

好中球スーパーオキサイド産生能 に関する基礎的並びに臨床的研究

第 2 編

急性白血病患者における好中球
スーパーオキサイド産生能に関する研究

岡山大学医学部第2内科（主任：木村郁郎教授）

厚 井 文 一

（昭和56年7月24日受稿）

Key words: superoxide production
neutrophilic granulocyte
acute leukemia

緒 言

急性白血病では Skipper による“total leukemic cell kill”の概念¹⁾が導入されて以来、大幅な生存期間の延長を認めるに至っていることは言うまでもない。しかしその反面、化学療法に基づく正常造血細胞の抑制とそれに起因する重症感染症の発症が、急性白血病的治療上極めて重要な問題として提起されていることも又事実である²⁾³⁾。急性白血病に合併する感染症は、近年 opportunistic infection とし位置づけられているが、その重症かつ難治性である背景とし、宿主防禦機構の破綻及びそれに随伴する諸因子の介在が知られている⁴⁾。宿主防禦機構のうち好中球についてはその量的問題のみならず、貪食及び殺菌作用などその質的問題が極めて重要であることは論をまたない。特に急性白血病の場合、白血病細胞の増多や化学療法による血液毒性としての正常好中球数の著減が重症感染症の発症に密接な関連を有しているが、一方では本症における好中球機能、さらに又抗白血病剤の好中球機能に及ぼす影響など好中球の質的異常の解析も必要であり、“急性白血病的易感染性”の検討はこれら両面からの把握により、より明確になされるものと考えられる。

近年好中球の細胞内殺菌作用における酸素代

謝と活性酸素の産生という一連の生化学的反應の関与が明らかにされつつあるが^{5)~13)}、この事は今後その細胞内殺菌作用が、従来の生物学的・形態学的な貪食殺菌作用からと同時に、生化学的な面から行なわれることの必要性を示すものであろう。すでに著者は本研究第1編において、正常ヒト好中球スーパーオキサイド(O₂⁻)産生に関する基礎的検討を行い、その至適実験条件、宿主因子とくに性別・加齢のO₂⁻産生能に及ぼす影響等を明確にしたが、本編では急性白血病患者の好中球O₂⁻産生能の検討を行い、本症における易感染性の機序解明に対する一助とせんとした。

研究対象及び方法

1) 対象

急性白血病43例(15~69才：平均41才)を対象とした。病型別では急性骨髄性白血病(A-ML)29例、急性リンパ性白血病(ALL)14例であり、病期別にみると未治療例20例、完全寛解維持療法例19例、再発早期例4例である。

2) 好中球分離採取方法

未治療例では次のごとくに行った。すなわち、まずプラスチックシリンジを用い、肘静脈より15~20mlヘパリン加採血し、さらに6%デキストラン生食水を5:1容の割合に加えて混じ室

温に静置する。約30分後に得られたバフィーコートに3mlのFicol-Hypaque mixture (9% Ficol 24容+32.8%メトリゾ酸ナトリウム10容)を入れたシリコン処理ガラス試験管2~3本に重層して分注し、500G 4℃で30分間遠沈後上層を捨て、赤血球と好中球に富む沈層を採取する。これに5mlの氷冷蒸留水を加えて pipetingしつつ60秒間の低張処理にて赤血球を溶血後、さらに1.8%食塩水を加えて等張に戻す。その後150G 4℃で10分間遠沈後上清を捨て、Krebs Ringer Phosphate Buffer (KRP・pH7.4) 3mlを加えて好中球を洗浄する操作を2回行った後、KRP 0.5~1ml加えて好中球浮遊液を作成し、細胞数を計算した後測定まで氷冷中にて保存した。なお完全寛解維持期及び再発早期期の白血球浮遊液作成方法は第1編で述べた方法と同様に行った。

3) O₂⁻測定方法

第1編と同様の方法で測定したが、好中球浮遊液の場合、細胞濃度は 0.1×10^6 コ/mlとして反応させた。

4) 白血病病型の診断

May-Giemsa 染色標本並びに Peroxidase 染色標本を用いて形態学的に行った。

5) 完全寛解判定基準

骨髓白血病細胞比率が5%以下であることを必須条件とした上で、木村の判定基準¹⁷⁾に従った。

尚、本実験において用いた好中球 O₂⁻産生能の正常或は第1編において検討した、正常人45名(20~69才)の平均値 6.45 ± 1.33 nmol/min/ 10^6 PMNs である。

成 績

1) 未治療期における好中球 O₂⁻産生能

AML 15例、ALL 5例の計20例における好中球 O₂⁻産生能は図1に示すごとく、 4.09 ± 1.43 nmol/min/ 10^6 PMNs であり、正常対象に比し有意の低値を示した (P<0.001)。つぎに好中球 O₂⁻産生能を白血病病型別に検討したところ、表1に示すごとく AML 4.18 ± 1.59 、ALL 3.81 ± 0.81 nmol/min/ 10^6 PMNs といずれも正常対象に比し有意の低値であったが (P<0.001)、AML と ALL の両者間に有意差はみられなかった。

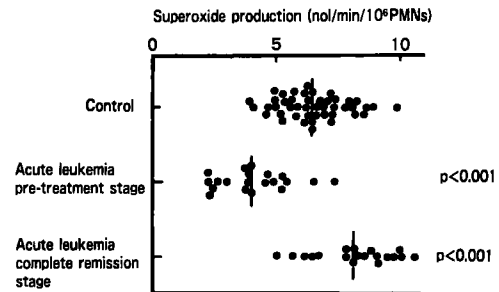


図1 急性白血病における好中球 O₂⁻産生能

表1 急性白血病未治療期における好中球 O₂⁻産生能

Group	No. of patient	Superoxide production (nmol/min/ 10^6 PMNs)	Significance
Total	20	4.09 ± 1.43	p<0.001
ANLL	15	4.18 ± 1.59	p<0.001
ALL	5	3.81 ± 0.81	p<0.001
Normal control	45	6.45 ± 1.33	

