生するが、関節液の主成分のひとつであるヒアルロン酸は活性酸素により分解され、関節液の粘度低下を招くことが報告されている [85-87]。そこで好中球による軟骨分解に対してヒアルロン酸の分子量変化がいかなる影響を与えるのか検討した。本研究ではラット腹腔好中球とウシ鼻中隔軟骨の共培養系をモデルとして用いた。また軟骨の分解に伴い軟骨より著しくプロテオグリカンが遊離されるが、コラーゲン遊離はほとんど見られないことより [76]、軟骨より遊離するプロテオグリカン量を硫酸化グリコサミノグリカン量として測定し、軟骨分解の指標とした。好中球の刺激剤として、cytochalasin B 存在下 *N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP)、opsonized zymosan、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 及びカルシウム-イオノフォア A23187 を用いた。この結果、好中球による軟骨分解はヒアルロン酸により濃度及び分子量依存的に抑制された。しかしながら用いる好中球刺激剤によりヒアルロン酸の抑制挙動は異なった。ヒアルロン酸による軟骨分解抑制においてヒアルロン酸の粘度は重要な因子と考えられるが、単に粘度のみではなく、好中球の機能への直接的作用も伴うことが推察された。

材料と方法

材料

エンドトキシンを含まない3種類の分子量の異なるヒアルロン酸(粘度平均分子量 M_v 2.0×10^6 , 9.5×10^5 及び 2.8×10^5) は *Streptococcus zooepidemicus* の培養上清より精製され [39]、資生堂医薬品

研究所より提供された。Opsonized zymosan は、40 mg の zymosan (Schwarz/Mann Biotech, U.S.A.) を 5 ml の ウシ胎児血清 (FBS; Hyclone Laboratories, U.S.A.) で 37°C, 30 min インキュベートすることにより調製し、RPMI1640 (Flow Laboratories, U.S.A.) で 3 回洗浄後使用した。ペニシリン及びストレプトマイシン (いずれも明治製菓) は、それぞれ 100 U/ml 及び 100 µg/ml で RPMI1640 に添加した。N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP; 10 mM, Sigma Chemical, U.S.A.), cytochalasin B (2 mg/ml, Sigma Chemical, U.S.A.), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; 2 mg/ml, ナカライテスク) 及び A23187 (2 mM, Sigma Chemical, U.S.A.) はジメチルスルホキシドに溶解し、使用するまで -20°C で保存した。

好中球の調製

Kudo らの方法 [88] に従い、腹腔浸潤細胞として好中球を調製した。ウイスター系雄性ラット (200~300 g, ケアリー) に 7~9 ml の生理食塩液に溶解した 3% カゼインナトリウム (和光純薬) を腹腔内投与し、15~16 h 後にエーテル麻酔、放血致死させ開腹した。腹腔は氷冷した $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -含有 phosphate-buffered saline (PBS) 10 ml で 4 回洗浄し、浸潤細胞を採取した。細胞懸濁液は 4°C で 300×g, 5 min 遠心し、細胞を沈澱として回収した。得られた細胞は混入した組織片を沈澱させるため 2.47% ゼラチンを含む生理食塩液に懸濁し、室温で 30 min 静置した。細胞は室温で 300×g, 5 min 遠心して集め、混入している赤血球を溶血により除くため、氷冷した 0.2% NaCl を加えて緩やかに 30 s 攪拌した。溶血処理後、直ちに等量の 1.6% NaCl を加えた。得られた好中球は $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -不含 PBS で 3 回洗浄し、RPMI1640 に再懸濁した。

軟骨ディスクの調製

軟骨スライス は屠殺後 2 時間以内の成牛 (ホルスタイン) 鼻中隔より無菌的に調製した。ディスク (厚さ 1.8~2.2 mm, 直径 3 mm) は無菌の皮膚用パンチを用いて軟骨スライスより打ち抜いた。軟骨ディスクは 10% 非働化 FBS, 100 U/ml ペニシリン及び 100 µg/ml ストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (Flow Laboratories, U.S.A.) 中で、使用するまで 2~4 日間, 5% CO_2 , 37°C で培養した。軟骨分解への生軟骨細胞の関与を避けるため、軟骨ディスクは凍結し、次いで $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -不含 PBS 中で 60°C, 30 min 加熱することにより軟骨細胞を死滅させた。一部の実験では生軟骨をそのまま用い、各実験ごとに明示した。

好中球と軟骨ディスクの共培養

数値はすべて最終濃度または最終液量を示す。軟骨ディスクを96穴丸底プレート(1 disc/well)に入れ、そこへ非働化及び酸処理(pH 2, 室温で2 h 放置後中和)[89]したFBS (5%)を含むRPMI1640 (200 μ l)を添加した。次いで分子量の異なるヒアルロン酸(0.1~2.0 mg/ml)及び好中球刺激剤を加え、最後に調製直後の好中球を添加した。一部の試験では、ウェルに好中球及び好中球刺激剤を加えた30 min または 90 min 後に、ヒアルロン酸及び軟骨ディスクを添加した。好中球刺激剤としては、cytochalasin B (5 μ g/ml, 本物質はFMLPの作用を増強することが報告されている[90]) 存在下FMLP (1 μ M), opsonized zymosan (1.3 mg/ml), TPA (100 ng/ml) またはA23187 (1 μ M)を用いた。各ウェルには $0.9 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ の範囲で好中球を添加した。好中球数は各実験ごとに示した。対照試験はヒアルロン酸無添加で行ない、好中球を含むものを陽性対照、好中球を含まないものを陰性対照とした。

軟骨分解機構を特徴づけるため、ヒアルロン酸に代えて作用の明確な種々の試薬を添加した。次のものを用いた; Diisopropylfluorophosphate (DFP; 1 mM, Sigma Chemical, U.S.A.), α -1-proteinase inhibitor (α -1-PI; 1 mg/ml, Sigma Chemical, U.S.A.), 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7; 50 μ M, 生化学工業), superoxidé dismutase (SOD; 1 mg/ml, 3670 U/mg, 東洋紡), catalase (50 μ g/ml, 65 KU/mg, Boehringer Mannheim, Germany), 抗ラットCD11aモノクローナル抗体 WT.1 (anti-CD11a, 1:50 希釈, 生化学工業), 抗ラットCD18モノクローナル抗体 WT.3 (anti-CD18, 1:50 希釈, 生化学工業), 及びcytochalasin B (5 μ g/ml)。一部の好中球(2×10^7 cells/ml)はポリプロピレンチューブ内で百日咳毒素(100 ng/ml, 科研製薬)により37°C, 2 h 前処理した。

軟骨と好中球の接触がプロテオグリカン分解に必要なかどうか検討するため、次の分離培養実験を行なった。軟骨ディスクを24ウェルプレートに入れ(2 discs/well), そこへ5%非働化及び酸処理FBSを含むRPMI1640 (600 μ l)を添加した。軟骨と好中球を分離しておくためのポリカーボネート膜(ポアサイズ0.4 μ m)を底部に装着したウェルインサートカップ(Transwell, Costar, U.S.A.)には、 6×10^6 の好中球及びウェル内と同濃度の好中球刺激剤(100 μ l)を加え、カップをウェルに挿入した。膜分離をしない条件を対照試験とした。

各サンプルは5% CO₂, 37°Cで18 hまで培養した。培養時間は各実験ごとに明示した。

軟骨分解の測定

軟骨分解率は、培養液中に遊離した硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)量を1,9-ジメチルメチレンブルー(DMB)法[91]で測定することにより求めた。標準物質にはコンドロイチン-4硫酸(生化学工業)

学工業)を用いた。培養終了後、軟骨と培養液を分離し、軟骨は $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -不含 PBS で 3 回洗浄した。培養液は 4°C で $1500 \times g$, 5 min 遠心し、好中球を除去した。軟骨は、パパイン (0.3mg/ml, type IV, Sigma Chemical, U.S.A.), EDTA (1 mM) 及び dithiothreitol (2 mM) を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) 200 μl 中で 60°C , 3 h 消化した。培養液には等量の同パパイン溶液を加え、同様に消化した。軟骨と培養液のパパイン消化液の一部について DMB と反応させ、525 nm の吸光度を測定することにより硫酸化 GAG 含量を求めた。軟骨分解率は次式で表示した。

$$\text{培養液中の硫酸化 GAG 量 } (\mu\text{g}) = A$$

$$\text{軟骨中の硫酸化 GAG 量 } (\mu\text{g}) = B$$

$$\text{軟骨分解率 } (\%) = A / (A + B) \times 100$$

好中球への FMLP の結合

FMLP 結合実験には、溶血処理後の腹腔浸潤細胞をさらに密度勾配遠心法により分画した好中球を用いた。 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -不含 PBS に懸濁した腹腔浸潤細胞を、等量の Histopaque (比重 1.077, Sigma Chemical, U.S.A.) に重層し、室温で $400 \times g$, 30 min 遠心した。底部に沈澱した好中球を $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -不含 PBS で洗浄し、10 mM NaN_3 を含む Hanks' balanced salt solution (結合実験緩衝液, pH 7.4) に再懸濁した。

ポリプロピレンチューブ内の 2×10^6 の好中球に、ヒアルロン酸 (1.0 mg/ml, M_r 2.0×10^6) 及び非標識 FMLP (100 μM , 保存溶液 200 mM) 存在下または非存在下, N-[phenylalanine-ring-3, 4, 5- $^3\text{H}(\text{N})$]-FMLP (1~100 nM, 2834 GBq/mmol, New England Nuclear, U.S.A.) を含む結合実験緩衝液 200 μl を加え、 4°C で 1~60 min 振とうしながらインキュベートした。インキュベート後、反応液を 0.1% polyethyleneimine に 3 h 浸漬したワットマン GF/C ガラス繊維フィルターでろ過し、フィルターは直ちに氷冷した $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -不含 PBS (5 ml) で 3 回洗浄した。フィルターは乾燥させた後、シンチレーションカクテル (AQUASOL-2, New England Nuclear, U.S.A.) 中で放射活性を測定した。 ^3H FMLP の特異的結合量は、全結合量から非特異的結合量 (100 μM 非標識 FMLP 存在下で測定したもの) を差し引いて算出した。

統計解析

結果は平均 \pm 標準偏差で示した。同一のヒアルロン酸濃度におけるヒアルロン酸分子量差に対する統計学的有意差は、対応のない Student's *t*-検定により評価した。

結果

好中球による軟骨分解

軟骨ディスクを, cytochalasin B (5 $\mu\text{g/ml}$) 存在下 FMLP (1 μM), opsonized zymosan (1.3 mg/ml), TPA (100 ng/ml) または A23187 (1 μM) で活性化した好中球とともに 37°C, 2 h 培養した. FMLP/cytochalasin B, opsonized zymosan 及び TPA は同程度の軟骨分解促進作用を示したが, A23187 は他に比べ弱かった (Table 5).

Table 5. Cartilage degradation by activated neutrophils

Experiment	Stimulation agent	Sulfated GAG content in μg	
		Medium [%] ^{a)}	Medium + Cartilage
1	Without neutrophils	1 \pm 1	1380 \pm 300
	Non-stimulated neutrophils	16 \pm 3 [1.1]	1471 \pm 222
	FMLP (1 μM) + cytochalasin B (5 $\mu\text{g/ml}$)	184 \pm 16 [12.4]	1487 \pm 242
	Opsonized zymosan (1.3 mg/ml)	172 \pm 20 [12.5]	1380 \pm 204
	TPA (100 ng/ml)	145 \pm 34 [10.3]	1407 \pm 271
2	Without neutrophils	0 \pm 0	1264 \pm 291
	Non-stimulated neutrophils	29 \pm 8 [2.1]	1409 \pm 391
	TPA (100 ng/ml)	145 \pm 11 [11.1]	1303 \pm 273
	A23187 (1 μM)	67 \pm 16 [5.0]	1350 \pm 250

Cartilages and neutrophils (2×10^6 cells/cartilage) were exposed to the above stimulation agents at 37°C for 2 h. Values in μg are the mean \pm S.D. of five separate experiments (except non-stimulated neutrophils in Exp. 2, n=10), where each was performed in triplicate. ^{a)}Each value in square parenthesis expresses the percentage of sulfated GAG content released in the medium against the total sulfated GAG in the medium and cartilage under various conditions.

好中球による軟骨分解の特徴

FMLP/cytochalasin B, opsonized zymosan または TPA で好中球を刺激し, 37°C, 2 h 軟骨とともに培養した. セリンプロテアーゼ阻害剤である DFP [92] または α -1-PI [82] を培養液に添加すると, 軟骨分解の顕著な阻害が認められた (Table 6). 活性酸素のスキャベンジャーである SOD 及び catalase には軟骨分解抑制作用は認められなかった. FMLP/cytochalasin B 及び opsonized zymosan の刺激に対して, protein kinase C 阻害剤である H-7 の影響も認められなかった. 好中球と軟骨をポリカーボネート膜で分離した場合, 軟骨分解はほとんど観察されなかった. 好中球を百日咳毒素で前処理すると, FMLP/cytochalasin B で刺激した場合は顕著な軟骨分解抑制効果が認められたが, opsonized zymosan 及び TPA 刺激した好中球に対する影響は弱かった. Cytochalasin B (アクチン重合を阻害する貪食阻害剤 [93]) または anti-CD18 (β_2 インテグリン β 鎖を認識する [94,95]) を添加すると, opsonized zymosan で刺激した好中球の軟骨分解は顕著に抑制された. 一方, FMLP/cytochalasin B

Table 6. Characterization of neutrophil-mediated cartilage degradation

Experiment	Treatment	Sulfated GAG content in μg											
		FMLP/cytochalasin B					Opsonized zymosan					TPA	
		Medium	Medium + Cartilage [%] ^{a)}	Medium	Medium + Cartilage [%]	Medium	Medium + Cartilage [%]	Medium	Medium + Cartilage [%]	Medium	Medium + Cartilage [%]	Medium	Medium + Cartilage [%]
1 ^{b)}	No addition	135 ± 16	992 ± 196	[13.6]	82 ± 50	719 ± 241	[11.4]	145 ± 34	1407 ± 271	[10.3]			
	DFP (1 mM)	28 ± 6	1295 ± 323	[2.2]	26 ± 6	1052 ± 200	[2.5]	62 ± 20	1318 ± 190	[4.7]			
	No addition	184 ± 16	1487 ± 242	[12.4]	172 ± 20	1380 ± 204	[12.5]	29 ± 17	1349 ± 175	[2.1]			
2 ^{c)}	DFP (1 mM)	57 ± 7	1409 ± 163	[4.0]	64 ± 11	1190 ± 165	[5.4]	148 ± 32	1535 ± 270	[9.6]			
	α -1-PI (1 mg/ml)	17 ± 4	1298 ± 135	[1.3]	39 ± 9	1330 ± 167	[2.9]	165 ± 31	1287 ± 299	[12.8]			
	SOD (1 mg/ml)	175 ± 17	1361 ± 279	[12.9]	146 ± 27	1319 ± 155	[11.1]	127 ± 30	1373 ± 375	[9.2]			
3 ^{c)}	Catalase (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	169 ± 31	1462 ± 307	[11.6]	178 ± 15	1388 ± 121	[12.8]	119 ± 14	1479 ± 94	[8.0]			
	Anti-CD11a (1:50 dilution)	187 ± 22	1538 ± 130	[12.2]	193 ± 34	1515 ± 337	[12.7]						
	Anti-CD18 (1:50 dilution)	162 ± 22	1462 ± 175	[11.1]	29 ± 8	1273 ± 223	[2.3]						
4 ^{b)}	Cytochalasin B (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)				37 ± 10	1463 ± 370	[2.5]						
	No addition	82 ± 8	1000 ± 55	[8.2]	62 ± 7	1033 ± 126	[6.0]						
	H-7 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	92 ± 19	990 ± 71	[9.3]	69 ± 17	969 ± 172	[7.1]						
5 ^{c)}	SOD (1 mg/ml)	67 ± 14	894 ± 153	[7.5]	58 ± 9	789 ± 116	[7.4]						
	No addition	128 ± 37	1008 ± 230	[12.7]	125 ± 41	1136 ± 307	[11.0]						
	H-7 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	132 ± 21	854 ± 140	[15.5]	108 ± 27	982 ± 154	[11.0]						
6 ^{d)}	No addition	306 ± 44	1668 ± 165	[18.3]	228 ± 44	1507 ± 172	[15.1]	188 ± 16	1411 ± 219	[13.3]			
	Pertussis toxin ^{e)}	91 ± 16	1452 ± 261	[6.3]	162 ± 56	1333 ± 195	[12.2]	155 ± 29	1453 ± 125	[10.7]			
	No addition	345 ± 36	2992 ± 160	[11.5]	235 ± 47	2891 ± 305	[8.1]	381 ± 32	2855 ± 324	[13.3]			
6 ^{d)}	Polycarbonate membrane ^{f)}	5 ± 2	2674 ± 406	[0.2]	5 ± 3	2713 ± 385	[0.2]	7 ± 2	2839 ± 273	[0.2]			

Cartilages and neutrophils (^{b)} 1.4×10^6 , ^{c)} 2×10^6 , and ^{d)} 3×10^6 cells/cartilage), activated with FMLP (1 μM)/cytochalasin B (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), opsonized zymosan (1.3 mg/ml), or TPA (100 ng/ml) were treated under various conditions at 37°C for 2 h. Values in μg are the mean \pm S.D. of five separate experiments, where each was performed in triplicate. ^{a)}Each value in square parenthesis expresses the percentage of sulfated GAG content released in the medium against the total sulfated GAG in the medium and cartilage under various conditions. ^{e)}Cells were pretreated with the toxin at 37°C for 2 h. ^{f)}Cells and cartilage were separated with a polycarbonate membrane (0.4 μm pore).

