Cytochrome-b の波形異常を認めた

慢性肉芽腫症 (CGD) の一男児例

小林 一郎・有賀 正*・上野 範博*・石坂 明人*

高橋 豊*・渡辺 徹*・崎山 幸雄*・松本 脩三*

坂根 郁夫**・高山 大**・高橋 和彦**・小山次郎**

由利 賢次・福島 直樹

**Spectrally abnormal cytochrome-b in a male
patient with chronic granulomatous disease**

Ichiro Kobayashi, Tadashi Ariga*, Norihiro Ueno*, Akihito Ishizaka*,
Yutaka Takahashi*, Toru Watanabe*, Yukio Sakiyama*, Shuzo Matsumoto*,
Fumio Sakane**, Hajime Takayama**, Kazuhiko Takahashi**, Jiro Koyama**,
Kenji Yuri and Naoki Fukushima

Department of Pediatrics, Oji General Hospital. Tomakomai Department of
Pediatrics, Hokkaido University, School of Medicine** Department of Hygenic
Chemistry, Hokkaido University, Faculty of Pharmaceutical Science*

【Summary】

Cytochrome-b and flavin adenine dinucleotide (FAD) were measured in neutrophils from a male patient and his family with the X-linked form of Chronic Granulomatous Disease (CGD). The membrane fraction of the patient's neutrophils contained 93 pmol/mg protein of FAD (control 102 ± 20 , mean $\pm$ sd), and 32 pmol/mg protein of cytochrome-b (control 88 ± 20 , mean $\pm$ sd). In the spectrophotometric study, the maximal absorbance peak of cytochrome-b was at 421 nm, as that from control was at 427 nm. Cytochrome-b in neutrophils from his mother and a sister, who were thought to be carriers, had their maximal absorbance peak at 425 nm. These findings suggest that the spectral abnormality of cytochrome-b contribute to the pathogenesis of CGD in this case.

Key words: granulomatous disease. chronic,
NADPH-dependent O_2^- -generating oxidase,
cytochrome-b,
spectral abnormality

【概 要】

伴性劣性遺伝形式をとる慢性肉芽腫症の一男児例およびその家族の末梢血好中球より、その膜分画にある cytochrome-b および flavin adenine dinucleotide (FAD) を測定した。FAD は対照 102 ± 20 pmol/mg protein, 患児 93 pmol/mg protein, 母親 84 pmol/mg protein, 長女 102 pmol/mg protein, 次女 96 pmol/mg protein であった。cytochrome-b は対照 88 ± 20 pmol/mg protein, 患児 32 pmol/mg protein, 母親 57 pmol/mg protein, 長女 98 pmol/mg protein, 次女 81 pmol/mg protein であった。dithionite を用いた還元一酸化差スペクトルの γ -band は、対照 427 nm, 患児 421 nm と、患児で短波長側に偏位していた。保因者と考えられた母親、次女の γ -band は 425 nm に存在していた。

以上より本症例の病態に、cytochrome-b の構造的ないし量的異常が関与している可能性が示唆された。

慢性肉芽腫症 (以下 CGD と略す) は好中球の活性酸素産生障害に基づく殺菌能の異常により生ずるとされている。その機序はいまだ不明の点が多いが、cytochrome-b (以下 Cyt-b と略す) の欠損例の報告以来、NADPH 依存 O_2^- 産生酵素の component と考えられている Cyt-b や flavoprotein の異常が注目されている^{1,2)}。

今回われわれは伴性劣性遺伝形式をとる CGD の一男児例とその家族の末梢血好中球膜分画の Cyt-b および flavin adenine dinucleotide (以下 FAD と略す) について検討し、本症例の病態に Cyt-b の構造異常が関与している可能性を示唆する結果を得たので報告する。

I. 症 例

1歳男児。生後5ヵ月で頸部膿瘍罹患後、口内炎、中耳炎、皮膚膿瘍を反復している。家族歴では母親に頸部リンパ節切除、次女に頸部リンパ節結核の既往がある。また、母親の第2人および従兄2人が幼児期に死亡しているが詳細は不明である (図1)。

好中球機能検査では、細菌貪食能は正常、殺菌能は著明に低下していた。lipopolysaccharide (LPS) 刺激による nitroblue tetrazolium (NBT) slide test においては、対照 89%, 患児 0%, 母親 65%, 長女 95%, 次

女 58% であった。zymozan 刺激による全血法 chemiluminescence では対照 169×10^3 c.p.m, 患児 0 c.p.m, 母親 87×10^3 c.p.m, 長女 141×10^3 c.p.m, 次女 53×10^3 c.p.m であった。

