

Myelodysplastic syndrome (MDS) 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

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

稲 垣 登 稔

(平成5年9月3日受稿)

Key words : superoxide anion, myelodysplastic syndrome (MDS)

緒 言

生体防御機構は、皮膚・粘膜などの局所的防御機構から顆粒球、単球-マクロファージによる貪食・殺菌機構、リンパ球による液性免疫、細胞性免疫まで複雑に絡み合いながら構成されているが、そのなかでも顆粒球、特に好中球における貪食・殺菌機構は感染初期の防御機構において極めて重要な位置を占めるものである。好中球による感染防御は「遊走→貪食→消化・殺菌」という一連の過程において発揮されるが、殺菌機構はさらに酸素依存性殺菌機構と酸素非依存性殺菌機構によって構成される。前者における生化学的反応としては、好中球の著明な酸素消費、五炭糖リン酸化回路の活性化、そして活性酸素の産生が注目され¹⁻³⁾、なかでも活性酸素の重要性については、貪食能は正常であるが、活性酸素産生能に障害を持つ慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease : CGD) で、乳幼児期より重篤な感染症を繰り返すことから明らかである^{4,5)}。貪食に伴って産生される活性酸素には、Superoxide anion (O_2^-)、Hydrogen peroxide (H_2O_2)、Hydroxyl radical ($\cdot OH$)、Singlet oxygen (1O_2) が知られているが、 O_2^- はそれ自体では強い殺菌作用は有しておらず、 O_2^- から生成される H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 1O_2 が強力な殺菌作用を有しているとされている。しかし反応初期段階において生成される O_2^- の重要性を否定することはできず、各種病態における易感染性の問題が好中球 O_2^- 産生能の面から広く検討されているところである⁶⁻⁸⁾。

さて Myelodysplastic syndrome (MDS)⁹⁾ は、1982年 French-American-British co-operative group (FAB group) により提唱された疾患概念で、主に末梢血あるいは骨髓内芽球比率等から、Refractory anemia (RA)、RA with ringed sideroblasts (RARS)、RA with excess of blasts (RAEB)、Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)、RAEB in transformation (RAEB-t) と大別されるが、これまで前白血病状態 (Preleukemic state, Preleukemic syndrome) として取り扱われていた病態を prospective に総括したものと云える。本症は高齢層に多く認められる原発性かつ後天性の骨髓障害であり、末梢血球減少と各種血球の形態異常などを特徴とし、一般に骨髓は正形成あるいは過形成を示すとされているが、血球減少と異形成の形態異常が赤芽球系、顆粒球系、巨核球系と複数の血球系にわたり認められること、さらに Raskindら¹⁰⁾ による G6PD isozyme の成績から、本症は多能性造血幹細胞の質的異常に起因する clonal hemopathy と考えられている。すでに本症の予後が、白血病化率をふくめ報告されているが¹¹⁻¹⁹⁾、その予後は白血病以外に感染や出血など、いわゆる骨髓不全に起因する合併症によって大きく左右される。なかでも感染合併については好中球数が比較的保たれているにもかかわらず致死の感染に至ることが多く、本症における好中球機能の検討は易感染性の解明のみならず、前白血病状態における血球の分化・成熟過程を機能面から解析・把握する上において極めて重要な情報を提供するものと思われる。

今回、著者は以上の観点にたち、MDSにおける好中球 O_2^- 産生能を検討することによって本症における血球形態異常と機能異常との関連、さらにまた易感染性の問題を解析し、本症における病態特異性の解析と臨床管理に対する一助とせんとした。

対象並びに方法

1. 対象

対象は Primary MDS 15例(年齢39—78歳(中央値63歳) 男女比11:4)である。診断は FAB 分類に準じ、骨髓の Cellularity の検討は原則として骨髓生検によった。病型別頻度は、RAEB 11例、RAEB-t 4例であったが、RAEB 11例中5例は RAEB with hypoplastic marrow²⁰⁾症例であった。なお、正常健康人134例、急性白血病未治療例17例を対照とした。

2. 方法

1) 好中球の分離

肘静脈よりヘパリン加静脈血 8 ml を得、6% デキストラン生食水を 5:1 の割合で加え、室温に 25~30 分間静置後得た Buffy coat を 3 ml の Ficol-Hypaque mixture (9% Ficol:32.8% メトリゾ酸ナトリウム=24:10) 入りプラスチック試験管に静かに重層し、500g 4℃で30分間遠沈後上層を捨て、好中球と赤血球に富む沈

層を採取した。これに 5 ml の氷冷蒸留水を加え pipetting 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し、その後 150g 4℃で10分間遠沈後、上清を捨て、pH7.4 Klebs Ringer Phosphate Buffer (KRP) 3 ml を加え、2回洗浄したのち、KRP 0.5~1.0 ml を加え好中球浮遊液を作成し、細胞数を計算後氷冷中にて保存した。

2) O_2^- 測定法

O_2^- の測定は 65 μ M 酸化型 Cytochrome C, 0.005mM Glucose を含む KRP に好中球を $0.1\sim 0.2\times 10^6$ 個/ml の濃度で加え、37℃ 5分間インキュベートし、ついで Concanavale A (ConA) と Cytochalasin D (CytD) をそれぞれ 100 μ g/dl, 20 μ g/dl の最終濃度となるように同時添加し、最終反応液量を 2.0ml とした。なお ConA は生食水に、CytD は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。測定は産生される O_2^- による Cytochrome C の還元を波長 550nm における吸光度変化として、double beam spectrophotometer UV-210A (島津) を用いて測定し、紙送りスピード 15mm/min にて経時的に記録し、好中球 10^6 個当りの産生能 (nmol/min/ 10^6 PMNs) として表現した (図 1)。なお、測定は全例未治療期に行い、有意差検定は t 検定によった。

