Original Article

Sodium ferrous citrate の好中球機能に及ぼす影響

前多 力^{1,*} , 華 見²⁾ , 秦 政輝¹⁾ , 北村大介¹⁾ , 瀧田尚仁¹⁾ , 北島政幸¹⁾ ,
落合 匠³⁾ , 長岡 功²⁾ , 鎌野俊紀¹⁾

¹⁾順天堂大学医学部下部消化管外科

²⁾順天堂大学医学部生化学・生体防御学

³⁾(財)東京都保健医療公社東部地域病院外科

*連絡先: 前多 力, 〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1, 順天堂大学医学部下部消化管外科,

Tel: 03-3813-3111, e-mail: mkt@med.juntendo.ac.jp

Evaluation of the effect of sodium ferrous citrate on neutrophil functions

BACKGROUND AND PURPOSE: The inflammatory bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis (UC) are intractable diseases of unknown origin. The mucosal injury of UC is presumed to be partly caused by reactive oxygen species (ROS) produced by neutrophils. Chronic inflammation of UC results in chronic anemia, to which iron is given. In this study, to evaluate the effect of sodium ferrous citrate (SFC) on neutrophil functions, we measured superoxide generation and migration of neutrophils treated with SFC *in vitro*.

METHODS: Superoxide generation induced by phorbol myristate acetate (PMA), opsonized zymosan (OPZ) and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) was determined based on the superoxide dismutase-inhibitable cytochrome c reduction. To further clarify the inhibitory mechanism of SFC, the membrane fraction was isolated and NADPH-dependent superoxide production was measured. Moreover, neutrophil migration was evaluated with a Boyden chamber assay using zymosan-activated serum (C5a) as a chemoattractant.

RESULTS: SFC dose-dependently inhibited the superoxide production induced by all the stimuli examined. Similarly, SFC-treatment inhibited the activity of NADPH oxidase in the membrane fraction of neutrophils. In addition, SFC suppressed chemotaxis toward zymosan-activated serum in a dose-dependent fashion.

CONCLUSIONS: In this study, we revealed that SFC could suppress neutrophil functions such as superoxide generation (NADPH oxidase activity) and migration. During episodes of IBD, stimulated neutrophils are accumulated in inflamed mucosa via the migration through vascular endothelium, where they release ROS such as superoxide. Thus, the present observations suggest that SFC may have a potential to reduce mucosal injury by suppressing migration and ROS generation by neutrophils in UC.

Rec.8/22/2005, Acc.9/16/2005, pp54-58

Tsutomu Maeda^{1,*}, Jian Hua²⁾, Masaki Hata¹⁾, Daisuke Kitamura¹⁾, Naohito Takita¹⁾, Masayuki Kitajima¹⁾,
Takumi Ochiai³⁾, Isao Nagaoka²⁾ and Toshiki Kamano¹⁾

¹⁾Department of Coloproctological Surgery, Juntendo University, School of Medicine, Tokyo, Japan

²⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University, School of Medicine, Tokyo, Japan

³⁾Department of Surgery, Tobu Chiiki Hospital, Tokyo Metropolitan Government Health Care Public Corporation, Tokyo, Japan

Key words sodium ferrous citrate, neutrophil function, superoxide generation, migration, adhesion molecules

緒 言

活性酸素が関与する疾患は多岐にわたっており、炎症性腸疾患においても、食細胞が産生する活性酸素が重要な組織傷害因子となっている¹⁾。一方、炎症性腸疾患では、出血、吸収障害および慢性炎症に伴い鉄欠乏性貧血を来し、鉄剤投与を余儀なくされる症例が多い。しかしながら、鉄は酸化ストレスに関係すると考えられており、慎重投与が必要とされてきた。さらに、組織傷害に重要である好中球への鉄の影響の報告は少なく、このため、炎症増悪期の鉄剤投与を躊躇させられる場合も多い。今回我々は、鉄剤として一般的に広く投与されている、クエン酸第一鉄ナトリウム(Sodium ferrous citrate; SFC)の好中球機能に及ぼす影響を検討した。好中球機能として、スーパーオキシド生成能を測定した。さらに、このメカニズムを明らかにするため、好中球におけるスーパーオキシド産生酵素である NADPH oxidase によるスーパーオキシド生成能を測定した。また、遊走能、接着分子発現に関しても検討し、若干の知見を得たので報告する。

