好中球活性化の刺激物特異性の検討

—感染症における好中球化学発光を用いて—

尾崎由基男・米山彰子・東原正明・岩田純一・大橋辰哉*

Stimulator-specific activation of neutrophils in infection
 Yukio Ozaki・Akiko Yoneyama・Masa-aki Higashihara・
 Jun-ichi Iwata・Tatsuya Ohashi*

感染症、外傷などの炎症性疾患において、種々の好中球機能が亢進することが明らかにされている^{1,2)}。しかし、これまでの報告においては、使用された好中球刺激物質は1種類の場合が多く、刺激物による反応の相違は検討されていない。われわれは好中球ルミノール化学発光 (CL) を用い、各種刺激物質に対する健康人、感染症患者の好中球の反応を検討した。その結果、細菌感染症において好中球の活性化が刺激物特異的に起きていることを見いだしたので、報告する。

(1) 方法

健康人34例、細菌感染症患者24例の検体について測定を行った。患者は、胆嚢炎、腎盂腎炎、化膿性腹膜炎、肺炎など臨床症状より細菌感染症とほぼ断定できるもののみを選んだ。臨床データはCL測定の前後2日以内のものを使用した。

(2) 白血球浮遊液の作成

血沈用チトラート10%を加えた末梢血に対し、6% dextran in PBS を30%添加し、室温で1時間放置した。その上清を2回洗浄し、HEPES buffer (NaCl 148 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1.2 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4) に、白血球 $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように作成した。

白血球化学発光 (CL) は Analytical Luminescence 社製 Monolight 401 photometer を用いた。polyethylene vial に細胞浮遊液 500 μl 、 10^{-4} M luminol (in HEPES buffer) 500 μl および 100 mM CaCl₂ 20 μl 加え、Monolight 401 photometer の測定 cell にセットした。5分間 baseline CL を測定したのち、好中球刺激剤を加え、それより10分間の CL を測定した。CL は photometer に励起される voltage で示され、各検体の CL 値としては peak intensity を使用した。また、検体中にはリンパ球も含むため、白血球分画より好中球の割合を求め、CL 値を補正した。好中球刺激物質としては、n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 10^{-7} M, phorbomyristate acetate (PMA) 20 ng/ml, A 23187 2×10^{-7} M, platelet activating factor (PAF) 10^{-6} M を使用した (最終濃度)。

結果と考察

まず最初に、各刺激剤が同様に好中球を活性化するか否かについて検討した。各検体における CL 値を、刺激

図1 fMLP 10^{-7} M, A 23187 2×10^{-7} M により誘起された好中球化学発光 (CL) の相関図

図2 fMLP 10^{-7} M および PAF 10^{-6} M により誘起された好中球化学発光の相関図

剤ごとに比較し、相関関係をみた。fMLP と A 23187 によって誘起される CL の相関を検討すると、全般的には両者とも健康者では低く、細菌感染症患者では高値を示す傾向がみられた。しかし、A 23187 で高値を示すが fMLP では低値の症例もかなりあり、相関係数は 0.57 と強い相関はなかった (図1)。fMLP と PMA により誘起される CL は、fMLP と A 23187 より強い相関を示したが、やはり PMA の CL が高いが fMLP が低値を示す症例が散見された。fMLP と PAF により誘起される CL を比較すると相関係数 0.82 と強い相関を示した (図2)。A 23187 と PMA による CL は、相関係数 0.56 と低く、他のどの組み合わせより相関が弱いことが示された。

以上の結果より、fMLP と PAF による好中球活性化はほぼ同様の傾向を示し、以下 fMLP と PMA, fMLP と A 23187 となるにしたがい異なる場合も多いことが示された。すなわち、好中球が活性化される場合、すべての刺激物質に対する反応がすべて亢進するのではなく、

* The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo 東京大学第一内科学教室

図3 健康者および感染症患者における好中球化学発光 (CL)