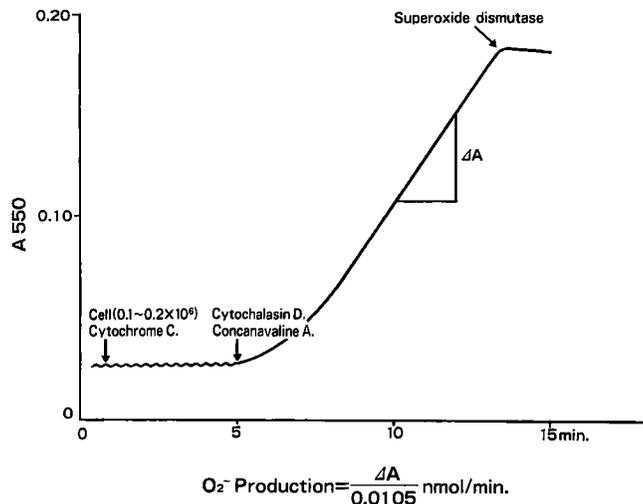


図 1 好中球 O_2^- 産生曲線

表1 MDS 診断時の末梢血所見

| Case | Age/Sex | RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$) | Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$) | WBC ($/\mu\text{l}$) | Mybl* (%) | NAP score | MPO(-) Neutrophils(%) |
|------------------------------|---------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| RAEB | | | | | | | |
| 1 | 50/F | 223 | 6.8 | 2000 | 1.0 | 4 | 15.0 |
| 2 | 76/M | 302 | 13.9 | 1700 | 0 | N.E | 0 |
| 3 | 66/M | 289 | 8.8 | 5300 | 5.0 | 223 | 0 |
| 4 | 56/M | 211 | 18.0 | 2200 | 0 | 172 | 0 |
| 5 | 64/F | 297 | 6.0 | 2300 | 1.0 | 226 | N.E |
| 6 | 62/M | 252 | 3.6 | 3000 | 0 | 294 | 0 |
| RAEB with hypoplastic marrow | | | | | | | |
| 7 | 72/M | 223 | 3.6 | 3600 | 0 | 414 | 0 |
| 8 | 78/F | 190 | 2.7 | 5900 | 5.0 | 413 | 18.0 |
| 9 | 42/M | 339 | 2.1 | 4800 | 0 | 92 | 0 |
| 10 | 68/M | 296 | 1.6 | 2100 | 2.0 | N.E | 0 |
| 11 | 59/M | 275 | 13.1 | 5500 | 1.0 | N.E | 0 |
| RAEB-t | | | | | | | |
| 12 | 64/M | 346 | 2.0 | 1800 | 0 | 21 | 3.0 |
| 13 | 56/M | 263 | 29.5 | 2900 | 0 | 231 | N.E |
| 14 | 60/F | 256 | 9.1 | 1600 | 0 | 319 | 5.0 |
| 15 | 68/M | 306 | 1.1 | 8500 | 1.0 | 277 | 5.0 |

N.E : not examined * : Type I + Type II

成 績

1. 血液学的検討

初診時末梢血所見, 骨髄所見は表1, 2に示すごとくで, 汎血球減少例が5例, 2血球系の減少例が9例, 1血球系の減少例が1例認められた。好中球アルカリフォスファターゼ(NAP)値は検討し得た12例中2例に著明な低値を認め, Ringed sideroblastは13例中6例(症例2:32%, 症例3:2%, 症例4:31%, 症例5:84%, 症例8:36%, 症例13:10%)に認められた。なお, 染色体分析では, 8例中5例に異常核型(症例1:46, XX, 9p-, 16q+, 症例2:47, XY, +c, 症例3:45, XY, -18/45, XY, -19/47, XY, +c, 症例5:46, XX/46, XX, 1p+, 症例12:45, X, -Y)が認められた。

2. MDSにおける好中球 O_2^- 産生能

MDS15例における好中球 O_2^- 産生能は図2上段に示すごとく, $3.73 \pm 2.93 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ PMNs}$ と, 急性白血病未治療例 $4.69 \pm 1.97 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ PMNs}$, 正常健康人 6.20 ± 1.53

$\text{nmol/min}/10^6 \text{ PMNs}$ に比し低値であった。しかしMDSではバラツキが大きく, ほとんど産生能の認められなかった症例から正常範囲の症例まで存在していた。つぎに病型別に検討したが, その結果は図2中・下段に示すごとくで, RAEBでは $2.85 \pm 2.49 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ PMNs}$, RAEB-tでは $6.17 \pm 2.93 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ PMNs}$ と前者で低下が認められた。一方, 骨髄が正形成あるいは過形成を示したいわゆる typical RAEB と骨髄が低形成を示した RAEB with hypoplastic marrow では各々 $3.28 \pm 2.43 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ PMNs}$, $2.33 \pm 2.20 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ PMNs}$ と, 両者間に有意の差は認められなかった。

3. 骨髄内芽球比率と好中球 O_2^- 産生能との関連

MDS 15例と急性白血病23例(未治療例, 寛解例をふくむ)を対象として, 好中球 O_2^- 産生能と骨髄内芽球比率(O_2^- 測定時)との関連について検討した。その結果は図3に示すごとくで, 急性白血病においては有意の逆相関($r = -0.55$, $p < 0.01$)が認められたが, MDSでは相関関係

