

〈原著〉

化学発光法による全血を用いた好中球活性酸素産生能の検討

秋山 佳織¹⁾、太田 安彦²⁾、徳永 賢治²⁾

Evaluation of reactive oxygen production using whole blood samples by chemiluminescence

Kaoru Akiyama¹⁾, Yasuhiko Ohota²⁾ and Kenji Tokunaga²⁾

Summary Conventionally, it has been necessary to isolate neutrophils to measure the production capacity of reactive oxygen species (ROS), and isolation takes a long time due to a large amount of blood. Although cytometry has been applied to measure ROS in a whole blood preparation, special equipment is required. We therefore investigated the feasibility of using a chemiluminescence technique to rapidly measure ROS in whole blood.

Chemiluminescent reagents 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido (3,4-d) pyrodazine-1,4 (2H,3H) dione (L-012), 2-Methyl-6-p-methoxyphenylethynylimidazopyrazinone (MPEC), luminol, and lucigenin, as well as the stimulants phorbol myristate acetate (PMA), formil-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), and opsonized zymosan (OZ) were used in the present study, and emission intensities were captured using a Luminescencer PSN. The results showed that L-102 exhibited a high degree of reaction specificity toward hypochlorous acid (HOCl) and sufficient sensitivity in the analysis using whole blood. Because this technique enables rapid measurement of ROS in trace samples, it is expected to be a valuable clinical laboratory assay.

Key words: Chemiluminescence, Neutrophils, Whole blood, ROS, L-012

I. 諸言

好中球は生体の非特異的防御の中心的な役割を果たしている。その際、種々の走化因子に反応し、内皮細胞への粘着、次いで感染巣に遊走

する。感染局所の好中球は微生物を貪食し、同時に細胞膜に存在するNADPH酸化酵素が活性化され、スーパーオキシド (O_2^-) を産生する。さらに O_2^- から派生する活性酸素により殺菌が行われる。

¹⁾香川県立中央病院 中央検査部
760-0017 香川県高松市番町 5-4-16

²⁾香川県立保健医療大学 臨床検査学科
761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Kagawa Prefectural Central Hospital

5-4-16 Ban-cho, Takamatsu-shi, Kagawa 760-0017, Japan

²⁾Department of Clinical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Science

281-1 Hara, Mure-cho, Takamatsu-shi, Kagawa 761-0123, Japan

受領日 平成23年11月11日

受理日 平成23年12月22日

一方、好中球の過剰な活性化による活性酸素の産生は、それ自身、脂質、糖質、核酸を酸化して組織障害をもたらす。さらに、細胞外の抗プロテアーゼを不活化し、放出されたプロテアーゼに対する阻害を低下させ組織障害を惹起する。また、慢性炎症疾患などの病態に係っていることが指摘されている。さらに、サイトカインによるプライミング反応は好中球活性化とMPO放出、酸化障害を亢進させる⁹⁾。したがって、これらの病態を把握するには、末梢血液中の好中球活性化の状態を簡便で迅速に測定することが重要であり、好中球活性酸素産生能の測定は、酸化ストレスによる病態のマーカーとして有用であると考えられる。

好中球活性酸素産生能の測定として、チトクロームCに代表される従来の方法は、活性酸素の測定においては、好中球を分離する必要がある、多量の血液および分離に長時間を要した。全血で測定する方法として、フローサイトメトリー法を用いた方法が報告^{2,3)}されているが、特別な装置が必要である。

近年、微量成分を定量するために化学発光試薬を利用した分析方法が開発されている⁹⁾。活性酸素の測定においては、好中球が細菌を貪食する際に光を発することをAllen⁹⁾が発見し、液体シンチレーションカウンターで測定することを試みている。しかし、この方法においても多量の血液を必要とした。その後、発光増強剤として、ルミノール、ルシゲニン、ウミホタル・ルシフェリン誘導体を用いた測定方法が報告されている。しかしながら、測定する活性酸素種については十分に検討されていない。

今回、各種化学発光試薬を用いて、全血でしかも短時間で測定する方法を検討したので報告する。

II. 方法と材料

1. 発光試薬を用いた活性酸素種の測定

化学発光法による活性酸素種の測定では、発光試薬が活性酸素と化学反応を起こし、励起状態から基底状態に戻る際に光を放出する。この発光は、活性酸素による酸化反応が主なエネルギー源となっている (Fig. 1)。

