

## 糖尿病患者における好中球活性酸素産生能と 高血糖, ケトン体の影響

東京医科大学内科学教室 (指導: 伊藤久雄主任教授)

笹井 信夫

**【要旨】** 糖尿病患者の易感染性を解明する目的として, 好中球機能, 特に活性酸素産生能と糖尿病状態との関連について検討した。方法としてルミノール依存性 Chemiluminescence (CL) を用いてオプソニン化ザイモザン (OZ) および N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) による刺激に対する化学発光の頂値 (CL 値) で表した。糖尿病患者群の CL 値は健常人対照群に対し有意な低下 ( $p < 0.01$ ) を認めた。糖尿病患者のコントロール状態による検討は血糖値 200 mg/dl 未満, 200 mg/dl 以上の群および HbA<sub>1c</sub> 9.0% 未満, 9.0% 以上の各群間において有意な差は認めなかった。尿ケトン体陽性群での CL 値の有意な低下 ( $p < 0.05$ ) を認めた。

*In vitro* で健常人好中球の高濃度グルコース添加処理において, OZ 刺激で CL 値の低下傾向がみられた。健常人好中球の 3-OHBA 添加処理において, OZ 刺激, FMLP 刺激で CL 値の有意な低下を認めた。ルミノール依存性 CL により糖尿病患者の好中球活性酸素産生能低下が認められた。糖尿病状態における高血糖あるいはケトン体の存在は, 酸素依存性殺菌能を低下させ, 易感染性を生じる要因の一つと考えられる。

### 結 言

糖尿病患者における感染症の発症は死に至る極めて重篤な時代があった。その後インスリン療法, 抗生物質の開発に伴い感染症による死亡例は著しく減少した。しかしこうした治療の進歩にも拘らず, 糖尿病患者における易感染性の問題は臨床上しばしば経験され, 治療に抵抗性を示すことが多い。糖尿病の感染増悪因子として脱水, 栄養障害, 血管障害, 神経障害, 好中球機能障害などが指摘されている<sup>1)</sup>。糖尿病患者の易感染性の本態については, 好中球機能に関しこれまで糖尿病患者では走化能<sup>2)3)</sup>, 貪食能<sup>4)~7)</sup>, 殺菌能<sup>4)~7)</sup>の低下がみられると報告されているが, なお不明な点も少なくない。一方, 感染症は糖尿病性ケトアシドーシスの誘因となるが, ケトアシドーシス状態が好中球機能の低下をもたらすことも指摘されてきた<sup>8)</sup>。本研究では, 糖尿病患者の易感染性を解明する目的として, 生体防御機構の上で重要な働きを持つ好中球機能について, ルミノール依存性化学発光を用いて, 好中球活性酸素産生能について

検討した。また, *in vitro* においてグルコース, ケトン体の存在が好中球活性酸素能におよぼす影響についても検討した。

### 方 法

#### 1) 対象

対象は東京医科大学内科入院中および外来通院中の糖尿病患者 14 例 (NIDDM 14 例, 男性 10 例女性 4 例, 平均年齢  $51 \pm 15$  歳) を糖尿病患者群とし, 健常人 14 例 (男性 11 例女性 3 例, 平均年齢  $30 \pm 4$  歳) を対照群として検討した。

糖尿病患者群は, 平均罹病期間は  $5.0 \pm 4.2$  年, 治療の内訳は食事療法群 3 例, 経口血糖降下剤治療群 4 例, インスリン治療群 7 例である。平均空腹時血糖値は  $192 \pm 80$  mg/dl, HbA<sub>1c</sub>  $9.5 \pm 2.4\%$  であった。測定時, 対象患者はステロイド剤および非ステロイド性抗炎症剤の服用は受けていない。

#### 2) 好中球の調整

空腹時ヘパリン加静脈採血により全血 10 ml を 6% デキストラン生食液と混和し, ディスポーザブル

1995 年 2 月 8 日受付, 1995 年 3 月 6 日受理

キーワード: 糖尿病, 活性酸素, ケトン体, 好中球, ルミノール依存性化学発光。

(別刷請求先: 〒160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学内科学教室第三講座 笹井信夫)

