

4. 小児膠原病における白血球および血小板 産生アラキドン酸代謝物の役割

研究協力者 宮崎 澄雄*
共同研究者 浜崎 雄平*

〔研究目的〕

膠原病、とりわけ SLE では、T-cell, B-cell の機能異常があることがよく知られている。SLE の活動期には免疫グロブリンの産生は著明に増加しており、IgG 分泌細胞数と疾患の活動性の間には強い相関があるといわれる¹⁾。B-cell 機能は、T-cell の調節をうけるので、B-cell の機能亢進には当然 T-cell の異常も考えられる²⁾。近年、T, B-cell 機能を調節する因子のひとつとして、アラキドン酸 (AA) 代謝物が注目されてきた。AA cyclooxy genase 代謝物のうちプロスタグランディン E₂ (PGE₂), PGD₂ はヘルパー T-cell の機能を抑制し、サプレッサー T-cell 機能を亢進させることが報告されている³⁾。また、AA lipoxi genase 代謝物のひとつロイコトリエン B₄ (LTB₄) もサプレッサー T-cell 機能を亢進させるといわれている⁴⁾。AA 代謝の二つの代謝系 (lipoxy genase および cyclooxy genase) 共に多くの強力な生理活性物質を産生するが、これら活性物質は、時には相反し、ある場合には協力的に働きながら、生体防御機構の調節に何らかの役割をはたしていることはまちがいないと思われる。しかし、SLE 等免疫異常をきたす疾患においては、ステロイド、および非ステロイド系抗炎症剤を使用する事が多く、これらの薬剤の二次的な影響も考慮する必要があるため、詳細なメカニズムの解明はすすんでいない。

ところで、生体のほとんどの細胞・臓器は AA 代謝系を有するが、そのうち好中球は LTB₄ を

はじめとする 5-lipoxy genase 代謝物および PG E₂, PGD₂, PGF_{2α} の重要なソースであり⁵⁾、血小板は 12-HETE (12 lipoxy genase 代謝物) およびトロンボキサン A₂ (TXA₂) の主なソースである⁶⁾。今回我々は、主に好中球と血小板由来の AA 代謝物を Radio immuno assay (RIA) および Radio metric assay (RMA) を使用して測定することにより、SLE, JRA における AA 代謝物の役割の評価を試みることを目的とした。

〔方 法〕

対 象：

SLE 2 名 (うち 1 名ステロイド使用中), JRA 3 名 (うち 2 名アスピリン; ASA 使用中)。コントロールとして、健康成人より採取した静脈血をもちいた。

好中球および血小板の分離 (図 1)：

3.8% クエン酸 Na 加静脈血 (1:9) を室温で 10 分間 (700 r. p. m.) 遠沈し、上清 (platelet rich plasma; PRP) より 350 μl を分取、血小板数の測定、コラーゲンによる凝集能の検査のために使用した。残りの PRP は 77 mM EDTA を 9:1 とするように加えたのち 4℃へ冷却し、1700×G で 30 分間遠沈した。遠沈後の上清 (platelet poor plasma; PPP) は 6 keto-PGF_{1α} 測定用の検体として -20℃で凍結保存した。血小板 pellet は EDTA 加 tris-buffered saline (pH 7.4) で洗浄し、再度 1700×G 30 分間遠沈し上清をすて、洗浄血小板とし、12-HETE 産生能測定のため -70℃で凍結保存した。