2) 完全寛解期における好中球 O₂⁻産生能

完全寛解期にある19例 (AML 14例、ALL 5例) の好中球 O₂⁻産生能は図1に示すごとく 8.22 ± 1.64 nmol/min/ 10^6 PMNs と正常対象に比し有意の高値を示したが (P<0.001)、一方表2に示した様に ANLL と ALL の両者間に有意差は無かった。次に表3に免疫賦活剤併用投与例と非併用投与例の好中球 O₂⁻産生能を示し

表2 完全寛解期における好中球 O₂⁻産生能

Group	No. of patient	Superoxide production (nmol/min/ 10^6 PMNs)	Significance
Total	19	8.22 ± 1.64	p<0.001
ANLL	14	8.09 ± 1.76	p<0.001
ALL	5	8.57 ± 1.35	p<0.01
Control	45	6.45 ± 1.33	

たが、前者では 8.08 ± 1.38 、後者では 8.32 ± 1.87 nmol/min/ 10^6 PMNs といずれも正常対象に比し有意の高値を示した。一方併用例と非併用例の両者間に有意差はみられなかった。

次に寛解持続期間と好中球 O₂⁻産生能との関係を検討したが、表4に示すごとく完全寛解到達時点では 7.29 ± 1.78 と正常対象に比し有意差

表3 完全寛解期における免疫賦活剤併用投与の有無と好中球 O_2^- 産生能

Group	No. of patient	Superoxide production (nmol/min/ 10^6 PMNs)	Significance
Immuno-potenciator (+)	8	8.08 ± 1.38	p < 0.01
Immuno-potenciator (-)	11	8.32 ± 1.87	p < 0.001

Immunopotenciator; OK-432 or PSK

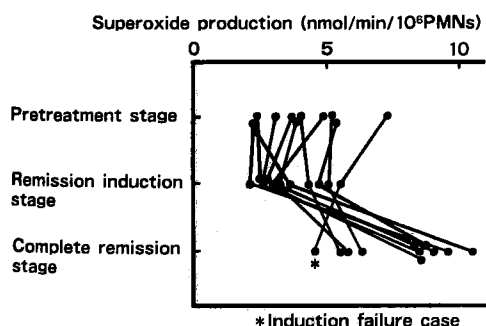
表4 完全寛解持続期間と好中球 O_2^- 産生能

Complete remission duration(month)	No. of patient	Superoxide production (nmol/min/ 10^6 PMNs)	Significance
a) at point CR established	10	7.29 ± 1.78	p < 0.1
b) 1 ≤ < 3	9	7.94 ± 1.66	p < 0.01
c) 3 ≤ < 12	4	8.09 ± 1.14	p < 0.05
d) 12 ≤ < 30	6	8.71 ± 2.01	p < 0.001
normal control	45	6.33 ± 1.33	

は認められなかったが ($P < 0.1$)、一方寛解持続期間が3ヶ月以内の症例では 7.94 ± 1.66 ($P < 0.01$)、3ヶ月以上12ヶ月以内の症例では 8.09 ± 1.14 ($P < 0.05$)、さらに12ヶ月以上30ヶ月以内の症例では 8.71 ± 2.01 nmol/min/ 10^6 PMNs ($P < 0.001$) といずれの時期とも正常対象に比し高値を示すとともに、完全寛解持続期間が長期に亘る症例程、好中球 O_2^- 産生能が高値を示す傾向が認められた。なお各期間別で比較したが有意差はみられなかった。

3) 好中球 O_2^- 産生能の経時的検討

未治療期、寛解導入療法期さらに完全寛解期と経時的に検討し得た11例 (AML 8例, ALL 3例) における好中球 O_2^- 産生能の推移は図2

図2 急性白血病における好中球 O_2^- 産生能の経時別検討

に示すごとくであり、未治療期では 4.04 ± 1.59 、寛解導入療法期では 3.56 ± 1.18 nmol/min/ 10^6 PMNs といずれも正常対象に比し低値であったが、完全寛解期では 8.15 ± 1.66 nmol/min/ 10^6 PMNs と有意の高値であった ($P < 0.01$)。なお対象とした11例中1例は寛解導入不能例であったが、本例では寛解導入療法施行後より O_2^- 産生能は漸時低下する傾向を示した点が注目された。

4) 未治療期における好中球 O_2^- 産生能と骨髓白血病細胞比率との関係

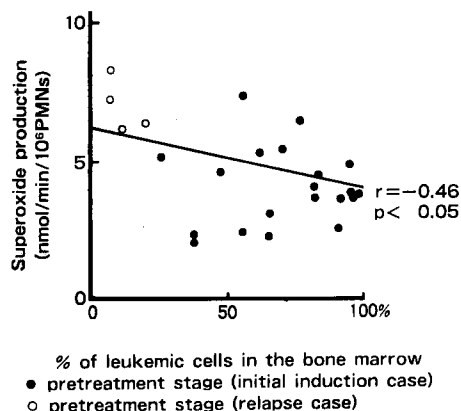
未治療例20例及び再発例で未治療である4例の計24例について、好中球 O_2^- 産生能とその測定時点での骨髓白血病細胞比率 (%) との関係を検討したところ、図3に示す如く両者間に有意の逆相関関係が認められた ($r = -0.46$, $P < 0.05$)。

5) 症例呈示

急性白血病初回治療例で未治療期、寛解導入期、完全寛解到達期及び完全寛解維持期の4期において比較的頻回に好中球 O_2^- 産生能を測定検討し得た6症例について概説する。

(症例1) N・K 45才 男性 AML (図4)

未治療期の末梢白血球数 (WBC) $6200/\text{mm}^3$ (白血病芽球80%, 好中球9%), 骨髓有核細胞数 (NCC) は $15.0 \times 10^4/\text{mm}^3$ (白血病芽球72%, 顆粒球1.6%) で、好中球 O_2^- 産生能は 2.40 nmol/min/ 10^6 PMNs であった。Neocarzinostatin (NCS), Cytosine arabinoside (CA), 6-mercaptopurine (6MP), Prednisolone (Pred)