今回、活性酸素種としてO₂はキサンチンオキシダーゼ (XOD) -ヒポキサンチン系で生成させた。HOClは次亜塩素酸からの調整およびMOP反応より生成させた。発光試薬として2-Methyl-6-p-methoxyphenylethynylimidazopyrazinone (MPECアトー社)、ルミノール (和光純薬)、ルシゲニン (和光純薬)、8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido (3,4-d) pyrodazine-1,4 (2H,3H) dione (L-102 和光純薬) を用いて活性酸素種との反応性について検討した。

測定装置はルミネッセンサーPSN (アトー社) を用いた。

1) 試薬

発光試薬としてMPECは1バイアルを5 mlのアルコールで3.6 mmol/lに溶解し、使用時に精製水で300 μmol/lに調整した。ルミノールとルシゲニンは0.2 mol/l Tris-HCl緩衝液pH8.5を用いて、それぞれ200 μmol/lに調整した。L-012は50 mmol/l Tris-HCl緩衝液pH7.5で500 μmol/lに溶解した。

活性酸素産生試薬として、O₂の生成は3.6 mmol/lヒポキサンチン、0.1 U/ml XODを用いた。MPO反応によるHOClの生成には75 mmol/lリン酸緩衝液 (KH₂PO₄、Na₂HPO₄) pH7.5を用いて150 U/l MPOに調整した。また、精製水で0.6

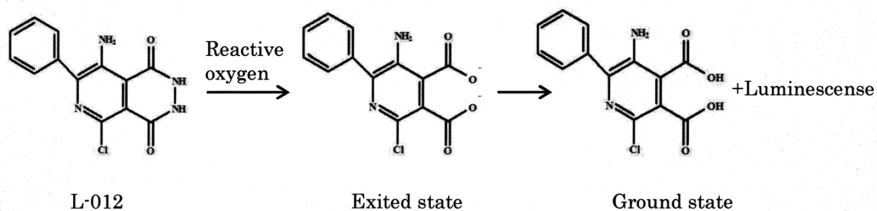


Fig. 1 Principle of measurement

mol/l H₂O₂溶液とした。次亜塩素酸溶液は、次亜塩素酸ナトリウム溶液から0.1 mol/l酢酸緩衝液、pH5.5で希釈し調整した。

2) 測定方法

O₂の検出は試験管にリン酸緩衝液180 μl、XOD溶液60 μl、発光試薬10 μlを加え混和後、ヒポキサンチン溶液50 μl添加して反応を開始させてルミネッセンサーPSNで発光量を測定した。HOClの検出は酢酸緩衝液240 μl、発光試薬10 μlを試験管に加え混和後、HOCl 50 μlを添加して反応を開始し同様に測定した。

MPO反応により生成するHOClの検出は、試験管に緩衝液200 μl、発光試薬10 μl、NaCl 20 μl、MPO 20 μlを加え混和後、H₂O₂ 50 μlを添加して発光量を測定した。HOClの検出の確認は、反応系に7.5 mmol/l NaN₃を10 μl加えて5分間処理後、H₂O₂を加えて反応を開始して、同様に発光量を測定した。

2. 全血を試料とした活性酸素種の測定

各種刺激物質 (formil-methionyl-leucyl-phenylalanine: fMLP、phorbol myristate acetate: PMA、opsonized zymosan: OZ) により好中球を活性化して、生成する活性酸素種と各発光試薬との反応を測定した。また、L-012により検出する活性酸素種について阻害物質を用いて検討した。阻害物質としてSuperoxide dismutase: SOD (シグマ)、Catalase: CAT (シグマ)、NaN₃ (和光純薬)を用いて阻害反応を調べた。

1) 試薬

Ca²⁺-free KRP緩衝液は、0.1 mol/lリン酸緩衝液 (pH7.4) 21容、0.15 mol/l NaCl 100容、0.154 mol/l KCl 4容、0.15 mol/l MgCl₂ 1容の割合で混合し、使用前に調整した。