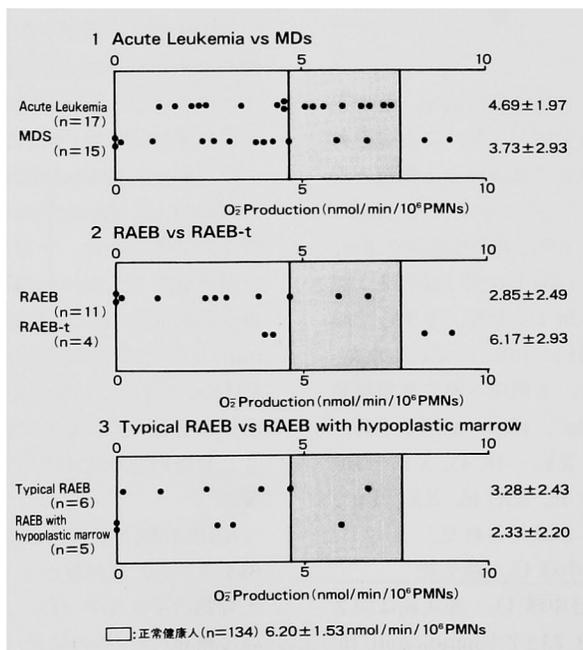
表2 MDS 診断時の骨髓所見

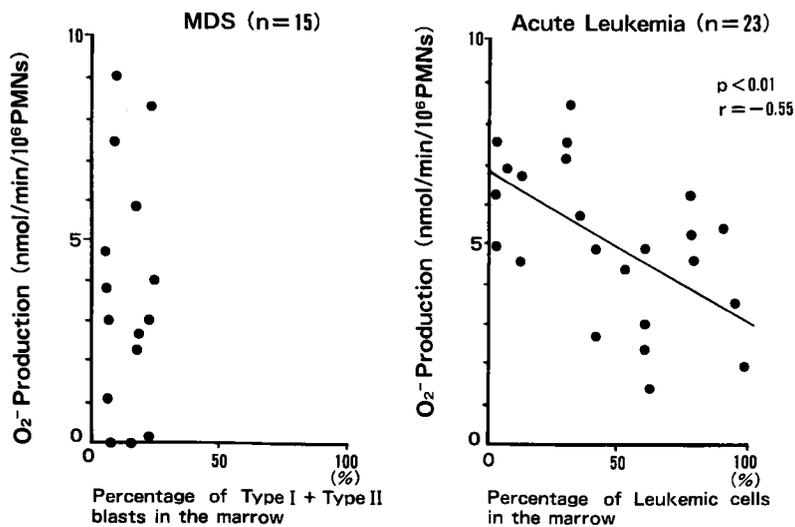
| Case | Age/Sex | Cellularity | Erybl (%) | Mybl** (%) | Ringed Sideroblast (%) | Karyotype |
|-------------------------------------|---------|---------------|-----------|------------|------------------------|--|
| RAEB | | | | | | |
| 1 | 50/F | Normoplastic* | 2.8 | 19.8 | 0 | 46, XX, 9p ⁻ , 16q ⁺ |
| 2 | 76/M | Hypercellular | 49.6 | 6.4 | 32 | 46, Y, +c |
| 3 | 66/M | Normocellular | 43.0 | 9.6 | 2 | 45, XY, -18/45, XY, -19 47, XY, +c |
| 4 | 56/M | Normoplastic* | 17.2 | 14.2 | 31 | 46, XY |
| 5 | 64/F | Normoplastic* | 40.4 | 6.8 | 84 | 46, XX/46, XX, 1q ⁺ |
| 6 | 62/M | Hyperplastic* | 35.4 | 6.4 | 0 | 46, XY |
| RAEB with hypoplastic marrow | | | | | | |
| 7 | 72/M | Hypoplastic* | 48.0 | 17.6 | 0 | N.E |
| 8 | 78/F | Hypoplastic* | 51.4 | 6.8 | 36 | N.E |
| 9 | 42/M | Hypoplastic* | 22.6 | 6.4 | 0 | N.E |
| 10 | 68/M | Hypoplastic* | 7.0 | 16.0 | N.E | N.E |
| 11 | 39/M | Hypoplastic* | 5.5 | 15.5 | N.E | N.E |
| RAEB-t | | | | | | |
| 12 | 64/M | Normocellular | 22.6 | 26.0 | 0 | 45, X, -Y |
| 13 | 56/M | Normocellular | 34.0 | 25.8 | 10 | N.E |
| | | | | Auer(+) | | |
| 14 | 60/F | Normocellular | 14.6 | 9.4 | 0 | N.E |
| | | | | Auer(+) | | |
| 15 | 68/M | Normoplastic* | 27.2 | 22.4 | 0 | 46, XY |