PRP 分取後の下層 (血球層) には 6% Dextran saline を 1:5 になるように加えてゆっくりと攪

* 佐賀医科大学小児科学教室

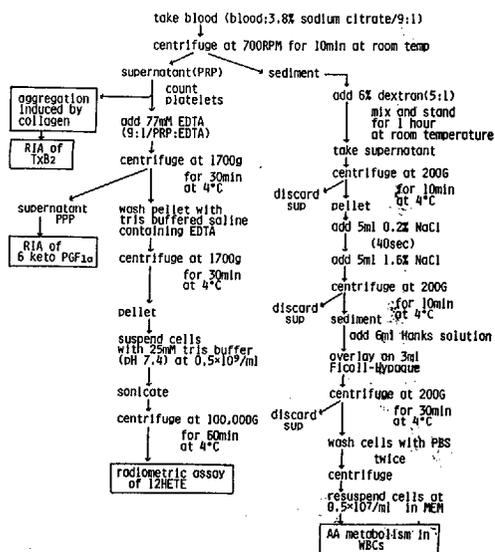


図1 好中球及び血小板の分離法

拌した。室温で20~30分間静置したのち、白血球含有層 (buffy coat) をとり遠沈し上清を捨て、赤血球を破壊、とりのぞく目的で0.2% NaCl (5 ml) を加えて40秒間振盪、すぐに0.16% NaCl を加えた。再び200×Gで10分間遠沈し上清を捨て、沈澱した好中球に6 ml の30 mMHEPES 加ハanks (pH 7.4) 液を加え、あらかじめ比重1.077 に調節したフィコールハイパーク 3 ml へ重層、200×Gで30分間遠沈し、沈澱した好中球を分取した。一旦2 ml のPBSに suspension し計数後 0.5×10^7 /ml になるように minimal essential medium (MEM) に再度 suspension して実験にもちいた。

好中球産生 PGs および LTB₄ の RMA

(図2) :

1 ml の MEM 中に 0.5×10^7 の好中球を suspension したものを、5% CO₂+95% air 中、37°C で培養し、¹⁴C-AA (0.25 μCi) を加えると同時に Caionophore A23/87 (10^{-5} M) で15分間刺激した。刺激後の上清を試験管に移し、1N HCl で pH を3.0とし、酢酸エチルで2度抽出した。抽出液は一旦 N₂ ガス下に乾固し少量のメタノールで溶解したのち、シリカゲル・プレート上に標準品と共に展開し (solvent; chloroform: MeOH: AA/90:5:1), 標準品に一致した radioactive なバンドをシンチレーションバイアル中にけずりとり、

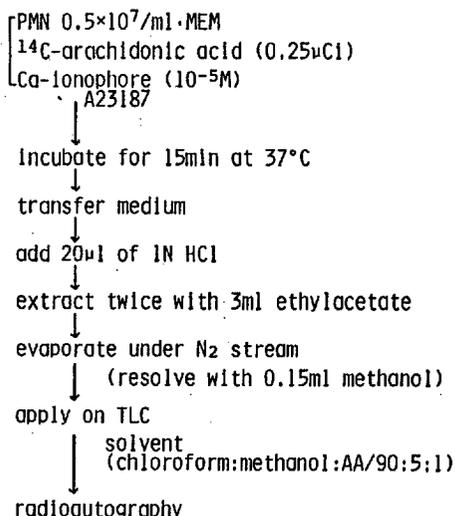


図2 Radiometric assay (RMA) 法による白血球産生プロスタグランジン D₂, E₂, F_{2α} およびロイコトリエン B₄ の測定

cpm を測定し産生量をもとめた。測定は必ず正常コントロールと同時にこない、正常人の産生を100%として産生量を表現した。

血小板産生12-HETE の RMA (図3) :

-70°C に保存された洗浄血小板を 0.5×10^9 /ml になるように 25 mM trisbuffer (pH 7.4) に suspension し、5秒間3回 sonicate したのち、 10^5 ×Gで60分間遠沈した。上清 (cytosol) 0.9ml に