刺激物質の調整は、PMA、fMLPともにエタノールで10 mmol/lに溶解し、使用時に0.5 %エタノールCa²⁺-free KRP緩衝液を用いて、0.2 mmol/l PMA、0.2 mmol/l fMLPを作成した。OZはザイモザン (シグマ) 4 mgを1 mlの20 mmol/l ベルナル緩衝液 (pH7.4) に懸濁し、100分間加熱沸騰させた。その後、室温で冷却し、1,900×g 10分間遠心、沈殿ザイモザンにヒト新鮮プル血清1 mlの割合で加え、37℃、30分間

反応させた後、1,900×g 10分間遠心上清を除き、次にCa²⁺Mg²⁺-free KRP緩衝液で2回洗浄し、OZが20 mg/mlになるようにCa²⁺Mg²⁺-free KRP緩衝液を加えた。

SOD 10 U/l、カタラーゼ1,000 U/l、1 mmol/l NaN₃はCa²⁺-free KRP緩衝液で各濃度に溶解した。グルコースは1 mol/l溶液を作成し、使用時にCa²⁺-free KRP緩衝液で500 mmol/lに希釈した。発光試薬は活性酸素種測定と同様の試薬を用いた。

2) 測定方法

試験管にCa²⁺-free KRP緩衝液195 μl、発光試薬20 μl、全血20 μl、グルコース 5 μlを加え、37℃ 3分インキュベーション後、各刺激剤10 μl、KRP 10 μlの添加により反応を開始し、ルミネッセンサーPSNで発光量を測定した。

Ⅲ. 結果

1. 発光試薬を用いた活性酸素種の測定

各種発光試薬としてMPEC、ルミノール、ルシゲニン、L-012を用いてO₂、HOClとの反応性について調べた。ヒポキサンチン-XOD系で生成させたO₂に対する反応性は、L-012が最も強く、次いでルシゲニン、ルミノール、MPECであった。L-012に対して他の試薬の発光量は約1/3程度であった (Fig. 2)。HOCl溶液に対する反応性は、L-012による発光が著しく高く、MPEC、ルミノール、ルシゲニンの順であった (Fig. 3)。

2. 全血試料を用いた測定

全血を試料として、PMAで刺激しL-012、

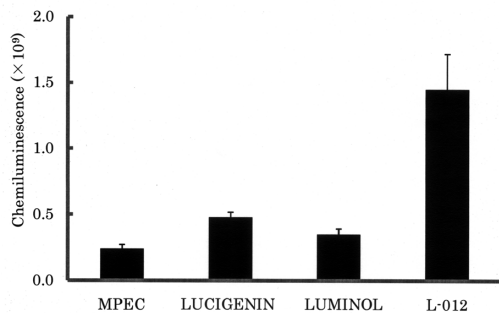


Fig. 2 Detectoin of superoxide by various chemiluminescence probes.

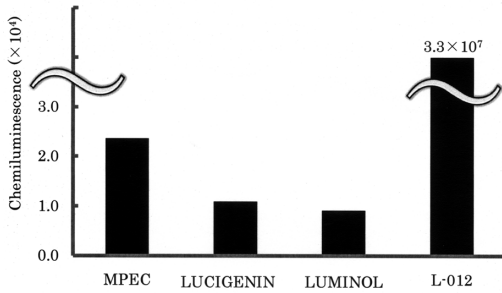


Fig. 3 Detectoin of hypochlorous acid by various chemiluminescence probes.

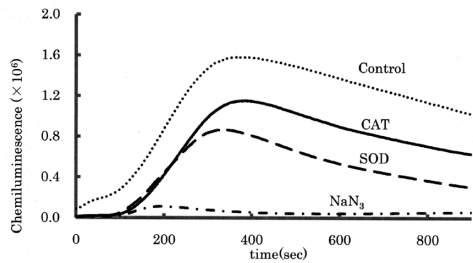


Fig. 6 Effect of inhibitor on chemiluminescence reaction.

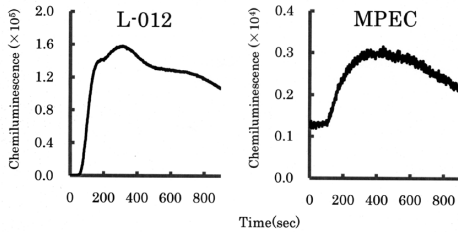


Fig. 4 Time course of chemiluminescence

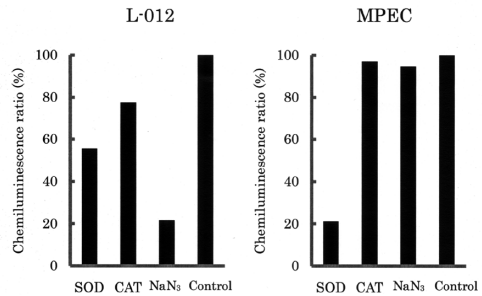


Fig. 7 Effect of inhibitor on chemiluminescence ratio.

