

牛副腎皮質細胞のコルチゾール産生に
対するインターフェロンの効果

伊藤 浩司、立川 英一

岩手医科大学医学部、薬理学講座
(主任：榎本威志教授)



Effects of Interferons on Cortisol Production
in Bovine Fasciculata Cells.

Koji Itoh and Eiichi Tachikawa

Department of Pharmacology,
School of Medicine, Iwate Medical University,
Morioka, Japan
(Prof. T. KASHIMOTO)

Abstract

It has recently begun to be understood that there is the interaction between the immune and endocrine systems *in vivo*. To investigate whether immune systems affect the function of endocrine systems, we examined the effects of intereferones (IFNs), transmitters of the immune systems, on cortisol secretion from bovine adrenal faciculata cells. Long-term pretreatment (2-24 hr.) of the cells with recombinant human IFN- α -2b (300-30,000 U/ml) leaded to its dose-dependent reduction of the cortisol secretion from the cells stimulated by ACTH (10^{-8} M). However, the pretreatment with fibroblast IFN- β or recombinant human IFN- γ did not affect the secretion by ACTH. The IFN- α inhibition of the ACTH-induced secretion was reversible and it was overecome by anti-human IFN- α antibody.

On the other hand, IFN- α altered neither the ACTH-induced cyclic AMP formation nor pregnenolone-induced cortisol secretion. Further, the inhibitory effect of IFN- α was not affected by increasing ACTH (10^{-11} - 10^{-6} M) or Ca^{2+} concentrations (0-10.4 mM). These results indicate that the IFN- α in the IFNs specifically inhibits the secretion of cortisol from bovine fasciculata cells stimulated by ACTH. The results further suggest that IFN- α suppressively acts on the secretory process following to cyclic AMP formation and prior to pregnenolone formation, and that the immune systems may regulate the endocrine systems via the transmitter cytokine, IFN- α , *in vivo*.

key words : cholesterol, cyclic AMP, Ca^{2+}

I. 緒言

生体は、神経系、内分泌系、免疫系によって維持、調節されている。従来は各々の系が、独自に働いていると考えられていたが、免疫系のトランスミッターのサイトカインが発見されてから各々が密接に関係し合い、総合的に生体機能を維持、調節していると考えられるようになった。免疫系が神経、内分泌系に影響する一例として1) ラット胎児培養新皮質や海馬の神経細胞に対してIL-2が成長因子として働く^{1) 2)}、2) ラット培養副腎皮質細胞において、インターロイキン (IL)-1がコルチコステロンの分泌を増加させる³⁾ ことがあげられる。

インターフェロン(IFNs)は、1957年、IsaacsとLindenman⁴⁾により、ウイルス増殖を抑制する物質として同定されたサイトカインである。糖タンパク質であり、ウイルス増殖以外に免疫調節作用、細胞増殖や分化の抑制作用を示す⁵⁾。IFNsは、主に白血球、線維芽細胞、T細

胞のそれぞれから産生されるIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ の3種類に分類されている。そこで、IFNsの内分泌系に対する影響を検討するため、内分泌系のモデルとして牛副腎皮質細胞を用い、IFNsが、皮質のコルチゾール産生にどの様に影響するか検討した。

副腎は全く異なる2つの組織からなり、内層は発生学的に外胚葉由来の髄質、外層は内胚葉由来の皮質からなる。副腎皮質はさらに3層よりなり、最外層は顆粒層、その下に束状層、最内層は網状層と呼ばれる。コルチゾールは主に束状層において、下垂体より分泌される副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の刺激により生合成され、分泌される。

II. 実験方法

1) 実験試薬

Human ACTH(1-24)はペプチド研究所より購入した。Recombinant human IFN- α (2b)とrecombinant

human IFN- γ は生化学工業より、
human fibroblast IFN- β は
SIGMA社から購入した。Sheep anti-
human IFN- α polyclonal
antibody はフナコシ社より購入した。
Krebs-Ringer Phosphate (KRP)
buffer (pH 7.4) は、154 mM NaCl、
5.6 mM KCl、0.8 mM MgSO₄、2.2
mM CaCl₂、3.0 mM phosphate-Na
buffer、10 mM glucose の組成である。
Krebs-Ringer-HEPES (KRH) buffer
(pH 7.4) は、125 mM NaCl、4.8 mM
KCl、2.6 mM CaCl₂、1.2 mM
MgSO₄、25 mM HEPES、5.6 mM
glucose、0.5% 牛血清アルブミンの組成で
ある。

2) 牛副腎皮質細胞の単離および培養

牛副腎を逆行性に KRP buffer で 10 分間
還流し、赤血球を除去した後、皮質の束状層部
分をスライサーを用い薄切片とした。これを

KRP bufferで洗浄し、0.05%コラゲネー
ス、0.005%トリプシンインヒビターと0.5
%牛血清アルブミンを含むKRP bufferで
O₂存在下、37℃で7分間preincubationし
た。溶液を濾過し、再び切片を上記KRP
bufferで37℃、30分間incubationした。
溶液を濾過、遠心し沈殿物をKRP bufferで
2回洗浄し単離細胞を得た。この細胞を培養液
(Dulbecco's Modified Eagle
Medium (DMEM)とF-12 Nutrient
Mixture (Ham)(1:1)に10% fetal
bovine serum、0.3 μg/ml
amphotericin B、100 units/ml
penicillin、100 μg/ml
streptomycinを加えたもの)に懸濁し24
wells プレートに5 x 10⁵ cells/wellの
濃度でうえた。これを5% CO₂、95% air、
37℃の条件下で培養し、実験に用いた。

3) インターフェロン (IFNs) 処置

特別な場合を除き基本的に、副腎皮質細胞の

培養開始72時間後に、培養液をIFNsを含有及び非含有培養液に置換し、さらに24時間培養した。

4) コルチゾール産生及び定量

培養細胞をKRH bufferで1回洗浄し、刺激物質を含むKRH bufferを1 ml培養細胞に加え、37℃の条件下で1時間反応した。生成されたコルチゾールを硫酸蛍光法で蛍光定量した⁶⁾。反応液0.5 mlにジクロロメタン3 mlを加え激しく振盪後、2,500 rpmで2分間冷却遠心した。次に上層を注意深く吸引し、0.1 N水酸化ナトリウム0.5 mlを加え同様に振盪、遠心した。上層を注意深く吸引し、硫酸試薬（硫酸：エタノール（7：3））3 mlを加え激しく振盪後、冷却遠心した。上層を吸引した後、1時間室温に放置し、コルチゾールを蛍光光度計（650-10S；日立製）で測定した（励起波長470 nm、蛍光波長520 nm）。コルチゾール産生量をng/5 × 10⁵ cells/hrで表した。

5) cyclic AMP生成及び定量

皮質細胞を1時間刺激後、細胞を1 N過塩素酸 1 mlでホモジネートした。その溶液を10分間遠心し、上清を得た。上清を70% KOHで中和し、その溶液100 μ lにスクシニル化剤 100 μ l、イミダゾール緩衝液 800 μ l、 $[^{125}\text{I}]$ cyclic AMP 100 μ l、cyclic AMP抗血清 100 μ lを加え、4 $^{\circ}$ Cで48時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、B/F分離剤（活性炭原液 8 mlに精製水 28 mlを加えたもの）500 μ lを加え30分間氷水中に静置した。溶液500 μ lを取り精製水500 μ lを加え混和、5分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心し、放射能を測定した。放射能の測定にはaloka社製、ARC-1000ガンマカウンターを使用した。生成されたcyclic AMP量を $\text{pmol}/5 \times 10^5 \text{ cells/hr}$ であらわした。

6) 統計処理

統計計算は、SendecorとCochranら⁷⁾

の方法に従って行った。P < 0.05の時、有意差があるとした。

Ⅲ. 実験結果

1) 培養牛副腎皮質束状層細胞のコルチゾール産生に対するACTHの効果

初めに、ACTHの濃度変化による培養牛副腎皮質束状層細胞（96時間培養）のコルチゾール産生量に対する影響を調べた。コルチゾール産生は 10^{-11} MのACTHから認められ、濃度依存性に増大し、 10^{-8} MのACTHで最大（約 1,500 ng/5 x 10^5 cells/hr)の産生量になった（図1）。そこで実験には 10^{-8} MのACTHを用いた。

2) コルチゾール産生に対するIFNsの効果

ACTHによる牛副腎皮質細胞のコルチゾール産生に対するIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ の効果調べた。分離細胞を72時間培養後、各IFNsの存在、非存在下、さらに細胞を24時間