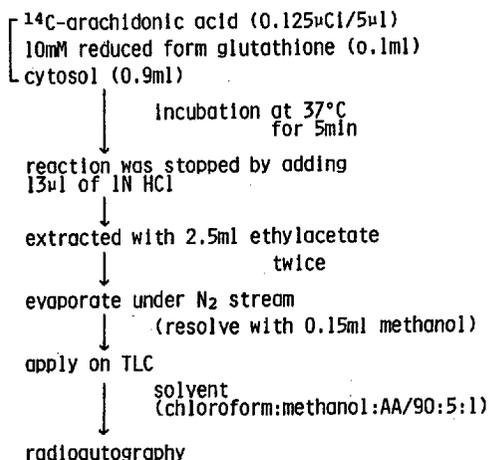


図3 Radiometric assay (RMA) 法による血小板産生 12-HETE の測定

0.1ml の 10 mM 還元型グルタチオンおよび ^{14}C -AA (0.125 μCi) を加えて 37°C で 5 分間インキュベーションしたのち 13 μl の IN HCL を加えて反応を停止し、酢酸エチルで 2 度抽出した。一旦 N_2 ガス下に乾固したのち、少量のメタノールで溶解し標準品といっしょにシリカゲル・プレート上に展開した (solvent; chloroform: methanol: 酢酸/90:5:1)。標準品に一致した radioactive なバンド (^{14}C -12 HETE) をけずりとり、cpm をカウントし cytosol の蛋白量で補正し、産生量とした (蛋白量の測定には Lowry 法を使用した)。

血小板凝集能測定:

測定には京都第一科学製血小板凝集計 (PA 3210) をもちいた。250 μl の PRP に、凝集惹起物質として 50 倍希釈コラーゲン液 50 μl を加えた。血小板凝集能は、最大凝集 (%) と最大凝集までの時間 (min) とで検討した。凝集後の PRP はただちに -20°C へ冷却し、TXB₂ RIA 用の検体とした。

TXB₂ の RIA:

既述の方法に従っておこなった。簡単に述べると、検体 (PRP) を pH 3.0 へ酸性化し、酢酸エチルで 2 度抽出したのち一旦乾固し、Assay buffer (0.9% NaCl および 0.1% bovine γ -globulin 含有 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) に溶解して測定サンプルとした。サンプルもしくは標準液 0.1 ml に、抗 TXB₂ ウサギ血清 0.1 ml (最終希釈; 120,000 \times)、 ^3H -TXB₂ (10,000 cpm)

0.1 ml, Assay buffer 0.1 ml を加えて、2 時間インキュベーションし、遊離の ^3H -TXB₂ をチャコールで吸着分離し上清をカウントした。

6 keto-PGF_{1 α} の RIA:

既述の方法に準じた。測定サンプルは PPP 0.5 ml より酢酸エチルで抽出し、最終的に Assay buffer に溶解した。Assay system は TXB₂ とほぼ同様であるが、抗 6 keto-PGF_{1 α} (10,000 cpm) を使用した。

薬品:

溶媒とその他の薬品は市販の特級品を用い、 ^3H -TXB₂ は New England Nuclear より、 ^3H -6 keto-PGF_{1 α} および ^{14}C -Arachidonic acid は Amersham より購入した。抗 6 keto-PGF_{1 α} ウサギ血清および抗 TXB₂ ウサギ血清は Dr. Tai より恵与された。

[結果]

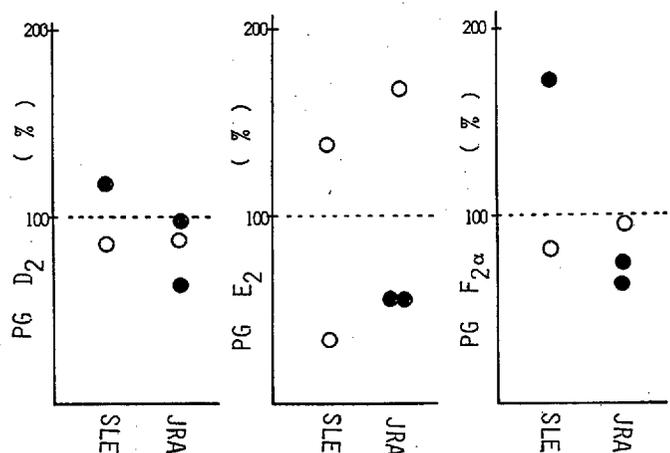
好中球産生 PGs および LTB₄:

