

好中球機能に及ぼす因子 (特に receptor について)

三 河 春 樹
伊 藤 節 子
(京都大学小児科)

好中球の主な機能である細菌の殺菌作用は、大きく分けると、chemotaxis, phagocytosis, intracellular bacterial killing の三段階より成っている。この各段階における機能異常が、好中球機能不全症として多数報告されている。

私共は、すでに *Staphylococcus aureus* (以下 *St. aureus* と略) に特異的な貪食能の低下を示す一例を報告し¹⁾、Fc(γ) receptor, C3b receptor の他に、*St. aureus* の貪食機構に重要な役割を果たしている部位、すなわち *St. aureus* に対する receptor が好中球上に存在している可能性を示した。また、小児にしばしばみられる全身性小血管炎である血管性紫斑病において、急性期血清中に、好中球 chemotaxis に対する inhibitor が存在し、その inhibitor が IgA class に属していることを示した²⁾。この inhibitor はおそらく、IgA immune complex であると考えるが、この inhibitor が好中球と interaction をおこす上で、IgA receptor の存在が必要となり、IgA receptor の炎症反応における役割が注目される。

このように、好中球上には、従来より、rosette 法や binding assay 法で証明されてきた Fc(γ) receptor, C3b receptor, chemotactic receptor, β adrenergic receptor 以外に、種々の receptor が存在すると考えられ、これらの receptor 毎に、好中球機能不全症を再分類することが、好中球の殺菌機構および炎症反応における役割をよりよく理解するのに役立つと考えられる。

そこで、まず、好中球の持つ機能を利用して、種々の receptor の検出を試みた。

方 法

IgG, IgA 及び IgE coated tube の作製: Kiyotaki 等の方法³⁾ を modify し、micro 化して行った。精製した IgG, IgA, IgE を各々 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.8 に溶解し、その溶解液 0.5 ml をコーケン M チューブに入れ、 37°C にて 2 時間 incubation 後、生食で 3 回洗浄し、IgG, IgA または IgE coated tube とした。

Opsonised Zymosan 又は ***St. aureus*** の作製: Zymosan または、*St. aureus* (Smith Strain) を fresh serum (以下 FS と略) または heat inactivated serum (以下 HIS と略) と 37°C にて 30 分間 incubation 後、 4°C にて Hanks 液にて洗浄後を用いた。

IgG, IgA 及び IgE soluble immune complex (以下 SIC と略) の作製: κ type の myeloma 血清より分離精製した IgG, IgA または IgE を抗原とし、市販の抗血清より分離

精製した anti γ chain antibody, anti α chain antibody, anti ϵ chain antibody および anti κ chain antibody を抗体として、すでに報告した方法⁴⁾で IgG SIC, IgA SIC, および IgE SIC を作製した。

Chemotaxis : IgG SIC, IgA SIC, IgE SIC の好中球 chemotaxis におよぼす影響は、すでに報告した方法⁴⁾で, Boyden chamber を用いて行った。すなわち, 種々の濃度の SIC と分離した好中球とを37°Cにて30分間 preincubation 後, Hanks 液で洗浄し, chemotactic factor と millipore filter とを set しておいた Boyden chamber の upper chamber に入れ, 遊走能を測定することにより, SIC の chemotaxis 抑制効果をみた。

O₂⁻ generation : O₂⁻ generation は, Type VI の cytochrome c (SIGMA) を用いて, Simchowitz 等の方法⁵⁾により, superoxide dismutase inhibitable cytochrome c reduction を測定することにより間接的に測定した。

結 果

IgG coated tube, IgA coated tube では, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という低蛋白濃度でも, 充分な O₂⁻ 産生がみられたが, IgE coated tube では, Kiyotaki 等の報告と同様, 蛋白濃度を500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで上げて O₂⁻ 産生はみられなかった。

そこで, IgE を種々の濃度 (0.01 $\mu\text{g} \sim 10 \mu\text{g}/10^6$ PMN) で好中球と preincubation し,

