

Latamoxef, aztreonam, C-reactive protein のヒト培養 血管内皮細胞におよぼす影響

浅 田 高 広

関西医科大学第一内科*

(平成4年1月16日受付・平成4年6月15日受理)

抗生物質である latamoxef (LMOX), aztreonam (AZT) (終濃度 500, 1,000, 3,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と感染症や炎症時に増加する急性期蛋白の一種である C-reactive protein (CRP) (終濃度 0.5, 5.0 mg/dl) のヒト血管内皮細胞におよぼす影響を, 内皮細胞の prostacyclin (PGI_2) 産生量および cyclic AMP (cAMP) 濃度, 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を測定することにより検討した。内皮細胞はヒト臍帯静脈より分離培養し, confluent を形成したものをを用いた。 PGI_2 産生量は培養上清液からその安定代謝産物の 6 Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ として radioimmunoassay (RIA) 法にて測定し, LMOX, AZT の存在下では control と比較して有意な変化はなかったが, CRP 5.0 mg/dl の存在下で有意に増加した。cAMP 濃度も培養上清液を用いて RIA 法にて測定したが, LMOX, AZT, CRP のいずれも影響をおよぼさなかった。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は内皮細胞浮遊液に Ca^{2+} 感受性蛍光色素である fura 2/AM を加えて histamine で刺激して蛍光測定した。LMOX, AZT の存在下では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は control と比較して有意な変化はなかったが, CRP 5.0 mg/dl の存在下では histamine で刺激する前後とも有意に増加し, 刺激前後での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 差も有意に増加した。また, 内皮細胞浮遊液を Ca^{2+} free とした場合の CRP 5.0 mg/dl 存在下による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は, histamine の刺激前後とも control と差は認められず, histamine の代わりに CRP 5.0 mg/dl による直接刺激では Ca^{2+} 存在下で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は増加したが, Ca^{2+} free solution の状態では増加しなかった。このことから CRP が内皮細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させるには細胞外 Ca^{2+} が必須であると考えられた。以上の結果から, LMOX, AZT は血管内皮細胞の PGI_2 産生には影響をおよぼさないが, CRP は cAMP 濃度を減少させることなく細胞外の Ca^{2+} の細胞内への流入, あるいはこれに伴う細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} の遊離により内皮細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させて PGI_2 の生産を促進すると考えられた。

Key words: LMOX, AZT, CRP, 内皮細胞, Ca^{2+}

抗生物質の血小板機能におよぼす影響に関しては今まで数多く報告されており, 筆者¹⁾も *in vitro* において latamoxef (LMOX), aztreonam (AZT) の高濃度で血小板 ADP 凝集を抑制することを確かめている。また感染症時に増加する急性期蛋白の一種である C-reactive protein (CRP) についても, 血小板の ADP および collagen 凝集を抑制する成績を得ており, 感染症時には抗生物質とともに CRP も血小板機能を抑制して出血傾向を惹起することが考えられる。

一方血小板機能は血管内皮細胞からも影響を受けており, 強力な血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を持つ prostacyclin (PGI_2) が内皮細胞から分泌され, 血小板凝

集抑制に大きく関与している²⁻⁶⁾。

本研究では抗生物質と CRP の血管内における血小板への影響を血管内皮細胞の側から検討するために, LMOX, AZT, CRP の存在下において内皮細胞が産生する PGI_2 と, その産生を調節している内皮細胞内 cyclic AMP (cAMP) 濃度および内皮細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を測定した。

I. 材料および方法

1) 血管内皮細胞の培養法

Jaffe ら⁷⁾の方法に準じて, ヒト臍帯静脈から 0.25% trypsin (Gibco) 処理により内皮細胞を分離し, 37°C, 5% CO_2 にて 25 $\text{cm}^2/\text{tissue culture flask}$