コントロールの産生量を 100% として比較した。SLE 患児では、図 4 に示すごとく、PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} 共にステロイド治療中患児で 117, 139, 171% と高値を示し、逆にステロイド非投与児で 85, 35, 81% と低値を示した。JRA 患児においてアスピリン (acetyl salicylic acid; ASA) 投与児は PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} 共コントロールよりも低値を示し、ASA 非投与児では PGE₂ が 168% と高値を示した以外はコントロールと差が

図 4 RMA 法による白血球産生

PGD₂, E₂, F_{2 α}

測定はコントロールの検体とペアでおこないコントロールを 100% として表現している。SLE の closed circle はプレドニンを、JRA の closed circle はアスピリンの投与中。open circle はステロイド、及び非ステロイド系抗炎症剤は使用していない。



なかった。

LTB₄に関しては、図5に示すごとく、SLEでステロイド使用、非使用にかかわらずコントロールの35%および34.8%と極めて低い値を示した。JRAにおいてもASA投与者で32%、24%と低値であった。ただし、ASA非投与児ではコントロールと差がなかった。

血小板産生 12-HETE:

図6に示すごとく、産生量はコントロールを100%とした時SLEで91%（ステロイド投与）および82%（ステロイド非投与）とやや低値を、JRAはASA投与児で72%および39%と低値を示した。

血小板凝集能:

コラーゲン50倍希釈液による最大凝集率を図7Aに示した。コントロールは1例をのぞいて100%の凝集を示したが、SLEでは軽度の凝集抑制がみとめられた。JRAではASA使用児で著明な抑制をみとめたが、ASA非使用児では抑制をみとめなかった。

最大凝集までの時間に関してもほぼ同様の結果を得た（図7B）。

血小板産生 TXB₂:

図8に示すごとく、コントロール群の16.41 ± 9.47 ng/ml · PRP · pl 10⁵に比べて、SLEではステロイドの非使用・使用にかかわらず、1.49, 0.58 ng/ml · PRP · pl 10⁵ときわめて低値を、JRAにおいてもASAの使用の有無にかかわらず低値を示し、特にASA投与中の患児では検量限界以下であった。

PPP中6 keto-PGF_{1α}濃度:

図9に示すごとく、コントロール群では、1.15 ± 0.08 ng/ml · PPPであったが、SLEでは0.88および0.87 ng/mlとやや低値を示し、JRAではASA使用児は0.71および1.44 ng/ml、ASA非使用児では0.80 ng/mlであった。

[考案]

ステロイド治療をしていないSLE患児においては、白血球PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}の産生は共に低値であり、治療中の患児では逆に高値を示した。ステロイドがphospho lipase A₂の阻害物

