

## 血液疾患における活性酸素産生能についての検討

東京医科大学内科学教室第三講座 (指導: 伊藤久雄主任教授)

蜂 巢 将

**【要旨】** 好中球は食作用時に活性酸素を産生し感染に対し防御機能として作用している。各種血液疾患について好中球の活性酸素産生能をルミノール反応を利用した化学発光法により測定し、比較検討した。

対象は血液疾患 48 症例で化学発光法を用いて活性酸素産生の最大値 (Peak High 値: PH 値) と、PH 値に到達した時間 (Peak Time 値: PT 値) について比較検討し症例は急性非リンパ性白血病 (ANLL) 10 例、急性リンパ性白血病 (ALL) 2 例、骨髄異形成症候群 (MDS) 7 例、慢性骨髄性白血病 (CML) 9 例、原発性血小板血症 (ET) 6 例、多発性骨髄腫 (MM) 11 例等であり、対照群として健常者 22 名について活性酸素産生能を測定した。

PH 値は急性非リンパ性白血病群、骨髄異形成症候群、慢性骨髄性白血病群、多発性骨髄腫群で低下し、PT 値は慢性骨髄性白血病群と急性骨髄性白血病の無治療群で延長していた。急性骨髄性白血病の無治療群は異常クローン由来の好中球が関与していると考えられ、完全寛解群では化学療法の影響も考えられた。また骨髄異形成症候群、慢性骨髄性白血病ではこれらの疾患が幹細胞レベルでの障害であるため好中球の機能異常に関与していることが示唆された。原発性血小板血症では活性酸素産生能は健常群に比し有意差はなかった。これは慢性骨髄性白血病と同様に幹細胞レベルでの障害による疾患だが障害部位の相違が考えられた。多発性骨髄腫では免疫抑制物質の関与が考えられた。

また化学療法の前後における PH 値は化学療法後に低下傾向を認め、PT 値は延長傾向が認められた。化学療法後では好中球機能は抑制されると思われるが、生態内では様々な要因があり好中球に対する影響は更に複雑であると思われた。活性酸素産生能を知ることは補助療法を行う上でも有益と考えられた。

### 緒 言

不対電子を有する原子または電子をフリーラジカルと呼び、中心に酸素を持つものを活性酸素と言う。活性酸素はフリーラジカル、不対電子を有する為、不安定であり、活性が高い。その活性は生理的に重要な役割を果たしており、病原菌を殺したり抗癌作用として働くこともあり、生命維持に必要不可欠である。

細菌やウイルスの感染、腫瘍細胞増殖に対して生体は多くの防御機構を備えている。即ち細胞性免疫による特異的系と、抗中球、単球、マクロファージ等の貪食細胞による貪食作用という非特異系である。これらの食細胞による貪食作用の重要性は、既に 100 年程前に Metschnikof により指摘されてお

り、1932 年に Baldrige と Gerard<sup>1)</sup> は貪食時に伴う酸素消費を発見し、更に 1973 年 Babior<sup>2)</sup> によって、食細胞は食作用時に活性酸素を産生するという報告がなされた。

化学発光法は、Allen<sup>3)</sup> らが好中球の貪食時に化学発光している事実を発見したことに始まった。これは付加反応の一種であり、発光物質と反応し生じた励起体が基底状態に遷移する過程で発光し、その発光を高感度光検出器を用いて測定する方法である。

造血器疾患において活性酸素産生能を測定し好中球機能を知る事は易感染性、好中球の分化成熟度や病的クローンとの関連、さらに治療や支持療法を行う上で意義ある事と考える。そこで筆者らは各種血液疾患の活性酸素産生につき化学発光法を用いて測定し、ルミフォトメーターの描出する最大発光強度

1995 年 2 月 14 日受付, 1995 年 3 月 6 日受理

キーワード: 活性酸素, 化学発光, 好中球, 血液疾患.

(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 蜂巢 将)

(Peak High 以下 PH) 最大発光強度に達した時間 (Peak Time 以下 PT) につき検討した。

### 対象及び方法

#### 1. 対象

昭和 62 年 10 月より平成 5 年 12 月までに当科及び関連病院に入院または外来を受診した血液疾患患者 48 症例を対象とした。その内訳は、①急性非リンパ性白血病 (ANLL) が 10 名 (男性 8 名, 女性 2 名) (Table 1) ②骨髄異形成症候群 (MDS) が 7 名 (男性 4 名, 女性 3 名) で MDS の内訳は症例 24 は chronic myelomonocytic leukemia (CMMoL), 症例 25 は refractory anemia with excess of blasts (RAEB), 他は refractory anemia (RA) であり, (Table 2) さらに③慢性骨髄性白血病 (CML) が 9 名 (男性 6 名, 女性 3 名) (Table 3) ④原発性小

