原 著

Systemic lupus erythematosus (SLE) および Behçet 病などの 疾患患者好中球にみられる活性酸素およびライソゾーム 酵素産生分泌能に関する研究

丹羽免疫研究所 丹羽 鞆負◇ 石本 浩市
高知県立中央病院内科 三宅 晋
高知市民病院内科 筒井 功 高知市民病院呼吸器科 筒井 大八
イリノイ大学医学部病理学, 細菌学 横山 三男

OXYGEN INTERMEDIATES AND LYSOSOMAL ENZYMES GENERATED
BY STIMULATED NEUTROPHILS FROM THE PATIENTS WITH SYSTEMIC
LUPUS ERYTHEMATOSUS, BEHÇET'S DISEASE AND OTHER DISEASED GROUPS

Yukie NIWA, MD and Koichi ISHIMOTO, MD

Niwa Institute for Immunology

Susumu MIYAKE, MD

Department of Internal Medicine, Kochi Prefectural Hospital, Kochi

Isao TSUTSUI, MD and *Daihachi TSUTSUI, MD

Department of Internal Medicine and *Department of Respiratory Disease, Kochi Municipal Hospital, Kochi

Mitsuo YOKOYAMA, MD

Department of Pathology and Microbiology, Illinois Medical Center, USA

概要 SLE患者17例, RA18例, その他の自己免疫病9例, Behçet病17例(以上大部分の患者はステロイド・コルヒチン内服中)の末梢血好中球について, *in vitro*のopsonized zymosan刺激のもとで活性酸素(O_2^- , H_2O_2 , $OH \cdot$, 1O_2)(OIと略記)およびライソゾーム酵素(LEと略記)の産生分泌能を測定し, さらに, 癌患者20例, 細菌感染患者15例, および健康対照群12例と, ステロイド・コルヒチン内服中の痛風患者や皮膚疾患患者計13例を薬物内服疾患対照群として同様の検査を行ない, 上述のSLEなどの疾患群と比較した。結果は, 薬物内服の疾患対照群では, 健康人に比し, OI, LEの高度な低下を示したが, active stageのcomplete type Behçet病やactive stageのSLEなど自己免疫病患者では, 薬物の内服に拘わらず, 健康対照群よりOIおよびLEの有意の増加が認められ特にOIの産生能の上昇が著しかった。inactive stageのこれら疾患でも薬物内服の疾患対照群と比較すると, OI, LEとも有意の増加がみられた。細菌感染群では, OIの上昇よりLEの増加が顕著にみられ, 一方癌患者ではzymosan刺激によるOI上昇能の欠如がみられた。immune complex originの疾患群では好中球の被刺激性が亢進し, OI産生能が上昇し, 炎症がbacterial originの場合はLE分泌能が上昇していることは興味深く, Behçet病やSLEにみられる組織障害やリンパ球障害は, 増加したOIにより惹起されたauto-oxidative damageの可能性も示唆される。また癌患者にみられたOIの異物刺激に反応上昇する能力の低下は, 癌発症と何らかの関連性があるのではないかと推測される。

〔昭和56年2月16日受稿〕

はじめに

異物の生体内への侵入に際し、動員された好中球はマクロファージとともに異物に対し食食作用を行なうが、その際、ライソゾーム酵素とともに活性酸素 (oxygen intermediates, oxygen radicals) (O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$, 1O_2) (以下OIと略記) を発生し、ライソゾーム酵素とともに胞体中の食食物に対しkilling function (融解, fusing)¹⁾を行なったり、また直接細菌にbactericidal^{2)~4)}に作用したりして、細菌や異物に対し強力な殺菌作用 (bactericidal function) を及ぼし、生体の自己防衛に有益な働きを営んでいる。胞体中のNADHの不活性に基因した活性酸素 (H_2O_2 , $OH\cdot$) の欠乏からkilling functionの低下を招き、易感染を反復するchronic granulomatous disease (CGD)¹⁾はよく知られている。

一方過度に刺激された食細胞は、OIやライソゾーム酵素の産生・分泌を増加させ、その結果、さまざまな有害な結果を生体にもたらしている。すなわち、ライソゾーム酵素による組織障害は有名であるが、増量したOIによつても同様に高度な組織障害⁵⁾がもたらされる他、近年好中球のviabilityの低下²⁾、易感染症の発生、溶血性貧血⁶⁾、リンパ球の機能障害^{8)~10)}、ライソゾーム酵素分泌抑制¹¹⁾、血小板の凝固促進⁷⁾、lipidの過酸化の亢進⁷⁾など生体にさまざまな有害な作用をもたらすことが明らかにされ、auto-oxidative damageとして近年注目されてきている。しかしながら、auto-oxidative damageとして報告されている疾患としては、GSH reductase欠損症⁶⁾とかGSH synthetase欠損症⁷⁾とかいつたように希有な疾患がそのほとんどで、実際に我々が臨床上遭遇する疾患は少ない。我々に身近な疾患で、auto-oxidative damageとして報告されているものとしては、Johnston⁵⁾らによるimmune complex diseaseの実験モデルがあり、micropore filterに結合したheat-aggregated IgGと接触した好中球が刺激され、大量のOI産生の増加や中等度のライソゾーム酵素分泌・上昇がみられたことが報告されている。