* 大阪府守口市文園町1番地

(Corning) 上に培養した。培養液は, Medium 199 (M 199, Hazelton) に, 15% fetal bovine serum (FBS, Bocknek) と, endothelial cell growth supplement (ECGS, Biomedical Product Division) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, penicillin (Sigma) 25 U/ml, streptomycin (Sigma) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, amphotericin B (Flow Laboratories) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, heparin (Nobo Industry A/S) を加えたものを使用した。

[Ca²⁺]_i 測定時には培養開始 5~7 日後の confluent 形成した細胞を用い, PGI₂ 産生量と cAMP 濃度の測定時には, confluent 形成した細胞を 0.25% trypsin にて剥離し, 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma) を加えた Buffer A (129 mM NaCl, 8.9 mM NaHCO₃, 0.8 mM KH₂PO₄, 0.8 mM MgCl₂, 5.6 mM Dextrose, 10 mM HEPES, 1.8 mM CaCl₂, pH 7.4) にて 2 回洗浄した後, 24 multiwell plate (Becton Dickinson) に分注 (500 $\mu\text{l}/\text{well}$) し, 36~48 時間後に再び confluent 形成した細胞 (5.0 $\times$ 10⁴ cells/well) を用いた。

細胞活性は, trypan blue を用いて検討した。

2) PGI₂ 産生量の測定

confluent 形成した細胞 (5.0 $\times$ 10⁴ cells/well) を 1% BSA を加えた Buffer A にて 2 回洗浄したのちその buffer を各 well に分注し, control, LMOX (Shionogi), AZT (Squibb), CRP (Sigma) を別々に加えて 500 $\mu\text{l}/\text{well}$ とし, 37°C, 5% CO₂ にて incubate を開始した。30 分後培養上清を取り出し, 酢酸エチルにて抽出後 PGI₂ の安定代謝産物である 6 Keto-PGF_{1 α} を [³H] 6 Keto-PGF_{1 α} assay system (Amersham) を用いて radioimmunoassay (RIA) 法にて測定した。

3) cAMP 濃度の測定

PGI₂ 産生量の測定法と同じように 30 分 incubate したのち 5% trichloroacetic acid (TCA) にて反応を止め, 凍結保存して翌日自然解凍したのち rubber spatula にて細胞を破壊して剥離し, スピッツに採取後 1,700 g で 10 分間遠心したあと上清をガラスのスピッツにとり, 水飽和エーテルにて抽出後 1,700 g で 5 分間遠心し, 上清を検体として cAMP [¹²⁵I] assay system (dual range) (Amersham) を用いて RIA 法にて測定した。

4) [Ca²⁺]_i の測定

confluent 形成した細胞 (10⁶ cells/well) を 0.25% trypsin にて剥離し, 1% BSA を加えた Buffer A にて 2 回洗浄したのち内皮細胞浮遊液に Ca²⁺ 感受性蛍光色素である fura 2/AM (終濃度 5 μM) を添加して

37°C で 45 分間 incubate した。その後再び同じ buffer で洗浄したのち浮遊液 (5.0 $\times$ 10⁴ cells/cuvette) に control, LMOX, AZT, CRP を別々に加えて 37°C で 5 分間 incubate し, histamine (Sigma, 終濃度 1.3 $\times$ 10⁻⁴ M) で刺激したのち 100 秒間の [Ca²⁺]_i を日立分光蛍光光度計 F-2000 を用いて 2 波長励起にて蛍光測定した (励起波長は 340 nm および 380 nm, 蛍光波長は 510 nm)^{8,9)}。なお LMOX, AZT, CRP はいずれも今回使用した濃度では自発蛍光を示さなかった。

また, CRP 5.0 mg/dl については内皮細胞浮遊液を CaCl₂ 無添加の Buffer A に 1 mM ethyleneglycol-tetraacetic acid (EGTA) を加えて Ca²⁺ free にした場合と, histamine の代わりに CRP 5.0 mg/dl により直接刺激した場合も検討した。

