

慢性肉芽腫症の微量・簡便診断法

合 屋 長 英
松 本 正
宮 崎 澄 雄
(九州大学医学部小児科)

要 旨

10 μ l 以下の血液で、顆粒白血球による過酸化水素とスーパーオキシドの放出を測定することにより、慢性肉芽腫症の診断を可能とする方法を開発した。過酸化水素はホモワニリン酸が酸化され発する蛍光により、スーパーオキシドはチトクロームCの還元による550 nmの吸光により測定した。この方法によれば、慢性肉芽腫症の診断は新生児期から可能であり、さらに、採血後40分で検査が終了する。

緒 言

近年、顆粒白血球の食作用に伴う殺菌系が、抗原・抗体反応等の免疫と共に生体の感染防禦に重要な役割を担っていることが知られるようになった。すなわち、顆粒球機能異常に伴う難治性感染症が注目され、このような病態における顆粒球機能の検査法の開発や、その異常の解明が望まれている。われわれは、顆粒球機能の1つである食作用時の活性酸素生成の測定法の改良を試みた。

従来からの、NBT や cytochrome C (cyt c) の還元をみる方法や酸素消費をみる方法には、多くの血液を必要とするため新生児・乳児には不適當であるとか、白血球を分離するための手間や時間がかかるとか、熟練が必要で普及しにくい等の問題があった。特に慢性肉芽腫症 (CGD) では乳児期より重症感染をくり返し、放置されると予後不良であることから、微量でしかも簡単に診断できる本法は有益な検査法である。

方 法

検体は、ヘパリン加静脈血か、ヘパリン処理ヘマトクリット管で採取した毛細管血を用い、測定まで4°Cで保存した。

1) 過酸化水素 (H_2O_2) 測定法

原理は、ホモワニリン酸が H_2O_2 と西洋ワサビペルオキシダーゼにより蛍光物質に変化する反応を利用し、蛍光分光光度計 (励起光 315 nm, 蛍光 425 nm) で蛍光増加をみた。反応系は、0.9 ml 中に、1~20 μ l のヘパリン血、Krebs-Ringer リン酸液、2mM グルコース、2mM

NaN₃, 2 nM 西洋ワサビペルオキシダーゼ, 0.5 mM ホモワニリン酸を含む。37°Cで10分間 preincubation した後, 熱処理大腸菌 (0.9 mg/ml) または, concanavalin A (Con A) (100 μg/ml) と cytochalasin D (Cyt D) (20 μg/ml) を加え反応を開始した。活性は, 同条件下に既知量の H₂O₂ を加えてその蛍光増加により計算した。

2) スーパーオキシド (O₂⁻) 測定法

O₂⁻ 生成は, O₂⁻ による cyt c の還元を, 二波長分光光度計により, 550—540 nm の吸光増加により測定した。測定系は, 全量 1 ml 中に, 1—10 μl のヘパリン血, Krebs-Ringer リン酸液, 2 mM グルコース, 100 μM cyt c を含む。37°Cで10分間 preincubation した後, Con A (100 μg/ml) と Cyt D (20 μg/ml) を加え反応を開始した。活性は, 還元型 cyt c のミリモル吸光係数19.1より計算した。

1)・2) とも反応は37°Cで行った。

結 果

図1に H₂O₂ 生成の経時変化を示す。大腸菌を加えると約10分後に蛍光の増加が始まり, これは superoxide dismutase (SOD) 添加により変化せず, Catalase により阻害された。Con A・Cyt D では, 約5分後に H₂O₂ 放出が始まり, SOD 添加により H₂O₂ 生成が約2倍に加速された。これは白血球より放出された O₂⁻ の dismutation が, SOD により促進されるためと考えられる。

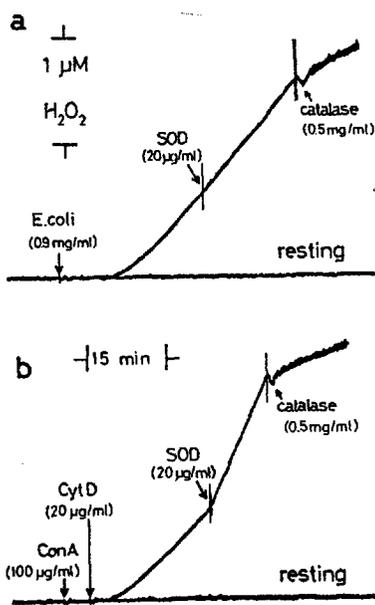


図1 Release of H₂O₂ from 10 μl of whole blood treated with E. coli (a) and ConA-CytD (b).

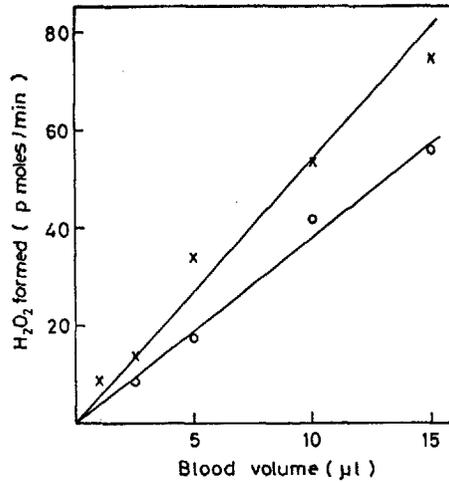


図2 The relationship between blood volume and the rate of H₂O₂ release induced by E. coli (o) and ConA-CytD (x).

