急性感染症の指標としての末梢白血球のルミノール 依存性化学発光測定の意義

小橋 修・小橋悠紀子・山口佐和子・村西寿一・宮崎正之・
中西真之・林 真一郎・石橋正文・池田東吾・重松信昭*

Role of whole blood luminol-dependent chemiluminescence on monitoring acute bacterial infections We have tested whether or not luminol-dependent chemiluminescence (CL) of whole blood can be used for monitoring an acute bacterial infection or acute episode of bacterial infection of patients with chronic infectious diseases. This assay has several serious problems to get a reliable and reproducible measurement, for example, diurnal and daily variation, changeable measurement by time after bleeding and contamination of red blood cells and plasma constituents. These shortcomings could be overcome by using 10 μ l of whole blood instead of 100 μ l of it and by measuring it within 30 minutes after bleeding at a certain fixed time for a patient. Acute bacterial infections, such as acute pneumonia or acute pleuritis induced a great increased CL response which turned to the normal level immediately after its recovery. The similar kinetics of CL response was observed at acute episode of patients with chronic infectious diseases. A very good correlation existed between CL response and clinical signs of acute bacterial infections, such as fever, increased erythrocyte sedimentation rate, leukocytosis ($r=0.73$), increased CRP ($r=0.88$). This assay can be used as one of the rapid and simple function tests of leukocytes for monitoring acute bacterial infections.

Osamu Kohashi・Yukiko Kohashi・Sawako Yamaguchi・Hisakazu Muranishi・Masayuki Miyazaki・
Masayuki Nakanishi・Shinichiro Hayashi・Masafumi Ishibashi・Togo Ikeda・Nobuaki Shigematsu*

*Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University

key words: chemiluminescence, bacterial infections, whole blood, CRP, leukocyte test

人口の高齢化とともに、種々の基礎疾患、慢性疾患が増え、かつ抗癌剤、免疫調節剤や抗生物質の使用により、延命は得られたものの、免疫能および感染防御能の低下した、いわゆる immuno-compromised host も増加している。

このような状況のなかで細菌感染症は多様化し、菌交代現象をはじめ、日和見感染症や複合感染症が重要な問題となっている。発熱、白血球増加、CRP 増加をはじめとする急性炎症性反応が観察されたとき、これが感染症によるのか、あるいは基礎疾患の急性増悪によるのかを迅速に決めることは治療方針を立てるうえでたいへん重要である。感染症において、その生体防御の主役として、免疫系の働く以前においても、また免疫系が作動しているときにおいても貪食細胞が重要な働きをしている^{1,2)}。すなわち、貪食細胞は、病原体または抗体および補体でオプソニン化された病原体を貪食し、消化し、代謝することによって生体防御を司っている。さらに、貪食細胞は、T細胞由来のリンホカインによって活性化され、さらに強い生体防御を司る細胞性免疫の担

い手としても重要な働きをしている³⁾。

近年、この貪食細胞の食機能が、細胞膜刺激後の活性酸素産生能とよく相関すると報告されている^{4,5)}。貪食細胞のルミノール依存性化学発光 (luminol-dependent chemiluminescence) (CL) が食機能とよく相関するとされている⁶⁾。筆者らも、この点に着目して当教室の入院患者および外来患者の末梢白血球の CL 値を全血法⁷⁾を用いて検討した。

末梢白血球の CL 値の測定には全血法⁷⁾と分離白血球 (PMN) 法⁹⁾とがあるが、従来より末梢白血球の機能検査として CL 値を用いる場合、いくつかの問題点が指摘されてきた。そのなかでも日内変動があることと採血後 CL 値の測定までの経過時間で大きな変動があること、すなわち再現性に乏しいことなどが指摘されており⁹⁾、このことが CL 値の測定を臨床検査としえない大きな理由であった。筆者らは CL 値の日内変動、採血から測定までの経時変化を詳細に検討し、各個人に決められた時間に採血すること、採血後 CL 値の測定までの時間を一定にし、かつ、採血から測定までの時間を30分以内とすることによって、再現性のよい CL 値

