ミトコンドリア筋症 (cytochrome c oxidase 欠損症) における白血球機能検査の試み

松永貞一^{*1)}, 鈴木和男^{*2)}, 古賀靖敏・埜中征哉^{*3)}, 山口正視^{*4)},
落合幸勝・山崎ユキ・甘楽重信^{*5)}, 水野左敏^{*2)}, 前川奈生子・
前川喜平^{*6)}

The peripheral leukocytes function test of cytochrome c oxidase deficiency We examined the peripheral leukocytes of an 18 year old female case of cytochrome c oxidase (CCO) deficiency, a type of mitochondria myopathy. As neutrophil function test, chemotaxis (Table 2), exocytic release of myeloperoxidase (Table 3), yeast phagocytosis (Table 4), chemiluminescence (Fig. 1) and superoxide generation (Table 5) were measured. Almost all of neutrophil function test of patient were normal. But chemotaxis was better than control. We tested also quantitative nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test by Baehner using peripheral neutrophils. NBT reduction of patient's neutrophil was ca. 50% of control. This value is almost same as the carrier of chronic granulomatous disease (CGD) (Fig. 2). By the way, we tried to diagnose CCO deficiency using peripheral leukocytes, instead of the biopsied muscle. CCO activity of isolated lymphocytes from peripheral blood of patient showed only ca. 5% of control (Table 1). We conclude that it will be possible to diagnose CCO deficiency using peripheral leukocytes.

Teiichi Matsunaga^{*1)}, Kazuo Suzuki^{*2)}, Yasutoshi Koga・Ikuya Nonaka^{*3)},
Masashi Yamaguchi^{*4)}, Yukikatsu Ochiai・Yuki Yamazaki・Shigenobu Tsuzura^{*5)},
Satoshi Mizuno^{*2)}, Naoko Maekawa・Kihei Maekawa^{*6)}

^{*1)} Saitama Children's Medical Center, Department of Infectious Disease and Immunology

^{*2)} National Institute of Health, Department of Antibiotics

^{*3)} National Institute of Neuroscience (NCNT), Division of Ultrastructural Research

^{*4)} The Jikei University School of Medicine, Central Research Laboratory,
Division of Electron Microscopy

^{*5)} Tokyo Metropolitan Kita Medical & Rehabilitation Center, Department of Pediatrics

^{*6)} The Jikei University School of Medicine, Department of Pediatrics

key words: *cytochrome c oxidase deficiency, granulocyte function, mitochondria myopathy, coenzyme Q₁₀, chronic granulomatous disease*

ミトコンドリアは、生体内のエネルギー供給物質である ATP の産生のもととして知られている。近年、このミトコンドリアの酵素異常のため、筋力低下、筋緊張低下、易疲労性、痙攣、精神薄弱、不随意運動などの筋肉、神経症状を呈する一連の疾患の存在が明らかとなり、ミトコンドリアミオパシーとよばれている。このうち、ミトコンドリアのエネルギー産生に關与する電子伝達系の異常として、NADH CoQ oxidoreductase (いわゆる複合体 I) 欠損症, succinate CoQ oxidoreductase (複合体 II) 欠損症, CoQ cytochrome c reductase (複合体 III), そして、電子伝達系の最後の酵素 cytochrome c oxidase (複合体 IV, 以下 CCO) 欠損症が知られている¹⁾。

今回、筆者らは、CCO 欠損症の 1 例を経験したのを機に、採取が容易な末梢白血球を用いて、生体におけるエネルギー産生の主役を演じるミトコンドリアの電子伝達系の異常が、さまざまな好中球機能にどのような影響を与えるのかを *in vitro* で観察した。これとは別に、従来筋生検によって診断を確定していた CCO 欠損症を末梢白血球を用いた検査によって、診断の一助とすることができるとはいえないかという結果を得た。