方 法

1) 試薬

Sodium ferrous citrate (エーザイ) は 0.025N HCl で溶解し使用した。Ferricytochrome c, phorbol myristate acetate(PMA), zymosan A, N-formyl-menthionyl-leucyl-phenylalanine(fMLP), superoxide dismutase(SOD)はすべて Sigma のものを使用した。

2) 好中球の単離

同意の得られた健康人から採取した血液をヘパリンで抗凝固し、Polymorphprep™(Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway)にて好中球を単離した。さらに、低張処理にて混入している赤血球を除去し、phosphate-buffered saline (PBS:137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.4)で洗浄し、 2×10^7 cells/ml に調整した。単離した好中球を May/Grünwald/Giemsa を染色して、純度を算定したところ、98% 以上の細胞が好中球であることがわかった。

3) 好中球スーパーオキシド生成能の測定

1×10^6 /ml の好中球懸濁液に SFC を 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, あるいは SFC の溶媒である 0.00025N 塩酸(Control) を添加して 37℃, 10 分間保温した。その後、PMA (最終濃度 250 ng/ml), opsonized zymosan (OPZ: 好中球との比率が 1:12) あるいは fMLP (最終濃度 10^{-7} M) を加え 37℃, 10 分間保温した。好中球より産生されたスーパーオキシドを cytochrome c 還元法 (分光光度計を用いて 550 nm における吸光度を測定し、cytochrome c の還元量から産生

されたスーパーオキシドを算出する) により測定した。Control のスーパーオキシド産生量を 100% とした場合の SFC 各濃度における値を % 産生率として表した。

OPZ は zymosan A (最終濃度 8mg/ml) とヒト血清を 37℃, 30 分間反応させ、zymosan 顆粒を PBS で洗浄して調製した。

4) 好中球から精製した NADPH oxidase によるスーパーオキシド生成能の測定

NADPH oxidase によるスーパーオキシド生成能の測定を、Yamashita²⁾らの方法に準じて行った。好中球を PMA で刺激する前と後に SFC を作用させた 2 つの系において、NADPH oxidase からのスーパーオキシド産生量を測定した。すなわち、PMA 刺激前に SFC を作用させた系では、 2×10^7 /ml の好中球に 10 μ g/ml となるように SFC を添加し、20 分間保温して、PMA を加え 5 分間保温した。その後、好中球を遠心して回収し、0.34M sucrose で懸濁し、超音波で破碎した。そして好中球の破碎液を 500g, 10 分遠心した後、上清を 107,000g, 30 分間超遠心し NADPH oxidase を含む膜画分を回収した。この膜画分に NADPH を加え、産生されたスーパーオキシドを cytochrome c 還元法 (吸光度 550-540nm の変化を分光光度計により連続的に測定) により測定した。

一方、PMA 刺激後に SFC を作用させた系では、好中球に PMA を加え 5 分間保温した。その後、前述のように、NADPH oxidase を含む膜画分を調製し、この膜画分に SFC (最終濃度 10 μ g/ml) を添加して 1 分間保温し、さらに、NADPH を加え、産生されたスーパーオキシドを cytochrome c 還元法により測定した。

5) 好中球遊走能測定

遊走因子として補体因子 C5a を用い、Boyden chamber 法により遊走距離を測定した。好中球懸濁液 (3.3×10^6 /ml) に SFC を 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml となるように加え 37℃, 20 分間保温し、その後、3 μ m の millipore filter を装着した Boyden chamber の上室に入れた。下室には遊走因子として C5a を含む zymosan activated serum を入れ、37℃, 20 分間保温した。反応後、フィルターを固定、染色し、好中球が遊走した距離を 1 フィルターあたり 20 視野測定し平均値を遊走距離とした。SFC の溶媒である 0.00025N 塩酸を添加した好中球を Control とし、その遊走距離を 100% とした場合の SFC 各濃度における遊走距離を % 遊走率として表した。