板症 (ET) が 6 名 (男性 3 名, 女性 3 名) (Table 4) ⑤原発性骨髄線維症 (PMF) が 1 名 (男性) ⑥急性リンパ性白血病 (ALL) が 2 名 (男性 1 名, 女性 1 名) (Table 5) ⑦多発性骨髄腫 (MM) が 11 名 (男性 6 名, 女性 5 名) (Table 6) ⑧良性 M 蛋白血症 (BMG) が 2 名 (男性 1 名, 女性 1 名) の 27 歳から 80 歳までの男性 31 名, 女性 17 名, 計 48 症例である。正常コントロール群は 19 歳から 40 歳までの健康正常人 22 名 (男性 12 名, 女性 10 名) である。また多発性骨髄腫 1 例, 急性白血病 3 例については, 化学療法剤投与前, 投与中, 投与後について経過を追って測定した。血液疾患群の測定時期は薬剤影響を避けるため測定前 30 日以上 of 休薬期間をとった。

#### 2. 方法

##### 1) 末梢好中球の分離

各症例および健常者の末梢血 10 ml をヘパリン加

Table 1 急性非リンパ性白血病の臨床検査結果と PH 値, PT 値

Case No.	Age/sex	Type	Peak High (rlu)	Peak Time (sec)	Abnormal karyotype	Clinical phase	WBC (/ $\mu$ l)	Neutrophil (/ $\mu$ l)
1	45 M	M 2	14.65	40	+	untreated	7700	4389
2	74 M	M 2	27.18	361	-	untreated	155400	40404
3	61 M	M 5	1.73	301	+	Relapse	115200	4608
4	40 M	M 2	16.94	191	-	Relapse	1400	168
5	50 F	M 1	152.00	841	-	CR	3200	1280
6	56 M	M 2	2.11	361	+	CR	2500	1025
7	27 M	M 2	10.53	390	+	CR	5600	2184
8	57 M	M 2	12.88	2442	-	CR	3700	555
9	38 M	M 5	11.86	473	-	CR	4400	2024
10	33 F	M 2	45.10	601	-	CR	3000	1080
Mean			29.50	600			39933	2019
SD			44.85	683			53227	1886

untreated は初診未治療時, Relapse は再発未治療時であり CR (complete remission) は CR を示した化学療法終了時から 30 日以上 of 休薬期間をとった症例

Table 2 骨髄異形成症候群の臨床検査結果と PH 値, PH 値

Case No.	Age/sex	Diagnosis	Peak High (rlu)	Peak Time (sec)	Abnormal karyotype	WBC (/ $\mu$ l)	Neutrophil (/ $\mu$ l)
11	62 F	RA	57.70	541	-	2700	1188
12	67 M	RA	16.17	556	-	4480	3450
13	69 M	RA	21.60	2	+	3100	1860
14	52 M	RA	22.33	2628	+	7500	3075
15	54 F	RA	14.03	346	-	2900	1972
16	77 M	CMMoL	23.42	530	+	2500	1115
17	74 F	RAEB	8.89	105	-	6800	4080
Mean			23.45	672.57		4283	2391
SD			15.98	890.07		1917	1067

Diagnosis : RA ; refractory anemia, CMMoL ; chronic myelomonocytic leukemia, RAEB ; refractory anemia with excess of blasts

**Table 3** 慢性骨髄性白血病の臨床検査結果と PH 値, PT 値

Case No.	Age/sex	Phase of disease	Peak High (rlu)	Peak Time (sec)	WBC ( $/\mu\text{l}$ )	Neutrophil ( $/\mu\text{l}$ )
33	20 M	chronic phase	40.00	121	93200	55920
34	27 M	chronic phase	12.87	2341	11200	3472
35	68 F	chronic phase	45.60	481	11900	6664
36	52 M	chronic phase	0.75	2281	21700	9548
37	51 M	chronic phase	25.47	588	3160	2180
38	80 M	chronic phase	11.36	373	16800	5208
39	70 F	chronic phase	17.57	361	43200	3024
40	49 F	chronic phase	1.24	346	39700	27790
41	52 M	chronic Phase	8.50	3590	1900	733
Mean			18.15	1165	26973	12727
SD			15.92	1242	27109	17097