今回は 1 例のみの経験であり、ここに示す結果の正否についてはさらに多くの症例による検討を必要とするが、今後、この方面の研究の嚆矢となればと考えここに報告する。

症 例

10 歳ごろより痙性麻痺、近位筋優位の筋力低下が出現し、A-V ブロック、感音性難聴、不随意運動、精神発達遅滞、低身長を呈した 18 歳女児。

脳波異常、血中の乳酸およびビルビン酸の高値を認め

^{*1)} 埼玉県立小児医療センター感染免疫科

^{*2)} 国立予防衛生研究所抗生物質部

^{*3)} 国立精神神経センター神経研微細構造

^{*4)} 東京慈恵会医科大学医科学研究所微細形態研究部

^{*5)} 東京都立北療育医療センター小児科

^{*6)} 東京慈恵会医科大学小児科学教室

表 1 末梢白血球および横紋筋におけるミトコンドリア酵素の活性

	lymphocyte		PMN		skeletal muscle	
	patient	control	patient	control	patient	control(n=14)
NADH-cytochrome c reductase (rotenon sensitive) いわゆる複合体 I + III	6.7	19.5	43.2	57.6	981	226.9±119.6
succinate cytochrome c reductase いわゆる複合体 II + III	32.7	24.2	ND	ND	419	232.9±96.9
cytochrome c oxidase (CCO) いわゆる複合体 IV	6.3	109.6	ND	ND	46	270.7±133.0

ND: not detectable

(in n mol/min/mg mitochondria protein)

る。右大腿四頭筋の筋生検所見では、筋線維は直径 8～60 μm といちじるしい大小不同を呈し、また、本疾患に特徴的といわれる ragged-red fiber を認めた。cytochrome c oxidase 染色では、筋線維に本酵素の活性を認めず、電顕では腫大したミトコンドリアの集積像を認めた。筋のミトコンドリア分画の CCO 活性はいちじるしく低下しており(表 1)、以上の所見より CCO 欠損症(脳筋型)と診断した。

方 法

(1) 検 体

リンパ球ならびに好中球は、ヘパリン化静脈血より Conray-Ficoll 法により得た。筋のミトコンドリア分画は、液体窒素で凍結保存した生検筋より、Bookelman らの方法²⁾でミトコンドリア分画を得た。末梢リンパ球ならびに好中球のミトコンドリア酵素活性は、これらの細胞を 3 回凍結融解した後、sonication して得られた crude homogenate を用いて実験を行った。

(2) 好中球機能検査

好中球遊走能は、アガロース法⁵⁾ならびにメムブラン法⁴⁾を用いて測定した。前者において、細胞用ウェルと遊走因子(ザイモザン活性化血清)用ウェルの間隔は 2 mm とした。ウェルの直径は 3 mm とし、37°C で 2 時間培養したときの結果を評価した。後者では、ポアサイズ 3 μm のミリポアフィルターを用い 10^{-8} の fMet-Leu-Phe(FMLP)を遊走因子として 37°C 5% CO_2 中で 45 分間培養し、leading front 法によって評価した。

好中球ライソゾーム酵素放出は、tetramethylbenzidine を基質とした Suzuki らの方法⁴⁾により、myeloperoxidase の放出により評価した。

貪食能は Miller らによる イースト貪食能³⁾を用いて行った。

化学発光(CL)試験は、37°C の条件下、振盪中のキューベット内で 10^{-5}M のルミノール存在下に 10^6 の好中球が、1.5 mg/dl のオプソニン化ザイモザン 100 μl 添加時に発生する CL を LKB-Wallac 社の Luminometer

model 1251 を用いて測定した⁵⁾。得られた CL 発生曲線より、CL の最大値を求めた。また、CL 発生曲線の最大勾配より CL 最大発生速度 ($\text{mV}/\text{min}/1 \times 10^6$ PMNs) を算出した。

O_2^- 産生は、cytochrome c の還元反応を利用し、cytochalasin B/FMLP または FMLP を刺激剤として分光学的に測定した⁶⁾。