また、我々は既に全身性紅斑性狼瘡 (SLE) や関節リウマチ (RA) の患者の好中球についてauto-oxidative damageの検索を行ない、患者好中球がT細胞を減少させたり、リンパ球の反応性を低下させ、リンパ球障害作用を惹起させていることを報告し⁹⁾、それが、増加したOIに基因するであろうことに言及した。今回は、自己抗体の抗体価高値を呈した、SLE, RA患者の好中球のin vitroにおける実際のOI (O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$, 1O_2) とライソゾーム酵素 (lysozyme, α -mannosidase, β -glucuronidase) の産生・分泌能を測定し、Behçet病、癌、細菌感染患者や健康人のそれと比較し、SLEを始め、それぞれの疾患にみられるOIやライソゾーム酵素値の変動とその背景について、文献例に基づき考察を加え検討することにした。また、OIとライソゾーム酵素は、共にkilling functionという生体に有利な機能を営むが、同時に共に組織障害など有害な作用面を有しており、両者のリンパ球障害との関連性についても若干比較検討することにした。

対 象

SLE17例 (全例女性, 18~44才) (うちactive stageのもの8例, inactive stage9例), RA18例 (男8例; 34~58才, 女10例; 29~45才) (うちactive stage8例, inactive stage10例), その他自己免疫疾患9例 (汎発性強皮症: 3例, 男2例, 45才と54才, 女1例43才, Sjögren症候群: 2例; 全例女性18才と39才, 激症肝炎: 2例, 男44才, 女56才, 皮膚筋炎: 1例女35才, 重症筋無力症1例女53才), Behçet病17例 (男10例, 27~52才, 女7例, 31~59才) (うちcomplete typeのactive stage5例, inactive stage2例, imcomplete typeのactive stage4例, inactive stage6例), 肺癌患者20例 (男12例, 44~60才, 女8例, 53~62才) に39~40℃の熱発を4日以上反復持続している一般細菌感染症 (肺炎, 腺窩性扁桃腺炎, 虫垂炎) 患者15例 (男性9例; 24女~49才, 女性6例; 28才~63才) を疾患群としてえらんだ。自己免疫疾患患者は全例リウマチ因子, 抗核抗体のうち少な

くとも1個以上が1:160以上を示した症例をえらんだ。なお自己免疫疾患患者の大部分はステロイドをprednisoloneに換算して15~10mg, Behçet病患者は全例コルヒチン1~2mgとステロイドをprednisoloneに換算し10~20mg, また肺癌患者は大部分が抗癌薬を投与中である。次に対照として、まず、コルヒチン1~2mgとprednisolone 10~20mg 1~6カ月間内服中の痛風患者4例(全例男性39~62才)と掌蹠膿疱症3例(男1例; 45才, 女2例; 28才と44才)さらにprednisolone 10mgを3~6カ月間内服中の気管支喘息3例(全例男性47~58才)と尋常性乾癬3例(全例男性42~56才)をコルヒチン・ステロイド内服疾患対照群にえらび、次に健康対照群として、薬物末内服の正常人12例(男6例; 17~45才, 女6例; 22~49才)をえらんだ。さらに、コルヒチン・ステロイドなど末内服の痛風患者5例(全例男性39~62才), 掌蹠膿疱症5例(男2例; 26才と41才, 女3例; 30~51才), 気管支喘息3例(全例男性47~58才)および、尋常性乾癬3例(全例男性42~56才)の好中球についてもOI, ライソゾーム酵素産生・分泌能の測定を行なった。

SLEの診断はStevensの診断基準⁹⁾に、RAはアメリカ・リウマチ協会の診断基準に従った。SLE active stageの定義としては、活動性の皮疹、漿膜炎、関節炎、活動性の中枢神経系の疾患の合併、および活動性の腎疾患を伴ったものをactive stageの症例とし、Behçet病active stageの定義としては、白血球数10000/mm³以上、CRP(3+)以上、血沈値1時間40以上に、補体値(C3C, C4, CH50)の上昇を伴ったものをactive stageの症例とした。

方 法

対象症例の静脈血より好中球(以下PMN)を文献¹¹⁾に従い分離集獲し、20%の正常人AB型血清を含むKRPG¹¹⁾(¹O₂測定の際のみ無色のHanks液を使用)を浮遊させ、PMN mediumを作製する。PMN分離集獲法を簡単に記すと、対象症例より採血した静脈血よりFicoll-Hypaque gradient

density法によりPMN含有層を集獲し、さらにPMN含有層を、被検血清と分子量 17×10^4 の6% dextran(最終濃度1%)で処理し、0.876% NH₄Clで混入赤血球を溶血させた。好中球刺激に使用したzymosanは文献¹¹⁾に従い、前以つて被検血清でopsonizeした。