注射器の針先を上にて室温で1時間放置後, 上清の血漿層をFicoll-conray液に重層し, 比重遠沈法により好中球を分離し, 混入した赤血球は低張溶血法により溶血した。分離した好中球にHepes緩衝液(HBS)(5 mM KCl, 145 mM KCl, 5.5 mM Glucose, 10 mM HEPES; pH 7.4)を加え2回洗浄した。測定直前に1 mM CaCl<sub>2</sub>加HBSにより好中球数 $1 \times 10^6$ 個/mlに調整した。

### 3) ルミノール依存性化学発光試薬

ルミノール溶液は1 mM Luminol in N/100 NaOHをHBS緩衝液にて希釈して $2 \times 10^{-4}$  M濃度として使用した。FMLP溶液の調整はN-formyl-methionyl-leucyl-phenyl alanine (FMLP)  $3 \times 10^{-6}$  MをHBSにて10倍希釈し, 濃度 $3 \times 10^{-7}$  Mとして使用した。オプソニン化ザイモザン(OZ)の調整は小橋ら<sup>9)</sup>の方法に準じ, zymosan A (Sigma)を蒸留水にて10 mg/mlとして100 cc 30分間煮沸後, Hanks balanced salt solution (HBSS)により3回洗浄。オプソニン化は新鮮ヒト血清2容に対しZymosan 1容の割合で37°C 30分間反応させ, HBSSにて3回洗浄, -80°C保存し, OZを測定時溶解し10 mg/mlにて使用した。

### 4) Chemiluminescence 測定

$1 \times 10^6$  個/mlに調整した好中球浮遊液100  $\mu$ lとLuminol溶液100  $\mu$ lをポリエチレンキュベット(7 $\times$ 50 mm)にて, 37°C 5分間incubateした後, 刺激物質としてFMLP (10  $\mu$ l/ml), OZ (10 mg/ml)を加え, それぞれの反応をLumiphometer TD-4000 (ラボサイエンス)にて37°C, Level $\times$ 100にて10分間経時的に測定し, 化学発光の頂値(CL値)で表した。単位はrelative light unit (rlu)で示した。なお調整された好中球のviabilityはいずれもトリパンブルー染色で90%以上であった。

### 5) 糖尿病患者群と対照群のCLの測定

糖尿病患者と対照群の好中球を, OZ (10 mg/ml)およびFMLP (10  $\mu$ l/ml)で刺激しCL値を測定した。

### 6) 糖尿病患者の血糖コントロール状態とCLの測定

糖尿病患者の血糖コントロール状態による好中球のCLを検討するため, 糖尿病患者を以下の方法により群別を行った。

a) 空腹時血糖値200 mg/dl未満群と200 mg/dl以上群

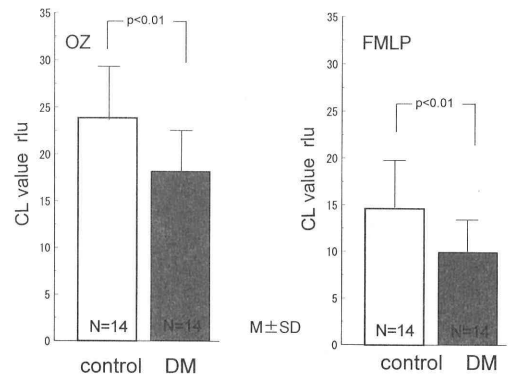


Fig. 1 Chemiluminescence response to OZ (10 mg/ml) or FMLP (10  $\mu$ l/ml) by neutrophils from control subjects and diabetic patients.