培養した。そのIFNs無処置細胞を 10^{-8} M ACTHで1時間刺激すると、大きくコルチゾール産生が増加した。一方、IFN- α (1,500と15,000 U/ml) 処置細胞ではACTHによるコルチゾール産生が強く抑制された。しかし、IFN- β 、IFN- γ 処置細胞においてはACTHによるコルチゾール産生は維持されていた。ACTHで刺激を受けていないコントロールの細胞において、IFNsはいずれもコルチゾール産生には影響しなかった(表1)。

3) ACTH刺激によるコルチゾール産生に対するIFN- α の阻害効果

図2に示したようにIFN- α はACTH (10^{-8} M)によるコルチゾール産生を濃度依存性に阻害した；IFN- α による阻害は300 U/mlから認められ、6,000 U/mlで56%、15,000 U/mlで約70%に達し、最大となった。

IFNs (6,000 U/ml)は時間に依存してACTH (10^{-8} M)によるコルチゾール産生を阻害した(図3)；コルチゾール産生阻害は、

IFN- α の細胞処置後約2時間から顕著に認められ、8時間後には約40%となり、24時間後に最大(56%阻害)となった。

また、IFN- α (6,000 U/ml) のコルチゾール産生阻害効果は、抗IFN- α 抗体の処理により打ち消(中和)された(図4)。

4) IFN- α のコルチゾール産生阻害効果の可逆性

分離副腎皮質細胞を24時間培養後、培養液中にIFN- α (6,000 U/ml)を加え、細胞を24時間培養した。その細胞からIFN- α を除き洗浄、さらに培養した。その洗浄された細胞は、洗浄24時間後からIFN- α のコルチゾール産生阻害が減少し始め、48時間後には、ほぼ完全に消失した(図5)。これは、IFN- α が、細胞に不可逆的なダメージを与えてACTHによるコルチゾール産生を抑制しているのではないことを示している。

5) IFN- α のコルチゾール産生阻害に対するACTHと外液Ca²⁺濃度の効果

IFN- α のコルチゾール産生阻害様式を検討するため、ACTHと細胞外Ca²⁺濃度変化のIFN- α 阻害効果に対する影響を調べた。図6Aに示したように、ACTHの濃度を増加(10⁻¹¹-10⁻⁶M)させても、IFN- α の阻害効果は、なんら影響されなかった。

ACTHのコルチゾール産生の増加には反応液のCa²⁺の存在が不可欠である^{8) 9)}。図6Bに示したように、反応液にCa²⁺が存在していない場合、ACTH(10⁻⁸M)によるコルチゾール産生は観察されなかった。この時、Ca²⁺が存在するとコルチゾール産生は大きく増加し、Ca²⁺濃度の増加(2.6-10.4 mM)に依存してコルチゾール産生も増加していった。しかし、この時、IFN- α の阻害効果は、Ca²⁺濃度の増加に関わらず、ほぼ一定(約55-61%)であった。以上の結果は、IFN- α のコルチゾール産生阻害は、ACTHや外液Ca²⁺とは競合していないことを示唆している。

6) ACTHによる細胞内cyclic AMP生成に対

するIFN- α の効果

副腎皮質細胞では、ACTHにより細胞内cyclic AMP生成が増加し、これと平行してコルチゾール産生が増加することが知られている¹⁰⁾。 10^{-8} MのACTHにより皮質細胞内で $12.5 \text{ pmol}/5 \times 10^5 \text{ cells/hr}$ のcyclic AMPが生成された。一方、ACTHによるcyclic AMP生成は、IFN- α (0-15,000 U/ml)処置細胞においても同じように認められた(図7)。

7) Dibutyryl cyclic AMP(dcAMP)、プレグネノロン刺激によるコルチゾール産生に対するIFN- α の効果

細胞膜透過性のcyclic AMP analogのdcAMPとコルチゾール前駆体のプレグネノロンを用い、それらのコルチゾール産生に対するIFN- α の影響を調べた。IFN- α (6,000 U/ml)はdcAMPによるコルチゾール産生をACTH刺激によるそれと同じ程度阻害した(48%)。しかし、プレグネノロン刺激によるコルチゾール

産生には全く影響しなかった (図8)。

IV. 考察

この研究は、牛副腎皮質細胞を recombinant human IFN- α -2b で比較的長時間 (2-24時間) 処理すると、ACTH刺激による細胞のコルチゾール産生が大きく抑制されることを示している。その IFN- α のコルチゾール産生阻害は時間 (2-24時間) と濃度 (300-30,000 U/ml) 依存性であった (表1、図1、2)。IFN- α は、細胞増殖、分化を抑制することが知られているので⁵⁾、IFN- α のコルチゾール産生阻害は、細胞の不可逆的なダメージによって生じると考えられるかもしれない。しかしこれは、IFN- α の阻害作用は可逆性であったこと (図5) やプレグネノロンによるコルチゾール産生はIFN- α で抑制されなかった (図8) ことより否定される。

一方、human fibroblast IFN- β (2,000と

15,000 U/ml)とrecombinant human IFN- γ (2,000と15,000 U/ml)はACTHによるコルチゾール産生には全く影響しなかった(表1)。これは、副腎皮質細胞におけるコルチゾール産生阻害効果がIFN- α に特異的であることを示している。しかし、IFN- α とIFN- β は同じ祖先の遺伝子であり、同じレセプターに作用し、同じ様な生物活性を表すことが報告されている^{11) 12)}ので、IFN- β もIFN- α と同じようにコルチゾール産生を阻害してもいいように思われる。それ故、IFN- α とIFN- β のコルチゾール産生における効果が異なっていたのは矛盾しているが、それに対して次のことがその理由にあげられる: 1) IFNsの生物活性は、種特異性であるので¹³⁾、human IFN- β は牛の細胞に作用できないのかもしれない; 2) IFN- α とIFN- β でレセプター結合後のシグナルトランスダクションのメカニズムが異なっているのかもしれない; 3) IFN- α とIFN- β でレセプターに対する親和性が異なるのかもしれない。

図9に示したように副腎皮質においてコルチゾー

ルは、コレステロールエステルから各ステップを経て合成される。まず最初にコレステロールエステルがコレステロールエステラーゼによって加水分解され、コレステロールが生成する。コレステロールはミトコンドリア内膜に移送され、そこに存在する側鎖切断酵素 (P450_{scc}) によってプレグネノロンに変換される。プレグネノロンはさらに、マイクロゾームの一連のP450酵素群によってデオキシコルチゾールに、そして再び最終的にミトコンドリアでコルチゾールに変えられる。ACTHによるコルチゾール産生には細胞内cyclic AMPの増加が不可欠である^{14) 15)}。ACTHが細胞膜に存在する受容体に結合するとGTP結合蛋白とアデニレートシクラーゼがカップルし、シクラーゼ活性が高まる。その結果、ATPからcyclic AMPの生成が増加し、cyclic AMP依存性プロテインキナーゼ (Aキナーゼ) が活性化される^{10) 14)}。Aキナーゼは、コレステロールエステラーゼのリン酸化に働き、これを活性化し、コルチゾール産生を高めている (図9)^{16) 17)}。IFN- α は、ACTHによるコルチゾール産生を阻害

するのと同じ濃度範囲 (300-20,000 U/ml) で ACTH による cyclic AMP 生成増加には全く影響しなかった (図8)。また、コルチゾール合成の中間物質であるプレグネノロンによるコルチゾール産生は IFN- α によって全く影響されなかった。しかし、細胞膜透過性の cyclic AMP analog の dcAMP によるコルチゾール産生は大きく IFN- α により抑制された (図8)。以上のことから、IFN- α が ACTH によるコルチゾール産生を阻害したのは、IFN- α がコレステロールエステラーゼ活性に抑制的に働いた結果であると考えられる。

IFN- α は、その受容体に結合してセカンドメッセンジャーである cyclic AMP やジアシルグリセロールの生成、そして A キナーゼや Ca^{2+} / ホスホリピッド依存性プロテインキナーゼの活性を介して遺伝子に影響し、生理活性をあらわす事が報告されている¹⁵⁾。また、この研究で IFN- α の阻害効果発現に比較的長い時間を必要としたことから、IFN- α のコルチゾール産生阻害はタンパク質や遺伝子合成阻害に基づいていると考えられ