活性酸素の測定: O_2^- は⁹⁾¹²⁾, O_2^- がmedium中に存在するとcytochrome Cを還元するという原理のもとに、 4×10^6 PMNを0.1mg/ml gelatin含有KRPG¹¹⁾ 0.25ccに入れ、opsonized-zymosan¹¹⁾ 1mg/mlを加え刺激し、37°C10分間、incubateした後、13.5mg/ml ferricytochrome C(Sigma Chemicals, USA) 0.25mlを添加し、4°Cに急冷し、1,500rpm10分間遠心した。そしてその上清をTurnerの分光光度計にかけ、波長550nmにおける吸収を測定した。なお、分光光度計で得られた値は、文献¹²⁾に従い還元されたcytochrome Cの量に換算した($\Delta E_{550nm} = 2.1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$)。なお、 O_2^- の特異性を確認するため、150U/ml SOD(Sigma Chemical)をmedium中に加え、cytochrome C還元阻止試験を行ない、好中球 O_2^- によるcytochrome Cの還元阻止を確かめた。

H_2O_2 の測定は、蛍光を発するscopoletinを、 H_2O_2 がperoxidaseの存在のもとに酸化することから、scopoletinの蛍光減少度でもつて H_2O_2 の量を表わす方法⁵⁾を用いた。すなわち上記のKRPG-medium 1.8ml中に 2.5×10^6 PMNと1mg/ml opsonized-zymosanを加え37°C10分間incubateした後、2mg/100ml scopoletin(Sigma Chemical) 0.05mlと2mg/10ml peroxidase(東洋防, 大阪, Japan) 0.1ml(いずれもKRPに溶解)とともに2ml容器の四面石英ガラスのcubette(日立)に入れ、蛍光分光光度計(日立MPF4型)を使用し、0分より30分まで5分間隔で蛍光量を測定し30分間に減少する蛍光量の減少率を算出した。一方、30% H_2O_2 (三菱油化化学)を20~21倍(しかし、実際には H_2O_2 製品の純度が低下していることが多く、実際には18~19倍の希釈でよい場合が多い)の倍数希釈を行ない0.01 μ molの H_2O_2 が30分間に

scopoletin 蛍光を減少 さす 減少率を測定し、 $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ による scopoletin 減少率を standard curve として、被検検体の 1 分間に scopoletin を減少する H_2O_2 量を算出した。なお、 H_2O_2 の特異性を調べるため 400 U/ml catalase (Sigma Chemical) によつて、 H_2O_2 の蛍光減少能の消失を確認した。

$\text{OH}\cdot$ に関しては、 $\text{OH}\cdot$ が α -keto-methiol butyric acid (KMB) を加えるとエチレンガス (C_2H_4) に変化する原理を利用し、 C_2H_4 を測定することによつて $\text{OH}\cdot$ 量の変動を知る方法を用いた¹³⁾。すなわち、gelatin 含有 KRP G 2cc を stoppered tube に入れ、 1 mM KMB と 2×10^6 PMN を加え 37°C shaker bath で pre-incubation を行なつた。次いで opsonized-zymosan を加え密栓し、 37°C 10, 20, 30, 40 分間それぞれ shaker bath で incubate した tube より、それぞれ gas tight syring によりシリコン栓を穿刺し、抜き取る気体量 (約 0.2 cc) だけ空気を tube に入れた後、tube 内の気体を抜き取り、ただちに日立ガスクロマトグラフにより、含有する C_2H_4 標準ガスを使用し、ガスクロの描く高さを測定して standard curve を作成し、検体の描く curve を比較して被検 $\text{OH}\cdot$ の値を算出した。さらに、こうして 10, 20, 30, 40 分間それぞれ shaker bath で incubate した tube より産生された $\text{OH}\cdot$ 量の合計を算出し、対照群と比較した。

$^1\text{O}_2$ については、最近、議論 (Chemiluminescence) は $^1\text{O}_2$ でなくすべての活性酸素を測定しているという) があるが、 $^1\text{O}_2$ は photon を発生するという原理より、Chemiluminescence を液体シンチレーションカウンタ (Packard, Illinois, USA) を用いて測定⁵⁾した。medium には無色の Hanks 液を使用し、操作はすべて赤色のランプのもとで暗室で行ない、tube は銀紙で包み遮光を厳重に行なつた。 5×10^6 PMN と 1 mg/ml opsonized-zymosan を 3 cc の gelatin 含有 Hanks 液に入れ、 37°C 10 分間 incubate した後、シンチレーションの機械の coincidence を off にして、tube の銀紙をはがし、素早く機械の中に tube を入れ、cpm を測定した。なお対照として、Hanks medium のみの入つた tube と、

incubate 開始直前の tube の cpm を測定した。

ライソゾーム酵素の測定：ライソゾーム酵素の測定は、lysozyme, α -mannosidase, β -glucuronidase の 3 種の酵素について行ない、やはり OI 産生の場合と同様、opsonized-zymosan (1 mg/ml) の刺激による PMN の酵素分泌量を測定した。それらの測定法については、詳細は既報¹¹⁾の通りであるが、lysozyme は lysodeikticus を用いて turbidimetric 法に従つて混濁度を Beckman Model 39 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, Ca) の分光光度計を使用し測定し、 α -mannosidase および β -glucuronidase は、それぞれ substrate として、P-nitrophenyl- α -mannoside および phenolphthalein- β -glucuronide を使用し、Turner の比色計でもつて、それぞれ黄色、赤色の吸収を測定した。なお好中球障害に基づく細胞膜透過性の非特異的亢進や、細胞の死滅をチェックするため¹¹⁾、LDH の測定も同時に行なつた。LDH は、pyruvate 含有の sodium phosphate buffer に溶解した nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) の酸化を Beckman 分光光度計を使用して測定した¹¹⁾。

