ルミノール添加による好中球の化学発光測定法

楊井正紀・森 剛一・福田友子・辻 芳郎*

Luminol-amplified chemiluminescence by human polymorphonuclear leukocytes An oxidative metabolic response is induced in polymorphonuclear leukocytes (PMNs) when the PMN membrane is stimulated by either phagocytizable particles or soluble stimuli. This response can be obtained by measuring the energy released as light (chemiluminescence; CL). A CL is correlated with metabolic activation of the hexose monophosphate shunt (HMPS), and is also oxygen dependent. This light emission results from generation by PMNs of highly reactive and excited state oxygen metabolites. Cyclic hydrazides, such as luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) yield a CL when reacted with a variety of oxidizing agents. In this reaction luminol is oxidized to the electronically excited aminophthalate ion, that relaxes to ground state by photon emission. In attempt to increase the sensitivity of CL assay, luminol was added to the incubating suspension of PMNs. CL was monitored using Aminco Chem-Glo photometer or a liquid scintillation spectrometer (model LS-100C; Beckman Inst.) at ambient temperature. Opsonized zymosan as phagocytizable particles was used and PMA (phorbol myristate acetate), Con A+Cyt E, FMLP, Ca^{2+} ionophor A 23187 as soluble stimuli were used. Luminol-amplified CL assay may be a simple, rapid, reproducible and useful method for diagnosis of chronic granulomatous disease (CGD) and a valuable parameter in assessing the oxidative metabolic and phagocytic capabilities of individuals.

Masanori Yanai・Koichi Mori・Tomoko Fukuda・Yoshiro Tsuji*

* Department of Pediatrics, Nagasaki University School of Medicine

好中球の機能には大別して走化能, 貪食能, 殺菌能があるが, その主要な機能である殺菌能は, 酸素依存性, 非依存性殺菌に分けられる¹⁾ (図1²⁾). この酸素依存性殺菌機構が, 好中球の殺菌能に非常に重要な位置を占めることが, 慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease; CGD) の好中球³⁾, あるいは嫌気状態における好中球殺菌能⁴⁾の研究より明らかとなってきた. オプソニン化された細菌は好中球の膜表面のリセプター⁵⁾を介して接触することにより貪食・殺菌過程が開始されるが, それに伴い種々の代謝が亢進してくる. とくに酸化代謝過程が促進され (表1⁶⁾), 酸素消費の増加, ヘキソースモノリン酸酸化経路 (hexose monophosphate shunt; HMPS) 活性の亢進⁷⁾, 超酸化酸素イオン (superoxide anion; O_2^-)⁸⁾ や過酸化水素 (H_2O_2)⁹⁾ などの産生が起こることが知られてきた. そのほか Haber-Weise 反応¹⁰⁾, Arneson 反応¹¹⁾, ミエロペルオキシダーゼ殺菌系 ($\text{MPO-H}_2\text{O}_2$ -ハロゲン系)¹²⁾ などにより・OH (hydroxyl radical), 一重項酸素 (singlet molecular oxygen; $^1\text{O}_2$) などの活性酸素が生じると考えられている. この酸化代謝過程は細菌などの異物貪食だけでなく, ある種の化学

刺激物質¹³⁻¹⁸⁾ (ホルボールミリステートアセテート, コンカナバリリンA, サイトカラシンE, Ca^{2+} イオノホア, フッ化ソーダなど) によっても惹起され, O_2^- や H_2O_2 測定が行われるようになってきた.

一方, 好中球が貪食を開始すると化学発光 (chemiluminescence; CL) が生じ, これは液体シンチレーションカウンター (LSC) で測定できることを1972年 Allen ら¹⁹⁾が報告して以来, CL 測定が好中球の機能検査法の一つとして用いられてきた. この CL は CGD とその保因者の診断に有用²⁰⁻²³⁾であるばかりでなく, 酸化的殺菌代謝機構の解明にも応用されている. 筆者らは, 使用する好中球を微量化する目的でルミノールを添加した CL 測定方法を検討したので報告する.

