好中球のスーパーオキシドアニオン(O_2^-)産生能に 及ぼすプライミング効果

西田 朗・中村利彦^{*1)}、高橋 篤^{*2)}

Neutrophil priming effects on superoxide anion production activity

Under opsonized zymosan(OZ) stimulation, the *cypridina* luciferin analog-dependent chemiluminescence(MCLA-CL) of neutrophils(PMNs) shows a different luminescence pattern with and without infection. The noninfected PMN shows the same luminescence pattern as with infection, when primed by tumor necrosis factor(TNF), f-methionyl-leucyl-phenylalanine(FMLP) and phorbol myristate acetate(PMA). From these findings, it is considered that the PMNs when infected, is primed by an increasing number of various mediators.

Akira Nishida・Toshihiko Nakamura^{*1)},
Atsushi Takahashi^{*2)}

key words : priming, superoxide anion, neutrophil,
TNF, chemiluminescence

好中球は種々の刺激によりスーパーオキシドアニオン(O_2^-)を産生し、それから派生する各種の活性酸素種が、種々の病態に重要な役割を担っていると考えられている。

筆者らは、*cypridina* luciferin analog(MCLA)を用いた O_2^- 産生能測定法を開発する¹⁻⁴⁾とともに、新生児好中球の O_2^- 産生能を経時的に測定し、オプソニン化ザイモザン(OZ)を刺激剤とした発光パターンが、感染症の有無で変化する(非感染時には1峰性であり、感染時には2峰性である)⁵⁾ことをすでに報告した。一方、感染時には種々のメディエーターが産生されることが知られている。

今回、筆者らは、感染による発光パターンの変化は、それら物質のプライミング効果によるとの仮説のもとに種々の検討を行った。

対象と方法

健康成人と感染などのストレスを認めない新生児および重症感染症(MRSA 敗血症)の新生児より得られた好中球を対象とした。新生児からの採血に当っては、両親よりの承諾を得た。

好中球分離は、健康成人は肘静脈よりヘパリン加血を2 ml 採取し、一方、新生児は橈骨動脈または足底よりヘパリン加血を0.2 ml 採取し、デキストラン沈降法および Conray Ficall 比重遠沈法を用いて行った。

O_2^- 産生能測定は、luminescence reader(Aloka Co.)を用い、ウミホタルルシフェリン誘導体依存性化学発光法(MCLA-CL method)⁴⁾にて行った。刺激剤としては、OZ, f-methionyl-leucyl-phenylalanine(FMLP)および phorbol myristate acetate(PMA)の3剤を使用した。反応系は、好中球 5×10^4 個をハンス液(HBSS)に加え、37°Cで3分間保温したあと、MCLA $0.5 \mu M$ と刺激剤として OZ 0.8 mg/ml , FMLP $1 \mu M$, もしくは PMA 20 ng/ml を加え反応開始とし、総量2 ml で行った。

プライミング効果による MCLA-CL の変化をみるため、まず、FMLP, PMA いずれも刺激剤として使用する濃度から 10^{1-5} 倍に希釈し、それ自体では O_2^- 産生を認めない濃度を求めプライミング濃度とした。

一方、hG-tumor necrosis factor(TNF)は、そのみでは化学発光を示さないことから、種々の濃度にてプライミングを行った。好中球浮遊液(5×10^4)37°Cに、FMLP 1 nM , PMA 2 pg/ml または TNF 10^3 u/ml を添加し、2~45分後に MCLA $0.5 \mu M$ と刺激剤として OZ 0.8 mg/ml , FMLP $1 \mu M$ もしくは PMA 20 ng/ml を加え反応開始とした。

hG-TNF は大日本製薬より恵与されたものを

^{*1)} The Neonatal Unit, Children's Hospital Hachioji, Tokyo 都立八王子小児病院新生児科

^{*2)} First Department of Surgery, School of Medicine, Gunma University, Gunma, Japan 群馬大学医学部第一外科学教室