Zymosan activated serum は zymosan A (8mg/ml) とヒト血清を 37℃, 30 分間反応させ作製した。

6) 好中球の接着分子発現の測定

ヒト全血 100 μ l に SFC (最終濃度 10 μ g/ml) を添加し 20

表 好中球のスーパーオキシド生成におけるSFCの影響

	Control (%)	Sodium ferrous citrate ($\mu\text{g/ml}$)		
		1	5	10
PMA (n=8)	100	85.37 $\pm$ 6.47 *	74.71 $\pm$ 10.16 *	66.74 $\pm$ 12.8 *
OPZ (n=7)	100	83.87 $\pm$ 6.47 *	79.16 $\pm$ 3.57 *	66.76 $\pm$ 5.93 *
fMLP (n=4)	100	77.76 $\pm$ 8.15 *	63.07 $\pm$ 5.63 *	60.89 $\pm$ 9.41 *

Controlの活性酸素生成量はPMA刺激では21.32 $\pm$ 6.61 nmol/min/ 10^6 cells, OPZ刺激では8.7 $\pm$ 1.87 nmol/min/ 10^6 cells, fMLP刺激では6.61 $\pm$ 2.36 nmol/min/ 10^6 cellsであった. * $p < 0.01$

図1 好中球によるスーパーオキシド生成に対するSFCの影響

SFCを作用させた後, PMA刺激によるスーパーオキシド産生量をcytochrome c還元法により測定した. データは8例の平均 $\pm$ SDを示す. Controlの活性酸素生成量は21.32 $\pm$ 6.61 nmol/min/ 10^6 cellsであった. * $p < 0.01$

図2 NADPH oxidaseによるスーパーオキシド産生に対するSFCの影響

PMA刺激の前あるいは後にSFCを作用させ, NADPH oxidaseを含む膜画分によるスーパーオキシド量をcytochrome c還元法により測定した. データは3例の平均 $\pm$ SDを示す. Controlの活性酸素生成量は76.99 $\pm$ 10.25 nmol/min/mg proteinであった. * $p < 0.01$

分間保温, その後, fMLP(最終濃度 10^{-7}M)を加え15分間保温した. 活性化された好中球にPhycoerythrin(PE)-labeled anti-CD11b monoclonal antibodyを30分間, 氷中で反応させ, フローサイトメトリー(FACScan, Becton Dickinson)でCD11bの発現を測定した. データはCell Quest software (Becton Dickinson)で分析し, CD11b発現をmean fluorescence intensity (MFI)で比較検討した.

7) 統計処理

測定したデータは平均 $\pm$ 標準偏差で表し, Controlと比較して $p < 0.05$ を有意差ありとした. 好中球, NADPH oxidaseによるスーパーオキシド生成能, 好中球遊走能はRepeated measure ANOVAを用いて検定し, 有意であればDunnettの多重比較検定を行った. また, 接着分子の発現はTwo group t -test: Pairedを用いて検定した.

結 果

1) SFCのスーパーオキシド生成能に及ぼす影響

SFCはPMA, OPZ, およびfMLPすべての刺激に対するスーパーオキシド産生を濃度依存的(1-10 $\mu\text{g/ml}$)に阻害した(表, 図1).

2) SFCのNADPH oxidaseによるスーパーオキシド生成能に及ぼす影響

PMA刺激前にSFCを作用させた系では, SFCを投与しないControl群に比べ, NADPH oxidaseによるスーパーオキシド産生は抑制される傾向にあったが, 有意差は認められなかった(図2). 一方, PMA刺激後にSFCを作用させた系ではControl群に比べ, NADPH oxidaseによるスーパーオキシド産生が有意に抑制された(図2).