また、各活性酸素およびライソゾーム酵素の実験において、opsonized-zymosan で好中球を刺激したが、同時に zymosan を添加しない好中球 medium についての各酸素、酵素の測定も行なつた。

全ての検査は、triplicate assay でもつて行ない、各実験によつて得られた平均値および SE (standard error of mean) より、対照との有意差を判定した。

成 績

まず対照群で、コルヒチン・ステロイド或いは、ステロイド末内服の痛風、掌蹠膿疱症、気管支喘息、尋常性乾癬患者 13 例中、痛風患者の 2 例に若干 4 種の OI 値と 3 種のライソゾーム値の高値がみられたが、全体として健康対照群とほぼ同傾向を示し、特に今回は薬物内服によるこれら疾患群の OI、ライソゾーム酵素の低下が問題となるのであるが、薬物末内服のこれら疾患々者ではそのような zymosan の刺激に対する OI 産生能の低値

のみられた症例は存在しなかつた(図省略)。一方、コルヒチン・ステロイド或いはステロイド内服中のこれら疾患対照群患者では健康対照群に比し、zymosan刺激に反応する4種のOI産生能はいずれも著明な低下($P<0.01$)を示し、3種のライソゾーム値も有意の低下を示した($0.01<P<0.05$) (図1~5)。

次に疾患群のBehçet病患者ではactive stageにあるcomplete typeの5例全例において、zymosan刺激に対する4種のOI産生能は全種、薬物内服中の疾患対照群とは勿論($P<0.0001$)、正常健康人とも有意に($P<0.01$)増加を示し、特にOIとしての強力な作用を有しているといわれて

いる($\text{OH}\cdot$ ・⁵⁾⁸⁾の産生能が特に上昇を示した($P<0.00001$) (図1~4)。ライソゾーム酵素も正常人($0.05>P>0.01$)および薬物内服の疾患対照群($P<0.01$)との間に有意の上昇が認められたが、OI程増加はみられなかつた(図5)。inactive stageのcomplete typeおよびactive, inactive stageのincomplete type 3 groupsでは、OI値は、3例の患者がactive stageのcomplete typeの症例と同程度に高値を示しているが、全体としては、健康正常人と比較すると、増加はしているが、 $\text{OH}\cdot$ を除き3種のOIについて統計学的有意差はみられなかつた($P>0.05$, $\text{OH}\cdot$ のみ $0.05>P>0.01$)。しかし、薬物内服中の疾患対照群と比較すると、

Fig 1. Generation of O_2^- by PMNs from the patients and control groups stimulated with opsonized zymosan.

●(*) Patients with Behçet disease of complete type in active stage. Patients with SLE, RA and other auto-immune diseases in active stage.

×(§) Patients with Behçet disease of complete type in inactive stage and incomplete type in active and inactive stage. Patients with SLE, RA and other auto-immune diseases in inactive stage.

§§ Diseased control groups receiving drugs included the patients with asthma, gout and some dermatosis receiving colchichine and/or steroids as the patients with Behçet, SLE and RA did.

O_2^- was assayed for reduced ferricytochrome C after 10 minutes incubation at 37°C with opsonized zymosan by measurement absorbance at 550nm using spectrophotometer. The results were converted to nanomoles of cytochrome C reduced by using $\Delta E_{550\text{nm}} = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. (Ref. 30)

Fig 2. Generation of H₂O₂ by PMNs from the patients and control groups stimulated with opsonized zymosan. ●(*), ×(\$), §§ See Fig. 1, Maximal rates of H₂O₂ release were measured by quantitating the decrease in fluorescence intensity of scopoletin due to its peroxidase-mediated oxidation by H₂O₂. Fluorescence intensity of scopoletin was determined in a fluorescence spectrophotometer (Hitachi Co Ltd, Tokyo, Japan). In order to calculate H₂O₂ concentration in the samples, the relationship was used in which 1 mol of H₂O₂ oxidize 1 mol of scopoletin. Before the start of the experiments, SMNs were incubated for 10 minutes at 37°C with opsonized zymosan, scopoletin and peroxidase.

Fig 3. Generation of OH by PMNs from the patients and control groups stimulated with • opsonized zymosan. ●(*), ×(\$), §§ See Fig 1. OH was quantitated by the capacity of ethylene gas formation from KMB added with OH • generated by PMNs. Ethylene content was determined by analysis in a gas chromatography machine (Hitachi Co Ltd). Before the start of experiment, PMNs were incubated for 10 minutes at 37°C with 10, 20 and 30 minutes following incubation.