*九州大学医学部胸部疾患研究施設

を得ることができることを見いだした。かくして得られた CL 値は、急性感染症時の発熱反応、白血球増多、急性炎症性蛋白の出現などとよく相関して動くこと、特に臨床検査において要求される簡便さと、迅速性においてすぐれていることを見いだしたので報告する。

対象と方法

(1) 対象

九州大学医学部附属胸部疾患研究施設呼吸器科入院中の患者、外来患者合計60名を対象にし、対照健康成人としては当科勤務医師10名を対象にした。

① 白血球の分離

ヘパリン加静脈血 1~1.5 ml を採血し、採血後 30 分以内に以下に述べる方法で、ルミノール依存性化学発光を測定した。一部の血液 1ml に対してデキストラン (Dextran MW 60000) 0.2 ml を加えよく混和し、室温に 30~45 分静置後デキストラン層 (Dx) を分離し、1:1 (V/V) の割合でリンパ球分離液 (LSM) の上に重層し、1,500 rpm 30分間室温遠心した。リンパ球と単球を含む中間層と、遠心管底の顆粒球 (PMN) を分離した。各細胞層をチュルク液にて染色し、細胞数をトーマの計算盤にて400倍率の顕微鏡下に算定した。細胞分画のためには、別に塗抹標本を作成して May Giemza 染色し白血球の分画をした。

② ルミノール依存性化学発光の試薬および測定

白血球の膜刺激物質として、PMA (Phorbol myristic acetate, Sigma), zymosan A (Sigma), ルミノール (Sigma), 溶媒として dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma), リン酸緩衝液 (PBS 0.02 M pH 7.2), ハンクス液 (HBSS) を使用した。各試薬の濃度はそれぞれの至適濃度を前報⁹⁾によってあらかじめ決定してから以下のように調整した。PMA (10mg) を 5 ml の DMSO に溶解し、600 μ l (PMA 2mg/ml) ずつ分注し、-20°C に保存した。使用時に PBS にて4倍に希釈した (PMA 0.5 mg/ml)。

zymosan A は、20 mg/ml になるように蒸留水にて調整し、100°C 60分煮沸後 10mg/ml になるように HBSS にて希釈し 4°C に保存した。オプソニン化は、 γ -globulin (ミドリ十字社、50mg/ml) を2容に対し zymosan (10 mg/ml) 1容の割合でまぜ、37°C 30分反応させ、3回 HBSS にて洗浄したあと 10mg/ml の濃度に HBSS にて調整し、分注して 4°C に保存した。一部は、健康人4名の新鮮血清および 56°C 30分非働化血清を用いて同様にオプソニン化した。ルミノールは DMSO にて (10mg/ml) になるように調整した。

③ Biolumat LB9500T による CL の測定

血液または PMN 層を 10 μ l 取り、HBSS 490 μ l の中にいれ、ただちに luminol 10 μ l を加えよく混和後、

図1 diurnal variation of CL response of whole bloods of 10 normal healthy adults (n=20) M: morning, N: noon E: evening. CL-PMA: CL response of whole blood stimulated by PMA ($\times 10^4$ counts per 3min)

図2 diurnal variation of CL response of whole bloods of seven patients with various respiratory diseases (See footnote of Fig.1)

Biolumat にセットした。37°C 5分間反応後に、PMA 10 μ l を加えよく混ぜたあと30分間反応させた。CL 値はピーク CL 値前後の3分間の合計であらわした⁹⁾。

結果

(1) CL 値の日内変動

図1は、健康人10名の末梢血液 10 μ l による CL 値 (n=66) の日内変動を示した。朝より夕方の CL 値が高い値を与えたが有意差はなかった。一方、7名の入院

