膜蛋白欠損を伴う好中球粘着異常

小林邦彦・藤田京子・梶井 正*

A neutrophil adhesion abnormality associated with a deficiency in neutrophil membrane proteins

This paper describes a sister and brother with recurrent infections resulting from an adhesion defect of neutrophils due to a deficiency in neutrophil membrane proteins.

Neutrophil function tests of both patients revealed a gross reduction in adhesion and chemotaxis and to a lesser extent in phagocytosis. Their parents' neutrophils showed a mild reduction in adhesion. Analysis of membrane proteins by conventional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis disclosed a total deficiency of 110 K glycoprotein (gp 110) in neutrophils of the siblings and a 50% reduction in those of the parents. These results indicate that the disease was inherited in an autosomal recessive fashion.

The patients' neutrophils attached on a glass surface showed a considerable reduction of pseudopods compared to a normal control, whereas when suspended in an aqueous solution, they showed normal morphological changes in reaction to a chemotactic factor, a finding indicating that their neutrophils have a normally functioning cytoskeleton. A polyclonal rabbit antiserum to the deficient membrane proteins identified yet another membrane protein, p 98, in addition to gp 110, deficient in the patients' neutrophils. The polyclonal antiserum showed a strong inhibitory activity against adhesion and chemotaxis and to a lesser extent against phagocytosis of normal neutrophils, a finding indicating that the membrane proteins deficient in the patients' neutrophils are essential in adhesion of the neutrophils.

Kunihiko Kobayashi・Kyoko Fujita・Tadashi Kajii*

* Department of Pediatrics, Yamaguchi University School of Medicine

key words : *neutrophil, adhesion, chemotaxis, membrane-protein*

好中球の膜蛋白の欠損と、好中球の粘着能、遊走能、および貪食能の低下、反復する細菌感染を呈する男児例を、1980年、Crowley ら¹⁾ がはじめて報告した。引きつづき、1982年に Bowen ら²⁾ は、同様の疾患をもつ男児と女児の2例を報告した。この疾患の臨床的な特徴は、生後まもなくからみられる反復する細菌感染、感染部の非膿瘍形成、臍帯脱落遅延、持続する歯肉炎と末梢血の著明な白血球増多である。

筆者らは、3カ月の女児に本疾患を見だし、すでに報告した³⁾。その後、生れた弟が同一疾患に罹患していたことから、この両者について、その臨床像、好中球機能検査、好中球膜蛋白分析、好中球の形態、その欠損膜蛋白に対する抗体の作製と、その好中球機能に対する影響を検索した。

〔症例1〕 現在3歳の女児。母34歳、父41歳時の第一子。

両親の血族関係はない。生後まもなくから皮膚の緑膿菌感染を繰り返し、3カ月時、臍部の発赤腫脹がつづくため、当科受診。末梢白血球数 $114,900/\text{mm}^3$ と著増、分類では75%の多核球、12%の桿球、9%の単球と4%のリンパ球だった。軽度の低色素性貧血があり、肝脾腫を認めた。骨髓穿刺では、hypercellular marrowで、ME比23.9:1だったが悪性細胞なく、46%は多核球だった。

免疫グロブリンはIgG、IgA、IgMが増加していたが、C₃、C₄は正常。臍部の発赤腫脹は抗生物質治療で効果をみないため、外科的に尿管管遺残部を切除し、その後抗生物質の治療で軽快した。その後も、ブドウ球菌、緑膿菌による蜂窩織炎、中耳炎、呼吸器感染を繰り返している。

〔症例2〕 1歳男児。症例1の弟。

生後2日目から胸部と腋窩にブドウ球菌による膿瘍がみられた。その後も、発熱と非膿瘍形成の皮膚感染を繰り返した。臍帯脱落は5週目で遅延していた。3カ月時、緑膿菌による難治性の肛門周囲膿瘍をきたした。こ

* 山口大学医学部小児科学教室

表 1 neutrophil function tests

source of cells	chemotactic differential (mm)	adhesion (%)		phagocytosis (yeast/100 neutrophils)	nitroblue tetrazorium test (Δ OD)
		nylon fiber	plastic dish		
age matched control	1.36	Not done	64.5	1,004	0.50
patient 1	0.17 ↓	12.5 ↓	4.6 ↓	302 ↓	0.77
patient 2	0.12 ↓	23.5 ↓	9.6 ↓	195 ↓	0.60
adult control	1.51	94.7	94.0	947	Not done
father	1.51	19.6 ↓	80.4 ↓	604 ↓	Not done
mother	0.91 ↓	43.8 ↓	76.2 ↓	917	Not done