3) SFCの好中球遊走能に及ぼす影響

SFCは補体因子C5aを遊走因子とする好中球遊走能を濃

図3 好中球の遊走能に対するSFCの影響
好中球にSFCを作用させ、補体因子C5aを遊走因子とする遊走能をBoyden chamber法により測定した。データは4例の平均±SDを示す。Controlの遊走距離は $50.55 \pm 3.65 \mu\text{m}$ であった。* $p < 0.01$

図4 好中球のCD11b発現に対するSFCの影響

好中球にSFCを作用させ、fMLP刺激によるCD11b発現をMFIで比較検討した。データは6例の平均±SDを示す。

度依存的(1-10 $\mu\text{g/ml}$)に阻害した(図3)。

4) SFCの好中球の接着分子発現に及ぼす影響

SFCによりfMLP刺激によるCD11b発現は抑制される傾向があったが、有意差は認められなかった(図4)。

考 察

生体内では、酸素を利用する過程において、常に種々の活性酸素が生成されている。食細胞が産生する活性酸素は、微生物感染においては、生体防御作用として働くが、過剰に放出された場合、自己組織を傷害する。それにより脳神経、循環器、呼吸器、消化器とあらゆる臓器の病態の形成や増悪を引き起こすことがある。

潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患においても好中球が産生する活性酸素が粘膜傷害を起こすとされている³⁾。好中球は炎症の際に活性化されると、接着分子を介して血管内皮細胞に接着し、さらに、内皮細胞の間隙を通して血管外に遊出し、炎症部位に向かって遊走する。遊走した好中球は炎症部位において、様々な炎症性メディエーターによって、さらに活性化され、活性酸素を産生し組織傷害を引き起こす。炎症に際して、上記のように作用する好中球機能を抑えることが、粘膜傷害を軽減することにつながると考えられる。

今回我々は、活性酸素による組織傷害において、中心的役割を果たす好中球に注目し、炎症性腸疾患にしばしば投与されるSFCの好中球に対する影響を、*in vitro*において検討した。小川らは、SFC(100mg)を経口投与した場合に、血中濃度が2 $\mu\text{g/ml}$ に達することが報告されている⁴⁾。そこで今回我々は、SFC濃度を1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$

に設定し実験を行った。また、好中球のスーパーオキシド生成は細胞膜に結合したNADPH oxidaseにより産生されることが知られているが、この酵素は刺激物によって、様々な過程を経て活性化されることが明らかにされており⁵⁾、その過程にはプロテインキナーゼやチロシンキナーゼなどが関与している。今回の結果は、用いたすべての刺激剤に対するスーパーオキシド生成を抑制した。そこで、SFCがNADPH oxidaseにどのように作用するかを明らかにするため、好中球をPMAで刺激する前と後にSFCを作用させた2つの系において、NADPH oxidaseからのスーパーオキシド産生量を測定した。まず、好中球にSFCを作用させ、その後PMAで刺激した好中球からNADPH oxidaseを含む膜画分を調製し、そこからのスーパーオキシド産生量を測定することで、SFCのNADPH oxidase活性化過程への作用を検討した。一方、PMAで刺激された好中球からNADPH oxidaseを含む膜画分を調製し、そこにSFCを作用させることにより、活性化されたNADPH oxidaseがスーパーオキシドを産生する段階でSFCの作用を検討した。その結果、PMA刺激後にSFCを作用させた系において、NADPH oxidaseからのスーパーオキシド産生がControl群に比べ有意に抑制された。したがって、SFCのスーパーオキシド生成阻害のメカニズムとしてNADPH oxidase活性化の過程に作用するというよりは、むしろNADPH oxidaseがスーパーオキシド産生する段階で作用すると考えられる。

次に、C5aを走化因子として遊走能、また接着分子として重要である α_2 インテグリンファミリーのMac-1(CD11b)の発現を測定した。SFCは遊走能を濃度依存的に抑制し