**Table 4** 原発性血小板血症の臨床検査結果と PH 値, PT 値

Case No.	Age/sex	Peak High (rlu)	Peak Time (sec)	WBC ( $/\mu\text{l}$ )	Neutrophil ( $/\mu\text{l}$ )
42	65 F	27.30	61	7300	6205
43	70 M	151.00	50	12000	7200
44	49 M	38.60	327	7000	3990
45	38 F	142.40	293	16100	8533
46	66 M	31.73	415	16000	11360
47	56 F	49.00	421	7500	4500
Mean		73.34	261	10983	6965
SD		57.36	167	3957	2494

**Table 5** 急性リンパ性白血病の臨床検査結果と PH 値, PT 値

Case No.	Age/sex	Clinical condition	Peak High (rlu)	Peak Time (sec)	WBC ( $/\mu\text{l}$ )	Neutrophil ( $/\mu\text{l}$ )
18	18 M	CR	13.49	343	4200	2940
19	33 F	CR	60.30	301	5300	3604
Mean			36.90	322	4750	3272
SD			33.14	30	550	332

CR: CR (complete remission) を示し化学療法終了時から 30 日以上休薬期間をとった症例

シリンジにより採取し, 6%デキストラン 5 ml を加え十分に混和し, 37°C 恒温槽に 20 分程度インキュベートした。上清をリンフォプレップ 3 ml の上に静かに重層し 1500 rpm 20 分間遠心分離した。上清を捨て, 混入した赤血球を低張食塩水で数回溶血させ, Buffer-I (後述) で数回洗浄した後, 好中球が  $5 \times 10^6/\text{ml}$  となる様に Buffer-I にて調整した。この時点で trypan blue dye exclusion method にて, 好中球生細胞が 94% 以上であることを顕微鏡にて確認した (Fig. 1)。

## 2) 活性酸素産生能の測定

CL (化学発光) 測定によった。即ち, sample 100

$\mu\text{l}$  に Buffer-I ( $\text{CaCl}_2$  1 ml in Buffer-II) 100  $\mu\text{l}$ , Buffer-II ( $\text{KCl}$  5 mM- $\text{NaCl}$ , 145 mM-glucose 5.5 mM in HEPES with  $\text{NaOH}$ ) 100  $\mu\text{l}$ , FMLP SOLUTION (FMLP  $3 \times 10^{-6}$  M in Buffer-I with 0.1%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 100  $\mu\text{l}$ , LUMINOL SOLUTION (Buffer-II にて  $1 \times 10^{-4}$  に希釈) 100  $\mu\text{l}$  を加え専用試験管にて混和し, ラボサイエンス社の TD-4000 ルミフォトメーターを用いて経時的に測定した。ルミフォトメーターの描出する PH 値, 及び PT 値を比較検討した。各試薬はラボサイエンス社製のものを使用した。また検定は, 対応のない場合の Wilcoxon 検定を用い,  $p < 0.05$  を有意とした。また, 2 因子間

Table 6 多発性骨髄腫の臨床検査結果と PH 値, PT 値

Case No.	Age/sex	M-protein Type	(mg/dl)	Peak High (rlu)	Peak Time (sec)	Clinical stage	WBC (/ $\mu$ l)	Neutrophil (/ $\mu$ l)
20	58 F	IgG-k	2270	39.70	601	I	8700	6960
21	71 M	IgG-k	3314	18.60	2041	I	5000	3350
22	62 F	IgG-k	1780	14.95	34	I	2700	2052
23	52 M	IgG-k	3220	40.80	331	I	5800	3480
24	61 M	IgA-k	4920	21.60	481	II	5300	3180
25	75 M	IgG-k	3510	128.00	61	II	3100	1860
26	50 M	IgG-k	5660	17.36	317	III	4600	3220
27	70 F	IgG-k	2866	18.98	1080	III	5400	3240
28	51 M	IgG-k	5260	40.00	65	III	3600	2124
29	71 F	BJ-k		4.90	1220	III	1900	1083
30	72 F	BJ-k		9.78	452	III	5200	3484
Mean			3183	32.25	608		4664	3094
SD			1387	34.07	615		1758	1444