Fig 4. Generation of Chemiluminescence by PMNs from the patients and control groups stimulated with opsonized zymosan. ●(*), ×(\$), §§} See Fig 1.

Chemiluminescence was quantitated in a liquid scintillation spectrometer after 10 minutes incubation at 37°C with opsonized zymosan.

Fig 5. Lysosomal enzymes and LDH released from stimulated-PMNs with opsonized zymosan.

■ Behçet disease of complete type in active stage.
 □ SLE in active stage. ▨ Bacterial infection. ▤ Healthy control.
 expressed as percent of total enzyme activity.

やはり有意の増加が認められ (O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 は, $P<0.01$), $OH\cdot$ の産生能は4コのOI中やはり最高の増加を示した ($P<0.001$) (図1~4). これら3 groupsのライソゾーム酵素値については, 薬物内服の疾患対照群と比較すれば, 有意の増加がみられたが ($0.05>P>0.01$), 健康対照群との間には有意差が認められなかつた ($P>0.05$) (図5). やはりこれら3 groupsでも, OI産生能と比較すると, ライソゾーム酵素分泌能の方が, 患者と対照群との間の有意差の開きが狭いという特徴が知られた. ライソゾーム酵素のうちでは, β -glucuronidaseの分泌能が他の2種の酵素と比較し高値を示す傾向がみられた.

SLE・RAおよびその他の自己免疫疾患群患者では, ほぼ同傾向を示し, active stageの患者では大半の症例 (約3/4以上) がステロイド内服中に拘わらず, zymosanの刺激に対する4種のOI産生能が高値を示し, 薬物内服の疾患対照群とは勿論 ($P<0.01$), 薬物未内服の健康対照群と比べても有意の上昇がみられた ($0.01<P<0.05$). inactive stageの患者は, 一般にactive stageのものより低く, 全体として, 健康対照群と比較すると有意差はみられないが, 薬物内服の疾患対照群と比較すると, 高値を示した ($0.01<P<0.05$). またactive stageの患者でも約1/4の症例は, inactive stageの症例と同程度の比較的低い値を示し, 逆に, inactive stageの症例でもactive stageのものと同じように高値を示すものもみられ, RA患者にその傾向が強く認められた (図1~4). SLEなど自己免疫疾患 (特にSLE) ではactive stageでも比較的低い症例も存在し, SE幅が広い (4種のOIのSEは, 健康人や疾患対照群のSEと比較し平均2~3倍の広さである) 特徴がみられた. またSLEでは, 4種のOIのうち4種全てのOIが増加を示さない症例がみられたり, zymosan刺激下では対照に比し高値を示さないが, 逆にzymosan無添加にすると対照よりOI産生能が高値を示した症例もみられた (図表省略). ライソゾーム酵素値については, やはりactive stageの症

例に高値が多く, Behçet病のactive stageのcomplete typeの症例と他の三つのgroupsとの間にみられた差異が, SLE・RAその他の自己免疫病患者のactive stageとinactive stageの症例との間の差異と類似共通しており, 説明を省略する (図5, 薬物内服疾患対照群の表示は省略).

癌患者では, OI産生能の高値を示す症例は皆無で, 約2/5が健康対照群と同程度の値を示したが, 3/5の患者は健康対照群より遙かに低い値を呈し, 全体として有意の低下を示した ($0.01<P<0.05$). ライソゾーム酵素値に関しても同様軽度ではあるが, 全般に分泌能は低下傾向を示した (図表省略).

細菌感染患者群では, 3/4の症例が健康人と同傾向のOI産生能を示し, 1/4が, Behçet病や自己免疫疾患群と類似して高値を示し, また逆に1例に, 極度の低下がみられた. 全体として健康対照群との間に有意差はみられなかつた ($P<0.05$) (図1~4). ライソゾーム酵素分泌能は, OI産生能より高く, SLEやBehçet病のそれと, ほぼ同程度の高値を示し, lysozymeや α -mannosidaseについては健康対照群と比較し有意の増加がみられ ($0.01<P<0.05$), β -glucuronidaseについては, さらに高値を示した ($P<0.01$) (図5).

Zymosanを加えない患者好中球mediumにおけるOI産生値については, やはり, 若干のOI産生が認められ, 特にBehçet病や自己免疫病の患者好中球に, 対照に比しOI産生能の増加傾向がみられた (図6). 薬物内服疾患対照群と健康人との比較および患者群と対照群の比較は, zymosanを加えた場合の両者の差異と, ほぼ同様の傾向がみられた. すなわち薬物内服疾患対照群 (図表省略) は健康人に比し, OIは有意な低下 ($0.01<P<0.05$) を示し, active stageの自己免疫病やBehçet病 (complete type) ではOIの産生が健康対照群より有意に上昇し ($0.01<P<0.05$), 薬物内服疾患対照群と比較すれば顕著な増加 ($P<0.01$) がみられた (図6). 細菌感染群でも, zymosan添加の場合とはほぼ同様の傾向が対照との間にみら

Fig 6. Oxygen radicals generated by PMNs without stimulation of zymosan.