b) HbA<sub>1c</sub> 9%未満群と9%以上群

c) 尿ケトン体陽性群と陰性群

各群より得た好中球を, OZ刺激, FMLP刺激によりCL値を測定した。

### 7) *In vitro*におけるグルコースとケトン体のCLに対する影響

a) グルコース添加によるCLの影響

調整した健常人好中球浮遊液を5.6 mM, 16.7 mM, 33.3 mM, 各濃度のグルコースを添加し5分および60分間, 37°C恒温槽にてincubateし, OZ刺激およびFMLP刺激による好中球のCL値を測定した。

b) ケトン体添加によるCLの測定

10 mM  $\cdot$  3hydroxy-butyl-acetate (3-OHBA)を調整して, 健常人好中球浮遊液に添加し5分および30分間, 37°C恒温槽にてincubateし, OZ刺激およびFMLP刺激による好中球のCL値を測定した。同時に, 対照群としてケトン体非添加のCL値を測定し, ケトン体非添加群に対するCLを%で表して検討した。なお, 統計学的検討はStudent t testを使用した。

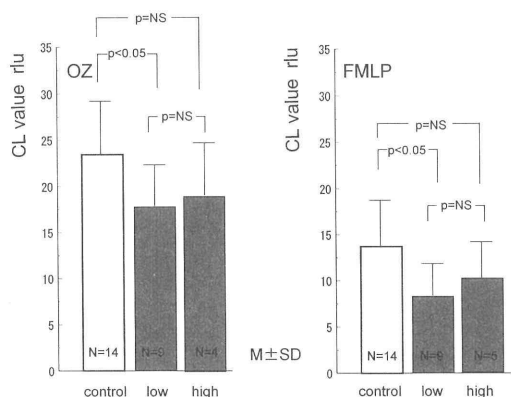
## 結 果

### 1) 糖尿病患者群と対照群のCL

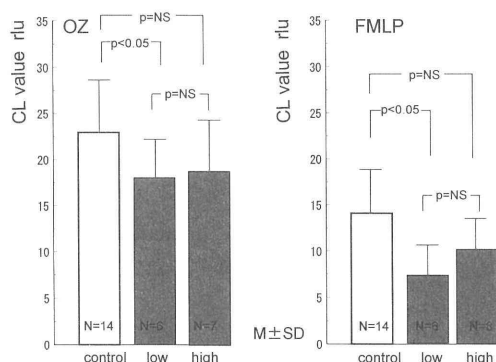
糖尿病患者群のCL値はOZ刺激では対照群 $23.7 \pm 6.6$ (rlu)に対し $18.2 \pm 4.7$ , FMLP刺激では対照群 $14.4 \pm 5.1$ に対し $8.9 \pm 3.3$ と有意に低下( $p < 0.01$ )を認めた (Fig. 1)。

### 2) 糖尿病患者の血糖コントロール状態とCL

血糖値200 mg/dl未満と200 mg/dl以上の2群



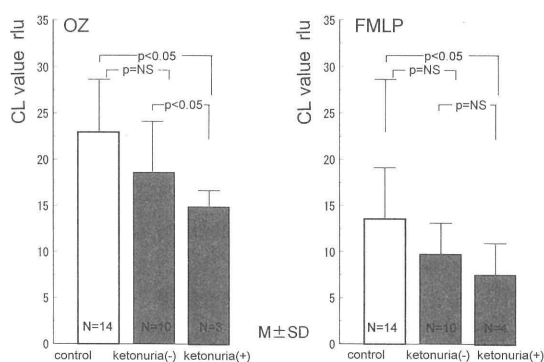
**Fig. 2** Chemiluminescence response of neutrophils from diabetic patients to OZ or FMLP in diabetic stated according to FBS level. Low : FBS < 200 mg/dl, High : FBS ≥ 200 mg/dl



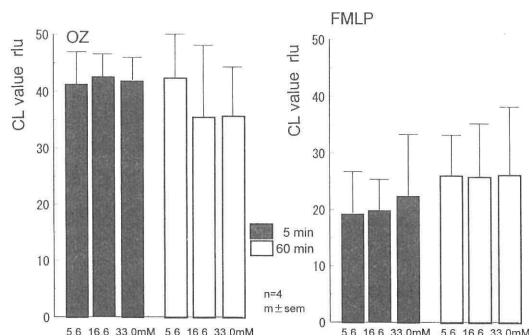
**Fig. 3** Chemiluminescence response of neutrophils from diabetic patients to OZ or FMLP in diabetic stated according to HbA<sub>1c</sub> level. Low : HbA<sub>1c</sub> < 9%, High : HbA<sub>1c</sub> ≥ 9%