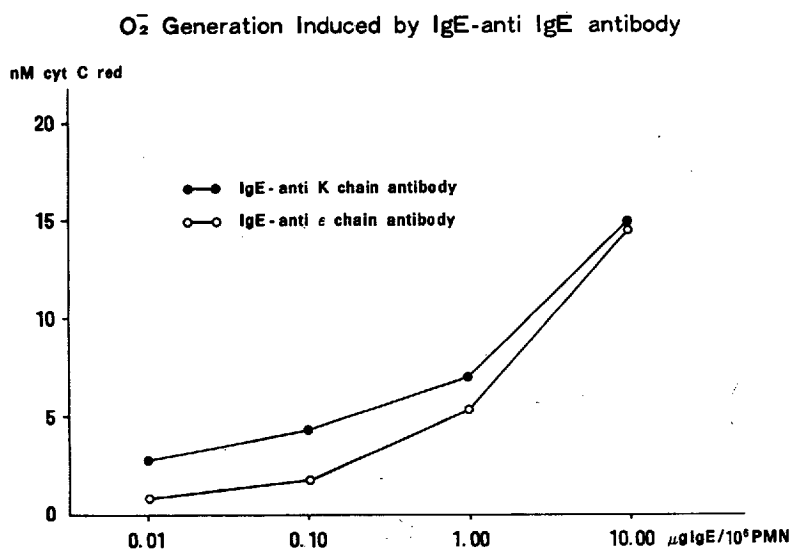


図1 「IgE-anti IgE antibody による O₂⁻ 産生」 0.01 $\mu\text{g} \sim 10 \mu\text{g}/10^6$ PMN の IgE を好中球と preincubation し, Hanks 液で洗浄後, 精製した anti ϵ chain antibody 又は, anti κ chain antibody で刺激すると, IgE 濃度に dependent に O₂⁻ 産生がみられた。whole anti ϵ antibody の代わりに, F(ab')₂ fragment を用いても同様の結果が得られたが, IgE のみ, 又は抗体のみでは, O₂⁻ は産生されなかった。

Hanks 液で洗浄後、精製した anti ϵ chain antibody または anti κ chain antibody で刺激することによる O_2^- 産生をみたのが図1である。H鎖に対する抗体で刺激しても、L鎖に対する抗体で刺激しても、IgE の濃度に dependent に O_2^- 産生の増加がみられた。IgE と preincubation, 洗浄後、抗体の代わりに Hanks 液を加えた場合、Hanks 液と preincubation, 洗浄後、抗体を加えた場合には、 O_2^- 産生はみられなかった。whole anti ϵ chain antibody の代わりに、pepsin 分解で得られた $F(ab')_2$ を用いた場合にも、同様の結果が得られたことより、抗体として用いた rabbit IgG と好中球上の $Fc(\gamma)$ receptor との interaction の結果ではなく、好中球膜上に IgE (おそらく $Fc(\epsilon)$) receptor が存在し、膜上に付着していた IgE が抗体を加えることにより IgE immune complex となって膜の変化をひきおこし、 O_2^- を産生したものと考える。

EA_{IgG} , opsonized Zymosan にも、 O_2^- が産生され、この場合の O_2^- 産生能は、colchicine を加えることによりむしろ増強された。このことより、粒子を貪食した結果 O_2^- を産生したのではなく、 $Fc(\gamma)$ または C3b receptor に粒子が付着したことにより膜の変化がおり、 O_2^- が産生されたものとする。

先に述べたように、私共は、易感染性を示し、rosette 法にては、 $Fc(\gamma)$ receptor も C3b receptor も検出でき、Streptococcus pyogenes および E. coli に対する貪食殺菌能は正常であるが、St. aureus に対しては貪食能が低下している症例を経験した。この症例 (patient

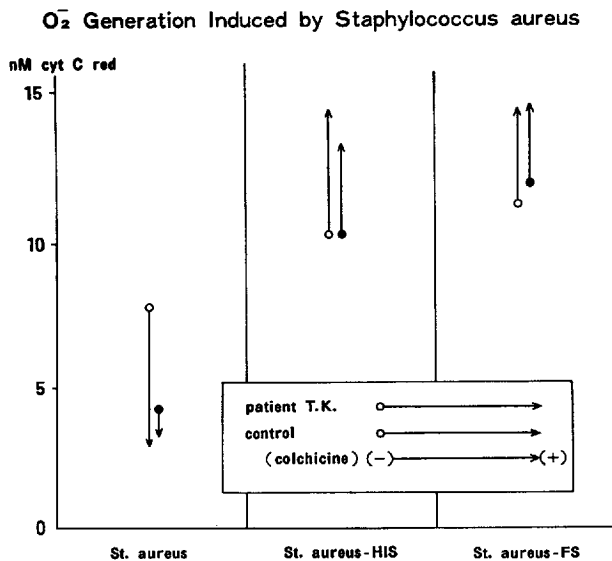


図2 「Staphylococcus aureus による O_2^- 産生」 opsonize しない St. aureus によって正常人では O_2^- が産生されたが、患児好中球は O_2^- をほとんど産生し得ず、正常人好中球の O_2^- 産生能も colchicine により抑制された。opsonize した St. aureus では、正常人、患児好中球共に O_2^- を産生し、colchicine 処理により、産生される O_2^- 量はむしろ増加した。