好中球の nitroblue tetrazolium (NBT) 還元能は、Bachner の分光学的定量法を用いて測定した⁷⁾。

(3) 電子伝達系酵素活性測定

NADH cytochrome c reductase と succinate cytochrome c reductase は、Mackler らの方法⁸⁾で、また、CCO は Oriei らの方法⁹⁾で、分光学的に酵素活性を測定した。

NADH cytochrome c reductase の測定に際しては、細胞のマイクロソームなどにも存在する本酵素の影響を除外するため、rotenon でミトコンドリアに局在する NADH cytochrome c reductase をブロックする実験も行い、rotenon を加えないときの結果との差を利用して、ミトコンドリア由来の本酵素の活性を測定した。

結 果

(1) 好中球機能

好中球遊走能は、アガロース法でもメムブラン法でも、ともに患者のほうが対照よりよく遊走していた(表 2)。ライソゾーム酵素放出として myeloperoxidase の細胞外放出をみたが、患者と対照の間に顕著な差は認められなかった(表 3)。オプソニン存在下で 30 分培養したときのイースト貪食能も対照との間に明らかな差は認められなかった(表 4)。

オプソニン化ザイモザンを刺激剤として行った化学発光試験では、患者の CL 最大値は 4094 mV であり、対照の 4277 mV とほぼ同じ値を示した。しかし、CL 最大発生速度は患者では、530 $\text{mV}/\text{min}/10^6$ PMNs で対照の 625 $\text{mV}/\text{min}/10^6$ PMNs に比し、15% ほどの軽度の低下を示した(図 1)。

表 2 cytochrome c oxidase 欠損症者の好中球遊走能

in μm	patient	control
agarose method (ZAS, 2 hours in 37°C 5% CO₂)		
net chemotaxis	785 ± 73	546 ± 44
activated chemotaxis	1372 ± 105	1092 ± 56
random migration	587 ± 127	546 ± 36
activated chemotaxis random migration	2.3	2.0
membrane method (FMLP 10⁻⁶M, 45 min. in 37°C)		
chemotaxis	84.0	59.5
random migration	34.4	19.3
chemokinesis	58.6	31.3

表 3 cytochrome c oxidase 欠損症者の好中球における myeloperoxidase の細胞外酵素放出

	patient	control
released (units)	7.72	10.60
total (units)	13.72	19.40
% release	56.3%	54.6%
% stimulation	187	160

表 4 cytochrome c oxidase 欠損症者の好中球のイースト貪食能

serum	PMN	patient	control
patient		3.66	3.38
control		3.58	3.62
(yeasts/PMN)			

cytochalasin B と FMLP ならびに FMLP 単独で刺激したときの O₂ 産生は、患者は対照の約 2/3 であった(表 5)。定量的 NBT 試験の結果では本症例は、好中球の膜の電子伝達系の異常と考えられる慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease: CGD)の保因者と同程度、すなわち健常者のほぼ 60% しか NBT 還元能がないことがわかった。

図 2 に示すように、反応後の NBT 溶液の 515 nm における吸収は本 CCO 欠損例と CGD の母すなわち CGD 保因者は 0.29、患児は 0.02、対照と父ならびに兄はおおの 0.46、0.38、0.39 であった。

(2) 電子伝達系酵素測定

末梢リンパ球と末梢好中球、ならびに生検筋のミトコンドリア電子伝達系酵素の活性を表 1 に示した。表にみるように、CCO に関しては、患者リンパ球の CCO 活性は対照の 5% ときわめて低い値を示し、筋肉より得られた CCO 活性がきわめて低い値を示したと同様の傾向を示した。

図 1 好中球化学発光試験
a : cytochrome c oxidase 欠損症者
b : 対照

表 5 cytochrome c oxidase 欠損症者の好中球スーパーオキシド産生能

	patient	control
cytochalasin B/FMLP	5.69	8.21
FMLP	3.28	4.92
(n moles/min/10 ⁶ PMN)