及びTPA刺激した好中球に対して anti-CD18 はほとんど作用を示さなかった。Anti-CD11a (β_2 インテグリン LFA-1 α 鎖を認識する [95]) にはいずれの刺激条件下でも抑制作用は認められなかった。

FMLP/cytochalasin B 刺激した好中球による軟骨分解に対するヒアルロン酸の作用

軟骨と好中球 (1×10^6 cells/cartilage) を分子量の異なるヒアルロン酸 (2.0 mg/ml) 存在下または非存在下, FMLP/cytochalasin B とともに 37°C で 18 h まで培養した。Fig. 12 に活性化された好中球による軟骨分解タイムコースを示した。培養後 2 h で顕著な軟骨分解が認められ, 培養後 18 h では軟骨からの硫酸化 GAG 遊離率は 46% に達した。ヒアルロン酸が存在すると, 好中球の軟骨分解は 18 h まで抑制された。ヒアルロン酸の抑制効果はヒアルロン酸分子量に依存していた。また培養後 6 h では, ヒアルロン酸の軟骨分解抑制効果は 0.1~2.0 mg/ml の範囲で濃度依存的であった (Fig. 13)。この抑制パターンは培養後 18 h でも変化しなかった。生軟骨を用いた場合でも, 死軟骨の場合と同様にヒアルロン酸は好中球による軟骨分解を抑制した (Fig. 14)。

好中球を予め FMLP/cytochalasin B で 90 min 刺激した後, ヒアルロン酸及び軟骨を添加し, さらに 6 h 培養した。ヒアルロン酸は濃度依存的に軟骨分解を抑制したが, 分子量依存性は認められなかった (Fig. 15)。

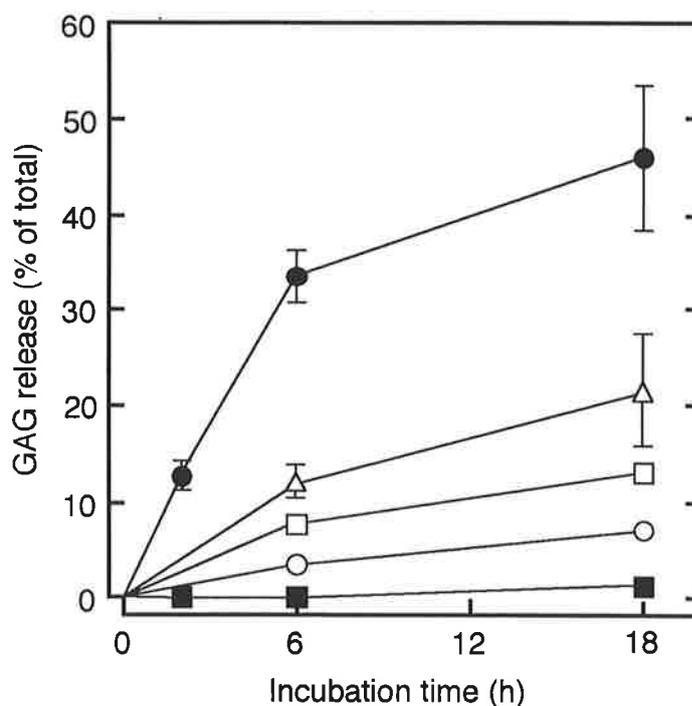


Fig.12. Effects of FMLP/cytochalasin B and hyaluronan (HA) on kinetics of cartilage degradation by neutrophils. Cartilage and neutrophils (1×10^6 cells/cartilage) were incubated at 37°C with (M_r Δ : 2.8×10^5 , \square : 9.5×10^5 , \circ : 2.0×10^6) or without (\bullet : positive control, \blacksquare : negative control without neutrophils) 2.0 mg/ml HA in the presence of the stimulation agent for neutrophils. Each point represents the mean \pm S.D. of five or six separate experiments, where each was performed in triplicate.

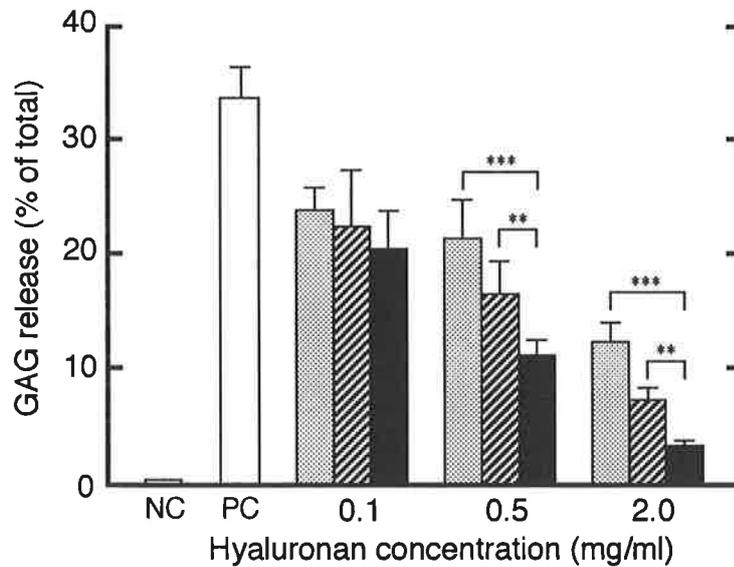


Fig.13. Effects of hyaluronan (HA) on neutrophil-mediated cartilage degradation in the presence of the stimulation agent, FMLP/cytochalasin B. Cartilages and neutrophils (0.9×10^6 cells/cartilage) were incubated at 37°C for 6 h in the absence or presence of HA of different molecular weights (■: 2.8×10^5 , ▨: 9.5×10^5 , ■: 2.0×10^6) at 0.1, 0.5, and 2.0 mg/ml. Control cultures are represented by NC (negative control without neutrophils) and PC (positive control without HA). Each column represents the mean \pm S.D. of five or six separate experiments, where each was performed in triplicate. Statistical significance, evaluated by the unpaired Student's *t*-test, are $p < 0.01$ (**) and < 0.001 (***).

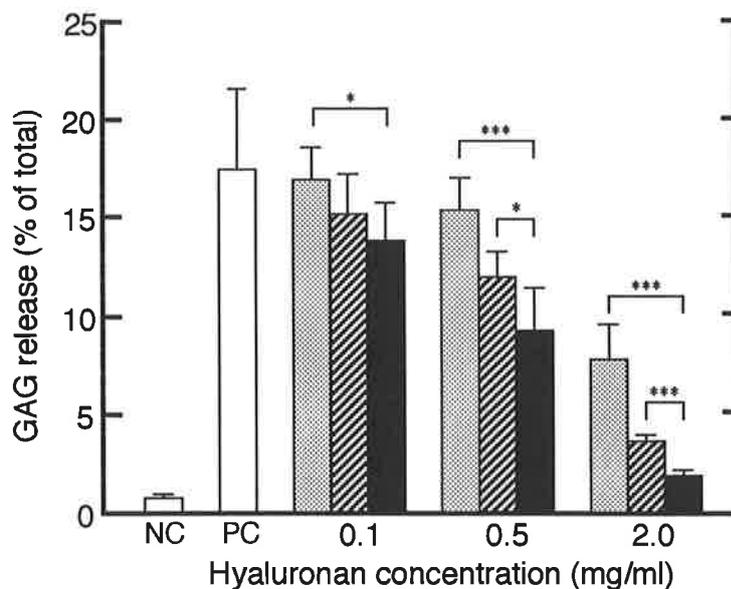


Fig.14. Effects of hyaluronan (HA) on neutrophil-mediated degradation of live cartilage in the presence of the stimulation agent, FMLP/cytochalasin B. Live cartilages and neutrophils (2×10^6 cells/cartilage) were incubated at 37°C for 6 h in the absence or presence of HA of different molecular weights (■: 2.8×10^5 , ▨: 9.5×10^5 , ■: 2.0×10^6) at 0.1, 0.5, and 2.0 mg/ml. Control cultures are represented by NC (negative control without neutrophils) and PC (positive control without HA). Each column represents the mean \pm S.D. of six separate experiments, where each was performed in triplicate. Statistical significance, evaluated by the unpaired Student's *t*-test, are $p < 0.05$ (*) and < 0.001 (***).

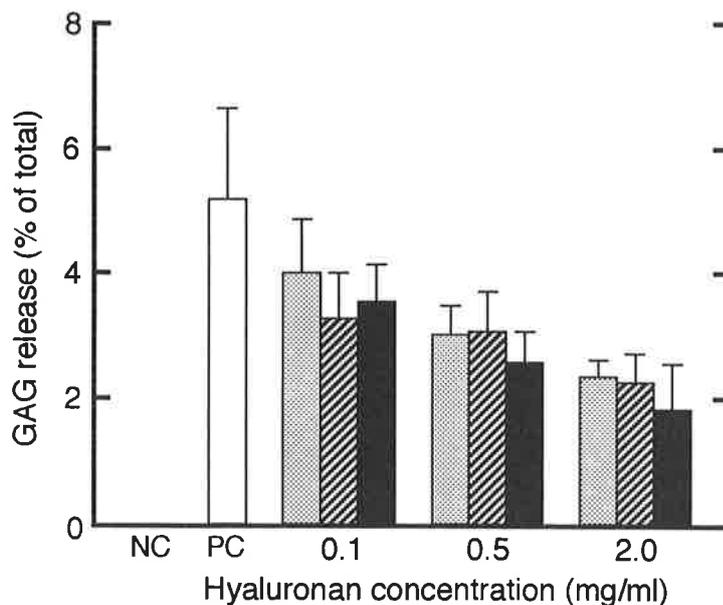


Fig.15. Effects of hyaluronan (HA) on cartilage degradation mediated by neutrophils preincubated with the stimulation agent, FMLP/cytochalasin B. Neutrophils (2×10^7 cells/ml) were preincubated with the stimulation agent at 37°C for 90 min. After preincubation, cartilages (cartilage/ 2×10^6 cells) and HA (M_r ■: 2.8×10^5 , ▨: 9.5×10^5 , ■: 2.0×10^6) at 0.1, 0.5, and 2.0 mg/ml were added to neutrophil cultures and incubated at 37°C for 6 h. Control cultures are represented by NC (negative control without neutrophils) and PC (positive control without HA). Each column represents the mean \pm S.D. of six separate experiments, where each was performed in triplicate.

Opsonized zymosan 刺激した好中球による軟骨分解に対するヒアルロン酸の作用

FMLP/cytochalasin B による刺激の場合と同様に、軟骨と好中球 (1×10^6 cells/cartilage) をヒアルロン酸存在下または非存在下、opsonized zymosan とともに培養した。Fig. 16 に活性化された好中球による軟骨分解タイムコースを示した。ヒアルロン酸非存在下では、好中球による軟骨分解パターンは FMLP/cytochalasin B で刺激した場合と類似していた。ヒアルロン酸を添加すると、好中球による軟骨分解に経時的な遅れが観察された。培養後 2 h では、分子量の大きなヒアルロン酸 (M_r 9.5×10^5 及び 2.0×10^6) は 0.5~2.0 mg/ml の範囲で軟骨分解を濃度依存的に抑制した (Fig. 17)。分子量 2.0×10^6 のヒアルロン酸は、分子量 9.5×10^5 のものより強い抑制効果を示した。一方、分子量 2.8×10^5 のヒアルロン酸は、検討した濃度ではほとんど軟骨分解を抑制しなかった。生軟骨を用いても同様な結果であった (Fig. 18)。

好中球を opsonized zymosan で予め 30 min 刺激した後にヒアルロン酸と軟骨を加え、さらに 2 h 培養した。FMLP/cytochalasin B で予め刺激した場合と異なり、ヒアルロン酸は 0.1~2.0 mg/ml の範囲で軟骨分解を全く抑制しなかった (Fig. 19)。

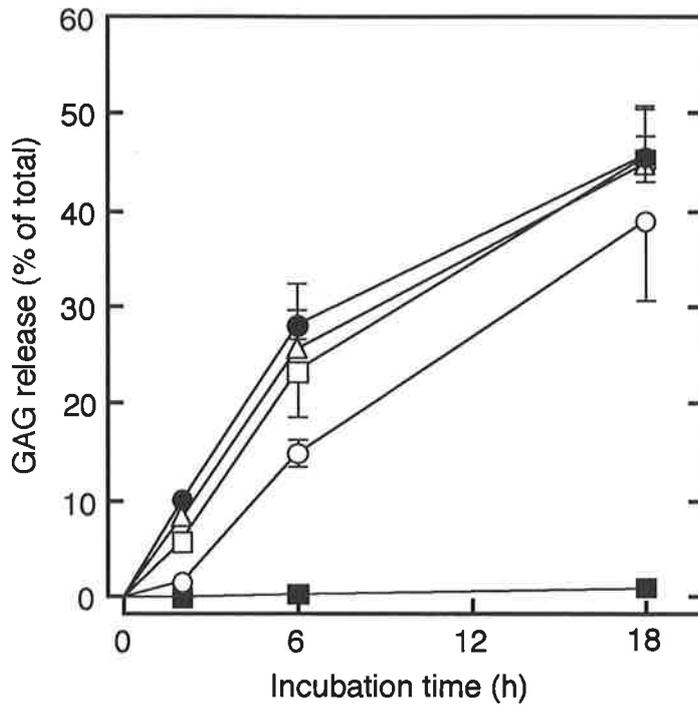


Fig.16. Effects of opsonized zymosan and hyaluronan (HA) on kinetics of cartilage degradation by neutrophils. Cartilage and neutrophils (1×10^6 cells/cartilage) were incubated at 37°C with ($M_r \Delta$: 2.8×10^5 , \square : 9.5×10^5 , \circ : 2.0×10^6) or without (\bullet : positive control, \blacksquare : negative control without neutrophils) 2.0 mg/ml HA in the presence of the stimulation agent for neutrophils. Each point represents the mean \pm S.D. of six separate experiments, where each was performed in triplicate.

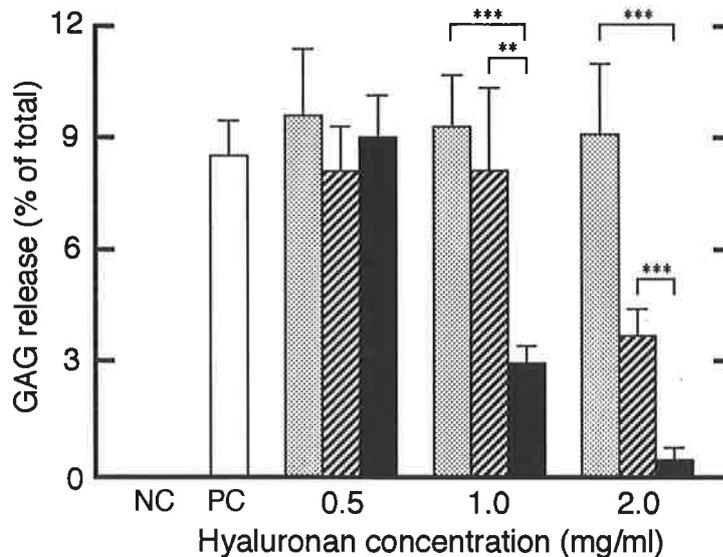


Fig.17. Effects of hyaluronan (HA) on neutrophil-mediated cartilage degradation in the presence of the stimulation agent, opsonized zymosan. Cartilages and neutrophils (1.1×10^6 cells/cartilage) were incubated at 37°C for 2 h in the absence or presence of HA of different molecular weights (\square : 2.8×10^5 , hatched : 9.5×10^5 , \blacksquare : 2.0×10^6) at 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml. Control cultures are represented by NC (negative control without neutrophils) and PC (positive control without HA). Each column represents the mean \pm S.D. of six separate experiments, where each was performed in triplicate. Statistical significance, evaluated by the unpaired Student's *t*-test, are $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

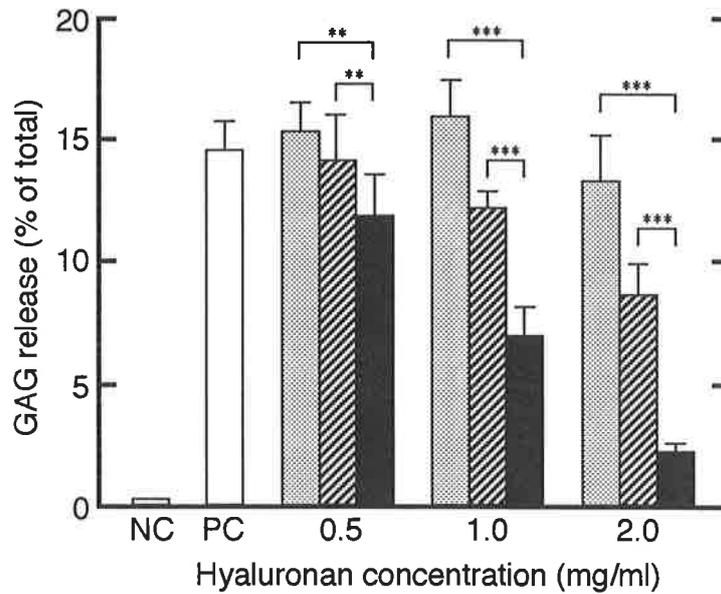


Fig.18. Effects of hyaluronan (HA) on neutrophil-mediated degradation of live cartilage in the presence of the stimulation agent, opsonized zymosan. Live cartilages and neutrophils (2×10^6 cells/cartilage) were incubated at 37°C for 2 h in the absence or presence of HA of different molecular weights (\square : 2.8×10^5 , ▨ : 9.5×10^5 , \blacksquare : 2.0×10^6) at 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml. Control cultures are represented by NC (negative control without neutrophils) and PC (positive control without HA). Each column represents the mean \pm S.D. of six separate experiments, where each was performed in triplicate. Statistical significance, evaluated by the unpaired Student's *t*-test, are $p < 0.01$ (**) and < 0.001 (***).

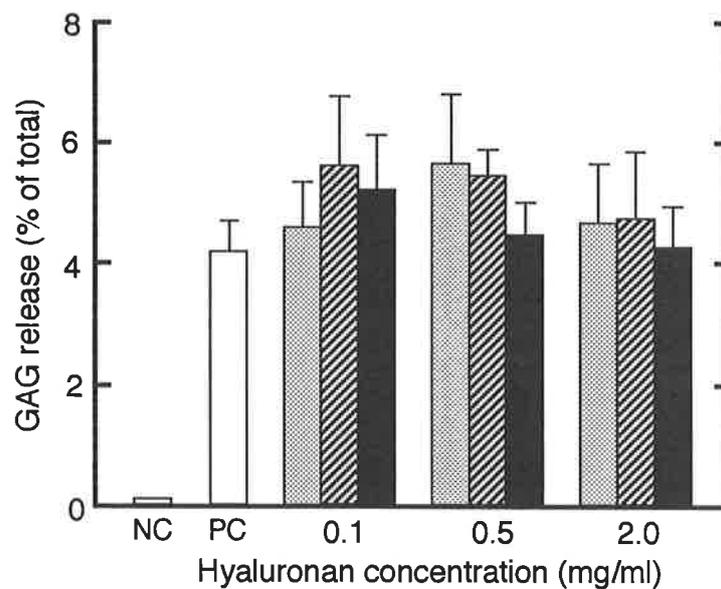


Fig.19. Effects of hyaluronan (HA) on cartilage degradation mediated by neutrophils preincubated with the stimulation agent, opsonized zymosan. Neutrophils (1×10^7 cells/ml) were preincubated with the stimulation agent at 37°C for 30 min. After preincubation, cartilages (cartilage/ 1×10^6 cells) and HA (M_r \square : 2.8×10^5 , ▨ : 9.5×10^5 , \blacksquare : 2.0×10^6) at 0.1, 0.5, and 2.0 mg/ml were added to neutrophil cultures and incubated at 37°C for 2 h. Control cultures are represented by NC (negative control without neutrophils) and PC (positive control without HA). Each column represents the mean \pm S.D. of six separate experiments, where each was performed in triplicate.

TPA または A23187 で刺激した好中球による軟骨分解に対するヒアルロン酸の作用

軟骨と好中球 (2×10^6 cells/cartilage) を分子量の異なるヒアルロン酸存在下または非存在下, TPA または A23187 とともに 37°C で 6 h 培養した. いずれの刺激条件下でも 0.5 mg/ml 以下のヒアルロン酸は軟骨分解にほとんど影響せず, 2.0 mg/ml で高分子量ヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) に抑制作用が認められた (Fig. 20).