以上より本症例は伴性劣性遺伝形式をとる CGD と診断された。

II. 方 法

1) Cyt-b の測定

末梢血より分離した好中球を 20 mM Tris HCl 緩衝液 PH 7.4, 0.34 M ショ糖の混合液中に浮遊させ、2 mM diisopropyl fluorophosphate を加えて sonicate した後、 $550 \times g$, 10 分間遠心して上清を得た。この上清に過量の dithionite を加え、還元一酸化差スペクトルをとり、その α -band 559 nm の高さをもって測定した ($\Delta\epsilon = 21.6 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$)。測定には島津の UV-300 を用いた。

2) FAD の測定

① γ 上清を 90°C で 5 分間加熱した後、 $15,000 \times g$ で遠心し、その上清を PH 2.8 として日立分光蛍光光度計 650-40 を用いて測定した³⁾。

3) 総蛋白濃度の測定

Bio-Rad Laboratories の protein assay reagent を

図1 家系図

表 1 CGD 家系における Cyt-b, FAD.

	Cytochrome-b (Pmol/mg protein)	FAD (Pmol/mg protein)
Control	88±20	102±20
Patient	32	93
Mother	57	84
Sister I	98	102
Sister II	81	96

図 2 cytochrome-b の還元-酸化差スペクトル

用いて測定した。

III. 結 果

Cyt-b は、対照 88±20 pmol/mg protein, 患児 32 pmol/mg protein, 母親 57 pmol/mg protein と、患児、母親で低下していた。長女、次女の Cyt-b 量は正常範囲

内であった (表 1)。

Cyt-b のスペクトルを検討すると、 γ -band が対照 427 nm であったのに対し、患児 421 nm と短波長側に偏位していた。また、母親、次女の γ -band は 425 nm と、患児と対照の中間に存在していた。長女のそれは 427 nm であった (図 2)。

好酸球増多を伴う対照より得られた検体においては、差スペクトルの偏位は認められなかった (データは省略)。

IV. 考 察

本症例は既往歴、NBT test, Chemiluminescence の結果より伴性劣性遺伝形式をとる CGD と診断され、母親と次女はその保因者と考えられた。

CGD における NADPH 依存 O_2^- 産生酵素の異常に関しては、伴性遺伝型においては Cyt-b が欠損し、常染色体性遺伝型においては Cyt-b の機能異常が考えられるとする報告⁴⁾、Cyt-b よりは flavoprotein の異常が主因であるとする報告がある⁵⁾。

本症例では FAD は正常量存在し、Cyt-b は低下していた。さらに Cyt-b の差スペクトルにおいては γ -band が 421 nm と短波長側に偏位していた。また、保因者と考えられた母親および次女においては、患児と対照の中間に存在していた。CGD における Cyt-b の波形異常については、436 nm と長波長側に γ -band をもち、量的に低値を示す症例が報告されている⁶⁾。本症例においては短波長側への偏位であり、好酸球による影響も考慮されたが、好酸球増多を伴う対照の検討では、その影響は認められなかった。

これらのことより本症例では、Cyt-b の分光学的偏位より何らかの構造上の異常が、量的低下と共に存在している可能性も示唆された。

現在のところ Cyt-b, flavoprotein のいずれも活性を有する純粋な形で単離されていない。今後、単離された Cyt-b あるいは flavoprotein による構造および機能異常の解析が必要と考えられる。なお、この症例で示された異常が伴性劣性遺伝形式をとる CGD で広く認められるか否かに関しては、他の家族例について現在検討中である。

文 献

- 1) Gallin, J.I., Beuscher, E.S., Seligmann, B.E., Nath, J., Geither, T., Katz, P.: Recent Advantages in Granulomatous Disease. *Ann. Intern. Med.*, 99: 657~674, 1993.
- 2) Segal, A.W., Jones, O.T.G., Webster, D., Allison, A.C.: Absence of a newly described

- cytochrome-b from neutrophils of patient with Chronic Granulomatous Disease. *Lancet*, 2 : 446~449, 1978.
- 3) Sakane, F., Takahashi, K., Koyama, J. : Purification and characterization of a membrane-bound NADPH-cytochrome c reductase capable of catalyzing menadione-dependent O_2^- formation in Guinea Pig polymorphonuclear leukocyte. *J. Biochem.*, 96 : 671~678, 1984.
- 4) Segal, A.W., Cross, A.R., Garcia, R.C., Borregard, N., Valerius, N.H., Soothill, J.F., Jones, O.T.G. : Absence of Cytochrome b-245 in Chronic Granulomatous Disease. *N. Engl. J. Med.*, 308 : 245~251, 1983.
- 5) Gabig, T.G., Lefker, B.A. : Deficient Flavoprotein component of the NADPH-dependent O_2^- -generating oxidase in the Neutrophils from three male patients with Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Invest.*, 73 : 701~705, 1984.
- 6) Gabig, T.G. : The NADPH-dependent O_2^- -generating oxidase from Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 258 : 6352~6356, 1983.
-