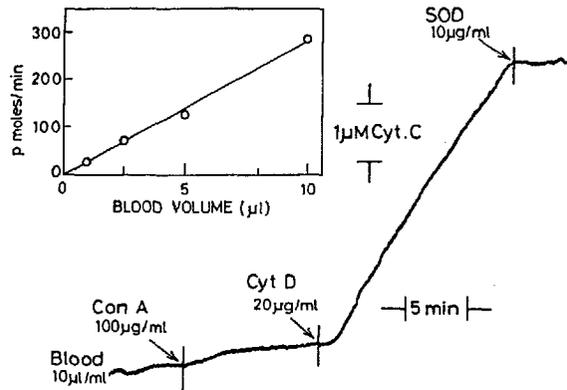


図3 Reduction of exogenous cytochrome c by 10 μl of whole blood with ConA-CytD. The insert shows the rate of O₂⁻ release as a function of blood volume.

この条件下での蛍光は、150 μM の H₂O₂ まで直線的に増加した。実際の測定では、顆粒球はせいぜい 3 μM 程度の H₂O₂ しか放出しないので、直線性のある部分で測定していると考えられる。

血液量を変化させた時の H₂O₂ 生成活性は、15 μl の血液まで直線的に増加した (図2)。

図3は O₂⁻ 生成の経時変化で、Con A・Cyt D 添加後約2分で O₂⁻ 生成が始まり、SOD で完全に阻害された。挿入図は血液量と O₂⁻ 生成活性を示したものである。10 μl まで直線的な活性上昇がみられた。

この方法は全血を用いるため、cyt c の還元による吸光変化に対しヘモグロビンの影響が

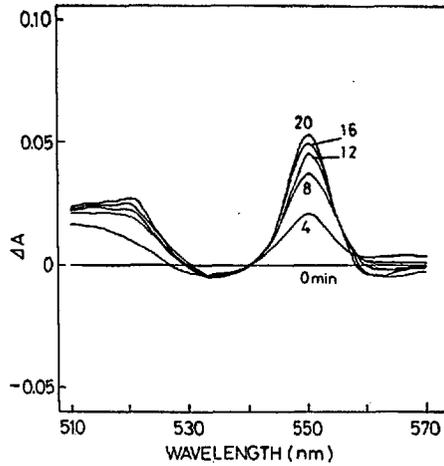


図4 Difference spectra of the suspensions with and without ConA-CytD, taken at 4-min intervals.

表1 Release of H_2O_2 and O_2^- by blood samples taken from 10 healthy individuals ($M \pm S.D.$)

Induction	Activity (pmol/min/ 10^4 granulocytes)	
	H_2O_2 release	O_2^- release
ConA+CytD	27.7 ± 4.9 (83.3 ± 16.6)*	107 ± 15 (400 ± 134)*
<i>E. coli</i>	22.3 ± 3.0 (81.9 ± 26.6)*	

* The values in parentheses were the activities based on the volume of blood (pmol/min/ $10 \mu l$ blood).

考えられた。そこで、Con A・Cyt D 添加後の経時的差スペクトルをとったところ（図4）、520、550 nm に吸収極大をもち、540 nm が isosbestic point となる典型的な cyt c の酸化還元スペクトルが得られ、ヘモグロビンの影響は除外できた。

健康成人10名の全血 $10 \mu l$ で測定した H_2O_2 、 O_2^- 生成活性の平均値と標準偏差は表1のようになった。活性値を全血 $10 \mu l$ 当りで表わした値より、顆粒球 10^4 個で表わした方が分散が小さくなった。

図5は、本法による健康人と、CGDの患者の H_2O_2 および O_2^- 生成をみたものである。患者の血液では、Con A・Cyt D 添加後も、 H_2O_2 、 O_2^- の生成はみられなかった。

考 按

CGDの定量的診断法はいくつか報告されているが、その多くはかなり大量の血液（数ml～十数ml）を必要とし、診断の対照となる乳児期の患者には侵襲が大きかった。あるいは白血球

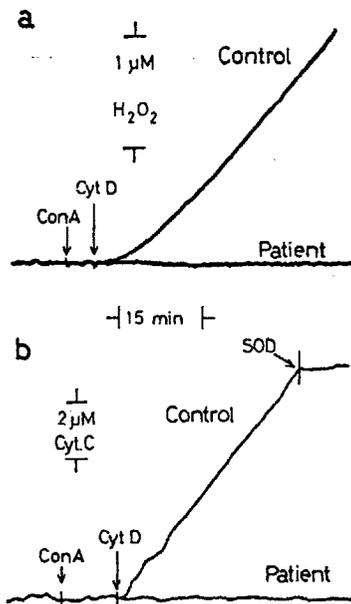
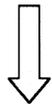


図5 Release of H_2O_2 (a) and O_2^- (b) from leukocytes of a healthy subject and a CGD patient.

を分離しての測定法が多く、分離までの時間・手間や処理中の活性低下などの問題があった。中村らは、数十 μ lの全血で酸素消費をみる方法を報告しているが、この方法は、高度の熟練を必要とし、だれにでもできるというわけにはいかない。ここで述べた方法は、反応液中に全血10 μ lを添加するだけで測定ができるため、極めて簡単でしかも採血後直ちに測定ができるためCGDの診断法として有望な方法と考える。さらに、微量・簡便・迅速といった利点を生かして、いろんなタイプの顆粒球機能異常の検査に応用できると考えている。



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



要旨

10 μ l 以下の血液で、顆粒白血球による過酸化水素とスーパーオキシドの放出を測定することにより、慢性肉芽腫症の診断を可能とする方法を開発した。過酸化水素はホモワニリン酸が酸化され発する蛍光により、スーパーオキシドはチトクローム C の還元による 550nm の吸光により測定した。この方法によれば、慢性肉芽腫症の診断は新生児期から可能であり、さらに、採血後 40 分で検査が終了する。