N.E : not examined

* : decided by bone marrow biopsy

** : Type I + Type II

図2 病態と好中球 O_2^- 産生能との関連

図3 骨髓内芽球比率と好中球 O_2^- 産生能との関連表3 顆粒球系形態異常出現頻度ならびに染色体分析と好中球 O_2^- 産生能との関連

| Case | 病型 | O_2^- 産生能* | Morphological anomalies | MPO(-) Neutrophils(%) | NAP score | Karyotype |
|----------|--------|--------------|--|-----------------------|-----------|---------------------------------------|
| 形態異常高頻度群 | | | | | | |
| 1 | RAEB | 0.13 | Hypogranularity Binucleated cell | 15.0 | 4 | 46, XX, 9p-, 16q+ |
| 4 | RAEB | 2.38 | Pseudo P-H anomaly | 0.0 | 172 | 46, XY |
| 8 | RAEB** | 0.00*** | Pseudo P-H anomaly Binucleated cell | 18.0 | 413 | N.E |
| 10 | RAEB** | 2.68 | Pseudo P-H anomaly Binucleated cell | 0.0 | N.E | N.E |
| 11 | RAEB** | 0.00*** | Pseudo P-H anomaly | 0.0 | N.E | N.E |
| 形態異常低頻度群 | | | | | | |
| 2 | RAEB | 4.76 | Hypersegmentation Giant granule | 0.0 | N.E | 47, XY, +C |
| 3 | RAEB | 7.44 | Pseudo P-H anomaly Binucleated cell | 0.0 | 223 | 45, XY, -18/45, XY, -19 47, XY, +C |
| 5 | RAEB | 1.07 | Binucleated cell | N.E | 226 | 46, XX/46, XX, 1q+ |
| 6 | RAEB | 3.88 | Binucleated cell | 0.0 | 94 | 46, XY |
| 7 | RAEB** | 5.91 | Binucleated cell | 0.0 | 413 | N.E |
| 9 | RAEB** | 3.05 | Pseudo P-H anomaly | 0.0 | 92 | N.E |
| 12 | RAEB-t | 4.17 | Binucleated cell Hypogranularity | 3.0 | 21 | 45, X, -Y |
| 13 | RAEB-t | 8.33 | Binucleated cell | N.E | 231 | N.E |
| 14 | RAEB-t | 9.01 | Binucleated cell | 5.0 | 319 | N.E |
| 15 | RAEB-t | 3.88 | Binucleated cell | 5.0 | 277 | 46, XY |

* : nmol/min/ 10^6 PMNs ** : RAEB with hypoplastic marrow *** : not determined N.E : not examined

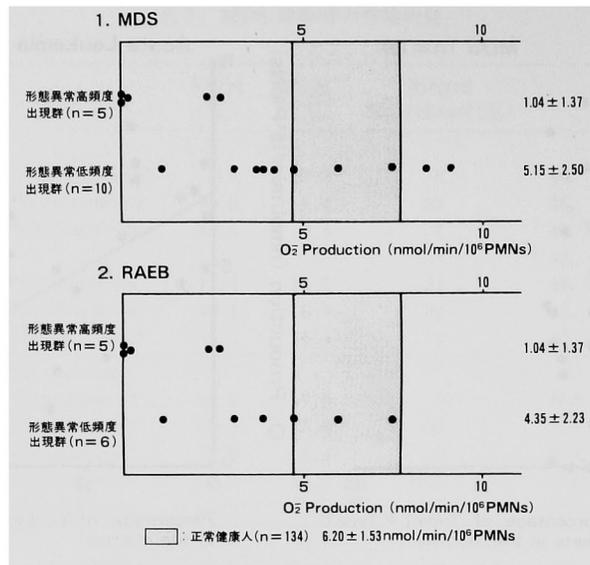
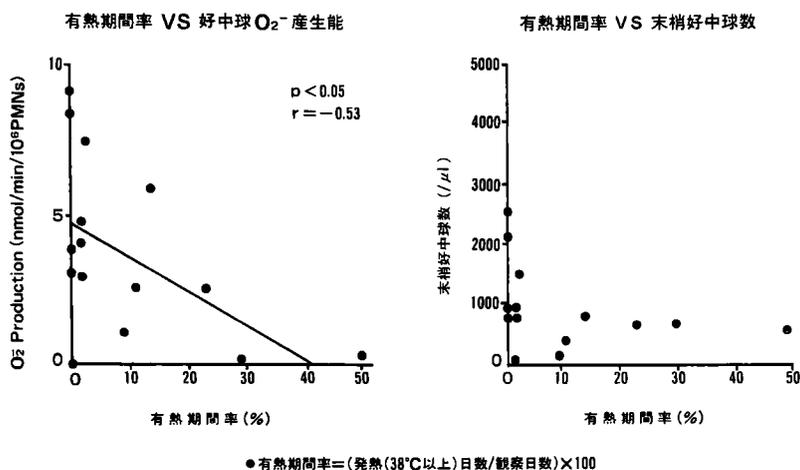


図4 顆粒球形態異常出現頻度と好中球 O₂⁻ 産生能との関連

表4 感染合併と好中球 O₂⁻ 産生能との関連

| Case | 病型 | 感染エピソード (回) | 発熱日数/観察日数 (有熱期間率) | 末梢好中球数 (/μl) | O ₂ ⁻ 産生能* | 抗菌性化学療法の効果 | 直接死因(起炎菌) |
|----------------|--------|-------------|-------------------|--------------|----------------------------------|------------|-------------------------|
| 有熱期間高率群 | | | | | | | |
| 1 | RAEB | 1 | 60/120 (50.0%) | 620 | 0.13 | (-) | Pneumonia (Aspergillus) |
| 4 | RAEB | 1 | 299/125 (23.2%) | 647 | 2.38 | (+) | Sepsis (Unkown) |
| 7 | RAEB** | 8 | 50/360 (13.9%) | 756 | 5.91 | (-) | Pneumonia (Candida) |
| 8 | RAEB** | 10 | 60/210 (28.6%) | 649 | 0.00*** | (-) | Pneumonia (Pseudomonas) |
| 10 | RAEB** | 4 | 16/150 (10.7%) | 378 | 2.68 | (-) | Sepsis (Klebsiella) |
| 有熱期間低率群 | | | | | | | |
| 2 | RAEB | 4 | 20/1200 (1.7%) | 136 | 4.76 | (+) | |
| 3 | RAEB | 1 | 7/250 (2.8%) | 1537 | 7.44 | (+) | Heart failure |
| 5 | RAEB | 3 | 12/135 (8.9%) | 161 | 1.07 | (+) | Cerebral bleeding |
| 6 | RAEB | 0 | 0/119 (0.0%) | 2160 | 3.88 | | Heart failure |
| 9 | RAEB** | 1 | 3/135 (2.2%) | 912 | 3.05 | (+) | GI-Bleeding |
| 11 | RAEB** | 0 | 0/38 (0.0%) | 2475 | 0.00*** | | Cerebral bleeding |
| 12 | RAEB-t | 2 | 7/480 (1.5%) | 882 | 4.17 | (+) | Sepsis (Unkown) |
| 13 | RAEB-t | 0 | 0/120 (0.0%) | 957 | 8.33 | | Heart failure |
| 14 | RAEB-t | 0 | 0/120 (0.0%) | 864 | 9.03 | | Pneumonia (Unkown) |
| 15 | RAEB-t | 0 | 0/22 (0.0%) | 4845 | 3.16 | | Pneumonia (Candida) |