図 1 位相差顕微鏡，走査電顕でみた好中球の粘着状態
a・c・eは〔症例2〕，b・d・fは正常対照の好中球，a・bはプラスチック面への粘着（anchoring）で，位相差顕微鏡所見，c～fはガラス面への粘着の走査電顕像，c・dとe・fと拡大率が異なる。

のころから軽度の肝脾腫を認めた。末梢白血球数は，常に増加しており，24,000～70,600の間にあった。その後も反復する皮膚感染を繰り返している。

材料と方法

(1) 好中球とリンパ球の分離

ヘパリン加採血液から，Ficoll-Hypaque 遠心法とデキストラン法で，好中球とリンパ球を分離した。一部リンパ球は EB ウイルスでライン化した。

(2) 好中球機能検査

① 粘着能：プラスチック表面への粘着状態（ancho-

ring）の検索は，Crowley ら¹⁾の方法で行い，位相差顕微鏡下で500細胞中，anchoringを示す細胞数の％であらわした。nylon fiber法は，MacGregor ら⁴⁾の方法によった。

② 遊走能：N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) を chemotactic factor に使い，agarose plate 法⁵⁾および Boyden-chamber 法⁶⁾で行った。

③ 貪食能：イースト菌を用いて Miller & Nilsson の方法⁷⁾で行った。

④ 殺菌能：ブドウ球菌を用いて Quie の方法⁸⁾で行った。

図2 浮遊球の形態変化(走査電顕)
a・c・eは〔症例2〕, b・d・fは正常対照

図3 SDS-PAGE(左)と immuno-blotting(右)でみた好中球膜蛋白
F:父, C:正常対照, M:母, B:弟〔症例2〕, S:姉〔症例1〕
110K(矢印)は, 分子量110K蛋白の泳動位置を示す, immuno-blotting(右)では, 正常好中球は110Kのほか, 98Kの太いbandがみられる, 110K, 98Kは両親で減少, 患児で欠損している。

図4 リンパ球膜蛋白の解析

1: 正常好中球, 2: 患者リンパ球〔症例2〕, 3: 正常リンパ球.
左半は SDS-PAGE で, 右半は immuno-blotting. 正常リンパ球では95Kの band がみられるが, 患児では欠損している.

⑤ NBT還元能: Gifford⁹⁾ のスライド法および Okamura¹⁰⁾ の定量法を用いた.

(3) 膜蛋白の調整と分析

好中球またはリンパ球を $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8/\text{ml}$ に PBS で調整し, 0.1 M の diisopropylfluorophosphate (DIPF) を細胞浮遊液 1 ml 当り $50 \mu\text{l}$ 加え, 0°C 10 分放置した. ついで 4°C 10 分 $250 \times g$ で遠心し, PBS で洗浄後細胞を $1 \times 10^8/\text{ml}$ に調整し, Nonidet P-40 (NP-40) と phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) を終濃度 0.5 % と 2 mM に加え, 0°C 15 分放置後, $105,000 \times g$ で遠心し, 上清を膜蛋白分画として採取した.

(4) SDS-polyacrylamide 電気泳動法 (SDS-PAGE)

高さ 85 mm, 幅 135 mm, 厚さ 2 mm の slab gel で Laemmli¹¹⁾ の法で行った.

(5) immuno-blotting 法

SDS-PAGE 後, 蛋白バンドを ニトロセルロース膜に electrotransfer し, ついで ニトロセルロース を膜蛋白に対する抗体と反応後, HRP (horseradish peroxidase) ラベル 2 次抗体と反応, 発色させた.

(6) 膜蛋白に対するウサギ抗体の作製

患者好中球の欠損膜蛋白に相当する膜蛋白を, 正常好中球から分画するため, 正常好中球膜蛋白を SDS-PAGE し, 欠損部分に相当するバンドを切りだし, 水で抽出後, 凍結乾燥した. この抽出蛋白でウサギを免疫し, 得られた抗血清は, [症例1] と [症例2] の膜蛋白で吸収

図5 ウサギ抗欠損膜蛋白抗体の正常好中球機能に対する効果

した. 吸収後の抗血清を硫酸分画し IgG を得た.

(7) 走査電顕

好中球をカバーガラスに付着させた状態と試験管内に浮遊した状態でそれぞれ固定後, 常法に従って走査電顕試料とした.

結 果

(1) 好中球機能検査

表1に, 患者姉弟と両親および正常人についてまとめで示す. 患児は, 姉弟とも粘着能, 遊走能にいちじるしい低下を示した. 貪食能も低下していた. 両親はともに粘着能に明らかな異常を示した. 特に, nylon fiber 法に顕著な低下を示した. なお, NBT還元能, 殺菌能には異常はなかった.

