

エンドトキシン血症家兎の好中球化学発光の変動

浅 雄 保 宏*

要 旨

好中球の貪食殺菌能を調べる方法として、増感剤を用いた化学発光 (CL) 法がある。好中球 CL は細菌感染によって増大するが、重症感染症になると低下する場合がある。重症の細菌感染症における好中球 CL の低下の原因を探るために、家兎に高濃度 ($70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$: III 群) あるいは低濃度エンドトキシン ($0.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$: II 群) を一回静注し、好中球の貪食殺菌能を CL 法によって経時的に測定した。

好中球を用いた CL ピーク値は、II 群では 180 分、360 分で有意の上昇が認められ、III 群では 30 分、60 分、180 分で有意の低下が認められた。好中球とプール血漿を組み合わせて CL を測定したところ、類似した結果が得られたため、好中球側に原因があることが示唆された。全血を用いた CL ピーク値と白血球数とは類似の変化を示し、30 分で有意に低下し、60 分で最低を示したのちに回復した。

以上より、軽度のエンドトキシン血症時には、好中球自体の貪食殺菌能が亢進する。しかし、重症エンドトキシン血症時には好中球数減少に伴う生体側の殺菌能の低下のほかに、好中球自体の貪食殺菌能の抑制が起こることが示された。

化学療法が進歩した今日においても、重症感染症の治療には多大な時間と労力を費やしており、そのコントロールが困難な場合には多臓器不全、死に至る場合が多い¹⁾。好中球は細菌感染に対する生体防御の第一線に位置し、侵入した細菌を貪食殺菌しているが、重症感染症においては好中球の顆粒内酵素の放出や過剰な活性酸素放出により臓器・組織障害を引き起こす²⁾と考えられている。

好中球の貪食殺菌能を調べる方法として、増感

剤を用いた化学発光 (ケミルミネッセンス: CL) 法があり、細菌感染により好中球の CL は増大する³⁾。しかし、赤尾ら⁴⁾は多臓器不全患者において白血球数は十分あるにもかかわらず、全血を用いた CL ピーク値が極端に低下する場合があることを報告している。また、重症感染症患者でみられる好中球の CL ピーク値の低下は好中球自体に原因があるという報告⁵⁾も認められる。

したがって、著者は感染の重篤度により好中球機能が変化すると考え、エンドトキシン投与量と投与後の時間が好中球機能に及ぼす影響をエンドトキシン血症家兎を作製し、好中球 CL の変化により検討した。また、プール血漿と分離した好中球を用いた CL 測定により、エンドトキシン投与後の CL の変化に対する血漿成分の影響を検討した。

1. 実験方法

白色日本家兎 (体重約 3 kg) は、実験前 1 週間は自由に摂食させた。エンドトキシンは lipopolysaccharide E. coli 0127: B8 (#3123-25-7, Difco Lab., Detroit, Mich.) を生理食塩水に溶解して用いた。ザイモザンは zymosan A (#Z4250, Sigma Chemical Co., St. Lois, Mo) を精製水で 30 分間煮沸後、 $1,500 \times g$ 、5 分間遠心分離し、沈渣を HEPES 緩衝液 (KCl 5 mM, NaCl 145 mM, ブドウ糖 5.5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.40) で 2 回洗浄後 HEPES 緩衝液を用いて $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に調整した。パーコール溶液は Percoll (#17-0891-01, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) に 1.5 M NaCl を 1/9 容加えて等張にしたのち、0.15 M NaCl により希釈して 68% ($\rho=1.084$) と 56% ($\rho=1.070$) の溶液を作製した。ルミノール (東京化成, 東京) は

* 岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室

0.01 M NaOH に溶解して 20 mM 溶液として保存した。使用時には生理食塩水により 4 mM に希釈した。

家兎 32 羽を生理食塩水静注群 (I 群, n=6), エンドトキシン $0.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静注群 (II 群, n=10), エンドトキシン $70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静注群 (III 群, n=10) の 3 群に分けた。残り 6 羽は II 群, III 群でのプール血漿作製に供した。