以上いずれの実験においても control には生理食塩水を用い, LMOX, AZT は終濃度 500, 1,000, 3,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CRP は終濃度 0.5, 5.0 mg/dl にて検討した。

II. 結 果

1) PGI₂ (6 Keto-PGF_{1 α}) 産生量 (Fig. 1)

LMOX, AZT の存在下では control と比較して有意な変化は見られなかったが, CRP 5.0 mg/dl の存在下では 1.10 $\pm$ 0.35 から 2.61 $\pm$ 0.53 ng/ml へと有意に増加した。

2) cAMP 濃度 (Fig. 2)

LMOX, AZT, CRP のいずれの濃度においても有意な変化は見られなかった。

3) 細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度

Table 1 には histamine による刺激前後およびその増加した [Ca²⁺]_i を示している。LMOX, AZT の存在下では control と比較して有意な変化は見られなかったが, CRP 5.0 mg/dl の存在下では histamine で刺激する前後とも control と比較して [Ca²⁺]_i が有意に増加しており, 刺激前後での [Ca²⁺]_i 差も有意に増加した (Table 1, Fig. 3)。

また, 内皮細胞浮遊液を Ca²⁺ free とした場合の CRP 5.0 mg/dl 存在下による [Ca²⁺]_i は, Ca²⁺ 存在下の場合と異なり histamine の刺激前後とも control と差は認められず, CRP 5.0 mg/dl による直接刺激では Ca²⁺ 存在下で [Ca²⁺]_i は増加したが, Ca²⁺ free solution の状態では増加しなかった (Fig. 4)。

III. 考 察

血管内皮細胞はすべての血管の内腔面を一層に被覆し, 長さ 15~50 μm , 幅 10~15 μm の多角形あるいは類円形をした均一な扁平細胞で, その生物学的特性

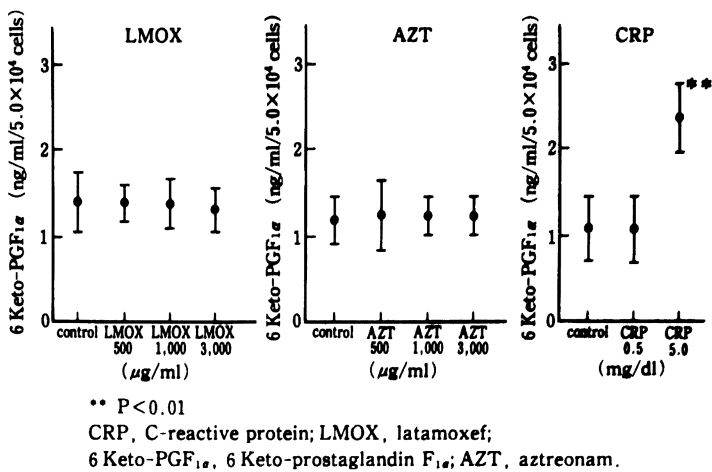


Fig. 1. Effect of LMOX, AZT, and CRP on 6 Keto-PGF_{1α} levels in cultured human vascular endothelial cells (Mean ± SD, n = 10).

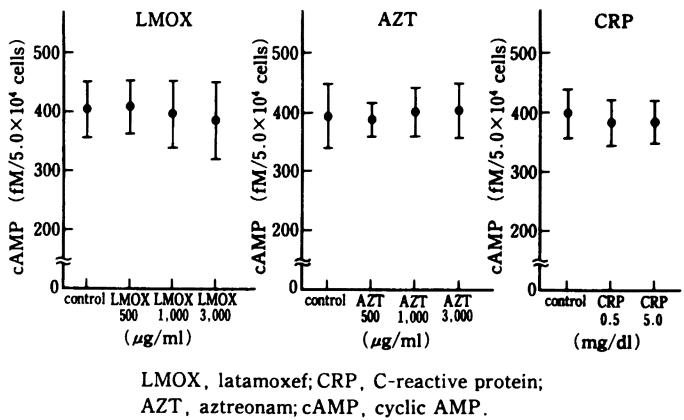


Fig. 2. Effect of LMOX, AZT, and CRP on cAMP levels in cultured human vascular endothelial cells (Mean ± SD, n = 15).