図1 TNFのプライミング, TNF濃度変化に伴う化学発光の変化

好中球浮遊液 (5×10^4) 37°C に, 種々の濃度のTNFを添加し, 10分後にMCLA $0.5 \mu\text{M}$ と刺激剤としてOZ 0.8 mg/ml , FMLP $1 \mu\text{M}$ もしくはPMA 20 ng/ml を加え反応開始とした。

結果

(1) 健康成人好中球

健康成人好中球 OZ 単独刺激の MCLA-CL 発光曲線は1峰性を示した。

TNFをプライミングに用いたときの, その濃度変化における各種刺激剤による発光パターンは, すべてTNF濃度に依存した変化を示した(図1)。したがって, もっとも変化の大きかった 10^3 u/ml を以下の実験のTNF濃度とした。

図2 プライミング時間に伴う化学発光の変化

好中球浮遊液 (5×10^4) 37°C に, TNF 10^3 u/ml , FMLP 1 nM または PMA 2 pg/ml を添加し, 2~45分後にMCLA $0.5 \mu\text{M}$ と刺激剤としてOZ 0.8 mg/ml を加え反応開始とした。

FMLP, PMAともプライミングに用いた濃度では, 好中球は O_2^- 産生を示さなかった。

プライミング時間が, 2~60分の間におけるOZ刺激の発光曲線はFMLP, PMAおよびTNFはすべて2峰性を示し, 特に10~15分の間で第1峰が最大であった(図2)。

TNFの10分間プライミングにおけるOZ刺激の発光曲線は, 感染時のそれと酷似していた。FMLPおよびPMAをたがいにプライミングおよび刺激剤として用いたときの発光パターンは, いずれも1峰性であった。またそのピーク値は, プライミング時間が, FMLPを刺激剤として用い

図3 FMLP・PMA をたがいにプライミングさせた化学発光

好中球浮遊液 (5×10^4) 37°C に、PMA 2 pg/ml または FMLP 1 nM を添加し、10 分後に MCLA $0.5 \text{ }\mu\text{M}$ と刺激剤として FMLP $1 \text{ }\mu\text{M}$ または PMA 20 ng/ml を加え反応開始とした。

たときには 5～10 分に、PMA を刺激剤として用いたときには 30 秒に最大を示した(図3)。

(2) 新生児好中球

感染症を認めない症例の好中球 OZ 単独刺激の MCLA-CL 発光曲線は 1 峰性を呈しており、かつ、そのピーク時間は TNF をプライミングしたときの第 2 峰のピーク時間とほぼ一致していた(図4)。

重症感染症例の好中球に、TNF をプライミングしたときの OZ 刺激の発光曲線は、OZ 単独刺激のそれに比べ第 1 峰の上昇を認めた。また、そのピーク時間には変化を認めなかった(図4)。

考 察

O_2^- 産生測定法として広く用いられているチトクローム C 還元法(c-法)は、 O_2^- 産生量をみているのに対し、本法(MCLA-CL 法)は、その発光強度が O_2^- 産生速度を示すことから、その発光パターンは O_2^- 産生速度の変化を経時的に捉えていることになる⁴⁾。

図4 感染症の有無と TNF によるプライミング効果

O_2^- 産生を指標にしてプライミング効果をみる場合、 O_2^- 産生量の増加で評価されるのが一般的であるが、本法を用いれば産生速度の変化、すなわち MCLA-CL の発光パターンでプライミング効果を評価することができる。

また、本法は必要細胞数も c-法に比し少数であることから、少量の検体にて測定することが可能である。したがって、食細胞の O_2^- 産生の変化を検討するにおいては、MCLA-CL 法はもっともすぐれた方法であると考えられる。

刺激剤やプライミングに用いた OZ, FMLP は、受容体を介して O_2^- 産生系を活性化することが知られており、PMA は直接プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化するといわれている。

また、液性刺激剤である FMLP や PMA と異なり、OZ は貪食を必要としており、好中球の機能を検索するうえではより生理的な刺激剤といえる。

好中球は、貪食時に O_2^- を産生し、それから派生する種々の活性酸素種が殺菌に重要な役割を担っている。感染時の MCLA-CL の発光パターンは、非感染時のそれに比しより早期に過剰の

