Lumisphere を用いた白血球の貪食能と化学発光

——健康人と各種疾患患者との比較——

小橋 修・小橋悠紀子・柴田真希^{*1)}、内田隆史・保坂俊太郎^{*2)}、
橋本修一・光山孝志・重松信昭^{*1)}

Lumisphere-induced phagocytosis and chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes of normal adults and the patients with various respiratory diseases Lumisphere, luminol-conjugated microspheres, proved to be useful for measuring simultaneously phagocytic function and chemiluminescence (CL) of human blood leukocytes. Phagocytic index (PI) which was calculated by summation of PMNs phagocytized more than 6 Lumisphere particles per 100 PMNs did not correlate well with any of CL responses to phorbol myristate acetate (CL-PMA), opsonized zymosan (CL-OZ), and Lumisphere by itself (CL-Lumi). Since phagocytosis is modulated by interaction of cell surface receptors such as FcR, C3bR and fibronectin with certain ligands, the present findings suggested no direct correlation or association of phagocytosis with oxygen active metabolisms. Correlation coefficients of CL-Lumi of healthy adults with CL-PMA and CL-OZ was 0.630 and 0.845, respectively. In contrast, the correlation coefficients of the patients were very low, suggesting that each of CL-PMA, CL-OZ, and CL-Lumi reflected the different receptor-mediated oxygen metabolisms. The comparison of these CL responses and phagocytosis gives an insight into monitoring various disease activities associated with phagocytic functions and receptor mediated functions of PMNs.

Osamu Kohashi・Yukiko Kohashi^{*1)}, Maki Shibata・Takahumi Uchida・Shyuntaro Hosaka^{*2)},
Shuichi Hashimoto・Takasi Mitsuyama・Nobuaki Shigematsu^{*1)}

^{*1)} Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University
^{*2)} Japan and Basic Research Laboratories, Toray Research Center

key words: Lumisphere, chemiluminescence, phagocytic index, PMN, disease activity

白血球の機能検査法として、細菌、ラテックス粒子、ザイモザン粒子などの貪食をみる貪食能検査¹⁾、白血球の化学走化活性²⁾、白血球遊走阻止³⁾、活性酸素産生に関係した NBT 還元反応⁴⁾、スーパーオキシド産生能⁵⁾、およびルミノール依存性化学発光⁶⁾、さらに白血球の細胞内酵素活性とその脱顆粒の測定⁷⁾ などがある。そのなかで、白血球の化学発光 (chemiluminescence, CL) は貪食細胞の殺機能とよく相関し⁸⁾、かつ慢性肉芽腫症や MPO 欠損症の重要な検査の一つとなっている^{9,10)}。

最近、東レ研究所でアクリル系ポリマー微粒子にルミノールを化学結合させた Lumisphere が開発され、白血球による Lumisphere の貪食能の測定が可能となり、Lumisphere を貪食した白血球の細胞内の化学発光を測定できるようになった^{11,12)}。

本研究では、ヒト末梢白血球を用いて、従来のルミノール依存性化学発光との比較と、Lumisphere に対する貪食能と、貪食されたビーズによる細胞内化学発光を同時に測定し、相互の関係を検討した。また、臨床検査に

応用するための基礎的条件を検討したので報告する。

対象と方法

(1) 対象

九州大学医学部付属病院呼吸器科入院中の患者30名、健康成人11名を対象にした。

① 採血と白血球の分離：ヘパリン加静脈血を2ml 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 (CL) を測定した。残りの血液1.5 ml にデキストラン (Dextran MW 60,000) 0.5 ml を加え、よく混和し、室温に静置した。30～45分後デキストラン層を分離し、これを1:1 (v/v) の割合でリンパ球分離液 (LSM) のうゑに重層し、1500 rpm 30分室温遠心し、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沫標本をつくり、May Giemza 染色し白血球を分画した。

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 myristate acetate, Sigma), zymosan A (Sigma), 溶媒として dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma), リン酸緩衝液 (PBS

^{*1)} 九州大学医学部胸部疾患研究施設

^{*2)} 東レ基礎研究所

図 1

図 2 kinetics of phagocytic index of PMN of normal adults during incubation at 37°C (●) or at 4°C (○)
PI: phagocytic index. See text.