図3 急性白血病未治療例における骨髓白血病細胞比率と好中球 O_2^- 産生能の関係

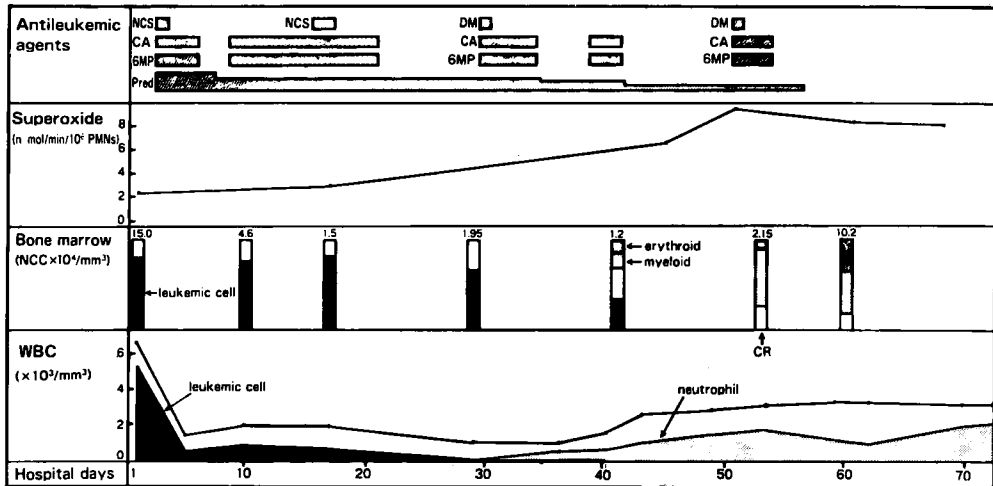


図4 N. K 45y.o ♂ AML

の併用による寛解導入療法を開始後16日目の O_2^- 産生能は2.50であり、なお白血病細胞は残存しており正常好中球の回復はみられなかった。入院策44病日、骨髄正常顆粒球15.2%と部分的に回復が認められるとともに、末梢血中の白血病細胞が消失し正常好中球数が $1,800/mm^3$ と増加した時点での O_2^- 産生能は6.02と正常域を示し、第51病日には9.10とむしろ正常域よりもovershootした。第53病日に完全寛解と判定したが、以後完全寛解維持期に測定した O_2^- 産生能は8.62, 8.03であった。なお本症例では第10病日より40病日にかけて高熱が出没し、敗血症と考えられたが感染巣・起炎菌とも不明であった。

(症例2) H・S 32才 女性 ALL (図5)

未治療期 WBC $16000/mm^3$ (白血病芽球95%), 好中球4%, 骨髄 NCC $50 \times 10^4/mm^3$ (白血病芽球92%, 顆粒球4%) で、好中球 O_2^- 産生能は $3.75 nmol/min/10^6 PMNs$ であった。Vincristine (VCR) と Pred の併用療法開始後4日目の O_2^- 産生能は2.65と低下を示したが、第23病日、末梢血及び骨髄中から白血病細胞が消失し正常顆粒球の回復が認められた時点での O_2^- 産生能は8.31であった。なお寛解導入療法中に感染症の合併はみられなかった。

(症例3) S・H 22才 男性 ALL (図6)

未治療時 WBC $13100/mm^3$ (白血病芽球92%, 好中球3%), 骨髄 NCC $52.0 \times 10^4/mm^3$ (白血病芽球95.2%, 顆粒球0.1%) で好中球 O_2^- 産生能は $4.32 nmol/min/10^6 PMNs$ であった。VCR と Pred の併用療法開始後13日目の O_2^- 産生能は3.00と前値よりやや低下したが、第42病日に完全寛解と判定し第56病日には9.19と正常域よりovershootした値を示した。感染症の合併はみられなかった。

(症例4) J・G 33才 男性 AML (図7)

未治療時 WBC $2300/mm^3$ (白血病芽球12%, 好中球30%), 骨髄 NCC $21.0 \times 10^4/mm^3$ (白血病芽球66%, 顆粒球20.0%) で、好中球 O_2^- 産生能は $3.01 nmol/min/10^6 PMNs$ であった。NC-S・CA・6MP・Predによる寛解導入療法を開始し、第11病日の O_2^- 産生能は2.60とさらに低下する傾向が認められたが、第36病日に完全寛解と判定された時点では8.54と正常域よりやや高値を示した。なお本症例では第20病日から10日間に亘って感染巣不明の高熱が出現した。

(症例5) S・N 53才 男性 AML (図8)

未治療時 WBC $3000/mm^3$ (白血病芽球2%, 好中球17%), 骨髄 NCC は $13.0 \times 10^4/mm^3$ (白血病芽球26%, 顆粒球8%) であり、好中球 O_2^- 産生能は $5.20 nmol/min/10^6 PMN$ と正常値下

