

学 位 論 文 題 名

好中球の活性酸素生成系の光情報による解析

－生体防御および炎症反応との関係－

学位論文内容の要旨

白血球の活性酸素は、生体防御にとって第一線の殺菌因子として有益である。その反面、一方で組織傷害を惹き起こし、全身性炎症反応症候群や多臓器機能不全の発症機序において、重要な役割を演じている。

食細胞のうち、強力な食殺菌作用を有するのは、顆粒球の好中球と好酸球である。好中球の活性酸素生成系の機構は、大別すると、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADPH）オキシダーゼの触媒するスーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）生成反応、およびミエロペルオキシダーゼ（MPO）の触媒する殺菌分解反応の2段階に分けられる。この機構の中に欠損または異常があると、殺菌能が低下するが、殺菌に最も寄与している活性酸素種は不明である。NADPH オキシダーゼの異常症の慢性肉芽腫症（CGD）では重症感染症となるのに対し、MPO 欠損症は無症状の場合が多いことから、この機構は単純でないことがわかる。

第1章では、MPO 反応の一重項酸素（ 1O_2 ）由来の近赤外微弱光検出と抗生物質の抗炎症作用について検討した。

好中球は、食胞内に取り込んだ微生物を、殺菌性ペプチドや活性酸素により殺菌する。活性酸素のうち O_2^- は、細胞膜に局在する NADPH オキシダーゼの触媒によって生成され、不均化反応により速やかに過酸化水素（ H_2O_2 ）となる。全ての哺乳動物の食細胞は、この酸素代謝機構を備えている。顆粒膜は、食作用に続いて、食胞膜と融合してファゴリソソームを形成し、その中にアズール顆粒内の MPO を遊離する。このヘム酵素の MPO の働きにより、強力な酸化力を有する $HOCl$ がつくられる。もうひとつの強力な活性酸素の一種の 1O_2 は、電子励起状態の酸素である。かつて 1O_2 は、化学発光の実験から、好中球の呼吸バーストの間、MPO の酵素反応により生成されと考えられたが、可視域の実験結果は、 1O_2 生成の証明にはならなかった。最も信頼性が高い 1O_2 の測定方法は、1 分子のデルタ型の 1O_2 が 1 分子の基底状態の三重項酸素に遷移する過程で生じる近赤外領域の発光ピーク（1,268 nm）のスペクトロメトリーである。

好中球の細胞内における $^1\text{O}_2$ の生成は、これまで、Ge PIN フォトダイオードを使用した非生理的 MPO 反応の実験から否定されてきた。

生理的な酵素反応由来の $^1\text{O}_2$ 測定のため、著者の所属する研究グループでは、差動演算増幅回路と InGaAs/InP PIN フォトダイオードを用いた、2 チャンネル型の近赤外域微弱光検出装置を開発した。MPO 反応条件は、ブタ由来の MPO (1~30 nM) + H_2O_2 (10~100 μM) + Cl^- (100~130 mM) とした。この検出装置を用いると、重水なしで、食胞内の生理的条件 (pH 7.4) で MPO 反応由来の近赤外発光が検出できた。この近赤外発光が 1.27 μm にシングルピークを示したことから、発光は $^1\text{O}_2$ 由来であることが確認できた。また、炎症性皮膚疾患に有効な 3 種類の抗生物質は、MPO 反応由来の $^1\text{O}_2$ 消光能から、抗炎症作用を有することが明らかとなった。

以上のことから、好中球の食胞内における MPO 反応からの $^1\text{O}_2$ の発生、および同反応由来の $^1\text{O}_2$ の炎症との関連が示唆された。これまでの見解とは異なり、MPO 反応由来の $^1\text{O}_2$ は、生体防御において重要な役割を担っているかもしれない。ただし、その直接的な証明を得るには、好中球レベルでの $^1\text{O}_2$ 由来微弱光が検出可能な装置の開発を待たなければならない。