0.02M pH 7.2), ハンクス液(HBSS)を使用した。前報に従って, PMA(2 mg/ml)と zymosan A(10 mg/ml)を調整した。オプソニン化ザイモザン(OZ)は, γ -globulin (ミドリ十字社, 50 mg/ml)を2容に対し, zymosan (10 mg/ml)1容の割合で混ぜ, 37°C 30分反応させたあと, 3回 HBSS にて洗浄し, 10 mg/ml の濃度に HBSS にて調整し, 分注して -20°C に保存した。必要時に1本取りだし, 4°C に保存し, 1週間以内に使用した。

③ biolumat LB9500T による CL 値の測定: 1検体用の biolumat 2台を用い, 1台は, PMA 刺激, 他の1台は OZ 刺激に用いた。全血 10 μ l を HBSS 490 μ l に加え, ただちに luminol 10 μ l を加えよく混和し, 37°C で測定を開始し, 5分間反応させたあと, PMA 10 μ l を加え, よく混ぜたあとさらに 37°C で計 30分間測定した¹³⁾。同時に, 別に全血 10 μ l を HBSS 490 μ l に加え,

さらに OZ 10 μ l と luminol 10 μ l を加えたサンプルを, もう一つの biolumat に入れ, CL を測定した。CL 値は, ピーク値前後の3分間の合計値をもってあらわし, PMA による白血球の非特異的刺激によって得られる CL 値を CL-PMA, オプソニン化ザイモザン OZ 刺激による CL 値を CL-OZ と便宜上あらわした¹⁴⁾。

④ Lumisphere によるヒト白血球貪食能と化学発光の測定: 上述した分離白血球 PMN(2.5×10^6 /ml)100 μ l に対して, Lumisphere(2×10^9 /ml)10 μ l を加え, HBSS 400 μ l を加えて biolumat にて CL を測定した^{10,11)}。白血球の Lumisphere の貪食機能は, この Lumisphere (2×10^9 /ml)を1倍, 2倍, 5倍, 10倍希釈した Lumisphere を準備し, 各 10 μ l に対して PMN(2.5×10^6 /ml)100 μ l, HBSS 400 μ l をそれぞれに加えて, 37°C で計30分間反応させたあと, 各反応試験管を氷浸けにし, 反応を止め30分後, 上清を捨て, 底に沈んだ PMN 層を1滴スライドグラスに垂らし, 濃厚塗沫標本をつくった。Giemsa 染色後, 油浸(1000 $\times$)にて鏡検し, PMN に取り込まれた Lumisphere の個数を数えた(図1)。この方法の欠点は, 白血球膜に単に付着したものと, 真に細胞内に取り込まれたものとの区別ができないことであるが, 顕微鏡の焦点を上下に動かしながら, 白血球に取り込まれた Lumisphere の個数を数え, 便宜上, つぎの6段階にわけて 0, 1~2, 3~5, 6~10, 11~20, 21個以上取り込んだ PMN を100個数え, その頻度分布曲線をつくった。

⑤ phagocytic index (PI)

Lumisphere を6個以上細胞内に取り込んだ白血球が, 全体に占める割合であらわした。

⑥ 統計処理

PMN 1個当たり貪食した Lumisphere 数に対する PMN の度数分布曲線については, χ^2 検定をした。CL-PMA, CL-OZ, CL-Lumi および PI については, おおのこの相関係数を計算した。

結 果

(1) 白血球による Lumisphere の貪食能の基礎的条件
健康人(n=5)の白血球の貪食能を, 4°C と 37°C において経時的に検討した。図2に示すように, 4°C では60分まではほとんど Lumisphere は取り込まれなかった。37°C では, 60分までは急速に取り込まれ, それ以後は調べられた180分まで徐々に取り込まれた。図3には, 0°C における図2に示された各個人の Lumisphere の取り込みを示した。多形核白血球(PMN)1個当たり取り込まれた Lumisphere の数が, 6個以上であった PMN の数は, 60分までは1~3%以内であった。このことから, 便宜上, Lumisphere を6個以上取り込んだ PMN の%をもって貪食能指数(phagocytic index)とした。健康人

図3 frequency curves of PMN phagocytized Lumisphere at various incubation times (15 min: —, 30 min: —, 60 min: —, 120 min: —, 180 min: —)

図4 frequency curve of Lumisphere phagocytized by PMN of normal adults (n=8)