る。すなわち、IFN- α がコルチゾール合成酵素であるコレステロールエステラーゼの合成、或いはその遺伝子の発現を抑制し、結果としてコレステロールエステラーゼ活性を低下させているのかもしれない。

最近、サイトカインが内分泌系、神経系機能を調節していることが報告され始めている。例えば、IL-1は*in vivo*、*in vitro*でラット視床下部からcorticotropic releasing factor (CRF)の遊離をおこし¹⁹⁾ ²⁰⁾ ²¹⁾、ACTHの分泌を増加させるし²²⁾、また直接、下垂体前葉に働いてACTHを分泌させる²³⁾。IL-6もまた、ラット下垂体前葉からのACTHと成長ホルモン分泌を強める²⁴⁾。この研究において、IFN- α が牛副腎皮質細胞からのACTHによるコルチゾール分泌を抑制したことは、サイトカインの1つであるIFNsも内分泌系組織の機能を調節している可能性を示唆している。IFNsはウイルス感染ばかりでなく多くの疾患（全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患、ザルコー

シス等) で産生される²⁵⁾。これは、IFNsがこれらの病態形成に深く関与していることをうかがわせている。この時、IFN- α が副腎皮質のコルチゾール産生を阻害し、コルチゾールによる免疫機能抑制を解除する方向に働いていると考え、非常に合目的的であるように思われる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました檜本威志教授、また、数々の御配慮、御協力を賜りました整形外科講座阿部正隆教授に深謝致します。また、本研究に御協力、御助言頂きました、医学部薬理学講座の皆様にも厚く御礼申し上げます。さらに、副腎採取に御協力頂きました岩手畜産流通センターの方々に感謝いたします。

文 献

1)Simojo, M., Imai, Y., Nakajima, K., et al.:
Interleukin-2 enhances the viability of
primary cultured rat neocortical neurons.
Neurosci. Lett. 151, 170-173, 1993.

2)Awatsuji, H., Fukukawa, Y., Nakajima,
M., et al.: Interleukin-2 as a neurotrophic
factor for supporting the survival of
neurons cultured from various regions of
fetal rat brain. J. Neurosci. Res. 35,
305-311, 1993.

3)O'connell, N.A., Kumar, A.,
Chatzipanteli, K., et al.: Interleukin-1
regulates corticosterone secretion from the
rat adrenal gland through a catecholamine-
dependent and prostaglandin E₂-
independent mechanism. Endocrinology

135, 460-467, 1994.

4) Isaacs, A. and Lindenmann, J.: The interferon. Proc. Soc., Ser. B, Biol. Sc. 147, 258-267, 1958.

5) 吉田 逸朗、東 匡伸 : インターフェロン概説。
薬局 16、769-776、1990。

6) Silber, R.H., Busch, R.D. and Oslapas, R.: Practical procedure for estimation of corticosterone or hydrocortisone. Clin. Chem., 4. 278-285, 1958.

7) Sendecor, G.W. and Cochran, W.G.: Stastical Methods. Iowa State University Press, Ames, IA, 1967.

8) Birmingham, M.K., Elliott, F.H. and Valero, P.H.L.: The need for the presence

of calcium for the stimulation *in vitro* of rat adrenal glands by adrenocorticotrophic hormone, *Endocrinology* 53, 687-689, 1953.

9) Cheitlin, R., Buckley, D.I. and Ramachandran, J.: The role of extracellular calcium in corticotropin-stimulated steroidogenesis. *J. Biochem.* 260, 5323-5327, 1985.

10) Wong, M., O'Brien, D. and Schimmer, B.P.: The roles of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of adrenocortical functions: analysis using DNA-mediated gene transfer. *Biochem. Cell Biol.* 64, 1066-1071, 1986.

11) Aguet, M.: High-affinity binding of ¹²⁵I-labeled mouse interferon to a specific surface receptor. *Nature* 284,

459-461, 1980.

12) Fernando, B.J.: Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 6934-6938, 1990.

13) 小林 茂保 (著) : インターフェロン。講談社、東京、1978。

14) Rae, P.A., Gutmann, N.S., Tsao, J., et al.: Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH) - sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 1896-1900, 1979.

15) Bristow, A.F., Glead, C. and Fauchere, J.: Effects of ACTH (corticotropin) analogues on steroidogenesis and cyclic

AMP in rat adrenocortical cells.

J. Biochem. 186, 899-603, 1980.

16) Boyd, G.S. and Gorban, A. M.S.: Protein phosphorylation and steroidogenesis. In "Molecular aspects of cellular regulation: recently discovered systems of enzyme regulation by reversible phosphorylation", vol. 1, ed. by Cohen, P., pp. 95-133, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, 1980.

17) Enyeart, J.J., Mlinar, B. and Enyeart, J.A.: Adrenocorticotrophic hormone and cAMP inhibit noninactivating K^+ current in adrenocortical cells by an A-kinase-independent mechanism requiring ATP hydrolysis. J. Gen. Physiol., 251-264, 1996.

18) Reich, N.C. and Pfeffer, L.M.:

Evidence for involvement of protein kinase C in the cellular response to interferon α . Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 8761-8765, 1990.

19) Winter, J.S.D., Gow, K.W., Perry, Y.S., et al.: A stimulatory effect of interleukin-1 on adrenocortical cortisol secretion mediated by prostaglandins. Endocrinology 127, 1904-1909, 1990.

20) Paola, G.A., Giuliano, N., Neri, A.S., et al.: Interleukin-1 β enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. Endocrinology 129, 53-57, 1991.

21) Berkenbosch, F., Joep, V.O., Adriana, D.R., et al.: Corticotropin-releasing factor producing neurons in rat activated by

Interleukin-1. *Science* 238, 524-526, 1987.

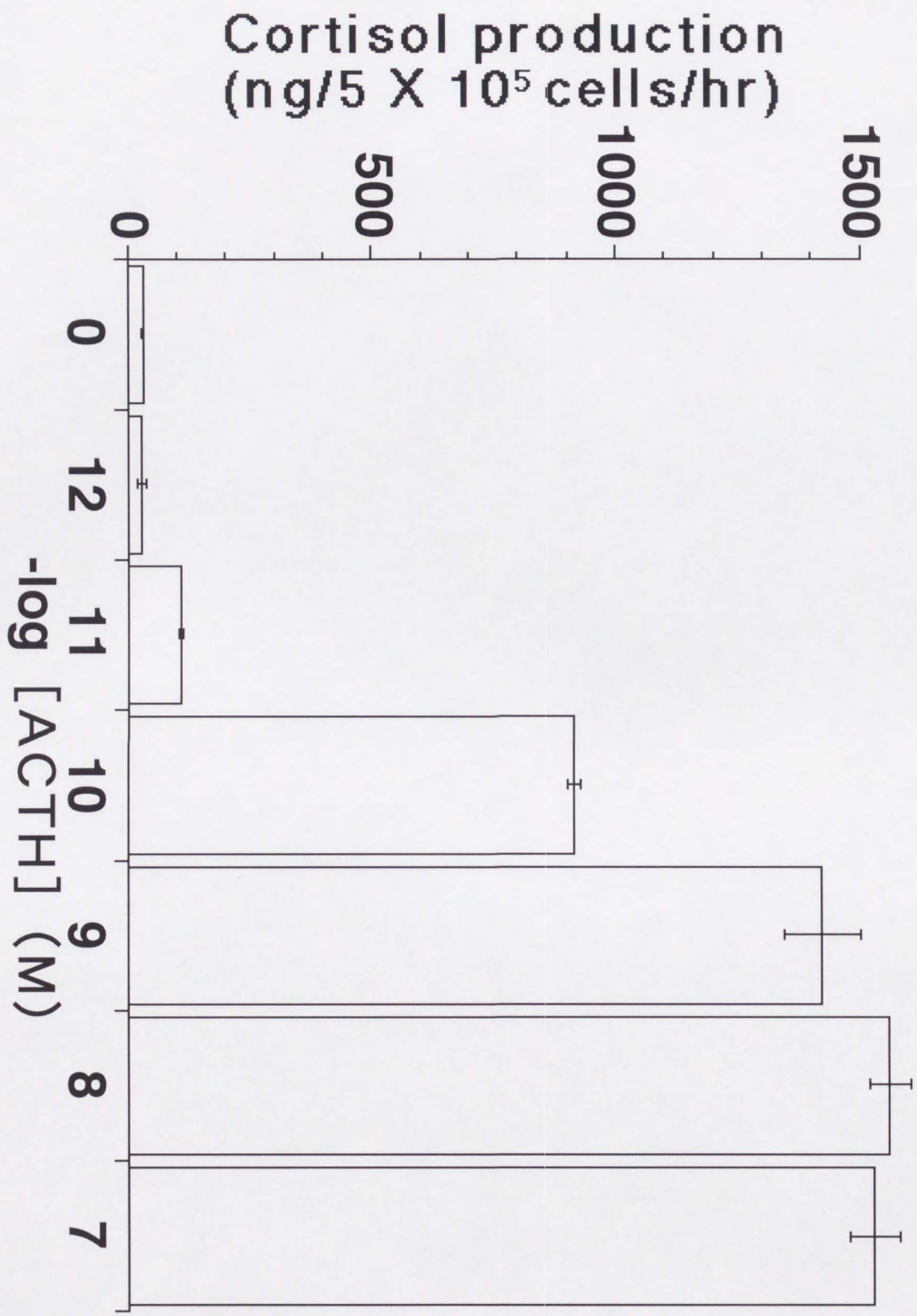
22) Uehara, A, Gottschall P.E., Dahl, R.R., et al.: Interleukin-1 stimulates ACTH release by an indirect action which requires endogenous corticotropin releasing factor. *Endocrinology* 121, 1580-1582, 1987.