各群とも塩酸ケタミン $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ミダゾラム $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ を筋注, 麻酔後, 一方の耳介の耳介動脈に動脈ラインを, 他方の耳介に静脈路を確保した。輸液は 10% ブドウ糖加維持輸液製剤を用い, $15 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ の速度で行った。麻酔から 2 時間以上経過したのちに動脈ラインより, エンドトキシン静注前, 静注後 30 分, 60 分, 180 分, 360 分にヘパリン加採血 (ヘパリン 100 単位 $\cdot \text{ml}^{-1}$) をそれぞれ 6 ml, 8 ml, 8 ml, 8 ml, 6 ml 行った。血液は 1 ml を全血を用いた CL 測定と血漿分離に, 1 ml を白血球数, 血小板数および血液ガス測定に用い, 残りを好中球分離に用いた。血漿分離は $7,000 \times \text{g}$, 1 分間遠心分離し, 血漿のみを氷水中に保存した。また, II 群, III 群ではそれぞれ家兎 3 羽よりエンドトキシン静注前, 静注後 60 分, 360 分にヘパリン加採血, 血漿分離を行い, 3 羽分を混合してプール血漿を作製し, 使用時まで -80°C で保存した。

好中球は, ファルコンチューブ (#2027, Becton Dickinson & Co., Lincoln Park, NJ) に 68% と 56% のパーコールを等量用いて不連続密度勾配を作成し, 同量の血液を重層して室温で $450 \times \text{g}$, 25 分間遠心分離した。68% と 56% パーコールの境界に存在する好中球層を取り, $150 \times \text{g}$, 10 分間遠心分離し, 沈渣に 34 mM NaCl を加えて赤血球を低張溶血させ, 20 秒後に 272 mM NaCl を同量加えて等張に戻した。 $150 \times \text{g}$, 10 分間遠心分離後, 沈渣を HEPES 緩衝液で 1 回洗浄し, チュルク試液で 10 倍希釈後, 好中球数を算定し, HEPES 緩衝液を用いて好中球数を $10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に調整した。好中球の純度は 90~50% 程度であった。

CL 測定はルミネッセンスリーダー (BLR-102 型, アロカ社, 東京) を用いて行い, クロマトパ

ック (CR-3 A, 島津製作所, 京都) でピーク時間とピーク値を記録した。全血を用いた CL 測定は, 専用のルミネッセンスチューブに全血 100 μl , HEPES 緩衝液 200 μl , ルミノール溶液 100 μl を入れ, 37°C , 2 分間インキュベート後, ザイモザン 100 μl を加えて行った。好中球を用いた CL 測定は, 専用のルミネッセンスチューブに好中球浮遊液 ($10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) 100 μl , 好中球と同時に得た血漿 100 μl , HEPES 緩衝液 100 μl , ルミノール溶液 100 μl を入れ, 37°C , 2 分間インキュベート後, ザイモザン 100 μl を加えて行った。II 群, III 群では, 好中球とプール血漿を用いて CL 測定を行った。好中球とプール血漿の組み合わせは, (好中球/プール血漿) で表わした場合, (静注前/静注前), (静注前/60 分), (静注前/360 分), (60 分/静注前), (360 分/静注前) で行った。

群内比較は, 静注前を対照として分散が等しいと考えられる場合には paired t-test を, 等しくないと考えられる場合には Wilcoxon 検定を用いて $P < 0.05$ を有意差ありとした。また, 群間比較は, I 群を対照にして分散が等しいと考えられる場合には unpaired t-test を, 等しくないと考えられる場合には Mann-Whitney の U 検定を用いて $P < 0.05$ を有意差ありとした。プール血漿を用いての CL 測定結果は, 群内比較はエンドトキシン静注前の好中球とプール血漿を用いた場合を対照にして同様にしてい, $P < 0.05$ を有意差ありとした。群間比較は行わなかった。

2. 結 果

I 群, II 群, III 群の体重は, それぞれ $3.0 \pm 0.2 \text{ kg}$, $3.0 \pm 0.3 \text{ kg}$, $3.1 \pm 0.2 \text{ kg}$ (平均値 \pm SD) であり, 有意差は認められなかった。収縮期圧, 血液ガス分析, 血小板数の結果を表に示した。

実験の経過中に著明な低血圧は認めなかった。血液ガス分析ではエンドトキシン投与量が増加するにつれ変化は大きくなり, pH, PaCO_2 , PaO_2 は 60 分で, HCO_3^- , 過剰塩基は 180 分で最大の変化を示した。エンドトキシン静注後の血液ガス分析では, 呼吸性アルカローシスと代謝性アシド

