

リンパ球酸化ストレス測定 of 臨床的有用性の検討

石井俊徳

熊本大学医療技術短期大学部

Clinical usefulness of lymphocyte oxidative stress measurement

Toshinori Ishii

Department of Medical Technology, College of Medical Science,
Kumamoto University

Abstract : The clinical usefulness of measuring lymphocyte oxidative stress (LOS) was evaluated by measuring LOS of 21 patients with systemic lupus erythematosus (SLE). The LOS of SLE patients in active state were significantly higher than those of SLE patients in inactive state and LOS significantly correlated with the disease activity score of SLE patients.

Complication of lupus nephritis also was a factor elevating LOS. In cases without nephritis but with high LOS values nephritis developed at a high rate in the following 5 years. Plasma concentrations of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) in SLE patients were all significantly higher than ones in healthy persons. These three inflammatory cytokines significantly raised LOS when they were added to lymphocytes of healthy persons in in vitro incubation. These results reveal that LOS measurement should be useful as clinical data in the case of diseases with hypercytokinemia like SLE.

Key words : SLE, Lymphocyte, Cytokine, ROS, Clinical examination

はじめに

1991年全身性炎症反応症候群(SIRS)という新しい概念が提唱され¹⁾、この病態の本質が高サイトカイン血症であることから、炎症とサイトカインの関係が注目を集めている。炎症の原因は細菌感染、外傷、自己免疫など多種多様であるが、その病態の形成にサイトカインが重要な役割を演じている点では共通しているので、サイトカインの測定による炎症病態の鑑別²⁾、抗サイトカイン剤による治療³⁾などが試みられている。

サイトカインは細胞に作用して最終的に増殖、アポトーシスなどの変化を引き起こすが、その過程で活性酸素(ROS)が産生されセカンドメッセン

ジャーとして働いている⁴⁾。ただしROS産生を抑制するように作用するサイトカイン⁵⁾もある。血球は当然血漿中のサイトカインの影響を受けるので、血球のROSの産生状態は種々のサイトカインが作用した総合的な結果を表していることになる。また間接的に炎症巣のサイトカインの状態を反映している可能性もある。したがって血球のROS産生の測定は、炎症の臨床検査となりうると考えられる。

自己免疫疾患の場合、リンパ球およびサイトカインがその発症に大きく関与しているので、末梢血リンパ球のROS測定は臓器障害の有無、程度、疾患の活動性の把握に役立つのではないかと考えられる。ここでは代表的自己免疫疾患であり炎症

性疾患でもあるSLEをとりあげ、その疾患活動性や臓器障害とくに腎障害についてROSとの関連性を検討した。

対 象

アメリカリウマチ協会のSLE分類基準⁶⁾をみたした21名のSLE患者(男性1名、女性20名、年齢 41.7 ± 10.5 歳)と、対照として健常人17名(男性3名、女性14名、年齢 31.2 ± 17.0 歳)を測定した。

腎病変については、6ヵ月以上にわたって尿蛋白1+以上が持続する症例をループス腎炎ありと判定した。

試 薬

ROS測定時の細胞刺激剤として、3種類のサイトカインInterleukine-1 β (IL-1 β :Endogen, Cambridge,MA,USA)、Tumor necrosis factor- α (TNF- α : Genzyme, Cambridge,MA,USA)、Interferon- γ (IFN- γ : Genzyme)を用いた。IL-1 β は100ng/mlの濃度で、TNF- α は 2×10^5 u/mlの濃度で、IFN- γ は 1×10^5 u/mlの濃度でそれぞれ細胞浮遊液100 μ l当たり10 μ l使用した。

抗サイトカイン抗体として抗IL-1 β 抗体(Genzyme)、抗TNF- α 抗体(Serotec,Oxford,UK)、抗IFN- γ 抗体(Endogen)、を用いた。各抗体の使用量は製品に添付のマニュアルに従った。