図 2 Bachner 法による好中球 NBT 試験の結果
左より本 cytochrome c oxidase 欠損症者 (0.291)、対照 (0.459)、CGD 患者 (0.021)、CGD の母すなわち保因者 (0.278)、CGD の兄 (0.391)、CGD の父 (0.381)。カップ内は、515 nm における吸光度を示す。

図3 本 cytochrome c oxidase 欠損症者の末梢白血球中のミトコンドリアの電子顕微鏡像

(3) 電子顕微鏡的観察

末梢白血球のミトコンドリア像を図3に示す。マトリックスやクリステはよく保たれているように思われた(図3)。

考 按

今回、筆者らは、全身の筋力低下などの症状を示す CCO 欠損症を経験したことを機に、このような病態において、末梢血内で遊走や食食という運動機能を持つ好中球の機能はどのようにになっているのかという疑問を抱き、今回の実験を行った。

いくつかの異なる方法・対照を用いて検討した結果は、表2～4に示したように遊走・酵素放出・食食などの機能において、患者と対照の間に明かな差を認めなかった。これは遊走能・食食能は嫌氣的解糖系によってエネルギーを供給されていると考えられていること¹¹⁾に照らし合わせれば、今回のこれらの結果は当然の帰結といえるかもしれない。

一方、これに対し、本 CCO 欠損症患児の O_2^- 産生や NBT 還元能が対照の $2/3 \sim 1/2$ と、かなり低い値を示していたことについての説明は困難である。 O_2^- の産生もシアンによって影響されないといわれている報告¹¹⁾があり、ミトコンドリアの機能のいかにかわらず、 O_2^- の産生は正常であることが予想されたが、今回の実験で

図4 coenzyme Q_{10} 使用経過中における好中球化学発光試験の変化

OZ: オブソニン化ザイモザン, PMA: 4β phorbol 12β myristate acetate 各刺激時の対コントロール比にて表示

は対照に比しやや低い値を示した。しかし、 O_2^- の産生は被験者により正常でもかなりばらつきがあり、今回得られた値も必ずしも異常と考えなくともよいというみかたも可能と思われる。

本症の治療法はまだ確立されていない。しかし、ミトコンドリア筋症(Kearns-Sayre syndrome)の心筋伝導障害に、複合体I, II, IIIの要にあたる coenzyme Q_{10} が効果があったという報告がある¹³⁾。本症例でも、心ブロックがあったため coenzyme Q_{10} を用いた。臨床的には目にみえる効果は認められなかったが、一方、オブソニン化ザイモザン刺激時の CL 最大発生速度は、対コントロール比で上昇する傾向が認められた(図4)。

CCO 欠損症が、ミトコンドリアの膜の電子伝達系の異常であるということから、その存在の場の規模は細胞内小器官から細胞と1オーダー大きくなるが、好中球の膜の電子伝達系の異常である CGD を起想した。CGD は、酸化的殺菌過程の障害を示す先天性免疫不全症の一つであり、その本態は、好中球の膜の電子伝達系である NADPH oxidase の異常と考えられている。

CGD の好中球は、健常者では示す NBT 還元能をまったく示さず、保因者(患者の母)の好中球は、健常者のほぼ半分の NBT 還元能しか示さないことが知られている。今回、CCO 欠損症者と CGD の両疾患の好中球を用いて、NBT 還元能を測定したところ、奇しくも CCO 欠損症者と CGD 保因者は同様の結果を示した。

NBT 還元能試験は、従来より CGD の診断に用いら

れてきたが、ミトコンドリアやミクロソームまたは核などにある種々の酸化還元酵素にも反応するとされ、その特異性は低い¹²⁾。このため、CCO 欠損症患児ではNBT還元能が低くでたと考えることもできよう。