表 収縮期圧, 血液ガス分析, 血小板数の経時的変化

		静注前	静注後 30 分	静注後 60 分	静注後 180 分	静注後 360 分
収縮期血圧 (mmHg)	I 群	99.7±7.2	97.2±6.8	99.7±6.4	98.0±13.5	97.0±7.2
	II 群	97.6±5.0	96.7±8.1	92.3±7.7*	96.1±6.4	94.2±8.9
	III 群	109.5±11.4	107.2±8.7 #	110.0±15.2	108.4±10.0	108.0±13.0
動脈血 pH	I 群	7.471±0.021	7.452±0.014*	7.431±0.024*	7.469±0.036	7.462±0.047
	II 群	7.451±0.030	7.498±0.110	7.484±0.022* #	7.484±0.040	7.453±0.045
	III 群	7.475±0.040	7.490±0.036 #	7.613±0.070* #	7.553±0.068* #	7.516±0.068
PaCO ₂ (mmHg)	I 群	25.4±3.9	27.6±3.0*	26.6±3.8	24.9±4.2	23.5±4.0
	II 群	28.2±3.0	23.4±2.7* #	22.7±3.0* #	20.7±5.0*	23.2±2.9*
	III 群	26.0±4.2	23.8±3.1 #	13.4±3.7* #	13.9±3.7* #	17.7±5.9*
PaO ₂ (mmHg)	I 群	105.8±6.2	112.7±16.5*	113.6±12.3	105.5±5.6	110.3±8.2
	II 群	100.4±9.9	123.2±12.0*	115.5±14.5*	108.1±11.2	111.7±7.1*
	III 群	104.8±9.3	129.1±17.5*	138.8±16.5* #	112.4±11.8	104.2±13.8
HCO ₃ ⁻ (mM)	I 群	18.4±2.5	19.1±1.7	17.6±2.7	18.0±2.8	16.6±1.7*
	II 群	19.5±1.5	16.9±2.2*	17.0±2.2*	15.5±3.4*	16.2±2.5*
	III 群	19.0±3.1	18.0±1.3	13.4±2.6* #	12.1±2.2* #	14.1±3.4*
過剰塩基 (mM)	I 群	-4.1±2.3	-3.8±1.5	-5.5±2.7	-4.6±2.6	-6.3±1.8*
	II 群	-3.4±1.5	-5.4±2.5*	-5.1±2.3*	-6.7±3.3*	-6.5±2.9*
	III 群	-3.4±3.1	-3.8±1.0	-6.1±2.7*	-8.6±2.3* #	-7.5±3.4*
血小板数 (×10 ⁻¹⁰ · l ⁻¹)	I 群	38.8±17.9	37.9±18.6	41.8±15.6	40.1±17.3	34.3±13.6
	II 群	44.3±14.5	46.4±20.5	39.4±12.3	39.4±13.6*	36.9±10.8*
	III 群	41.0±10.9	25.9±10.9*	33.7±10.4*	28.7±7.1*	21.1±6.6* #

生理食塩水 (I 群, n=6), エンドトキシン 0.7 μg · kg⁻¹ (II 群, n=10), エンドトキシン 70 μg · kg⁻¹ (III 群, n=10) をおのおの静注し, 前後での収縮期血圧, 血液ガス分析, 血小板数の経時的変化を示す。表示は平均値±SD で示す。

群内比較は静注前を対照として行い, * : P<0.05。群間比較は I 群を対照として行い, # : P<0.05。

ーシスが混在した病態であった。血小板数は I 群では有意差なく経過したが, II 群, III 群ではエンドトキシン投与量が増加するにつれ変化は大きくなり, しかも 360 分でもっとも低下した。

白血球数 (図 1) は I 群では有意差なく経過した。II 群ではエンドトキシン静注後 30 分で有意に低下し, 60 分を最低としてしだいに回復し, 360 分には前値まで回復した。III 群では II 群よりもさらに低下し, 60 分を最低としたが, 360 分で前値まで回復しなかった。

全血による CL ピーク値 (図 2, A) は I 群では有意差は認められなかった。II 群では 30 分, 60 分では有意に低下したが, 360 分では上昇した。III 群では 30 分, 60 分, 180 分で有意に低下し,

しかも II 群よりも低値を示した。全血による CL ピーク時間 (図 2, B) は, I 群の 60 分と 180 分, III 群の 30 分, 60 分, 180 分で有意な短縮が認められた。

好中球による CL ピーク値 (図 3, A) は I 群では有意差は認められなかった。II 群では 30 分で低下傾向を示し, 180 分, 360 分では有意に上昇した。III 群では 30 分, 60 分, 180 分に有意に低下した。好中球による CL ピーク時間 (図 3, B) は, I 群, II 群では有意差は認められなかった。III 群の 30 分, 60 分, 180 分で有意な短縮が認められた。