ピークを認める⁹⁾。このことより、感染時には非感染時に比べより早期に O_2^- 産生を示す一群の好中球が存在しているものと考えられる。

TNF, FMLP および PMA のプライミングにより、非感染時の好中球においても感染時と同様な2峰性の発光パターンを認め、特に生理的に存在するTNFのプライミングでは感染時の発光パターンに酷似していた。したがって、感染時と同様に、これらの物質によるプライミングにより、より早期に O_2^- 産生を示す一群の好中球が出現したのと考えられる。また、プライミングによって出現するピークのピーク時間は感染時に認められる第1峰のピーク時間と一致していた。

以上のことから、感染時に存在する第1峰を示す好中球は、感染時に増加している種々のメディエーターによりプライミングされて生じたものであることが強く示唆される。

プライミング機構に関しては、プライミングする物質により異なっており、現在まで受容体⁶⁾やPKC⁷⁾およびチロシンキナーゼ(TK)⁸⁾の関与などが報告されているが、いまだ不明な点が多い。今後、プライミングに伴うPKCやTK活性の変化や、その局在性およびその阻害剤による変化とMCLA-CL発光パターンの変化との関連について詳細に検討する必要がある。

新生児好中球においては、感染時に限らず仮死時においてもMCLA-CLが2峰性を示すことを筆者はすでに報告した⁹⁾。一方、感染時と同様に仮死時にはインターロイキン-8が増加しているとの報告¹⁰⁾がみられ、仮死時においても種々のメディエーターが増加しているものと考えられる。したがって、仮死時の新生児好中球は感染時と同様に、それらの物質によりプライミングされ2峰性を呈したものと示唆される。新生児においても成人におけるのと同様に種々の病態に好中球が深く関わっているものと思われ、好中球の動態を検討することにより疾患の病態を知るばかりでなく、その治療に役立つものと考えられる。

文 献

- 1) Sugioka, K., Nakano, M., Kurashige, S., Akuzawa, Y., Goto, T.: A chemiluminescent probe with a *cypridina* luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one, specific and sensitive for O_2^- production in phagocytizing macrophages. FEBS Lett 197: 27-30, 1986.
- 2) Nakano, M., Sugioka, K., Ushijima, Y., Goto, T.: Chemiluminescence probe with *cypridina* luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one, for estimating the ability of human granulocytes to generate O_2^- . Anal. Biochem. 159: 363-369, 1986.
- 3) Nishida, A., Kimura, H., Nakano, M., Goto, T.: A sensitive and specific chemiluminescence method for estimating the ability of human granulocytes and monocytes to generate O_2^- . Clinica. Chimica. Acta. 179: 177-182, 1989.
- 4) 西田 朗: 白血球の O_2^- 産生能の測定. 活性酸素と発光. (中野 稔, 吉川敏一・編), 日本医学館, 1990, p 107-112.
- 5) 中村利彦, 西田 朗: 新生児好中球スーパーオキシド・アニオン産生能の周産期感染症における変化. 未熟児新生児誌 4: 283-288, 1992.
- 6) Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., Vadas, M. A.: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8667-8671, 1985.
- 7) Kraft, A. S., Anderson, W. B.: Phorbol esters increase the amount of Ca^{+2} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. Nature 301: 621-623, 1983.
- 8) Yuo, A., Kitagawa, S., Azuma, E., Natori, Y., Togawa, A., Saito, M., Takaku, F.: Tyrosine phosphorylation and intracellular alkalinization are early events in human neutrophils stimulated by tumor necrosis factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor. Biochim. Biophys. Acta. 1156: 197-203, 1993.
- 9) 中村利彦, 西田 朗: 新生児仮死時における好中球スーパーオキシド・アニオン(O_2^-)産生能について. 未熟児新生児誌. (印刷中).
- 10) 高崎二郎, 吉田直子, 高田栄子: 新生児の血漿中顆粒球エラスターゼとインターロイキン8. 新生児誌 27: 779, 1991.