Basedow 病におけるマイクロゾーム抗体陽性血清の 活性酸素増加作用

森本康男・谷口 洋・山城有機・馬場茂明^{*1)}、茂幾隆輝・小倉 一^{*2)}、丹羽靱負^{*3)}

Stimulated production of active oxygen with anti-microsome antibody positive sera in Basedow's disease To evaluate pathophysiological significance of anti-microsome antibody positive sera in Basedow's disease, we have examined the production of opsonized zymosan stimulated active oxygens in neutrophils and the chemotaxis stimulated by f-methionyl-leucyl-phenylalanine. O_2^- significantly increased with sera of Basedow's disease as compared with those of healthy subjects. However $OH^\bullet$ production and chemotaxis have not significantly changed.

Productive-stimulating factors are, therefore, suggested to be present in the sera of Basedow's disease. The association of the factors with hyperthyroidism was discussed.

Yasuo Morimoto・Hiroshi Taniguchi・Yuki Yamashiro・Shigeaki Baba^{*1)},
Takateru Mogi・Hajime Ogura^{*2)}, Yukie Niwa^{*3)}

^{*1)} Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine

^{*2)} Department of Internal Medicine Kobe Kaigan Hospital

^{*3)} Niwa Institute for Immunology

key words: Basedow's disease, microsome antibody, active oxygens, chemotaxis

生体内で産生された活性酸素は生体が外界から傷害を受けた場合、その防御作用に関与するといわれているが、過剰に産生されると、酸素毒性として細胞の破壊を生じると考えられている¹⁾。

最近、自己免疫疾患である SLE 患者の血清中には正常人好中球を刺激して、活性酸素 (active oxygen, 以下 AO) 産生を高め、さらにそれによって組織傷害を引き起こす因子が存在することが報告されている²⁻⁴⁾。その他に、AO 産生因子として免疫複合体や補体を介する機構が示唆されている¹⁾。さて、他の自己免疫疾患でも同様な因子が存在するか否かは、興味ある問題である。そこで筆者らは、甲状腺の自己免疫疾患である Basedow 病の、特にマイクロゾーム抗体を有する患者の血清について検討したので報告する。

方 法

マイクロゾーム抗体陽性の男性 9 人および女性 12 人の Basedow 病患者、および 9 人のマイクロゾーム抗体を有さない健康人より空腹時血清を得た。

好中球は健康人末梢血より分離⁵⁾、5 mM glucose と 1 mg/ml gelatin を含んだ Krebs-Ringer phosphate buffer(KRP)⁶⁾に浮遊し、測定に供した。

O_2^- 産生は Johnston & Lehmyer の方法⁷⁾によった。すなわち 4×10^6 の好中球を用い、1 mg/ml のオプソニン化 zymosan(Sigma) 刺激により産生された O_2^- による

ferricytochrome C (Type III, Sigma) の還元を吸光度 550 nm で測定した。

$OH^\bullet$ の測定については、まず 2×10^6 の好中球を密栓試験管に入れ、2 ml KRP 中で 1 mM α -keto methiol butyric acid(KMB)と 5 分間 37°C でインキュベーション後、1 mg/ml のオプソニン化 zymosan を添加し 30 分間インキュベートし、発生するガスの一部を抜きとり、 $OH^\bullet$ と KMB より産生された ethylene を gas-chromatography(日立)で測定し、 $OH^\bullet$ の量に換算した⁸⁾。

なお、T3, T4, メルカゾールは被検血清中に存在する濃度においては本測定系に影響を及ぼさなかった。

マイクロゾーム抗体はセロクリット-MC(榮研)キットを用いて測定した。

chemotaxis は 10^{-6} f-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)を刺激剤として、agarose plate 法で調べた。すなわち plate 上に 8 mm 間隔に直径 3 mm の wells をつくり、中央の well に 10^6 cells/ml の好中球含有 RPMI 1640 溶液 (2.4% agarose solution 2.5 ml と 10% FCS 添加 RPMI 1640 2.5 ml の混合液)を 10 μ l 入れ、外側の well に 2 mg/ml カゼインを 10 μ l、内側の well にカゼインを加えない RPMI 1640 溶液のみを 10 μ l 入れ、37°C 5% CO_2 incubator 中に 2 時間放置し、中央から外側の well に向かって移動した、もっとも外側にある 10 個の cells について、中央の well からの移動距離を chemotaxis とした。