T.K.) および、正常人の好中球を用いて、St. aureus そのもの、HIS にて opsonize した St. aureus, FS にて opsonize した St. aureus による O_2^- 産生能を測定したのが図2である。HIS または FS で opsonize した St. aureus による O_2^- 産生能は、患児好中球も、正常人好中球も有意差がなく、colchicine を実験系に加えることによりむしろ増強したのは、EA_{IgG}, FS opsonized Zymosan で刺激した時と同様で、好中球の Fc(γ) receptor および C3b receptor を介した反応と考えられる。opsonize していない St. aureus で好中球を刺激した場合には、正常人好中球では、若干の O_2^- 産生がみられ、colchicine により抑制されるが、患児好中球では、ほとんど O_2^- 産生がみられなかった。正常人好中球でも colchicine による抑制をうけたことより、St. aureus そのものによる O_2^- 産生は、貪食を介した反応であり、St. aureus の貪食には、Fc(γ) receptor, C3b receptor 以外に、もう一つの認識機構が必要であると考えられる。患児の好中球には、この認識機構が欠如しているために、Fc(γ) receptor, C3b receptor があるにもかかわらず、St. aureus を貪食できないものと考えられる。

IgG SIC および IgA SIC の chemotaxis におよぼす影響は、すでに報告⁴⁾した通りで、IgA SIC は、H鎖を介して作製した場合も、L鎖を介して作製した場合も、好中球 10^6 個あたり $3 \mu\text{g}$ という低蛋白濃度で、chemotaxis に対して 50%以上の抑制効果を示したが、IgG SIC には、このような作用がなく、IgA SIC の chemotaxis 抑制効果は、抗体として用いた rabbit IgG を介したものではなく、IgA と好中球との interaction によるものと考えられる。

IgE SIC の好中球 chemotaxis に対する抑制効果は図3に示した。H鎖を介して作製し

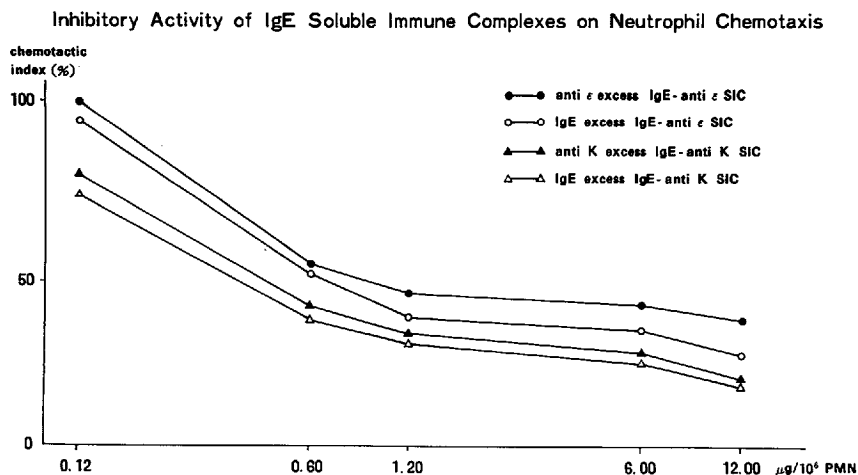


図3 「IgE SIC の好中球 chemotaxis 抑制効果」種々の濃度の IgE SIC と preincubation する事により好中球の chemotaxis は dose dependent な抑制をうけた。結果は、SIC の代わりに Hanks 液と incubation した場合を100とし、百分率であらわしたものを chemotactic index として表現した。

た場合も、L鎖を介して作製した場合も、抗原過剰の形でも、抗体過剰の形でも、好中球 10^6 個あたり $1.2\ \mu\text{g}$ で50%以上の抑制効果を示した。同様の形に作製したIgG SICでは、chemotaxisの抑制がみられないことより、この場合も、抗体として用いたrabbit IgGと好中球Fc(γ) receptorとのinteractionの結果ではなく、IgEと好中球とのinteractionによる結果であると考えられる。

chemical receptorとしては、 β adrenergic receptorとcholinergic receptorとがあり、特に前者は、binding assayによっても証明されており、cyclic nucleotideを介して好中球の働きに重大な影響をおよぼす。 β adrenergic agentは、chemotaxisに対しては、 10^{-6}M 、 O_2^- 産生能に対しては、 10^{-4}M の濃度で抑制的に働く。また、 β adrenergic agentを服用している喘息患児では、この抑制作用が表われにくく、tachyphylaxisの状態を表わしていると考えられる。Carbacholは、chemotaxisに対しては、 10^{-4}M をpeakとしてenhanceするが、 O_2^- generationに対しては有意な影響をおよぼさなかった。

考 按

好中球機能を利用して検出した好中球のreceptorを表1にまとめた。

これらのreceptorのうち、Fc(γ)、Fc(α)、C3b、 β adrenergic receptorは、rosette法、

表1 Demonstration of various receptors on neutrophils

receptor	method
Fc(γ)	O_2^- generation: IgG coated tube EA _{IgG} Staph. aureus opsonized with HIS
Fc(α)	O_2^- generation: IgA coated tube chemotactic inhibitory activity of IgA SIC
Fc(ϵ)	O_2^- generation: IgE + anti ϵ chain antibody IgE + anti K chain antibody chemotactic inhibitory activity of IgE SIC
C3b	O_2^- generation: Zymosan opsonized with FS Staph. aureus opsonized with FS
Staph. aureus	O_2^- generation: Staph. aureus
β adrenergic	impaired chemotaxis and O_2^- generation by β adrenergic agent
cholinergic	enhanced chemotaxis by Carbachol

HIS = heat inactivated serum

FS = fresh serum

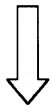
SIC = soluble immune complex

binding assay 等により認められている。Fc (ϵ) receptor に関しては、Fc 部分に対する receptor であるという確証はまだ得られておらず、検討中であるが、IgE に対する receptor の存在は確実であると考えられる。好中球機能不全症のなかに、血清 IgE 値の高値と、recurrent St. aureus infection をくり返し、chemotaxis の低下している症例が hyper IgE syndrome として報告されている。hyper IgE syndrome において chemotaxis が低下する mechanism として、chemical mediator の関与についての検討は多いが、IgE そのものの影響についての検討はされていない。私共も、血清 IgE 値の異常高値と recurrent infection を示す一女兒例を経験し、chemotaxis の著明な低下をみた。この患児の血清中に、cell-directed chemotactic inhibitor が存在していたことより、IgE と好中球との interaction の可能性を考え、上記の図 2 および図 3 に示すような実験を行い、この患児における chemotactic inhibitor が IgE immune complex である可能性を示した。

このように、好中球機能を利用して、種々の receptor が検出でき、各々の receptor の好中球機能におよぼす影響を検討することにより、従来報告されている好中球機能不全症を再分類できるものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) Ito, S., Mikawa, H., Hirao, T. and Okuda, R. : Defective phagocytosis confined to Staphylococcus aureus in a female infant with recurrent infections. Eur. J. Pediatr, **133** : 11, 1980.
- 2) Ito, S., Mikawa, H., Shinomiya, K. and Yoshida, T. : Neutrophil chemotactic inhibitor in sera of patients with acute stage Schönlein-Henoch purpura. Ann. Pediatr Jpn. 27, 1981. (in press).
- 3) Kiyotaki, C., Shimizu, A., Watanabe, S. and Yamamura, Y. : Superoxide production from human polymorphonuclear leukocytes stimulated with immunoglobulin of different classes and fragments of IgG bound to polystyrene dishes. Immunol, **35** : 613, 1978.
- 4) Ito, S., Mikawa, H., Shinomiya, K. and Yoshida, T. : Suppressive effect of IgA soluble immune complexes on neutrophil chemotaxis. Clin. Exp. Immunol, **37** : 436, 1979.
- 5) Simchowitz, L., Mehta, J. and Spielberg, I. : Chemotactic factor induced superoxide radical generation by human neutrophils. J. Lab. Clin. Med., **94** : 403, 1979.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



好中球の主な機能である細菌の殺菌作用は、大きく分けると、chemotaxis, phagocytosis, intracellular bacterial killing の三段階より成っている。この各段階における機能異常が、好中球機能不全症として多数報告されている。

私共は、すでに *Staphylococcus aureus* (以下 *St. aureus* と略) に特異的な貧食能の低下を示す一例を報告し 1), Fc()receptor, C3b receptor の他に, *St. aureus* の貧食機構に重要な役割を果たしている部位, すなわち *St. aureus* に対する receptor が好中球上に存在している可能性を示した。また, 小児にしばしばみられる全身性小血管炎である血管性紫斑病において, 急性期血清中に, 好中球 chemotaxis に対する inhibitor が存在し, その inhibitor が IgA class に属していることを示した 2)。この inhibitor はおそらく, IgA immune complex であると考えるが, この inhibitor が好中球と interaction をおこす上で, IgA receptor の存在が必要となり, IgA receptor の炎症反応における役割が注目される。

このように, 好中球上には, 従来より, rosette 法や binding assay 法で証明されてきた Fc()receptor, C3b receptor, chemotactic receptor, adrenergic receptor 以外に, 種々の receptor が存在すると考えられ, これらの receptor 毎に, 好中球機能不全症を再分類することが, 好中球の殺菌機構および炎症反応における役割をよりよく理解するのに役立つと考えられる。

そこで, まず, 好中球の持つ機能を利用して, 種々の receptor の検出を試みた。