た．一方，CD11b の発現は SFC によって有意に抑制されなかった．

以上の結果から，SFC は炎症に際し，血管内から組織中に遊出した好中球の炎症巣への遊走を抑制し，炎症巣においては，NADPH oxidase によるスーパーオキシド生成を抑制する．このような抗炎症作用から，SFC は UC などの炎症性腸疾患による粘膜傷害をも軽減する可能性が考えられる．

鉄は以前より酸化ストレスを助長する prooxidative agent と考えられていた⁶⁾．その理由としては，活性酸素がすでに存在する炎症局所においては，スーパーオキシドが不均化反応($O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$)により過酸化水素となり，その後 Fenton 反応($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{\cdot}$)によりさらに組織傷害性の強いヒドロキシルラジカルが生成されると説明されている^{6,7)}．しかしながら一方では，Erythromycin-iron complex が $O_2^{\cdot-}$ scavenging effect を持つという報告や，Iron-EDTA が好中球からのスーパーオキシド生成を抑制し，殺菌能を阻害したという報告もみられる^{8,9)}．これらの報告，ならびに今回の我々の実験結果から，鉄はあらかじめ，炎症細胞機能を down-regulation することにより抗炎症効果を発揮する可能性が考えられる．

したがって，UC に代表される炎症性腸疾患における SFC の投与は，鉄欠乏性貧血の改善だけではなく，その抗炎症効果により粘膜傷害を軽減する可能性が考えられる．また，今回の結果から，SFC は *in vitro* において 1 μ g/ml 以上の濃度で弱いながら好中球機能を阻害したが，この濃度は経口投与した際の SFC の血中濃度(2 μ g/ml)とほとんど同じであった．したがって，SFC は *in vivo*，すなわち生体内でも好中球の活性酸素や遊走などの機能を阻害しうると考えられる．今後，UC や他の炎症性腸疾患に鉄剤が有効に作用するかどうか，さらに他の治療薬との併用効果などについて検討する必要がある．

文 献

- 1) 北洞哲治, 伊東ひろみ, 仲村 洋, 吉田武史, 鈴木紘一, 土屋雅春: 腸疾患とフリーラジカル 活性酸素・フリーラジカル, 2: 595-600, 1991.
- 2) Yamashita T, Someya A, Tsuzawa-kido Y: Effect of maleimide derivatives on superoxide-generating system of guinea-pig neutrophils stimulated by different soluble stimuli. Eur J Biochem, 145: 71-76, 1984.
- 3) 吉田憲正, 山口泰司: 炎症メディエーター (好中球, 活性酸素, 一酸化窒素): 炎症性腸疾患.(武藤徹一郎編), 医学書院, 東京, 2000, pp41-45.
- 4) 小川 正, 朝野芳郎, 森下亘通, 吉田 晃, 岩田展明, 前川 正: E-0708, S-0708 (錠, 顆粒) 製剤の同等性試験. 臨床と研究, 62: 2023-2028, 1985.
- 5) 菅野智子, 宮口長青, 梶谷典子, 山田勝彦, 秋山実男, 吉岡 保, 内海 耕: 好中球の fMLP 刺激依存性活性酸素生成のグリチルリチンによる特異的阻害作用. 医と薬学, 45: 835-845, 2001.
- 6) Reifen R, Matas Z, Zeidel L, Berkovitch Z, Bujanover Y: Iron supplementation may aggravate inflammatory status of colitis in a rat model. Dig Dis Sci, 45: 394-397, 2000.
- 7) 北川誠一: 好中球: 活性酸素代謝.(笹田昌孝編), 医薬ジャーナル社, 大阪, 1988, pp47-57.
- 8) Muranaka H, Suga M, Sato K, Nakagawa K, Akaike T, Okamoto T, Maeda H, Ando M: Superoxide Scavenging Activity of Erythromycin-Iron Complex. Biochem Biophys Res Commun, 232: 183-187, 1997.
- 9) Kim YM, Yamazaki I, Piette LH: The effect of hemoglobin, hematin, and iron on neutrophil inactivation in superoxide generating systems. Arch Biochem Biophys, 309: 308-314, 1994.