プール血漿を用いた場合の CL ピーク値は, II 群 (図 4, A) では有意差は認められなかったが,

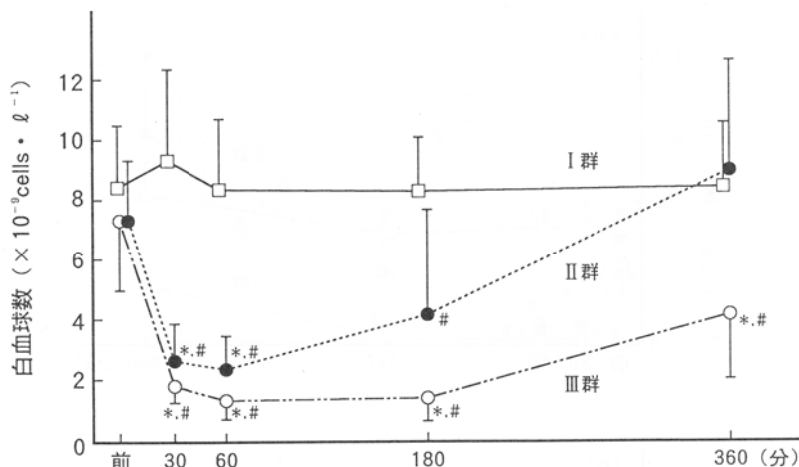


図1 白血球数の変動

生理食塩水 (I群, n=6), エンドトキシン $0.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (II群, n=10), エンドトキシン $70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (III群, n=10) をおのおの静注し, 前後での白血球数の経時的变化を示す。表示は平均値 \pm SDで行っている。群内比較は静注前値を対照にして行い, * : $P < 0.05$ 。群間比較はI群を対照にして行い, # : $P < 0.05$ 。

360分の好中球を用いた場合にCLピーク値は上昇傾向を示した。III群(図4, B)では60分の好中球と静注前のプール血漿を用いた場合のCLピーク値に有意な低下が認められた。CLピーク時間はII群(図4, C)では有意差はなく, III群(図4, D)では60分好中球を用いた場合に短縮傾向が認められ, 静注前好中球と360分プール血漿を用いた場合に有意な延長が認められた。

3. 考 察

好中球は細菌感染以外にも種々の侵襲刺激, 例えば外傷⁶⁾や手術⁷⁾などに反応して機能が変化する。I群では血圧, 血液ガス分析, 血小板数, 白血球数のうち, HCO_3^- と過剰塩基が360分で有意に低下したのみであった。これは採血量が多かったためと考えられるが, 準備段階での侵襲は最小限と考えられた。

全血を用いたCLピーク値(図2, A)と白血球数(図1)の変化のパターンは類似性が高いので, 全血での細菌貪食殺菌能は白血球数が大きく寄与していると考えられる。また, 好中球を用いたCLピーク値(図3, A)と全血を用いたCLピーク値/白血球数(図5)の変化パターンもかなり類

似しており, 全血を用いたCLピーク値/白血球数は好中球を用いたCLピーク値の変化の推定に使用可能な指標であると考えられる。

好中球を用いたCLピーク値(図3, A)は, II群において180分, 360分で有意な上昇が認められ, III群では30分, 60分, 180分で有意な低下が認められた。プール血漿を用いてのCLピーク値は, II群(図4, A)では360分好中球を用いた場合に上昇傾向が認められ, III群(図4, B)では60分好中球を用いた場合に有意な低下が認められた。分離好中球を用いたCLピーク時間(図3, B)はII群では有意差はなく, III群では30分, 60分, 180分で有意な短縮が認められた。プール血漿を用いてのCLピーク時間は, II群では有意差はなく, III群では60分好中球を用いた場合に短縮傾向が認められ, 静注前好中球と360分プール血漿を用いた場合に有意な延長が認められた(図4, C・D)。

好中球によるCLの機序は, 好中球内に存在するミエロペロキシダーゼによって生じた次亜塩素酸イオンがルミノールを酸化し, 励起するためとされている⁸⁾。CLピーク値は血漿のオプソニン活性⁹⁾と好中球の殺菌活性¹⁰⁾を示し, CLピーク