Clinical stage は Durie and Salmon の臨床病期分類によった。

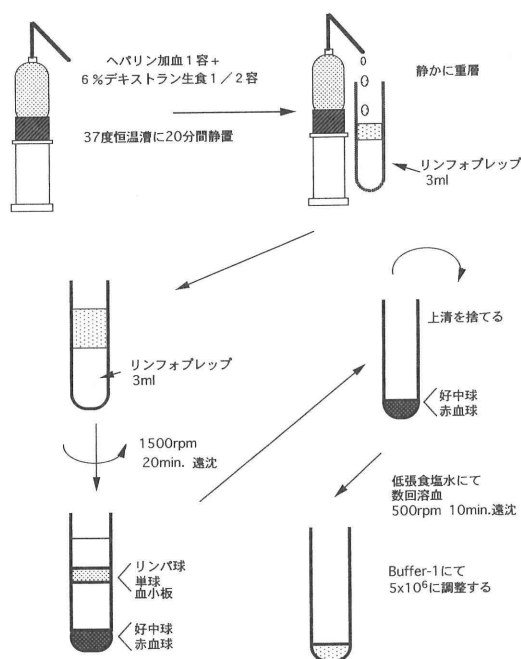


Fig. 1 好中球数の調整

各症例及び健常者の末梢血 10 ml をヘパリン加シリンジにより採取し、6%デキストラン 5 ml を加え充分に混和し、37°C恒温槽に 20 分程度インキュベートした。上清をリンフォブレップ 3 ml の上に静かに重層し 1500 rpm 20 分間遠心分離した。上清を捨て、混入した赤血球を低張食塩水で数回溶血させ、Buffer-I (方法参照) で数回洗浄した後、好中球が  $5 \times 10^6$ /ml となるように Buffer-I にて調整した。

の相関は Spearman の相関係数で検討した。

## 結果

### 1) Peak High 値 (PH 値)

初診時ないし再発時に検索した ANLL 群の未治療群 ( $n=4$ ) の PH 値は  $15.13 \pm 10.46$  rlu, ANLL 群の完全寛解 (CR) 群 ( $n=6$ ) の PH 値は  $39.08 \pm 57.27$  rlu であった。MDS 群 ( $n=7$ ) の PH 値は  $23.45 \pm 15.98$  rlu, CML 群 ( $n=9$ ) の PH 値は  $18.15 \pm 15.97$  rlu, ET 群 ( $n=6$ ) の PH 値は  $73.34 \pm 57.36$  rlu であった。ALL 2 例の PH 値は、13.49 rlu, 60.30 rlu であった。MM 群 ( $n=11$ ) の PH 値は  $32.24 \pm 34.07$  rlu であった。

正常コントロール群 ( $n=22$ ) の PH 値は  $52.44 \pm 30.73$  rlu であった。各疾患群と正常コントロール群との比較では ANLL 群の未治療群及び ANLL 群の CR 群, MDS 群, CML 群, MM 群の 5 群は正常コントロール群に比し有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。ET 群及び ALL 群は正常コントロール群と比較して有意差を認めなかったが、ET 群との比較では ANLL の未治療群, MDS 群, CML 群, MM 群の 4 群は ET 群に比し有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。

ANLL の未治療群の症例 1-4 と CR 例 5-10 では有意差を認めなかった。又化学療法の影響を考慮し ANLL の未治療群と MDS 群, ANLL の CR 群と CML 群と比較したが有意差を認めなかった。MDS 群内で染色体核型異常を有す群と正常核型を示した

群との比較を検討したが有意差を認めなかった。MDS 群と同様に幹細胞段階の疾患である CML 群の比較では、有意差は認めなかった。

また CML 群と ET 群との比較では、CML 群が ET 群に対し有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。

MM 群内で臨床病期分類によって検討したが各病期間で有意差を認めなかった。IgG 分泌型 8 例において IgG 量 3000 mg 以上と以下との群で比較を行ったが、有意差を認めなかった。

PH 値と白血球数、血清 LDH 値、血清 Ca 値との間では相関を認めなかったが PH 値と好中球数との間では相関係数は 0.4049,  $p < 0.05$  であり相関を認めた。

## 2) Peak Time 値 (PT 値)

ANLL の未治療群 ( $n=4$ ) の PT 値は  $223.3 \pm 141.0$  sec ANLL の CR 群 ( $n=6$ ) の PT 値は  $851.3 \pm 798.7$  sec であった。MDS 群 ( $n=7$ ) の PT 値は  $672.6 \pm 890.1$  sec, CML 群 ( $n=9$ ) の PT 値は  $1164.7 \pm 1242.2$  sec, ET 群 ( $n=6$ ) の PT 値は  $261.2 \pm 166.9$  sec であった。ANLL 2 例の PT 値は、343.0 sec, 301.0 sec であった。MM 群 ( $n=11$ ) の PT 値は  $607.6 \pm 614.5$  sec であった。

正常コントロール群 ( $n=22$ ) の PT 値は  $287.2 \pm 126.8$  sec であった。正常コントロール群との比較では ANLL の CR 群及び CML 群の 2 群の PT 値のみが正常コントロール群の PT 値と比較して有意に延長していた ( $p < 0.05$ )。