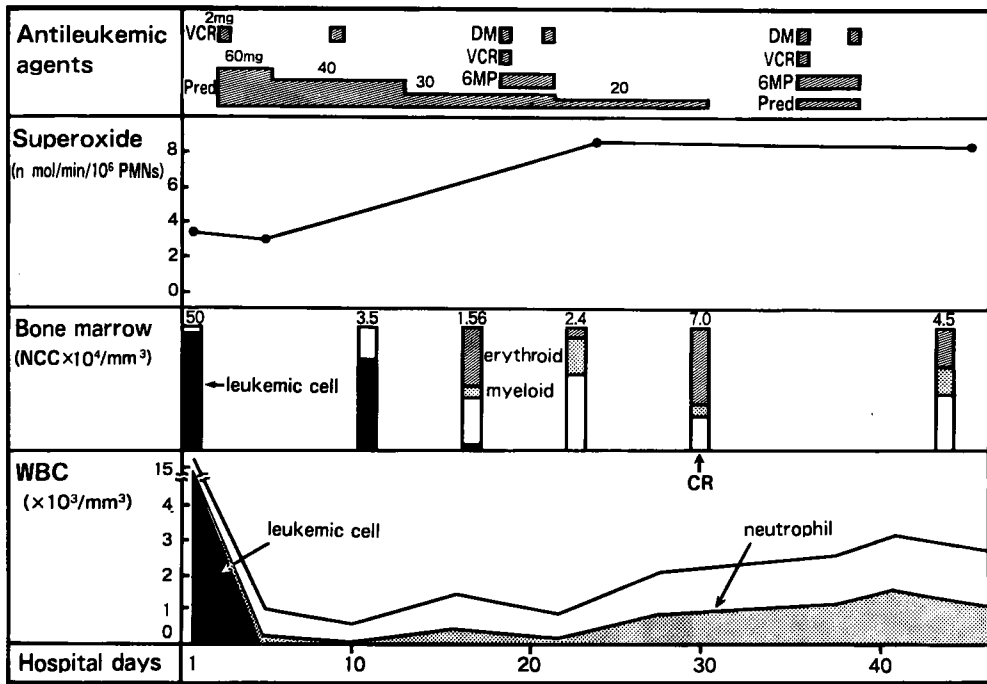


図5 H. S 32y.o ♀ ALL

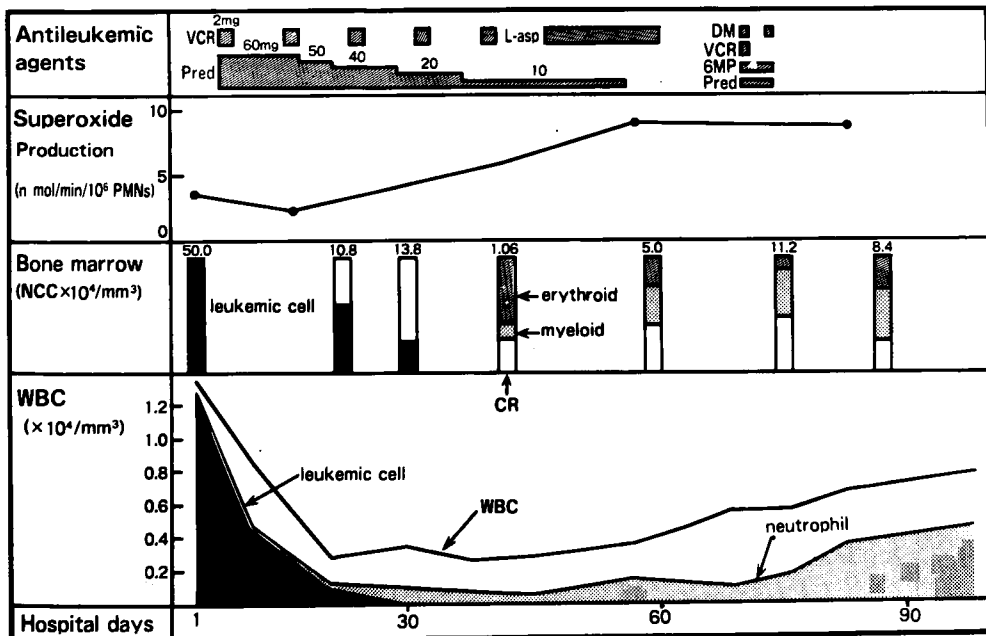


図6 S. H 22y.o ♂ ALL

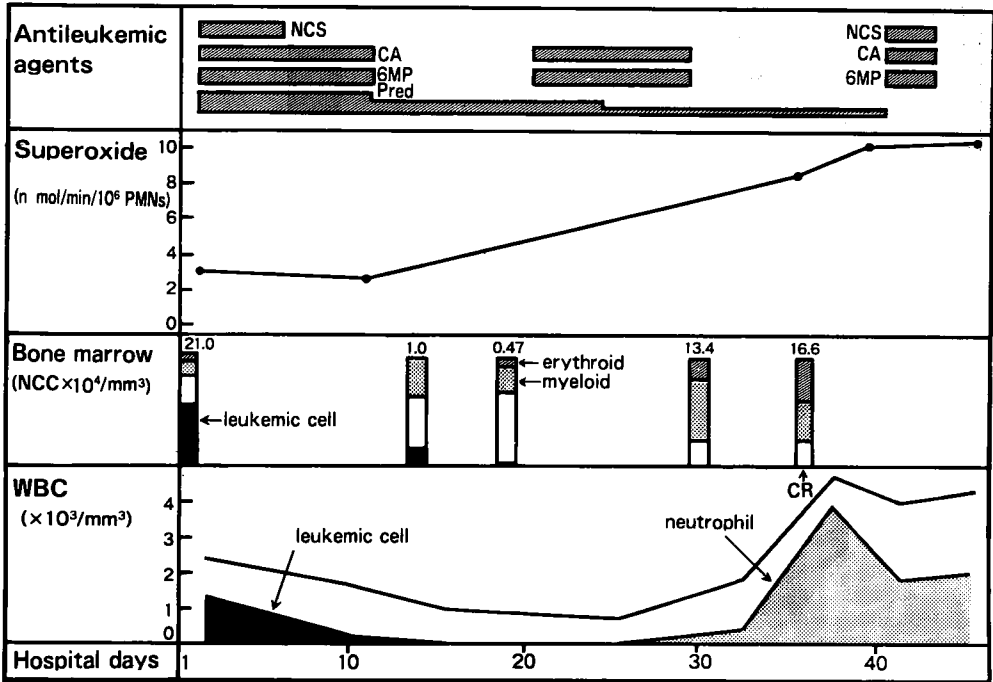


図 7 J. G 33y.o ♂ AML

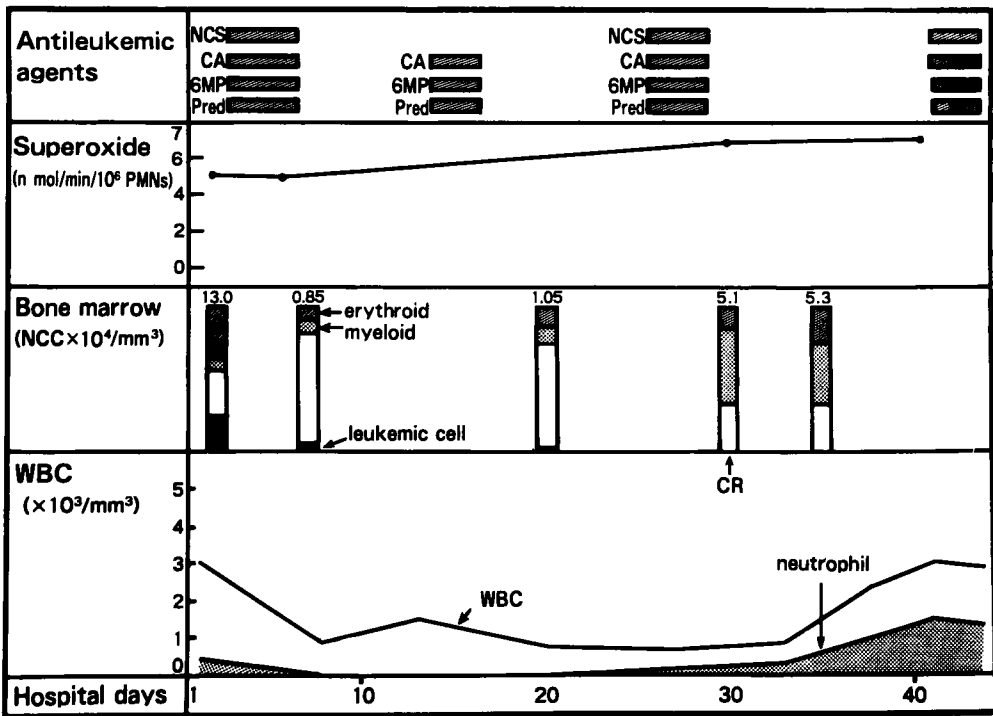


図 8 S. N 53y.o ♂ AML

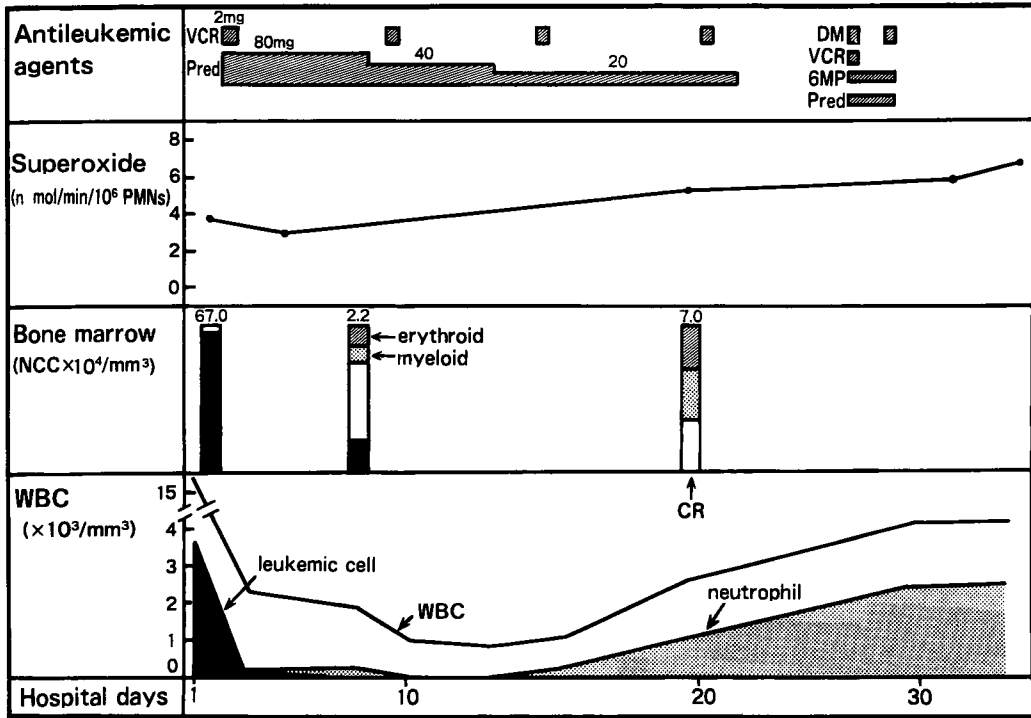


図9 K. H 55 y.o ♀ ALL

限であった。NCS・CA・6MP・Predによる寛解導入療法開始後5日目の O_2^- 産生能は5.10であり、第30病日、完全寛解と判定した時点では6.42、第40病日には6.50といずれも正常域であった。感染症の合併はなかった。

(症例6) K・H 55才 女性 ALL (図9)

未治療時の末梢血 WBCは $16,600/mm^3$ (白血球芽球90%, 好中球2%), 骨髓 NCCは $67.0 \times 10^4/mm^3$ (白血球芽球95%, 顆粒球0%) であり、好中球 O_2^- 産生能は $3.93nmol/min/10^6 PMNs$ と低値であった。