- A : fMLP 10^{-7} M による健康者由来の好中球 CL
 B : fMLP 10^{-7} M による感染症患者由来の好中球 CL
 C : A 23187 2×10^{-7} M による健康者由来の好中球 CL
 D : A 23187 2×10^{-7} M による感染症患者由来の好中球 CL

ある程度選択的であることが明らかになった。

この現象は、使用した各刺激物質の好中球活性化機構が異なることに由来するのかもしれない。細菌膜の analogue としても使用される fMLP は好中球膜上の receptor に結合して好中球を刺激し、また PAF も同様の機序が想定されている。PMA はやはり好中球膜に receptor があるとされているが、外液中の Ca イオンの有無によらず好中球の活性化が起こるとか、C-kinase を直接活性化することが知られており fMLP とは異なる機構で好中球を活性化するらしい。A 23187 は Ca ionophore であり、細胞内に直接 Ca イオンを導入することにより好中球を活性化させる。これらの異なる活性化機構をもつ刺激物質による好中球活性化の度合いが異なるということは、リンパ球などと同様に好中球の活性化が抗原特異的である可能性を示唆するものであり、重要な問題と思われる。

つぎに、健康人と細菌感染症患者の2群について、各刺激物質による CL 値を比較した。fMLP による CL 値は健康人群中で平均22.4、感染症群で平均129.4と有意に感染症群で増加していた(図3)。A 23187 による CL 値は健康人群中で平均135.6、感染症群で平均231.8と感染症群で増加していたが、fMLP ほどの差は認められなかった。健康人群中、感染症群ともに、低値より高値までの症例が混在し、A 23187 による CL 値より感染症の有無を推定するのは困難と思われた。PMA による CL 値は、感染症群で有意に高値を示したが、fMLP ほど顕著ではなかった。このように感染症において fMLP による CL 値がかなり特異的に増加することが示された。われわれはこの fMLP による CL の増加が receptor を介しての刺激に対して反応しうる好中球の能力、A 23187 による CL が全体として好中球の反応しうる能力を示すと考

図4 発熱と好中球化学発光との関連
 slight fever は 37.5°C , moderate-high はそれ以上の発熱を示す。

え、fMLP による CL を A 23187 による CL で割り (fMLP/A), これにより再検討を加えた。この操作により、よりいっそう刺激物質特異的な活性化が顕著になること、また検体中に混在する赤血球による CL の阻害の影響を除くことを期待した。fMLP/A は、fMLP による CL と同様、感染症で著明に増加しており、fMLP による CL より、バラつきの少ない傾向があった。

つぎに臨床データと fMLP/A との関係を検討した。fMLP/A は発熱が高度になるほど増加する傾向があった(図4)。CRP は(±)~(1+)群で有意に増加していたが、(2+)以上でさらに増加する傾向はなかった。血沈、白血球数との関係もみたが、前2者ほどの有意な差は認められなかった。fMLP による CL の増加を起こす因子と発熱を起こす因子とのなんらかの関係が示唆される。

今回のわれわれの実験結果より、好中球はどの刺激物質に対しても同様に活性化されるわけではなく、ある程度刺激物質特異的に活性化されていることが示された。リンパ球の免疫応答にあるごとく、好中球もまた抗原特異的に活性化される可能性が示唆される。また、発熱、白血球増加、CRP 陽性、血沈亢進などの症状を示す患者において、刺激物質を何種類か使用し、CL 値をみることにより、感染症か否かの診断がつけられる可能性が示された。

文 献

- 1) Barbour, A.G., et al.: Chemiluminescence by polymorphonuclear leukocytes from patients with active bacterial infection. J. Infectious Diseases 141(1): 14-26, 1980.
- 2) McCarthy, J.P., et al.: Differential alterations in host peripheral polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence during the course of bacterial and viral infection. Infection and Immunity 30 (3): 824-831, 1980.