* : nmol/min/10⁶PMs ** : RAEB with hypoplastic marrow *** : not determinated (+) : 有効 (-) : 無効

図5 有熱期間率と好中球 O_2^- 産生能, 末梢好中球数との関連表5 病型移行と好中球 O_2^- 産生能との関連

| Case | 病型 | O_2^- 産生能* | 確定診断からの生存期間(M) | 病型移行からの生存期間(M) |
|--------|--------------------------------|--------------|----------------|----------------|
| 病型移行群 | | | | |
| 1 | RAEB →RAEB-t | 0.13 | 7.0 | 2.0 |
| 4 | RAEB →RAEB-t | 2.38 | 27.0 | 12.3 |
| 9 | RAEB** →RAEB-t →Acute leukemia | 3.05 | 23.0 | 17.0 |
| 10 | RAEB** →RAEB-t | 2.68 | 5.0 | 1.0 |
| 12 | RAEB-t →Acute leukemia | 4.17 | 20.5 | 5.5 |
| 13 | RAEB-t →Acute leukemia | 8.33 | 6.0 | 2.5 |
| 14 | RAEB-t →Acute leukemia | 9.01 | 10.0 | 4.0 |
| 病型非移行群 | | | | |
| 2 | RAEB | 4.76 | 48.0+ | |
| 3 | RAEB | 7.44 | 9.0 | |
| 5 | RAEB | 1.07 | 21.0 | |
| 6 | RAEB | 3.88 | 6.3 | |
| 7 | RAEB** | 5.91 | 12.0 | |
| 8 | RAEB** | 0.00*** | 4.0 | |
| 11 | RAEB** | 0.00*** | 21.0 | |
| 15 | RAEB-t | 3.18 | 4.5 | |

* : nmol/min/ 10^6 PMNs

** : RAEB with hypoplastic marrow

*** : not determined

は認められなかった。

4. 顆粒球系細胞における形態異常出現頻度, 細胞内酵素活性, 染色体所見と好中球 O_2^- 産生能との関連

各症例における好中球 O_2^- 産生能, 顆粒球系細胞における形態異常出現頻度, 細胞内酵素活

性, 染色体所見は表3に示すごとくで, 形態異常としては偽ベルゲル核異常, 2核の未熟顆粒球, 顆粒の減少, 過分葉好中球, 巨大顆粒のいずれかが全例に認められた。その中でも特に出現頻度が高かった5症例を「形態異常高頻度群」とし, 「形態異常低頻度群」と好中球 O_2^- 産生

能を比較検討した結果、図4に示すごとく、「形態異常高頻度群」における好中球 O_2^- 産生能は $1.04 \pm 1.37 \text{ nmol/min/}10^6 \text{ PMNs}$ 、「形態異常低頻度群」においては $5.15 \pm 2.50 \text{ nmol/min/}10^6 \text{ PMNs}$ と前者で有意 ($p < 0.05$) の低下が認められた。また RAEB 症例に限定し、同様の検討をおこなったところ、「形態異常高頻度群」における好中球 O_2^- 産生能は $1.04 \pm 1.37 \text{ nmol/min/}10^6 \text{ PMNs}$ 、一方「形態異常低頻度群」では $4.35 \pm 2.23 \text{ nmol/min/}10^6 \text{ PMNs}$ と前者に有意 ($p < 0.05$) の低下が認められた。また Myeloperoxidase (MPO) 陰性好中球の出現率、NAP値、染色体異常との関連についても検討を行ったが、一定の傾向は認められなかった。

5. 感染合併と好中球 O_2^- 産生能との関連

有熱期間率〔発熱日数(薬剤、輸血などを除外し 38°C 以上の発熱を呈した日数)/観察日数〕が10%を超える症例を「有熱期間高率群」、10%未満のものを「有熱期間低率群」とし、各群の好中球 O_2^- 産生能、抗菌化学療法効果、直接死因について検討した。その結果は表4に示すごとくで、まず「有熱期間高率群」は5例認められ、全例 RAEB 症例であった。これら症例では、1例を除き好中球 O_2^- 産生能は著明な低値

を示し、また1例を除き末梢好中球数は $500/\mu\text{l}$ 以上であったにもかかわらず、抗菌化学療法に抵抗性を示し、感染症が遷延する傾向を認めた。直接死因としては感染症によるものが8例(肺炎5例、敗血症3例)と高率であり、以下出血3例(脳出血2例、消化管出血1例)、心不全3例で、「有熱期間高率群」の5例は全例感染症を直接死因とするものであった。なお「有熱期間高率群」、「有熱期間低率群」における好中 O_2^- 産生能は各々 $2.22 \pm 2.15 \text{ nmol/min/}10^6 \text{ PMNs}$ 、 $4.49 \pm 2.83 \text{ nmol/min/}10^6 \text{ PMNs}$ であった。つぎに「有熱期間率と好中球 O_2^- 産生能」との関係、「有熱期間率と末梢好中球数」との関係を検討したが、その結果は図5に示すごとくで「有熱期間率と好中球 O_2^- 産生能」との間に逆相関 ($r = -0.53$, $p < 0.05$) が認められた。