図3 diurnal and daily variation during three consecutive days of CL response of whole bloods from three patients with chronic pseudomonas infection of respiratory tract and from 10 normal healthy adults

図4 kinetics of CL response of whole blood at various intervals after bleeding

患者で調べると図2に示すように日内変動がより大きいことが示された ($n=21$)。一方、これらの日内変動に再現性があるかどうかを確かめるために、3名の患者の3日連続、朝、昼、夕方全血によるCL値の変動 ($n=26$)と健常人10名の2～3日連続朝夕2回のCL値 ($n=20$)の変動を調べ、図3に示した。

患者3名は、臨床症状からはほぼ安定期にある、緑膿菌による難治性呼吸器感染症の患者である。3日間連続して、ほとんど日内変動を示さない人と大きく変動する人とあったが、おおむねその人に一定した日内変動を示した。健常人は図の斜線内に入った(朝: 15.6 ± 9.7 , 夕:

図5 kinetics of CL response of whole blood at short periods after bleeding from patients and normal adults

図6 relationship between CL-PMA of whole blood and leukocyte counts of 10 normal healthy adults ($n=83$)

20.1 $\pm$ 12.5).

(2) 採血後測定時間までの経過時間によるCL値の変動

採血後血液を氷上に放置し、一定時間ごとにCL値を測定し、CL値の経時変化を調べた(図4)。採血後1時間を過ぎると、特にCL値の変動は大きくなった。オプソニン化 zymosan によるCL値は、それほどの変動はみられなかったが、PMAによるCL値は時間変化が大きかった。さらに図5に示すように、採血から90分以内のCL値の変動を採血後、5、15、30、45分にかけて詳細に測定すると、CL値の変動は15%以内であった。ただし、高いCL値を与える血液の場合には採血後60分以内といえども、CL値が大きく変動する例があった。

(3) 全血法における白血球数とCL値との関係

図7 CL-PMA of whole blood (CL-WBC) vs WBC of 60 patients with various respiratory diseases and 10 normal healthy adults, during 3 months. The CL responses of the healthy adults were enclosed by a dotted line.

図8 CL-PMA per leukocyte (CL/cell) vs WBC (See footnote of Fig. 7)

健康人10名の全血法による血液 $10\mu\text{l}$ の CL 値と末梢白血球数 (WBC) との関係を図6に示した。この10名 ($n=83$) のなかに白血球数が 9200, 10350, 8540, 9825 と高値を示す人がいたが、特に医学的に異常はなかったため健康人に含めた。相関係数 $r=0.517$ とあまりよい相関は得られなかった。データには示していないが、入院患者で長く経過が追え、かつこの間白血球数が大きく変動した数名について、集団としてではなく個人ごとにみた CL 値と白血球数との関係についても、相関係数 $r=0.3-0.6$ とやはりよい相関は得られなかった。また、過去1年間の CL 値のうちから無作為抽出し、全血法における白血球数と CL 値との関係を調べた。無作為抽出された170検体の血液 $10\mu\text{l}$ の CL 値 (CL/WBC) と、細胞1個当たりの CL 値 (CL/cell) とを比較した (図7, 8) がいずれにおいてもよい相関関係は認められなかった (相関係数 $r=0.45$, $r=0.40$)。図の枠内は170検体中に含まれた健康人の CL 値である。

(4) 急性感染症患者の急性期と回復期の CL 値の比較

図9に、16名の急性呼吸器感染症患者の急性期の CL 値と回復期の CL 値の比較を示した。発熱、咳、痰などの臨床症状を示し、多くの場合、白血球増加を示した急性期には明らかに有意に高い CL 値を示し、回復期に

図9 CL response of whole blood of 16 patients ($n=16$) with acute episode of bacterial infection and of 6 normal healthy adults ($n=26$)

CL-PMA : mean $\pm$ SD ($\times 10^4$ counts per 3 min)