結 果

好中球 O_2^- はマイクロゾーム抗体陽性血清添加により

^{*1)} 神戸大学医学部第二内科学教室

^{*2)} 神戸海岸病院内科

^{*3)} 丹羽免疫研究所

図1 Basedow 病患者および健常人血清の各種活性酸素増加作用
 ▨ Basedow 病 (n=21), □ 健常人 (n=9)

図2 マイクロゾーム抗体力価と各種活性酸素値
 マイクロゾーム抗体力価: ■ 20 (n=1), ▨ 40 (n=3), ▤ 80 (n=1), ▥ 160 (n=1), □ 320 (n=2), ▧ 2560 (n=3), ▩ 5120 (n=10)

マイクロゾーム抗体陰性の健常人血清添加時の 1.51 ± 0.15 より 2.52 ± 0.32 nmol/min/ 4×10^6 PMN に増加した ($P < 0.001$) (図1, 上段)。

他方 $OH^\bullet$ は, Basedow 病患者血清では 4.89 ± 1.71 pmol/min/ 2×10^6 PMN であり, 健常人血清による 4.42 ± 1.48 pmol/min/ 2×10^6 PMN とくらべ増加傾向はみられたが, 統計学的な有意差はなかった (図1, 中段)。また chemotaxis も, 前者で 17.81 ± 3.7 mm, 後者で 16.78 ± 6.76 mm であり有意差はなかった (図1, 下段)。

マイクロゾーム抗体力価と O_2^- , $OH^\bullet$, chemotaxis の間の相関はみられなかった (図2)。

考 察

リウマチ様関節炎患者において, その関節液中の好中球は AO の産生が著明に亢進している⁹⁾。その他 Behçet 病¹⁰⁾, Crohn 病^{11,12)}, 潰瘍性大腸炎^{1,12)} などの自己免疫疾患でも同様な AO 産生が報告されている。また活動性の SLE 血清中には, 正常人の好中球 AO 産生能を上昇させることが知られている²⁾。これらの好中球は静脈内皮細胞を傷害する^{2,9)}。今回検討された Basedow 病患者の血清も, 正常人好中球の O_2^- を有意に産生亢進せしめ, それは 21 人中 20 人において認められた。 $OH^\bullet$ 産生に関しては, Basedow 病患者血清とコントロールと

の間に統計学的な有意差がみられなかったが, 患者のほうが正常人より増加傾向はみられた。この測定結果を O_2^- のそれと比較してみると, $OH^\bullet$ の場合, 非常に標準偏差値が大きく, このことが統計学的有意差をなくした原因の一つとも考えられ, O_2^- の測定と異なり今回用いた $OH^\bullet$ の測定系は, 血清成分の不定の影響を受けやすいことが推測される。

しかし SLE¹³⁾, scleroderma¹⁴⁾ や Crohn 病¹¹⁾ などの自己免疫疾患においては, その異常リンパ球より血清中に放出される分子量 6,000~10,000 の clastogenic factor が生体の O_2^- によって活性化されて, リンパ球などの染色体の断裂を起こし自己免疫疾患を引き起こすことが示唆されている。

一方, 免疫複合体による好中球 AO 産生亢進も報告されている⁷⁾。今回用いた Basedow 病患者における血清は, すべてマイクロゾーム抗体を含んでいたことから, この抗体が抗原と反応した免疫複合体として好中球に作用し, O_2^- の上昇をきたした可能性もある。また, マイクロゾーム抗体が補体を介して好中球の AO を増加させた可能性も考えられる¹⁾。

しかしながら, マイクロゾーム抗体力価と O_2^- の上昇の間には相関がないことから, 必ずしもマイクロゾーム抗体の存在に O_2^- 上昇を起因させることはできないかも