VCR, Predによる寛解導入療法開始後4日目の O_2^- 産生能は3.02とさらに低下する傾向を示したが、第19病日、完全寛解判定時には5.31であり、以後5.85, 6.94と漸増した。なお第6病日より高熱が出現し、staphylococcus aureusによる敗血症と診断された。

考 察

これまで急性白血病患者好中球の貪食殺菌能に関しては多くの検討が諸家によりなされてい

るが¹⁸⁾⁻³¹⁾、活性酸素に関する報告は未だみられない。貪食に伴って産生される活性酸素には O_2^- ¹⁰⁾¹²⁾、 H_2O_2 ¹¹⁾、 $OH\cdot$ ¹³⁾、 1O_2 ¹⁴⁾が知られており、とくに O_2^- は Babiorら¹⁰⁾が好中球にラテックス粒子を貪食させることにより細胞外液中へ放出されることを最初に証明した活性酸素で、その後 Nakagawaraら¹⁵⁾¹⁶⁾による membrane mimicker を用いた O_2^- 測定法の開発により、細胞内殺菌能異常の解明に応用されているものである。今回著者は急性白血病の易感染性の検討を目的として、本病態における好中球 O_2^- 産生能を病型別、病期別、免疫賦活剤併用の有無、さらには寛解維持期間との関連において検討したわけであるが、まず未治療例の好中球 O_2^- 産生能はAML・ALLとも正常対象に比し有意に低値を示すことが確認され、AMLとALLの間にも有意差は認められなかった。このことは急性白血球病態における細胞内殺菌能の低下を示すものであり、本病態における易感染性を好中球機能、特にその生化学的過程における異常と