■ Behçet disease of complete type in active stage.

□ SLE in active stage. ▨ Bacterial infection. ▩ Healthy control.

* Ferricytochrome C reduction (nmol/min per 4×10^6 PMNs).

** H_2O_2 generation ($\mu M \times 10^2$ min per 2.5×10^6 PMNs).

§ Ethylene formation ($p \text{ mol} \times 10^2 / 2 \times 10^6$ PMNs).

§§ Chemiluminescence ($cpm \times 10^4 / 5 \times 10^6$ PMNs).

れたが、癌患者では、zymosan刺激の場合には健康人より有意のOI産生低下がみられたのに反し、zymosan未添加では、OI値に健康人との有意差が存在しなかつた（表示省略）。

ライソゾーム酵素値については、zymosanを加えない好中球mediumでは分泌量が極く微量であるため、測定比較は不可能であつた。

考 案

今回の実験結果、Behçet病やSLEを始めとする自己免疫疾患患者の好中球は、健康人好中球に比し、in vitroで、好中球単独mediumでも若干、zymosan刺激のmediumでは著明に、4種のOIの産生増加をもたらすことが証明され、特にactive stageのこれら疾患患者では、コルヒチン・ステロイド内服に拘わらず、薬物未内服の健康対照

群より、OI産生能が上昇していることが知られた。また、ライソゾーム酵素も適度な分泌上昇が認められた。コルヒチン・ステロイド内服疾患対照群では、未内服の疾患対照群や健康人に比し、有意差をもつてOIおよびライソゾーム酵素の産生分泌の低下がみられ、これら薬物は一般に好中球の特にOIの産生に強い抑制を示すとはいえ、OIのphagosome中での活性を表わすNBTテストがステロイドにより低下し¹⁴⁾、コルヒチンも好中球機能やOI産生を低下さす報告¹⁵⁾と一致するものである。active stageのcomplete type以外のBehçet病患者や、inactive stageのSLE・RA・など自己免疫疾患患者では、比較的高値が軽度であつたのは、これら薬物の影響と考えられ、従つて、これらOI抑制薬の投与にも拘わらずOI高値を示

したactive stageの患者では、好中球が異常な被刺激性亢進状態にあつたといえよう。

このことは、Behçet病・SLEなどのimmune complex diseaseの好中球は、恐らく、異物がimmune complex (IC) という大きなparticleであるため、貪食後fusingにより多くのOIを必要とするためと推測される。今回の実験の対象となつたSLEを始めとする自己免疫疾患の症例は、直接血清中のICは測定していないが、全例リウマチ因子、抗DNA抗体、抗核抗体のうち、少なくとも1個以上が1:160以上を呈した症例であるため、血清中ICの存在が考えられ、またBehçet病患者にもIC陽性の報告⁷⁾がみられることより、今回の自己免疫疾患やBehçet病患者に証明されたOIの高値は、ICと何らかの関係が存在するものと思われる。しかしながら、ICが患者の20%にしか証明されないBehçet病患者において、SLE・RA以上にOIの産生増加が認められ、Behçet病の組織障害の原因とも推測されている（アレルギー誌投稿中）ことや、ICの証明されないseronegativeのRA患者にもOIの増加が証明される場合も経験することにより、ICの貪食のみが好中球の刺激・機能亢進状態の原因ではなく、疾患そのものの背景に、好中球の被刺激性を亢進さす何らかの原因があるものと考えられる。特にBehçet病⁷⁾については、食細胞の貪食能やchemotaxisの亢進が知られ、また食細胞が食細胞を貪食するライター細胞がみられ、患者食細胞の機能亢進が考えられており、Behçet病のOI産生能の亢進による疾患発生病理との関係については、著者の研究室で、実験されている（アレルギー誌投稿中）。今回の実験では主として患者好中球のOIや酵素の産生分泌能について報告したが、神宮¹⁴⁾らはSLEの組織障害とOIの関連性についての実験で、正常人好中球とICを含有した患者血清を使用し、Johnston⁵⁾らもimmune complex diseaseの実験モデルにおいて、正常人好中球とmicropore filterに結合した重合IgGを使用し、正常人好中球が、ICを貪食することによりOIを大量に産生することを報告し、

患者血清 (IC) にその原因を想定している。われわれの実験室でも、正常人好中球はSLE・RA患者血清添加により、OI産生が増量する場合も多いが、増加のみられぬ場合もあり、dataのばらつきがみられていることを経験する（別誌投稿中）。また、やはり今回のわれわれの実験で、zymosanを加えない患者好中球のみのmediumにおいても健康人のそれに比し、OIの産生上昇がみられたことは、好中球側の異常な機能亢進状態を証明すると同時に、このことはin vitroに移された好中球膜表面のFc receptorに、なお血中のICその他の血清成分が附着していたことが原因であることも考えられ、自己免疫疾患やBehçet病にみられたOI産生能の上昇は、好中球側の何らかの原因に加えて、ICその他補体などの血清側の要因の双方に基因していると考えるのが妥当と思われる。