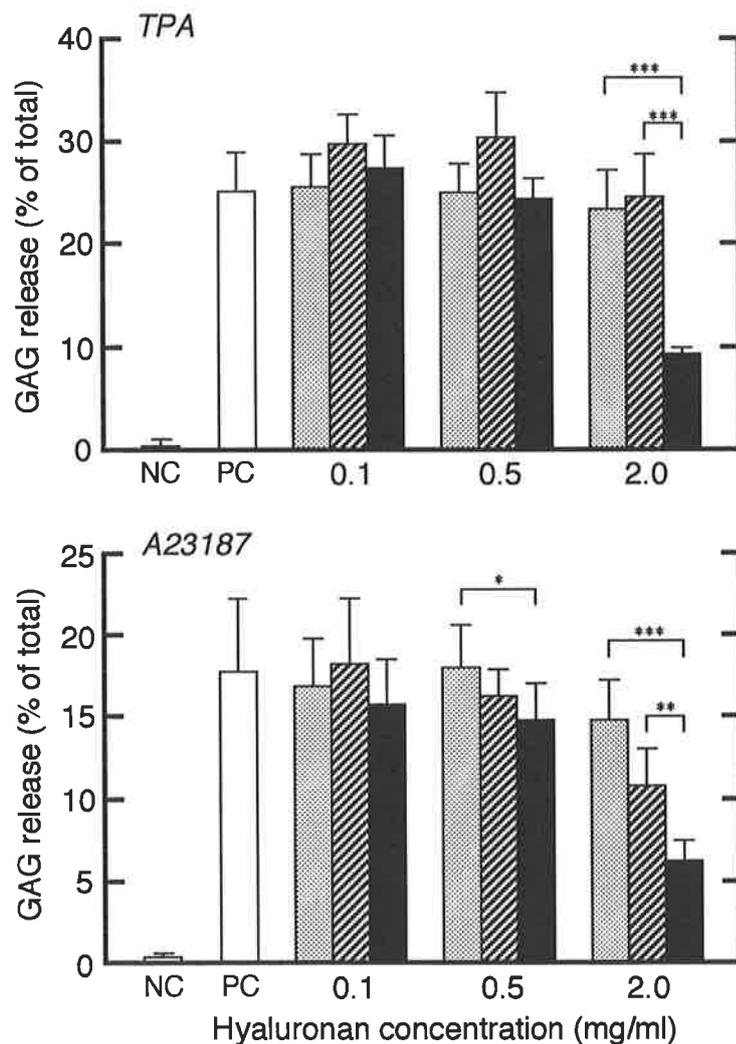


Fig.20. Effects of hyaluronan (HA) on neutrophil-mediated cartilage degradation in the presence of the stimulation agents, TPA (upper panel) and A23187 (lower panel). Cartilages and neutrophils (2×10^6 cells/cartilage) were incubated at 37°C for 6 h in the absence or presence of HA of different molecular weights (▨: 2.8×10^5 , ▩: 9.5×10^5 , ■: 2.0×10^6) at 0.1, 0.5, and 2.0 mg/ml. Control cultures are represented by NC (negative control without neutrophils) and PC (positive control without HA). Each column represents the mean \pm S.D. of six separate experiments, where each was performed in triplicate. Statistical significance, evaluated by the unpaired Student's *t*-test, are $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**), and < 0.001 (***).

[³H]FMLP の結合に対するヒアルロン酸の影響

最も強い軟骨分解抑制作用を示したヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) 1.0 mg/ml 及び非標識 FMLP (100 μ M) 存在下または非存在下, 1~100 nM [³H]FMLP とともに好中球を 60 min インキュベートした。 [³H]FMLP の全結合が反応後 60 min で平衡に達したことは予備的に確認した。好中球への特異的 [³H]FMLP 結合は 60 nM で飽和した (Fig. 21)。 Scatchard 分析により K_d 及び B_{max} はそれぞれ 7.5 nM 及び 11.8 fmole/ 10^6 cells (細胞当り 7290 結合部位数に相当) となった。ヒアルロン酸はいずれの [³H]FMLP 濃度でも好中球への特異的 [³H]FMLP 結合にほとんど影響しなかった。ヒアルロン酸存在下で Scatchard 分析すると, K_d 及び B_{max} は 5.4 nM 及び 11.2 fmole/ 10^6 cells (細胞当り 6990 結合部位数に相当) となった。

1~100 nM [³H]FMLP を加えた場合, [³H]FMLP の全結合量に対する非特異的結合量は 6.4% 以下であり, またヒアルロン酸が共存しても影響されなかったことより, 全結合量を指標として [³H]FMLP 結合に対するヒアルロン酸 (1.0 mg/ml, $M_r 2.0 \times 10^6$) の経時的影響を 100 nM [³H]FMLP 存在下で検討した。この結果, 1~60 min の範囲でヒアルロン酸は好中球への [³H]FMLP 結合量に影響しなかった (Fig. 22)。

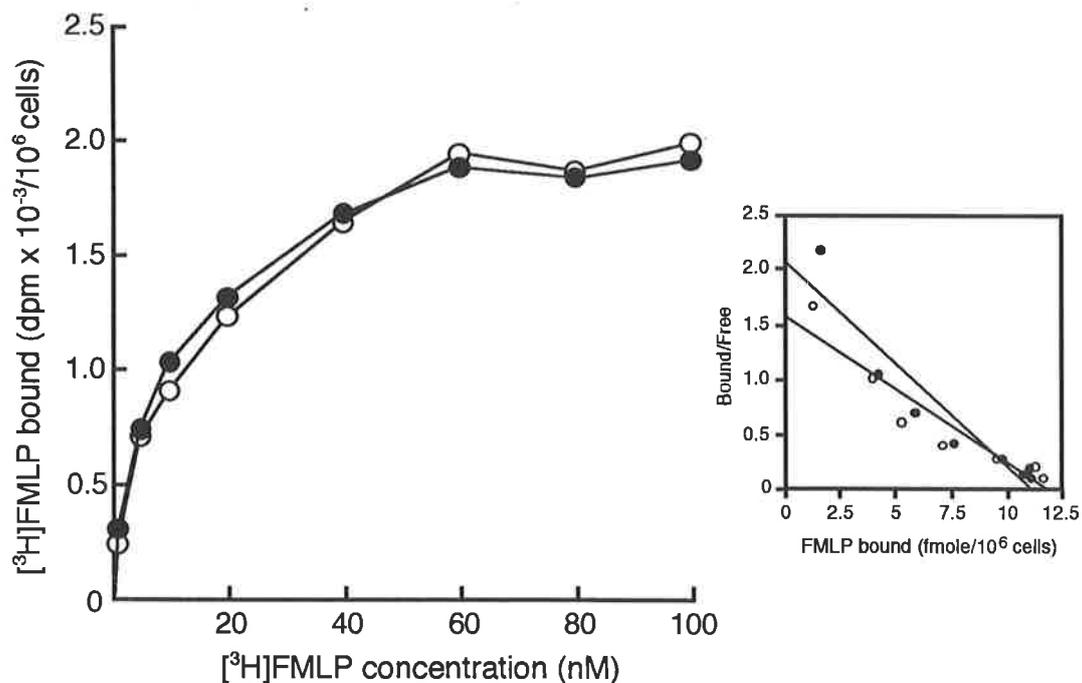


Fig.21. Effect of hyaluronan (HA) on specific [³H]FMLP binding to neutrophils. Increasing concentrations of [³H]FMLP were incubated with cells at 4°C for 60 min in the presence (●) or absence (○) of 1.0 mg/ml HA ($M_r 2.0 \times 10^6$). Specific [³H]FMLP binding is defined as the difference between binding in the absence and presence of 100 μ M unlabeled FMLP. The points shown are from three separate experiments. Inset represents Scatchard transformation of the data.

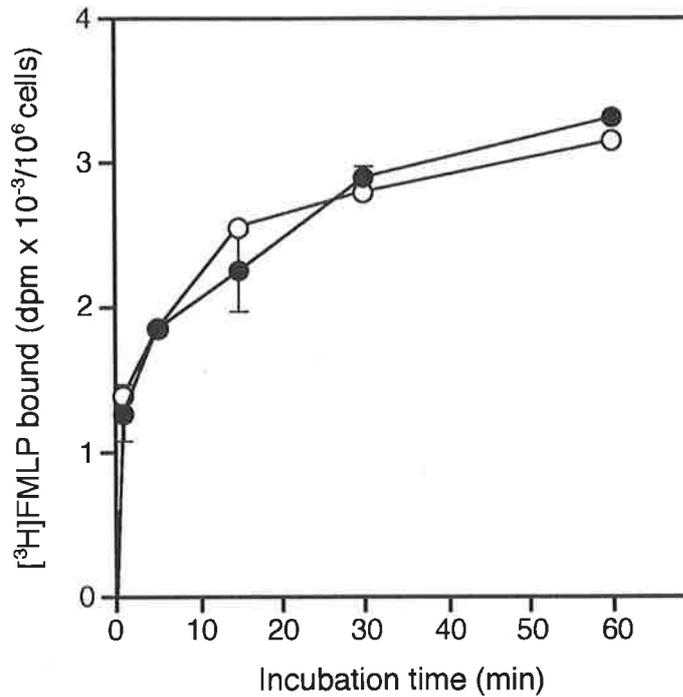


Fig.22. Effect of hyaluronan (HA) on the kinetics of [³H]FMLP binding to neutrophils. Cells were incubated with 100 nM [³H]FMLP in the presence (●) or absence (○) of 1.0 mg/ml HA (M_r 2.0 × 10⁶) at 4°C for the indicated periods. Each point represents the mean ± S.D. of three separate experiments.

好中球の生存率に及ぼすヒアルロン酸の影響

ポリプロピレンチューブ内で好中球 (1.4×10^7 cells/ml) を非働化及び酸処理 FBS (5%) とヒアルロン酸 (2.0 mg/ml, M_r 2.0 × 10⁶) を含む RPMI1640 に懸濁し, 37°C で 20 h まで培養した. 細胞生存率はトリパンプルー排除法により評価した. ヒアルロン酸は 20 h まで細胞生存率に影響しなかった (Table 7).

Table 7. Effect of hyaluronan (HA) on neutrophil viability

Time (h) after incubation	Viability (%)	
	Control	HA
0	92.8 ± 0.4	-
2.5	83.0 ± 1.0	85.4 ± 3.7
20	75.4 ± 3.7	76.5 ± 2.2

Neutrophils (1.4×10^7 cells/ml) were incubated with or without (control) 2.0 mg/ml HA (M_r 2.0 × 10⁶) at 37°C. Values are the mean ± S.D. of triplicate determinations.

考察

好中球を FMLP/cytochalasin B, opsonized zymosan または TPA で刺激すると、軟骨からの硫酸化 GAG 遊離を指標とした軟骨分解が促進された (Table 5). いずれの刺激剤を用いても、活性化された好中球による軟骨分解は DFP や α -1-PI により強く抑制されたことより (Table 6), 軟骨が分解される過程には エラスターゼ や カテプシン G といったセリンプロテアーゼが関与することが示された. これは従来の報告 [81-84] と一致する. 一方, SOD や catalase は軟骨分解に影響しなかった. スーパーオキシドや過酸化水素は軟骨分解に直接関係しないことが示され, これも従来の報告 [83,96,97] と一致した. ポリカーボネート膜で好中球と軟骨を分離すると, 軟骨分解はほとんど認められなかった. これより好中球は軟骨表面に位置しており, 好中球由来のプロテアーゼが軟骨表面で高濃度になることにより軟骨組織の分解が開始されるものと考えられる. このことは, *in vitro* での好中球による軟骨分解と, 軟骨への好中球の接着は関連しているという最近の報告 [98] と矛盾しない. 好中球の接着と接着基質の分解は密接に結びつくことより [99], 好中球が発現する接着分子のひとつである β_2 インテグリンの関与をモノクローナル抗体を用いて検討した. しかしながら anti-CD11a 及び anti-CD18 は軟骨分解にほとんど影響しなかった. β_2 インテグリンは好中球による軟骨分解に対して関与しないものと考えられる. Anti-CD18 は opsonized zymosan 刺激時の好中球による軟骨分解を強く抑制したが, これは好中球の zymosan 貪食を抑制したことに起因する [94].

好中球を FMLP/cytochalasin B で 6 h (Fig. 13) または opsonized zymosan で 2 h (Fig. 17) 刺激した場合, 活性化された好中球による軟骨分解はヒアルロン酸濃度依存的に抑制された. ヒアルロン酸の抑制効果は明らかにヒアルロン酸分子量に依存しており, 特にヒアルロン酸が最も高濃度 (2.0 mg/ml) のときに顕著であった. 分子量 2.0×10^6 のヒアルロン酸は軟骨分解を最も強く抑制したが, 好中球の生存率には影響しなかったこと (Table 7), また軟骨細胞が生存している軟骨組織を用いてもヒアルロン酸による軟骨分解抑制パターンに変化がなかったこと (Fig. 14 及び Fig. 18) より, ヒアルロン酸は好中球の作用に基づく軟骨分解に対して影響していると考えられる. またヒアルロン酸の分子量が増加するに従って増大する粘度が, 好中球による軟骨分解の抑制に寄与していることが強く示唆される. 即ち, 高分子量のヒアルロン酸溶液が与える高い粘度が, 好中球と軟骨の接触を立体的に妨害するものと考えられる. この可能性はヒアルロン酸が濃度及び分子量依存的に白血球の運動や接着を阻害するという報告 [9,100] により支持される.

Opsonized zymosan に応答した好中球による軟骨分解は, 培養後 2 h で 1.0 mg/ml 以上の高分子量ヒアルロン酸 (M_r 2.0×10^6 及び 9.5×10^5) で抑制された. 分子量 2.8×10^5 のヒアルロン酸は検討

したすべての濃度でほとんど抑制効果を示さなかった。高分子量のヒアルロン酸 (M_r 1.1~2.9×10⁶) は 0.25~1.3 mg/ml の濃度で白血球の貪食を阻害することが報告されている [8,101,102]。貪食が軟骨分解を誘発することは、貪食阻害剤である cytochalasin B や anti-CD18 が軟骨分解を顕著に抑制することより確認された (Table 6)。従って高分子量ヒアルロン酸分子鎖の形成する 3次元ネットワークは好中球と軟骨の接触を阻止することに加え、好中球の貪食を遅らせることにより軟骨分解を抑制すると考えられる。またヒアルロン酸による好中球の貪食抑制が軟骨分解の抑制に深く関与することは、opsonized zymosan で予め刺激した好中球、即ち zymosan を貪食した好中球の軟骨分解に対してヒアルロン酸は抑制作用を持たないことでも示される (Fig. 19)。

FMLP/cytochalasin B で好中球を刺激した場合、用いたヒアルロン酸すべてが 2.0 mg/ml で好中球の軟骨分解を少なくとも 18 h 抑制した (Fig. 12)。これは opsonized zymosan を用いた場合とは顕著に異なる結果であった。Opsonized zymosan を用いると、培養後 18 h ではヒアルロン酸 (2.0 mg/ml) の阻害効果はほとんど見られない (Fig. 16)。また opsonized zymosan 刺激下では作用を示さない 0.5 mg/ml 以下のヒアルロン酸も、FMLP/cytochalasin B 刺激下では有意に軟骨分解を抑制した。FMLP/cytochalasin B を用いた場合の軟骨分解に対するヒアルロン酸の作用様式は、opsonized zymosan を用いた場合とは部分的に異なるものと考えられる。

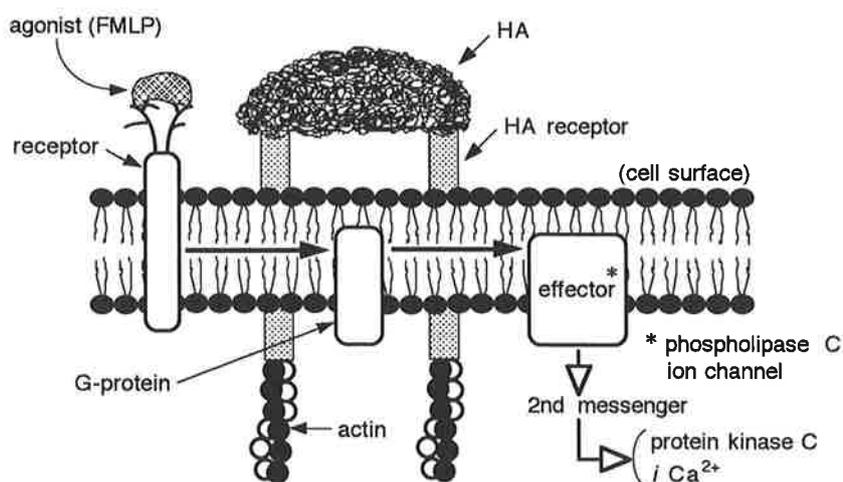
FMLPの作用は細胞膜上のレセプターを介する [103]。そこで [³H]FMLPの好中球への結合に対するヒアルロン酸の影響を調べた。ヒアルロン酸 (1.0 mg/ml) は最も強い軟骨分解抑制作用を持つ分子量 2.0×10⁶ のものを用いた。この結果、ヒアルロン酸は [³H]FMLPの結合に影響せず (Fig. 21)、FMLP結合後の好中球の応答に対して作用することが示唆された。この可能性は、予め FMLP で 90 min 刺激し、FMLPの結合が既に飽和した好中球 (Fig. 22) による軟骨分解に対し、ヒアルロン酸が抑制作用を有することでも示される (Fig. 15)。FMLPのレセプター結合が細胞応答に到る過程には、百日咳毒素感受性 GTP結合タンパク質が介在することが報告されている [104,105]。事実、好中球を百日咳毒素で前処理すると、FMLP/cytochalasin B 刺激した好中球による軟骨分解は強く阻害された (Table 6)。しかしながら opsonized zymosan 及び TPA を用いた場合はほとんど影響を受けなかった。好中球の貪食は百日咳毒素に影響を受けないことが報告されている [106]。FMLPはレセプターに結合後、好中球の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇や protein kinase Cの活性化を引き起こすことが知られている [104]。そこで細胞内 Ca²⁺濃度を上げる A23187、及び protein kinase Cの活性化剤である TPA で 6 h 刺激した好中球の軟骨分解に対するヒアルロン酸の影響を調べた。この結果、0.5 mg/ml 以下ではヒアルロン酸の抑制効果はなく、最高濃度 (2.0 mg/ml) の高分子量ヒアルロン酸 (M_r 2.0×10⁶) に抑制作用が認められた (Fig. 20)。この抑制パターンは opsonized zymosan 刺激時と近似