(2) 形態学的検索

好中球のプラスチック表面への粘着 (anchoring) と, ガラス面への付着状態を形態学的に検索したものを図1

に示す。プラスチック面への粘着は患児〔症例2〕では、辺縁が円く（a）、正常の不規則な形態（b）と明らかに異なっていた。

ガラス面付着を走査電顕でみると、患児（c, e）は、正常対照（d, f）に比し、明らかに偽足の突出が少なく、胞体の一部はガラス面から遊離している像もみられた。浮遊状態の細胞の微細構造を図2に示すが、患児（a, c, e）と正常（b, d, f）は、形態上差は認めなかった。また、fMLP に対して、遊走を示す像は、患児（e）と対照（f）ともに認められた。

以上から、患児好中球は fMLP に対して反応を示し、正常細胞と同様に形態変化を起こすことが示された。すなわち、患児好中球は、fMLP レセプターを有し、また細胞内 microtubulus, microfilament などの機能は正常にたもたれていることを示す。

（3）好中球膜蛋白の電気泳動解析

図3左に、SDS-PAGE を示す。患児姉（S）、弟（B）の膜蛋白では、分子量11万（110K、矢印）の band が欠損していた。父（F）と母（M）では、この band は正常（C）にくらべ、明らかに淡く、その減少が認められた。densitometer による本 band の定量を試みたところ、両親では正常の約50%を示した。

（4）抗体の作製とそれによる膜蛋白の解析

ウサギで作製した抗体を用いて、immunoblotting 法で膜蛋白の解析をした（図3右）。本抗体は、患児の好中球膜蛋白とはまったく反応しない（図3右 B・S）が、正常膜蛋白とは2本の band（110K と 98K）と反応した（図3右 C）。この2本の band は両親にも認めたが（図4右 F・M）、正常に對し明らかに減少していた。

以上から、患児の好中球は、この2本の band に相当する蛋白が完全欠損し、両親はともに減少していることが明らかとなった。2本のうち、98K は、SDS-PAGE では、その欠損が判別できないが（図3、左）、抗体を用いることではじめて同定しえた膜蛋白である。

（5）リンパ球膜蛋白と抗体の反応性

この抗体は、リンパ球と反応させると、正常では95Kの部分に1本の band を認めた。この band は、患児のリンパ球には欠損していた（図4）。この band は、正常人のTおよびBリンパ球に共通に存在していた。

（6）患児Bリンパ球の凝集性異常

正常のBリンパ球はEBウイルス添加で培養すると、細胞は凝集塊を形成して増殖する。患児のBリンパ球を同一条件で培養すると、細胞は凝集を示さず、まったく free cell の状態で増殖を示した。

（7）抗体の好中球機能に対する影響

患児の好中球機能異常が、欠損膜蛋白と直接関係するか否かをみるため、欠損膜蛋白に対する抗体の正常好中球機能に対する影響を検討した。図5に示すように、抗

体の存在下における粘着能（anchoring）は、加えた抗体の量に比例して急速に低下した。抗体の対照として、正常ウサギ IgG を用いた系では、この低下はまったく認めなかった。この抗体は、正常好中球の遊走能と貪食能にも影響を与えたが、粘着能にもっとも強い阻止効果を示した。抗体の粘着能阻止効果を形態学的に位相差顕微鏡および走査電顕でみると、抗体を作用させた正常好中球は、円型を示し、偽足の突出がほとんど認められず、患児好中球に類似した異常形態を示した。正常ウサギ IgG では、この変化はまったく認めなかった。

考 按

本症の反復する細菌感染は、好中球の粘着異常に起因する遊走能および貪食能低下によるものと考えられる。この粘着能異常の直接的な原因は、この好中球の表面膜蛋白欠損によることは、その蛋白に対する抗体により、正常好中球の粘着能が著明に阻害されることから、明らかである。患者好中球は、遊走能などの細胞の運動に関係する microtubulus や、microfilament, actin などの収縮蛋白や chemotactic factor（fMLP）の反応性に異常はない。したがって、本症の本質的異常は、膜蛋白欠損による粘着異常で、遊走能や貪食能低下は粘着不全による2次的異常である。したがって、本症に欠損する膜蛋白は、粘着に関与する蛋白といえる。本症のBリンパ球は、EB ウイルス下での培養で凝集形成をまったく示さない。また、Bリンパ球にみられた95K蛋白も、粘着に関与する蛋白といえる。好中球でみられた欠損蛋白は、110K と 98Kである。この2種の好中球膜蛋白とリンパ球の95K蛋白との関係は、polyclonal ウサギ抗体では、その異同の検索はできなかった。

筆者らは、monoclonal 抗体の作製を試み、好中球98K蛋白に対する抗体を得ることができた。この抗体は、リンパ球の95Kとも反応したことから、好中球98Kとリンパ球95Kは、同一抗原性をもつ蛋白と考えている。分子量の差は、糖鎖の差によると推測しているが、その同定は今後の課題である。