6. 病型移行と好中球 O_2^- 産生能との関連

観察期間中の病型移行は、表5に示すごとくで、「RAEB→RAEB-t」が4例、「RAEB-t→Acute leukemia」が3例と計7例に病型移行が認められた。病型移行群と非移行群の好中球 O_2^- 産生能は図6に示すごとくで、各々 $4.25 \pm 3.26 \text{ nmol/min/}10^6 \text{ PMNs}$ 、 $3.28 \pm 2.76 \text{ nmol/min/}10^6 \text{ PMNs}$ と差は認められず、RAEB 症例に限定

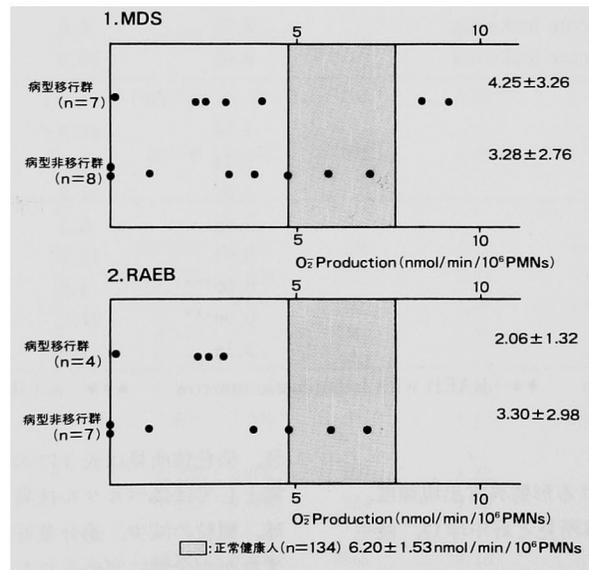


図6 病型移行と好中球 O_2^- 産生能との関連

した場合でも病型移行群の好中球 O_2^- 産生能は $2.06 \pm 1.32 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$, 非移行群の好中球 O_2^- 産生能は $3.30 \pm 2.98 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ と両者間に有意差は認められなかった。

考 察

MDS は高年齢層に多く認められる原発性かつ後天性の骨髄障害で、末梢血における血球減少、骨髄の正形成あるいは過形成とともに各種血球系の形態異常を特徴とする clonal hemopathy であり、従来よりいわれる前白血球状態に相当する疾患概念である。近年、分子生物学的検索の進歩により本症における ras 癌遺伝子の one point mutation による活性化²¹⁾等が報告され、その病因についても次第に解明されつつあるところである。また本症の臨床的特徴の一つに、易感染性の問題があり、本症における白血球機能の検討は、前白血球状態という血球の分化、成熟異常状態と血球機能異常の関連を明らかにするのみならず、易感染性というきわめて臨床的な意味において、一つの指針を供するものと考えられる。

すでに MDS における白血球機能について、Schreiner ら²²⁾は殺菌機能の低下を、Schofield ら²³⁾は Myeloperoxidase 活性と Lactoferrin 活性の低下を、Martin ら²⁴⁾は貪食能と殺菌能の低下を、また Boogaerts ら²⁵⁾は粘着能・走化性・Myeloperoxidase 活性・貪食能・化学発光・殺菌能の低下を報告している。今回著者は、MDS 症例における好中球 O_2^- 産生能を検討し、① MDS における好中球 O_2^- 産生能は正常か否か。②異常とすればその原因は何か。またその異常は MDS 全体に普遍化するのか。さらに③血球の形態的分化異常と相関し、④易感染性の背景因子として位置づけが可能なのか、またその検討は⑤白血球化を予知する一つの指針となり得るのか、などについて検討を加えたわけであるが、まず MDS 症例における O_2^- 産生能は $3.73 \pm 2.93 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ と低値を示しており、ことに RAEB 症例では $2.85 \pm 2.49 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ と急性白血病未治療例 $4.69 \pm 1.97 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$, 正常健康人 $6.20 \pm 1.53 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ に比較し低値を示して

いた。しかし、そのバラツキは大きく、症例によってはその産生能がほとんど認められないものから正常域の産生能を示すものまであり各症例間に heterogeneity が存在することが示唆された。また今回、骨髄が正形成あるいは過形成を示すいわゆる typical RAEB と骨髄が低形成を示す RAEB with hypoplastic marrow 症例との比較も行ったが、両群間に差はなく、好中球機能の面から見ると MDS with hypoplastic marrow 症例は、MDS 症例と血球機能の面から同一範囲内で取り扱うことが可能と考えられた。また急性白血病症例、MDS 症例における骨髄内芽球比率と好中球 O_2^- 産生能との関連について検討したところ、急性白血病では負の相関が認められたのに比し、MDS では相関は認められなかった。すでに厚井⁷⁾は、急性白血病症例では骨髄白血球細胞と好中球 O_2^- 産生能との間に負の相関が存在することから、好中球 O_2^- 産生能が低下する機序の一つとして total leukemic mass に起因した体液性因子が関与する可能性を指摘しているが、MDS では急性白血病症例と比較しても好中球 O_2^- 産生能は低値を示し、なおかつ骨髄内芽球比率との間に相関は認められなかった。このことは MDS における好中球 O_2^- 産生能低下が急性白血病と異なった機序に起因することを推定させる。すでに著者らは急性白血病症例における幼若顆粒球の O_2^- 産生能を検討し、 O_2^- 産生能がほとんど認められないことを報告し²⁶⁾、北川ら²⁷⁾は *in vitro* において白血病培養株である HL60 を分化成熟させ、 O_2^- 産生能の検討を行い、産生能が出現することを報告しているが、本症における好中球 O_2^- 産生能の低下は機能的に顆粒球系細胞の跛行的成熟を示唆するものと考えられる。さらにこの点を検討すべく、血球形態異常出現率との関係について検討したが、形態異常の出現頻度の高かった症例 1, 4, 8, 10, 11 の 5 例 (形態異常高頻度群) における O_2^- 産生能は、他の 10 例 (形態異常低頻度群) に比し有意に低値を示し、このことは RAEB 症例に限定しても同様であった。本症では MPO, NAP をはじめとする諸酵素の異常が存在すること、Clark ら²⁸⁾は末梢好中球は形態学的に一見正常に見えるものでもモノク