していたが、FMLP/cytochalasin B 刺激した場合は顕著に異なった。

FMLPレセプターは細胞内セカンドメッセンジャーである inositol 1,4,5-trisphosphate や diacylglycerol を生成するホスホリパーゼCとカップルしているが、ホスホリパーゼCの活性化にGTP結合タンパク質が介在する [104]。これら一連の細胞内情報伝達系は細胞膜に存在している。第1章で、細胞表面上のヒアルロン酸結合タンパク質に結合したヒアルロン酸が、細胞膜流動性に影響する可能性について推論した。膜流動性の変化は細胞内セカンドメッセンジャー量へ影響することが報告されている [108,109]。さらにヒアルロン酸は細胞内に到達しないこと [65] を考慮すると、細胞膜で機能している細胞内情報伝達系にヒアルロン酸が影響を与える可能性を考えることができる (Schema II 参照)。Protein kinase C 阻害剤である H-7 は FMLP/cytochalasin B 刺激した好中球の軟骨分解を抑制しなかった (Table 6)。FMLP による好中球の機能変化には protein kinase C とは独立した現象も伴うため [107]、FMLP により特異的に発現され、かつ軟骨分解に関与する細胞応答に対してヒアルロン酸が影響する可能性も考えられる。

以上の結果より、異なる経路により活性化された好中球の軟骨分解に対して、ヒアルロン酸の軟骨分解抑制作用はそれぞれ異なることが示された。ヒアルロン酸の抑制作用には粘度以外の因子が関与することが推察される。また炎症性関節症において、高分子量のヒアルロン酸は好中球による傷害より関節軟骨を保護する作用を有することが示唆される。

Schema II. Signal Transducing Unit in Plasma Membrane and HA



第3章 ラット好中球のスーパーオキシド産生に対する接着表面にコートされた免疫グロブリンG, 関節液成分及びヒアルロン酸の影響

序論

慢性関節リウマチを始めとする炎症性関節症では、関節組織への好中球の浸潤が顕著である [78, 79, 110]。好中球は膜酵素の NADPH oxidase の作用によりスーパーオキシドアニオン (O_2^-) を遊離する [111]。生成した O_2^- はさらに過酸化水素, hydroxy radical, singlet oxygen 及び hypochlorous acid といった他の活性酸素種へ変換され得る [111]。これらの活性酸素は関節組織に対して種々の障害を与えることが示されている。関節液中のヒアルロン酸の分解 [85-87], 滑膜細胞のヒアルロン酸合成阻害 [112], 軟骨細胞の増殖抑制 [113], あるいは軟骨におけるプロテオグリカン合成阻害 [97, 114, 115] を引き起こすことが報告されている。

関節液中には不溶性あるいは可溶性免疫グロブリン凝集物が存在し、好中球の活性酸素産生を刺激することが報告されている [116-121]。しかしながら不溶性免疫グロブリン凝集物は細胞内での活性酸素の生成を促進するが、細胞外への遊離には影響のないことが示され [118-121], 関節内における組織傷害に対しては重要でないとする指摘もある [119-121]。炎症性関節症の関節軟骨表層には関節液中の免疫グロブリンG (IgG) の沈着が認められている [122, 123]。このような軟骨を好中球とインキュベートすると、軟骨表面に多数の好中球が接着することが報告されている [124]。表面に結合した IgG は接着した好中球の活性化リガンドとなり、好中球の O_2^- 産生を促進する [125, 126]。組織との接着面で好中球の産生する O_2^- は、生体内スカベンジャーである superoxide dismutase の作用を受けにくいことが示されている [127]。従って IgG の沈着した軟骨表面上での好中球の O_2^- 産生は、軟骨組織に対してより強い傷害を与える可能性が考えられる。好中球の活性酸素産生に対する関節液の影響を調べた報告 [116-121] は、いずれも懸濁状態の好中球を用いている。接着した好中球の O_2^- 産生は接着基質の種類に影響を受けることが報告されている [128-132]。しかしながら軟骨表面に沈着し得る関節液中の好中球活性化リガンドについて、免疫複合体以外の関節液成分を、関節液を直接用いて調べた報告はない。そこでヒト関節液中の未知の表面付着性好中球活性化リガンドの存在を検索するとともに、軟骨組織に対して影響が大きいと考えられる接着好中球の O_2^- 産生挙動を検討した。また好中球接着表面をヒアルロン酸により処理すると、好中球の O_2^- 産生に対してどのような影響が現われるのか検討した。本研究では細胞外に遊離される O_2^- を特異的に検出できる

cytochrome C を用いた。この結果、IgG コート表面上での好中球の O_2^- 産生は、接着表面を関節液でさらにコートすることにより促進された。この作用には関節液の個人差があった。関節液単独で表面処理しても O_2^- 産生刺激効果は認められなかった。IgG と共働的な関節液中の O_2^- 産生促進物質は高分子であり、プロテアーゼまたは *O*-glycanase 処理により失活した。好中球接着表面を IgG 及び関節液で表面コートする前にヒアルロン酸により表面処理すると、好中球の O_2^- 産生が抑制された。また IgG または関節液によるコート時にヒアルロン酸を共存させた場合、及び IgG コート表面をヒアルロン酸でさらに処理した場合にも O_2^- 産生が抑制された。ヒアルロン酸は IgG 及び関節液中の IgG 共働性好中球活性化物質の表面沈着を抑制するか、あるいは表面に付着したヒアルロン酸が直接的に好中球の O_2^- 産生を抑制する可能性が示唆された。

材料と方法

関節液

関節液の貯留を伴う変形性膝関節症患者より関節液を採取した。採取した関節液は -20°C で保存し、使用時に 4°C で $11000 \times g$, 20 min 遠心し、不溶物を除いた。供試時は Hanks' balanced salt solution (HBSS) で 2 倍希釈した。一部の関節液 (2 倍希釈液 5 ml) は HBSS で平衡化した Affi-Gel protein A (Bio-Rad, U.S.A.) 2 ml と混合し、 4°C で一晩転倒攪拌した。遠心してゲルを除いた後、上清をミリポアフィルター (タイプ HV, ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$) でろ過した。供試する関節液には、個人差を検討するもの以外はすべてプールしたものをを用いた。

関節液のゲルろ過クロマトグラフィー

関節液のゲルろ過は、Sephacryl S-500 (Pharmacia LKB, Sweden) カラム ($2.5 \times 92 \text{ cm}$) を用い、HBSS を溶出液として 4°C で行なった。カラムには HBSS で 3 倍希釈し、 $0.45 \mu\text{m}$ -フィルターでろ過した関節液 10 ml を添加し、最大流速 13 ml/h で溶出した。溶出液は 5 ml ずつ分取した。

好中球接着表面

24 穴ポリスチレンプレート (Corning, U.S.A.) に 0.15 M NaCl に溶解したラット免疫グロブリン G (IgG; 0.5 mg/ml , Cappel-Organon Teknika, U.S.A.) 0.5 ml/well を添加し、 4°C で一晩放置すること

により IgG を表面コートした。プレートは 0.5 ml の 0.15 M NaCl で 4 回洗浄し、一次処理プレートとした。一次処理プレートにはさらに 2 倍希釈関節液を 0.5 ml/well 添加し、37°C で 1 h 放置した。プレートは 0.5 ml の HBSS で 3 回洗浄し、二次処理プレートとした。

比較のため、二次処理時に関節液に代えて、Affi-Gel Protein A 処理関節液、ウシ胎児血清 (FBS; Hyclone Laboratories, U.S.A.), リューマチ因子陽性ヒト血清 (RF-serum; 20% 希釈, The Binding Site, England), 無処理または熱凝集ヒト IgG (1.0 mg/ml, Cappel-Organon Teknika, U.S.A.), 無処理または熱凝集 C-reactive protein (CRP; 0.4 mg/ml, Chemicon, U.S.A.), あるいはこれらの混合液をウェルに添加した。ヒト IgG の熱凝集化は、HBSS に溶解し 10 mg/ml とした IgG を 63°C, 1 h 処理することにより行なった。CRP の熱凝集化はプレートの二次処理直前に、2.45 mg/ml の濃度で 63°C, 2 min 行なった [133]。

プレートの二次処理は関節液のゲル口過溶出画分を用いても行なった。この関節液ゲル口過分画物については、さらに chondroitinase AC (0.31 U/ml, 生化学工業), hyaluronidase (78 mU/ml, *Streptococcus dysgalactiae* 由来, 生化学工業), glycopeptidase A (1.6 mU/ml, 生化学工業), N-glycanase (33 mU/ml, Genzyme, U.S.A.) または O-glycanase (0.083 mU/ml, Genzyme, U.S.A.) で 37°C, 24 h, あるいは trypsin (1.6 mg/ml, Flow Laboratories, U.S.A.) または actinase E (0.63 mg/ml, 科研製薬) で 37°C, 1 h 処理し、これらを用いて同様にプレート二次処理を行なった。

IgG または関節液成分の表面沈着に対してヒアルロン酸 (M_r 2.0×10^6 , 9.5×10^5 及び 2.8×10^5 , 資生堂, 第 1 章参照) が影響するのかどうか検討するため、IgG または関節液で表面処理する際にヒアルロン酸 (0.1, 0.5 及び 2.0 mg/ml) を共存させた。さらにプレートを予めヒアルロン酸 (HBSS 溶液) で処理 (37°C, 1 h) した場合、また IgG をコートした一次処理プレートをヒアルロン酸で二次処理 (37°C, 1 h) した場合についても検討した。

好中球の採取

好中球の採取方法は第 2 章に記載した。採取した好中球の生存率はトリパンプルー排除法により評価した結果、常に 90% 以上であった。

スーパーオキシドアニオンの測定

好中球から遊離されたスーパーオキシドアニオン (O_2^-) は catalase (65 KU/mg, Boehringer Mannheim, Germany) 存在下, superoxide dismutase (SOD; 3570 U/mg, Sigma Chemical, U.S.A.) によ

り阻害される cytochrome C (Sigma Chemical, U.S.A.) 還元量として測定した [134]. 種々の表面処理を行なったプレートに, SOD (50 $\mu\text{g/ml}$) 存在下 (ブランク) または非存在下, cytochrome C (200 μM), catalase (5 $\mu\text{g/ml}$) 及び好中球生細胞 (3.6×10^5 cells/well) を含む HBSS (600 μl) を加え, 5% CO_2 , 37°C で 90 min まで培養した. 反応は好中球を添加することにより開始した. ブランクは各条件ごとに設定した. 培養終了後, SOD (100 μg) を含む HBSS (400 μl) を添加し, 直ちに氷上で冷却することにより反応を停止させた. 反応液は, 主波長 550 nm, リファレンス波長 540 nm における吸光度を測定した. O_2^- 生成量は, ブランク値を差し引いた後, 550 nm - 540 nm における還元 cytochrome C のミリモル吸光係数を 19.1 として算出した.

IgG 及び関節液で処理したプレート表面上での好中球の O_2^- 産生を機構的に特徴づけるため, 作用の明かな種々の試薬の添加効果を検討した. 用いた試薬の中には水難溶性のものが含まれたため, 好中球培養液にはキャリアーとして 0.1% ウシ血清アルブミンを加えた. 次のものを用いた; 抗ラット CD11a モノクローナル抗体 WT.1 (anti-CD11a, 1:50 希釈, 生化学工業), 抗ラット CD18 モノクローナル抗体 WT.3 (anti-CD18, 1:50 希釈, 生化学工業), 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride (H-7; 500 μM , 生化学工業), staurosporine (100 nM, Biomol Research Laboratories, U.S.A.), N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide (W-7; 500 μM , 生化学工業), calyculin A (1 μM , 和光純薬), okadaic acid (1 μM , 和光純薬), genistein (50 $\mu\text{g/ml}$, Extrasynthese, France), cytochalasin B (5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma chemical, U.S.A.) 及び dibutyryl-cAMP (di-Bt-cAMP, 1 mM, Sigma chemical, U.S.A.). 一部の好中球 (1.2×10^6 cells/ml) はポリプロピレンチューブ内で百日咳毒素 (100 ng/ml, 科研製薬) により 37°C, 2 h 前処理した. Staurosporine (10 mM), calyculin A (1 mM), okadaic acid (1 mM), genistein (100 mg/ml) 及び cytochalasin B (2 mg/ml) は予めジメチルスルホキシドに溶解し, 使用するまで -20°C で保存した.

接着好中球数

IgG, 関節液, 及びヒアルロン酸で処理した 24 穴プレートを用いた. SOD (50 $\mu\text{g/ml}$) 及び catalase (5 $\mu\text{g/ml}$) を含む HBSS (600 μl) に懸濁した好中球 (3.6×10^5 cells/well) をウェルに添加し, 種々の条件下 5% CO_2 , 37°C で 60 min インキュベートした. HBSS で 3 回おだやかに洗浄した後, 直ちに光学顕微鏡下で写真撮影した. 撮影箇所はウェルにつき任意に 3 ケ所選んだ. 現像した写真より一定面積当りの細胞数を計測した.

結果

IgG コート表面上での好中球の O_2^- 産生

好中球を IgG コート表面上及び無処理 (プラスチック) 表面上で培養した。 O_2^- 産生タイムコースは 90 min まで調べた (Fig. 23)。好中球添加後 15 min から 60 min までは直線的に O_2^- が産生された。好中球の O_2^- 産生は IgG をコートすることにより顕著に促進された。表面処理する際の IgG 用量依存性を 0.001~1.0 mg/ml の範囲で調べた結果を Fig. 24 に示した。培養時間は 60 min とした。好中球の O_2^- 産生は 0.5 mg/ml の IgG で最大に達した。IgG の由来をラット及びヒトで比較した。表面コートする IgG 濃度は 0.5 mg/ml とした。この結果、培養時間 60 min で、ラット由来: 11.2 ± 0.4 nmole/ 10^6 cells, ヒト由来: 12.1 ± 0.6 nmole/ 10^6 cells, コントロール (プラスチック表面): 0.8 ± 0.1 nmole/ 10^6 cells (いずれも $n=3$) となり、ラット及びヒト間での差は認められなかった。

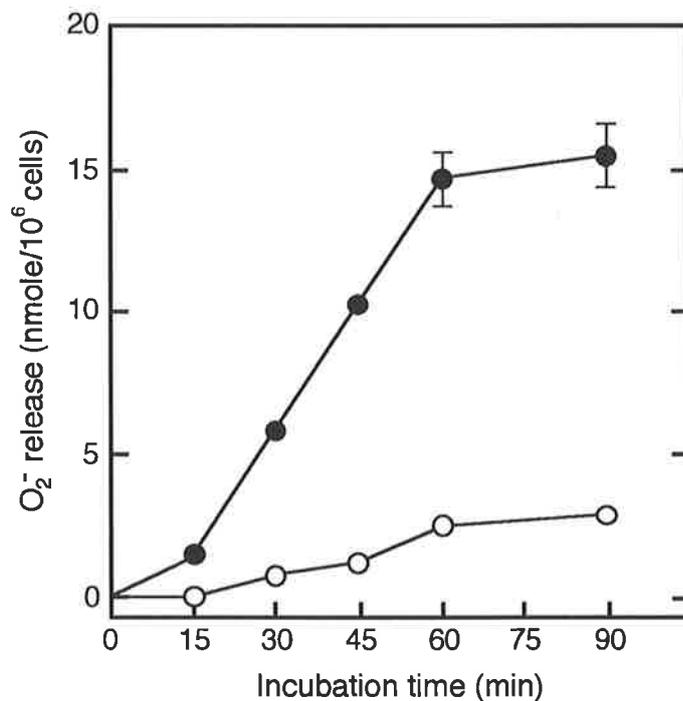


Fig.23. Time course of O_2^- release by neutrophils on plastic (○) and IgG-coated (●) surfaces. Each point represents the mean \pm S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate.

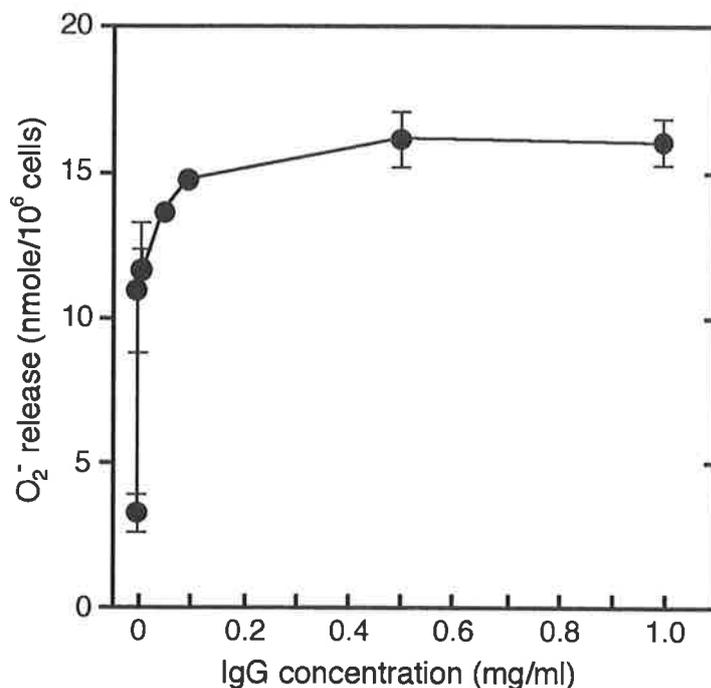


Fig.24. O₂⁻ release by neutrophils in response to varying concentrations of IgG for surface coating. Cells were incubated at 37°C for 60 min on the surfaces. Each point represents the mean ± S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate.

IgG コート表面の関節液による二次処理が好中球の O₂⁻ 産生に及ぼす影響

IgG コートしたプレートを関節液により二次処理した場合の好中球の O₂⁻ 産生挙動を、培養時間 60 min で検討した。IgG コート表面を関節液でさらに処理することにより、好中球の O₂⁻ 産生が約 2 倍に亢進することがわかった (Table 8)。この O₂⁻ 産生促進活性は、関節液を Affi-Gel protein A で処理しても失われなかった。一方、プラスチック表面を関節液で処理しても全く O₂⁻ 産生促進効果は認められず、関節液にヒト IgG (1.0 mg/ml) を添加しても同様であった。関節液に代えて、RF-serum, FBS, 熱凝集及び無処理 CRP (関節液中に存在することが報告されている [135])、あるいは RF-serum 添加または無添加の熱凝集及び無処理ヒト IgG の影響を検討したが、いずれも関節液に匹敵する効果を持つものはなかった。

関節液処理による好中球の O₂⁻ 産生促進効果は関節液濃度に依存しており、8 倍希釈でほぼ最大となった (Fig. 25)。次に O₂⁻ 産生促進効果における関節液の個人差を検討した。関節液は 22 例の異なる患者のものを使用し、すべて 2 倍希釈した。この結果、IgG コート表面での関節液の O₂⁻ 産生促進活性には個人差があり、全く活性を示さない関節液も認められた (Fig. 26)。またプラスチック表面を関節液で処理すると、O₂⁻ 産生促進作用を示す関節液もあったが、この場合にも個人差が認められた。

Table 8. Effects of various treatments of plastic and IgG-precoated surfaces on the O_2^- release by settled neutrophils

	Treatment	O_2^- release (nmole/ 10^6 cells)
Plastic surface	No addition	5.5 ± 0.2
	SF	3.0 ± 0.5
	SF + hlgG	3.4 ± 0.3
IgG-precoated surface	No addition	16.1 ± 1.2
	SF	29.5 ± 0.9
	SF incubated with Affi-Gel protein A	26.4 ± 1.9
	FBS	18.8 ± 0.4
	hlgG	20.2 ± 0.8
	Heat-aggregated hlgG	19.6 ± 0.2
	RF serum	17.9 ± 1.4
	hlgG + RF serum	19.1 ± 0.8
	Heat-aggregated hlgG + RF serum	20.0 ± 0.9
	CRP	15.8 ± 0.7
	Heat-aggregated CRP	16.4 ± 1.8

Plastic surfaces precoated with or without rat IgG were subsequently coated with synovial fluid (SF), SF incubated with Affi-Gel protein A, fetal bovine serum (FBS), human IgG (hlgG, 1.0 mg/ml), rheumatoid factor positive human serum (RF serum, 20%) and C-reactive protein (CRP, 0.4 mg/ml). hlgG and CRP were heat-aggregated at 63°C for 1 h and for 2 min, respectively, in some experiments. Neutrophils (3.6×10^5 cells) were incubated for 60 min at 37°C, and O_2^- release was measured. Values are the mean ± S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate.