筆者らの症例は姉弟で、両親は、ともに膜蛋白は50%に減少し、好中球粘着能もともに低下していた。したがって、遺伝形式は常染色体劣性と規定できる。Crowley ら¹⁾と、Bowen ら²⁾の報告した疾患は、X-連鎖性劣性遺伝というが、臨床的にも膜蛋白欠損の点においても、筆者らの症例と同一疾患と思われる。Anderson ら¹²⁾は、8例の同様疾患を検討した結果、常染色体劣性遺伝が妥当としている。

これらの報告にみられる疾患が、すべて同一か否かを決定するには、欠損蛋白の同定が必要である。Dana ら¹³⁾は、好中球膜に主として表現されている種々の膜抗原に対する monoclonal 抗体を用いて、同様の疾患に、

Mo 1 (OKM-1) と LFA-1 という抗原が欠損していることを明らかにした。その後、Springer ら¹⁴⁾は、種々の monoclonal 抗体を駆使し、この疾患の好中球は、少なくとも3種の膜蛋白が欠損していることを見いだした。また、この3種は、それぞれ2本のサブユニットからなる蛋白であり、その1本(β鎖)は、3種に共通であることから、一連の膜蛋白 family に属するもので、もう1本のα鎖の抗原性の差で3種にわけられることが明らかにされた。

筆者らは、彼らから monoclonal 抗体の提供を受け探索したところ、患児姉弟は3種とも欠損していることから、彼らの症例と同一であることを確認した。なお、筆者らの polyclonal なウサギ抗体は彼らの monoclonal 抗体のうち、主としてβ鎖に対する抗体と近似しており、また筆者らの monoclonal 抗体はβ鎖に対するものであることが判明した。したがって、筆者らの同定した好中球の110Kと98K、およびリンパ球の95Kのうち98Kと95Kはβ鎖で、110Kは3種のα鎖のうちのひとつと同定した。

好中球機能異常は、いろいろあるが、その原因、異常の機序の不明なものがある。このような疾患には、今後、免疫生化学的手法で解析することにより、その異常発現の機序が明らかにされるものと信ずる。

文 献

- 1) Crowley, C.A., Curnette, J.T., Roscin, R.E. et al.: An inherited abnormality of neutrophil adhesion. *N. Engl. J. Med.* 302: 1163-1168, 1980.
- 2) Bowen, T.J., Ochs, H.D., Altman, L.C. et al.: Severe recurrent bacterial infections associated with defective adherence and chemotaxis in two patients with neutrophil deficiency in a cell-associated glycoprotein. *J. Pediatr.* 101: 932-940, 1982.
- 3) Kobayashhi, K., Fujita, K., Okino, F., Kajii, T.: An abnormality of neutrophil adhesion: Autosomal recessive inheritance associated with missing neutrophil glycoproteins. *Pediatrics* 73: 606-610, 1985.
- 4) MacGregor, R.R., Spagmuolo, P.J., Lentnek, A.L.: Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, predonisone, and aspirin, measured with an assay system. *N. Engl. J. Med.* 291: 642-646, 1974.
- 5) Nelson, R.D., Quie, P.G., Simmons, R.L.: Chemotaxis under agarose. A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* 115: 1650-1656, 1975.
- 6) Baum, J., Mowat, A.G., Kirk, J.A.: A simplified method for the measurement of chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from human blood. *J. Lab. Clin. Med.* 77: 501-509, 1971.
- 7) Millar, M.E., Nilsson, U.R.: A familiar deficiency of the phagocytosis-enhancing activity of serum related to a dysfunction of the fifth component of complement (C5). *N. Engl. J. Med.* 282: 354-358, 1970.
- 8) Quie, P.G., White, J.G., Holmes, B. et al.: *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J. Clin. Invest.* 46: 668-679, 1967.
- 9) Gifford, R.H., Malawista, S.E.: A simple rapid micromethod for detecting chronic granulomatous disease of childhood. *J. Lab. Clin. Med.* 75: 511-519, 1970.
- 10) Okamura, N., Takano, T., Ishibashi, S. et al.: Sensitive and quantitative nitroblue-tetrazolium test for detecting chronic granulomatous disease. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 2175-2180, 1976.
- 11) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 12) Anderson, D.C.: 私信 (1985)
- 13) Dana, N., Todd III, R.F., Pitt, J. et al.: Deficiency of a surface membrane glycoprotein (Mol) in man. *J. Clin. Invest.* 73: 153-159, 1984.
- 14) Springer, T.A., Thompson, W.S., Miller, L.J. et al.: Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p 150, 95 glycoprotein family and its molecular basis. *J. exp. Med.* 160: 1901-1918, 1984.