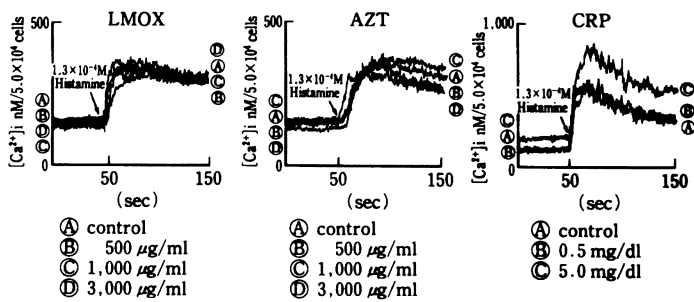


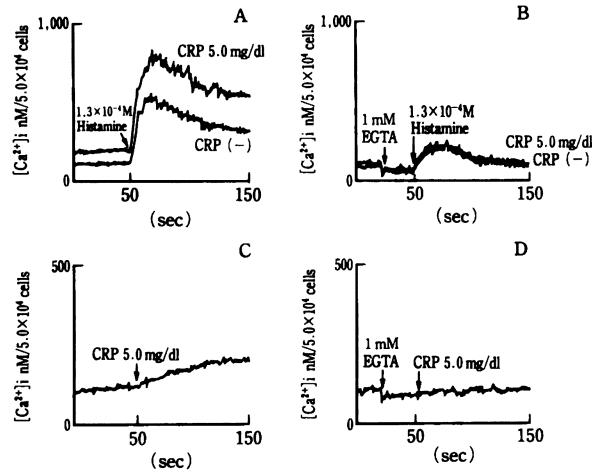
Fig. 3. Effect of LMOX, AZT, and CRP on [Ca²⁺]_i in cultured human vascular endothelial cells.

Table 1. Effect of LMOX, AZT and CRP on $[Ca^{2+}]_i$ in cultured human vascular endothelial cells (nM/5.0×10⁴ cells, Mean±SD, n=5)

	㊶ Resting condition	㊷ Stimulated condition by 1.3×10 ⁻⁴ M histamine	㊷-㊶
LMOX			
control	157.3±17.4	311.2±32.9	154.0±25.9
500 μg/ml	152.0±31.4	339.2±90.8	187.3±77.2
1,000 μg/ml	156.1±36.6	352.3±99.1	196.2±78.6
3,000 μg/ml	158.4±37.9	328.3±88.7	169.9±76.2
AZT			
control	135.5±34.7	332.5±95.9	196.9±65.5
500 μg/ml	144.8±26.2	344.6±48.7	199.8±31.5
1,000 μg/ml	141.0±38.5	346.3±78.9	205.2±52.1
3,000 μg/ml	144.2±25.7	330.9±76.8	186.7±61.9
CRP			
control	120.6±27.0	402.8±134.6	282.1±146.2
0.5 mg/dl	121.5±29.3	423.7±185.7	302.2±178.6
5.0 mg/dl	202.7±48.1**	715.9±167.0**	513.2±154.5*

LMOX, latamoxef; AZT, aztreonam; CRP, C-reactive protein; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular free Ca^{2+} concentration.

* P<0.05, ** P<0.01



(A) (C) 1.8 mM $CaCl_2$ containing solution

(B) (D) Calcium-free solution

CRP, C-reactive protein;

EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid;

$[Ca^{2+}]_i$, intracellular free Ca^{2+} concentration.

Fig. 4. Effect of CRP on $[Ca^{2+}]_i$ in cultured human vascular endothelial cells.