ルミノール添加による CL 測定

好中球が貪食あるいは膜刺激物質により, 前述の活性酸素が生じるが, ルミノール (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) を添加すると CL は著明に enhance されることを1976年 Allen ら²⁴⁾が, 1977年 Van Dyke ら²⁵⁾が発表した. ルミノールは有機ヒドラジドであり, アルカリ溶液中で適当な触媒下に酸化を受けると発光し, これは aminophthalate の蛍光スペクト

* 長崎大学医学部小児科学教室

表 1 好中球の酸化代謝における変化

1. respiratory burst: NAD(P)H oxidase
 - a) シアン耐性の酸素消費の増加
 - b) HMPS を経由する糖代謝の亢進
 - c) O_2^- の産生
2. O_2^- の関与する反応
 - a) superoxide dismutase (SOD)

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$
 - b) Haber-Weise 反応

$$O_2^- + H^+ + H_2O_2 \longrightarrow \cdot OH + H_2O_2 + {}^1O_2$$
 - c) Arneson 反応

$$O_2^- + H^+ + \cdot OH \longrightarrow H_2O + {}^1O_2$$
 - d) spontaneous dismutation

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + {}^1O_2$$
3. ミエロペルオキシダーゼ殺菌系 (MPO- H_2O_2 -ハロゲン系)

$$H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow H_2O + OCl^-$$

$$H_2O_2 + OCl^- \longrightarrow H_2O + Cl^- + {}^1O_2$$
4. 酸化的殺菌と化学発光

図 1 細胞内殺菌系²⁾

細胞内殺菌は、主に酸素依存系で生じる活性酸素の働きによる。その引き金は NADPH 酸化酵素で、細胞膜の直下に存在する。酸素非依存系は補助的役割をもつ。

ルと一致することが知られている。

photometer による CL 測定

筆者ら²⁷⁾は Van Dyke らの方法²⁵⁾に順じ、aminco Chem-Glo photometer を用いて、記録は recorder (島津製作所) により CL を測定した。方法は cell (直径 6 mm) にルミノール溶液 50 μ l (0.2 mg/ml)、オプソニン化ザイモサン浮遊液 450 μ l (1.25 mg/ml) 入れ、好中球浮遊液 100 μ l を混入し、1 分間よく攪拌ののち、cell holder に cell を挿入し測定を開始する。図 4²⁷⁾は好中球数による CL の変化を示したものであるが、multiplier switch (感度調製) は 10 にセットした状態では再現性、各症例の比較などの点では 10^6 個が適当と考えられた。感度を上げれば 10^5 個でも可能ではあるが、いくつかの症例で比較する場合、好中球数調製に時間を要し、臨床スクリーニングに用いるには不適と思われた。ルミノール、好中球浮遊液などは pH 7.4、0.1%ゼラチン含有 HBSS (gel HBSS) を用いるが、pH 8.6 と変化させると、ルミノールの至適 pH から考えて pH 8.6 がやや高値となったが、筆者らは従来どおり pH 7.4 の gel HBSS を用いている。

図 5 は被食食粒子の違いによる CL の変化を示したもののだが、粒子の違いによりパターンは変化し、生菌の *E. coli*, *S. aureus* の場合、時間経過とともにパターンが変化し、従来の報告²³⁾と同様で再現性がザイモサンに比較し悪い。13 歳男子の CGD の好中球ではザイモサン貪食にかかわらずまったく CL が認められず (図 6)、感度を 100 倍上げてほとんど上昇はみられなかった。

同様の反応系に活性酸素の不均化酵素や scavenger で

図 2 活性酸素によるルミノールの化学発光

ある SOD (superoxide dismutase), カタラーゼ, 安息香酸ナトリウム, アザイドの添加により CL は一部抑制され²⁸⁾, ルミノール無添加の系の結果²⁹⁾とほぼ同様であり、ルミノール添加時の CL も単一の活性酸素に起因するというよりは、あらゆる活性酸素がなんらかの影響を及ぼしていると考えられた。

aminco Chem-Glo photometer と recorder を使用することにより、従来の好中球数を 1/10 に少量化でき、暗室での操作が不要で測定時間を短縮できる。またルミノール添加によっても従来の方法^{22,23)}と同様、CGD の診断に利用できるばかりでなく、好中球の酸化的殺菌機構の異常のスクリーニングに有用である^{27,28)}。