ANLL 群内において未治療群と CR 群の PT 値の比較では CR 群の PT 値が有意に延長していた ( $p < 0.05$ )。

MDS 群と CML 群の PT 値との比較では有意差を認めなかった。また MDS 群内で染色体異常核型を示した群と正常核型を示した群での PT 値の検討では有意差は認めなかった。

疾患群相互の比較で CML 群と ET 群の PT 値は CML 群が有意に延長していた ( $p < 0.05$ )。

MM 群内の検討では臨床病期分類による検討、又 IgG 分泌 8 例内でも検討を行ったが有意差は得られなかった。

PT 値と白血球数、好中球数、血清 LDH 値、血清 Ca 値との間では相関を認めなかった。

## 3) PH 値と PT 値との相関

ANLL の未治療群と CR 群, MDS 群, CML 群, ET 群, MM 群の 6 群及び全症例における PH 値と

PT 値の間で相関は認めなかった。

## 4) 化学療法の影響と経時的計測

さらに対象症例より経時的に計測し得た ANLL の 3 例 (M2; 2 例, M5; 1 例) と MM の 1 例を選び、化学療法直後の影響を検討するために化学療法の前後でそれぞれ PH 値, PT 値の測定を行なった (Fig. 2)。

Fig. 2 (a) は M2 と診断され寛解導入後, CR を維持, consolidation 時の A-triple-V 療法 (enocytabine; BAHC 150 mg/m<sup>2</sup>/day, etoposide; VP-16 150 mg/m<sup>2</sup>/day, vindesine; VDS 3 mg/m<sup>2</sup>/day, prednisolone; PSL 40 mg/m<sup>2</sup>/day) 時の結果である。

治療前の好中球数は 1080/ $\mu$ l であり治療 3 週後では 741/ $\mu$ l であった。PH 値は治療直後は 45.10 rlu, から 13.5 rlu に減少し, 3 週後は 2.65 rlu で更に減少した。PH 値は直後前では 601 sec, 治療直後では 361 sec, 治療後 3 週後では 351 sec であった。

Fig. 2 (b) は M2 と診断され寛解導入後, CR を維持, consolidation での BHAC-MMP 療法 (BHAC 300 mg, methotrexate; MTX 8 mg/m<sup>2</sup>/day, 6-mercaptopurine; 6-MP 50 mg/m<sup>2</sup>/day, PSL 30 mg/m<sup>2</sup>/day) 時の結果である。治療前の好中球数は 1848/ $\mu$ l であり治療 10 日後では 429/ $\mu$ l であった。PH 値は治療前は 10.53 rlu, 直後では 18.95 rlu であり 10 日後は減少し 2.31 rlu であった。PT 値は化学療法前は 390 sec, 直後では 285 sec, 10 日後で 353 sec で直後より延長していた。

Fig. 2 (c) は M5 で化学療法 (BHAC 300 mg/m<sup>2</sup>/day, doxorubicin; DXR 8 mg/m<sup>2</sup>/day, ACNU 50 mg/m<sup>2</sup>/day, PSL 10 mg/m<sup>2</sup>/day) 時の結果である。

治療前の好中球数は治療 10 日前は 4680/ $\mu$ l であり治療前では 6180/ $\mu$ l であった。PH 値は治療 10 日前は 1.73 rlu, 治療前では 1.71 rlu, 直後では 1.51 rlu で減少した。PT 値は化学療法の 10 日前では 301 sec, 化学療法の開始前は 351 sec で、直後では 22 sec であった。

Fig. 2 (d) は多発性骨髄腫と診断され MVP 療法 (melphalan 6 mg/m<sup>2</sup>/day, VCR 1 mg/m<sup>2</sup>/day, PSL 40 mg/m<sup>2</sup>/day) にて化学療法時の結果である。

治療前の好中球数は 3484/ $\mu$ l であり治療 9 日後では 2254/ $\mu$ l であった。PH 値は治療前は 9.78 rlu, 直後では 5.53 rlu で減少し, 9 日後は更に減少し 1.72

rluであった。PT値は化学療法前452sec、後では786secと延長し9日後では377secであった。

5) Negative control

Johnston, Keeleらは慢性肉芽腫症は好中球機能異常を有する疾患であり活性酸素産生能は障害されていると報告した<sup>4)</sup>。今回測定した慢性肉芽腫症ではPH値1.24rluで低値であり、PT値は120.0secで正常コントロール群と比較して延長していなかった為、PH値のNegative controlと考えられた。