なると健康人とほぼ等しい CL 値に戻った。この16名の CL 値と白血球数との関係を各個人別に図10に示した。図6と図7とは明らかに異なり、急性感染時には白血球数の増加につれて CL 値も増加し、両者間により相関 ($r=0.731$, $n=65$) が認められた。各個人別にみると、白血球数が増加すると必ず CL 値も増加していることがわかる。

(5) CL 値と他の急性炎症のパラメータである白血球数および CRP との関係

CL 値の上昇が他の急性炎症のパラメータである CRP

図 10 relationship between CL response of whole blood (CL-PMA) and leukocyte counts of 16 individual patients with acute bacterial infections (n=65)

とどのような関係にあるかを調べた。38～39℃の発熱を伴った典型的な急性肺炎、急性胸膜炎および急性気管支炎患者でCRPとCL値とを同時に測定しえた14名について、急性期と回復期におけるCRP値とCL値との関係を図11に示した。これらの患者は大部分が急性期には発熱とともにCRP値が4以上を示した。治療の開始とともに、また臨床症状の改善とともにCRPは(+)から(-)となった。一方、CL値は急性期には高値を示し、臨床症状の改善とともに正常化した。CRP(-)を0とし、CRP(±)を0.5として図11の数値からCRPとCL値との間の相関係数を計算すると、 $r = 0.88$ ($n = 40$)となり強い正の相関関係が認められた。

一方、末梢白血球数は急性感染症のときに増加するが、上記の14名の患者の末梢白血球数とCL値との関係を調べると、相関係数 $r = 0.709$ ($n = 37$)と図10と同様により相関が得られた。各個人別にみると、急性期の白血球の増加に対して必ずCL値も増加していることから両者の間にさらに強い相関関係が示唆された。

(6) 慢性気道感染症3名の緑膿菌感染による急性悪化時と回復期のCL値の経過

つぎに慢性感染症の例において当教室に入院中の3名の難治性慢性気道感染症患者の数ヶ月間の入院期間中のCL値を調べた。この期間中緑膿菌感染の悪化による発熱、赤沈促進、CRP増加、 PaO_2 低下、呼吸困難、痰の増加などの臨床症状のあった急性感染症の時期 (acute infection) のCL値を安定期と回復期 (stable and convalescent stage) のCL値と比較した。この3名はこのような悪化と回復を2～3回繰り返したので、安定期、

図 11 relationship between CRP and CL response of whole blood of 14 patients with acute pneumonia, acute pleuritis or acute bronchitis

急性期、緩解明にわけて表1に示した。急性感染症時のCL値は明らかに高く、臨床症状、臨床所見の改善につれてCL値は低下した。

考 察

本研究において、末梢白血球の示すリノール依存性化学発光 (CL) は、感染症の急性期に高値を示し、回復とともに正常化した。また、このCL値の動きは、急性炎症の重要な臨床所見であるCRPの増加や白血球増加との間に強い正の相関関係を示した (図9～11, 表1)。このことは、貪食細胞の示す活性酸素産生と食機能との間により相関関係があり、感染症によって食機能が亢進すること⁶⁾からもうなずける。一方、貪食細胞は感染症のみならず、免疫複合体や補体によっても活性化され^{10,11)}、またリンフォカインによっても活性化されるので³⁻⁵⁾、CL値が高値を示すことがただちに感染症を示唆するとはいえない。

しかし、本研究の成績 (図9～11) から明らかのように、全血法によるCL値は、CRPや白血球増加と同様に急性感染症の一つのよい指標として十分に役立てることが判明した。しかし、末梢白血球の機能検査としてこのCL値を臨床応用するに当たって、日内変動が大きいことと測定値の再現性に問題があることが指摘されて

