

学 位 論 文 題 名

Flow cytometry を用いた全身性エリテマトーデス
患者の好中球機能の研究

学位論文内容の要旨

I 目 的

全身性エリテマトーデス(SLE)の好中球機能異常として、貪食能の低下による易感染性、免疫複合体のクリアランスの低下によるⅢ型アレルギー反応の増強、好中球活性酸素による組織障害が考えられているが、その測定法はなお確立されていない。貪食能と好中球内活性酸素のflow cytometryによる定量解析法を検討し、SLE患者の病態との関係を調べた。

II 方 法

貪食能は既報の方法に準じ、heparin加全血 $100\mu\text{l}$ と標的蛍光粒子($1.97\mu\text{m}$ 径fluorescent carboxylate microspheres, Polyscience社製)浮遊液を 37°C 一時間incubateした。冷却0.2%EDTA加PBSで反応を停止し、溶血処理後0.2%EDTA加PBSにて再浮遊した。FACScan(Becton Dickinson社製)で前方、側方散乱のcytogramでリンパ球以外の細胞分画をtrigger areaとし、一個以上の粒子を貪食した細胞の貪食率を求めた。種々の粒子濃度における貪食率から、貪食率50%となる標

的粒子数対貪食細胞数比(T/C ratio)を算定し、Ph50値と定義した。

好中球内活性酸素はBassの方法に準じ、heparin加全血100 μ lと5 μ M dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA, Eastman-Kodak社製)2mlを37 $^{\circ}$ C 20分間incubateした。刺激群は25 μ g/ml PMA 10 μ l添加し再び20分間incubateした。溶血処理後再浮遊し、前方、側方散乱のcytogramにて好中球領域をtrigger areaとしdichlorofluorescein(DCF)の蛍光強度を解析した。

対象はアメリカ・リウマチ協会診断基準を満たすSLE, RA例とした。

III 結 果

前方、側方散乱のcytogramでは、貪食現象により単球群と好中球群の側方散乱が増加し、貪食細胞の蛍光強度は貪食した粒子数を表わす多峰性のhistogramを呈した。

貪食率とT/C ratioの関係では、標的粒子の少ない場合、貪食率はT/C ratio値に正比例し、標的粒子数が過剰量存在する場合、貪食率は約90%でplateauとなった。標的粒子数が適当量の場合、貪食率(P)はT/C ratio値の対数関数式で表わされた($P=K_1 \times \log(T/C \text{ ratio}) + K_2$, K_1, K_2 ; 定数)。

健常人血球浮遊液と自己血清による検討では、Ph50は血清量6.25%-100%の範囲では変化しなかったが、血清が存在しない場合や非働化処理血清(56 $^{\circ}$ C 30分)ではPh50が高く貪食能が低下した。

全血のPh50は、健常人群 $5.2 \pm 1.1(10)$ (平均 $\pm$ 標準偏差(検討数))より、SLE例群 $10.3 \pm 4.8(15)$, RA群 $8.3 \pm 2.3(5)$ が有意に高く、疾患群の貪食能の低下が示された。また8名のSLE患者についてそれぞれの非活動期血球浮遊液を用い、活動期血清、非活動期血清を添加しPh50を調べると、7例では活動期血清の添加にてPh50は高く活動期血清が貪食能を低下させることが示された。

好中球内活性酸素と刺激PMA量との関係では、ある濃度以上のPMA量で急激にDCF蛍光強度が増加したが、それ以上のPMA濃度では蛍光強度はほとんど変化せず、好中球内活性酸素は一好中球単位でall-or-none responseを示した。

採血後5時間室温放置(preincubation)した健常人例とSLE例のPMA刺激好中球、非刺激好中球の蛍光強度のhistogramを検討した。PMA

刺激好中球では健常人とSLE例は差がなかった。非刺激好中球では、健常人は単峰性のhistogramを呈したがSLE例は二峰性のhistogramを呈し、活性酸素の高い好中球のsubpopulationが存在した。

採血から測定まで4-7時間室温放置(preincubation)した検体と、4℃で保存した検体のPMA刺激好中球、非刺激好中球の活性酸素陽性好中球の割合を健常人、SLE群、RA群で比較した。PMA刺激好中球は、どの群でも90%以上で差を認めなかった。非刺激好中球では、健常人群、SLE群、RA群ともに、室温放置検体(健常人 $5.4 \pm 4.4\%$ (10), SLE $11.6 \pm 12.0\%$ (19), RA $11.8 \pm 7.9\%$ (17))が4℃保存検体(健常人 $0.7 \pm 0.5\%$ (9), SLE $3.9 \pm 4.7\%$ (19), RA $3.7 \pm 5.5\%$ (17))より有意に高値を示し、preincubationで活性酸素陽性好中球の増加を認めた。4℃保存検体では、SLE群、RA群が健常人群より有意に高値を示した。

非刺激の4℃保存検体の活性酸素陽性好中球は、SLEでは血沈(0.31(19))(相関係数(検討数))、抗核抗体(0.65(19))と正の相関、血清補体価(-0.47(19))と負の相関を示し、RAではCRP(0.69(17))と正の相関を示し、疾患活動性と相関した。

IV 考 案

均一な粒子を用い、貪食率とT/C ratioとのkineticsを詳細に検討できた。標的粒子が少ない場合は加えた標的粒子がほぼすべて貪食され、標的粒子が多いplateau相での貪食率はtrigger areaへの好中球などの非貪食細胞の混入率を反映するため、貪食率50%付近の対数相での検討が有用と思われ、Ph50値を定義した。