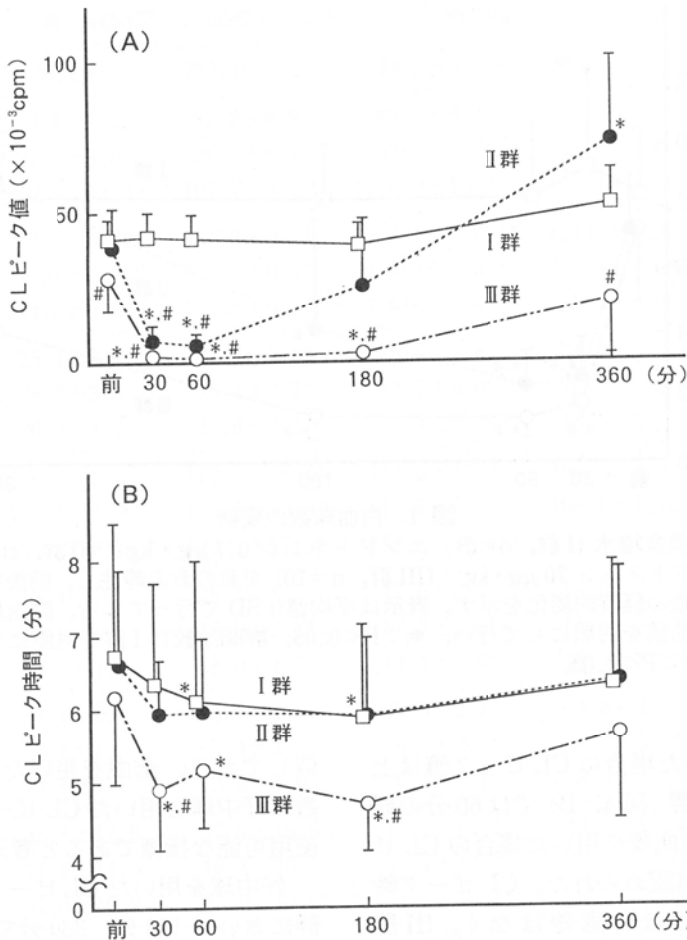


図 2 全血を用いた CL ピーク値とピーク時間の変動
 生理食塩水 (I 群, n=6), エンドトキシン 0.7 μg · kg⁻¹ (II 群, n=10), エンドトキシン 70 μg · kg⁻¹ (III 群, n=10) をおのおの静注し, 前後で得た全血を用いて化学発光測定を行った。全血を用いた CL ピーク値 (A) およびピーク時間 (B) を示す。表示は平均値 ± SD で行っている。群内比較は静注前値を対照にして行い, * : P < 0.05。群間比較は I 群を対照にして行い, # : P < 0.05。

時間は血漿と好中球相互のオプソニン効果¹¹⁾, つまり血漿のオプソニン物質と好中球膜上のオプソニン受容体の濃度ないし親和性を示す¹²⁾とされている。プール血漿を用いれば主に好中球側の変化, つまり CL ピーク値は好中球の殺菌活性を示し, CL ピーク時間は好中球膜上のオプソニン受容体の濃度ないし親和性を示すと考えられる。また, 同一好中球を用いれば CL ピーク値は血漿のオプソニン活性の変化を示すと考えられるので理解が容易になる。

これらを踏まえると, II 群の 180 分, 360 分での好中球による CL ピーク値の上昇は主に好中球の殺菌活性増大によると考えられ, III 群の 30 分, 60 分, 180 分での好中球による CL ピーク値の低下, ピーク時間の短縮は, 好中球膜上のオプソニン受容体の機能が亢進しているが, それから貪食殺菌に至る過程で抑制が起きていることが示唆される。