表 1 CL response of three patients with chronic bronchitis or bronchiectasis during repeating infections with *Pseudomonas aeruginosa*

patients	CL-PMA		mean $\pm$ SD	
	stable		acute infection	
			convalescent	
	P		P	
(1)	22.7 $\pm$ 8.3 (n = 8)**	61.8 $\pm$ 5.3 (n = 8)**	25.6 $\pm$ 5.2 (n = 8)	
(2)	41.0 $\pm$ 10.7 (n = 5)**	120.7 $\pm$ 23.6 (n = 6)*	75.0 $\pm$ 18.3 (n = 3)	
(3)	81.8 $\pm$ 10.8 (n = 5)**	202.8 $\pm$ 9.8 (n = 6)**	138.7 $\pm$ 14.3 (n = 3)	

Statistical analysis was carried out by unpaired Student's t test.

**P < 0.01. *P < 0.05

きた。日内変動に関しては、前報⁹⁾と同様に、図1と図2とから容易にわかるように、健常人ではほぼ一定であるが患者間では変動が大きかった。しかし、図3に示すように、3日連続して測定したCL値をみると、CL値の日内変動は個人個人ではほぼ一定した値を示すと考えられた。これらの点を考慮すると、全血法によるCL値を白血球の機能検査として用いる場合、患者ごとに採血時間を決め、決められた時間に採血し測定すれば臨床応用可能であると考えられた。測定時間が決められた時間から大幅にずれた場合には、他日そのずれた時間に採血し、前回と同一時間でのCL値を2～3回測定して日内変動を確認し参考にする必要があった。

つぎに採血後のCL値の経時変化については、人によって非常にまちまちの経時的変化を示し、採血から測定までの時間が60分を超えるとCL値が大きくなった。その変動の仕方は同一人であっても、日によって大きく異なった。図5から採血後30分以内の測定であれば、CL値の変動はかなり小さかった。以上の問題を踏まえて、①採血時間をできる限り個人に決められた時間内にすること、②採血後30分以内にCL値を測定し、かつ、③採血から測定までの時間をできる限り各個人において一定にすることを原則とし、CL値の測定をすることが重要である。分離白血球のCL値の測定の場合には、PMNを分離し、そのCL値を測定するまでに採血後少なくとも2時間以上を要するので、採血後、より早い時間内に測定できる全血法のほうが、*in vivo*の白血球のCL値をよりよく反映しているといえるかもしれない。しかし、全血法の場合は分離PMNと違って多くの赤血球が混在するうに、血清および薬物などの影響が加わる^{7,9,12)}。通常、全血法では100 μ lの血液による測定がなされているが⁷⁾、本法の10 μ lにくらべて、血漿成分や赤血球成分による影響が大きくなる。

私どもは、先にこの問題を検討し、全血100 μ lのかわりに10 μ lによる測定にかえることによって、赤血球成分および血清成分の影響を最少限にできることを見いだした⁹⁾。CL値は、前報で検討したように、各検体ごとについて調べると、その細胞数とCL値との関係は直

線関係($r = 0.98 \sim 0.99$)にあった。しかし、全血法で測定されたCL値に関しては、健常人であれ、患者であれ、集団としてみるとCL値と細胞数との関係は直線関係を示さず、細胞数とは無関係にばらばらのCL値を示した(図6, 7)。このことの一つの説明は、もともと細胞に準備されている活性酸素産生に係わる酵素の量が、各個人によって異なっているとすれば、また同一人であっても日によって酵素の量が異なっているとすれば説明できる。この点は今後の問題である。

しかしながら少なくとも急性感染症の場合、図10, 11に示すように、CL値は急性感染症のよい指標とされているCRPや白血球数との間に正の相関関係が認められたこと、さらにデータには示していないが、全血法で測定したCL値は、発熱、赤沈促進ともよい相関を示したので、この全血法によるCL値は急性感染症のよい指標として、十分臨床応用可能と考えられる。さらに、各個人別にみた図10の成績から、白血球数の増加率とCL値の増加率とは、各個人別にみると明らかに異なっており、CL値は白血球数の反映としてのみでなく、白血球の機能の亢進状態を知るうえで重要な情報を与えているといえる。

さて、白血球の示すCL値は、細菌感染のときに上昇し、ウイルス感染では抑制されるという報告がある^{13,14)}が、逆にウイルス感染でも上昇するという報告もある。本研究ではウイルス感染の患者は含まれていないので、この点の確認はできなかった。なお症例を重ねて検討する必要がある。

以上、全血法による末梢白血球のCL値が、細菌感染症の急性期に著明に上昇すること、回復期には正常化すること、CL値の絶対値には個体差があること、日内変動は健常人では、それほど大きくないが、患者では大きいことを示した。さらに、日常臨床の場において発熱、赤沈促進CRPをはじめとする急性炎症性蛋白の出現などがあったとき、これが基礎疾患(たとえば膠原病、悪性腫瘍など)そのものの増悪によるのか、それとも感染症によるものかを、白血球の機能検査の一つとして全血法によるCL値の測定によって、迅速にかつ簡単に鑑

別できれば、たいへん重要な検査になるに違いない。

本研究は厚生省の研究費の援助を受けた。また、本研究の一部は第19回日本胸部疾患九州地方会において発表した。

文 献

- 1) Mackaness, G.B.: The mechanism of macrophage activation. *Infectious Agents and Host Reactions*. ed. S. Mudd. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1970, p 61.
- 2) Klebanoff, S.J.: Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Semin. Hematol.* 12: 117-142, 1975.
- 3) Nathan, C.F., Karnovsky, M.L., David, J.R.: Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J. Exp. Med.* 133: 1356-1376, 1971.
- 4) Babior, B.M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 298: 659-668, 1978.
- 5) Johnston, R.B. Jr., Godzik, C.A., Cohn, Z.A.: Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.* 148: 115-1978.
- 6) Cheson, B.D., Christensen R.L., Sperling, R., Kohler, B.E., Babior, B.M.: The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. *J. Clin. Invest.* 58: 789-796, 1976.
- 7) Kato, T., Wokalek, H., Schopf, E., Eggert, H., Ernst, M., Rietschel, E.Th., Fischer, H.: Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood. I. Role of granulocytes, platelets, and plasma factors in zymosan-induced chemiluminescence. *Klin. Wochenschr.* 59: 203-211, 1981.
- 8) Allen, R.C., Stjernholm, R.L., Steele, H.: Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 679-684, 1972.
- 9) Kohashi, O., Kohashi, Y., Toyoshima, S., Shigematsu, N.: A simple and rapid micro-technique for studying a luminol-dependent chemiluminescence of whole blood. *Jap. J. Inf.* 5: 193-272, 1985.
- 10) Wright, S.D., Silverstein, S.C.: Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* 158: 2016-2023, 1983.
- 11) Leijh, P.C.J., van der Barselaar, M.Th., van Zwet, T.L., Daha, M.r., van Furth, R.: Requirement of extracellular complement and immunoglobulin for intracellular killing of micro-organisms by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 63: 772-784, 1979.
- 12) Faden, H., Maciejewsky, N.: Whole blood luminol-dependent chemiluminescence. *J. Reticuloendothel. Soc.* 30: 219-226, 1981.
- 13) Abramson J.S., Mills, E.L., Giebink, G.S., Quie, P.G.: Depression of monocyte and polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism and bactericidal capacity by influenza A virus. *Infect. Immun.* 35: 350-355, 1982.
- 14) Abramson, J.S., Lewis, J.C., Lyles, D.S., Heller, K.A.: Inhibition of neutrophil lysosome-phagosome fusion associated with influenza virus infection in vitro. Role in depressed bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 69: 1393-1397, 1982.
- 15) Shult, P.A., Dick, E.C., Joiner, K.A., Busse, W.W.: Role of serum in stimulation of polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence by influenza A. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131: 267-272, 1985.