23) Edward W.B., Judith E.B., John W.H., et al.: Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 238, 519-521, 1987.

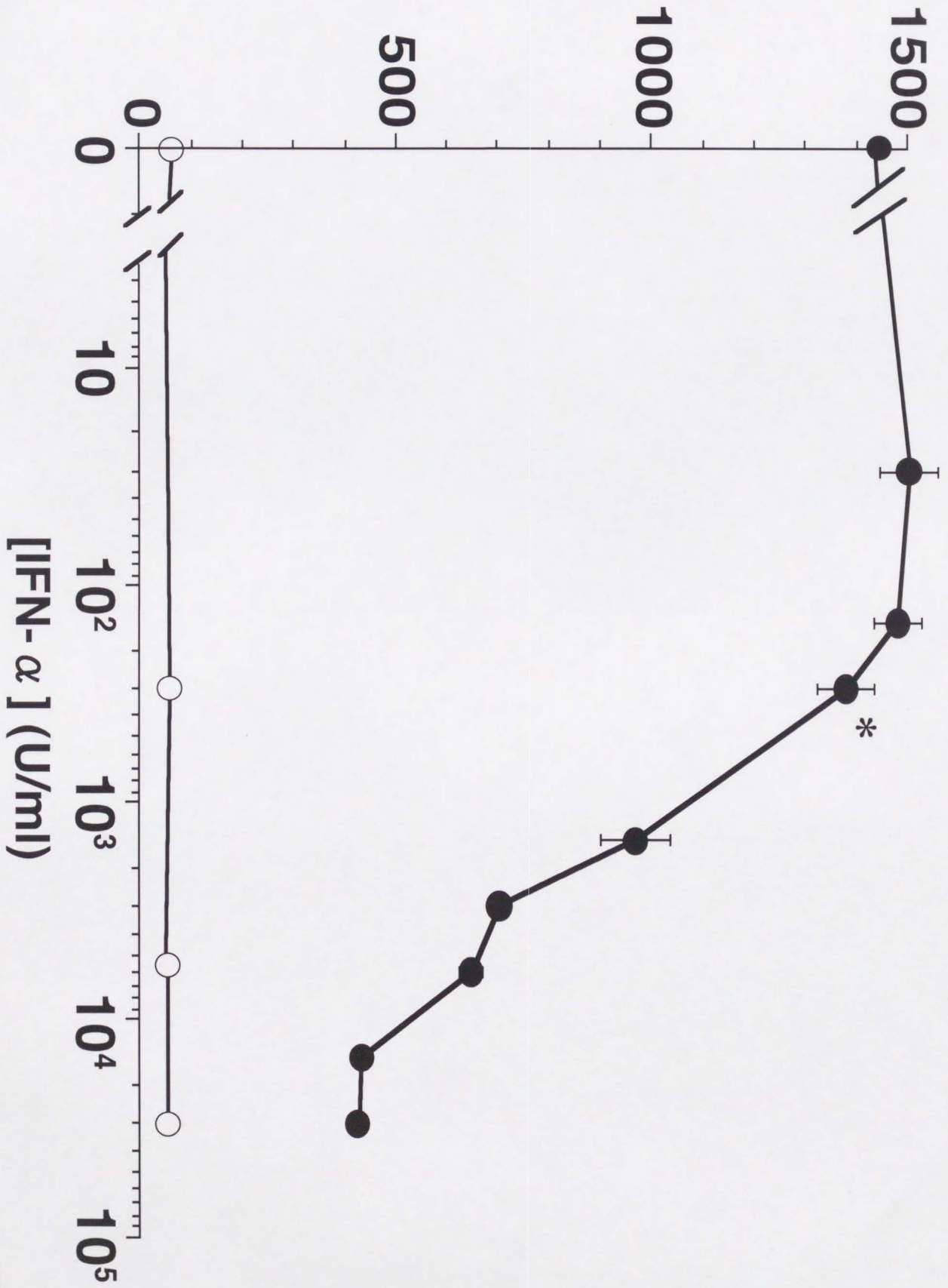
24) Shimizu, H., Ken-ichi O., Sato, N., et al.: Increase in serum interleukin-6, plasma ACTH and serum cortisol levels after systemic interferon- α administration. *Endocri. J.* 42, 551-556, 1995.