好中球の O_2^- 産生特性

IgGコート及び IgG/関節液コート表面上で好中球を 37°C, 60 min 培養した。Protein kinase C 阻害剤である H-7 及び staurosporine は好中球の O_2^- 産生をいずれの表面上でもコントロール(プラスチック表面)レベルまで強力に抑制した (Table 9)。カルモジュリン拮抗剤である W-7 にも同様に強い抑制作用が認められた。Protein phosphatase 阻害剤の影響を調べたところ, okadaic acid は IgG コート表面での好中球の O_2^- 産生にほとんど影響せず, IgG/関節液コート表面では弱い阻害を示した。一方, calyculin A は強い O_2^- 産生阻害効果を示し, 特に IgG/関節液コート表面では顕著であった。cAMP アゴニストである di-Bt-cAMP, tyrosine kinase 阻害剤の genistein, 及びアクチン重合を阻害する cytochalasin B にも強い O_2^- 産生抑制作用が認められたが, これらの場合も IgG/関節液コート表面で明白であった。接着分子である β_2 インテグリン LFA-1 α 鎖を認識する anti-CD11a は, IgG コート表面及び IgG/関節液コート表面とも同程度に弱く O_2^- 産生を抑制した。 β_2 インテグリン β 鎖を認識する anti-CD18 は, IgG 表面コートでの O_2^- 産生抑制作用は anti-CD11a よりむしろ弱い,

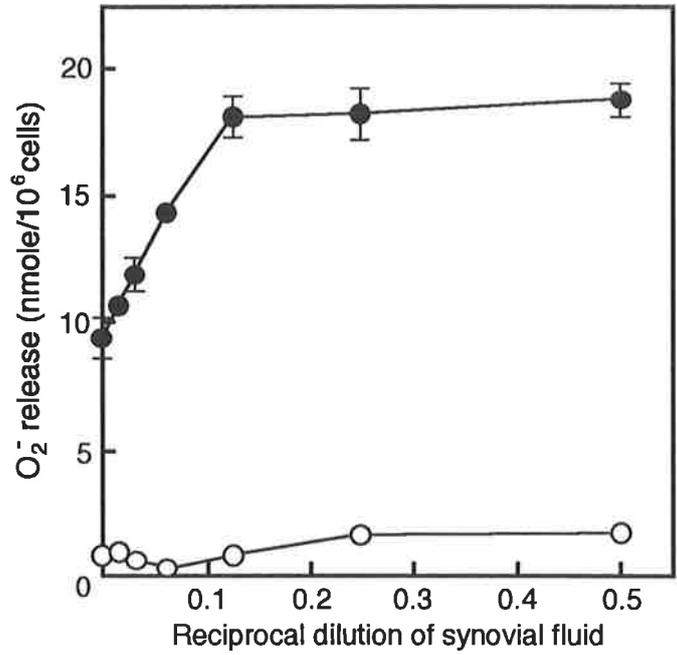


Fig.25. O₂⁻ release by neutrophils in response to increasing concentrations of synovial fluid for coatings of plastic (O) and IgG-precoated (●) surfaces. Cells were incubated at 37°C for 60 min on the surfaces. Each point represents the mean ± S.D. of two separate experiments, where each was performed in triplicate.

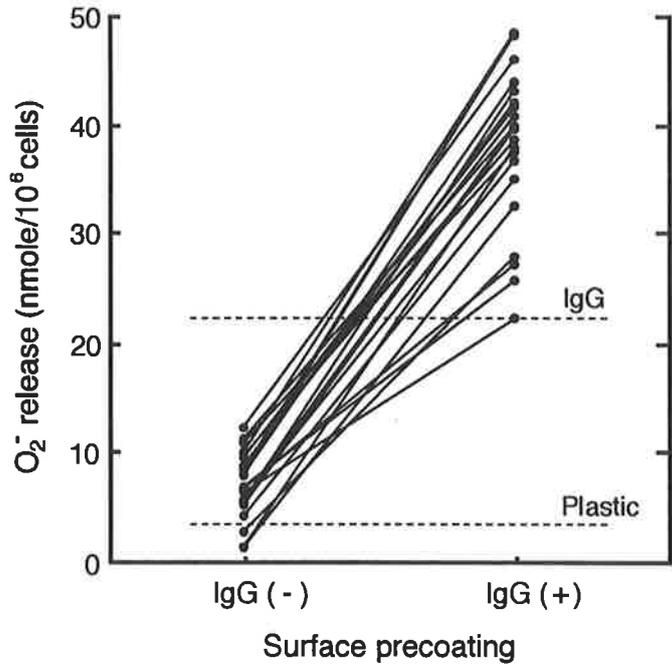


Fig.26. O₂⁻ releases by neutrophils in response to different synovial fluids from patients (n=22) with inflammatory joint disease. Neutrophils on surfaces precoated with or without (plastic) IgG and subsequently coated with synovial fluids were incubated at 37°C for 60 min. Each point represents the mean ± S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate. O₂⁻ release levels on plastic and IgG-coated surfaces are indicated.

IgG/関節液コート表面では強力な抑制作用を示した。百日咳毒素による好中球の前処理も O_2^- 産生を抑制したが、この場合も IgG/関節液コート表面で強く認められた。

Table 9. Characterization of O_2^- release by neutrophils on IgG- and IgG/synovial fluid (SF)-coated surfaces

Experiment	Treatment	O_2^- release (nmole/ 10^6 cells)			
		IgG-surface	[Ratio] ^{a)}	IgG/SF-surface	[Ratio]
1	No addition	31.2 ± 1.1	[1.00]	34.9 ± 0.4	[1.00]
	H-7 (500 μ M)	2.4 ± 0.1	[0.08]	1.9 ± 0.1	[0.05]
	W-7 (500 μ M)	2.9 ± 0.4	[0.09]	3.3 ± 0.4	[0.09]
	Di-Bt-cAMP (1 mM)	7.6 ± 0.1	[0.24]	4.3 ± 0.1	[0.12]
	Anti-CD11a (1:50 dilution)	17.0 ± 0.8	[0.54]	21.4 ± 0.1	[0.61]
	Anti-CD18 (1:50 dilution)	22.1 ± 1.8	[0.71]	4.1 ± 0.1	[0.12]
2	No addition	26.6 ± 0.8	[1.00]	33.6 ± 0.9	[1.00]
	Staurosporine (100 nM)	2.4 ± 0.4	[0.09]	2.5 ± 0.3	[0.07]
	Okadaic acid (1 μ M)	24.1 ± 2.1	[0.91]	20.4 ± 2.1	[0.61]
	Calyculin A (1 μ M)	9.6 ± 0.9	[0.36]	4.4 ± 0.1	[0.13]
	Genistein (50 μ g/ml)	11.2 ± 0.3	[0.42]	4.1 ± 0.0	[0.12]
	Cytochalasin B (5 μ g/ml)	5.6 ± 0.2	[0.21]	2.9 ± 0.2	[0.09]
3	No addition	21.5 ± 0.9	[1.00]	24.1 ± 0.5	[1.00]
	Pertussis toxin ^{b)} (100 ng/ml)	11.2 ± 0.8	[0.52]	5.7 ± 0.1	[0.24]

Neutrophils (3.6×10^5 cells) settled on surfaces precoated with IgG and subsequently coated with or without SF were incubated under various conditions at 37°C for 60 min, and O_2^- release was measured. Values are the mean \pm S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate. ^{a)}Each value in square parenthesis expresses the relative ratio to the positive control (no addition). ^{b)}Cells were pretreated with pertussis toxin (100 ng/ml) at 37°C for 2 h. Negative control (plastic surface) values for Exp.-1 and -2, and Exp.3 were 3.0 ± 0.1 nmole/ 10^6 cells, and 2.0 ± 0.4 nmole/ 10^6 cells, respectively.

好中球の接着特性

IgGコート及びIgG/関節液コート表面上で好中球を37°C, 60 min 培養し, HBSSによる洗浄後, 接着好中球数をカウントした。IgGコート表面, IgG/関節液コート表面, 及び関節液のみでコート処理した表面での接着好中球数をプラスチック表面と比較した結果を Fig. 27 に示した。接着細胞数はプラスチック表面で最も多く, 添加した好中球の90%が接着した。IgGコート表面及びIgG/関節液コート表面での接着細胞数はやや少なく, プラスチック表面に対してそれぞれ88%及び77%となった。関節液単独コート処理表面ではさらに減少し, プラスチック表面の49%であった。

IgGコート及びIgG/関節液コート表面への好中球の接着を staurosporine は阻害しなかった (Table 10)。H-7 は IgG/関節液コート表面で接着をやや阻害する傾向が認められたが, IgGコート

表面では全く影響がなかった。W-7はいずれの表面上でもほぼ完全に細胞接着を抑制した。Calyculin Aも接着を強く抑制したが okadaic acid は影響しなかった。Di-Bt-cAMP 及び cytochalasin Bは共通して IgG コート表面での好中球接着に影響しなかったが、IgG/関節液コート表面での接着数を半減させた。Genistein の添加、及び百日咳毒素による好中球の前処理はいずれの表面に対しても弱い接着抑制効果を示したが、その作用は IgG/関節液コート表面でやや強かった。接着分子抗体を比較した結果、anti-CD11a は好中球接着に影響しなかったが anti-CD18 は強く抑制し、特に IgG/関節液コート表面で顕著であった。

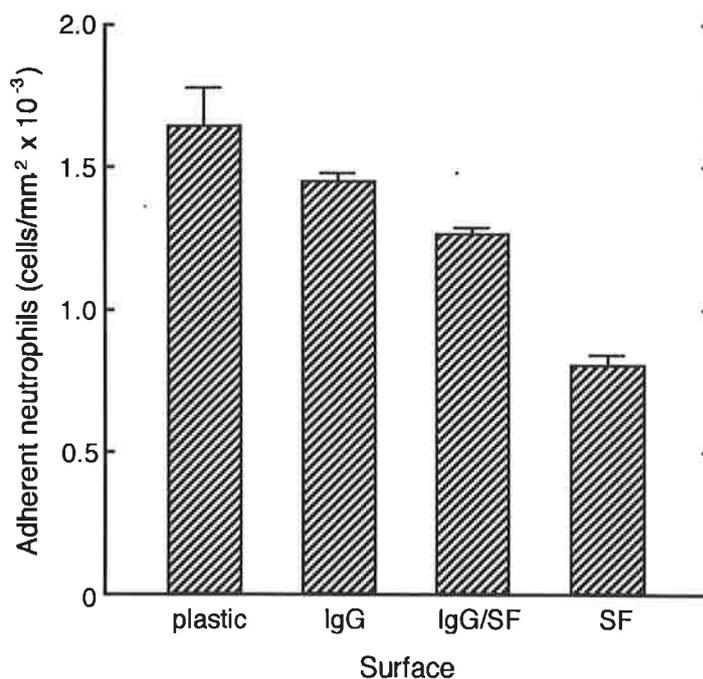


Fig.27. Determination of neutrophil adhesion to surfaces coated with or without IgG and synovial fluid (SF). Neutrophils (1.8×10^3 cells/mm²) were added on the surfaces and incubated at 37°C for 60 min. After gentle washing, adherent cells were counted. Each column represents the mean \pm S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate.

Table 10. Characterization of neutrophil adhesion on IgG- and IgG/synovial fluid (SF)- coated surfaces

Experiment	Treatment	Number of adherent neutrophils (cells/mm ²)			
		IgG-surface	[Ratio] ^{a)}	IgG/SF-surface	[Ratio]
1	No addition	1197 ± 83	[1.00]	1095 ± 239	[1.00]
	H-7 (500 μM)	1165 ± 360	[0.97]	657 ± 103	[0.60]
	W-7 (500 μM)	20 ± 9	[0.02]	8 ± 7	[0.01]
	Di-Bt-cAMP (1 mM)	1379 ± 136	[1.15]	521 ± 130	[0.48]
	Anti-CD11a (1:50 dilution)	1200 ± 188	[1.00]	1005 ± 264	[0.92]
	Anti-CD18 (1:50 dilution)	367 ± 43	[0.31]	43 ± 37	[0.04]
2	No addition	1073 ± 177	[1.00]	883 ± 181	[1.00]
	Staurosporine (100 nM)	1216 ± 240	[1.13]	802 ± 82	[0.91]
	Okadaic acid (1 μM)	1171 ± 122	[1.09]	799 ± 150	[0.90]
	Calyculin A (1 μM)	126 ± 16	[0.12]	17 ± 23	[0.02]
	Genistein (50 μg/ml)	928 ± 69	[0.86]	558 ± 57	[0.63]
	Cytochalasin B (5 μg/ml)	1349 ± 203	[1.26]	428 ± 23	[0.48]
3	No addition	1360 ± 47	[1.00]	1350 ± 199	[1.00]
	Pertussis toxin ^{b)} (100 ng/ml)	1151 ± 121	[0.85]	847 ± 76	[0.63]

Neutrophils (1800 cells/mm²) added on surfaces precoated with IgG and subsequently coated with or without SF were incubated under various conditions at 37°C for 60 min. After gentle washing, adherent cells were counted. Values are the mean ± S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate. ^{a)}Each value in square parenthesis expresses the relative ratio to the control (no addition). ^{b)}Cells were pretreated with pertussis toxin (100 ng/ml) at 37°C for 2 h.

ゲルろ過クロマトグラフィーによる関節液中の O₂⁻ 産生促進物質の分析

関節液を Sephacryl S-500 カラムにより分画し, IgG と共働する好中球の O₂⁻ 産生促進活性の分布を調べた. 関節液中の O₂⁻ 産生促進物質は V₀ 領域にやや遅れて溶出されたが, 280 nm の吸収によるタンパク質主ピークに先行する高分子物質であることが示された (Fig. 28). O₂⁻ 産生促進活性の認められたフラクション 50~70 をプールし, この画分について種々の酵素の影響を検討した. この結果, chondroitinase AC, hyaluronidase, N-glycanase 及び glycopeptidase A は O₂⁻ 産生促進活性に影響を与えなかったが, trypsin, actinase 及び O-glycanase は完全に失活させた (Table 11). コントロールとしてそれぞれの酵素で IgG コート表面をインキュベートしたが, 好中球の O₂⁻ 産生に対してほとんど影響を与えなかった.

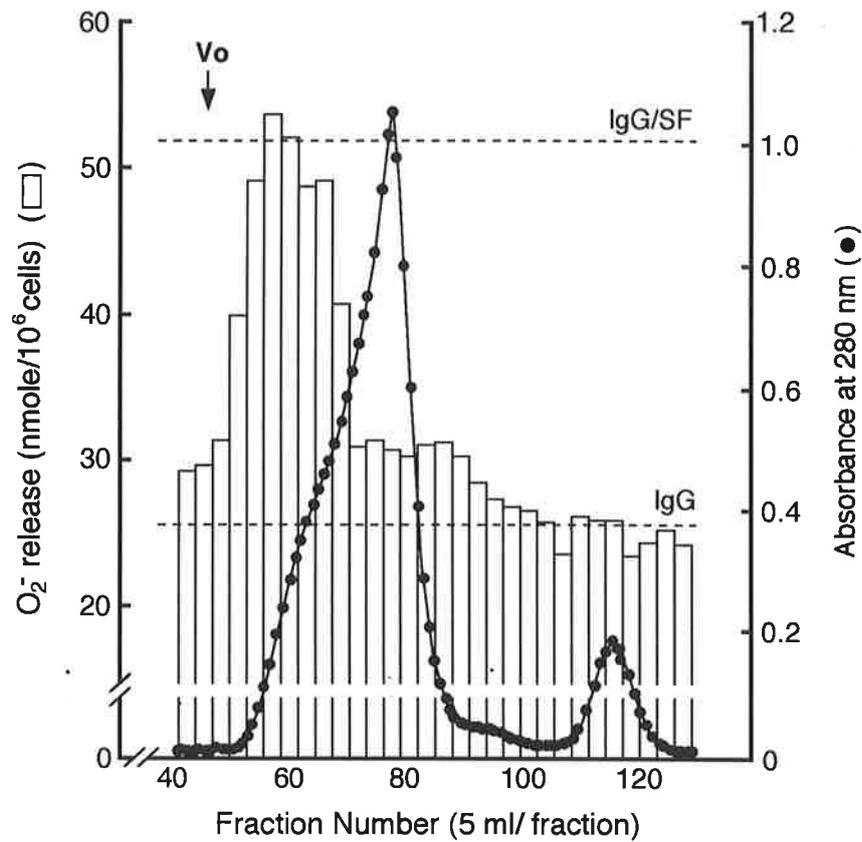


Fig.28. The elution profile following Sephacryl S-500 filtration chromatography of synovial fluid (SF). Each fraction was tested for UV-absorption (280 nm) and oxidative response of neutrophils. Cells on surfaces precoated with IgG and subsequently coated with the column fractions were incubated at 37°C for 60 min, and O₂⁻ release was measured. The void volume (Vo) and the O₂⁻ release levels on IgG- and IgG/SF-coated surfaces are indicated.