LSC による CL 測定

さらに使用する好中球数を微量化する目的で LSC (model LS-100C, Beckman Inst.) を用いると、ルミノール濃度が 1 μ M で 2.5×10^4 個の好中球、0.1 μ M で 10^5 個の好中球で、しかも同時に 4~7 検体の CL の測

図3 活性酸素によるルミノール化学発光

図4 多核白血球数の差と CL の変化

図5 被貪食粒子の違いによる CL の変化

図6 正常人(control)と慢性肉芽腫症(CGD)の CL の比較

図7 オプソニン化ザイモサン貪食時の化学発光

定が可能となった。しかし、感度がよい測定バイアルは暗順応させ、暗室での操作が必要となる。

図7は 10^5 個の好中球がザイモサンを貪食する際のCLを示したもので、ピークはやや遅れて12分前後にみられる。好中球は膜刺激物質によっても酸化代謝が亢進し、 O_2^- 、 H_2O_2 の産生が増加するが、CLも誘発することができる。ミリスチン酸基をもつPMA(phorbol myristate acetate)は強力な膜刺激物質³¹⁾でCLを誘発することができる(図8)が、CGD好中球ではまったくCLがみられない。

Kakinumaら³²⁾は、ミリスチン酸で処理した白血球の産生するCLは 1O_2 のscavengerであるジメチルフランなどで阻害されず、SODやカタラーゼで一部阻害されるため O_2^- 、 H_2O_2 が発光に関与していると推察している。またCGD好中球はミリスチン酸処理にても H_2O_2 生成がみられない³³⁾。Lehmeyerら³⁴⁾はPMAで誘発される O_2^- 産生やCLは Ca^{2+} の影響がみられなかったという。またレクチンであるコンカナバリンA(Con A)は好中球に可逆的に食作用を抑制し、HMPSを促進させる作用がある³⁵⁾が、 O_2^- 放出はわずかである¹³⁾。サイトカラシン(Cyt)族にはA~Fまで知られ

図 8 PMA により誘発される化学発光

図 9 Con A, Cyt E で誘発される化学発光

Con A と Cyt E を同時に添加した場合、CL の cpm がもっとも高く、Cyt E の添加時間がずれるにしたがってピークの cpm が低下する。

図 10 Con A あるいは FMLP で誘発される化学発光

ているが、好中球の O_2^- 放出反応は C, D, E に認められ³⁶⁾、Con A と Cyt E の併用により O_2^- 放出は著明にみられる³⁷⁾。同様の刺激にて CL を誘起することができ(図 9)、Con A 単独でもわずかに CL はみられるがルミノール濃度を $1 \mu M$ に上げると著明となる(図 10)。FMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine) は、それ自身走化因子として作用するだけでなく、好中球のナイロン線維への付着、lysosomal enzyme release、 O_2^- 産生がみられる^{17,18)}が、CL をも誘発する。ルミノール濃度を $1 \mu M$ に上げると図 10 のごとく FMLP では二峰性の CL が認められた。Lehmeyer ら³⁴⁾は

図 11 Ca^{2+} イオノホア A23187 により誘発される化学発光

図 12 グラスバイアル内面に付着により生ずる化学発光

ルミノール濃度 $1 \mu M$ の条件下で、ゼラチンを含む HBSS に 5×10^5 の好中球を浮遊させ、ガラスバイアルに混入すると CL が生じた。17 分後、バイアル内容を他のバイアルに移すとふたたび同様のパターンで CL が生じてきた。一方、空になったバイアルからも依然として CL が証明できた。

FMLP で生じる CL は Ca^{2+} の存在下では約 2 倍増加し、chemotactic peptide で誘起される好中球の respiratory burst に Ca^{2+} が重要な役割を演じていることを指摘している。