方 法

1. リンパ球の分離

ヘパリン入り真空採血管に静脈血10mlを採血し、リン酸緩衝食塩液(PBS, pH 7.4)に50mg/mlの濃度に懸濁させたCarbonyl iron(半井化学, 京都)を血液に1/10量加え、37 $^{\circ}$ C 60分間10分毎に転倒攪拌しながら孵置した。次に同量のLymphocyte Separation Medium(ICN Biomedicals,

Ohio,USA)に重層し、室温で2,500rpm 30分遠沈後中間層をリンパ球分画として採取した。リンパ球はPBSに浮遊させ 2×10^6 /mlの濃度に調整した。単球の混入率は単球特異的な抗CD14抗体を用いてFlow cytometry(FCM)法で測定すると、1.8~2.6%であった。

2. 生細胞数のカウント

分離した白血球の数の算定は、0.5%トリパンブルーPBS溶液に浮遊し、ピュルケル-チュルク血球計算盤に入れ顕微鏡下で行った。なお細胞の生存率は、ほぼ100%であった。

3. ROS測定

Bass等のFCMによる方法⁷⁾を修正した方法で測定した。細胞浮遊液100 μ lに刺激剤を加え恒温槽で37 $^{\circ}$ C 15分反応させ、carboxy 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (cDCFH-DA, Lambda, Austria, 20 μ M)500 μ lを加えてさらに30分反応させた。試薬を洗浄除去後、細胞内の過酸化水素とエステラーゼの作用でcDCFH-DAから変化したcDCFの緑色蛍光をFCMで測定し、その平均蛍光強度(MFI)をROSの相対的な量とした。ネガティブコントロールとして5(6)carboxyfluorescein diacetate(CFH-DA, Lambda, Austria, 20 μ M)を用いCFの非特異的蛍光をcDCFから差し引いた。

なおROS産生量と細胞内ROS量は等しくないため、この論文ではROS産生量と区別するためにリンパ球の細胞内ROS量に対してリンパ球酸化ストレス(LOS)という表現を用いている。

4. 血漿サイトカイン濃度の測定

血漿サイトカイン濃度は市販のEIAアッセイキットを用いて、サンドイッチ法によるenzyme linked immunosorbent assay(ELISA)で測定した。IL-1 β とIFN- γ はMedgenix Diagnostics社(Brussels,Belgium)のキットを、またTNF- α はT Cell Science社(Cambridge,MA,USA)のキットを用いた。測定法は各キットのマニュアルに従った。

5. SLE活動性の評価法

ハーバード大学の評価法Systemic Lupus Activity Measure (SLAM)⁸⁾を用いた。SLAMは24の臨床症状と8の検査データ項目よりなり、各項目はその異常の程度が点数化されている。総スコアが8以上の症例が活動性で、7以下の症例は非活動性と判定される。

6. 統計解析

測定データの平均値の有意差の検定や相関性の有意検定は、統計解析ソフトJMP (SAS Institute, Cary, USA) で行った。

結果

1. 炎症性サイトカインによるLOSの刺激効果

炎症性サイトカイン刺激によるLOSの変化をIL-1β、TNF-α、IFN-γについて調べてみた。健常人リンパ球にサイトカインを加え30分刺激すると、非刺激LOSは43.9±1.6なのに対し、IL-1βでは67.2±1.8、TNF-αが67.8±2.4、IFN-γが65.5±3.3といずれも有意の増加がみられた。次に高サイトカイン血症 (TNF-α 184 pg/ml, IFN-γ 4.4 IU/ml, IL-1β 39.4 pg/ml) がみられるSLEの血清で刺激してみると (図1)、正常血清の場合のLOSが40.8±3.1なのに対し、SLE血清で50.3±0.8と有意に亢進していた。しかしSLE血清に

