チロシン依存性化学発光を用いた多核白血球 貪食時のミエロペルオキシダーゼ活性測定

西田 朗・近藤昌敏^{*1)}、中野 稔^{*2)}

Assay of myeloperoxidase activity in phagocytizing polymorphonuclear leukocytes on chemiluminescence of tyrosine

The myeloperoxidase (MPO) activity of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) during phagocytosis was investigated using a pro-chemiluminescence probe tyrosine. The tyrosine-dependent chemiluminescence (T-CL) appeared when PMNs was stimulated with opsonized zymosan (OZ) and enhanced by the addition of tyrosine.

This method can measure the released MPO activity in intact PMNs over time.

Rec. 12/5/1994, Acc. 12/26/1994, pp 161~165

*Akira Nishida・Masatoshi Kondou^{*1)},
Minoru Nakano^{*2)}*

key words : *myeloperoxidase, polymorphonuclear leukocytes, phagocytosis, tyrosine-dependent chemiluminescence, opsonized zymosan*

多核白血球 (PMNs) は、食菌時に大量のミエロペルオキシダーゼ (MPO) を菌に向かって放出することが知られている。この MPO と、貪食時に産生されたスーパーオキシドアニオン (O_2^-) より生じた過酸化水素 (H_2O_2) および塩素 (Cl^-) により次亜塩素酸 (OCl^-) が生成され、これが殺菌作用を発揮する主要な因子であると考えられている。

一方、生体発光のおもな発光機序として、アミノ酸であるチロシンの水酸基がペルオキシダーゼと H_2O_2 により酸化され、チロシンおよびバイチロシンのカチオンラジカルとなり、この系で生じたペルオキシダーゼ compound III から電子を得て発光することが考えられている^{1,2)}。

以上のことから筆者らは、PMNs のオプソニン化ザイモザン (OZ) 刺激時にチロシンを添加することで、PMNs を障害することなく貪食時の MPO 活性を測定できるものと考え、以下の実験を行った。

方 法

(1) PMNs の分離法³⁾

少量のヘパリンを入れたディスプレイ注射器にて、新生児は末梢動脈より、成人は肘静脈より、体重に応じ 0.5~2.5 ml 採血する。

PMNs の分離はデキストラン生食による沈降法により行い、PMNs 数 $5\sim10\times10^6/ml$ になるようにカルシウム、マグネシウムを除いた Hank's 液 (HBSS- Ca^{++} , Mg^{++}) にて調製し、使用するまで氷中保存とした。なお、採血から測定までは、6 時間以内とした。

(2) 試薬および酵素の調製

ザイモザンは以前に報告した方法³⁾にてプール血清を用いてオプソニン化を行い、20 mg/ml の濃度に調製した。formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) は以前に報告した方法³⁾により 5 mg/1.14 ml (10^{-2} M) 濃度に調製し、チロシンは再蒸留水にて 3 mM に溶解した。これらの試薬はおのおの使用時まで $-80^\circ C$ に分注保存とした。2 倍濃度の HBSS を、以前に報告したように Na_2HPO_4 を用いて pH を調整し作製したのち、使用時まで冷蔵保存とした。

ザイモザン、チロシン、FMLP、superoxide dismutase (SOD) HBSS- Ca^{++} , Mg^{++} は Sigma

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

^{*2)} Department of Photon and Free Radical, Japan Immunoresearch Laboratories 日本抗体研究所光フリーラジカル部門

Offprint requests to : Akira Nishida, Neonatal Unit, Children's Hospital Hachioji, 4-33-13, Daimachi, Hachioji-shi, Tokyo 193, Japan

図1 刺激剤とT-CL

The incubation mixture contained 1 mM tyrosine, 5×10^5 PMNs and 1.6 mg of OZ or 1 μ M FMLP in HBSS (total volume 2 ml).

図2 阻害剤とT-CL

- 1 : complete incubation mixture (1 mM tyrosine, 5×10^5 PMNs and 1.6 mg of OZ in HBSS),
- 2 : complete mixture + SOD (0.5 μ M),
- 3 : complete mixture + NaN_3 (0.5 mM),
- 4 : complete mixture + SOD + NaN_3 ,
- 5 : PMNs was omitted from the complete mixture.