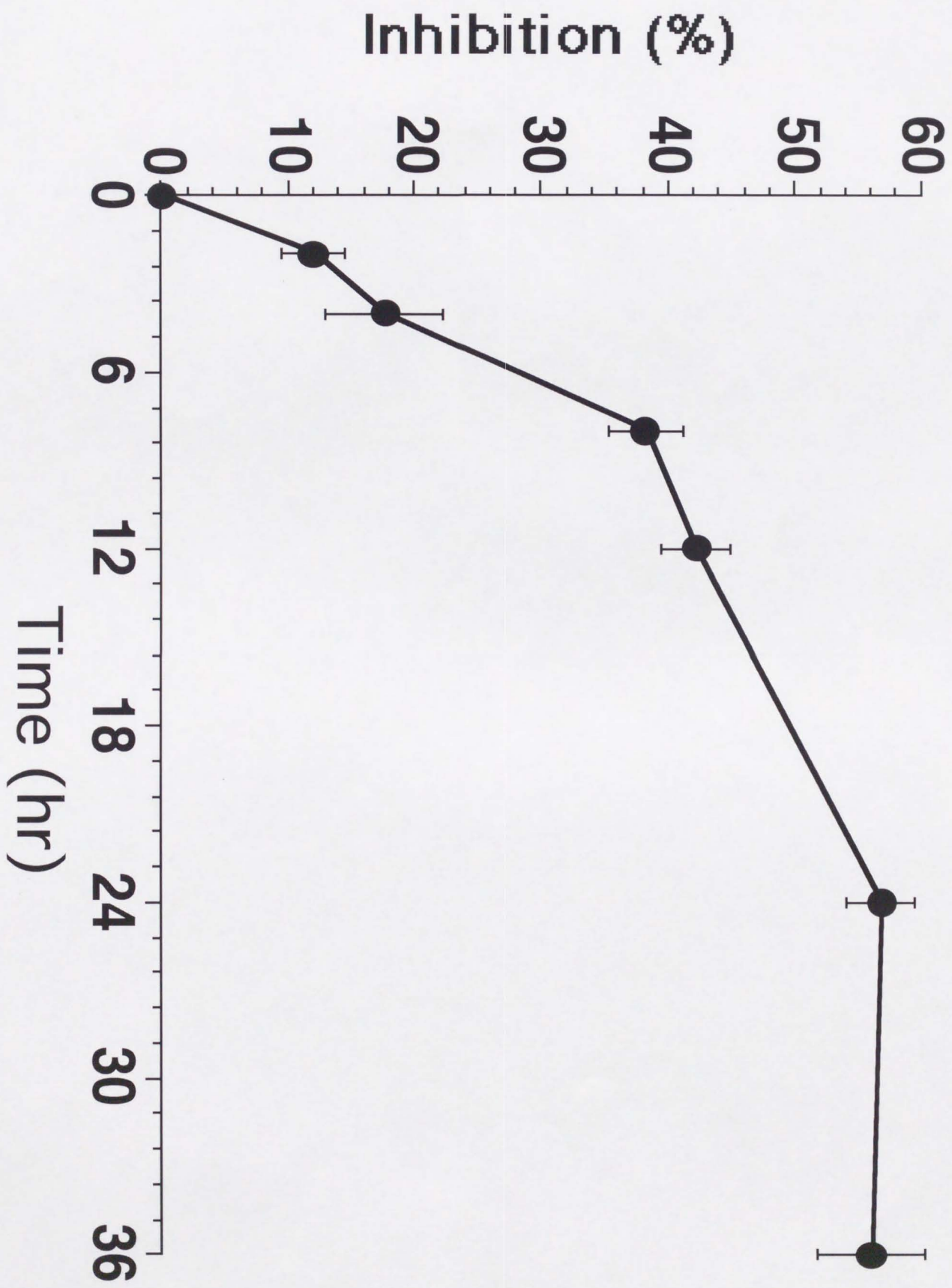
25) 今西 二郎 : インターフェロンはどのような物

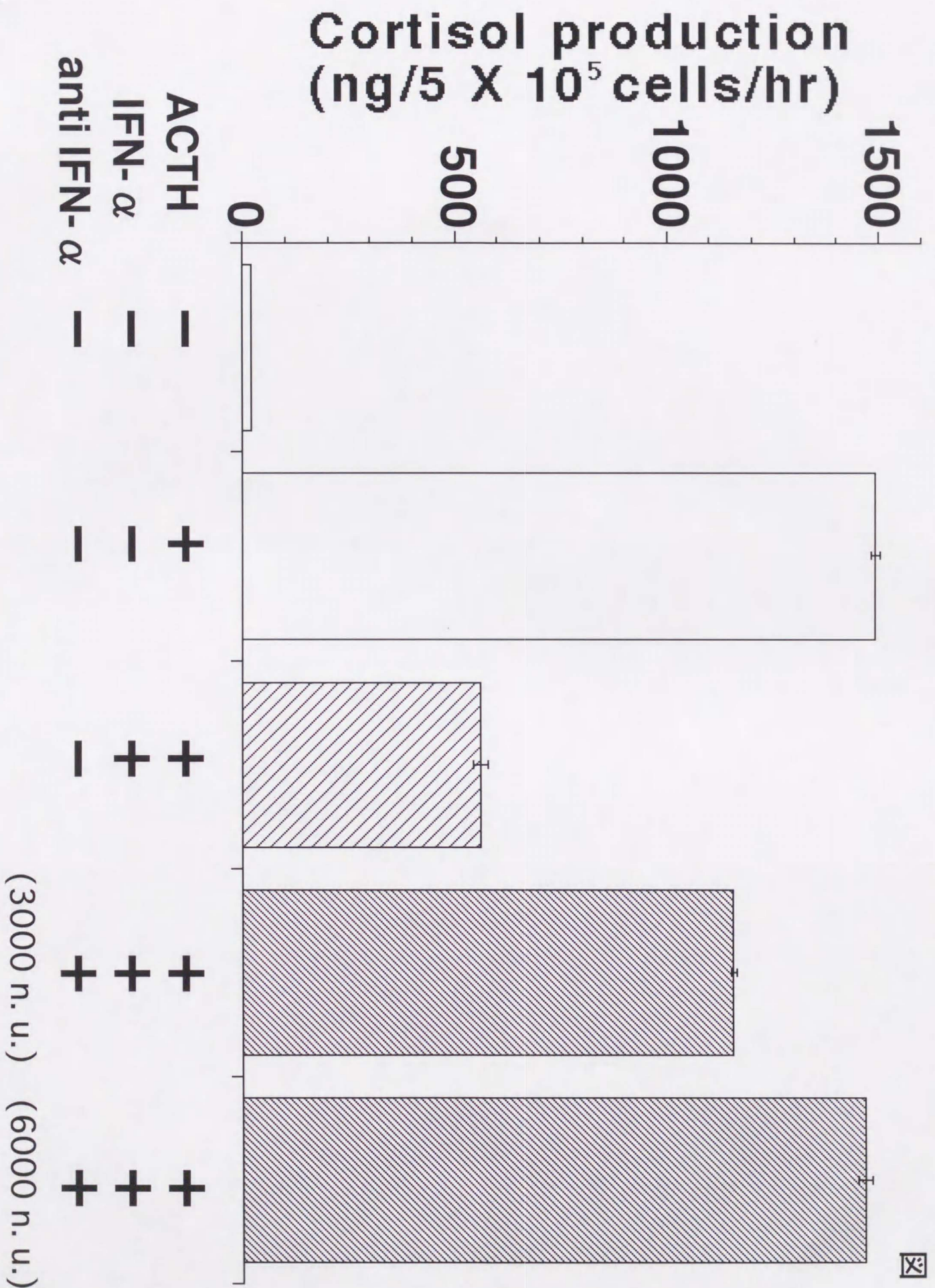
質か。臨床医 19、1454-1458、1993。



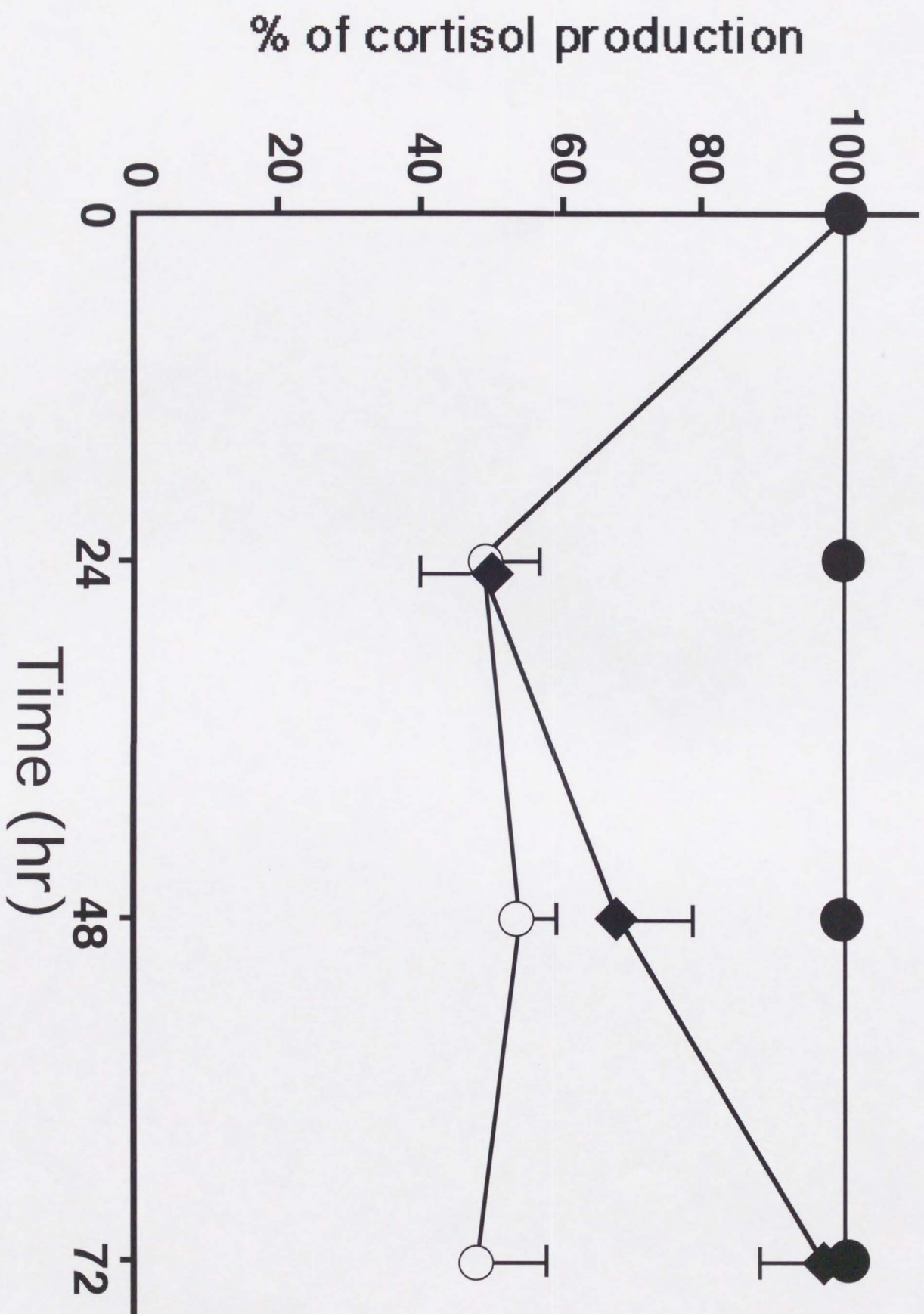
Cortisol production (ng/5 X 10⁵ cells/hr)