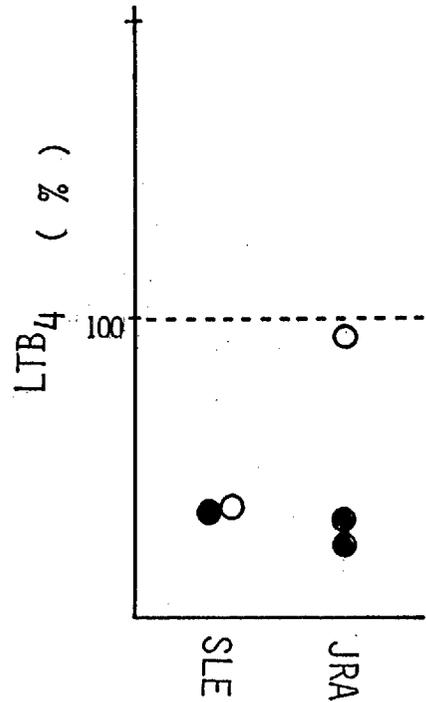


図5 RMAによる白血球産生 LTB₄
Open, closed circle は図4と同じ。

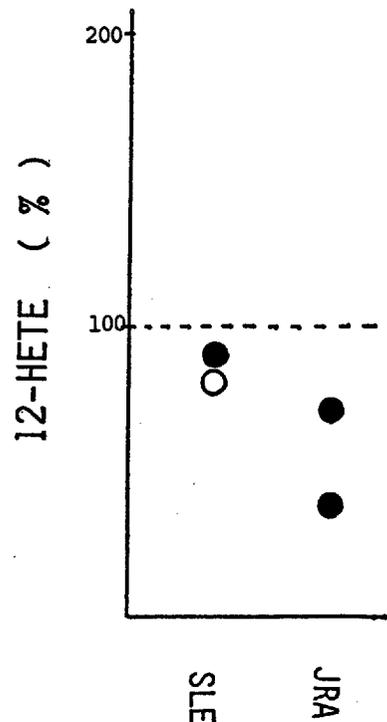
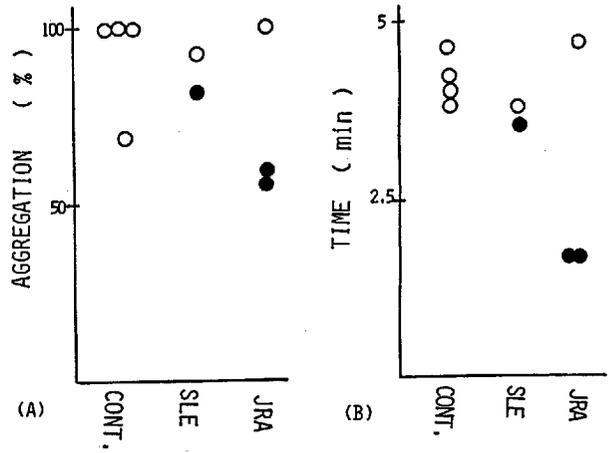


図6 RMAによる血小板産生 12-HETE
Open, closed circle は図4と同じ。

図7 Collagen 50倍希釈液による血小板の凝集
 (A) 最大凝集率(%) (B) 最大凝集までの時間を示す。Open, closed circle は図4と同じ。



質を誘導する作用を有することを考慮すると、ステロイド治療中の患児で高値を示した理由は明確でないが、 PGD_2 、 PGE_2 は共にヘルパー T-cell 機能を抑制し、サプレッサー T-cell 機能を活性化すると報告があり³⁾、疾患の活性期に PG E_2 PGD_2 産生そのものの産生低下がおり、回復期には産生が増加するとの可能性も否定はでき

ない。JRA の3例のうち2例は、cyclooxygenase の特異的阻害剤である ASA を服用中であり、この2例に関しては、 PGD_2 、 PGE_2 $PGF_{2\alpha}$ 共に産生は低下していた。しかしながら、完全な抑制ではなく、薬剤として、かなりの量を長期間服用しても好中球内の酵素活性を完全に抑制できないことが明らかとなった。

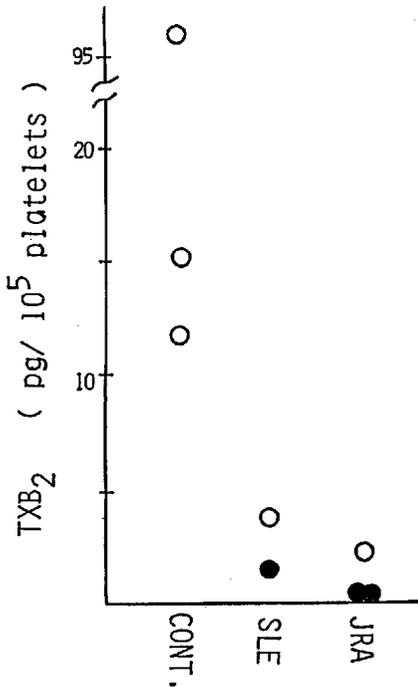


図8 血小板産生 TXB_2
 Collagen 刺激後の PRP 中 TXB_2 を RIA で測定。
 Open, closed circle は図4と同じ。