健常人と異なり、活動期SLE血清の添加では貪食能が低下した。これは、熱非働化处理血清で健常人においても貪食能が低下したことから、SLEでの補体活性の低下や、血中免疫複合体の標的粒子との競合が貪食能が低下させる要因である可能性が考えられた。

今回の好中球1個毎に細胞内 H_2O_2 をみる方法は、従来の活性酸素の測定法と本質は異なるが、PMA刺激好中球ではなく、非刺激好中球の活性酸素陽性好中球においてSLEと健常人に有意差を認め、従来法の報告に矛盾しなかった。本法は慢性肉芽腫症例の活性酸素生成能の定性診断に利用されていたが、定量分析法としての基準はなかった。PMA刺激でall-or-none responseを示し、SLE例の非刺激好中球

は二峰性の蛍光強度のhistogramを示すことから、平均蛍光強度より蛍光強度が基準以上の活性酸素陽性好中球の陽性率が本法による活性酸素測定法のよい指標と思われた。

健常人と異なり疾患では室温放置によるpreincubationで多くの活性酸素を産生した。これは好中球機能異常や血清中の刺激因子の存在を示唆し、さらに臨床的な疾患活動性の指標との相関を認めたことから、病態との密接な関係が考えられた。

V 結 語

Flow cytometryにより、種々の粒子濃度での貪食率の計測から統計的にPh50値を求める貪食能の測定や、DCF蛍光強度のhistogramの解析による活性酸素陽性好中球の測定は、全血を用い分離精製処理を省略でき、多数細胞を迅速に解析できるため、SLEの好中球機能の解析に有用な手段と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 川 昌 一

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 松 本 脩 三

学位論文題名

Flow cytometryを用いた全身性エリテマトーデス患者
の好中球機能の研究

全身性エリテマトーデス(SLE)では、貪食能の低下による易感染性、免疫複合体のクリアランスの低下、好中球活性酸素による組織障害などの好中球機能障害が存在することは知られているが、確立された測定法はなく、従来ほとんど病態との関係が解析されていなかった。今回、申請者はflow cytometryを利用し、蛍光粒子による貪食能、dichlorofluorescein (DCF)による好中球内活性酸素の定量解析法を、主に全血法にて検討し、SLE患者の好中球機能と病態との関係を解析した。

その結果、

(1)前方、側方散乱のcytogramでは、貪食現象により単球群と好中球群の側方散乱が増加し、蛍光強度は貪食した粒子数を表わす多峰性のhistogramを示した。

(2)貪食率とT/C(target particles/phagocytes) ratioの関係では、標的粒子の少ない場合、貪食率はT/C ratio値に正比例し、標的粒子数が過剰量存在する場合、貪食率は約90%でplateauとなった。標的粒子数が適当量の場合、貪食率はT/C ratio値の対数関数式で表わされた。以上の観察より好中球の50%が貪食したときのT/C ratio値をPh50値と定義し、貪食能の指標として以下の検討に用いた。

(3)全血では、健常人よりSLE群、慢性関節リウマチ(RA)群の貪食能の低下が示された。

(4)患者の非活動期血球浮遊液を用い、同じ患者の治療経過中の-70℃凍結血清を添加した検討では、活動性の高い時期の血清が活動性の改善した時期の血清より貪食能を障害し、治療による活動性の改善に従って、血清が貪食能に与える影響も改善することを示した。

- (5) 貪食能は血清量依存を示さなかったが、血清をまったく除いた場合や56℃30分の熱非働化处理により貪食能が著明に障害された。
- (6) 好中球内活性酸素と刺激PMA量との関係では、ある濃度以上のPMA量で急激にDCF蛍光強度が増加したが、それ以上のPMA濃度では蛍光強度はほとんど変化せず、一好中球単位でall-or-none responseを示した。
- (7) このDCF蛍光強度による検討では、PMA刺激好中球は健常人とSLE例は差を示さなかったが、SLE例の非刺激好中球は二峰性のhistogramを呈し、活性酸素陽性好中球のsubpopulationの存在が示された。
- (8) この活性酸素陽性好中球はSLE群、RA群において健常人群より有意に高率に認められ、疾患活動性を示す血清補体価や炎症反応などの臨床検査との相関を認めた。
- (9) 室温放置や37℃恒温槽でのpreincubation処理では、4℃保存検体に比べSLEの活性酸素陽性好中球は増加した。

以上の結果、

SLEにおける貪食能の低下は、活動期SLE血清中にその要因があり、健常人の熱非働化处理血清による貪食能の障害から、SLEで認められる血清補体の活性低下や、流血中の血中免疫複合体の標的粒子との競合が要因として考えられた。

SLEの活性酸素陽性好中球の増加は、好中球機能異常や血清中の刺激因子の存在を示唆し、さらに臨床的な疾患活動性の指標と相関を認め、血管炎や組織障害など病態との密接な関係が考えられた。

またflow cytometryによるこれらの好中球機能の測定は、全血を用い分離精製処理を簡略化し、多数細胞を迅速に正確に解析できるため、SLEの好中球機能の解析にも有用な手段となるものと考えた。

試問に際し、

小野江教授より一好中球あたりの貪食粒子数の意義やレセプターと貪食能の関係、血中免疫複合体と貪食能の関係についての質問、松本教授より好中球の活性酸素陽性好中球のsubpopulationについての質問、膠原病の非刺激好中球での活性酸素陽性好中球と細菌感染時の活性酸素陽性好中球との比較、好中球数と貪食能の関係についての質問、阿部教授より単球と好中球の比率と貪食能の関係について質問・意見があったが、申請者は概ね適切な答弁をした。

以上により、本論文は学位授与に値するものと判定した。