の CL 値をみると、OZ 刺激において対照群 23.7 ± 6.6 に比し、血糖値 200 mg/dl 未満の群で 17.8 ± 4.0 と有意な低下 (p < 0.05) を、また血糖値 200 mg/dl 以上の群では 19.0 ± 6.6 と低下傾向を認めた。血糖値 200 mg/dl 未満群と、200 mg/dl 以上群の両群間では有意差を認めなかった。FMLP 刺激の CL 値は、対照群 14.4 ± 5.1 に比し、血糖値 200 mg/dl 未満の群で 8.3 ± 3.2 と有意な低下 (p < 0.05) を、200 mg/dl 以上の群で 10.2 ± 3.7 と低下傾向を認めた。また、両群間においては有意差を認めなかった (Fig. 2)。

HbA<sub>1c</sub> 9%未満と 9%以上の 2 群の CL 値をみる



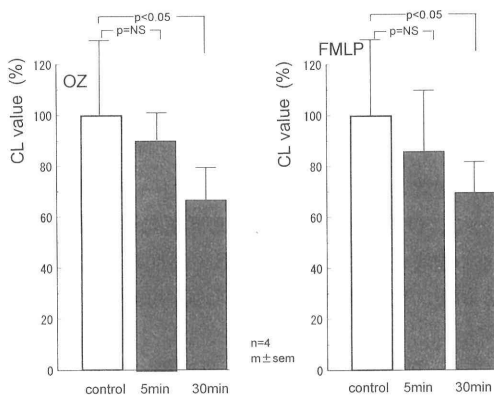
**Fig. 4** Chemiluminescence response of neutrophils from diabetic patients of OZ or FMLP in diabetic stated according to Ketonuria.



**Fig. 5** Effect of incubation time with glucose concentration on CL response Chemiluminescence response obtained following the addition of OZ (10 mg/ml), FMLP (10 μl/ml) to neutrophils.

と、OZ 刺激において対照群に比し 9%未満の群は 17.9 ± 3.9 と有意な低下 (p < 0.05) を、9%以上の群では 18.3 ± 5.6 と低下傾向を認めた。また、9%未満の群と 9%以上の群では有意差は認められなかった。FMLP 刺激による CL 値は、対照群に比し 9%未満群、9%以上群共に 7.3 ± 3.1, 10.2 ± 3.2 と有意な低下 (p < 0.05) を認めた。また、両群間には有意差は認められなかった (Fig. 3)。

尿ケトン体陽性群と陰性群の CL 値は、OZ 刺激において対照群に比し陰性群で 18.9 ± 5.3, 陽性群で 14.6 ± 1.6 と両群共に有意な低下 (p < 0.05) を認めた。FMLP 刺激の CL 値は対照群に比し陰性群で 9.5 ± 3.2, 陽性群で 7.5 ± 3.9 と両群共に有意な低下を示した。また尿ケトン体陽性群と陰性群の CL 値も、陽性群で有意に高値を示した (p < 0.05) (Fig.



**Fig. 6** Effect of Ketone bodies on CL response  
Chemiluminescence response obtained following the addition of OZ (10 mg/dl), FMLP (10 µl/ml) to neutrophils.

4).

### 3) *In vitro* での検討

#### a) グルコース添加による CL の影響

グルコース添加による CL への影響をみると (Fig. 5), 5.6 mM, 16.6 mM, 33.3 mM のグルコース濃度において 5 分間の incubate による CL 値は, OZ 刺激では 5.6 mM で  $41.4 \pm 6.6$ , 16.6 mM で  $42.6 \pm 3.9$ , 33 mM で  $42.0 \pm 3.8$ , FMLP 刺激では 5.6 mM で  $18.8 \pm 7.9$ , 16.6 mM で  $19.1 \pm 5.2$ , 33 mM で  $22.1 \pm 10.8$  といずれも有意な差を認めなかった。

60 分間の incubate による CL 値は, OZ 刺激では 5.6 mM で  $42.5 \pm 7.5$  に対し, 16.6 mM で  $35.6 \pm 13.5$ , 33 mM で  $35.8 \pm 9.2$  と高濃度グルコース添加処理群に CL 値の低下傾向がみられた。また FMLP 刺激では, グルコース各濃度で CL 値に有意差は認められなかった

#### b) ケトン体添加による CL の測定

ケトン体 (10 mM 3-OHBA) 添加処理した好中球の CL は, 非添加群を 100% とすると, 5 分間の incubate において, OZ 刺激で  $90.5 \pm 0.1\%$ , FMLP 刺激で  $85.8 \pm 22.1\%$  といずれも低下傾向がみられた。また 30 分間の incubate において, OZ 刺激で  $66.5 \pm 16.1\%$ , FMLP 刺激で  $69.5 \pm 12.4\%$  と有意な低下 ( $p < 0.05$ ) を認めた (Fig. 6)。

## 考 案

糖尿病患者の好中球機能に関して殺菌能につい

て, 近年活性酸素産生能からの検討がなされている<sup>10)~14)</sup>。筆者は糖尿病患者の易感染性を解明する目的でオプソニン化ゼイモザン (OZ) 並びに N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) の 2 つの刺激を与えて好中球の活性酸素産生能についてルミノール依存性 Chemiluminescence (CL) を測定しいずれも低下を認めた。OZ は好中球細胞膜の C3b レセプターを介して活性酸素産生を刺激するとされており<sup>15)</sup>, また FMLP は貪食を伴わずに膜レセプターを介し活性酸素産生を刺激するとされている<sup>16)</sup>。このことから考えると, 糖尿病患者の好中球の活性酸素産生能の低下は膜レセプターの障害よりも膜刺激後の細胞膜内での活性酸素産生の低下が考えられる。Shah<sup>10)</sup> にも OZ 刺激と phorbol myristate acetate (PMA) 刺激により糖尿病患者の好中球の CL 値を検討し筆者らと同様に低下している事を認めている。

筆者は糖尿病のコントロール状態によって好中球機能が変化するかどうかを知る目的で早朝空腹時血糖値が 200 mg/dl 未満の群と 200 mg/dl 以上の群に分けて検討したが両群間で有意差は認めなかった。さらに HbA<sub>1c</sub> 9.0% 未満の群と 9.0% 以上の群に分けて検討したが両群間に有意差は認められなかった。この事から糖尿病のコントロール状態の良否では好中球の活性酸素産生能に差があるとはいえなかった。しかし尿ケトン体陽性の患者群で対照群および尿ケトン体陰性の患者群に比し OZ 刺激, FMLP 刺激のいずれでも CL 値の有意な低下が認められた事から, ケトン体の存在, 強いていえば糖尿病のコントロール状態が好中球 CL 値に影響を及ぼすことが示唆された。熊坂<sup>11)</sup> は糖尿病患者では多核白血球の貪食能は健康人との間に有意差はないが, 殺菌能および活性酸素産生能は有意に低下しており, 殺菌能, 活性酸素産生能の低下は HbA<sub>1c</sub> 特に HbA<sub>1c</sub> 値の上昇と有意の相関があったと報告している。また今村<sup>12)</sup> は糖尿病のコントロール状態が好中球機能にいかにか影響しているかを調べる目的で CL 頂値と HbA<sub>1c</sub> との相関を検討し, 糖尿病患者の CL 値は健康者に比し有意に低下, HbA<sub>1c</sub> の減少率と CL の変化率とは有意の負の相関, 即ち HbA<sub>1c</sub> の減少と共に CL 値が増加する事を報告している。

筆者は *In vitro* の好中球につき三種類の濃度のグルコースを 5 分間および 60 分間添加して CL 値を検討した。5 分間添加ではいずれの濃度でも, OZ,

FMLPの両刺激ともにCL値に有意な差を認めなかった。しかし60分の添加ではFMLP刺激ではいずれの濃度でもCL値に有意差をみなかったが、OZ刺激により高濃度グルコース添加処理群でCL値の低下傾向が認められた。Wilsonら<sup>13)</sup>は、糖尿病患者の好中球につきPMA刺激にてCL値を測定し、50mM/lの高濃度グルコースにてCL値が低下したと報告しており、高濃度グルコース添加にて好中球の活性酸素産生能が低下する事が示唆された。また筆者の成績でOZ刺激で低下傾向を示し、FMLP刺激では有意差がなかったことから、可溶性刺激剤による高血糖状態における反応の違いも考えられた。

筆者の成績で尿中ケトン体陽性の糖尿病患者で好中球CL値の有意な低下を認めたが、ケトアシドーシスでは血中で増加しているのは3-OHBAである<sup>17)</sup>。そこで好中球に3-OHBA添加処理を行い好中球活性酸素産生能を検討したがOZ刺激、FMLP刺激のいずれでも5分間の添加ではCL値の低下傾向を、30分間の添加ではCL値の有意な低下を認めた。ケトン体の増加は5炭糖リン酸回路のインスリン依存性酵素の一つであるphospho fluctokinaseの活性を抑制する結果、ポリオール代謝が亢進しNADPHが欠乏することから活性酸素産生能の低下を生じるとする報告<sup>5)</sup>がある。Sato<sup>18)</sup>らはケトン体がNADPHoxidase系による活性酸素生成を阻害する事を示し、一方、ミエロペルオキシダーゼ活性は阻害しないとしている。その理由としてNADPHoxidase系がPlasma membraneに存在することから、ケトン体の影響を受け易いとしている。筆者の成績ではOZ刺激、FMLP刺激の二つの異なる膜レセプターを介してCL値が低下した事より、ケトン体による細胞膜レセプターへの障害も考えられる。なおこの点については分子レベルでのさらなる検討が必要である。糖尿病における易感染性は、高血糖はもとより、血管障害、腎障害、神経障害などの種々の合併症やケトアシドーシス、ケトアシドーシスなどが感染症の増悪に関与し、糖尿病における易感染性の病態をさらに複雑にしていることが考えられる。

## 結 語

糖尿病患者の易感染性の本態を解明する目的で、好中球機能についてCL値により検討した。

1) 糖尿病患者の好中球CL値は、OZ刺激、

FMLP刺激で対照群より有意に低下を認めた。

2) 糖尿病患者の血糖コントロール状態200mg/dl以上群、200mg/dl未満群およびHbA<sub>1c</sub>9.0%以上群、9.0%未満群の各群の間にCL値の差を認めなかった。

3) 健常人好中球の高濃度グルコース添加処理において、OZ刺激でCL値の低下傾向がみられた。

4) 健常人好中球の3-OHBA添加処理において、OZ刺激、FMLP刺激共にCL値の有意な低下を認めた。

以上、糖尿病状態における高血糖、ケトン体の存在は、好中球活性酸素産生能の低下をもたらす酸素依存性殺菌能を低下させ、易感染性を生じる要因の一つと考えられた。

本論文の要旨は、第8回日本炎症学会にて発表した。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師伊藤久雄教授に深謝いたします。また直接御指導、御助言頂きました植木彬夫助教授に厚く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Cooppan R: Infection and diabetes. "In Joslin's diabetes mellitus" Lea and Febiger, Philadelphia 737~747, 1985
- 2) Mowat AG, Baum J: Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 284: 621~627, 1971
- 3) 槇健一郎: 糖尿病患者における好中球機能. 久留米医学会雑誌 44: 706~722, 1981
- 4) Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ: Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. Diabetes 23: 9~15, 1974
- 5) Wilson RM, Reeves WG: Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-independent diabetes. Clin. Exp. Immunol. 63: 478~484, 1986
- 6) Kaneshige H, Endoh M, Tomino Y, Nomoto Y, Sakai H, Arimori S: Impaired granulocyte function in patients with diabetes mellitus. Tokai. J. Exp. Clin. Med. 7: 77~80, 1982
- 7) Nolan CM, Beaty HN, Bagdade JD: Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. Diabetes 27: 889~894, 1978
- 8) Bybee JD, Rogers DE: The phagocytic activity of