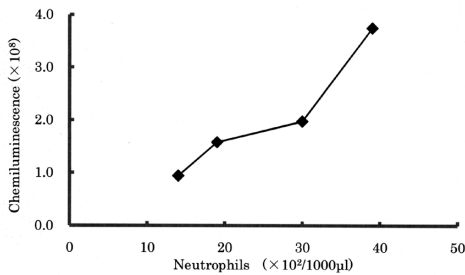


Fig. 5 Effect of neutrophils on chemiluminescence reaction.

MPECを用いて発光のタイムコースを調べた。

Fig. 4に示すごとく、L-012は急激に反応し約300秒で発光はピークに達する。一方、MPECは反応が遅くピークは400秒であった。発光強度の比較は、感度的にL-012と比較してMPECは1/50の感度であった。

3. 発光反応に対する好中球数の影響

好中球を分離しないで全血で測定するため、

全血における好中球数と発光量との関係について検討した。赤血球、好中球、血漿を分離し、赤血球数と血漿量を一定にして、分離した好中球を添加した試料について、その影響を調べた。好中球数の増加に比例して発光強度が増加した (Fig. 5)。

4. L-012と活性酸素種の反応性の検討

好中球活性化より生成する活性酸素に対するL-012の反応性について、活性酸素消去酵素、活性酸素産生酵素に対する阻害剤を用いて検討した。活性酸素生種として O_2 に対してはSOD、 H_2O_2 にはCAT、HOClは NaN_3 を反応系に添加して反応性を調べた。Fig. 6のごとく、発光のタイムコースからそれぞれの阻害反応はラグタイムが生じ、さらに発光量も減少した。阻害物質の中で NaN_3 が最も反応を阻害した。これらの反応性をMPECと比較した結果はFig. 7に示すごとく、L-012は NaN_3 、MPECはSODが最も発光量を減少させた。

Ⅳ. 考察

好中球の過剰な活性化は O_2^- の産生、MPO放出、さらに O_2^- から派生する活性酸素により酸化障害を亢進させることが知られている。したがって、これらの状態を把握するには、末梢血液中の好中球活性化の状態を簡便で迅速に測定することが重要である。そこで、発光試薬を用いて、アトー社のルミネッセンサーPSN測定装置を利用した全血を試料とした好中球活性酸素産生能を検討した。

発光法による活性酸素種分析は、発光プローブと呼ばれる発光化合物が活性酸素と化学反応を起こすことを利用している。発光プローブは化学エネルギーを受け取り酸化化合物となり、この励起状態から基底状態に戻る際に過剰のエネルギーを光として放出する。発光にはエネルギーの供給が必要であり、それは酸化、還元、その他、発エルゴン反応であればどのような反応でもよいとされている。通常、酸化反応が発光の主なエネルギー源となっている。本分析法は、高感度であり、発光試薬を使用するための光源を必要とせず小型で比較的安価な装置で測定できるなどの利点がある。近年、ウミホタル・ルシフェリン誘導体であるCLA、MCLAが汎用されているが、活性酸素に対する選択性の向上、自動酸化によるバックグラウンドを低下させた発光プローブの開発が試みられ、MPEC⁶⁾、L-012⁷⁾が出現している。

今回、発光試薬としてMPEC、ルミノール、ルシゲニン、L-102を用いて、XOD-ヒポキサンチン系で生成する O_2^- 、MPO- H_2O_2 -Cl系で生成するHOClを測定した。結果は O_2^- 、HOClともに、全ての発光試薬と反応した。HOClについてはL-012が最も感度が高く、ついでMPECであった。

次に試料として全血を用いて、発光反応について検討した。PMA刺激によりL-012は感度的に測定が可能であったが、MPECは十分な感度が得られなかった。他の刺激物質としてfMLP、OZも同様の結果であった。また、発光反応に対する好中球数の影響は好中球の個数に比例して発光強度が増加することを確認した。

好中球の活性化により産生する活性酸素種と発光試薬の反応性を確認するために反応系に阻害剤を加えた。すなわち、HOClに対しては NaN_3 、

O_2^- はSOD、 H_2O_2 はCATにより活性酸素の産生を抑制した系と阻害剤不在の系で発光強度を比較した。L-012とMPECの比較では、阻害物質に対する反応性が異なる結果を得た。L-012は NaN_3 によってほとんど発光が阻害されるが、MPECはSODにより最も阻害を受けた。この結果は両者の活性酸素に対する反応性に差があることを示しており、L-012はHOCl、MPECは O_2^- との反応性が高いことが推測された。この反応性を確認するため、MPO- H_2O_2 -Cl反応系に NaN_3 を添加し発光量を測定した。結果は NaN_3 により発光が減少した(結果不掲載)。これはL-012がHOClと特異的に反応することを示唆する。Imada⁸⁾は、L-012はルミノールよりも数倍強く発光することを報告している。また、活性酸素種と発光プローブの反応性について、西田⁹⁾は、ウミホタル・ルシフェリン依存性化学発光がSODにより抑制され、CAT、 NaN_3 では抑制されない。したがって O_2^- の関与が主であることを明らかにした。ルミノールとの反応について顆粒球においては、MPO欠損患者では発光を示さず、健常人ではMPOの阻害剤 NaN_3 で発光が阻害されたことを報告している。本研究に用いたL-012は同様に NaN_3 によって阻害され、HOClの発光が主であると考えられる。

アトー社のルミネッセンサーPSN測定装置は生物発光・化学発光分析機でATP分析、抗酸化能測定に開発された機器であるが、発光試薬としてL-012を用いることで、全血による好中球活性酸素産生能を測定は十分な感度であった。

本法は、好中球の分離操作が不要であるため短時間、しかも $20\mu l$ の血液で測定が可能であった。全血での測定においては、好中球数が影響するために補正する必要がある。しかし、現在の血球測定装置では、血球数とともに好中球数も同時に計測することが可能であり、好中球(10^3 個)あたりに換算して表示することで、臨床検査における好中球活性酸素産生能として利用できる。本法は、迅速で簡便な酸化ストレスマーカーの測定方法として、有用な検査情報を提供することが期待される。

Ⅴ. 結語

今回、化学発光試薬を用いて全血による好中

球活性酸素産生能の測定を検討した。発光試薬の中でL-012はMPO由来活性酸素であるHOClに反応特異性が高い結果であった。L-012を利用しルミネッセンサーPSNを用いた測定は、全血での好中球活性酸素産生能の測定に十分な感度を示した。また、好中球の分離操作が不要のため、微量で短時間の測定が可能であった。

文献

- 1) 小川道雄： サイトカインによる好中球の活性化と臓器障害. 医学のあゆみ, 169: 845-849, 1994.
- 2) 徳永賢治, 土居 修, 宍野宏治, 村瀬光春, 武内 望, 篠原力雄, 石黒伊三雄他: 慢性関節リュウマチにおける活性酸素産生能の検討. 臨床化学, 18: 196-200, 1989.
- 3) 西郷勝康, 矩口真理子, 井本しおん: 臨床検査としての好中球機能と酸化ストレス. 臨床病理, 56: 791-801, 2008.
- 4) 和田光弘, 中島憲一郎: 経口および化学発光法と臨床分析化学. 臨床化学, 39: 6-14, 2010.
- 5) Allen RC, Stjernholm RL and Steele RH: Evidence for the generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocyte and its participation in bactericidal activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 46: 679-684, 1972.
- 6) Shimomura O, Wu C, Murai A and Nakamura H: Evaluation of five imidazopyrazione-type chemiluminescent superoxide probes and their application to the measurement of superoxide anion generated by listeria monocytogenes. *Anal Biochem*, 258: 230-235, 1998.
- 7) Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, Kieschov AL and Munzel T: Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminal analogue L-012. *Free Radic Biol Med*, 36: 101-111, 2004.
- 8) Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, Konaka R and Inoue M: Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem*, 271: 53-58, 1999.
- 9) 中野 稔, 古川敏一編; 西田 朗: 白血球のO₂産生能の測定. 活性酸素と発光, 107-112, 日本医学館, 東京, (1990)