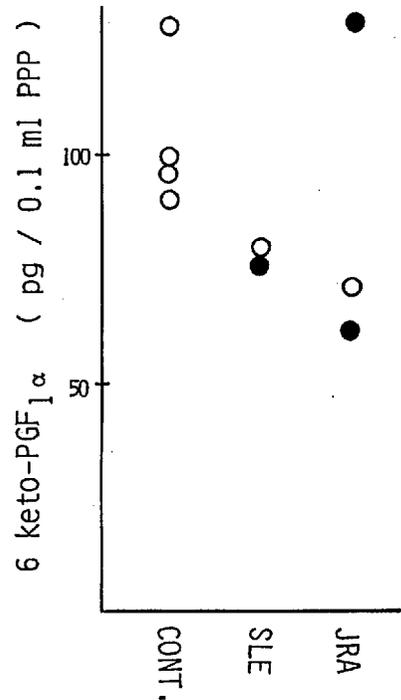


図9 PPP 中 6keto- $PGF_{1\alpha}$ の濃度を RIA で測定
 Open, closed circle は図4と同じ。

SLE では、ステロイド治療、非治療にかかわらず、LTB₄ 産生は極端に低い値を示した。前述のごとく LTB₄ はサプレッサー T-cell 機能を亢進させて抗体産生に対しては抑制する方向に働くと考えられており⁹⁾、LTB₄ の産生低下が B-cell の機能の亢進に参与している可能性はおおいに考えられる。JRA においても ASA 投与児で LTB₄ の産生は低下していた。ASA は 5-lipoxygenase を抑制することではなく、通常は cyclooxygenase を抑制するために、相対的に lipoxygenase の活性を上昇させると考えられており、LTB₄ の産生低下は ASA の効果とは考えにくく、病態そのものに関連していると考えるのが妥当と思われるが、この点に関しては更に症例をふやして検討する必要がある。

12-HETE は主に血小板で産生され、白血球および血管内皮細胞に対する強力な化学遊走惹起物質であることが知られている⁸⁾。即ち、血管炎の発症と進行に参与した炎症のメディエーターであり、TXA₂ と共に血管炎発症の機構に重要な役割をはたしている可能性があるため、SLE ではその動向が注目される。ところがコントロールに比べて、非ステロイド投与児でも産生の増加は認められなかった。病気の活動性のみならず、時期にも依存することが考えられ、経過をおっての検討が必要であると思われた。血小板産生 TXB₂ に関しても同様であり、SLE では低値を示した。PPP 中の 6 keto-PGF_{1α} に関しても、SLE ではコントロールに比しやや低い値を示しているが、TXB₂ の産生低下の方がより著明であった。血栓および血管炎の発生には TXA₂/PGI₂ 比の上昇が関与するとする所謂“陰陽セオリー”とは一致しない⁹⁾。しかしながら、本研究でも示されたごとく、血小板 cyclooxygenase は白血球に比して容易に抑制され、病歴上は明確ではなかったが、何らかの抗炎症剤の服用による一過性の影響も完全には否定できない。