- polymorphonuclear leukocytes obtained from patients with diabetes mellitus. *J. Lab. Clin. Med.* **64**: 1~13, 1964
- 9) 小橋 修, 小橋悠紀子, 豊島静枝, 重松信昭: ルミノール依存性化学発光測定による迅速簡便な白血球機能検査の基礎的条件. *炎症* **5**: 205~210, 1985
- 10) Shah SV, Wallin JD, Eilen SD: Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocytes from diabetic patients. *J. C. End. Meta.* **57**: 402~409, 1983
- 11) 熊坂義裕: 糖尿病における多核白血球機能に関する研究. *弘前医学* **36**: 121~143, 1984
- 12) 今村 稔: ヒト好中球および単球における活性酸素産生能の基礎的および臨床的研究 (2): 糖尿病患者の好中球および単球における活性酸素産生能の測定. *近畿大医誌* **12**: 169~179, 1987
- 13) Wilson RM, Tomlison DR, Reeves WG: Neutrophil sorbitol production impairs oxidative killing in diabetes. *Diabetic Medicine* **4**: 37~40, 1987
- 14) 笹井信夫, 植木彬夫, 能登谷洋子, 伊藤久雄: 糖尿病における好中球. *化学療法の領域* **4**: 41~45, 1988
- 15) 住本英樹, 竹重公一郎, 水上茂樹: 顆粒球の機能と代謝. *炎症* **5**: 89~100, 1985
- 16) 竹重公一郎, 高杉紳一郎, 水上茂樹: 白血球. 活性酸素 (中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦編) 蛋白質核酸酵素 **33**: 2244~2755, 1988
- 17) 原納 優, 小島秀人, 大槻孝明: 尿ケトン体. *日本臨床* **44**: 252~257, 1986
- 18) Sato N, Simizu H, Shimomura Y, Suwa K, Mori M, Kobayashi I: Mechanism of inhibitory action of ketone bodies on the production of reactive oxygen intermediates (ROIS) by polymorphonuclear leukocytes. *Life Sciences* **51**: 113~118, 1992

## Effects of Hyperglycemia and Ketone Bodies upon Active Oxygen Production from Neutrophils in Diabetic Patients

Nobuo SASAI

Department of Internal Medicine, Tokyo Medical College  
(Director: Prof. Hisao ITO)

In order to study the causes of the high degree of susceptibility to infection of diabetic patients, the interrelationship between neutrophil function, especially the ability to produce active oxygen, and the diabetic condition was studied. The method employed was measurement of peak values of chemiluminescence, using luminol-dependent chemiluminescence (CL), with stimulation of opsonized zymosan (OZ) and N-formyl-methionyl-phenylalanine (FMLP). A significant decline ( $p < 0.01$ ) was observed in the CL values of diabetic patients as compared with their normal counterparts. Investigations into diabetic patients under controlled conditions showed the absence of significant differences between one group of patients with a blood glucose level lower than 200 mg/dl and the other with that of 200 mg/dl or higher. Also shown was the absence of significant differences between one group with an HbA<sub>1c</sub> level lower than 9% and the other with that of 9% or more. A significantly lower level of the CL values ( $p < 0.05$ ) was observed in a group of patients with positive urinary ketone bodies. In an *in vitro* study, the CL values declined with OZ stimulation when they were given high-concentration glucose of neutrophils of normal subjects. A significant decline ( $p < 0.05$ ) in the CL values was observed *in vitro* with OZ and FMLP stimulation by giving 3-OHBA of neutrophils of normal subjects. The use of luminol-dependent CL indicated a decline in the ability to produce neutrophil active oxygen among diabetic patients. These investigations led to the conclusion that the existence of hyperglycemia levels or ketone bodies reduces the oxygen-dependent antimicrobial ability, causing the high degree of susceptibility to infection.

---

<Key words> Diabetes mellitus, Active oxygen, Ketone bodies, Neutrophils, Luminol-dependent chemiluminescence.

---