としては1) 血漿成分の選択的透過生, 2) 抗血栓および血栓性作用, 3) 細胞外基質の産生, 4) 血管新生, 5) 血管トーンズの調節などが認められている。

これらの作用のうち血栓, 抗血栓性作用については健康な生体内では抗血栓作用優位で血管内で血栓が生じないように恒常性が保たれているが, なんらかの異

常によりこの恒常性が保てなくなると血栓傾向や逆に出血傾向になる。抗血栓性に関しては、細胞表面に存在するヘパラン硫酸のアンチトロンビンIIIとの結合によるトロンビンの不活化¹⁰⁻¹²⁾、同じく細胞表面に存在するトロンボモジュリンのトロンビンとの結合によるトロンビンの不活化およびその複合体によるプロテインCの活性化を介した血液凝固第Va, VIIIa 因子の不活化¹³⁻¹⁷⁾などの抗凝固作用、プラスミノーゲンアクチベーターの産生による線溶亢進作用¹⁸⁾、PGI₂産生による抗血小板作用²⁻⁴⁾などにより調節されている。

PGI₂は強力な血小板凝集抑制作用とともに血管拡張作用も有しており、その産生はヒスタミン、ブラジキニン、トロンビン、ADP、インターロイキン1, 2等により促進され、これらの物質は内皮細胞に特異的な受容体を持っているものと考えられている^{9,19-23)}。また、心臓の収縮によって作られる脈圧や組織の虚血状態の発生によっても産生が刺激されるといわれている²⁴⁾。

生体が感染症や炎症状態にある場合には多くのケミカルメディエーターが産生され、これらが流血中の血小板や血管内皮細胞にも影響して抗血栓性の恒常性に異変を生じる可能性がある。著者¹⁾は *in vitro* において感染症時に投与される抗生物質が高濃度で血小板凝集を抑制することを報告してきたが急性期蛋白の一種であるCRPにも *in vitro* において血小板凝集抑制作用があり、その強さは抗生物質より強いことを確認した。

このようなCRPやLMOX, AZTの血小板への直接的な作用とは別に、血管内皮細胞を介しての間接的な血小板への作用をPGI₂の産生量を指標として検討したところ、LMOXとAZTは3,000 µg/mlという臨床的には得られないほどの高濃度でもPGI₂産生量に影響をおよぼさなかったが、CRPは5.0 mg/dlという臨床的に得られる濃度でPGI₂産生量を有意に増加させた。

PGI₂産生の機序として最終的には[Ca²⁺]_iが増加することによりホスホリパーゼを活性化しPGI₂産生が促進されるが、cAMPはなんらかの機序でその細胞内Ca²⁺の働きを阻害するといわれており、その機序の一つとしてcAMPが内皮細胞内free Ca²⁺のCa²⁺貯蔵部位への取り込みや細胞外へのくみ出しを促して[Ca²⁺]_iを減少させると考えられている²⁵⁻²⁷⁾。したがって内皮細胞内のcAMP濃度が減少すると[Ca²⁺]_iが増加してPGI₂産生が促進されることになるが、LMOX, AZTは内皮細胞内cAMP濃度、

[Ca²⁺]_iともに影響をおよぼさなかった。CRPはcAMP濃度には影響をおよぼさなかったものの[Ca²⁺]_iを増加させ、histamine刺激による[Ca²⁺]_iの増加も促進させた。この[Ca²⁺]_i増加作用はCa²⁺ free solutionにおいては消失したことからCRPが内皮細胞の[Ca²⁺]_iを増加させるには細胞外Ca²⁺が必須であると考えられる。