Table 11. Effects of enzyme treatments of synovial fluid (SF) on oxidative response of neutrophils

Experiment	Enzyme	O ₂ ⁻ release (nmole/10 ⁶ cells)		
		+ pooled fraction	[Ratio] ^{a)}	- pooled fraction
1 ^{b)}	No addition	22.8 ± 0.5	[1.43]	15.9 ± 0.9
2 ^{c)}	No addition	21.8 ± 0.7	[1.37]	15.9 ± 0.8
	Trypsin	12.2 ± 0.5	[0.83]	14.7 ± 0.8
	Actinase	14.1 ± 1.0	[0.83]	17.0 ± 2.1
3 ^{d)}	No addition	19.5 ± 0.7	[1.23]	15.9 ± 0.8
	Chondroitinase AC	24.7 ± 0.6	[1.33]	18.6 ± 0.4
	Hyaluronidase	22.1 ± 0.9	[1.26]	17.6 ± 0.5
	N-Glycanase	21.2 ± 0.1	[1.28]	16.6 ± 0.3
	O-Glycanase	13.3 ± 0.4	[0.87]	15.3 ± 0.8
	Glycopeptidase A	21.5 ± 0.4	[1.72]	12.5 ± 0.5

Neutrophil activating pooled fraction of SF after filtration chromatography on Sephacryl S-500 was treated with various enzymes, and then used for coatings of IgG-precoated surfaces. Control experiments were carried out in the absence of the pooled fraction. Neutrophils (3.6×10^5 cells) on the surface were incubated for 60 min at 37°C, and O₂⁻ release was measured. Values are the mean ± S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate. Negative control (plastic surface) value was 5.0 ± 0.3 nmole/10⁶ cells. ^{a)}Each value in square parenthesis expresses the relative ratio to each control (without pooled fraction). Pooled fractions were incubated at 37°C for ^{b)}0 h, ^{c)}1 h and ^{d)}24 h in the presence or absence of enzymes.

ヒアルロン酸による表面処理が好中球の O₂⁻ 産生及び接着に及ぼす影響

ヒアルロン酸によりプレートを前処理した場合、IgGまたは関節液によるプレートのコート処理時にヒアルロン酸を共存させた場合、及びIgGをコートしたプレートをさらにヒアルロン酸で処理した場合の好中球の O₂⁻ 産生挙動と接着細胞数を検討した。IgGをコートする前にヒアルロン酸でプレートを処理すると、好中球の O₂⁻ 産生に対して分子量 2.0×10^6 のヒアルロン酸は 0.1~2.0 mg/ml の範囲で影響しなかったが、分子量 9.5×10^5 及び 2.8×10^5 のヒアルロン酸は促進する傾向が認められた (Table 12)。一方、予めヒアルロン酸処理したプレートを IgG、次いで関節液でコートすると、高分子量ヒアルロン酸 (M_r 2.0×10^6) のみが O₂⁻ 産生を抑制した。しかしながら濃度依存性は見られなかった。プレートを IgG コートする際にヒアルロン酸 (2.0 mg/ml) を共存させた場合、弱く O₂⁻ 産生が抑制されたが、分子量依存性は認められなかった。IgG コートプレートを関節液でさらにコート処理する際にヒアルロン酸を共存させた場合にも、ヒアルロン酸は O₂⁻ 産生を抑制した。しかしながら濃度及び分子量依存性とも認められなかった。IgG コート後、ヒアルロン酸で処理したプレート上での好中球の O₂⁻ 産生は、分子量 9.5×10^5 及び 2.8×10^5 のヒアルロン酸 (2.0 mg/ml) では影響されなかったが、高分子量ヒアルロン酸 (M_r 2.0×10^6) は 0.1~2.0 mg/ml の範囲で濃度依存的に抑制する傾向が示された。

Table 12. Effect of hyaluronan (HA) treatment of biological surfaces on O_2^- release by settled neutrophils

Experiment	Surface treatment			HA		O_2^- release		
	Pre-	1st	2nd	M_r	Concentration	(nmole/ 10^6 cells)	[Ratio] ^{a)}	
1		lgG				18.9 ± 0.3	[1.00]	
		lgG + HA		2.8 × 10 ⁵	2.0 mg/ml	13.6 ± 0.5	[0.72]	
				9.5 × 10 ⁵	2.0 mg/ml	13.8 ± 0.6	[0.73]	
				2.0 × 10 ⁶	2.0 mg/ml	15.4 ± 0.5	[0.81]	
2	HA	lgG				15.9 ± 0.8	[1.00]	
		lgG		2.8 × 10 ⁵	0.1 mg/ml	18.3 ± 0.4	[1.15]	
						0.5 mg/ml	19.7 ± 1.2	[1.24]
						2.0 mg/ml	20.0 ± 0.1	[1.26]
				9.5 × 10 ⁵	0.1 mg/ml	20.2 ± 0.3	[1.27]	
						0.5 mg/ml	21.1 ± 0.5	[1.33]
						2.0 mg/ml	20.7 ± 1.0	[1.30]
				2.0 × 10 ⁶	0.1 mg/ml	17.5 ± 0.9	[1.10]	
						0.5 mg/ml	17.1 ± 0.5	[1.08]
					2.0 mg/ml	16.0 ± 0.2	[1.01]	
		lgG	HA	2.8 × 10 ⁵	2.0 mg/ml	16.5 ± 0.9	[1.04]	
				9.5 × 10 ⁵	2.0 mg/ml	16.8 ± 0.8	[1.06]	
				2.0 × 10 ⁶	0.1 mg/ml	13.6 ± 0.5	[0.86]	
					0.5 mg/ml	13.4 ± 0.9	[0.84]	
					2.0 mg/ml	11.2 ± 0.4	[0.70]	
		HA	lgG	SF			39.3 ± 0.8	[1.00]
			lgG	SF	2.8 × 10 ⁵	0.1 mg/ml	40.2 ± 0.9	[1.02]
						0.5 mg/ml	36.9 ± 1.8	[0.94]
						2.0 mg/ml	38.1 ± 0.9	[0.97]
				9.5 × 10 ⁵	0.1 mg/ml	39.4 ± 0.1	[1.00]	
						0.5 mg/ml	37.8 ± 0.6	[0.96]
						2.0 mg/ml	36.8 ± 0.5	[0.94]
				2.0 × 10 ⁶	0.1 mg/ml	26.2 ± 1.1	[0.67]	
						0.5 mg/ml	25.6 ± 1.3	[0.65]
					2.0 mg/ml	27.2 ± 0.4	[0.69]	
	lgG		SF + HA	2.8 × 10 ⁵	0.1 mg/ml	27.8 ± 0.9	[0.71]	
					0.5 mg/ml	25.5 ± 0.5	[0.65]	
					2.0 mg/ml	26.6 ± 1.2	[0.68]	
			9.5 × 10 ⁵	0.1 mg/ml	26.3 ± 1.8	[0.67]		
					0.5 mg/ml	24.8 ± 0.1	[0.63]	
				2.0 mg/ml	25.9 ± 0.5	[0.66]		
		2.0 × 10 ⁶	0.1 mg/ml	27.5 ± 0.5	[0.70]			
				0.5 mg/ml	24.3 ± 1.4	[0.62]		
				2.0 mg/ml	26.4 ± 1.0	[0.67]		

Neutrophils (3.6×10^5 cells) on the surfaces treated under various conditions were incubated at 37°C for 60 min, and O_2^- release was measured. Plastic surfaces were pretreated at 37°C for 1 h with HA of different molecular weights (M_r , 2.8×10^5 , 9.5×10^5 , and 2.0×10^6) at 0.1, 0.5, and 2.0 mg/ml. 1st treatment with IgG was carried out at 4°C overnight and 2nd with synovial fluid (SF) was 37°C for 1 h in the presence or absence of HA of different molecular weights at the indicated concentrations. Values are the mean ± S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate. ^{a)} Each value in square parenthesis expresses the relative ratio to the appropriate control (without HA treatment). Negative control (plastic surface) values for Exp.1 and Exp.2 were 10.3 ± 0.7 nmole/ 10^6 cells and 5.0 ± 0.3 nmole/ 10^6 cells, respectively.

好中球の接着に対しては、分子量 2.0×10^6 のヒアルロン酸 (2.0 mg/ml) を用いて検討した。好中球の接着数は、プレートのヒアルロン酸による前処理により増加する傾向が認められたが、その他の処理では全く影響を受けなかった (Table 13)。

Table 13. Effect of hyaluronan (HA) treatment of biological surfaces on neutrophil adhesion

Surface treatment			Number of adherent neutrophils	
Pre-	1st	2nd	(cells/mm ²)	[Ratio] ^{a)}
	IgG		1197 ± 83	[1.00]
	IgG + HA		1231 ± 42	[1.03]
	IgG	HA	1124 ± 102	[0.94]
HA	IgG		1502 ± 129	[1.25]
	IgG	SF	1095 ± 239	[1.00]
	IgG	SF + HA	1046 ± 164	[0.96]
HA	IgG	SF	1203 ± 49	[1.10]

Neutrophils (1800 cells/mm²) added on the surfaces treated under various conditions were incubated at 37°C for 60 min. After gentle washing, adherent cells was counted. Plastic surface was pretreated with 2.0 mg/ml HA (M_r 2.0×10^6) at 37°C for 1 h. 1st treatment with IgG was carried out at 4°C overnight and 2nd with synovial fluid (SF) was 37°C for 1 h in the presence or absence of 2.0 mg/ml HA (M_r 2.0×10^6). Values are the mean ± S.D. of three separate experiments, where each was performed in triplicate. ^{a)}Each value in square parenthesis expresses the relative ratio to the appropriate control (without HA treatment).

考 察

好中球接着表面の関節液による処理が、好中球の O_2^- 産生挙動に及ぼす影響を検討した。IgG コート表面を関節液でさらにコート処理すると、IgG コート表面に比較して好中球の O_2^- 産生が増強された (Table 8)。プラスチック表面を関節液で処理しても、IgG コート表面を関節液で処理することにより増加した量に相当する O_2^- 産生は認められなかった。また IgG/関節液コート表面上の接着細胞数は、IgG コート表面と比較してやや少ないことが示された (Fig. 27)。従って関節液の O_2^- 産生増強作用は、予め表面に結合した IgG と共働的であり、好中球の O_2^- 産生機構が直接活性化された結果と考えられる。

関節液中には好中球の活性酸素産生を刺激する因子の存在が報告されている [116-121]。この因子に対する好中球の応答性は熱凝集 IgG と類似すること [116, 118]、関節液を遠心 (11600×g, 2~5 min) した上清では刺激活性が低下していること [118, 120]、さらに関節液中の刺激活性は protein A-アフィニティークロマトグラフィーによりほぼ完全に除去できること [117,120] が示されている。従って関節液中の好中球刺激因子は、分子サイズの大きな、粒子性の IgG 複合体及び可溶性 IgG 凝集物であると結論されている。また好中球の活性酸素産生を刺激する作用の弱い熱凝集 IgG も、リユーマチ因子で前処理することにより刺激活性が顕著に増大することが示されている [116]。これらのことから、IgG コート表面を関節液によりさらに処理することにより、用いた関節液中に存在する可能性のある免疫複合体が表面に付着し、好中球の O₂⁻ 産生を促進することが考えられる。しかしながら用いた関節液は遠心 (11000×g, 20 min) により粒子性の IgG 複合体が除かれており、また Affi-Gel protein A で関節液を処理しても大部分の IgG 共働性 O₂⁻ 産生促進活性は保持された (Table 8)。さらに IgG コート表面を RF-serum 存在下または非存在下、熱凝集ヒト IgG で二次処理しても O₂⁻ 産生増強効果はわずかであった。これは無処理ヒト IgG を用いても同様であった。従って、関節液中に存在する IgG 共働性 O₂⁻ 産生促進物質は免疫グロブリンタイプのものではないと推定される。慢性関節リユーマチや変形性膝関節症患者の関節液中には CRP が存在することが示されている [135]。また関節組織への CRP 沈着も報告されている [136]。CRP は熱凝集させた場合、CRP 単独では作用を示さないが、熱凝集 IgG による好中球の細胞内活性酸素産生を増強することが報告されている [137,138]。そこで IgG コート表面を熱凝集化及び比較のための無処理 CRP により二次処理したが、いずれの場合も好中球からの O₂⁻ 遊離は促進されなかった。従って IgG/関節液コート表面上での好中球の O₂⁻ 産生に CRP が関与する可能性も低いと考えられる。

IgG コート表面を関節液でさらにコートすることにより、そこへ接着した好中球の O₂⁻ 産生が増強されるという報告例はない。しかしながら未知または既知を問わず、関節液中の何らかの成分が IgG 結合表面上に沈着した結果と考えられる。この成分の物質的特徴を調べるため、先ず関節液中の IgG 共働性 O₂⁻ 産生促進物質の分子量分布を Sephacryl S-500 カラムを用いて検討した。この結果、関節液中の O₂⁻ 産生促進活性は V₀ 領域にやや遅れて回収され、活性成分は大きな分子サイズを持つことがわかった (Fig. 28)。一般的に巨大分子は糖とタンパク質の複合体である場合が多いので、カラムから溶出された活性成分をプールし、糖質分解酵素及びプロテアーゼに対する感受性を検討した。この結果、trypsin 及び actinase により O₂⁻ 産生促進活性が失われた (Table 11)。従って活性成分の構成要素としてタンパク質の存在が示された。糖質分解酵素では、用いた酵素の中で O-glycanase のみが失活させた。これらのことより IgG 共働性 O₂⁻ 産生促進物質は、タンパク質骨格

の serine または threonine に galactose(β 1 \rightarrow 3)*N*-acetylgalactosamine 残基が *O*-グリコシド結合したムチン型糖鎖を持つ glycoconjugates であることが示唆された。O₂⁻ 産生促進物質の表面沈着状態として、IgG が糖鎖を認識して結合し、外部へタンパク質部分を露出させるもの、または逆に IgG とタンパク質部分の相互作用により結合し、外部へ糖鎖を露出させるものが考えられる。いずれの場合でも活性成分中の糖鎖とタンパク質部分が結合していることが活性発現に必須であると考えられる。

IgG コート表面と IgG/関節液コート表面での好中球の O₂⁻ 産生は staurosporine 及び H-7 により強力に抑制された (Table 9)。しかしながら表面上への接着細胞数は影響を受けなかった (Table 10)。従って表面接着後の好中球の O₂⁻ 産生経路には protein kinase C が関与することが示された。カルモジュリン拮抗剤である W-7 も強力に O₂⁻ 産生を抑制したが、これは W-7 添加により好中球の接着がほぼ完全に抑制されたことと関連するものと考えられる。Phosphatase 阻害剤の影響を検討したところ、okadaic acid は IgG コート表面と IgG/関節液コート表面のいずれに対しても接着細胞数に影響しなかった。一方 calyculin A には強い細胞接着抑制作用が認められ、これらの現象は O₂⁻ 産生量と関連していた。Calyculin A と okadaic acid は phosphatase type-2A に対する阻害力は同程度だが、phosphatase type-1 に対しては okadaic acid の阻害作用は弱く、calyculin A はより強力な阻害作用を示す [139]。従って好中球の接着に対して phosphatase type-1 が重要な働きをしていると考えられる。また calyculin A による細胞接着抑制は IgG/関節液コート表面で強く見られることより、phosphatase の関与の程度も表面コートの違いによって異なるものと考えられる。Okadaic acid は IgG/関節液コート表面での好中球の O₂⁻ 産生を弱く阻害したが、NADPH oxidase の活性化に必要なタンパク質である p47-phox と p67-phox、及び protein kinase C の細胞質から細胞膜への移行を部分的に抑制している可能性もある [140]。

種々のタンパク質性細胞外マトリックスでコートされた表面上での接着好中球の活性酸素産生に対して、好中球表面上に発現されている β_2 インテグリンが重要な役割を果たすことが報告されている [141,142]。本研究においても β_2 インテグリンに共通のサブユニットである β 鎖の抗体 anti-CD18 は好中球の接着及び O₂⁻ 産生を抑制し、その作用は特に IgG/関節液コート表面で顕著であった (Table-9 及び -10)。一方、LFA-1 (CD11a/CD18) α 鎖を認識する anti-CD11a は細胞接着を全く抑制しなかったことより、関節液中の IgG 共働性 O₂⁻ 産生促進物質は Mac-1 (CD11b/CD18) または p150,95 (CD11c/CD18) のリガンドである可能性が示唆される。Anti-CD11a は好中球の接着性には影響しないが、O₂⁻ 産生に対しては抑制作用を示した。細胞上の LFA-1 が、接着性とは無関係に接着表面上での O₂⁻ 産生に影響しているかも知れない。

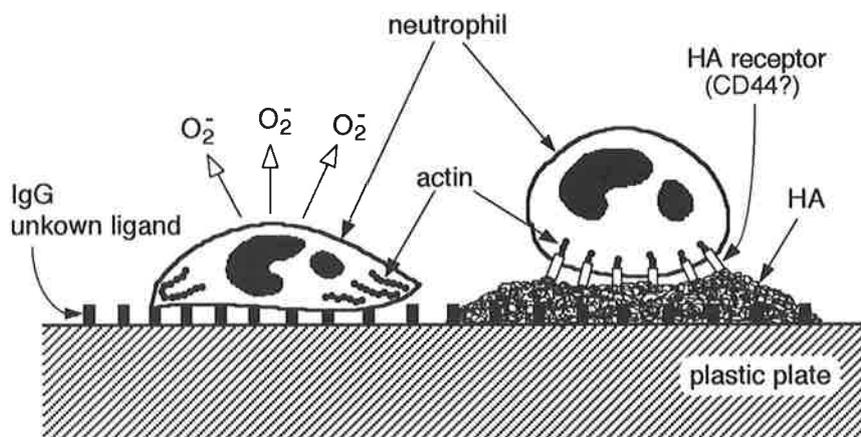
細胞膜透過性の cAMP アゴニストである di-Bt-cAMP と、アクチン重合阻害剤である cytochalasin B [93] は、好中球の接着数と O_2^- 産生量に対して同じ抑制挙動を示した。Cytochalasin は、好中球の基質表面への接着に影響することなく接着表面での細胞の伸展性を阻害し、 O_2^- 産生を抑制することが報告されている [143-145]。cAMP も細胞骨格の再構成と好中球の接着表面上での伸展性に阻害的であること [143,146]、また cAMP は好中球の O_2^- 産生を protein kinase C の作用位置より下流で抑制することが報告されている [147]。これらの報告と、cytochalasin B 及び di-Bt-cAMP が IgG コート表面で好中球の接着数に影響することなく O_2^- 産生を阻害する結果とは良く一致する。しかしながら IgG/関節液コート表面では接着好中球数を減少させ、それに応じた O_2^- 産生量の低下が認められた (Table-9 及び -10)。関節液でコートすることにより、好中球の接着しにくい表面状態になったものと推定される。好中球の活性酸素産生や伸展性を抑制することが報告されている tyrosine kinase 阻害剤 genistein の作用様式も、cytochalasin B や di-Bt-cAMP と比較的類似していた。また百日咳毒素はアクチン再構成に影響しないと報告されているが [148]、その作用は genistein と近似していた。

異なる 22 例の患者の関節液を用いて IgG 共働性 O_2^- 産生促進活性を調べた。用いる関節液により全く活性を示さないものから、IgG コート表面に比べて約 2.2 倍の O_2^- 産生促進活性を示すものまで個人差が認められた (Fig. 26)。患者の病態との関連性に興味を持たれる。

