呼吸器感染症と末梢白血球のルミノール依存性化学発光

小橋 修・切石淳子・小橋悠紀子・石橋正文・村西寿一・重松信昭*

Luminol-dependent chemiluminescence of human peripheral leukocytes among infectious diseases of the lung
 Osamu Kohashi・Junko Kiriishi・Yukiko Kohashi・
 Masabumi Ishibashi・Hisakazu Muranishi・Nobuaki
 Shigematsu*

近年、高齢化につれ、感染防御能の低下に基づく呼吸器感染症が増加している。抗癌剤、副腎ステロイドホルモン、免疫調節剤の頻用によっても、重篤な感染症を誘発することが知られている。感染防御能がどの程度保たれているか、亢進しているのか、正常なのか、低下しているのか、を知ることはきわめて重要である。免疫機能、補体量の測定に関しては、多くの検査が日常化しており、詳細な情報が得られる。しかし、抗体や補体が十分に存在していても、慢性肉芽腫症や MPO 欠損症にみるように重篤な感染症に罹患する。このことは、感染防御能の担い手である食食細胞の殺菌能力の重要性を示唆している。かかる殺菌能との関係において、近年、食食細胞の示す活性酸素の重要性が注目されている。特にルミノール依存性の化学発光の強さが食食細胞の殺菌能とよく相関することが報告されている。この方法は、食食機能や殺菌能を直接調べる方法に比べて、簡便で、迅速であることから、臨床への応用が期待されている。この方法を感染症の補助診断法として用いるうえでの問題点、注意点、意義などについて報告する。

方法と材料

(1) 試薬

ルミノール、PMA (phorbol myristate acetate), DMSO (dimethyl sulfoxide) などは Sigma 社のものを使用した。保存試薬としてルミノール (20 mg/ml of DMSO), PMA (20 mg/ml of DMSO) を -20°C に保存し、用時、前者は DMSO にて10倍に希釈し、PMA はリン酸緩衝液にて4倍に希釈して用いた。

(2) 血液および血球成分の分離

ヘパリン加静脈血か動脈血を患者に固定した時間 (±60分) に採血し、ただちに氷づけにした。所定の方法で dextran に比べ室温に 30~40 分静置後、デキストラン層

(Dx) と赤血球を分離し、Dx 層はそのままリンパ球分離液 (LSM) に重層し、室温で 1,500 rpm, 30分遠心した。リンパ球、単球 (LM) 層と多形核白血球 (PMN) 層を分離した。LM, PMN はともにハンクス液 (HBSS) に浮遊させ、細胞数を計測した。これらの細胞はすべて氷上に保存した。

(3) CL 値の測定

細胞浮遊液 10 μl を HBSS 490 μl に加え、ただちにルミノール 10 μl を加えたのち、Biolumat 9700 LB (37°C) にセットし、5分後に PMA 10 μl を加え、30分間計測した。peak 値の3分間の値を CL 値とした。ルミノールや PMA の濃度は健康人の血球成分で、dose-response curve をつくり、peak 値をもたらしプラトー近辺の濃度を用いた。

結果と考察

(1) CL 値の日内変動と血球分離から測定までの経時変動

前回報告したように、CL 値は日内変動が著しいため、各個人で採血時間を一定にすることによって測定した。また、血球を分離してから CL 値測定までの時間によっても2倍以上の変動が示されるので、分離後速やかに CL を測定し、採血時間と測定時間とを記録した。

(2) 全血法と分離血球の CL 値の比較

全血 10, 50, 100, 250 μl にそれぞれ HBSS を490, 450, 300, 250 μl を加え CL 値を測定した。PMN の場合も同様にして測定した。図1に示すように PMN はその細胞数と CL 値とのあいだにきれいな dose-response が得られたが、全血法では、むしろ赤血球および血清による抑制がみられた。

(3) CL 値の赤血球および血清による抑制

上記の PMN 液に赤血球 (RBC) を 0.1, 1, 10% になるように加えて CL 値を測定した。図2に示すように 0.1~1% では CL 値の抑制は認められなかったが、10% の RBC の存在で CL 値は約 50% の抑制がみられた。図には示していないが、等量の溶血赤血球を用いてもまったく同等の抑制がみられた。この抑制の本態は検討中である。一方、全血法の場合、10 μl と 100 μl とを同時測定して比較すると図3のように3つの型に分かれた。すなわち CL 値が① 10 μl > 100 μl , ② 10 μl $\approx$ 100 μl と

* Research Institute for Diseases of the Chest,
 Faculty of Medicine, Kyushu University 九州大
 学医学部付属胸部疾患研究所

図1 dose response curve of CL

図2 inhibitory effect of red blood cells on luminol-dependent chemiluminescence of PMN

③ $10 \mu\text{l} < 100 \mu\text{l}$ である。①の型のヒトの血清を③のPMNに加えると血清の量に依存性の抑制が観察された。このことは血清中にCL値を抑制する因子のあることを示唆している。

(4) 呼吸器感染症とCL値との関係

胸膜炎（結核性または一般細菌感染）の急性期には発熱、白血球増加、ESR亢進、CRP亢進などの急性反応が認められたが、末梢白血球のCL値も著明に亢進した。急性炎症の消退とともにCL値も正常化された(図4)。一方、慢性気道感染症の急性増悪期も同様にCL値の亢進を示した。慢性期では、常時高値を示す群と、正常値を示す群とに分かれたが、いずれも増悪期には慢性期の値より亢進したCL値を示した。さて、CL値は、感染症のみでなく、過敏性肺炎や肺癌の末期、大動脈瘤剝離などにおいても亢進した。肺線維症やサルコイドーシスなどでは正常値を示す人が多かった。

感染症以外の疾患における末梢白血球のCL値の亢進と急性感染症時のCL値とのあいだの差異の有無に関しては今後さらに症例を増やして検討しなければならない。ルミノール依存性の化学発光(CL)は、貪食細胞が

図3 comparison of CL of whole blood between 10 and $100 \mu\text{l}$

図4 pulmonary tuberculosis

その膜を刺激されたときに起こる一連の活性酸素代謝の過程で生ずるものとされている。特に H_2O_2 の量を反映しているとされている。この一連の代謝系に及ぼす各種薬物の効果を調べるうえにもきわめて有用な方法である。今回は刺激物としてPMAのみについて報告したが、オプソニン化 zymosan や FMLP などを用いると、さらに多くの情報が得られ、現在検討中である。