しれないが、さらにマイクロゾーム抗体陰性の Basedow 病患者血清を用いた比較検討や、抗体の種類、免疫複合体の有無の検討などがなされるべきであろう。

まとめ

Basedow 病において、マイクロゾーム抗体陽性の血清の病態生理学的意義を検討するために、オプソニン化 zymosan 刺激好中球を用いて、AO 産生および fMLP 刺激による好中球 chemotaxis を検討した。O₂⁻ は Basedow 病患者血清において、健常人にくらべて有意に増加していた。しかし OH[•] 産生や fMLP 刺激での chemotaxis には有意な変化はみられなかった。

Basedow 病患者の血清に O₂⁻ 産生を刺激する因子が存在する可能性が示され、甲状腺機能亢進の発生機構との関連につき、考察を加えた。

文 献

- 1) 丹羽靱負, 宗宮教壹: 生体の活性酸素と superoxide dismutase に関連した疾患群およびその治療について. 最新医学 39: 339-356, 1984.
- 2) Niwa, Y., Sakane, T., Shingu, M., Miyachi, Y.: Role of stimulated neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus in tissue injury, with special reference to serum factors and increased active oxygen species generated by neutrophils. *Inflammation* 9: 163-172, 1985.
- 3) Abramson, S.B., Given, W.P., Edelson, H.S., Weissmann, G.: Neutrophil aggregation induced by sera from patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 26: 630-636, 1983.
- 4) Hashimoto, Y., Ziff, M., Hurd, E.R.: Increased endothelial cell adherence, aggregation and superoxide generation by neutrophil incubated in systemic lupus erythematosus and Felty's syndrome sera. *Arthritis Rheum.* 25: 1409-1418, 1982.
- 5) Skosey, J., Chow, D.E., Damgaard, E., Sorensen, L.B.: Effect of cytocharasin B on the response of human polymorphonuclear lymphocytes of zymosan. *J. Cell Biol.* 57: 237-240, 1973.
- 6) Cohen, P.P.: *Suspending media for normal tissues: Monometric techniques and tissue metabolism.* 3rd ed. (ed. Umbreit, W.W., Burrit, R.H., Stauffer, J.F.), Burgess Publishing Co, Minneapolis, p 149-150.
- 7) Johnston, R.B. Jr., Lehmeyer, J.E.: Elaboration of topic oxygen by product by neutrophils in a model of immune complex disease. *J. Clin. Invest.* 57: 836-841, 1976.
- 8) Niwa, Y., Sakane, T., Miyachi, Y.: Dissociation of inhibitory effect of dapsone on the generation of oxygen intermediate in comparison with that of colchicine and various scavengers. *Biochem. Pharmacol.* 33: 2355-2360, 1984.
- 9) Niwa, Y., Sakane, T., Shingu, M., Yokoyama, M.M.: Effect of stimulated neutrophils from the synovial fluid of patient with rheumatoid arthritis on lymphocytes. A possible role of increased oxygen radicals generated by the neutrophils. *J. Clin. Immunol.* 3: 228, 1983.
- 10) Niwa, Y., Miyake, S., Sakane, T., Shingu, M., Yokogawa, M.: Auto-oxidative damage in Behçet's disease-endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.* 49: 247-255, 1982.
- 11) Emerit, I., Michelson, A.M.: Chromosome instability in human and murine autoimmune disease: anticlastogenic effect of superoxide dismutase. *Acta Physiol. Scand.* 492: 59-65, 1980.
- 12) 丹羽靱負: 美容・健康と酸素障害—活性酸素, 過酸化脂質および SOD の臨床的意義. *Fragrance J.* 14: 89-99, 1986.
- 13) Emerit, I., Michelson, A.M.: Mechanism of photosensitivity in systemic lupus erythematosus patient. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 2537-2540, 1981.
- 14) Emerit, I., Housset, E., Feingold, J.: Chromosomal breakage and scleroderma: Studies in family members. *J. Lab. Clin. Med.* 88: 81-86, 1976.