内皮細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺の遊離を阻止した場合、Ca ionophore A 23187 (A 23187) 等で刺激してもPGI₂産生量は著減し、その基礎産生量までも抑制したことより内皮細胞のPGI₂産生は細胞内Ca²⁺貯蔵部位から動員されるCa²⁺に大きく依存するとされているが、細胞外Ca²⁺をfreeにしてA 23187等で刺激した場合にはPGI₂産生量の増加は著明に抑制され、PGI₂産生亢進作用の発現には細胞外Ca²⁺が不可欠と考えられている²⁸⁻³⁰⁾。しかしA 23187の場合は細胞外Ca²⁺をfreeにしても軽度内皮細胞の[Ca²⁺]_iを増加させることから、細胞外のCa²⁺の細胞内への流入とは無関係にCa²⁺貯蔵部位からCa²⁺を遊離させる作用も有するとされている³¹⁾。Histamineに関しては今までの報告⁹⁾や今回の実験(Fig. 4 B) からA 23187と同じ作用が考えられるが、CRPにはFig. 4 Dに示すように細胞外Ca²⁺がなければ[Ca²⁺]_iはほとんど上昇せず、そのような作用は見られないと思われる。

以上の結果および諸報告から、LMOX, AZTは血管内皮細胞のPGI₂産生には影響をおよぼさないが、CRPはcAMP濃度を減少させることなく細胞外のCa²⁺の細胞内への流入、あるいはこれに伴う細胞内Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺の遊離により内皮細胞の[Ca²⁺]_iを増加させてPGI₂の産生を促進すると考えられる。その際細胞膜のCa²⁺チャンネルをCRPが刺激することによる機序などが考えられるが現在のところ詳細な機序は不明である。内皮細胞のCa²⁺チャンネルに関しては牛毛細血管内皮細胞において2種類のチャンネルが存在するとの報告³¹⁾や、ブラジキニン刺激による検討³²⁾が報告されているが、内皮細胞の細胞膜を介するCa²⁺の流入および流出の動態に関しては今後の詳細な検討が必要と思われる。

一方、CRP存在下におけるhistamine刺激による[Ca²⁺]_i増加の促進機序としては、細胞膜のhistamine receptor⁹⁾へのCRPのなんらかの影響も考えられるが詳細は不明である。なおhistamineの自発蛍光はほとんど見られず、今回の実験には影響がなかったと思われる。

その他cAMPを介さない系としてインターロイキ

ン1等が $[Ca^{2+}]_i$ を変化させることなく PGI_2 産生を増大させた報告³³⁾がみられる。また、豊田²⁷⁾は内皮細胞内の cGMP も PGI_2 産生を抑制することを示し、Ca 拮抗薬の diltiazem (DTZ) が phosphodiesterase の阻害剤である 1-methyl-3-isobutylxanthine (MIX) による内皮細胞内の cAMP の増量には影響せず cGMP の増量を抑制したことから、DTZ の PGI_2 産生亢進作用に cGMP が関与している可能性を示唆した。さらに cGMP の増減は内皮細胞においては $[Ca^{2+}]_i$ に変化をもたらさず、DTZ は $[Ca^{2+}]_i$ に変動を伴わずに PGI_2 産生を亢進するとの報告がある²⁹⁾。しかし cGMP に関してはまだ不明な点も多く今回は検討しなかった。

感染症や炎症時の生体内では産生された CRP は、直接血小板に作用するとともに内皮細胞からの PGI_2 産生を促進することにより血小板の凝集を抑制する方向に働くと考えられるが、感染症時には CRP の上昇とともに血小板の血管内皮下組織に対する粘着反応に重要な役割をはたしている von willebrand 因子も増加するという報告³⁴⁾もあり、血栓性、抗血栓性の両方に CRP が関与している可能性も考えられる。