エンドトキシンにより活性化された補体は, 好中球の活性酸素産生能や脱顆粒を促進する⁹⁾。ま

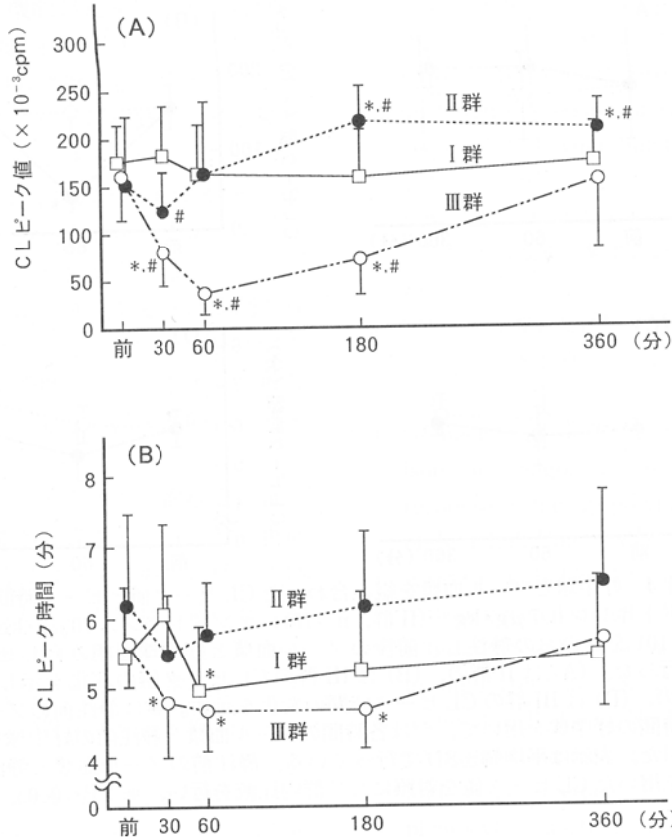


図3 好中球を用いたCLピーク値とピーク時間の変動
生理食塩水 (I群, n=6), エンドトキシン $0.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (II群, n=10), エンドトキシン $70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (III群, n=10) をおのおの静注し, 前後で好中球を分離して化学発光測定を行った。好中球を用いたCLピーク値 (A) およびピーク時間 (B) の経時変化を示す。表示は平均値 \pm SDで行っている。群内比較は静注前値を対照にして行い, * : $P < 0.05$ 。群間比較はI群を対照にして行い, # : $P < 0.05$ 。

た, リンパ球, 単球をエンドトキシンで刺激するとサイトカインが分泌され, サイトカインは *in vitro* において好中球活性酸素産生能を亢進する^{13)~16)}。II群の180分, 360分での変化は, エンドトキシン投与量が少量であり, 活性化補体やサイトカインが大量には生成されなかったために, 好中球が過剰刺激を受けることなく好中球貪食殺菌能が亢進したと考えられる。

敗血症患者では血中エンドトキシン濃度の上昇¹⁷⁾, 好中球の走化性の抑制¹⁸⁾や化学発光の抑制⁵⁾¹⁸⁾が認められている。そして感染症が重篤になるほど血中の活性化補体濃度の上昇¹⁹⁾や好中

球膜上の補体受容体CR3の増加²⁰⁾, 好中球エラストラーゼの上昇¹⁹⁾, 好中球顆粒内酵素量の低下²⁰⁾も認められている。これらの事実より, 敗血症患者ではエンドトキシンにより活性化された補体, あるいはサイトカインにより好中球が過剰に活性化され, 脱顆粒の進行や膜上の補体受容体が増加している。また, 好中球は刺激時に細胞内ATPを増大させることなく消費する²¹⁾ため, 好中球自体が疲弊していると推測される。高濃度エンドトキシンを静注した場合 (III群) には, 活性化補体やサイトカインなどによって好中球の過剰な活性化が起こり, 補体受容体CR3の増加にみられ