し認めた点で興味ある所見と思われる。それではこの好中球 O_2^- 産生能低下は何に起因するのか、白血球の異常分化をはじめ、白血病という腫瘍性病態の中で検討される必要がある。

すでにこれまで骨髓性白血病細胞自体がある条件下で成熟し顆粒球様の形態変化を示し³²⁾⁻³⁷⁾、Fcリセプター・貪食能・遊走性等の表現形質を発現することが実験的に確かめられており³²⁾、形態学的にも AML では核や細胞質顆粒の形態異常³⁸⁾⁻⁴⁰⁾⁴²⁾、Myeloperoxidase をはじめとする酵素染色異常を示す好中球の出現²³⁾²⁴⁾⁴¹⁾などが報告されている。なかでも渡辺³⁹⁾は、急性骨髓性白血病で白血病細胞の跛行的成熟が好中球にも発現していることを認め、白血病で出現する好中球には正常幹細胞と白血病幹細胞の両者から分化した2つの population が存在する可能性を超微細形態学的立場から指摘しているが、今回認めた AML における好中球 O_2^- 産生能の低下は、まず白血病幹細胞由来好中球の一次的機能変調を反映しているのではないかと考えられる。

一方未治療期 ALL 好中球における殺菌能低下についても諸家により報告されているが^{20)25)~27)}、Strauss ら²⁵⁾ は HMP 回路を形成する諸酵素活性を測定し、G6PDH、6PGDH さらには NADPH oxidase などの各酵素活性の低下を認め、殺菌作用に重要な H_2O_2 の産生不全が ALL 好中球の殺菌能低下に関連するのではないかとしている。今回著者は ALL においても AML 同様好中球 O_2^- 産生能が低下することを認めたが、NADPH oxidase は現在 O_2^- 産生酵素であると考えられ⁴³⁾、同時に又 G6PDH も O_2^- 産生に不可欠な酵素である⁴⁴⁾⁴⁵⁾ことからして、Strauss の報告したこれら酵素活性低下と今回著者の認めた O_2^- 産生能低下は一元論的に説明し得るものではないかと考えられる。

つぎに著者は、骨髓における白血病細胞百分率と好中球 O_2^- 産生能との関係を AML と ALL の未治療期について検討し、両者間に有意の逆相関を認めた。このことは Total leukemic cell mass と好中球 O_2^- 産生能との間に何らかの関連が存在することを示唆するものであろう。Wilkinson²⁸⁾ や Goldman ら²¹⁾ は AML 患者血

清を正常好中球の貪食殺菌反応系に添加した場合、殺菌能の抑制を認め、患者血清が好中球の enzyme inhibitor として作用する可能性を論じているが、AML・ALL とともに好中球 O_2^- 産生能の低下を認め、さらに Total leukemic cell mass と好中球 O_2^- 産生能が逆相関にあることなどからして、急性白血病の好中球 O_2^- 産生能低下の一因とし、体液因子の関与も否定することはできないものと思われる。

今回また11症例を対象として寛解導入療法時の O_2^- 産生能を測定したが、未治療期に比し差は認められなかった。ただ症例 2・3・4・6 に示したごとく寛解導入療法を開始するとともに O_2^- 産生能が低下を示す場合もみられ、好中球 O_2^- 産生能に対する抗白血病剤の影響も今後解明すべき一つの問題点と考えられた。

さて、これまで寛解時期における好中球貪食殺菌能の検討は主として ALL においてなされており、その結果についても正常²⁰⁾²⁷⁾あるいは低下²⁵⁾²⁶⁾⁴⁶⁾と一定しておらず、その原因として維持療法に用いられた抗白血病剤の関与も否定出来ない。このため著者は薬剤の影響を出来るだけ除外するため、抗白血病剤投与から少なくとも2週間以上の間隔をおいた時点で好中球 O_2^- 産生能を測定したが、正常よりも overshoot した状態にあることが示唆された。また寛解維持期間と好中球 O_2^- 産生能との関係を検討した結果、寛解期間が長い症例程より高い産生能を示す傾向がうかがわれた。この高値を呈した点に関して明確な根拠はないものの、未治療期・寛解導入期を通じ量的並びに質的に抑制状態にあった正常顆粒球系クローンが、寛解と同時に量的に回復するのみならず、質的にも回復する過程の中で一つの rebound 現象を示したのではないかとと思われる。又 O_2^- 産生能の高値が細胞内殺菌能の亢進した状態を示している事なのか否かという点に関してもさらに検討を要する問題である。なお今回の臨床的検討からは免疫賦活剤である OK432 及び PSK 投与の好中球 O_2^- 産生能に及ぼす影響は認められなかったが、OK432 がマクロファージ貪食菌能を賦活して宿主の抗感染性を増強するという報告⁴⁷⁾もあり、この問題についても今後検討を要するものと考えら

れる。

以上本編では急性白血病症例を対象としてその好中球 O_2^- 産生能を主に病型別・病期別に検討した。すでに周知のごとく急性白血病における感染症発症は未治療期と寛解導入療法期に集中しており、その原因としては好中球数の減少が最も重要な factor であることは言うまでもないが、本編で明らかにしたごとく好中球 O_2^- 産生能も両時期に一致して低値を示しており、急性白血病的易感染性には好中球の量的問題と同時に、細胞内殺菌能異常という質的異常が強く関与しているのではないかと考えられる。