考 案

1) Peak High (PH) 値と Peak Time (PT) 値の意義

一般的に血液疾患における好中球に由来する免疫

不全には質的異常と量的異常が関与していることは明白である。更に化学療法施行時には量的異常が強く関与している。本研究では好中球の細胞数の調整を行うことによって数的な異常は測定時に除外されており、質的異常に関する検討を行った。

また今回の研究では好中球は洗浄した後の測定であるため血清Ca値、血清LDH値の影響は受けないと考えられPH値、PT値とも相関は認めなかった。

全症例及び各症例群でのPH値とPT値の間には相関を認めなかった。PH値の低下とPT値の延長は両者共に好中球機能の障害を示すと考えられるが、それぞれ機序の異なる障害の指標と思われた。好中球の貪食時には化学走化性、異物認識、取り込

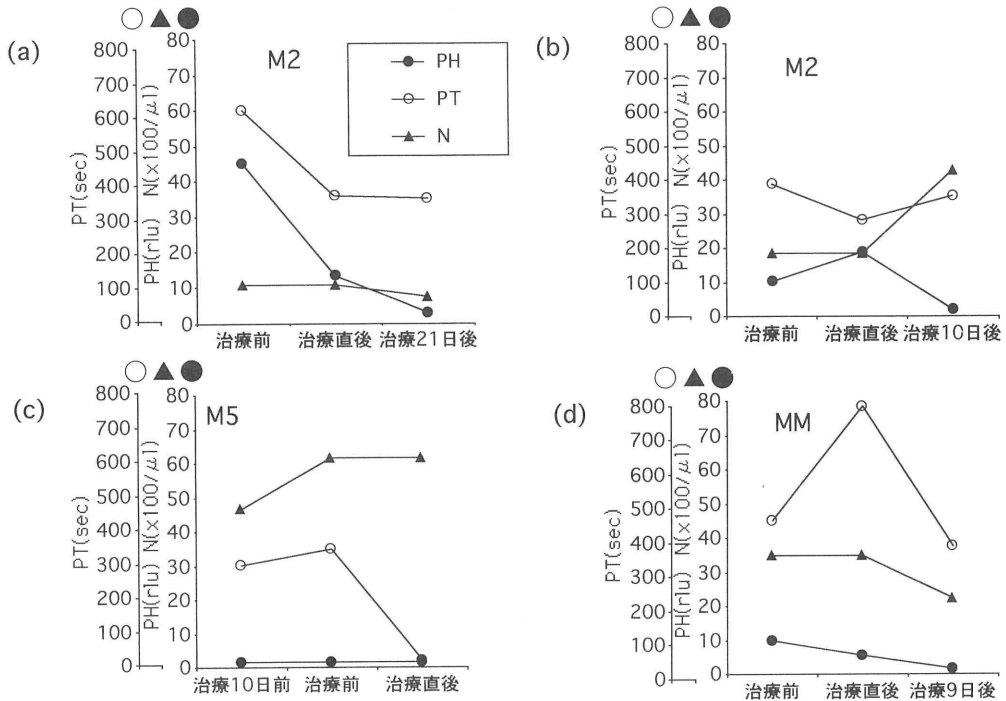


Fig. 2 化学療法時におけるPH値とPT値の経時的変化

X軸：治療前；化学療法初日の開始前 治療直後；化学療法初日の点滴終了直後

Y軸：PH；Peak High (rlu)，化学発光測定時の最大発光強度 PT；Peak Time (sec)，最大発光強度に到達した時間 N；好中球数  $\times 10^2/\mu\text{l}$

a) の化学療法は (enocytabine; BAHC 150 mg/m<sup>2</sup>/day, etoposide; VP-16 150 mg/m<sup>2</sup>/day, vindesine; VDS 3 mg/m<sup>2</sup>/day, prednisolone; PSL 40 mg/m<sup>2</sup>/day).

b) の化学療法は (BHAC 300 mg, methotrexate; MTX 8 mg/m<sup>2</sup>/day, 6-mercaptopurine; 6-MP 50 mg/m<sup>2</sup>/day, PSL 30 mg/m<sup>2</sup>/day).

c) の化学療法は (BHAC 300 mg/m<sup>2</sup>/day, doxorubicin; DXR 8 mg/m<sup>2</sup>/day, ACNU 50 mg/m<sup>2</sup>/day, PSL 10 mg/m<sup>2</sup>/day).

d) の化学療法は (melphalan 6 mg/m<sup>2</sup>/day, VCR 1 mg/m<sup>2</sup>/day, PSL 40 mg/m<sup>2</sup>/day).

み、脱顆粒、活性酸素産生と反応が進行する。PH 値は主に産生量に関わる因子と考えられ、それらの因子として Rossi と Zatti<sup>5)</sup> は細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼをあげ Segal と Jones<sup>6)</sup> はアズール顆粒に含まれるミエロペルオキシダーゼ (MPO) との関連を指摘した。また PT 値は好中球の反応性の低下を示すと思われ NADPH, MPO 系酵素以外にも複数の活性化因子の存在があり因子間相互作用も明確とはなっていないが、それらの代謝反応性の低下を示していると考えられた。

## 2) 各疾患における活性酸素産生能と関連要因

好中球機能としての活性酸素産生は感染に対する防御機構や抗腫瘍性に作用し、生理的に有用な反応であるが、多量に発生すると組織障害性に作用し肝障害、心筋障害、神経疾患、発癌、老化など様々な病態に関与している事が知られている。

今回の検討では、ANLL の未治療群、ANLL の完全寛解群、MDS 群、CML 群、MM 群において、正常コントロール群と比較して PH 値の有意の低下があり、好中球の活性酸素産生能は低下していると考えられた。また PT 値に関しては ANLL の CR 群、CML 群において正常コントロール群に比し有意の延長が認められた。PT 値は細胞膜の反応や細胞内での代謝の速度と関連していると推測され、これらの疾患では成熟好中球の機能が障害されていることが示唆された。

ANLL の成熟顆粒球にはアウエル小体がしばしば認められるが、この事から白血球の好中球には白血病クローンの存在があり、これが好中球機能低下の原因となっていることが考えられる。また ANLL における完全寛解例は症例、5-10 の 6 例であるが、これらの群の PH 値は健常群に比し有意に低下しており、しかも PT 値は有意に延長したことより好中球機能は回復しているとは言えなかった。このことは完全寛解であっても病的クローンは残存しているか、または薬剤の影響が残存していることが考えられたが、前治療後より少なくとも 30 日以上休薬期間をとった事から考えると、薬剤の影響よりは白血病クローンの残存が活性酸素産生の低下となる可能性が示唆された。

骨髄異形成症候群 (MDS) は画一の疾患ではなく種々の病態を含む疾患群であるが、今回対象とした疾患は RA 5 例、RAEB 1 例、CMMoL 1 例であり、正常コントロール群に比し PH 値は低下していた。

Koeffler と Golde らは MDS は多能性幹細胞段階での分化異常であると報告した<sup>7)</sup>。一般的に MDS の末梢血好中球では過分葉、偽 Pelger 異常、成熟好中球の脱顆粒等の異常を認める。従ってこの疾患での好中球機能低下は異常クローン由来の好中球が成熟好中球に対しある程度以上の割合を占めている事が原因であると考えられた。

慢性骨髄増殖症候群は多能性幹細胞レベルでの腫瘍疾患であり、慢性骨髄性白血病、真性多血症、原発性血小板血症、原発骨髄線維症がこの疾患群に含まれる。

CML 群の PH 値は低値であり、PT 値は延長していた。症例は全例共、臨床的に安定した慢性期であった。好中球の機能障害の原因としては CML が幹細胞レベルでの障害であるためと思われ、代謝障害も存在すると思われた。Yuo らは CML は多能性幹細胞の腫瘍化であると考えられる為、好中球の質的異常、機能障害が存在すると報告している<sup>8)</sup>。

今回の研究では、ET 群の PH 値は健常群に比し有意差はなかった。ET は CML と同じく幹細胞レベルでの障害ではあるが、好中球に対する障害の程度は CML とは異なると考えられる。

原発性骨髄線維症は一例のみ計測したが、PH 値は高値であった。この原因は不明である。しかしこのことは CML との鑑別診断の一助になり得ると思われる。

今回の検討では MM 群では PH 値は正常コントロール群に比し有意に低値であり、PT 値は正常コントロール群に比し有意差は認めなかった。活性酸素産生障害の理由としての代謝物質やサイトカインの影響が挙げられている。

ALL では正常コントロール群に比し PH 値に有意差は認めなかったが、これは白血病細胞がリパ球であり好中球機能との関連が希薄であるためと考えられる。

## 3) 抗癌剤の抗中球機能への影響

抗癌剤の抗中球機能への影響に関しては種類により活性酸素産生能に異なった影響を与えることが判明している。

今回の研究における化学療法前後の PH 値、PT 値測定では、PSL 投与後また VCR, VDS 投与後で PH 値の低下傾向及び PT 値の延長傾向を認め、抗中球機能の障害が示唆された。しかし今回の症例では多剤併用療法のため使用薬剤の影響は一様ではな