本論文の要旨は第 37 回日本化学療法学会西日本支部総会 (1989 年)、第 39 回日本化学療法学会総会 (1991 年) において発表した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究に際しご指導を賜りました第一内科学教室、安永幸二郎教授に深く感謝の意を表すとともに終始研究に直接御指導、御助言を頂きました間瀬勲史講師に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 浅田高広: Latamoxef, aztreonam, C-reactive protein の血小板凝集能におよぼす影響. *Chemotherapy* 40: 763~770, 1992
- 2) Moncada S, Bunting R J, Vane J R: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663~665, 1976
- 3) Moncada S, Higgs E A, Vane J R: Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin X), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* I: 18~21, 1977
- 4) Johnson R A, et al: The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins* 12: 915~929, 1976
- 5) Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane J R: Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac

arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* 12: 897~913, 1976

- 6) Raz A, Isakson P C, Minkes M S, Needleman P: Characterization of a novel metabolic pathway of arachidonate in coronary arteries which generates a potent endogenous coronary vasodilator. *J Biol Chem* 252: 1123~1126, 1977
- 7) Jaffe E A, Nachman R L, Beckler C G, Minick R C: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 52: 2745~2756, 1973
- 8) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y: A new generation of Ca^{2+} -indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440~3450, 1985
- 9) Rotrosen D, Gallin J I: Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces f-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J Cell Biol* 103: 2379~2387, 1986
- 10) Shimada K, Ozawa T: Modulation of glycosaminoglycan production and antithrombin III binding by cultured aortic endothelial cells treated with 4-methylumbelliferyl- β -D-xyloside. *Arteriosclerosis* 7: 627~636, 1987
- 11) Marcum J A, Rosenberg R D: Anticoagulant active heparin-like molecules from vascular tissue. *Biochemistry* 23: 1730~1737, 1984
- 12) Stern D, Nawroth P, Marcum J A et. al.: Interaction of antithrombin III with bovine aortic segments. Role of heparin in binding and enhanced anticoagulant activity. *J Clin Invest* 75: 272~279, 1985
- 13) Maruyama I, Salem H H, Ishii H, Majerus P W: Human thrombomodulin is not an efficient inhibitor of the procoagulant activity of thrombin. *J Clin Invest* 75: 987~991, 1985
- 14) Esmon N L, Owen W G, Esmon C T: Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 257: 859~864, 1982
- 15) Esmon C T, Esmon N L, Harris K W: Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 257: 7944~7947, 1982
- 16) Walker F J, Sexton P W, Esmon C T: The inhibition of blood coagulation by activated protein C through the selective inactivation of activated factor V. *Biophys Biochim Acta* 571: 333~342, 1979
- 17) Marlar R A, Kleiss A J, Griffin J H: Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood* 59: 1067~1072, 1982