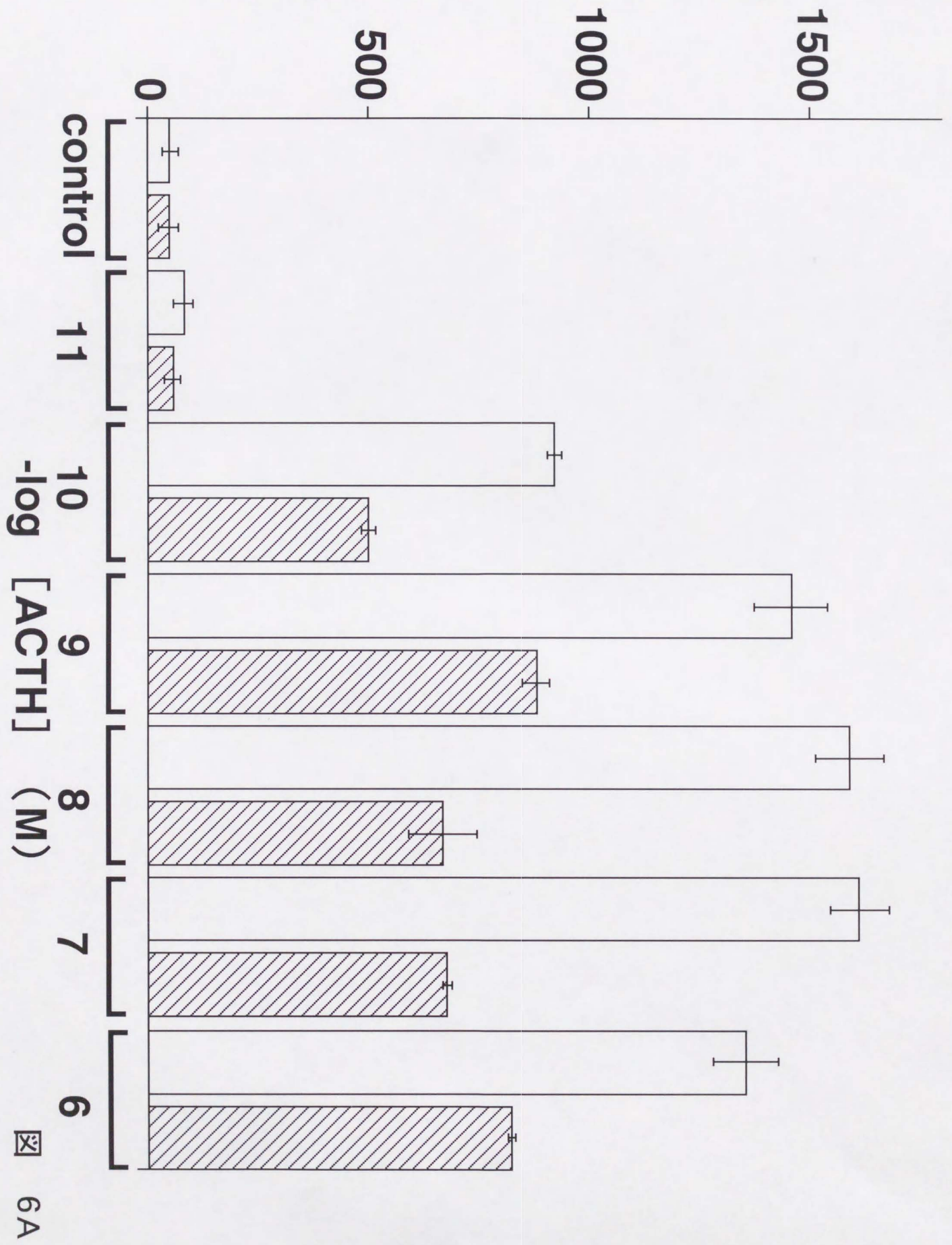


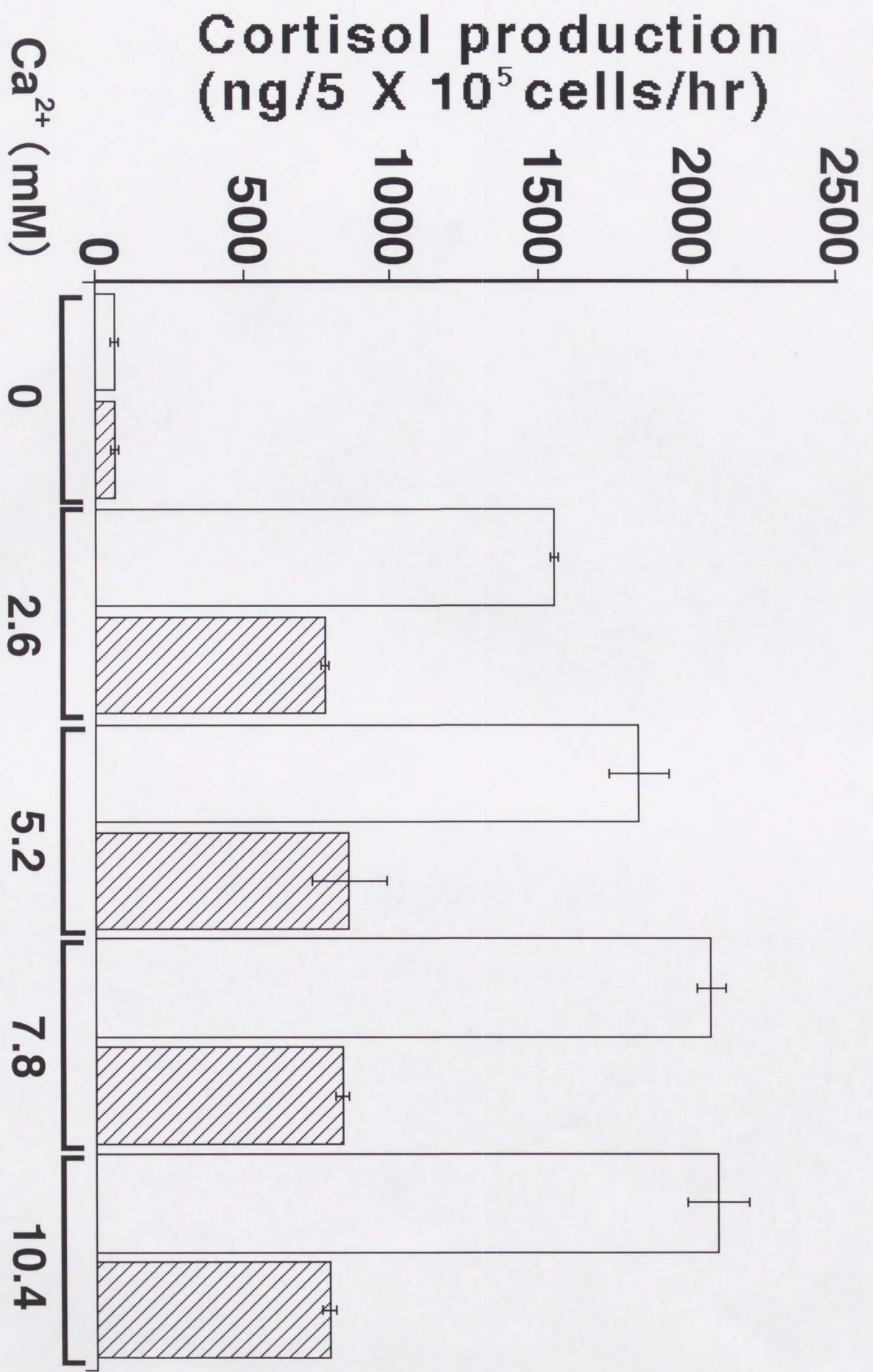


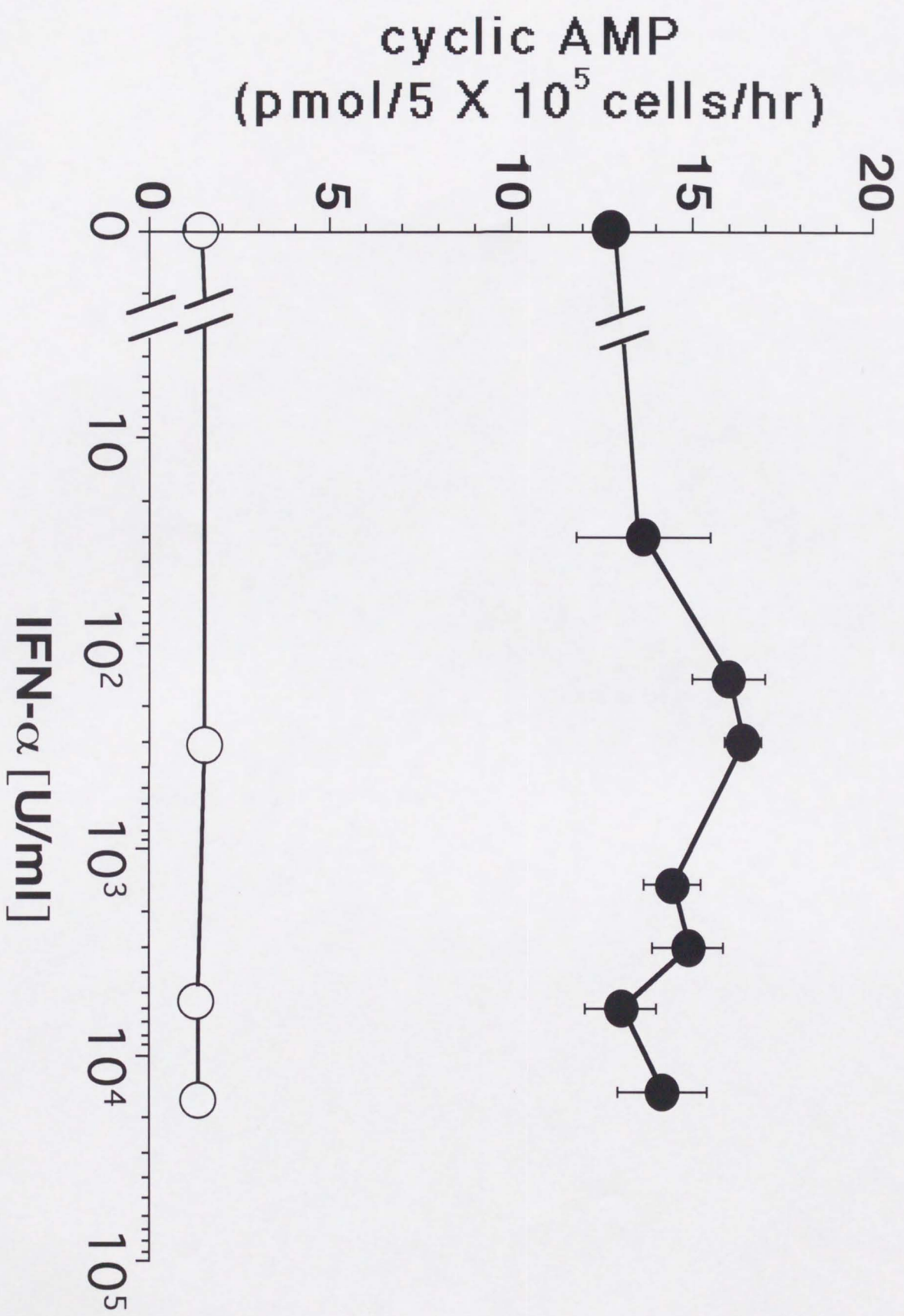