(n=14), および当科入院患者 (n=13) の白血球 ($2.5 \times 10^8/\text{ml}$) $100 \mu\text{l}$ に対して各濃度の Lumisphere ($2 \times 10^9/\text{ml}$, $1 \times 10^9/\text{ml}$, $4 \times 10^8/\text{ml}$, $2 \times 10^8/\text{ml}$) をそれぞれ $10 \mu\text{l}$ を加え, 37°C , 30分培養後, 貪食された Lumisphere の個数を数え, 合計 100 個の白血球について度数分布曲線をつくった. 健康人および患者での頻度分布曲線は, 図4と図5に示すように, Lumisphere の濃度が低いと Lumisphere を貪食していない白血球が約 40%, 1~2 個貪食した白血球が 45% と合計 85% となった. 一方, Lumisphere が $2 \times 10^9/\text{ml}$ の濃度を用いた場合, 度数分布は正規分布に近くなった. 図4と図5において Lumisphere の濃度と貪食した細胞数との間の χ^2 検定は, $P < 0.001$ となった.

図5 frequency curve of Lumisphere phagocytized by PMN of the patients with chronic bronchitis (3), emphysema (2), bronchial asthma (3), idiopathic pulmonary fibrosis (3), and lung cancer (3) () : numbers of the patients tested

図6 kinetics of phagocytosis of Lumisphere by PMN of a patient (H.K. 66 years old, male) with acute pneumonia during active phase (○, △, ▨, ▩, ▪) and convalescent periods (○, ▲, ■, ◆, ◇)

(2) Lumisphere 貪食能の経日変化

$2 \times 10^9/\text{ml}$ の Lumisphere に対する貪食能を頻回に測定し得た 3 名の患者について, それぞれの度数分布曲線を図 6, 7, 8 に示した. 同一人でも炎症所見の強い時期にはたくさん貪食していた. ステロイド投与時は逆に貪食能は低下していた.

(3) 貪食された Lumisphere による白血球の化学発光
いろいろな濃度の Lumisphere に対する白血球の化学発光は, 図 9 に示すように, Lumisphere の濃度に対して直線的に上昇した. また, 図 10 に示すように, 一定の濃度の Lumisphere ($2 \times 10^9/\text{ml}$) に対して, PMN 濃度の

図7 kinetics of phagocytosis of Lumispheres by PMN of a patient (B.Y. 62 years old, male) with idiopathic pulmonary fibrosis during active phase (■▲△◆○) and stable period (□○●)

図8 kinetics of phagocytosis of Lumispheres by PMN of a patient (S.I. 73 years old, female) with chronic bronchitis during acute exacerbation (○△▲) and stable periods (○■●◆)

影響をみると、PMN 濃度は $5 \times 10^6/\text{ml}$ が至適濃度であった。

(4) Lumispheres による化学発光と従来のルミノール依存性化学発光の比較

表1, 2に健常人($n=8$), および患者($n=54$)における各パラメーター間の相関係数を示した。表1に示すように、食食能の指標(PI)は、他のどのパラメーターとの間にも強い相関はなかった。ただし、感染症患者の急性期の食食指数($PI=71.9 \pm 14.3$)は、回復期($PI=37.3 \pm 13.1$)との間に有意差($P<0.001$)がみられ、かつ、健常

図9 dose response curve of CL response vs concentration of Lumispheres

図10 dose response curve of PMN CL response vs Lumispheres ($2 \times 10^6/\text{ml}$)

人($PI=48.8 \pm 17.1$)とも有意差($P<0.001$)があった。

一方、表2に示すように、健常人においては、CL-PMA, CL-OZ, CL-Lumi の3者の間に正の相関があったが、分離白血球との間には強い相関はなかった。患者においては、CL-Lumi と他の CL との間には強い相関は得られなかった。

考 察

本研究で、東レで開発された Lumispheres を用いてヒト末梢白血球の食食能と、食食された Lumispheres 粒子に対するルミノール依存性化学発光(CL)を測定し、従来よりの方法と比較した。3種類の刺激物質おのによる白血球の CL に関して、健常人では、CL-Lumi と CL-PMA, CL-OZ, の間に正の相関関係($r=0.630$, $r=0.845$)がみられたが、患者での相関係数は低かった($r=0.021$, $r=0.174$)。白血球膜には活性酸素産生に関

表 2 correlation coefficients of CL-Lumi to other CL responses

パラメーター		相 関 係 数			
		健常人 N=10	全患者 N=54	感染症 N=26	肺線維症 N=10
CL-Lumi	VS WBC	0.731	0.213	0.324	0.448
CL-Lumi	VS CL-PMA	0.630	0.021	0.200	0.692
CL-Lumi	VS CL-OZ	0.845	0.174	0.283	0.055
CL-Lumi	VS CL-PMA/PMN	0.252	-0.225	-0.145	-0.330
CL-Lumi	VS CL-OZ/PMN	0.400	-0.107	-0.243	-0.412
WBC	VS CL-PMA	0.547	0.452	0.360	0.283
WBC	VS CL-OZ	0.503	0.625	0.640	0.381
CL-PMA	VS CL-OZ	0.628	0.715	0.699	-0.271
CL-PMA/PMN	VS CL-OZ/PMN	0.736	0.662	0.584	0.569

表 1 correlation coefficients of phagocytic index (PI) to CL responses of normal adults and the patients with various pulmonary diseases.

パラメーター	相 関 係 数	
	健常人 N=8	患 者 N=54
PI VS WBC	-0.083	-0.375
PI VS CL-PMA	-0.234	-0.194
PI VS CL-OZ	-0.248	-0.192
PI VS CL-Lumi	0.085	-0.481
PI VS CL-P/PMN	0.008	0.027
PI VS CL-O/PMN	0.225	-0.146

PI: phagocytic index

わる種々のレセプターがあり、PMA, OZ, Lumisphere はそれぞれ異なったレセプターを刺激している。PMA は、細胞内の protein kinase C¹⁵⁾ に関係した活性を、OZ は IgG の Fc レセプター¹⁶⁾ および C3b レセプター¹⁷⁾ に関係した活性をみているが、Lumisphere は、白血球膜を非特異的に刺激し、かつ細胞内に取り込まれた Lumisphere のみに関係した CL を測っている^{11,12)}。

健常人では、これら3者の間に強い相関がみられたことは、これら3者がほぼ同様な活性化状態にあることを示唆している。

一方、患者で CL-PMA, CL-OZ, CL-Lumi の間に強い相関がなかったことは、一つには患者の病態を反映して、白血球膜のレセプターに変化があったと考えられる。あるいは、レセプターに変化がなかったとすれば、細胞内の活性酸素産生に関係した諸酵素に変化があったとも考えられる。または、その両方の可能性もある。これらの可能性のいずれかを決めるためには、レセプターを直接測るか、細胞内酵素を他の方法で定量する必要がある。まったく別の考えかたとして好中球や好

酸球にサブセットが存在し、病態に応じてその比率が異なる可能性も否定できない¹⁸⁾。いずれにしても、CL-PMA, CL-OZ, CL-Lumi は、それぞれ白血球の異なった側面をみており、おのおののレセプターの量と質の変化を反映していると考えられるので、これら CL の測定は、病態把握に有用である¹⁹⁾。

感染症の急性期には、食食能は有意に亢進し、活性酸素産生も回復期や健常人にくらべて有意に高値を示した¹⁹⁾。しかし、健常人や患者全体でみると、食食指数と他のパラメーター (CL-PMA, CL-OZ, CL-Lumi) との間には強い相関はみられなかった(表1)。

従来より活性酸素産生と食食能とが連結しているのか、解離しているのかに関して両方の仮説がある¹⁷⁾が、よくわかっていない。本研究では、特異的刺激のみによる Lumisphere の食食能の強さと細胞膜および細胞内の活性酸素産生に係わる諸酵素の質と量とに左右される化学発光量との間に解離のあることが示唆された。蛍光粒子を用いて、全血のまま白血球の食食能を客観的にかつ迅速に測定できる flow cytometry 法²⁰⁾とくらべると、この Lumisphere 法は、latex や zymosan 粒子の食食能をみる場合と同様に、白血球に食食された粒子の数を顕微鏡(×1000)で数えるため、かなり主観的となるうえ、かなりの時間を要す。しかし、Lumisphere の特徴は、Lumisphere 粒子の表面に結合したルミノール反応を利用しているので、食食能と平行して食食後の粒子上で起こる活性酸素機能を同時に測定できる利点がある^{11,12)}ので、定量性を工夫することによって、さらに臨床応用が期待される。また、オプソニン化ザイモザンの場合と同様に、この Lumisphere にグロブリンを結合させることによって、白血球膜 Fc レセプターに関係した活性をみたり、他にモノクローナル抗体を結合させることによって、いろいろな細胞膜レセプターの測定にも応用が可能であり、将来の臨床応用が期待される。

文 献

- 1) Stossel, T.P.: Phagocytosis. N. Engl. J. Med. 250: 717-723, 774-780, 833-839, 1974.
- 2) Ward, R.A.: Leukotaxis and Leukotactic disorders. Am J. Pathol. 77: 520-538, 1974.
- 3) Rocklin, R.E.: Products of activated lymphocytes: leukocyte inhibitory factor and distinct from migrating inhibitory factor (MIF). J. Immunol. 112: 1461-1466, 1974.
- 4) Baehner, R.L., Nathan, D.C.: Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. N. Engl. J. Med. 278: 971-976, 1968.
- 5) Nakagawara, A., Nabi, B.Z.F., Minakami, S.: An improved procedure for the diagnosis of chronic granulomatous disease, using concanavalin A and cytochalasin E. Clin. Chim. Acta 74: 173-176, 1977.
- 6) Allen, R.C.: Evaluation of serum opsonic capacity by quantitating the initial chemiluminescence response from phagocytizing polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 15: 828-833, 1977.
- 7) Zurier, R.B., Hoffstein, S., Weissmann, G.: Cytochalasin B: Effect on lysosomal enzyme release from human leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 844-848, 1973.
- 8) Allen, R.C., Stjernholm, R.L., Steel, R.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) Rosen, H., Klebanoff, S.J.: Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase-deficient leukocytes. J. Clin. Invest. 58: 50-60, 1976.
- 10) Fantone, J.C., Ward, P.A.: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am. J. Pathol. 107: 397-418, 1982.
- 11) Uchida, T., Hosaka, S., Murao, Y.: Polymer microbeads bound to C3 fragments for detecting and labeling cells with C3 receptors. Immunol. Commun. 11: 467-476, 1982.
- 12) Uchida, T., Kanno, T., Hosaka, S.: Direct measurement of phagosomal reactive oxygen by luminol-binding microspheres. J. Immunological Methods 77: 55-61, 1985.
- 13) Kato, T., Wokalek, H., Schopf, E., Eggert, H., Ernst, M., Reitschel, 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.
- 14) Kohashi, O., Kohashi, Y., Yamaguchi, S., Muranishi, H., Miyazaki, M., Nakanishi, M., Hayashi, S., Ishibashi, M., Ikeda, T., Shigematsu, N.: Role of whole blood luminol-dependent chemiluminescence on monitoring acute bacterial infections. J. J. Inflammation 6: 134-140, 1986.
- 15) Huang, C.K., Oshana, S.C.: Partial characterization of protein kinase C and inhibitor activity of protein kinase C in rabbit peritoneal neutrophils. J. Leukocyte Biology 39: 671-678, 1986.
- 16) Forslid, Jan., Hed, J.: *In vitro* effect of hydrocortisone on the attachment and ingestion phases of immunoglobulin G and complement component 3b-mediated phagocytosis by human neutrophils. Infect. Immun. 38: 811-816, 1982.
- 17) Wright, S.D., Silverstein, S.C.: Receptor for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. J. Exp. Med. 158: 2016-2023, 1983.
- 18) Shult, P.A., Graziano, F.M., Wallow, I.H., Busse, W.W.: Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. J. Lab. Clin. Med. 106: 638-645, 1985.
- 19) Kohashi, O., Kohashi, Y., Yamaguchi, S., Muranishi, H., Kuwano, K., Hirose, N., Shigematsu, N.: Simultaneous measurement of luminol-dependent chemiluminescence to PMA and opsonized zymosan of whole blood of patients during acute and chronic bacterial infections —infectious pattern of CL response—. J. J. Inflammation 7: 151-157, 1987.
- 20) Bass, David, A., Wallace, P.J., Lawrence, R.R., Pamela, S., Michael, C.S., Michael, T.: Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. J. Immunol. 130: 1910-1917, 1983.