次に第 2 章では、微量好中球のチトクローム b_{558} (cyt b_{558}) の吸収スペクトルの測定法を開発し、CGD の診断に応用した。

CGD は、新生児期から深刻な重症感染症を反復する遺伝性疾患で、これまではヒトの症例のみが報告されている。この疾患の原因の多くは、好中球の O_2^- 生成系の NADPH オキシダーゼの構成因子のひとつの cyt b_{558} の欠損である。CGD の診断には、 O_2^- 生成活性、オキシダーゼ構成因子のイムノブロットによる欠損の検索、ならびに cyt b_{558} のスペクトル測定が行われてきた。しかし、新生児の CGD 由来の少量の血液から分離される好中球サンプル中には、ヘモグロビン Hb (オキシ oxy Hb およびメト met Hb) が高率に混在し、cyt b_{558} のスペクトル測定を妨害するため、この b タイプのチトクロームの定量は困難であった。

そこで、ヒトの微量の好中球の吸収スペクトルから、cyt b_{558} 量を迅速かつ正確に測定するために、従来の一酸化炭素 (CO) バブリング法に代わる、安全な CO 処理方法を開発した。混在する oxy Hb による α および β バンドへの影響は、CO 処理後のジチオナイト添加による酸化還元差スペクトルを測定することで除去できた。さらに、このヘムの吸収スペクトルの α バンドの微分スペクトル $\{d[\Delta A]/d\lambda, \Delta A = \text{吸光度差}, \lambda = \text{波長 (nm)}\}$ を求めると、cyt b_{558} の有無判定の困難な例でも、正確な診断が可能となった。CO 非感受性の met Hb の γ バンドへの影響は、溶血して得られた Hb 液の CO 処理前後のスペクトルの比較によって met Hb を推量し、そのスペクトルを差し引くことで

除去できた。

このように、本吸収スペクトル測定法は、Hb の混在する CGD 好中球の cyt *b*₅₅₈ の定量に有効であった。ヒトとウシならびにブタの好中球の cyt *b*₅₅₈ の吸収スペクトルの α ピークには差異がみられないことから、本測定法は、ヒト医療にとどまらず、獣医療においても応用可能であると考えられた。

以上の結果をまとめると、好中球の食胞内における MPO 反応由来の $^1\text{O}_2$ の産生とその炎症反応への関与が示唆された。また、CO を使用した cyt *b*₅₅₈ の吸収スペクトル測定法は、CGD 由来の微量の好中球にも適用可能であった。

この分野の研究は、細胞由来の $^1\text{O}_2$ 検出装置の開発により飛躍的に進歩すると思われる。その際には、本論文では分離して検討せざるをえなかった、NADPH オキシダーゼ系、および MPO 反応をひとまとめにした、好中球の活性酸素生成系の機構の解明に新しい論争が展開すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 永 徹
副 査 教 授 桑 原 幹 典
副 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 助 教 授 稲 波 修

学 位 論 文 題 名

好中球の活性酸素生成系の光情報による解析

－生体防御および炎症反応との関係－

好中球由来の活性酸素は、生体防御において第一線の殺菌因子として重要な役割を演じている。活性酸素生成系の機構は、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) オキシダーゼの触媒するスーパーオキシドアニオン生成反応、およびミエロペルオキシダーゼ (MPO) の触媒する殺菌分解反応の2段階に分けられるが、殺菌に最も寄与している活性酸素種は不明である。申請者は新しい光検出装置と技術を使用して、好中球の活性酸素生成機構について検討し、次のような結果を明らかにした。

まず、申請者の所属する研究グループが開発した新しい近赤外域微弱光検出装置を用いて、好中球の食胞内と同様の生理的条件下で、MPO 反応の一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の検出に初めて成功した。また、同反応由来の $^1\text{O}_2$ 消光能をもつ抗生物質をみいだした。

次に、NADPH オキシダーゼの構成因子の一つのチトクローム *b* 558 (cyt *b* 558) の吸収スペクトル測定法を検討し、混在する oxy Hb および met Hb の影響を除去できる安全な一酸化炭素処理法を確立した。さらに、 α バンドの微分スペクトルを求めると、慢性肉芽腫症由来の微量好中球サンプルのような cyt *b* 558 の超極微量な例でも診断が可能であることを明らかにした。

以上のように申請者は、好中球の食胞内における MPO 反応由来の $^1\text{O}_2$ の産生とその炎症反応への関与の可能性を明らかにした。また、今後、獣医療においても応用可能な cyt *b* 558 の吸収スペクトル測定法を開発した。本研究の結果は、好中球の活性酸素生成機構の解明に大きく貢献するものと判断された。よって、審査員一同は桐生千花氏が博士 (獣医学) の学位を授与される資格を有するものと認めた。