本 CCO 欠損症患者においては、末梢リンパ球の CCO 活性は、筋肉におけると同様にきわめて低い値が得られた。CCO 欠損症は、本症例のような脳筋型のほか、すべての臓器で CCO 活性の低下する全身型、乳児良性型、さらに筋肉の組織化学的検査によってのみ診断のつく focal deficiency など多くの型にわけられる。このため、わずかこの1例の経験のみをもって、ただちに末梢血を用いて CCO 欠損症を診断できるというのは性急である。しかし、検体採取が容易なことより、症例を重ねることにより、今後そのスクリーニング法として利用できることが明らかになるのではないかと期待される。

結 語

ミトコンドリアミオパチー(CCO 欠損症)の1例を経験したことを機に、本症の末梢白血球を用いて、その機能検査を行った。この中で、従来筋生検によって診断を確定していた CCO 欠損症を、末梢血を用いた検査によって診断できる可能性についても論じた。

本論文の要旨は、第8回日本炎症学会(昭和62年7月、東京)において口演発表した。本研究の一部は、都立北療育医療センター臨床研究のための東京都の研究費によって行った。

文 献

- 1) 埜中征哉：小児のミトコンドリア・ミオパチー。神経内科 24: 117-124, 1986.
- 2) Bookelman, H., Trijbels, J.M.F., Sengers, R.C.A., Janssen, A.J.M.: Measurement of cytochromes in Human Skeletal Muscle Mitochondria isolated from Fresh and Frozen stored Muscle Specimens. Biochemical Med. 19: 366-373, 1979.
- 3) 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.
- 4) Suzuki, K., Asaoka, K., Takahashi, K., Fujikura, T.: Differences among Primates in Defence against Infection: Sensitivity of Polymorphonuclear Leukocytes to fMet-Leu-Phe. Cell Biochemistry and Function 3: 297-303, 1985.
- 5) 松永貞一, 橋本文久, 河野三郎, 木谷信行, 堀誠, 前川喜平: 体温変動域内での温度変化における好中球機能の検討。臨床免疫 18: 851-858, 1986.
- 6) Suzuki, K., Sakatani, T., Sasagawa, S., Fujikura, T.: Suppression and recovery of Lysosomal Enzyme and Superoxide Anion Production from Human Polymorphonuclear Leukocytes after exposure to n-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine: Recovery of sensitivity to Cytochalasin B. Technical Report RERF TR 18-83, Radiation Effects Research Foundation Oct. 1985.
- 7) Baehner, R.L., Nathan, D.G.: Quantative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. N. Engl. J. Med. 278: 971-976, 1968.
- 8) Mackler, B.: Microsomal DPNH-Cytochrome c reductase. Methods in Enzymology Vol X Oxidation and Phosphorylation edited by Estabrook RW & Pullman ME. Academic Press, New York and London 1967, p 551-553.
- 9) Orii, Y., Okunuki, K.: Studies on Cytochrome a, XV. Cytochrome Oxidase Activity of Okunuki Preparation and Its Activation by Heat, Alkali and Detergent Treatments. J. Biochemistry 58: 561-568, 1965.
- 10) 松永貞一, 稻名市郎, 村上 仁, 浦上達彦, 関兼英, 福永 謙, 南谷幹夫, 福原幸子, 兼田瑞穂, 柿沼カツ子: Chronic granulomatous disease 保因者診断の問題点—組織化学的検査と分光学的検査の併用の重要性について—。医学のあゆみ 140: 835-836, 1987.
- 11) Klebanoff, S.J., Clark, R.A.: Carbohydrate metabolism in The Neutrophil: Function and Clinical Disorders. North-Holland Publishing Company, Amsterdam New York Oxford, 1978, p 326-339.
- 12) Azzi, A., Montecucco, C., Richter, C.: The use of acetylatedferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65: 597-603, 1975.
- 13) Ogasahara, S., Yorifuji, S., Nishikawa, Y., Takahashi, M., Wada, K., Hazama, T., Nakamura, Y., Hashimoto, S., Kono, N., Tarui, S.: Improvement of abnormal pyruvate metabolism and cardiac conduction defect with coenzyme Q₁₀ in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 35: 372-377, 1985.