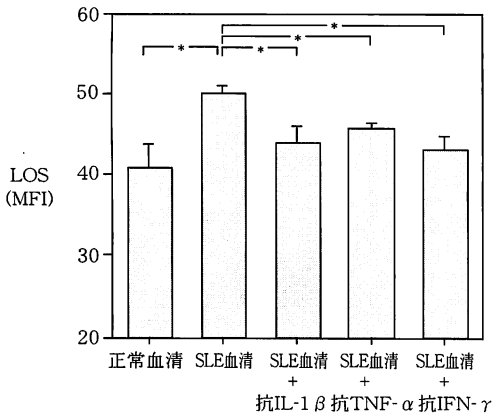


図1 SLE血清と抗サイトカインのLOSに対する影響 Student t-test: *p<0.05

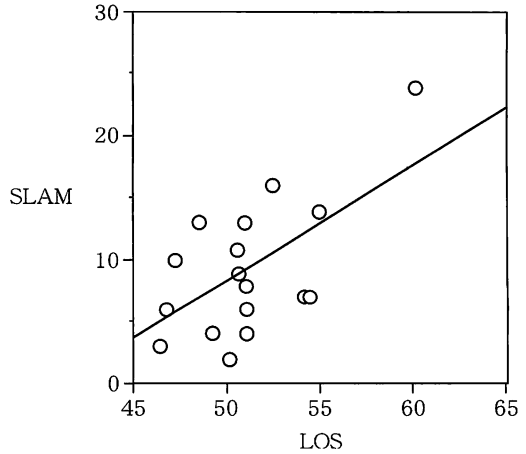


図2 SLAMとLOSの相関関係 分散分析: r=0.627, p<0.05

抗サイトカイン抗体を加えてみると、抗IL-1β抗体では44.0±2.1、抗TNF-α抗体では45.9±0.6、抗IFN-γ抗体では43.3±1.5となり、SLE血清によるLOSの亢進効果はかなり減弱した。したがって炎症性サイトカインがリンパ球に作用してLOSを高めることは明らかである。

2. SLEの活動性指数とLOS (図2)

SLEの病態にはサイトカインが深く関与している⁹⁾ので、SLEの疾患活動性がLOSに反映されている可能性がある。そこで疾患活動性指数SLAMによりSLEを活動性SLEと非活動性SLEに分類し、LOSを測定してみた。活動性SLE 8例のLOSが62.8±19.3に対し、非活動性SLE 12例が47.9±16.0、健常人14名が37.8±13.4となり、明らかに活動性SLEのLOSが高くなっていた。しかし各グループの標準偏差がかなり大きく、またSLAMの評価項目にはLOSに影響を与えないものもあるので、直接SLE症例のSLAMとLOSの相関性を調べてみた (図2)。その結果、相関係数0.627と有意の相関がみられ、LOSがSLEの活動性の評価に役立つ可能性があることが示された。

3. SLEの腎障害と血漿サイトカイン

SLEは多彩な臓器障害を来すが、なかでもルー

プス腎炎は代表的な臓器障害であり、サイトカインの関与が強く示唆されている¹⁰⁾。そこで炎症性サイトカインのなかで、TNF- α とIFN- γ について血漿中の濃度と腎炎との関係を調べてみた。血漿TNF- α は腎炎群が 168.3 ± 94.1 pg/ml、非腎炎群が 73.7 ± 77.1 pg/ml、健常人が 11.0 ± 14.6 pg/mlとなり、SLEで高値を示しSLEの中でも腎炎群はさらに高値であった。IFN- γ でも腎炎群が 5.4 ± 1.4 Iu/ml、非腎炎群が 4.2 ± 0.9 Iu/ml、健常人が 3.5 ± 0.3 Iu/mlとなり、やはり腎炎で高値であった。この結果は炎症性サイトカインがループス腎炎の発症と密接な関係にあることを示唆している。

4. ループス腎炎とLOS

図3はSLEをループス腎炎の有無で2群に分け、そのLOSを比較したものである。腎炎群のLOSは 62.0 ± 18.0 、非腎炎群のLOSは 39.0 ± 19.0 となり、やはり腎炎群のLOSが有意に高かった。しかし非腎炎群でもLOSが高値の症例もあり、このような症例はその後の経過で腎炎を発症してくる可能性が推測される。