Ca^{2+} ionophore A23187 は Ca^{2+} を細胞内へ透過させ、好中球の代謝を促進させる^{39,40)}が、CL も同様に誘発させることができる(図 11)。

以前は好中球の O_2^- 産生あるいは酸化代謝過程の指標として NBT 還元試験が行われ、種々の方法があるが、Gifford らの方法⁴¹⁾はガラス表面へ付着した好中球が NBT 試薬をホルモザンに還元し、そのホルモザン色素を有する好中球の比率を算出する方法である。ゼラチンを含まない HBSS で作成した比較的高濃度の好中球浮遊液をガラスバイアルに入れるだけで、図 12 のような CL が得られる³⁰⁾が、CGD 好中球ではまったく CL がみられない。この CL は好中球がガラス内面に付着するためであり³⁰⁾、そのバイアルを他のガラスバイアルに移し替えると、ふたたび好中球はガラス内面に付着しはじめ、図 12 の×××で示したように CL がみられる。一方、空になったバイアルにも依然として CL が

表 2

	photometer	LSC
ルミノール濃度	約 1 M	0.1~1 μ M
使用好中球数	$10^5 \sim 10^8$	$2.5 \times 10^4 \sim 10^5$
バイアルの暗順応	不 要	ある程度必要
測定時間	10~15分	30~60分
測定検体数	1 検体	4~7 検体
検体容量	600 μ l	4~5 ml
記録計接続	容 易	不 可
測定温度	室 温	室 温

証明できる。バイアル内面に付着することにより誘発される CL は、シリコン処理バイアルでは 1/4 に、プラスチックバイアルではまったくみられない。また、ゼラチンやアルブミン添加により完全に阻害され、SOD やアザイドにてザイモサン食食時の CL と同程度の抑制がみられた。

LSC による CL は、ルミノール無添加で $5 \times 10^6 \sim 10^7$ 個の好中球で測定可能²³⁾であるが、Chem-Glo photometer ではまったく不可能である。このように LSC は感度が良好であるため、ルミノール添加の系では好中球がガラスバイアルに付着し、その際生じる酸化代謝過程の亢進を CL でとらえることができ、好中球付着能の検査に用いることができる。

以上、ルミノール添加による CL 測定について述べたが、aminco Chem-Glo photometer と LSC (model LS-100C, Beckman Inst.) での条件、操作の違いを表 2 に示した。

まとめ

ヒト好中球の CL 測定は 1972 年 Allen らの報告¹⁹⁾が最初で、この CL は HMPS 活性と相関し、食食過程で産生された $^1\text{O}_2$ が細菌に作用し excited carbonyl group が生じ、dioxetan を経て基底状態に戻る際 photon を放つためだと推測した¹⁹⁾。好中球は食食に伴い NADPH 酸化酵素の活性化により O_2^- が産生されるが、表 1 に示したごとく非酵素的にも $^1\text{O}_2$ が生成されると考えられている。また Krinsky は Klebanoff の提唱した $\text{MPO-H}_2\text{O}_2$ -ハロゲン系¹²⁾より $^1\text{O}_2$ が生成されると示唆した。しかし、好中球の酸化代謝過程で $^1\text{O}_2$ が産生されるか否か議論の余地があり、CL の発光スペクトルの解析⁴³⁻⁴⁶⁾から $^1\text{O}_2$ 産生の確かな証拠がなく、酸化代謝過程で生じる多くの因子が関与すると思われる。

一方、CL は好中球だけでなく、好酸球、単球、肺胞マクロファージでもみられ、CL 測定は食食あるいは膜刺激時の酸化代謝過程のパラメーターとして利用でき、臨床的に好中球をはじめとする食食細胞の機能検査の一つとして用いられ、とくに CGD の CL は特徴的で診