結 論

急性白血病43例を対象として好中球 O_2^- 産生能を検討した結果、以下の結論を得た。

1) 白血病病型にかかわらず、未治療期の好中球 O_2^- 産生能は正常ヒト好中球 O_2^- 産生能に比し、有意の低値を示すとともに、骨髓白血病細

胞百分率とは有意の逆相関関係が認められた。

2) 寛解導入療法の施行により O_2^- 産生能がさらに抑制される傾向が認められ、抗白血病剤による産生能抑制が示唆された。

3) 完全寛解期の O_2^- 産生能は有意に高値を示し、測定時点までの寛解持続期間の長い症例程、高値となる傾向が認められた。

4) 未治療期並びに寛解導入期に認められた好中球 O_2^- 産生能の有意の低下は、同時期に発症し易い重症感染症の発症と密接な関連を有すると考えられる。

稿を終えるにあたり御指導ならびに御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深謝するとともに、終始懇切なる御指導と助言をいただいた喜多嶋康一助教授並びに高橋功講師に感謝の意を表す。

尚本論文の要旨は第41回日本血液学会総会(1979年東京)において発表した。

文 献

1. Skipper, H.E., Schabel, F.M., Wilcox, W.S.: Experimental evaluation of potential anticancer agents VIII. On the criteria and kinetics associated with "Curability" of experimental leukemia. *Cancer Chemother. Rep.* 35, 1—III, 1964.
- 2) Levine, A.S., Deisseroth, A.B.: Recent development in the supportive therapy of acute myelogenous leukemia. *Cancer* 42, 883—894, 1978.
3. Body, G.P., Rodriguez, V., Chang, H., Narboni, G.: Fever and infection in leukemic patients. *Cancer* 41, 1610—1622, 1978.
4. Levine, A.S., Schimpff, S.C., Graw, R.G., Young, R.C.: Hematological malignancies and other marrow failure states; Progress in the management of complicating infections. *Semin. Hematol.* 11, 141—202, 1974.
5. Holmes, B., Page, A.R., Good, R.A.: Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J. Clin. Invest.* 46, 1422—1432, 1967.
6. Sbarra, A.J., Karnovsky, M.L.: The biochemical basis of phagocytosis. 1. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 234, 1355—1362, 1959.
7. Weening, R.S., Roos, D., Loos, J.A.: Oxygen consumption of phagocytizing cells in human leukocyte and granulocyte preparations: A comparative study. *J. Lab. Clin. Med.* 83, 570—576, 1974.
8. Reed, P.W.: Glutathione and hexose monophosphate shunt in phagocytizing and hydrogen peroxide-treated rat leukocyte. *J. Biol. Chem.* 244, 2459—2464, 1969.
9. Skeel, R.T., Yankee, R.A., Spivak, W.A., Novikovs, L., Henderson, E.S.: Leukocyte preservation. 1. Phagocytic stimulation of the hexose monophosphate shunt as a measure of cell viability. *J. Lab.*

- Clin. Med.* **73**, 327—337, 1969.
10. Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**, 741—744, 1973.
 11. Root, R.K., Metcalf, J., Oshino, N., Chance, B.: H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. 1. Documentation, quantitation and some regulating factors. *J. Clin. Invest.* **55**, 945—955, 1975.
 12. Weening, R.S., Wever, R., Roos, D.: Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **85**, 245—252, 1975.
 13. Tauber, A.I., Babior, B.M.: Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **60**, 374—379, 1977.
 14. Allen, R.C., Stjernholm, R.L., Steele, R.H.: Evidence for the generation of an electronic excitation states in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 679—684, 1972.
 15. Nakagawara, A., Kakinuma, K., Shin, H., Miyazaki, S., Minakami, S.: Lack of cytochalasin E-induced superoxide release by polymorphonuclear leukocytes of patients with chronic granulomatous disease; A new diagnostic test. *Clin. Chim. Acta* **70**, 133—137, 1976.
 16. Nakagawara, A., Nabi, B.Z.F., Minakami, S.: An improved procedure for the diagnosis of chronic granulomatous disease, using concanavalin A and cytochalasin E. *Clin. Chim. Acta* **74**, 173—176, 1977.
 17. 木村喜代次, 太田和雄, 恒吉英彦: 白血病の化学療法上の二三の知見について. *癌*, **48**, 496—498, 1957.
 18. Sbarra, A.J., Shirley, W., Selvaraj, R.J., McRipley, R.J., Rosenbaum, E.: The role of the phagocyte-host-parasite interactions III. The phagocytic capabilities of leukocytes from myeloproliferative and other neoplastic disorders. *Cancer Res.* **25**, 1199—1206, 1965.
 19. Sbarra, A.J., Shirley, W., Selvaj, J., Ouchi, E., Rosenbaum, E.: The role of the phagocyte in the host-parasite interactions 1. The phagocytic capabilities of leukocytes from lymphoproliferative disorders. *Cancer Res.* **24**, 1958—1968, 1964.
 20. Rosner, F., Valmont, I., Kozinn, P.J., Caroline, L.: Leukocyte function in patients with leukemia. *Cancer* **25**, 835—842, 1970.
 21. Goldman, J.M., Th'ng, K.H.: Phagocytic function of leukocytes from patients with acute myeloid and chronic granulocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **25**, 299—308, 1973.
 22. Cline, M.J.: A new white cell test which measures individual phagocyte function in a mixed leukocyte population. 1. A neutrophil defect in acute myelocytic leukemia. *J. Lab. Clin. Med.* **81**, 311—316, 1973.
 23. Pinkerton, P.H., Robinson, J.B.: Granulocyte function in untreated acute and chronic granulocytic leukemia. *Acta. Haematol. Acta. Haematol.* **56**, 65—72, 1976.
 24. Goldman, J.M., Catovsky, D.: The function of the phagocytic leukocytes in leukaemia. *Br. J. Haematol.* **23**, (suppl.), 223—230, 1972.
 25. Strauss, R.R., Paul, B.B., Jacobs, A.A., Simmons, C., Sbarra, A. J.: The metabolic and phagocytic activities of leukocytes from children with acute leukemia. *Cancer Res.* **30**, 480—488, 1970.
 26. Thompson, E.N., Williams, R.: Bactericidal capacity of peripheral blood leukocytes in relation to bacterial infections in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *J. Clin. Pathol.* **27**, 906—910, 1974.
 27. Humbert, J.R., Hutter, J.J., Thoren, C.H., DeArmedy, P.A.: Decreased neutrophil bactericidal activity in acute leukemia of childhood. *Cancer* **37**, 2194—2200, 1976.
 28. Wilkinson, P.M., Sumner, C., Delamore, I.W., Greary, C.G., Milner, G.R.: Granulocyte function in my-