従来、immune complex diseaseにおける組織障害の機序としては、好中球の分泌するライソゾーム酵素¹⁵⁾によるものが考えられていた。また、動物実験で1965年Cochrane¹⁸⁾らはnephrotoxic nephritisにおいて、またHawkins¹⁹⁾らは1965年immunological glomerulonephritisにおいて、好中球による組織障害が、ライソゾーム酵素によるものであろうと推測したが、電顕的検索によりライソゾーム酵素分泌による顆粒の減少が証明されず、当時Cochrane¹⁸⁾らは、ライソゾーム酵素以外の好中球factorが炎症の組織障害に関与している可能性を示唆していた。Johnston⁵⁾らは、1976年immune complex diseaseの好中球の実験モデルで、ライソゾーム酵素のうちの β -glucuronidaseの分泌の適度な増加がみられる他に、 O_2^- 、 H_2O_2 、 1O_2 のOIの産生が著明に上昇することを報告した。さらに神宮¹⁶⁾らは、SLEの組織障害の原因として、活性酸素の増加を示唆している他、著者ら⁷⁾もBehçet病患者で好中球機能亢進の一つとしてOI産生能の増加を挙げ、増加したOIが、in vitroで培養静脈内皮細胞に障害性を示すことを報告し（アレルギー誌投稿中）、増加したOIと組織障害と

の関連性が近年明らかにされてきている。また、組織障害以外にもリンパ球障害とOIの増加との関連性が、著者⁹⁾らのSLE・RAの好中球に関する実験(Con Aに対する反応性の低下が最も強い)や、西田¹⁰⁾らのhypoxanthine-xanthine oxidaseの実験系より産生した大量のOIによるリンパ球の反応性の低下(やはりCon Aに対する反応性の低下も最も著明)に関する報告、またMertger⁶⁾のネズミの好中球の産生したOIによるCon Aへのリンパ球の反応の低下についての報告などにより明らかにされてきた。OI以外の好中球よりの分泌因子も関与しているであろうが、OIもリンパ球障害や組織障害の原因の一つのfactorとなつていることが考えられる。

従来より、癌患者の血清中にライソゾーム酵素やLDHが増加することは、細胞の破壊が激しいために当然のこととして理解されているが、今回の実験では癌患者好中球のライソゾーム酵素産生能は、OI産生能とともに健康人より低下していることが知られたことは興味深い。このことは、対象となつた症例の多くに抗癌薬が投与されていたことが原因とも考えられるが、抗癌薬未使用の癌患者にも、最近のわれわれの研究結果で、特にzymosanで刺激した好中球のOI産生能の低下が証明されている。OIの活性の示標になるNBTテストのうち、latexなどで刺激したstimulated testで低値を示す患者に癌患者が多く、このことが癌発生の原因である可能性について著者ら²⁰⁾は解説を行なつてきたが、このようなzymosanで刺激を加えた癌患者好中球のOI産生能の低値は、癌の発生病理との間に何らかの関連性を示唆するものと思われる。

細菌感染群患者では、ライソゾーム酵素産生能の上昇が大部分の症例にみられ、OI産生能について、約1/4の症例にBehçet病やSLEにおける程ではないが上昇が認められた。このことは、phagosome中に貪食された細菌のkillingにはOIよりもライソゾーム酵素がより必要なためではなかろうかと推測される。また、重篤な感染の併発し

た1例に、OIの高度な低下がみられたことは、何らかの原因でOI産生能がCGDのように低下し、それが原因でCGDにみられるような重症感染に罹患したことが推測される。

なお、SLE患者ではactive stageでOIの高値を示す症例がみられたにも拘わらず、比較的低いOI値を示す症例(約1/4に)も存在し、標準偏差が大きい特徴が認められたが、全例がステロイドを内服しており、ステロイドにはOI値を抑制する作用があり¹⁴⁾、患者のステロイドへの感受性の差から、dataのばらつきが大きい結果が得られたものと推測される。また今回の実験で明らかにされたように、自己免疫疾患(特にSLE)の好中球では、4種のOIが全種揃つて増加を示さなかつたり、zymosan刺激の好中球mediumではOIが対照群との間に差がないが、zymosan未添加のmediumでOI産生能が対照群より亢進を示したり、SLE好中球の多様性、異常な反応性が知られたことも興味深い。

従来、既述のように炎症には食細胞によるライソゾーム酵素の分泌増加を伴い、組織障害の発生、炎症の進展がみられると考えられていたが、近年活性酸素の研究が進み、それらの測定が容易となり、同じ炎症の場合に、活性酸素の関与も明らかにされてきた。そして、bacterial originの炎症では主にライソゾーム酵素が関与し、immune complex originの場合にはライソゾーム酵素以外に、活性酸素が、ライソゾーム酵素以上に炎症に密接な関係を有していることが今回の実験により結論付けられたことはJohnston⁵⁾らの報告とも一致し注目に値するといえ、今後、ライソゾーム酵素とともに活性酸素と種々の炎症性疾患との関連性の研究が期待される。

また、既述のように、従来より、臨床的に好中球の機能や活性酸素・ライソゾーム酵素と関連性の知られている疾患としては、低下例としてCGD¹⁾やChediak-Higashi syndrom⁷⁾、上昇例としてGSH reductase欠損症⁶⁾やGSH synthetase欠損症⁷⁾など、われわれ一般臨床家にとつて馴染みの浅い

疾患であつたが、今回われわれの報告で、身近かに活性酸素の異常高値が原因の一つと考えられる疾患が存在することが知られたことは、有意義なことといえる。

結 論

従来、活性酸素 (OI) といえ、CGD に代表されるように、低下による生体防衛の破綻が問題となつていた。しかしながら、近年、その過度な増加も、ライソゾーム酵素のみが原因と考えられていた組織障害を始め溶血性貧血、好中球の viability の低下、易感染の発生、血小板凝固促進など生体に多くの不利な結果をもたらすことが明らかにされ、auto-oxidative damage として注目されて来ている。われわれは、SLE、Behçet 病の好中球が、組織障害 (SLE ではリンパ球障害も) に関与していることを証明したので、今回、SLE、Behçet 病を始め種々の疾患群の OI とライソゾーム酵素 (LE) 産生能を測定した。

結果、Behçet 病 および 自己免疫疾患群 では、OI の著明な上昇と軽度の LE の増加が認められ、一方細菌感染群では、中等度の LE の上昇と、軽度の OI の増加がみられた。癌患者では、健康人より、高度な OI 産生能の低下がみられ、抗癌薬未内服、未治療の患者にも同様の傾向がみられ、このことは、OI の生体防衛に占める役割から考えて、癌の発生病理と何らかの関係を有していることが推測される。

文献の auto-oxidative damage についての疾患報告は、日常、余りわれわれの遭遇しない疾患であつたが、今回のように、日常診療する疾患に、従来組織障害の元凶と考えられていた LE 以上の高値に、OI が証明されたことは興味深い。

文 献

- 1) Baehner RL: The growth and development of our understanding of chronic granulomatous disease. In "The phagocytic cell in host resistance" (Ed. by Bellanti, JA and Dayton, DH), Raven Press, New York, 1979, p173.
- 2) Salin ML and McCord JM: Free radicals and inflammation. *J Clin Invest* 56: 1319, 1975.
- 3) Murry HW and Cohn ZA: Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of toxoplasma gondii to oxygen intermediates. *J Exp Med* 150: 938, 1979.
- 4) Rosen H and Klebanoff SJ: Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. *J Exp Med* 149: 950, 1979.
- 5) Johnston RB Jr and Lehmeyer JE: Elaboration of toxic oxygen byproducts by neutrophils in a model of immune complex disease. *J Clin Invest* 57: 836, 1976.
- 6) Boxer LA, et al: Protection of granulocytes by vitamin E in glutathione synthetase deficiency. *New Engl J Med* 303: 901, 1979.
- 7) 丹羽鞆負, 横山三男: 活性化した好中球の auto-oxidative damage について. 最新医学 37(3): (未定), 1982.
- 8) Metzger, et al: Macrophage-mediated suppression. *J Immunol* 124: 983, 1980.
- 9) 丹羽鞆負, 他: 好中球との混合培養による全身性紅斑性狼瘡およびリウマチ患者のリンパ球障害について—主としてリンパ球膜表面およびその機能障害を中心に. アレルギー 29: 981, 1980.
- 10) 西田秀太郎, 他: Free radicals のリンパ球におよぼす影響. 日本免疫学会, 総会記録 10: 327, 1980.
- 11) 丹羽鞆負: Stimulated neutrophils により増加した oxygen intermediates による auto-oxidative damage の紹介—negative feedback influence により低下した lysosomal enzymes 分泌に対する scavengers の影響を中心に. 日血会誌 44: 105, 1981.
- 12) Massey V: The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome C. *Biochem Biophys Acta* 34: 255, 1959.
- 13) Klebanoff SJ and Rosen H: Ethylene formation by polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 148: 490, 1978.
- 14) Miller DR and Kaplan HG: Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisolone. *Pediatrics* 45: 861, 1970.
- 15) Malawista ES: The action of colchicine in acute gouty arthritis. *Arch Rheum* 18: 835, 1975.
- 16) 神宮政男, 他: SLE 血清による顆粒球依存性培養血管内皮細胞傷害とその機序としての su-

- peroxide およびライソゾーム酵素. 厚生省特定疾患系統的血管病変に関する調査研究班(班長: 福田芳郎), 1978年度研究報告書, 287, 1979.
- 17) Janoff A: At least three human neutrophil lysosomal proteases are capable of degrading joint connective tissues. *Ann New York Acad Sci* 256: 402, 1975.
- 18) Cochrane CG, et al: A role of polymorphonuclear leukocytes and complement in nephrotoxic nephritis. *J Exp Med* 122: 99, 1965.
- 19) Hawkins D and Cochrane CG: Glomerular basement membrane damage in immunological glomerulonephritis. *Immunology* 14: 665, 1968.
- 20) 丹羽鞆負, 他: Immunobeads を使用した好中球の貪食能検査法. 医学のあゆみ 第Ⅲ巻: 626, 1979.
-