4

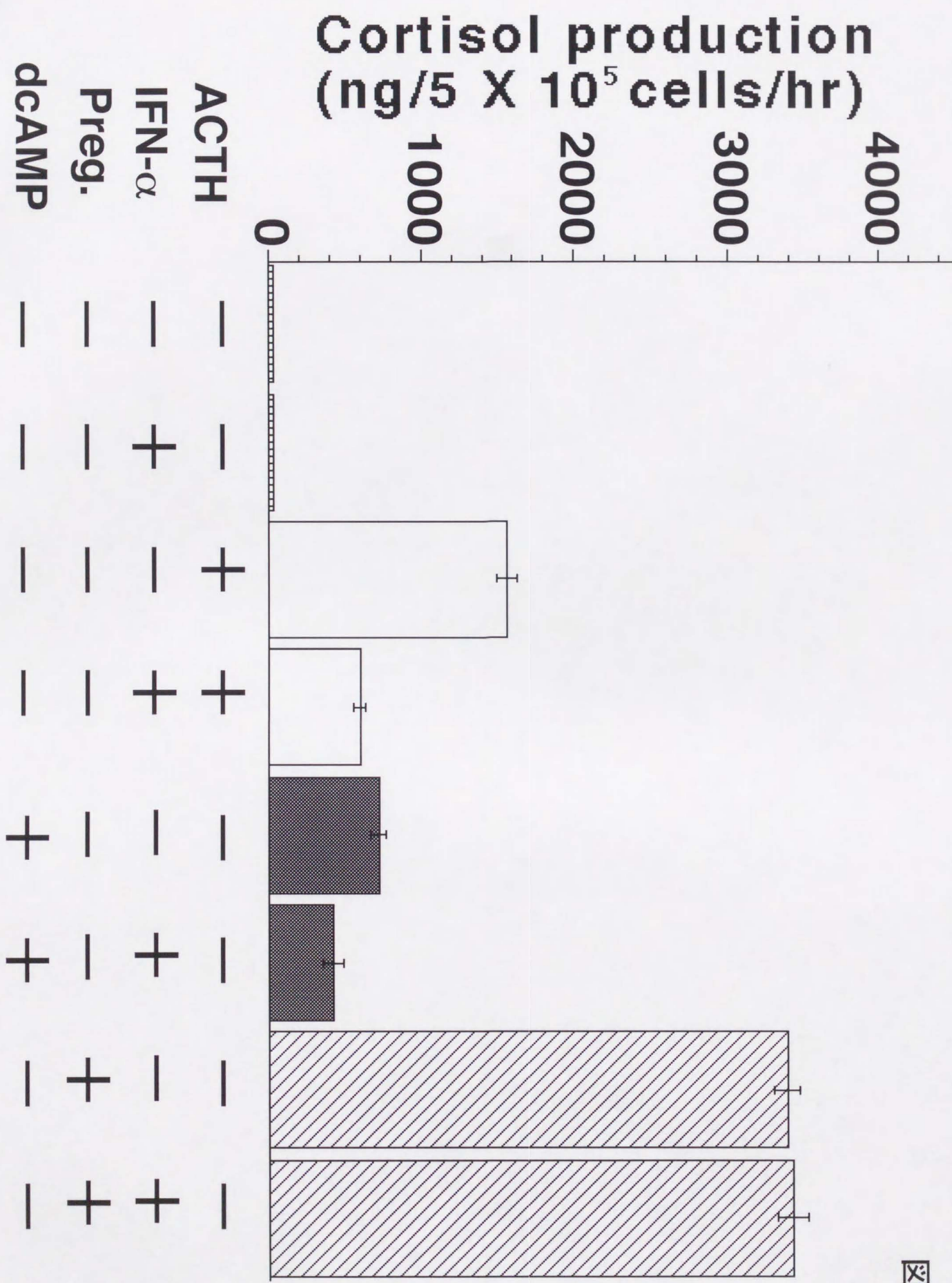


Cortisol production (ng/5 X 10⁵ cells/hr)