より、窒化ソーダ(NaN_3)は和光純薬より、HBSSは日水製薬より購入した。

(3) チロシン依存性化学発光(T-CL)測定

T-CLは、チロシン溶液に反応系が2 mlで、かつ等張になるように、再蒸留水と2倍濃度のHBSSおよびPMNsを加え3分間保温したのち、刺激剤としてOZもしくはFMLPを添加して反応開始とした。T-CLの測定は、37°Cで連続攪拌を行いながら、Luminescence Reader (Aloka

Co, Tokyo)を用いて行った。

(4) 細胞外MPO(EC-MPO)活性測定

EC-MPO測定は、Ueharaらの方法⁴⁾に準じ過酸化水素/KBr/MCLA/SOD系にて行った。T-CLと同様に、PMNsをOZにて刺激後15分その一部を分取し遠沈後(3,000 rpm, 10 min), その上清50 μ lをEC-MPOの検体とした。

(5) T-CL発光量と最大発光強度

測定法確立後、T-CLの発光量(30分間)と最大発光強度とを比較検討した。

(6) 統計処理

統計処理は、Student's t検定を用いて $P < 0.05$ を有意とした。

結果

(1) 刺激剤とT-CL

チロシンの有無に関わらず、刺激剤を加えない状態ではPMNsのHBSS浮遊液は、自然発光を示さなかった。PMNsのHBSS浮遊液に刺激剤としてOZを加えると、微弱発光を呈するが、チロシンを添加することによりその発光は増強された。一方、この系に刺激剤としてOZのかわりにFMLPを加えても発光は認められなかった(図1)。

(2) 阻害剤とT-CL

OZ刺激のT-CLにまえてSOD(superoxide anionの消去酵素)もしくは NaN_3 (MPOの阻害剤であると同時にsinglet oxygenの消去剤)を加えても、発光は一部しか抑制されないが、SODと NaN_3 を同時に加えると、その発光は完全に抑制された(図2)。

この結果から、以下の実験はすべてSODを添加して行った。

(3) チロシン濃度および細胞数と発光

0.125 mMチロシンまでは、濃度の増加に伴い発光量(図3)および発光強度は直線的な増大を認めたが、0.5 mM以上ではその発光はほぼプラトーに達した。細胞数と発光量(図4)および発光強度の間には、PMNs 2.5×10^5 個まではほぼ直線関係が示されたが、それ以上では増加率の減少を認めた。

(4) EC-MPOとT-CL

OZ刺激後のEC-MPOとT-CLの発光量(図

図3 チロシン濃度と発光

図4 好中球数と発光

図5 EC-MPOとT-CL

図6 T-CL発光量と最大発光強度

5)および発光強度との間には、ともに $r = 0.878$, 0.901 と有意な相関を示した。

(5) T-CL 発光量と最大発光強度

T-CL の発光量と最大発光強度の間には $r = 0.88$ と有意な相関を認めた(図6)。

考 察

PMNs は、食殺菌時に酸素消費が亢進すること(呼吸バースト)が知られているが、この酸素消費はミトコンドリアの呼吸とは異なりシアンによって阻害されない。これら PMNs 食殺菌時の呼吸バーストは、1933年 Baldrige と Gerard によっ

て発見された⁵⁾が、その重要性はあまり注目されることはなかった。

1961年、Iyer により、食食時の非特異的な殺菌作用を有すると考えられていた H_2O_2 が、呼吸バーストに伴い生成されることが報告され⁶⁾、その生理的役割に注目が集まるようになった。

活性酸素と殺菌作用の関連は、慢性肉芽腫症の PMNs が O_2^- 産生に欠陥を有し殺菌力低下を認めること⁷⁾、また、*in vitro* で食細胞と細菌を反応させる際 O_2^- を除去すると、食細胞の殺菌活性が著明に抑制されること⁸⁾などの所見から確立された。

表 1 T-CL測定系

I.	3 mM tyrosine	667 μ l
	50 μ MSOD	20 μ l
	I + IIの溶液が等張かつ1920 μ lになるように	
	2 倍HBSSおよび再蒸留水にて調製	

↓ II. PMNs 500,000 個

37°C, 3 min. 保温

↓ III. OZ (20 mg/ml HBSS) 80 μ l

T-CL測定

また、近年においては、食細胞が産生する活性酸素には、殺菌作用のみならず殺腫瘍作用や発癌作用さえも認められるようになった。

筆者らは、ウミホタルルシフェリン誘導体を用いた化学発光法(MCLA-CL)を開発しすでに報告した^{3,9-11)}。MCLAは O_2^- により特異的に発光を呈するとともに、細胞障害性が認められないこと、また、MCLA-CLは必要細胞数が少なく、 O_2^- 産生速度を経時的に捉えることができることから、 O_2^- 産生能に関する限りMCLA-CLはもっともすぐれた方法であると考えられる。

貪食時に産生された O_2^- は、不均化反応でただちに H_2O_2 へと変化する。一方、食胞に向かって大量に放出されたMPOにより、この H_2O_2 とClから強力な酸化剤である OCI^- が生成され¹²⁾、これによる細菌膜の塩素化(クロリネーション)が、殺菌作用を発揮する主要な因子であると考えられている。アミノ酸であるタウリンは、 OCI^- によりクロリネーションを起こしタウリンクロラミンとなる^{13,14)}が、このクロラミンは5-thio-2-nitro-benzoic acidを酸化し、5-5'-dithiobis-2-nitro-benzoic acidとすることが知られている。現在まで、貪食時のMPO活性をPMNsを障害することなく測定するには、この反応を用いて OCI^- 産生量を測定する以外に方法を認めなかった。しかし、この系では OCI^- の産生を経時的にとらえることは不可能であった。

今回筆者らが開発したT-CLは、

① 液性刺激剤であるFMLPでは発光の増強を認めなかった。しかし、貪食を伴う、言い換えれば、MPOを外部に放出する過程を伴う粒状の刺激剤であるOZにより、その発光の増強を認めた。

② まえもってSODとMPOの阻害剤である NaN_3 を加えておくと、その発光は完全に抑制された。

③ OZ刺激後のEC-MPO活性と有意な相関を示した。

以上の成績より、本発光は、チロシンの水酸基が貪食により放出されたMPOと、 O_2^- より不均化反応で生じた H_2O_2 により酸化され、チロシンおよびバイチロシンのカチオンラジカルとなり、この系に生じたMPO compound IIIおよび O_2^- から電子を得て発光するものと考えられる。したがって、本法はPMNsを障害することなく、貪食時のMPO活性を経時的に測定できる唯一の方法であると思われる。

今回の成績より実際にT-CLを行うに当たって、筆者らは表1に示す反応系を用いている。また、T-CLの発光量と最大発光強度が有意な相関を認めたことより、本法を臨床的に応用する場合には、最大発光強度を用いることが可能であり、測定時間は約10分間に短縮できるものと考えられる。

文 献

- 1) Totsune, H., Nakano, M., Inaba, H.: Chemiluminescence from bamboo shoot cut. B.B.R.C. 194: 1025-1029, 1993.
- 2) Takahashi, A., Totsune, H., Nakano, M., Mashiko, S., Suzuki, K., Ohma, C., Inaba, H.: Generation of O_2^- and tyrosine cation-mediated chemiluminescence during the fertilization of sea urchin eggs. FEBS Lett. 246: 117-119, 1989.
- 3) 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.
- 4) Uehara, K., Hori, K., Nakano, M., Koga, S.: Highly sensitive chemiluminescence method for determining myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. Anal. Biochem. 199: 191-196, 1991.
- 5) Baldrige, C.W., Gerard, R.W.: The extra respiration of phagocytosis. Amer. J. Physiol. 103: 235, 1993.
- 6) Iyer, G.Y.N., Islam, D.M.F., Quastel, J.H.: Biochemical aspect of phagocytosis. Nature 192: 535-541, 1961.
- 7) Halmes, B., Page, A.R., Good, R.A.: Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. J. Clin. Invest. 46: 1422-1432, 1967.
- 8) Johnston, R.B. Jr., Keele, B.B. Jr., Misra, H.P., Lehmeyer, J.E., Webb, L.S., Bahner, R.L.,

- Ragagopalan, K.V.: The role superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. *J. Clin. Invest.* 55 : 1357-1372, 1975.
- 9) Nakano, M., Sugioka, K., Ushijima, Y., Goto, T. : Chemiluminescence probe with Cypridina luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydro-imidazo [1,2-a] pyrazin-3-one, for estimating the ability of human granulocytes to generate O_2^- . *Anal. Biochem.* 159 : 363-367, 1986.
- 10) Nishida, A., Kimura, H., Sugioka, K., Nakano, M. : The ability of granulocytes to generate superoxide anions and hypochlorite during phagocytosis : Comparison of neonatal granulocytes with adult granulocytes. *Biol. Neonate* 58 : 145-151, 1990.
- 11) 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.
- 12) Harrison, J.E., Schultz, J. : Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 251 : 1371-1374, 1976.
- 13) Zgliczynski, J.M., Stelmaszynska, T., Domanski, J., Ostrowski, W. : Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acid by myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* 235 : 419-424, 1971.
- 14) Stelmaszynska, T., Zgliczynski, J.M. : Myeloperoxidase of human neutrophilic granulocytes as chlorinating enzyme. *Eur. J. Biochem.* 45 : 305-312, 1974.