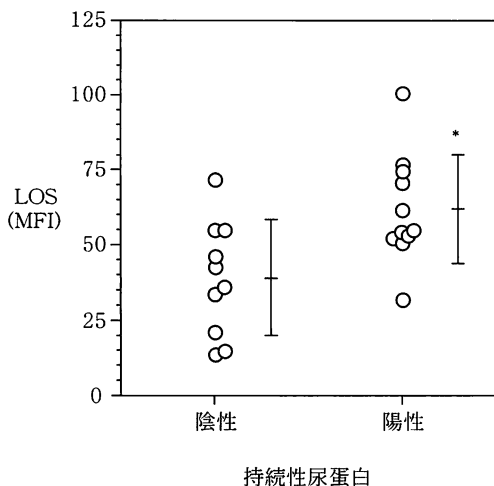


図3 ループス腎炎とLOS
Student t-test: * $p < 0.05$

5. LOSによる腎炎発症の予測 (図4)

LOS測定時にループス腎炎を発症していないSLEを、LOSが40以下の低値群と40を超える高値群に分け、LOS測定後の5年間の腎炎発症率を比較してみた。その結果低値群の腎炎発症率が7例中1例(14.3%)であったのに対し、高値群では3例中2例(66.7%)と高率に腎炎を発症していた。したがってループス腎炎を発症してなくても、LOSが高値であれば将来腎炎を起こす可能性が高いと考えられ、注意深く経過観察を行うことや場合によっては腎炎の予防的治療も考慮する必要があると思われる。

考 察

ヒト細胞は産生機序は異なるにしても、全てが大なり小なりROSを産生している。このROSは細胞にとって有益な場合もあるが障害をもたらすこともある。そのため細胞はROS消去酵素をはじめ種々の抗酸化物質による防御機構を備えており、ROSの消去を行っている。したがってROSの産生量を正確に測定することは難しく、実際はROS産生量から抗酸化物質による消去量を引いた分(これを酸化ストレスと表す)を測定してい

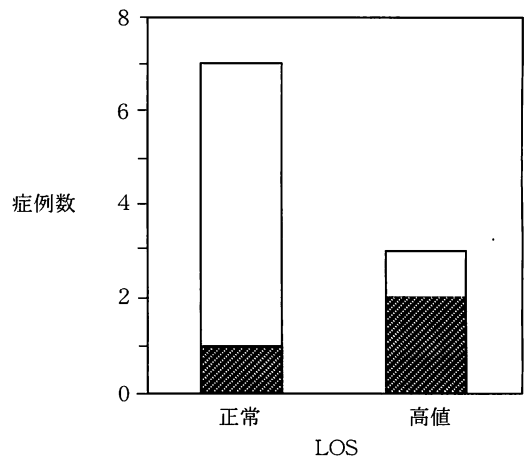


図4 腎炎非発症SLEのLOSとその後の腎炎発症との関係

■ 腎炎, □ 非腎炎

る。以上の理由からここではROSではなく酸化ストレスという表現を用いている。

酸化ストレスの増大はROS量の増大、抗酸化物質の減少のいずれかあるいは両方によって生じるが、疾患においてはROS産生量の増大が主な原因である。リンパ球のROS産生を亢進させる因子としては、抗原、細胞接着分子、サイトカインによる刺激があげられる。しかし抗原による特異的刺激をうけるリンパ球の全リンパ球に占める割合は非常に低く、また細胞接着分子を介する刺激を受けたリンパ球は血管壁に局在するか血管外に遊走している。他方、サイトカイン特に炎症性サイトカインに対するレセプターはリンパ球に広く存在しているので、静脈血リンパ球のROSは炎症性サイトカインによる刺激の影響が極めて大きいと考えられる。