⊗

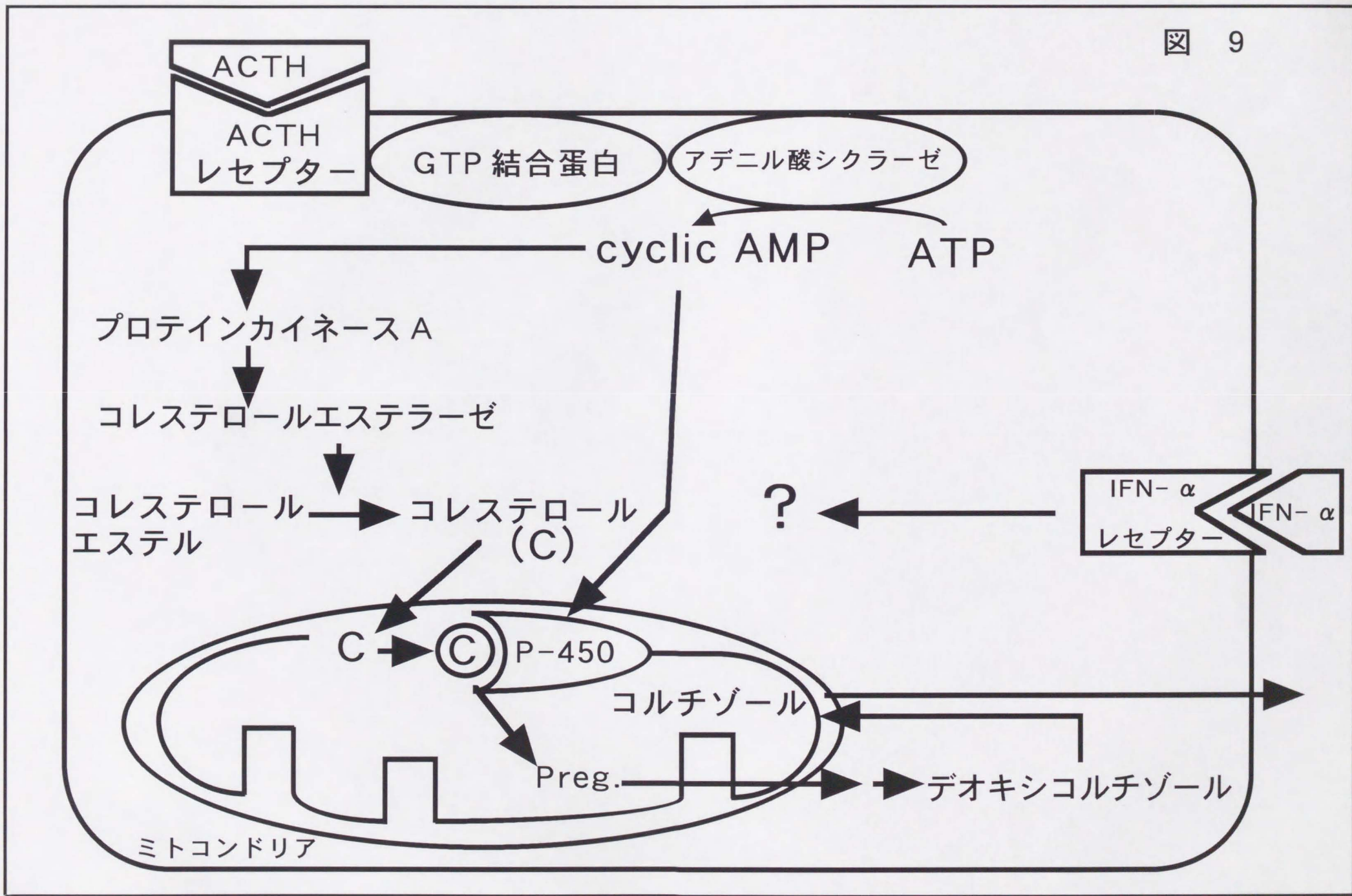


表 1. 培養牛副腎皮質細胞のコルチゾール産生
に対するインターフェロンの効果

IFNs [U/ml]	Cortisol production [ng/ 5x10 ⁵ cells/hr]	
	Control	ACTH
None	21 ± 5	1448 ± 72
IFN- α	1500	28 ± 10
	15000	29 ± 7
IFN- β	2000	19 ± 6
	15000	24 ± 5
IFN- γ	2000	26 ± 9
	15000	25 ± 8

分離した牛副腎皮質細胞 (5 x 10⁵ cells/well) を 72 時間培養し、IFN- α (1,500 と 15,000 U/ml)、IFN- β (2,000 と 15,000 U/ml)、IFN- γ (2,000 と 15,000 U/ml) 存在、非存在下さらに 24 時間培養した。それら細胞を 10⁻⁸ M の ACTH の存在、非存在下 1 時間反応した。産生されたコルチゾールを「実験方法」で記載したように定量した。Values are means \pm S.D. from four experiments.

図 表

図1 副腎皮質細胞のコルチゾール産生に対するACTHの濃度変化の影響

分離した牛副腎皮質束状層細胞を(5×10^5 cells/well)96時間培養後、 $0-10^{-7}$ Mの各濃度のACTHで 37°C 、1時間刺激した。産生されたコルチゾールを「実験方法」で記載したように定量した。Values are means \pm S.D. from four experiments.

図2 副腎皮質細胞のコルチゾール産生に対するIFN- α の濃度効果

分離した牛副腎皮質細胞を(5×10^5 cells/well)72時間培養後、 $0-30,000$ U/mlの各濃度のIFN- α で24時間培養した。それら細胞を 10^{-8} MのACTHの存在(●)、非存在(○)下、1時間反応した。産生されたコルチゾールを「実験方法」で記載したように定量した。Values are means \pm S.D. from four experiments.* $P < 0.05$; ACTHによる細胞のコル

チゾール産生と比較。

図3 副腎皮質細胞のコルチゾール産生に対する IFN- α の処理時間の影響

分離した牛副腎皮質細胞(5×10^5 cells/well)を48時間培養し、IFN- α を加え、さらに0-36時間培養した。その細胞を 10^{-8} MのACTHの存在、非存在下1時間反応した。産生されたコルチゾールを「実験方法」で記載したように定量した。コルチゾール産生量は各値からコントロール値 (ACTHで刺激されなかった細胞のコルチゾール産生量) が減ぜられ、阻害率 (%) として表されている。Values are means \pm S.D. from four experiments.

図4 ACTHによるコルチゾール産生のIFN- α 阻 害に対する抗IFN- α 抗体の効果

分離した牛副腎皮質細胞(5×10^5 cells/well)を72時間培養し、6,000 U/mlのIFN- α 、3,000、6,000 n. u.(IFN- α の効果を無効にする抗血清の中和単位)

のIFN- α 抗体の存在、非存在下さらに24時間培養した。それらの細胞を 10^{-8} MのACTHの存在、非存在下1時間反応した。産生されたコルチゾールを「実験方法」で記載したように定量した。Values are means \pm S.D. from four experiments.

図5 ACTHによるコルチゾール産生のIFN- α 阻害の可逆性

分離した牛副腎皮質細胞(5×10^5 cells/well)を24時間培養後、6,000 U/mlのIFN- α の存在(○、◆)、非存在下(●)24時間培養した。それらの細胞を培養液で洗浄し、6,000 U/mlのIFN- α 存在(○)、非存在下(◆、●)で更に48時間培養した。時間は、IFN- α 存在後から示している。また、コルチゾール産生量はIFN- α 無処置細胞をACTHで刺激した値からACTHで刺激していない値を減じ、それを100%として表されている。産生されたコルチゾールを「実験方法」で記載したように定量した。Values are means \pm S.D. from four experiment.

図6 コルチゾール産生のIFN- α 阻害に対する

ACTHとCa²⁺濃度の効果

分離した牛副腎皮質細胞(5 x 10⁵ cells/well)を72時間培養後、6,000 U/mlのIFN- α の存在、非存在下さらに24時間培養した。(A)それら細胞を0-10⁻⁶ MのACTHで1時間反応した。(B)それらの細胞を0-10.4 mMのCa²⁺存在下、10⁻⁸ MのACTHで1時間反応した。産生されたコルチゾールを「実験方法」で記載したように定量した。Values are means \pm S.D. from four experiment.

図7 副腎皮質細胞のcyclic AMP産生に対するIFN- α の効果

分離した牛副腎皮質細胞(5 x 10⁵ cells/well)を72時間培養後、各濃度のIFN- α (0-20,000 U/ml)の存在下、さらに24時間培養した。それらの細胞を10⁻⁸ MのACTHの存在(●)、非存在(○)下、1時間反応した。産生されたcyclic AMPを「実験方法」で記載したように定量した。cyclic AMP生成量は、pmol/5 x 10⁵ cells/hrで表された。Values are means \pm S.D. from four experiments.

図8 ACTH、dibutyryl cyclic AMP、プレグネノロンによるコルチゾール産生に対するIFN- α の効果

分離した牛副腎皮質細胞(5×10^5 cells/well)を72時間培養後、6,000 U/mlのIFN- α の存在、非存在下さらに24時間培養した。それらの細胞を 10^{-8} M ACTH、2 mM dcAMP、10 μ M プレグネノロン(Preg.)の存在、非存在下1時間反応した。産生されたコルチゾールを「実験方法」で記載したように定量した。Values are means \pm S.D. from four experiment.

図9 コルチゾール産生経路

ACTH刺激によるコルチゾール産生経路を示している。C;コレステロール、P-450;チトクロームp-450scc、preg.;プレグネノロン

Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak