



慢性肺気腫症患者における好中球遊走能及び活性酸素産生能と赤血球SOD活性の検討

中村, 博文

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 58(1/2/3):29-35

(Issue Date)

1997-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177379>



慢性肺気腫症患者における好中球遊走能及び 活性酸素産生能と赤血球SOD活性の検討

神戸大学医学部内科学第一講座（指導：横山 光宏教授）

中 村 博 文

（平成9年2月27日受付）

要 旨

慢性肺気腫（CPE）の成因を明らかにするために、13人の慢性肺気腫患者（CPE群、平均年齢65.8±6.2才、平均1秒率38.8±7.2%）及び8人の健康成人（コントロール群、平均年齢60.1±8.2才）を対象に末梢血好中球（PMN）の遊走能、活性酸素（ O_2^- ）産生能及び赤血球SOD活性（RBC-SOD）を測定した。CPE群のPMN遊走能は、コントロール群よりも有意に亢進していた（363±243 vs 113±91 PMNs/mm³, $p < 0.05$ ）が、 O_2^- 産生能は、両群間に有意差を認めなかった。一方、RBC-SODはCPE群で有意に低値であった（1.82±0.22 vs 3.12±0.85 U/10⁴RBC, $p < 0.01$ ）。以上よりCPE群では、PMNの機能異常だけでなく、RBC-SOD活性の低下を認め、アンチオキシダント活性は、CPEの成因に関与している可能性が示唆された。

緒 言

慢性肺気腫（以下CPE）の成因に喫煙の影響が特に重要であることはよく知られている⁽¹⁾⁽²⁾。タバコ煙は、肺胞マクロファージ（以下AM）の増加及び活性化、好中球（以下PMN）の末梢血管内から肺胞への遊走及び活性化を起し、プロテアーゼの放出を促し、肺胞壁破壊の亢進を引き起こす⁽³⁾。また、活性化され遊走した炎症細胞のオキシダントおよびタバコ煙自体のオキシダントによりプロテアーゼ・インヒビターが酸化を受け⁽⁴⁾、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ均衡においてプロテアーゼ優位の不均衡を生むことになる⁽⁵⁾。この不均衡に基づき、プロテアーゼによる肺組織のエラスチンの分解が進行され、気腫性変化が引き起こされると考えられている。このようにCPEの成因には、攻撃因子としてのプロテアーゼ、オキシダント、防御因子としてのアンチプロテアーゼ、アンチオ

キシダントがあり、これらの間に生ずる不均衡が大きく関与していると考えられる⁽³⁾。

赤血球（以下RBC）には高濃度のスーパーオキシドディスムターゼ（Superoxide dismutase：以下SOD）、カタラーゼ、グルタチオン、ペロキシダーゼが含まれており、気管内へ注入されたRBCは95%酸素に曝露されたラットの生存率を改善することが報告されている⁽⁶⁾。またRBCのカタラーゼはタバコ煙による α 1-アンチトリプシン（以下 α 1-AT）の不活化を防止するので⁽⁷⁾、RBC内のアンチオキシダントがCPE発症の抑止力として作用している可能性がある。したがって、RBCのSOD、カタラーゼ、グルタチオンオキシダーゼ等のCPE形成に対するアンチオキシダント作用が注目されている。

我々は、CPE患者においてPMNの遊走能、オキシダントの1つである活性酸素（以下 O_2^- ）産生能を測定し、攻撃因子の評価を行う一方、RBCに含まれるアンチオキシダントの1つであるSOD活性を測定し、防御因子の1つの要因としての意義を検討した。

対象および方法

1. 対象

臨床症状、胸部X線写真及び胸部CT写真、肺機能検査によりCPEと診断され、ここ1ヶ月間に明らかな感染がなく臨床症状の安定している13人を対象とした（Table 1）。CPE群は平均年齢65.8才、平均1秒率は38.8±7.2%であり、また13名全例が喫煙歴を有し、Current smoker 10人、Ex-smoker 3人であった。治療としては経口テオフィリン剤、抗コリン剤吸入、 β_2 刺激剤の吸入を中心とし、ステロイド療法（吸入、経口及び注射を含む）、抗生剤、抗菌剤の投与をうけていない患者を対象とした。一方、対照には呼吸器症状をもたない健康成人8人を選んだ（コントロール群）。その構成は、平均年齢60.1才、Current smoker 3

キーワード：肺気腫、好中球遊走能、好中球活性酸素産生能、赤血球SOD活性

Table 1 Characteristics in Subjects

	Age(y.o)	Gender	Ex(y)	Brinkmann				
				Index	VC(L)	%VC(%)	FEV1(L)	FEV1%(%)
Patients with CPE(CPE)								
1	75	F		240	1.45	69	0.69	46.6
2	66	M		400	2.21	65.5	1.02	45.7
3	61	M		640	2.98	80.5	0.74	25.5
4	61	M		750	3.06	91	1.03	33.9
5	71	M		440	2.55	81.2	0.74	36.2
6	61	M		1400	1.4	42.4	1.24	37.5
7	73	M		600	2.1	66.6	0.76	44.1
8	63	M		2000	4	116	1.16	39
9	71	M		2000	3.27	102	1.17	39.6
10	57	F		250	2.56	102	1.18	45.5
11	71	M	2	1500	3.19	96.6	1.26	42.2
12	69	M	10	1200	2.23	71.4	0.54	25.2
13	57	M	5	780	2.37	66.5	0.94	43.9
Mean	65.8			938.5	2.6	80.8	0.96	38.8
SD	6.2			620.1	0.7	20.1	0.24	7.2
Control subjects(Control)								
1	53	M		0				
2	65	M	30	200				
3	67	F		0				
4	61	F	12	900				
5	66	F		0				
6	43	M		690				
7	61	M		1000				
8	65	M		900				
Mean	60.1			461				
SD	8.2			452.6				

Abbreviation ; CPE=Chronic pulmonary emphysema, Ex(+)=Ex-smoker, VC=Vital capacity, FEV₁₀=Forced expiratory volume at one second, M=male, F=female. Results are expressed as mean±SD.

人, Ex-smoker 2人, Non-smoker 3人から成っていた。採血の12時間以上前より吸入を含む薬剤を一切中止し, また喫煙も同様に中止してもらった。

尚, 本研究に際しては, 各患者に本研究のプロトコルを示し, 同意を得て行った。

2. 方法

A. PMN遊走能, O₂⁻産生能の検討

(1) PMNの分離方法

ヘパリン加採血した静脈血をモノ・ポリ分離溶液 (Mono-Poly Resolving Medium, Flow Laboratories, Australia) に重層し, 室温で300gにて遠心を行い, PMNを分離した後, PMNをRPMI1640培養液 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) またはハンクス液 (HBSS, Sigma) に浮遊させた。本研究では, 顕微鏡にて95%以上のPMNからなり, トリパ

ンブルー染色により95%以上の生存を確認したものを実験に用いた。

(2) PMN遊走能の測定

Burnettらの方法に従い, Modified Boyden chamberにてPMN遊走能を測定した⁽⁸⁾。下室のchamberに非特異的遊走刺激物質としてformylmethionyl leucyl phenylalanine (以下FMLP, Sigma) の10⁻⁸ M, 0.2mlを加えた。上室と下室の間にpore size 2.0 μmのフィルター (Nucleopore, Pleasanton, Calif., U.S.A.) をおき, 5%CO₂, 37°Cにて90分間培養後, 取り出したフィルターにメイ・ギムザ染色を行なった上で, 顕微鏡下400倍にてフィルターの下面に到達したPMNを計測した。測定は5視野を計測し, 1mm²あたりのPMN数として算出した。無目的自動運動の影響をなくすために, 同時にFMLPのかわりに対照と

してRPMI 1640培養液0.2mlを下室に加えたものを用い、その時のフィルター下面に認められたPMNを計測することによりFMLPによるPMNの遊走能を測定した⁽⁶⁾。

(3) PMN活性酸素 (O_2^-) 産生能の測定

O_2^- 産生能はチトクロームC還元法を用いて測定した⁽⁷⁾。PMNをハンクス液にて 1×10^6 /mlに調整し、その0.5mlにチトクロームC (5 mg/ml) 0.2ml及びFMLP (5×10^{-4} M) 0.2mlを加え、さらにSOD (300 μ g/ml) 0.1mlまたはハンクス液0.1mlを混和した。15分間37°Cで振とうした後、氷冷で反応を停止させ、4°C 3000rpm 10分遠心後、得られた上清の550nmでの吸光度を測定した。SODの混和の有無による吸光度の差をPMNの O_2^- 産生能とした。

