新生児期における好中球スーパーオキシド産生能

高田 哲・佐野公彦・小村三代治・中村 肇・松尾 保*

Superoxide production by neutrophils in neonates

Satoshi Takada・Kimihiko Sano・Miyozzi Komura・
Hajime Nakamura・Tamotsu Matsuo*

新生児期の好中球機能については、比較的多量の血液を必要とすることから、いまなお不明な点が多い。最近、Yegin ら¹⁾は、新生児期の好中球 chemotaxis が、成人に比し低値をとることを報告している。一方、スーパーオキシド (O_2^-) 産生能についてのこれまでの報告の多くは、組織化学的 NBT 還元能試験法、または chemiluminescence 法 (CL) を用いて行われており、必ずしも定量的とはいえない。今回われわれは、新生児の好中球 O_2^- 産生能を、中河原ら²⁾の方法を一部改変し、微量の血液による測定法を開発したので、その方法および結果を報告する。

方法と材料

図1は、測定方法を示す。ヘパリン血 0.2 ml を 6% デキストラン 0.05 ml と混和後30分間静置し、白血球を分離した。白血球浮遊血漿 20 μ l を、2.5 mM glucose および 40 μ M cytochrome C を含む phosphate buffered saline (+) 液 1.45 ml に加え、37°C 恒温槽、攪

図1 方法

拌装置を内蔵した2波長分光光度計セルホルダー内にて3分間プレインキュベートした。ついで 5 mg/ml concanavarin A 20 μ l を添加し、さらに5分間インキュベートしたのち、1 mg/ml cytochalasin D 10 μ l を加え、550~540 nm での吸光度変化を記録した。同時に、白血球浮遊血漿中の白血球数算定、白血球分類を行い、好中球 10^6 個当たり1分間に生成される O_2^- 量を算出した。バッファー中の好中球数は、新生児血では、およそ $1.0 \sim 1.5 \times 10^5$ 個/ml となり、この範囲では、 O_2^- 産生量は好中球数に比例した。

図2は、好中球 O_2^- 産生の反応曲線を示す。cytochalasin D 添加後、若干の lag time があり、cytochrome C の還元速度が、ほぼ一定となる添加後2分から5分までの吸光度変化により、 O_2^- 産生量を求めた。この反応は、super oxide dismutase を加えることにより完全に阻害されることから cytochrome C が、 O_2^- により還元されていることを確認した。

対象

神戸大学医学部付属病院母子センターおよび国立神戸病院に入院した生後6日目までの在胎37週以上、出生体重 2,500 g 以上の成熟新生児24例、うち感染のある児8例を対象とした。感染症の診断には、臨床症状、胸部X線像、CRP 値、血液髄液培養結果を指標とした。また、神戸大学小児科のスタッフ7名より採血し、健常成人値とした。

図2 好中球 O_2^- 生成反応

* Department of Pediatrics, Kobe University School of Medicine 神戸大学医学部小児科学教室

図3 好中球 O_2^- 生成に及ぼす血漿添加の影響
PBS (2.5 mM glucose, 40 μ M cytochrome C) に浮遊させた同一好中球検体に血漿を添加し、その影響を調べた。矢印は、われわれの方法での血漿含有量を示す。

結 果

① 血漿成分の測定値に及ぼす影響：分離した好中球成分に各種濃度の血漿を添加し、好中球 O_2^- 産生能を検討したところ、血漿量の増加に伴い O_2^- 産生能の低下を認めた。白血球浮遊血漿を用いた場合に含まれている血漿量では約20%の低下を示した(図3)。

② 好中球 10^3 個当たりの O_2^- 産生量は、生後72時間以内の新生児 7.9 ± 2.5 n mol/min, 72時間～168時間の新生児 13.1 ± 3.0 n mol/min, 成人 15.1 ± 4.4 n mol/min と生後72時間以内に測定した群では、それ以後に測定した群および成人に比し明らかに低値を示した(図4)。

③ 生後72時間から生後168時間までに測定した正常児と感染児の好中球 O_2^- 産生量を比較したところ、正常児群での測定値 13.1 ± 3.0 n mol/min に対し、感染児群では、 8.4 ± 4.4 n mol/min と有意に低値を示した($P < 0.025$)(図5)。

考 察

新生児期の好中球機能については不明な点が多い。好中球 O_2^- 産生能の日齢に伴う変化について検討した報告はない。また、成人においては、感染時に、好中球 O_2^-

図4 日齢による好中球 O_2^- 生成の変化

図5 感染が好中球 O_2^- 生成に及ぼす影響(生後72時間～168時間)

産生能が上昇することが知られている³⁾が、今回の新生児に関する結果では、むしろ低値を示しており興味深い。Shigeoka ら⁴⁾は、CL法を用い、異常新生児では、正常児に比べ zymosan に対する反応性に乏しいことを報告している。一方、刺激物質による違いも報告されており⁵⁾、新生児の O_2^- 産生能に関しては意見の一致をみていない。本測定においては、試料の微量化のため白血球浮遊血漿を用いている。そこで含まれる血漿成分の影響をみたところ、血漿成分の存在により O_2^- 産生能は約20%の低下を示したが、異なる血漿を添加してもほぼ同じ程度の抑制を示し、血漿成分の影響を無視しうるものと考えた。本法を用いることにより簡便に好中球 O_2^- 産生能を測定しうることは、採血量に制限のある新生児における好中球機能の測定を可能にし、新生児期の感染防御機構の解明に有用と考えられる。

文 献

- 1) Yegin, O.: *Pediatr. Res.* 17: 183-187, 1983.
- 2) Nakagawara, A., et al.: *Clinica Chimica Acta* 74: 173-176, 1977.
- 3) Barbour, A.G., et al.: *J. Infect. Dis.* 141: 14-26, 1980.
- 4) Shigeoka, A.O., et al.: *J. Pediatr.* 95: 454-460, 1979.
- 5) Shigeoka, A.O., et al.: *J. Pediatr.* 98: 392-398, 1981.