ローナル抗体を用いた検索により、分化抗原の出現から異常クローン由来と考えられる症例のあることを報告し、Kereら²⁹⁾は7番染色体欠損ないし長腕欠損の核型異常を有するMDS症例において、7番染色体に特異的なDNAプローブを用いたサザンブロット法による検索をおこない、末梢好中球の大部分が異常クローン由来であることを証明している。今回の検討から「形態異常高頻度群」でより強く好中球 O_2^- 産生能の障害が認められたことは、好中球の形態異常と機能異常との間にある程度の関連が存在することを示すと同時に本症における好中球 O_2^- 産生能の低下が異常クローンから機能脱落をともなった跛行的成熟による可能性を強く示唆するものと考えられた。

染色体分析は、急性白血病をはじめ造血器腫瘍における予後因子の一つとして注目されているが、本症においてもその診断的価値・病因的意義のみならず予後判定因子として指摘がされている³⁰⁾。現在まで本症における染色体分析では50%前後の症例になんらかの異常が認められているとされ、なかでも $-5/5q^-$ 、 $-7/7q^-$ が高率に出現している³¹⁾。このうち $-7/7q^-$ 症例において好中球 O_2^- 産生能が低値であったとの報告も認められるが³²⁾、今回の検討では染色体異常と好中球 O_2^- 産生能との間に一定の関連を見出すことはできなかった。

さて造血器腫瘍、特に急性白血病における感染症は重症かつ難治性で致死性の感染の性格を強く持つことから、その臨床管理が問題とされてきた。また本症における感染防御機構の変調が好中球、リンパ球（サブセットの異常）、単球-マクロファージ、粘膜上皮、分泌細胞、個々の臓器構成細胞などの量的あるいは質的変調から検討されてきたが、好中球に代表される貪食細胞の一次的あるいは二次的変調が易感染性の大きな背景因子として位置づけられている。すでに述べたごとくMDSにおける感染合併は、本症における直接死因の大部分を占め、急性白血病と異なり治療戦略が確立していない現在、本症における感染症対策は臨床さきわめて重要な問題と言えよう。今回、著者は本症における易感染性と好中球 O_2^- 産生能との関連を検討すべ

く、有熱期間率〔発熱日数（薬剤、輸血などを除外し 38°C 以上の発熱を呈した日数）/観察日数〕を設定し、好中球 O_2^- 産生能との関連について検討したわけであるが、有熱期間率が10%を超えた「有熱期間高率群」5症例中4例が、急性白血病における感染合併の指標である好中球数が $500/\mu\text{l}$ 以上³³⁾であるにもかかわらず、抗菌性化学療法に抵抗性を示し、全例感染症により死亡していることが判明した。「有熱期間高率群」では「有熱期間低率群」に比し、好中球 O_2^- 産生能は著明な低下を示し、さらに「有熱期間率と好中球 O_2^- 産生能」、「有熱期間率と末梢好中球数」との関連を検討したところ、前者において負の相関傾向が認められた。このことは本症における易感染性の一因として好中球 O_2^- 産生能の低下が存在することを強く示唆するものと考えられる。特に「有熱期間高率群」で好中球 O_2^- 産生能が低値であったことは、今後その測定から臨床管理の方向づけを示すものとして期待される。

MDSにおける白血病化率についてはすでに諸家の報告がみられ、欧米¹²⁻¹⁹⁾ではRAで11~40%、RARSで4~36.4%、RAEBで11~80%、RAEB-tで33.3~71%、CMMLでは0~100%とされ、本邦例を集計した内野ら¹¹⁾の報告ではRAで25.6%、RARSで10.4%、RAEBでは71.1%とされている。MDSの白血病化例は、化学療法に対する反応性が典型的白血病に比し極めて低いことが知られており、また白血病化をふくめた予後推定に、各種血球の量的あるいは形態異常に基づいたScoring法^{15,34,35)}が提案されている。今回の検討から著者は、好中球 O_2^- 産生能の検討が易感染性を介して予後推定に有用であることを明らかにしたが、さらに各症例間にheterogeneityが存在する好中球 O_2^- 産生能が病型移行の一つの指標となりうるか否か興味ある点であろう。今回対象としたMDS15例において、「RAEB→RAEB-t」、「RAEB-t→Acute leukemia」の病型移行が各々4例、3例に認められたが、移行群と非移行群における好中球 O_2^- 産生能の比較では、両群間に有意の差は認められず、このことはRAEB症例のみを対象とした検討でも同様であった。現在、MDSの白血病