SLEにおけるサイトカインに関しては、Interleukin(IL)-2産生¹¹⁾やIL-2 receptor発現¹²⁾の低下、IFN- γ ⁹⁾の産生亢進という報告が大勢を占めている。SLEではTh1/Th2リンパ球バランスがTh2優位なので¹³⁾、産生されるサイトカインもtype 1 サイトカイン (IFN- γ 、IL-12)に対して type 2 サイトカイン (IL-4、IL-10)が優位と考えるのが当然であるが、血漿中の濃度に関しては必ずしもこの考えに一致していない。炎症性サイトカインTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β の血漿濃度については、TNF- α ^{14)、15)}とIFN- γ ¹⁶⁾は増加しているという報告が多い。私の測定結果でもTNF- α 、IFN- γ ともに有意の増加がみられた。しかしIL-1 β は産生低下の報告^{11)、17)}は多数あるが、血漿中の濃度に関する報告は少なく、増加しているという報告¹⁸⁾もあるがはっきりしていない。私もIL-1 β の血漿濃度を測定してみたが(未発表)、有意の増加も低下もみられなかった。

炎症性サイトカインのROS産生に対する効果については、IFN- γ は血管内皮細胞を対象として調べた報告¹⁹⁾、TNF- α とIL-1 β は軟骨細胞を対象として調べた報告²⁰⁾があり、いずれも産生を亢進させている。リンパ球もこれらのサイトカイン

に対するレセプターを有しているので同様の結果が予想されたが、私の研究結果はそれを裏付けるものであった。

血漿サイトカインによるSLEの疾患活動性の評価については、Aringerら²¹⁾がTNF- α との相関性を、Miretら²²⁾はIL-10との相関性を、さらにKimら¹⁶⁾はIFN- α と疾患活動性に相関性があることを報告している。またIL-6、IL-10、TNF- α に加えて顆粒球のROSもSLEの活動性と相関があるとの報告²³⁾もあるが、これを否定する報告²⁴⁾もある。サイトカインとループス腎炎との関係についてもTNF- α ¹⁴⁾、IL-1 β ¹⁸⁾、IL-6^{18)、25)}、IFN- γ ^{10)、18)、25)}の関わりを示唆する報告と否定する報告¹⁶⁾がある。LOSは複数のサイトカイン刺激によって生じるものと考えられるので、LOSがSLEの活動性やループス腎炎と関係があるという結果は、サイトカインとSLE活動性やループス腎炎との関係を肯定するものと考えられる。LOSは病巣部リンパ球のサイトカインによる刺激状態を末梢血リンパ球の酸化ストレス状態でシミュレートしているとも出来る。

LOSには疾患特異性がないので、診断に直接役立つような検査ではない。しかし疾患の活動性悪化や臓器障害の発現の早期把握(例えば腎炎の尿蛋白よりも早く、ウイルス感染でいえばウィンドウピリオッド)にはかなり有用ではないかと考えられる。LOSと将来のループス腎炎発症率の関係について調べた結果がこの可能性を示唆している。また生体に負担がかかるような検査(例えばCNSループスのCSF検査)の代用として有用かもしれない。

酸化ストレスの測定はリンパ球でなくても、他の血球(好中球や単球)でよいのではないかと考えられるが、自己免疫性疾患のようなリンパ球が発症機序に主役を果たしている疾患の場合、リンパ球に作用するサイトカインが重要な役割を担っている可能性が高いのでリンパ球を測定したほうがよいと思われる。ただしフローサイトメトリーではリンパ球、単球、顆粒球の同時測定も可能な

ので、この3種類の血球の酸化ストレスを測定すれば対象疾患の拡大や判定精度の向上が期待できる。

LOSと同じく炎症性疾患の非特異的検査としては、赤血球沈降速度 (ESR)やC reactive protein (CRP)がある。ESRは非常に簡便な検査であるが、非炎症的因子 (貧血、血漿アルブミン減少など)の影響があるし、CRPは非常に感度に優れた検査であるが、SLEなど一部の炎症性疾患では炎症と関連しないなどの問題がある。他方LOSにも現時点では測定の簡便や感度に問題があるが、CRPやESRとは質的に異なる炎症検査となる可能性を秘めている。

おわりに

LOS測定が臨床検査として認められるには、簡便性、再現性、定量化など技術的な面の改善とともに、種々の疾患における測定意義の確立が必要であり、今後これらの問題点の解決に努力して行きたい。