最後に、好中球接着表面のヒアルロン酸処理が好中球の O_2^- 産生に及ぼす影響を検討した。この結果、IgG 及び関節液で表面コートする際に $0.1 \sim 2.0$ mg/ml の分子量の異なるヒアルロン酸 (M_r 2.0×10^6 , 9.5×10^5 及び 2.8×10^5) を共存させると、好中球の O_2^- 産生が抑制された (Table 12)。ヒアルロン酸処理表面を IgG、引き続いて関節液でコートする場合、及び IgG コート表面をヒアルロン酸で後処理する場合には高分子量ヒアルロン酸 (M_r 2.0×10^6) のみ抑制作用を示した。好中球の接着に対しては、いずれの場合でも分子量 2.0×10^6 のヒアルロン酸 (2.0 mg/ml) は影響しなかった (Table 13)。これらのことより、まずヒアルロン酸は IgG、及び関節液中の IgG 共働性好中球活性化物質の沈着を抑制する可能性がある。この作用に対して、検討した範囲ではヒアルロン酸分子量の影響はないと考えられる。第 2 の可能性として、好中球接着表面上に固定化されたヒアルロン酸と好中球上のヒアルロン酸レセプターとの結合により、直接的に好中球の O_2^- 産生が抑制されることが考えられる。ヒアルロン酸レセプターは細胞骨格と会合していることが報告されている [57-59]。従って、巨大分子であるヒアルロン酸が複数のレセプターと結合することにより、複数のアクチンフィラメントがクラスター状態を形成することが推測される (Schema III 参照)。このような状態はアクチンの再構成に影響を与え、好中球の O_2^- 産生を抑制することが考えられる。この場合、1 分

子のヒアルロン酸が、ある一定数以上のヒアルロン酸レセプターと結合する必要があると仮定すれば、高分子量ヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) のみ O_2^- 産生を抑制したことを説明できるものと考えられる。本研究ではヒアルロン酸がプレート表面に固定化されていることを確認していない。用いた好中球上にヒアルロン酸レセプターが存在することも確認していないが、ヒアルロン酸レセプターのひとつである CD44 [12,13] がヒト末梢血好中球に存在することが報告されている [149]。また関節液中にはヒアルロン酸が含まれるが、この内在性ヒアルロン酸の関与については明確でない。しかしながら、炎症性関節症において関節内に注入した高分子量のヒアルロン酸は、関節組織に接着した好中球が産生する活性酸素による組織傷害を軽減することが示唆される。

Schema III. Interaction of surface-coated HA with neutrophil



結論

関節液の主要構成成分のひとつであるヒアルロン酸が、関節炎症に関連した諸現象に与える影響について *in vitro* モデル系を用いて検討した。

炎症とプロスタグランジンは密接に関連している。そこで変形性膝関節症患者由来の滑膜細胞を用い、エイコサノイド生合成前駆体であるアラキドン酸の細胞膜リン脂質からの遊離に対するヒアルロン酸の影響を検討した。ヒアルロン酸は [¹⁴C]アラキドン酸標識した細胞からのブラジキニン刺激による [¹⁴C]アラキドン酸遊離を、反応後 1 h 以降で抑制した。この抑制効果はヒアルロン酸濃度及び分子量に依存していた。しかしながらヒアルロン酸の抑制作用は単に粘度にのみ起因するものではなかった。ヒアルロン酸は滑膜細胞と [³H]ブラジキノンの結合に影響せず、また滑膜細胞による [¹⁴C]アラキドン酸取り込みにも影響しなかった。ヒアルロン酸による [¹⁴C]アラキドン遊離抑制は、滑膜細胞を A23187 で刺激した場合にも認められた。これらのことより、ヒアルロン酸は細胞膜におけるホスホリパーゼ活性に影響を与える可能性が示唆された。細胞外に遊離されたアラキドン酸は関節腔内に浸潤した活性化好中球などに取り込まれ、炎症性プロスタグランジンへ変換される。従って高分子量のヒアルロン酸は関節腔内において抗炎症作用を有するものと考えられる。

炎症性関節症の特徴である軟骨分解は、部分的には浸潤した好中球に起因する。そこでラット腹腔好中球によるウシ鼻中隔軟骨分解に対するヒアルロン酸の影響を検討した。FMLP/cytochalasin-B, opsonized zymosan, TPA または A23187 で活性化した好中球を軟骨とともに 18 h まで培養した。活性化された好中球による軟骨分解はヒアルロン酸により濃度及び分子量依存的に抑制された。Opsonized zymosan を用いた場合、低分子量ヒアルロン酸 ($M_r 2.8 \times 10^5$) は軟骨分解を抑制せず、高分子量ヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) は軟骨分解を約 2 h 遅らせる作用様式を示した。予め貪食させた好中球に対してはヒアルロン酸は抑制作用を示さなかった。ヒアルロン酸の粘性が軟骨分解抑制に重要であると考えられる。ヒアルロン酸の軟骨分解抑制パターンは、opsonized zymosan, TPA 及び A23187 を刺激剤として用いた場合、相互に近似していた。FMLP/cytochalasin B を用いた場合、ヒアルロン酸は軟骨分解を少なくとも 18 h 抑制した。ヒアルロン酸は好中球への FMLP の結合に影響せず、また予め FMLP で刺激した好中球に対しても軟骨分解抑制作用を示した。これらのことよりヒアルロン酸の抑制作用には、粘度に起因するものに加え、粘度以外の細胞に対する直接的な作用もあるものと推察される。高分子量のヒアルロン酸は、関節腔に浸潤した好中球による軟骨分解に対して保護的であると考えられる。

炎症性関節症では関節軟骨への好中球の接着が認められる。そこで関節液及びヒアルロン酸による好中球の接着表面処理が、接着好中球の O_2^- 産生に及ぼす影響について検討した。関節液中には表面にコートされた IgG と共働して、好中球の O_2^- 産生を促進する物質が存在することを見いだした。この O_2^- 産生促進物質は高分子であり、ムチン型糖鎖を持つ glycoconjugates であると推定された。IgG 及び関節液で表面コートする際にヒアルロン酸を共存させると、好中球の O_2^- 産生が抑制された。表面をヒアルロン酸前処理後、IgG 及び関節液でコートした場合、及び IgG コート表面をヒアルロン酸で後処理した場合には高分子量ヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) のみが O_2^- 産生を抑制した。ヒアルロン酸 ($M_r 2.0 \times 10^6$) 処理による好中球の接着抑制は認められなかった。これらのことより、ヒアルロン酸は IgG 及び関節液中の IgG 共働性 O_2^- 産生促進物質の表面沈着を抑制するか、あるいは表面コートされたヒアルロン酸が直接的に好中球の O_2^- 産生を抑制する可能性が示唆された。高分子量のヒアルロン酸は、関節組織に接着した好中球の産生する活性酸素による組織傷害を軽減するものと考えられる。

以上の結果より、炎症の進展にともなう組織傷害に対して高分子量ヒアルロン酸は組織保護的な作用を持つものと考えられる。言い換えると、高分子量ヒアルロン酸は生体由来の抗炎症剤と位置づけることができるかも知れない。炎症性関節症では関節液中のヒアルロン酸が濃度低下や低分子化を起すことが知られている。一方、炎症にともなう発熱や関節液中へ遊離される炎症性サイトカインは、滑膜細胞のヒアルロン酸合成を促進することが知られている。これらの現象は炎症の修復過程のひとつであり、生体の恒常性維持作用の一環であると推察される。また、炎症により量的に減少した高分子量ヒアルロン酸を外部より補うことにより、炎症反応による自己組織傷害を抑制できる可能性が考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました鳥取大学農学部 平野茂博教授に心から感謝申し上げます。またヒト滑膜組織を御供与下さいました早石病院副院長 早石雅宥先生に深く感謝致します。本研究に対し、種々有益な御助言を賜りましたマルホ株式会社研究顧問 木村徳次博士に深く感謝致します。本研究は神戸薬科大学放射薬品学教室、及びマルホ株式会社中央研究所の多くの方々の御支援のもとで行われました。関係の方々に心から感謝致します。

引用文献

1. Ruoslahti, E. (1989) Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13369-13372.
2. Labat-Robert, J., Bihari-Varga, M. and Robert, L. (1990) Extracellular matrix. *FEBS Lett.*, **268**, 386-393.
3. Juliano, R.L. and Haskill, S. (1993) Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.*, **120**, 577-585.
4. Laurent, T.C. (1987) Biochemistry of hyaluronan. *Acta Otolaryngol.*, **442**, 7-24.
5. Bothner, H. and Wik, O. (1987) Rheology of hyaluronan. *Acta Otolaryngol.*, **442**, 25-30.
6. Comper, W.D. and Zamparo, O. (1990) Hydrodynamic properties of connective-tissue polysaccharides. *Biochem. J.*, **269**, 561-564.
7. Laurent, T.C. and Fraser, J.R.E. (1992) Hyaluronan. *FASEB J.*, **6**, 2397-2404.
8. Forrester, J.V. and Balazs, E.A. (1980) Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*, **40**, 435-446.
9. Forrester, J.V. and Wilkinson, P.C. (1981) Inhibition of leukocyte locomotion by hyaluronic acid. *J. Cell Sci.*, **48**, 315-331.
10. Underhill, C.B. and Toole, B.P. (1980) Physical characteristics of hyaluronate binding to the surface of Simian virus 40-transformed 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4544-4549.
11. Underhill, C.B., Thurn, A.L. and Lacy B.E. (1985) Characterization and identification of the hyaluronate binding site from membranes of SV-3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **260**, 8128-8133.
12. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B. and Seed, B. (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, **61**, 1303-1313.
13. Culty, M., Miyake, K., Kincade, P.W., Silorski, E., Butcher, E.C. and Underhill, C. (1990) The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.*, **111**, 2765-2774.
14. Yoneda, M., Suzuki, S. and Kimata, K. (1990) Hyaluronic acid associated with the surfaces of cultured fibroblasts is linked to a serum-derived 85-kDa protein. *J. Biol. Chem.*, **265**, 5247-5257.
15. Dahl, I.M.S. and Husby, G. (1985) Hyaluronic acid production in vitro by synovial lining cells from normal and rheumatoid joints. *Ann. Rheum. Dis.*, **44**, 647-657.
16. Prehm, P. (1988) Biosynthesis of hyaluronate. *Agents Actions*, **23**, 36-37.
17. Venuti, M.C. (1986) Therapeutic approaches to rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. in *Annu. Rep. Med. Chem.*, Bailey, D.M., Ed., **21**, 201-210, Academic Press, Inc.
18. Caputo, C.B. and Shaw, A. (1987) Osteoarthritis as a target for drug intervention. in *Annu. Rep. Med. Chem.*, Bailey, D.M., Ed., **22**, 179-189, Academic Press, Inc.
19. Dahl, L.B., Dahl, I.M.S., Engstrom-Laurent, A. and Granath, K. (1985) Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann. Rheum. Dis.*, **44**, 817-822.
20. Pujol, J.-P. and Loyau, G. (1987) Interleukin-1 and osteoarthritis. *Life Sci.*, **41**, 1187-1198.
21. Kirkham, B. (1991) Interleukin-1, immune activation pathways, and different mechanisms in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **50**, 395-400.
22. Hamerman, D. and Wood, D.D. (1984) Interleukin 1 enhances synovial cell hyaluronate synthesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **177**, 205-210.
23. Butler, D.M., Vitti, G.F., Leizer, T. and Hamilton, J.A. (1988) Stimulation of the hyaluronic acid levels of human synovial fibroblasts by recombinant human tumor necrosis factor α , tumor necrosis factor β (lymphotoxin), interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *Arthritis Rheum.*, **31**, 1281-1289.
24. Yaron, I., Meyer, F.A., Dayer, J.-M., Bleiberg, I. and Yaron, M. (1989) Some recombinant human cytokines stimulate glycosaminoglycans synthesis in human synovial fibroblast cultures and inhibit

- it in human articular cartilage cultures. *Arthritis Rheum.*, **32**, 173-180.
25. Wegrowski, Y. (1993) Effect of hyperthermia on the extracellular matrix I. Heat enhances hyaluronan and inhibits sulphated glycosaminoglycan synthesis. *FEBS Lett.*, **334**, 121-124.
 26. Arfag, A.A. and Davis, P. (1991) Osteoarthritis 1991. Current drug treatment regimens. *Drugs*, **41**, 193-201.
 27. Jones, A.C. and Doherty, M. (1992) The treatment of osteoarthritis. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **33**, 357-363.
 28. Miller, R.J. (1987) Bradykinin highlights the role of phospholipid metabolism in the control of nerve excitability. *Trends Neurosci.*, **10**, 226-228.
 29. Steranka, L.R., Manning, D.C., DeHaas, C.J., Ferkany, J.W., Borosky, S.A., Connor, J.R., Vavrek, R.J., Stewart, J.M. and Snyder, S.H. (1988) Bradykinin as a pain mediator: Receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 3245-3249.
 30. Burch, R.M. and Axelrod, J. (1987) Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: Evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 6374-6378.
 31. Kaya, H., Patton, G.M. and Hong, S.L. (1989) Bradykinin-induced activation of phospholipase A₂ is independent of the activation of polyphosphoinositide-hydrolyzing phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **264**, 4972-4977.
 32. Burgoyne, R.D. and Morgan, A. (1990) The control of free arachidonic acid levels. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 365-366.
 33. Rittenhouse-Simmons, S. (1981) Differential activation of platelet phospholipases by thrombin and ionophore A23187. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4153-4155.
 34. Cohen, R.H. and Perl, E.R. (1990) Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. *J. Neurophysiol.*, **64**, 457-464.
 35. Irvine, R.F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?. *Biochem. J.*, **204**, 3-16.
 36. Dennis, E.A. (1987) Regulation of eicosanoid production: Role of phospholipases and inhibitors. *Bio/Technology*, **5**, 1294-1300.
 37. Dixon, A.S.J., Jacoby, R.K., Berry, H. and Hamilton, E.B.D. (1988) Clinical trial of intra-articular injection of sodium hyaluronate in patients with osteoarthritis of the knee. *Curr. Med. Res. Opin.*, **11**, 205-213.
 38. Leardini, G., Mattara, L., Franceschini, M. and Perbellini, A. (1991) Intra-articular treatment of knee osteoarthritis. A comparative study between hyaluronic acid and 6-methylprednisolone acetate. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **9**, 375-381.
 39. Akasaka, H., Seto, S., Yanagi, M., Fukushima, S. and Mitsui, T. (1988) Industrial production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **22**, 45-52.
 40. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
 41. Manning, D.C., Vavrek, R., Stewart, J.M. and Snyder, S.H. (1986) Two bradykinin binding sites with picomolar affinities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**, 504-512.
 42. Bathon, J.M., Manning, D.C., Goldman, D.W., Towns, M.C. and Proud, D. (1992) Characterization of kinin receptors on human synovial cells and upregulation of receptor number by interleukin-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**, 384-392.
 43. Uhl, J., Singh, S., Brophy, L., Faunce, D. and Sawutz, D.G. (1992) Role of bradykinin in inflammatory arthritis: Identification and function analysis of bradykinin receptors on human synovial fibroblasts. *Immunopharmacology*, **23**, 131-138.
 44. Roberts, R.A. and Gullick, W.J. (1989) Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis is increased by expression of a mutant ras oncogene. *J. Cell Sci.*, **94**,

45. Burch, R.M., Farmer, S.G. and Steranka, L.R. (1990) Bradykinin receptor antagonists. *Med. Res. Rev.*, **10**, 237-269.
46. Lee, A.G. (1991) Lipids and their effects on membrane proteins: Evidence against a role for fluidity. *Prog. Lipid Res.*, **30**, 323-348.
47. Zakim, D., Kavecansky, J. and Scarlata, S. (1992) Are membrane enzymes regulated by the viscosity of the membrane environment?. *Biochemistry*, **31**, 11589-11594.
48. Kannagi, R. and Koizumi, K. (1979) Effect of different physical states of phospholipid substrates on partially purified platelet phospholipase A₂ activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 423-433.
49. Van Den Bosch, H. (1980) Intracellular phospholipases A. *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 191-246.
50. Kramer, R.M., Jakubowski, J.A., Vaillancourt, R. and Deykin, D. (1982) Effect of membrane cholesterol on phospholipid metabolism in thrombin-stimulated platelets. Enhanced activation of platelet phospholipase(s) for liberation of arachidonic acid. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6844-6849.
51. Hofmann, S.L. and Majerus, P.W. (1982) Modulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides, and calcium ions. *J. Biol. Chem.*, **257**, 14359-14364.
52. Dawson, R.M.C., Hemington, N.L. and Irvine, R.F. (1983) Diacylglycerol potentiates phospholipase attack upon phospholipid bilayers: Possible connection with cell stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 196-201.
53. Dawson, R.M.C., Irvine, R.F., Bray, J. and Quinn, P.J. (1984) Long-chain unsaturated diacylglycerols cause a perturbation in the structure of phospholipid bilayers rendering them susceptible to phospholipase attack. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 836-842.
54. Momchilova, A., Petkova, D. and Koumanov, K. (1986) Rat liver microsomal phospholipase A₂ and membrane fluidity. *Int. J. Biochem.*, **18**, 659-663.
55. Koumanov, K.S., Momchilova-Pankova, A.B., Wang, S.-R. and Infante, R. (1990) Membrane phospholipid composition, fluidity and phospholipase A₂ activity of human hepatoma cell line HepG₂. *Int. J. Biochem.*, **22**, 1453-1455.
56. Vernon, L.P. and Bell, J.D. (1992) Membrane structure, toxins and phospholipase A₂ activity. *Pharmac. Ther.*, **54**, 269-295.
57. Tarone, G., Ferracini, R., Galetto, G. and Comoglio, P. (1984) A cell surface integral membrane glycoprotein of 85,000 mol wt (gp85) associated with triton X-100-insoluble cell skeleton. *J. Cell Biol.*, **99**, 512-519.
58. Lacy, B.E. and Underhill, C.B. (1987) The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J. Cell Biol.*, **105**, 1395-1404.
59. Turley, E.A., Brassel, P. and Moore, D. (1990) A hyaluronan-binding protein shows a partial and temporally regulated codistribution with actin on locomoting chick heart fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **187**, 243-249.
60. Diccianni, M.B., Mistry, M.J., Hug, K. and Harmony, J.A.K. (1990) Inhibition of phospholipase A₂ by heparin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1046**, 242-248.
61. Yasui, T., Akatsuka, M., Tobetto, K., Hayaishi, M. and Ando, T. (1992) The effect of hyaluronan on interleukin-1 α -induced prostaglandin E₂ production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions*, **37**, 155-156.
62. Akatsuka, M., Yamamoto, Y., Tobetto, K., Yasui, T. and Ando, T. (1993) In vitro effects of hyaluronan on prostaglandin E₂ induction by interleukin-1 in rabbit articular chondrocytes. *Agents Actions*, **38**, 122-125.
63. Rollins, T.E. and Smith, W.L. (1980) Subcellular localization of prostaglandin-forming cyclooxygenase in Swiss mouse 3T3 fibroblasts by electron microscopic immunocytochemistry. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4872-4875.
64. Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J. and Needleman, P. (1988) Isolation and characterization of the

- complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.*, **263**, 3550-3553.
65. Laurent, T.C., Dahl, I.M.S., Dahl, L.B., Engstrom-Laurent, A., Eriksson, S., Fraser, J.R.E., Granath, K.A., Laurent, C., Laurent, U.B.G., Lilja, K., Pertoft, H., Smedsrod, B., Tengblad, A. and Wik, O. (1986) The catabolic fate of hyaluronic acid. *Connect. Tiss. Res.*, **15**, 33-41.
 66. Godfrey, R.W., Johnson, W.J. and Hoffstein, S.T. (1987) Recombinant tumor necrosis factor and interleukin-1 both stimulate human synovial cell arachidonic acid release and phospholipid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 235-241.
 67. Gilman, S., Chang, J., Zeigler, P.R., Uhl, J. and Mochan, E. (1988) Interleukin-1 activates phospholipase A₂ in human synovial cells. *Arthritis Rheum.*, **31**, 126-130.
 68. Godfrey, R.W., Johnson, W.J. and Hoffstein, S.T. (1988) Interleukin-1 stimulation of phospholipase activity in rat synovial fibroblasts. Possible regulation by cyclooxygenase products. *Arthritis Rheum.*, **31**, 1421-1428.
 69. Hulkower, K.I., Hope, W.C., Chen, T., Anderson, C.M., Coffey, J.W. and Morgan, D.W. (1992) Interleukin-1 β stimulates cytosolic phospholipase A₂ in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 712-718.
 70. Angel, J., Colard, O., Chevy, F. and Fournier, C. (1993) Interleukin-1-mediated phospholipid breakdown and arachidonic acid release in human synovial cells. *Arthritis Rheum.*, **36**, 158-167.
 71. Hulkower, K.I., Coffey, J.W., Levin, W., Anderson, C.M., Chen, T., Hope, W.C., Bolin, D.R. and Morgan, D.W. (1993) Interleukin-1 β induces cytosolic PLA₂ in parallel with prostaglandin E₂ in rheumatoid synovial fibroblasts. *Agents Actions*, **39**, C5-C7.
 72. Chang, J., Gilman, S.C. and Lewis, A.J. (1986) Interleukin 1 activates phospholipase A₂ in rabbit chondrocytes: A possible signal for IL 1 action. *J. Immunol.*, **136**, 1283-1287.
 73. Gilman, S.C., Berner, P.R. and Chang, J. (1987) Phospholipase A₂ activation by interleukin 1: Release and metabolism of arachidonic acid by IL 1-stimulated rabbit chondrocytes. *Agents Actions*, **21**, 345-347.
 74. Galea-Lauri, J., Wilkinson, J.M. and Evans, C.H. (1993) Characterization of monoclonal antibodies against rabbit CD44: Evidence of a role for CD44 in modulating synoviocyte metabolism. *Mol. Immunol.*, **30**, 1383-1392.
 75. Punzi, L., Schiavon, F., Cavasin, F., Ramonda, R., Gambari, P.F. and Todesco, S. (1989) The influence of intra-articular hyaluronic acid on PGE₂ and cAMP of synovial fluid. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **7**, 247-250.
 76. Bader, D.L., Kempson, G.E., Barrett, A.J. and Webb, W. (1981) The effects of leucocyte elastase on the mechanical properties of adult human articular cartilage in tension. *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 103-108.
 77. Broom, N.D. and Silyn-Roberts, H. (1990) Collagen-collagen versus collagen-proteoglycan interactions in the determination of cartilage strength. *Arthritis Rheum.*, **33**, 1512-1517.
 78. Barrett, A.J. (1978) The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage. *Agents Actions*, **8**, 11-18.
 79. Mohr, W., Wild, A. and Wolf, H.P. (1981) Role of polymorphs in inflammatory cartilage destruction in adjuvant arthritis of rats. *Ann. Rheum. Dis.*, **40**, 171-176.
 80. Chatham, W.W., Swaim, R., Frohsin, H., Heck, L.W., Miller, E.J. and Blackburn, W.D. (1993) Degradation of human articular cartilage by neutrophils in synovial fluid. *Arthritis Rheum.*, **36**, 51-58.
 81. Baici, A., Salgam, P., Cohen, G., Fehr, K. and Boni, A. (1982) Action of collagenase and elastase from human polymorphonuclear leukocytes on human articular cartilage. *Rheumatol. Int.*, **2**, 11-16.
 82. Velvart, M. and Fehr, K. (1987) Degradation in vivo of articular cartilage in rheumatoid arthritis and juvenile chronic arthritis by cathepsin G and elastase from polymorphonuclear leukocytes.

- Rheumatol. Int.*, **7**, 195-202.
83. Schalkwijk, J., Joosten, L.A.B., van den Berg, W.B. and van de Putte, L.B.A. (1988) Elastase secreted by activated polymorphonuclear leukocytes causes chondrocyte damage and matrix degradation in intact articular cartilage. *Agents Actions*, **23**, 58-59.
 84. Janusz, M.J. and Doherty, N.S. (1991) Degradation of cartilage matrix proteoglycan by human neutrophils involves both elastase and cathepsin G. *J. Immunol.*, **146**, 3922-3928.
 85. Greenwald, R.A. and Moak, S.A. (1986) Degradation of hyaluronic acid by polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation*, **10**, 15-30.
 86. Baker, M.S., Green, S.P. and Lowther, D.A. (1989) Changes in the viscosity of hyaluronic acid after exposure to a myeloperoxidase-derived oxidant. *Arthritis Rheum.*, **32**, 461-467.
 87. Saari, H. (1991) Oxygen derived free radicals and synovial fluid hyaluronate. *Ann. Rheum. Dis.*, **50**, 389-392.
 88. Kudo, M., Nakamura, T. and Koyama, J. (1985) Purification and some properties of a membrane-bound dipeptidyl peptidase IV of guinea pig casein-induced intraperitoneal leukocytes. *J. Biochem.*, **97**, 1211-1218.
 89. Williams, J.D., Whitehead, S.H., Scott, D.L., Huskisson, E.C. and Willoughby, D.A. (1987) An in vitro system for studying cartilage degradation by macrophages. *Biomed. Pharmacother.*, **41**, 89-92.
 90. Bengtsson, T., Dahlgren, C., Stendahl, O. and Andersson, T. (1991) Actin assembly and regulation of neutrophil function: Effects of cytochalasin B and tetracaine on chemotactic peptide-induced O₂⁻ production and degranulation. *J. Leukoc. Biol.*, **49**, 236-244.
 91. Farndale, R.W., Buttle, D.J. and Barrett, A.J. (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*, **883**, 173-177.
 92. Watanabe, H., Hattori, S., Katsuda, S., Nakanishi, I. and Nagai, Y. (1990) Human neutrophil elastase: Degradation of basement membrane components and immunolocalization in the tissue. *J. Biochem.*, **108**, 753-759.
 93. Cooper, J.A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.*, **105**, 1473-1478.
 94. Ross, G.D., Cain, J.A. and Lachmann, P.J. (1985) Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin and functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J. Immunol.*, **134**, 3307-3315.
 95. Tamatani, T., Kotani, M. and Miyasaka, M. (1991) Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, **21**, 627-633.
 96. Schalkwijk, J., van den Berg, W.B., van de Putte, L.B.A. and Joosten, L.A.B. (1987) Elastase secreted by activated polymorphonuclear leukocytes causes chondrocyte damage and matrix degradation in intact articular cartilage: Escape from inactivation by alpha-1-proteinase inhibitor. *Br. J. Exp. Pathol.*, **68**, 81-88.
 97. Kowanko, I.C., Bates, E.J. and Ferrante, A. (1989) Mechanisms of human neutrophil-mediated cartilage damage in vitro: The role of lysosomal enzymes, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Immunol. Cell Biol.*, **67**, 321-329.
 98. Kowanko, I.C. and Ferrante, A. (1991) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil-mediated cartilage degradation and neutrophil adherence. *Arthritis Rheum.*, **34**, 1452-1460.
 99. Campbell, E.J., Senior, R.M., McDonald, J.A. and Cox, D.L. (1982) Proteolysis by neutrophils: Relative importance of cell-substrate contact and oxidative inactivation of proteinase inhibitors in vitro. *J. Clin. Invest.*, **70**, 845-852.
 100. Forrester, J.V. and Lackie, J.M. (1981) Effect of hyaluronic acid on neutrophil adhesion. *J. Cell Sci.*, **50**, 329-344.

101. Brandt, K.D. (1974) The effect of synovial hyaluronate on the ingestion of monosodium urate crystals by leukocytes. *Clin. Chim. Acta*, **55**, 307-315.
102. Pisko, E.J., Turner, R.A., Soderstrom, L.P., Panetti, M., Foster, S.L. and Treadway, W.J. (1983) Inhibition of neutrophil phagocytosis and enzyme release by hyaluronic acid. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **1**, 41-44.
103. Williams, L.T., Snyderman, R., Pike, M.C. and Lefkowitz, R.J. (1977) Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 1204-1208.
104. Ohta, H., Okajima, F. and Ui, M. (1985) Inhibition by islet-activating protein of a chemotactic peptide-induced early breakdown of inositol phospholipids and Ca^{2+} mobilization in guinea pig neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15771-15780.
105. Volpi, M., Naccache, P.H., Molski, T.F.P., Shefcyk, J., Huang, C.-K., Marsh, M.L., Munoz, J., Becker, E.L. and Sha'afi, R.I. (1985) Pertussis toxin inhibits fMet-Leu-Phe- but phorbol ester-stimulated changes in rabbit neutrophils: Role of G proteins in excitation response coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 2708-2712.
106. Lad, P.M., Olson, C.V. and Grewal, I.S. (1986) A step sensitive to pertussis toxin and phorbol ester in human neutrophils regulates chemotaxis and capping but not phagocytosis. *FEBS Lett.*, **200**, 91-96.
107. Bass, D.A., Gerard, C., Olbrantz, P., Wilson, J., McCall, C.E. and McPhail, L.C. (1987) Priming of the respiratory burst of neutrophils by diacylglycerol: Independence from activation or translocation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6643-6649.
108. Kitagawa, S. and Hirata, H. (1992) Effects of alcohols on fluorescence anisotropies of diphenylhexatriene and its derivatives in bovine blood platelets: Relationships of the depth-dependent change in membrane fluidity by alcohols with their effects on platelet aggregation and adenylate cyclase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1112**, 14-18.
109. Opper, C., Fett, C., Capito, B., Raha, S. and Wesemann, W. (1993) Plasma membrane properties in heterogeneous human blood platelet subfractions modulate the cellular response at the second messenger level. *Thromb. Res.*, **72**, 39-47.
110. Mohr, W., Westerhellweg, H. and Wessinghage, D. (1981) Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. An electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **40**, 396-399.
111. Weiss, S.J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 365-376.
112. Hutadilok, N., Smith, M.M. and Ghosh, P. (1991) Effects of hydrogen peroxide on the metabolism of human rheumatoid and osteoarthritic synovial fibroblasts in vitro. *Ann. Rheum. Dis.*, **50**, 219-226.
113. Vincent, F., Brun, H., Clain, E., Ronot, X. and Adolphe, M. (1989) Effects of oxygen-free radicals on proliferation kinetics of cultured rabbit articular chondrocytes. *J. Cell. Physiol.*, **141**, 262-266.
114. Bates, E.J., Johnson, C.C. and Lowther, D.A. (1985) Inhibition of proteoglycan synthesis by hydrogen peroxide in cultured bovine articular cartilage. *Biochim. Biophys. Acta*, **838**, 221-228.
115. Schalkwijk, J., van den Berg, W.B., van de Putte, L.B. and Joosten, L.A.B. (1985) Hydrogen peroxide suppresses the proteoglycan synthesis of intact articular cartilage. *J. Rheumatol.*, **12**, 205-210.
116. Gale, R., Bertouch, J.V., Bradley, J. and Roberts-Thomson, P.J. (1983) Direct activation of neutrophil chemiluminescence by rheumatoid sera and synovial fluid. *Ann. Rheum. Dis.*, **42**, 158-162.
117. Dularay, B., Badesha, J.S., Dieppe, P.A. and Elson, C.J. (1990) Oxidative response of polymorphonuclear leucocytes to synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **49**, 661-664.
118. Nurcombe, H.L., Bucknall, R.C. and Edwards, S.W. (1991) Activation of the neutrophil

- myeloperoxidase-H₂O₂ system by synovial fluid isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **50**, 237-242.
119. Robinson, J.J., Watson, F., Bucknall, R.C. and Edwards, S.W. (1992) Stimulation of neutrophils by insoluble immunoglobulin aggregates from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Invest.*, **22**, 314-318.
 120. Robinson, J., Watson, F., Bucknall, R.C. and Edwards, S.W. (1992) Activation of neutrophil reactive-oxidant production by synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. Soluble and insoluble immunoglobulin aggregates activate different pathways in primed and unprimed cells. *Biochem. J.*, **286**, 345-351.
 121. Robinson, J.J., Watson, F., Phelan, M., Bucknall, R.C. and Edwards, S.W. (1992) Activation of neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **52**, 347-353.
 122. Trujillo, P.E. and Mannik, M. (1992) IgG is bound by antigen-antibody bonds and some IgG and albumin are bound by intermolecular disulfide bonds to cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol. Int.*, **11**, 225-234.
 123. Mannik, M. and Person, R.E. (1993) Immunoglobulin G and serum albumin isolated from the articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis contain covalent heteropolymers with proteoglycans. *Rheumatol. Int.*, **13**, 121-129.
 124. Ugai, K., Ishikawa, H., Hirohata, K. and Shirane, H. (1983) Interaction of polymorphonuclear leukocytes with immune complexes trapped in rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.*, **26**, 1434-1441.
 125. Blackburn, Jr., W.D. and Heck, L.W. (1988) Neutrophil activation by surface bound IgG: Pertussis toxin insensitive activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 136-142.
 126. Kusunoki, T., Higashi, H., Hosoi, S., Hata, K., Sugie, K., Mayumi, M. and Mikawa, H. (1992) Tyrosine phosphorylation and its possible role in superoxide production by human neutrophils stimulated with FMLP and IgG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 789-796.
 127. Vissers, M.C.M., Day, W.A. and Winterbourn, C.C. (1985) Neutrophils adherent to a nonphagocytosable surface (glomerular basement membrane) produce oxidants only at the site of attachment. *Blood*, **66**, 161-166.
 128. Hoffstein, S.T., Gennaro, D.E. and Manzi, R.M. (1985) Surface contact inhibits neutrophil superoxide generation induced by soluble stimuli. *Lab. Invest.*, **52**, 515-522.
 129. Neumann, M. and Kownatzki, E. (1989) The effect of adherence on the generation of reactive oxygen species by human neutrophilic granulocytes. *Agents Actions*, **26**, 183-185.
 130. Ginis, I. and Tauber, A.I. (1990) Activation mechanisms of adherent human neutrophils. *Blood*, **76**, 1233-1239.
 131. Kownatzki, E. and Uhrich, S. (1991) Adherence-induced enhancement of the oxidative burst of human neutrophilic granulocytes: Effects of the surface coat and of divalent cations. *Agents Actions*, **32**, 41-45.
 132. Laurent, F., Benoliel, A.M., Capo, C. and Bongrand, P. (1991) Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes: Modulation by adhesive stimuli. *J. Leukoc. Biol.*, **49**, 217-226.
 133. Zeller, J.M., Landay, A.L., Lint, T.F. and Gewurz, H. (1986) Enhancement of human peripheral blood monocyte respiratory burst activity by aggregated C-reactive protein. *J. Leukoc. Biol.*, **40**, 769-783.
 134. Babior, B.M., Kipnes, R.S. and Curnutte, J.T. (1973) Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.*, **52**, 741-747.
 135. Shine, B., Bourne, J.T., Begum Baig, F., Dacre, J. and Doyle, D.V. (1991) C reactive protein and immunoglobulin G in synovial fluid and serum in joint disease. *Ann. Rheum. Dis.*, **50**, 32-35.
 136. Kushner, I. and Somerville-Volanakis, J. (1973) Studies of synovial and serum C-reactive protein in

- experimental arthritis in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**, 112-114.
137. Zeller, J.M., Landay, A.L., Lint, T.F. and Gewurz, H. (1986) Aggregated C-reactive protein binds to human polymorphonuclear leukocytes and potentiates Fc receptor-mediated chemiluminescence. *J. Lab. Clin. Med.*, **108**, 567-576.
138. Zeller, J.M. and Sullivan, B.L. (1992) C-reactive protein selectively enhances the intracellular generation of reactive oxygen products by IgG-stimulated monocytes and neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, **52**, 449-455.
139. Ishihara, H., Martin, B.L., Brautigan, D.L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D. and Hartshorne, D.J. (1989) Calyculin A and okadaic acid: Inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 871-877.
140. Garcia, R.C., Whitaker, M., Heyworth, P.G. and Segal, A.W. (1992) Okadaic acid produces changes in phosphorylation and translocation of proteins and in intracellular calcium in human neutrophils. *Biochem. J.*, **286**, 687-692.
141. Nathan, C., Srimal, S., Farber, C., Sanchez, E., Kabbash, L., Asch, A., Gailit, J. and Wright, S.D. (1989) Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: Dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J. Cell Biol.*, **109**, 1341-1349.
142. Shappell, S.B., Toman, C., Anderson, D.C. Taylor, A.A., Entman, M.L. and Smith, C.W. (1990) Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J. Immunol.*, **144**, 2702-2711.
143. Nathan, C. and Sanchez, E. (1990) Tumor necrosis factor and CD11/CD18 (β_2) integrins act synergistically to lower cAMP in human neutrophils. *J. Cell Biol.*, **111**, 2171-2181.
144. Nathan, C.F. (1987) Neutrophil activation on biological surfaces: Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **80**, 1550-1560.
145. Ginis, I., Zaner, K., Wang, J.-S., Pavlotsky, N. and Tauber, A.I. (1992) Comparison of actin changes and calcium metabolism in plastic- and fibronectin-adherent human neutrophils. *J. Immunol.*, **149**, 1388-1394.
146. Fuortes, M., Jin, W.-W. and Nathan, C. (1993) Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.*, **120**, 777-784.
147. Mitsuyama, T., Takeshige, K. and Minakami, S. (1993) Cyclic AMP inhibits the respiratory burst of electropermeabilized human neutrophils at a downstream of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta*, **1177**, 167-173.
148. Wang, J.-S., Pavlotsky, N., Tauber, A.I. and Zaner, K.S. (1993) Assembly dynamics of actin in adherent human neutrophils. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **26**, 340-348.
149. Tsuboi, I., Kotera, N., Shichijo, S., Namba, K., Suzuki, K. and Yokoyama, M.M. (1993) Effect of high molecular weight sodium hyaluronate (SL-1010) on human neutrophil function. *Japan. J. Inflamm.*, **13**, 55-61.