B. RBC-SOD活性の測定

末梢血よりRBCを分離し、生理食塩水で洗浄後、0.1mlをとり蒸留水で溶血させた。RBC溶血後エタノール1ml、クロロホルム0.6mlを加え室温で15分間振とうした。振とう後2500rpm、10分間遠心し(Tuschihashi's method)、得られた上清をニトロブルーテトラゾリウム還元法(NBT還元法、SODテストワコー)を用い560nmの吸光度を測定しSOD活性を求めた⁽¹⁰⁾。RBC 10^4 個あたりのSOD活性で評価した。

統 計

成績は、平均値 \pm SD (Standard deviation of mean) で表した。検定は、unpaired t-testを用い、p値が0.05以下の場合に有意差ありとした。

結 果

①PMN遊走能の測定

FMLP 10^{-8} Mを遊走刺激物質としたときのPMN遊走能はFig. 1に示すようにCPE群 (363 ± 243 PMNs/ mm^2) では、コントロール群 (113 ± 91) に比べて、有意な遊走能の亢進が認められた ($p < 0.05$)。

②PMN- O_2^- 産生能の測定

FMLP 5×10^{-4} Mを刺激物質としたときのPMNの O_2^- 産生能は、Fig. 2にみられるようにCPE群 (28.8 ± 18.9 nmol/15min/ 10^6 PMNs) コントロール群 (8.2 ± 10.1) の両群間に有意差は認められなかった。

③RBC-SOD活性の測定

Fig. 3はRBC 10^4 個当りのRBC-SOD活性を示しているが、CPE群で 1.82 ± 0.22 U/ 10^4 RBC、またコントロール群で 3.12 ± 0.85 U/ 10^4 RBCとCPE群

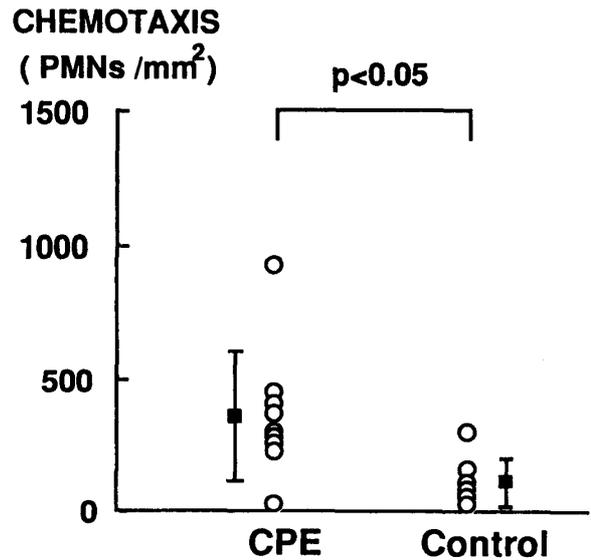


Fig1. Chemotactic response of PMNs to FMLP in CPE group (n=9) and control group (n=7).

The cell number of migrated PMNs was counted after FMLP stimulation, and is expressed as PMN/ mm^2 .

PMNs' chemotaxis in CPE group showed more enhanced activity than that in control group.

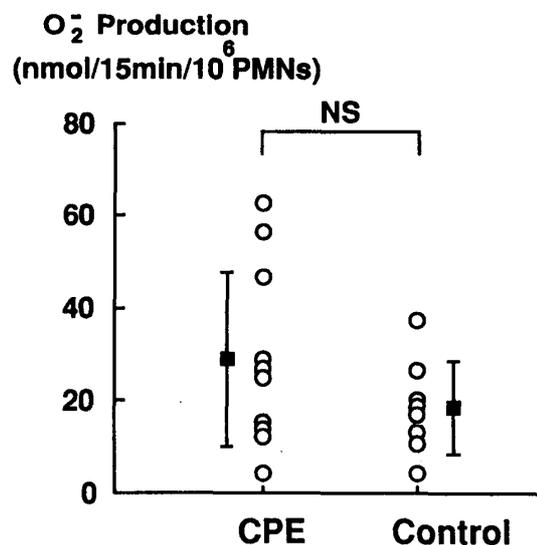


Fig2. Superoxide anion (O_2^-) production of PMNs in CPE group (n=11) and control group (n=8) after stimulation with FMLP. O_2^- production was quantitated by measuring the superoxide dismutase inhibitable reduction of cytochrome c for 10^6 PMNs and expressed as nmol cytochrome c reduced in 15min.

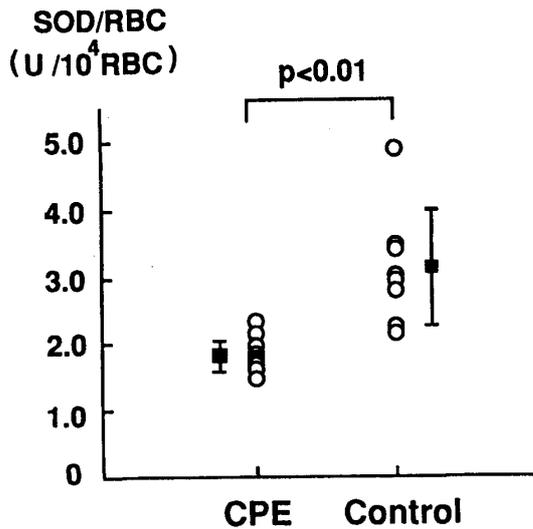


Fig3. The SOD activity of erythrocytes in CPE group (n=13) and control group (n=8).

The mean value of SOD/RBC was significantly lower in CPE group ($p < 0.01$).

が有意に低値を示した ($p < 0.01$)。SOD活性は1秒量や拡散能などの肺機能諸指標との相関は認めなかった。

考 察

CPE発生の重要な危険因子の一つに喫煙がある。剖検肺の検討において、喫煙量の増加は肉眼的及び組織学的な肺胞破壊の程度を増す⁽¹⁾。また、モルモットに12ヶ月間の慢性喫煙させると、病理学的にCPE発症が認められる⁽¹¹⁾。現在、喫煙によるCPEの成因には、AM、PMN、多くの化学遊離物質、エラスターゼ、アンチプロテアーゼ、内因性あるいは外因性オキシダント、アンチオキシダント及びエラスチンを代表とする結合織の間での複雑な相互関係が成り立っているが、特にプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ バランスの不均衡がCPE発症に強く関係していると考えられている⁽¹²⁾。

今回の結果は、FMLPという非特異的の化学遊走物質ではあるが、CPE患者のPMN遊走能はコントロール群に比し有意に亢進していた。喫煙者の肺胞内には多くのAMが存在し、活性化されていることが、近年の気管支肺胞洗浄液（以下BALF）における細胞成分の分析から明らかにされており、また、これらのAMは、C5a, LTB₄, IL-8などのPMN遊走因子を放出している。喫煙により血液中のPMNは、肺循環での通過時間が遅れ肺内で停滞することが示されていることより⁽¹³⁾、多くのPMNが容易に肺血管系より間質へ遊走することが考えられる。タバコ煙自体には

多くのオキシダントが含まれており⁽¹⁾⁽⁵⁾、また喫煙により肺へ移行集積してきたPMNをはじめとする炎症細胞もオキシダントを産生する。

このような炎症細胞浸潤によるオキシダント負荷の増加は、 α 1-Protease Inhibitor（以下 α 1-PI）の不活化をおこし、結果としてプロテアーゼ負荷の増加をもたらすことになる。

タバコ煙の直接的要因だけでなく、喫煙者のPMNはオキシダントの1つであるO₂⁻産生能が亢進しており⁽¹⁴⁾、ニコチンやタバコ煙に曝露されたラットのPMNにおいても、O₂⁻産生の亢進が報告されている⁽¹⁵⁾。Abboundらは喫煙後にBALF中の α 1-PIが不活化される時間経過をみると、AMがオキシダントを産生する時間経過と類似していたことより⁽¹⁶⁾、AMも積極的にオキシダント産生に関与していることを明らかにしている。今回のCPE群のPMNのO₂⁻産生能を検討した結果では、コントロール群と比較し軽度亢進していたのみで、有意差を認めるほどではなかった。しかし、前述したように、CPE患者にはPMN遊走能の亢進が認められており、また多くの研究者はBALFでPMNの実数の増加を認めており、肺全体としては個々の細胞のO₂⁻産生能が著増していなくても肺組織全体としてO₂⁻が増加し、過大なオキシダント負荷がかかっていると考えられる。