要 旨

リンパ球酸化ストレス(LOS)測定の臨床検査としての有用性を全身性エリテマトーデス (SLE)で検討した。活動性SLEのLOSは非活動性SLEのLOSより有意に高く、LOSと疾患活動性指数との間には正の相関がみられた。ループス腎炎を合併するSLEでは非腎炎SLEよりもLOSが高かった。しかし非腎炎であってもLOSが高い症例ではLOSが低い症例よりもその後の経過で腎炎を合併する率が高かった。SLE血漿中のinterleukin-1 β (IL-1 β)、tumor necrosis factor α (TNF- α)およびinterferon- γ (IFN- γ)濃度は健常人血漿と比較して有意に高くなっていた。またIL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ のいずれも健常人のLOSを高めた。これらの結果はLOSがSLEにおける臨床検査としての有用性を示しているが、それに止まらず

広く高サイトカイン血症を来す疾患で臨床検査として役立つ可能性も示唆している。

文 献

1. Anonymous : American College of Chest physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference:Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit.Care Med. 20:864-874,1992.
2. Oberhoffer,M., et al. : Discriminative power of inflammatory markers for prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or sepsis at arbitrary time points. Intensive Care Med. 26:S170-S174,2000.
3. Feldman,M., et al. : Anti-TNF α therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? Annu. Rev. Immunol. 19:163-196,2001.
4. Lo,Y.Y.C., et al. : Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-jun NH₂-terminal kinases. J.Biol.Chem. 271: 15703-15707,1996.
5. Dokka,S., et al. : Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. Am.J.Physiol.Lung Cell. Molecul.Physiol. 280:L1196-L1202,2001.
6. Tan,E.M. et al. : The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 25:1271-1277,1982.
7. Bass,D.A., et al. : Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils. J.Immunol. 130:1910-1917, 1983.
8. Liang,M.H., et al. : Reliability and

- validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 32:1107-1118,1989.
9. Friedman,R.M., et al. : Interferon production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:802-803,1982.
 10. Uhm,W.S., et al. : Cytokine balance in kidney tissue from lupus nephritis patients. *Rheumatol.* 42:935-938,2003.
 11. Linker-Israeli,M., et al. : Defective production of interleukin-1 and interleukin-2 in patients with systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 130:2651-2655,1983.
 12. Ishida,H., et al. : Impaired expression of high affinity interleukin 2 receptor on activated lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 139:1070-1074,1987.
 13. Park,Y.D., et al. : Elevated interleukin-10 level correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin.Exp. Rheumatol.* 16:283-288,1998.
 14. Aringer,M., et al. : SLE-Complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.Therapy* 5:172-177,2003.
 15. Svenungsson,E., et al. : TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus* 12:454-461,2003.
 16. Kim,T., et al. : Serum levels of interferons in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin.Exp.Immunol.* 70:562-569,1987.
 17. Anderson,L.S., et al. : Production of IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist and IL-10 by mononuclear cells from patients with SLE. *Autoimmunity* 30:235-242,1999.
 18. Robak,S.T., et al. : Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Przegląd Lekarski* 53:623-626,1996.
 19. Matsubara,T., et al. : Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J.Immunol.* 137:3295-3298,1986.
 20. Tiku,M.L., et al. : Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *J.Immunol.* 145:690-696,1990.
 21. Aringer,M., et al. : Increased bioactive TNF in human systemic lupus erythematosus: association with cell death. *Lupus* 11:102-108,2002.
 22. Miret,C., et al. : Relationship of oncogenes (sFas, Bcl-2) and cytokines (IL-10, alfa-TNF) with the activity of systemic lupus erythematosus. *Anticancer Research* 21:3053-3059,2001.
 23. Robak,E., et al. : Association of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 serum levels with systemic lupus erythematosus activity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 46:375-380,1998.
 24. Grondal,G., et al. : Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin.Exp. Rheum.* 18:565-570,2000.
 25. al-Janadi,M., et al. : Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *J.Clin.Immunol.* 13:58-67,1993.