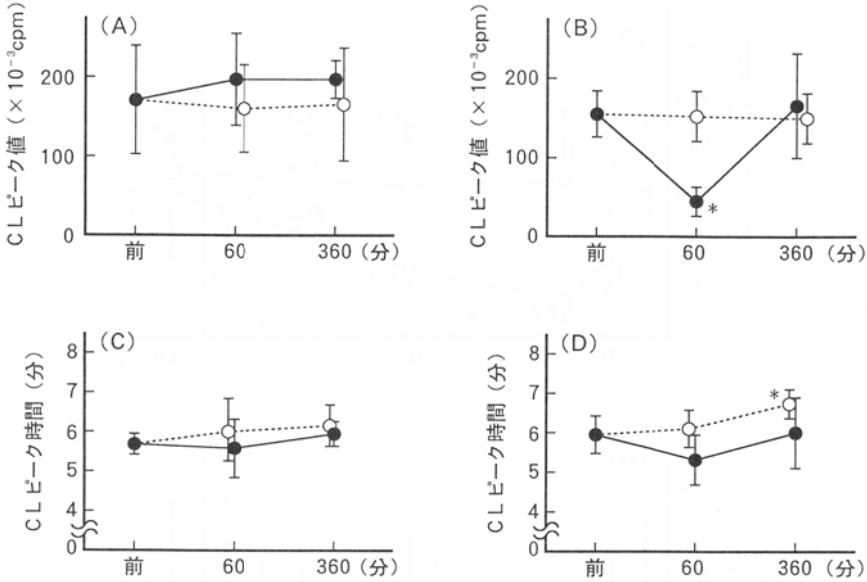


図 4 好中球とプール血漿を組み合わせた CL ピーク値とピーク時間

エンドトキシン $0.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (II 群, $n=10$), エンドトキシン $70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (III 群, $n=10$) をおのおの静注し, 前後のプール血漿と好中球を組み合わせて CL 測定を行った。(A) は II 群の, (B) は III 群の CL ピーク値の変化を示し, (C) は II 群の, (D) は III 群の CL ピーク時間の変化を示す。●は静注前のプール血漿と各時間の好中球を用いて, ○は各時間のプール血漿と静注前の好中球を用いて測定した。表示は平均値 \pm SD で行っている。静注前のプール血漿と静注前の好中球を用いた CL ピーク値を対照にして群内比較を行い, * : $P < 0.05$ 。

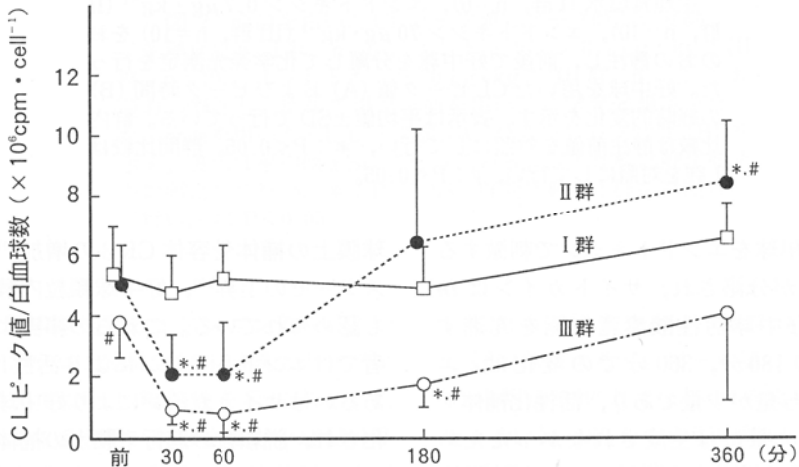


図 5 全血を用いた CL ピーク値/白血球数の変動

生理食塩水 (I 群, $n=6$), エンドトキシン $0.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (II 群, $n=10$), エンドトキシン $70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (III 群, $n=10$) をおのおの静注し, 前後での全血を用いた CL ピーク値を白血球数で除した。表示は平均値 \pm SD で行っている。群内比較は静注前値を対照にして行い, * : $P < 0.05$ 。群間比較は I 群を対照にして行い, # : $P < 0.05$ 。

るオプソニン受容体の機能が亢進したが、同時に脱顆粒の進行や好中球内 ATP 減少により、CL 測定時のザイモザン刺激に対する反応が低下したと推測される。一方、急性感染症時に幼若な顆粒球が末梢血中に出現することが知られているが、幼若なほど走化性や活性酸素産生能が低下する²²⁾。III 群の 30 分、60 分、180 分での変化は、このような機序によっても説明される。

殺菌過程のどの段階が活性化あるいは抑制されて、CL 測定値の変動をもたらしているかは明らかではない。また、高濃度のエンドトキシン投与により好中球殺菌能を抑制する因子を明らかにする必要がある。

以上より、軽度のエンドトキシン血症時には好中球自体の貪食殺菌能が亢進する。しかし、重症エンドトキシン血症時には好中球減少に伴う生体側の殺菌能の低下のほかに、好中球自体の貪食殺菌能の抑制が起こることが示された。したがって、細菌感染症を重症化させない、重症化しても早期に回復させることが好中球機能の面から考えても重要である。

稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜りました平川方久教授に深く感謝致しますとともに、直接指導して頂いた板野義太郎助手、赤尾正樹博士に感謝致します。