一方、過大なオキシダント負荷に対してはアンチオキシダントが生体の防御因子として機能しており、COPD患者において血漿中のアンチオキシダント活性と1秒率の異常とは密な関係があることはすでに認められている⁽¹⁷⁾。今回RBC-SODについて検討したところ、CPE群では有意にコントロール群に比し低値であった。アンチオキシダント活性は過大なオキシダント負荷に伴い、その活性が誘導されることはすでに報告されている⁽¹⁸⁻²¹⁾。In vitroの系ではあるが、パラコートでPMN-SODの誘導をもたらされた人は長命であることが認められている⁽¹⁸⁾、また、in vivoの系でも高濃度酸素曝露の際には、ラット肺組織中のアンチオキシダントとしてのCuZn-SOD、Mn-SOD活性が誘導されたという報告⁽¹⁹⁾や、humanやハムスターのAMのSOD活性亢進が喫煙によって誘導されているという報告がみられる⁽²⁰⁾。さらに、PMNやAMのみでなく、RBC内のグルタチオン、カタラーゼが喫煙者で上昇していたとの報告もある⁽²¹⁾。

今回の研究でCPE群のRBC内のSOD活性の低下が認められたことは、CPE患者におけるアンチオキシダントの異常が生じていることを示唆している。この異常のメカニズムについては、喫煙量の増加に伴って起こるはずのRBC-SODの誘導、上昇が、CPE患者

では喫煙量の増加に伴うオキシダント負荷の増大に見合う程には十分に引き起こされないために、オキシダント・アンチオキシダント バランスの負の不均衡が生じた可能性が考えられる。すなわち、喫煙によりオキシダント・アンチオキシダントの負のバランスが大きくなり、肺泡破壊が進行する人がCPEになるのではないかと推測される。しかし、今後、喫煙者でありながら、CPEになっていない健常喫煙者についても検討を加え、オキシダント・アンチオキシダントのバランスの異常のCPE形成への関与を明らかにする必要がある。

以上、CPEの発症には、プロテアーゼ負荷の増大と共に、オキシダント負荷の増大、アンチオキシダントの低下によるアンチプロテアーゼの低下という攻撃因子と防御因子の両者の不均衡の増大が関連していると考えられた。喫煙者の10~15%にCPEが生じると推定されているが⁽²²⁾、今後は、どのような喫煙者にCPEが生じるのかというsusceptibilityの問題についてさらなる詳細な検討が必要である。

結 語

CPEの病態形成にプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ バランスの不均衡及び、オキシダント・アンチオキシダント バランスの不均衡という2つの不均衡が大きく関わっていると考えられ、攻撃因子としての末梢血のPMNの遊走能、 O_2^- 産生能、また防御因子としてRBC-SOD活性について検討した。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御校閲賜りました神戸大学第一内科横山光宏教授に深く感謝致します。

研究当初より御指導、御助言下さいました神戸大学第一内科前田均助手、また本研究に御協力下さいました神戸大学第一内科の諸先生方に深く感謝致します。

参考文献

- (1) Niewoehner, D. E. and McGowan, S.E.: Cigarette smoking and the development of chronic airflow obstruction. *Current Pulmonology*, 7 : 23-71, 1986.
- (2) Jason D. M., Balz F., Atkinson W. L., J. Michael G., Sean M. L., Yu Shyr., William E. S., John A. O. and L. Jackson Roberts.: Increase in circulating products of lipid

- peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. smoking as a cause of oxidative damage. *N. Engl. J. Med.* 332: 1198-1203, 1995.
- (3) Sibille, Y. and Reynolds, H. Y.: Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defence and injury (state of the art). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141 : 471-501, 1990.
- (4) Mark, D. E., and William, A. P.: Cigarette smoking, emphysema, and damage to α 1-proteinase inhibitor. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol Physiol)* 10 : L593-611, 1994.
- (5) Cantin, A. and Crystal, R. G.: Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. *Eur. J. Respir. Dis.*, 66 (supple, 139):7-17, 1985.
- (6) Van Asbeck, S., Hoidal, J., Schwartz, B., Vercelletti, G. M., Moldoe, C. F. and Jacob, H. S.: Protection against lethal hyperoxide by tracheal insufflation of erythrocytes: Role of red cell glutathione. *Science*, 227 : 756-759, 1985.
- (7) Managione, S., Kueppers, F., Puglia, C. and Greenspon, L. W.: Erythrocytes prevent inactivation of alpha-1 antitrypsin by cigarette smoke. *Eur. Respir. J.*, 4 : 26-30, 1991.
- (8) Burnett, D., Chamba, A., Hill, S. L. and Stockley, R. A.: Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet*, 7 : 1043-1046, 1987.
- (9) 諏訪部 章, 八鍬 直, 中村 秀範, 加藤 修一, 長内 和弘, 池田 英樹, 佐藤 忍, 高橋 敬治, 安井 昭二: いわゆる“びまん性汎細気管支炎”に対するエリスロマイシンの少量長期投与療法—投与前後の末梢血白血球の検討—*日胸疾会誌*, 26 : 1284-1290, 1988.
- (10) Oyanagi, Y.: Establishment of nitrite-kit for SOD activity determination. *炎症*, 4 : 63-73, 1984.
- (11) Wright, J. L. and Churg, A.: Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 142 : 1422-1428, 1990.
- (12) Janoff, A.: Elastase and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease

- hypothesis (state of the art). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132 : 417–433, 1985.
- 13 MacNee, W., Wiggs, B., Belzberg, A. S. and Hogg, J. G.: The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N. Engl. J. Med.*, 321 : 924–928, 1989.
- 14 Ludwig, P. W. and Hoidal, J. R.: Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 126 : 977–980, 1982.
- 15 Gillespie, M. N., Owasoyo, J. O., Kojima, S. and Jay, M.: Enhanced chemotaxis and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes from nicotine-treated and smoke-exposed rats. *Toxicology*, 45 : 45–52, 1987.
- 16 Abboud, R. T., Fera, T., Richter, A., Tabora, M. Z. and Johal, S.: Active effect of smoking on the functional activity of alpha 1-proteinase inhibitor in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 131 : 79–85, 1985.
- 17 Taylor, J. C., Madison, R. and Kobinska, D.: Is antioxidant deficiency related to chronic obstructive pulmonary disease? *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134 : 285–289, 1986.
- 18 Niwa, Y., Ishimoto, K. and Kanoh, T.: Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood*, 76 : 835–841, 1990.
- 19 Crapo, J. D. and Donald, F. T.: Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.*, 226 : 1401–1407, 1974.
- 20 Kevin, M. and John, H.: Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141 : 678–682, 1990.
- 21 Toth, K. M., Berger, E. M., Beehler, C. L. and Repine, J. E.: Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134 : 281–284, 1986.
- 22 Fletcher, C. M. and Peto, R.: The natural history of chronic airflow obstruction. *Brit. Med. J.*, 1 : 1645–1648, 1977.

Relation between Chemotactic Activity and Superoxide Anion Generation of Polymorphonuclear Neutrophils, and Activity of Erythrocyte Superoxide Dismutase in Patients with Chronic Pulmonary Emphysema

Hirofumi Nakamura

First Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine

Summary

The current hypothesis on the pathogenesis of chronic pulmonary emphysema (CPE) is that it results from proteolytic lung injury caused by an imbalance between protease and antiprotease in the lung. Oxidants also play an important role on the inactivation of antiprotease. To evaluate the relations between oxidants and antioxidants on the pathogenesis of CPE, we measured the level of FMLP-stimulated superoxide anion (O_2^-) produced by polymorphonuclear neutrophils (PMNs), PMNs' chemotaxis for FMLP, and erythrocyte superoxide dismutase (SOD) in 13 patients with CPE (CPE group, mean age 65.8 y.o.), and 8 control subjects (Control group, mean age 60.1 y.o.). The chemotactic activity of PMNs obtained from CPE group was significantly more activated than that of control group ($p < 0.05$). There was no significant difference in the O_2^- production by PMNs between CPE and control groups, although PMNs' FMLP-stimulated chemotaxis was more enhanced in CPE group (363 ± 243 PMNs/ mm^2) than in control group (113 ± 91 PMNs/ mm^2) ($p < 0.05$). SOD activity of erythrocytes was lower in CPE group than that in control group ($p < 0.01$).

We conclude that the disproportionate state between enhanced activity of oxidants and the decreased activity of antioxidants plays an important role for the pathogenesis of CPE in smokers.