- 18) Matsubara F, Sueishi K, Ishii Y, Tanaka K: Release of plasminogen activator from isolated dog heart. *Thrombos Haemostas* 53: 126~129, 1985
- 19) Baenziger N L, Fogerty F J, Mertz L F, Cher-nuta L F: Regulation of histamine-mediated prostacyclin synthesis in cultured human vascular endothelial cells. *Cell* 24: 915~923, 1981
- 20) Weksler B B, Marcus A J, Jaffe E A: Synthesis of prostaglandin I_2 (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3922~3926, 1977
- 21) Van Coevorden A, Boeynaems J M: Physiological concentrations of ADP stimulate the release of prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Prostaglandins* 27: 615~626, 1984
- 22) Rossi V, Breviario F, Ghezzi P, Dejana E, Mantovani A: Prostacyclin synthesis induced in vascular cells by interleukin-1. *Science* 229: 174~176, 1985
- 23) Hall E R, Papp A C, Seifert W E Jr, Wu K K: Stimulation of endothelial cell prostacyclin formation by interleukin-2. *Lymphokine Res* 5: 87~96, 1986
- 24) Frangos J A, Eskin S G, McIntire L V, Ives C L: Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227: 1477~1479, 1985
- 25) Hopkins N K, Gorman R R: Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J Clin Invest* 67: 540~546, 1981
- 26) Brotherton A F A, Hoak J C: Role of Ca^{2+} and cyclic AMP in the regulation of the production of prostacyclin by the vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 495~499, 1982
- 27) 豊田武夫: ヒト培養血管内皮細胞の PGI_2 産生遊離機構における Ca^{2+} , calmodulin 及び cyclic nucleotides の役割. Ca 拮抗薬の PGI_2 産生亢進機序. 京府医大誌 95: 205~222, 1986
- 28) 中川雅夫, 豊田武夫: 血管内皮細胞の PGI_2 産生遊離調節機構. 血液と脈管 18: 1~12, 1987
- 29) 白井 馨, 他: ヒト培養血管内皮細胞の PGI_2 産生遊離機構における Ca^{2+} と電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの役割. 血管 11: 127~137, 1988
- 30) 高松 一, 他: ヒト培養血管内皮細胞の PGI_2 産生遊離機構における細胞内外の Ca^{2+} の関与について. 動脈硬化 14: 221~227, 1986
- 31) Bossu J L, Elhmdani A, Feltz A: Voltage-dependent calcium entry in confluent bovine capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 299: 239~242, 1992
- 32) Schilling W P, Rajan L, Strobl-Jager E: Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 264: 12838~12848, 1989
- 33) 服部良之, 笠井貴久男, 平岩正樹, 江本達志, 曾 振武, 下田新一: 血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生機構に関する検討. 医学のあゆみ 150: 175~176, 1989
- 34) Pottinger B E, Read R C, Paleolog E M, Higgins P G, Pearson J D: Von Willebrand factor is an acute phasereactant in man. *Thrombos Res* 53: 387~394, 1989

Effect of latamoxef, aztreonam and C-reactive protein on cultured human vascular endothelial cells

Takahiro Asada

First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University,
1 Fumizonochō, Moriguchi 570, Japan

The effect of the antibiotics latamoxef (LMOX) and aztreonam (AZT) (final concentrations: 500, 1,000 and 3,000 $\mu\text{g/ml}$) and C-reactive protein (CRP), one of the acute proteins in infection and inflammation (final concentrations: 0.5 and 5.0 mg/dl) on cultured human vascular endothelial cells was investigated measuring the production of prostacyclin (PGI_2) and concentration of cyclic AMP (cAMP) in endothelial cells, and the concentration of intracellular free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Endothelial cells were isolated from the human umbilical vein and cultured to obtain confluent cells. Production of PGI_2 was assessed by measuring its stable metabolite 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ in the culture supernatant by a radioimmunoassay (RIA) technique. Although there was no significant difference in this parameter in the presence of LMOX or AZT compared with the control, production significantly increased in the presence of CRP (5.0 mg/dl). cAMP concentration in the culture supernatant was measured by an RIA technique; LMOX, AZT and CRP had no effect on cAMP concentration. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured fluorometrically by adding the Ca^{2+} -sensitive fluorescein fura 2/AM to a suspension of endothelial cells and stimulating them with histamine. When compared with the control, there was no significant difference in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the presence of either LMOX or AZT. On the other hand, there was a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the presence of CRP (5.0 mg/dl), both before and after histamine stimulation. When Ca^{2+} was eliminated from the suspension of endothelial cells, there was no significant difference in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the presence of CRP (5.0 mg/dl) before or after histamine stimulation, when compared with the control. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased in the presence of extracellular Ca^{2+} in response to direct stimulation with CRP (5.0 mg/dl) instead of histamine. However, it did not increase in a Ca^{2+} -free solution. This suggested that extracellular Ca^{2+} is essential for CRP to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in endothelial cells. Based on these results, it appears that LMOX or AZT have no effect on the production of PGI_2 in vascular endothelial cells, but that CRP enhanced PGI_2 production through the increase in an influx of Ca^{2+} into endothelial cells without reducing the concentration of cAMP, liberating Ca^{2+} from its intracellular storage site, thereby increasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$.