血小板凝集は、SLE でステロイド治療の有無にかかわらず軽度抑制、ASA 治療中の JRA では著明な抑制をうけ、TXB₂ の産生量と平行し

ていた。TXA₂ のコラーゲン凝集における重要性をうらづけるものである。

§ 文 献

- 1) Blase, R. M., Grayson, J. and Steinberg, A. L.: Increased Immunoglobulin-Secreting cells in the blood of patients with active Systemic lupus erythematosus. *Amer. J. Med.*, **69**: 345-350, 1980.
- 2) Jelinek, D. F., Thompson, P. A. and Lipsky, P. E.: Regulation of human B-cell Activation by prostaglandin E₂. *J. Clin. Invest.* **75**: 1339-1349, 1985.
- 3) Rocklin, R. E., Thistle, L. and Audera-C.: Decreased sensitivity of atopic mononuclear cells to prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin D₂ (PGD₂). *J. Immunol.*, **135**: 2033-2039, 1985.
- 4) Atluru, D. and Goodwin, J. S.: Control of polyclonal immunoglobulin production from human lymphocytes by Leukotrienes: Leukotriene B₄ induces cell from resting Human OKT (-) T-cells. *J. Clin. Invest.*, **74**: 1444-1450, 1984.
- 5) Hafström, I., Palmblad, J. and et al.: Leukotriene B₄-A stereospecific stimulation for release of lysosomal enzymes from neutrophils. *FEBs letters*, **130**: 146-148, 1981.
- 6) Chang, W. C., Nakao, J. and et al.: Effects of reduced glutathione on the 12-lipoxygenase pathways in rat platelets. *Biochem. J.*, **202**: 221-376, 1982.
- 7) 浜崎雄平, 市丸智浩, 他: 川崎病 (MCLS) に対するアセチルサリチル酸治療の再検討; とくにアラキドン酸代謝面より (実験の部). *小児学会誌* (accepted).
- 8) Nakao, J., Ooyama, H. and et al.: Calcium dependency of aortic smooth muscle cell migration induced by 12-L-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosa tetra enoic acid. *Atherosclerosis*. **46**: 309-319, 1983.
- 9) Moncada, S. and Vane, J. R.: Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.*, **30**: 293-331, 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



〔研究目的〕

膠原病,とりわけ SLE では,T-cell ,B-cell の機能異常があることがよく知られている。SLE の活動期には免疫グロブリンの産生は著明に増加しており,IgG 分泌細胞数と疾患の活動性の間には強い相関があるといわれる 1)。B-cell 機能は,T-cell の調節をうけるので,B-cell の機能亢進には当然 T-cell の異常も考えられる 2)。近年,T,B-cell 機能を調節する因子のひとつとして,アラキドン酸(AA)代謝物が注目されてきた。AA cyclooxy genase 代謝物のうちプロスタグランディン E2(PGE2),PGD2 はヘルパー-T-cell の機能を抑制し,サプレッサー-T-cell 機能を亢進させることが報告されている 3)。また,AA li-poxy genase 代謝物のひとつロイコトリエン B4(LTB4)もサプレッサー-T-cell 機能を亢進させるといわれている 4)。AA 代謝の二つの代謝系(li-poxy genase および cyclooxy genase)共に多くの強力な生理活性物質を産生するが,これら活性物質は,時には相反し,ある場合には協力的に働きながら,生体防御機構の調節に何らかの役割をはたしていることはまちがいないと思われる。しかし,SLE 等免疫異常をきたす疾患においては,ステロイド,および非ステロイド系抗炎症剤を使用する事が多く,これらの薬剤の 2 次的な影響も考慮する必要があるため,詳細なメカニズムの解明はすすんでいない。

ところで,生体のほとんどの細胞・臓器は AA 代謝系を有するが,そのうち好中球は LTB4 をはじめとする 5-lipoxy genase 代謝物および PGE2,PGD2,PGF2 の重要なソースであり 5),'血小板は 12-HETE(12lipoxy genase 代謝物)およびトロンボキサン A2(TXA2)の主なソースである 6)。今回我々は,主に好中球と血小板由来の AA 代謝物を Radio immuno assay(RIA)および Radio metric assay(RMA)を使用して測定することにより,SLE,JRA における AA 代謝物の役割の評価を試みることを目的とした。