本稿の要旨は第 40 回日本麻酔学会総会 (1993 年、盛岡市) にて発表した。

引用文献

- 1) Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, et al: Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. Arch Surg 115: 136, 1980
- 2) Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med 320: 365, 1989
- 3) Barbour AG, Allred CD, Solberg CO, et al: Chemiluminescence by polymorphonuclear leukocytes from patients with active bacterial infection. J Infect Dis 141: 14, 1980
- 4) 赤尾正樹, 物部容子, 浅雄保宏ほか: ICUにおける感染症患者の全血ケミルミネッセンス. ICUとCCU 16: 337, 1992
- 5) Salo M, Perttilä J, Lehtonen O-P: Granulocyte chemiluminescence in patients with postoperative infections. Arch Surg 123: 17, 1988
- 6) Lanser ME, Mao P, Brown G, et al: Serum-mediated depression of neutrophil chemiluminescence following blunt trauma. Ann Surg 202: 111, 1985
- 7) 小原 進: ケミルミネッセンス法による術前・術後の好中球機能に関する研究. ICUとCCU 12: 401, 1988
- 8) 中野 稔: 発光化合物を用いる, 顆粒球, マクロファージの酸化種生成能の測定法. 炎症 5: 277, 1985
- 9) Grebner JV, Mills EL, Gray BH, et al: Comparison of phagocytic and chemiluminescence response of human polymorphonuclear neutrophils. J Lab Clin Med 89: 153, 1977
- 10) Ewetz L, Palmblund J, Thore A: The relationship between luminol chemiluminescence and killing of Staphylococcus aureus by neutrophil granulocytes. Blut 43: 373, 1981
- 11) Tono-oka T, Ueno N, Matsumoto T, et al: Chemiluminescence of whole blood. 1. A simple and rapid method for the estimation of phagocytic function of granulocytes and opsonic activity in whole blood. Clin Immunol Immunopathol 26: 66, 1983
- 12) Dwenger A, Schweitzer G, Regel G: Bronchoalveolar lavage fluid and plasma proteins, chemiluminescence response and protein contents of polymorphonuclear leukocytes from blood and lavage fluid in traumatized patients. J Clin Chem Clin Biochem 24: 73, 1986
- 13) Sample AK, Czuprynski CJ: Priming and stimulation of bovine neutrophils by recombinant human interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha. J Leukoc Biol 49: 107, 1991
- 14) Klausman M, Pflüger K-H, Krumweih D, et al: Stimulation of oxidative metabolism of granulocytes by recombinant granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor and conditioned medium of a urinary bladder carcinoma cell line. Blut 54: 307, 1987
- 15) Berton G, Zeni L, Cassatella MA, et al: Gamma interferon is able to enhance the oxidative

Yasuhiro ASAO

*Department of Anesthesiology and Resuscitology,
Okayama University Medical School, Okayama, 700*

metabolism of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 138 : 1276, 1986

16) Borish L, Rosenbeum R, Albury L, et al : Activation of neutrophils by recombinant interleukin-6. *Cell Immunol* 121 : 280, 1989

17) Miyata T, Torisu M : Plasma endotoxin levels and functions of peripheral granulocytes in surgical patients with respiratory distress syndrome. *Jpn J Surg* 16 : 412, 1986

18) Solomkin JS, Jenkins MK, Nelson RD, et al : Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. *Surgery* 90 : 319, 1981

19) Cardinali M, Padalino P, Vesconi S, et al : Complement activation and polymorphonuclear neutrophil leukocyte elastase in sepsis. Correlation with severity of disease. *Arch Surg* 127 : 1219, 1992

20) Tellado JM, Christou NV : Critically ill anergic patients demonstrate polymorphonuclear neutrophil activation in the intravascular compartment with decreased cell delivery to inflammatory foci. *J Leukoc Biol* 50 : 547, 1991

21) Borregaard N, Herlin T : Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest* 70 : 550, 1982

22) Glasser L, Fiederlein RL : Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 69 : 937, 1987

(1993. 7. 19 —特掲—)

ABSTRACT

The Effect of Endotoxin on the Neutrophil Chemiluminescence in the Rabbit

To examine the effects of endotoxin on the neutrophil function, neutrophil-dependent microbicidal activities were evaluated by the chemiluminescence (CL) method in rabbits injected with endotoxin. Six rabbits in the first group were administered saline intravenously as control. Ten rabbits each in the second and third group received endotoxin $0.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ respectively. Luminol-dependent CL in whole blood (whole blood CL) and in isolated neutrophils (neutrophil CL) were examined before administration and 30, 60, 180 and 360 min after administration.

Peak values of whole blood CL in the second group were significantly depressed at 30 and 60 min, and elevated at 360 min. Those in the third group were depressed more than in the second group at all times after endotoxin administration. Peak values of neutrophil CL in the second group at 180 and 360 min were significantly elevated, but those in the third group at 30, 60, 180 min were markedly depressed. Experiments combining neutrophils and pooled plasma revealed that these CL responses were associated with the neutrophils themselves.

It is speculated that the neutrophil suppression observed in the third group was caused by the overactivation of neutrophils induced by the activated complements and some other stimulating factors, and/or may be due to the abundant appearance of immature granulocytes with lesser activities.