- eloblastic leukaemia. *Br. J. Cancer* 32, 574—577, 1975.
29. Nakamura, M., Nakamura, M., Okamura, J., Kobayashi, Y.: A rapid and quantitative assay of phagocytosis-connected oxygen consumption by leukocytes in whole blood. *Lab. Clin. Med.* 91, 568—575, 1978.
 30. Skeel, R.T., Yankee, R.A., Henderson, E.S.: Hexose monophosphate shunt activity of circulating phagocytes in acute lymphocytic leukemia. *J. Lab. Clin. Med.* 77, 975—984, 1971.
 31. Pickering, L.K., Anderson, D.C., Choi, S., Feigin, R.D.: Leukocyte function in children with malignancies. *Cancer* 35, 1365—1371, 1975.
 32. 本間良夫, 穂積本男: 細胞分化に影響を与える物質. 代謝. 17, 1119—1127, 1980.
 33. 穂積本男: 白血病細胞の分化誘導と白血病の化学療法. 癌と化学療法. 8, 9—18, 1981.
 34. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., Gallo, R.C.: Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. Exp. Med.* 149, 969—974, 1979.
 35. Hoelzer, D., Schmücker, K.H., Harris, E.B.: Evidence for differentiation of human leukemic blood cells in diffusion chamber culture. *Blood* 49, 729—744, 1977.
 36. Ichikawa, Y., Maeda, M., Horiuchi, M.: *In vitro* differentiation of Rauscher-virus-induced myeloid leukemia cells. *Int. J. Cancer* 17, 789—797, 1976.
 37. Ichikawa, Y.: Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *J. Cell Physiol.* 74, 223—234, 1969.
 38. Tulliez, M., Vernant, J.P., Breton-Gorius, J., Imbert, M., Sultan, C.: Pseudo-Chediak-Higashi anomaly in a case of acute myeloid leukemia; Electron microscopic studies. *Blood* 54, 863—871, 1979.
 39. 渡辺陽之輔: 好中球および白血球細胞の微細構造. 日本医師会雑誌. 83, 119—134, 1980.
 40. Bainton, D.F., Friedlander, L.M., Shohet, S.B.: Abnormalities in granule formation in acute myelogenous leukemia. *Blood* 49, 693—704, 1977.
 41. Breton-Gorius, J., Houssay, D., Dreyfus, B.: Partial myeloperoxidase deficiency in a case of preleukemia. 1. Studies of fine structure and peroxidase synthesis of promyelocytes. *Br. J. Haematol.* 30, 273—278, 1975.
 42. Schmalzl, F., Lederer, B., Braunsteiner, H.: Atypical myeloblastic leukemia with differentiation into "Paraneutrophils". *Blut* 20, 337—349, 1970.
 43. 竹重公一郎, 水上茂樹: Superoxide Synthase. 臨床科学. 16, 985—991, 1980.
 44. Cooper, M.R., DeChatelet, L.R., McCall, C.E., LaVia, M.F., Spurr, C.L., Baehner, R.L.: Complete deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase with defective bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 51, 769—778, 1972.
 45. Gray, G.R., Klebanoff, S.J., Stamatoyannopoulos, G., Austin, T., Naiman, S.C., Yoshida, A., Kliman, M.R., Robinson, G.C.F.: Neutrophil dysfunction, chronic granulomatous disease, and non-spherocytic haemolytic anemia caused by complete deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Lancet*. ii, 530—534, 1973.
 46. Gregory, L., Williams, R., Thompson, E.: Leukocyte function in Down's syndrome and acute leukemia. *Lancet* i, 1359—1361, 1972.
 47. Yokota, T., Nogaki, K., Ogawa, H., Akiba, T.: Stimulatory effect of the streptococcal preparation picibanil on phagocytosis. *Current Chemotherapy.* 324—326, 1978.

Studies on superoxide production of human neutrophils

Part 2. Clinical studies on superoxide production of neutrophils in patients with acute leukemia

Fumikazu KOHI

Department of Internal Medicine, Okayama University

Medical School Okayama 700, Japan

(Director: Prof. I. Kimura)

It is well known that patients with acute leukemia have a predisposition for life threatening infections. Among several factors which disturb host defense mechanisms, quantitative and qualitative disorders of neutrophils are thought to be important. Up to date, there have been some papers concerning the bactericidal activities of neutrophils obtained from patients with acute leukemia; however, little information about the production of active oxygens, especially the superoxide anion, is available. Superoxide of neutrophils is one of the active oxygen related to intracellular bactericidal activities; therefore, in this study, superoxide production of neutrophils in patients with acute leukemia was examined in order to clarify the cause of the high susceptibility to infection. The results were as follows:

1. Before antileukemic chemotherapy, superoxide production was 4.09 ± 1.43 nmol/min/ 10^6 PMNs in patients with acute leukemia. It was 6.45 ± 1.33 nmol/min/ 10^6 PMNs in normal subjects. During induction chemotherapy, superoxide production was suppressed to a level of 3.56 ± 1.18 nmol/min/ 10^6 PMNs; however, it recovered to normal range and somewhat overshoot in the complete remission stage.

2. An inverse correlation between superoxide production of neutrophils and the total number of leukemic cells in the bone marrow was recognized.

3. The changes in superoxide production throughout the entire course were not correlated with the type of leukemia.

These results clearly indicate disturbance of superoxide production by neutrophils in patients with acute leukemia. They also suggest that alterations in the intracellular bactericidal activities of neutrophils may be one of the reasons for the high susceptibility to infections of patients with acute leukemia.