断的意義が大きい。その他オプソニン活性の測定など応用範囲も広い。

近年ルミノール添加により好中球の微量化が進み、新生児、好中球減少のある患者の好中球 CL の測定も容易となってきた。

CL の測定は研究者により使用好中球数、溶媒など、いくぶんの違いはあるが、経時の変化が観察でき、非常に再現性、客観性があり、迅速かつ経済的な方法である。

文 献

- 1) Klebanoff, S.J.: Semin. Hematol. 12: 117, 1975.
- 2) 辻 芳郎・他：西日皮膚 43: 375, 1981.
- 3) Quie, P.G., et al.: N. Engl. J. Med. 278: 976, 1968.
- 4) Mandell, G.L.: Infect. Immun. 9: 337, 1974.
- 5) Henson, P.M.: Immun. Commun. 5: 757, 1976.
- 6) 楊井正紀・他：小児科 22: 471, 1981.
- 7) Karnovsky, M.L.: Semi. Hematol. 5: 156, 1968.
- 8) Babior, B.M., et al.: J. Clin. Invest. 52: 741, 1973.
- 9) Root, R.K., et al.: J. Clin. Invest. 60: 1266, 1977.
- 10) Kellogg, E.W., et al.: J. Biol. Chem. 250: 8812, 1975.
- 11) Arneson, R.M.: Arch. Biochem. Biophys. 136: 352, 1970.
- 12) Klebanoff, S.J.: J. Bacteriol. 95: 2131, 1968.
- 13) 中川原章・他：代謝 14: 985, 1977.
- 14) 竹重一郎・他：代謝 17: 1719, 1980.
- 15) Simchowitz, L., et al.: J. Lab. Clin. Med. 93: 583, 1979.
- 16) Lehmeyer, J.E., et al.: Blood 54: 35, 1979.
- 17) Boxer, L., et al.: J. Lab. Clin. Med., 93: 506, 1979.
- 18) Simchowitz, L., et al.: J. Lab. Clin. Med. 94: 403, 1979.
- 19) Allen, R.C., et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 47: 679, 1972.
- 20) Quie, P.G., et al.: Prog. Hematol. X: 193, 1977.
- 21) Stjenholm, R.L., et al.: Infect. Immun. 7: 313, 1973.
- 22) 辻 芳郎・他：医学のあゆみ 102: 161, 1977.
- 23) 楊井正紀：臨床血液 20: 372, 1979.
- 24) Allen, R.C., et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 69: 245, 1976.
- 25) Van Dyke, K., et al.: Microchem. J. 22: 463, 1977.
- 26) 神谷 功：化学発光. 講談社, 1972, p 50.
- 27) 楊井正紀・他：医学のあゆみ 112: 594, 1980.
- 28) 森 剛一・他：Photomed. Photobiol. 2: 67, 1980.
- 29) 楊井正紀・他：J. Med. Enzymol. 3: 165, 1979.
- 30) Yanai, M., et al.: Infect. Immun. 32: 1181, 1981.

- 31) DeChatelet, L.R., et al.: Blood 47: 545, 1976.
- 32) Kaminuma, K., et al.: FEBS Lett. 102: 38, 1979.
- 33) Kakinuma, K.: J. Biochem. 86: 93, 1979.
- 34) Lehmeyer, J.E., et al.: Blood 54: 35, 1979.
- 35) Romeo, D., et al.: FEBS Lett. 42: 90, 1974.
- 36) Nakagawara, A., et al.: Exp. Cell Res., 101: 225, 1976.
- 37) Nakagawara, A., et al.: Clin. Chim. Acta 74: 173, 1977.
- 38) Hatch, G.E., et al.: J. Exp. Med. 147: 182, 1978.
- 39) Romeo, D., et al.: Nature 253: 542, 1975.
- 40) Schell-Frederick, E.: FEBS Lett. 48: 37, 1974.
- 41) Gifford, R.H., et al.: J. Lab. Clin. Med. 75: 511, 1970.
- 42) Krinsky, N.I.: Science 186: 363, 1974.
- 43) Cheson, B.D., et al.: J. Clin. Invest. 58: 789, 1976.
- 44) Andersen, B.R., et al.: Infect. Immun. 17: 62, 1977.
- 45) Ushijima, Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 93: 1232, 1980.
- 46) Ushijima, Y., et al.: J. Appl. Biochem. 2: 138, 1980.