いことや、サイトカインの影響、病気、病態など様々な要素が関わっていると思われるため一元的には断定できないと思われる。*In vivo* ではさらに活性酸素産生能に関与する因子が多いため予測は困難であるが、抗癌剤により病的クローンの減少及び正常クローンの増加が認められれば活性酸素産生能に反映すると思われる。

化学発光法は比較的短時間、簡便な操作で結果を得ることが可能であり、血液疾患またその化学療法時において即時的に活性酸素産生能を知ることは臨床的にも意義のある事と考えられた。

### 結 語

1. 急性非リンパ性白血病群の未治療群と完全寛解、慢性骨髄性白血病群及び骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫群における Peak High (PH) 値 (最大発光強度) は、正常コントロール群に比し低く有意差を認めた。

2. 慢性骨髄性白血病群と急性非リンパ性白血病群の完全寛解における Peak Time (PT) 値 (最大発光強度に到達した時間) は正常コントロール群に比し延長し有意差を認めた。

3. PH 値と白血球数、血清 LDH 値、血清 Ca 値との間には相関は認めなかった。

4. PT 値と白血球数、血清 LDH 値、血清 Ca 値との間には相関は認めなかった。

5. 全症例及び各症例における、PH 値と PT 値の間に相関は認めなかった。

6. 抗癌剤投与によると思われる好中球機能低下例が認められた。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました伊藤久雄教授に深謝致しますと共に、終始御指導、御鞭撻を頂きました酒井信彦客員助教授、代田常道

講師に厚く感謝致します。また御指導、御協力頂きました東京医科大学内科学教室第三講座の教職員各位、関連機関の諸先生に対し、心から感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Baldrige CW, Gerard RW: The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* **103**: 235~236, 1932
- 2) Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT: Biological defence mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent, *J Clin Invest* **52**: 421~444, 1973
- 3) Allen RC, Stjernholm RL, Steele RH, Steele RH: Evidence for the generation of an electronic excitation state in polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem Biophys Res Commun* **47**: 679~684, 1972
- 4) Johnston RB, Bernard BK, Hara PM, Joyce EL, Lawrence SW, Robert LB, Rajagopalan KV: The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. *J Clin Invest* **55**: 1357~1372, 1975
- 5) Rossi F, Zatti M: Changes in the metabolic pattern of polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Br J Exp Path* **45**: 548~559, 1964
- 6) Segal AW, Jones OTG: Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* **276**: 515~517, 1978
- 7) Koeffler HP, Golde DW: Cellular maturation in human preleukemia. *Blood* **52**: 355~361, 1978
- 8) Yuo A, Kitagawa S, Okabe T, Urabe A, Komatsu Y, Itoh S, Takaku F: Recombinant human G-CSF repairs the abnormalities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndrome and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **70**: 404~411, 1987



## Neutrophil Active Oxygen Productivity in Blood Diseases and Healthy Subjects.

Masaru HACHISU

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

We investigate the productivity of active oxygen in neutrophil by the measurement of chemiluminescence using the luminol reaction and compared the results in various blood diseases and in healthy subjects. Neutrophils produce active oxygen as a defensive action against infection at the time of phagocytosis. Peak high (PH) values are maximum values on the curves monitored by a lumiphotometer, and peak time (PT) is the time of the PH value.

We examined the productivity of active oxygen in a total of 48 patients with blood diseases, including 12 with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL), 7 with myelodysplastic syndrome (MDS), 9 with chronic myelocytic leukemia (CML), 6 with essential thrombocythemia (ET), 11 with multiple myeloma (MM), and others. As normal controls, the productivity of active oxygen was also measured in 22 healthy volunteers. The PH value and the PT value of the each disease were statistically analyzed and compared to those of healthy volunteers. The PH values were significantly lower than that of the healthy volunteers in AML, MDS, CML, MM, And the PT value was significantly longer in CML. This suggested that in AML some mature neutrophils are derived from leukemic clones, and clonal disorder of the disease involves even mature neutrophils and resulting in poor function, while in MDS and CML disorders at the stem cell level, cause dysfunction of neutrophils. Furthermore immunosuppressive substances are involved in MM.

In relation to chemotherapy, anti-leukemic agents inhibited neutrophil function i.e. they adversely affect the cell membrane and the metabolic system. *In vivo* the influence of anti-leukemic agents is more complicated, but knowledge of the function of neutrophils is considered useful for chemotherapy.

---

<Key words> Active oxygen, Chemiluminescence, Neutrophil, Blood disease.

---