化は異常クローンの拡大,あるいは異常クローンにおこる新たな変化の結果と考えられているが,好中球 O_2^- 産生能の検討は病型移行の予測という面においては限界があるものと思われた。

以上本研究においては, MDS における好中球 O_2^- 産生能と病型, 好中球形態異常, 易感染性, 病型移行などとの関連について検討したが, MDS の非白血病死の大部分をしめる感染症の背景には, 好中球 O_2^- 産生能の低下が存在するものと考えられた。またこの機能異常は異常クローンからの跛行的成熟を機能的に示すものと考えられた。また好中球 O_2^- 産生能は MDS における病型, 病型移行と関連を示さなかったが, 感染合併の予知という点では有用であり, その臨床管理において重要な情報を提供するものと考えられた。

結 論

MDS 15例においてその病態と好中球 O_2^- 産生能との関連を追及する目的で, ①好中球 O_2^- 産生能は正常か否か, ②異常とすればその原因は何か。またその異常は MDS 全体に普遍化するのか。さらに③血球の形態的分化異常と関連し, ④易感染性の背景因子として位置づけが可能なのか。またその検討は⑤白血球化の一つの指針となり得るのか。について検討を行った結果, 以下に示す成績を得た。

1. MDS における好中球 O_2^- 産生能は $3.73 \pm 2.93 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ と急性白血病未治療例 $4.69 \pm 1.97 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$, 正常健康人 $6.20 \pm 1.53 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ に比し低値を示し, なかでも RAEB 症例では $2.85 \pm 2.49 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ とより強い好中球 O_2^- 産生能の低下が認められた。

2. MDS における好中球 O_2^- 産生能を各症

例内で検討すると比較的バラツキが大きく各症例間に heterogeneity が存在する可能性が示唆された。

3. 急性白血病では好中球 O_2^- 産生能と骨髓内芽球比率との間に負の相関が認められたが, MDS では相関は認められなかった。

4. 好中球の形態異常と O_2^- 産生能との関連について検討した結果, 「形態異常高頻度群」では $1.04 \pm 1.37 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$, 「形態異常低頻度群」では $5.15 \pm 2.50 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ と前者において有意の低下を認め, 本症における好中球 O_2^- 産生能の低下は, 異常クローンからの機能脱落を伴った跛行的成熟によるものと考えられた。

5. 「有熱期間高率群」における好中球 O_2^- 産生能は $2.22 \pm 2.15 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$, 「有熱期間低率群」で $4.49 \pm 2.83 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ と前者において有意の低下が認められた。また「有熱期間率と好中球 O_2^- 産生能」との間に負の相関傾向が認められ, 好中球 O_2^- 産生能の測定は本症の臨床管理上重要な情報をもたらすものと考えられた。

6. 病型移行と好中球 O_2^- 産生能との関連について検討した結果, 好中球 O_2^- 産生能は移行群では $4.25 \pm 3.26 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$, 非移行群では $3.28 \pm 2.76 \text{ nmol/min/10}^6 \text{ PMNs}$ と差は認められず, 病型移行の予測という面においては限界があるものと考えられた。

本論文の要旨は第30回日本臨床血液学会総会(岡山)において発表した。

稿を終えるにあたり御指導, 御校閲を賜った木村郁郎教授ならびに高橋功講師に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Weening RS, Wever R and Roos D: Quantitative aspect of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes. *J Lab Clin Med* (1974) **83**, 570-576.
- 2) Bachner RL, Murrmann SK, Davis J and Johnston RB: The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis associated oxidative metabolic reaction. *J Clin Invest* (1976) **56**, 571-576.
- 3) Cohes MS, Metcalf JA and Root RK: Regulation of oxygen metabolism in human granulocytes;

- relationship between stimulus binding and oxidative response using plant lectins as probes. *Blood* (1980) **55**, 1003—1010.
- 4) Nakagawara A, Kakinuma K, Shin H, Miyazaki S and Minakani S : Lack of cytochalasin E induced superoxide release by polymorphonuclear leukocytes of patients with chronic granulomatous disease, A new diagnostic test. *Clin Chim Acta* (1976) **70**, 133—137.
 - 5) Curnutte JT, Whitten DM and Babior BM : Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* (1974) **290**, 593—597.
 - 6) 佐野 清 : 糖尿病における白血球の機能に関する研究. 第一編 好中球スーパーオキシド産生能. *岡山医誌* (1979) **91**, 713—722.
 - 7) 厚井文一 : 好中球スーパーオキシド産生能に関する基礎的並びに臨床的研究. 第二編 急性白血病患者における好中球スーパーオキシド産生能に関する研究. *岡山医誌* (1981) **93**, 885—896.
 - 8) 厚井文一 : 好中球スーパーオキシド産生能に関する基礎的並びに臨床的研究. 第三編 好中球スーパーオキシド産生能に及ぼす各種抗白血病剤の影響. *岡山医誌* (1981) **93**, 897—907.
 - 9) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR and Sultan C : Proposal for classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* (1982) **51**, 189—199.
 - 10) Raskind WH, Tirumali N, Jacobson R, Singer J and Fialkow PJ : Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. *Blood* (1984) **63**, 1318—1323.
 - 11) Uchino H : Concise review; Refractory anemia. *Acta Haematol Jpn* (1986) **49**, 1536—1545.
 - 12) Coiffier B, Adeleine P, Viala JJ, Bryon PA, Fiera D, Gentilhomme and Vuvan H : Dysmyelopoietic syndrome : A search for prognostic factors in 193 patients. *Cancer* (1983) **52**, 83—91.
 - 13) Nielsen B, Thielde T, Sundstrom C and Hagberg H : Classification of patients with myelodysplastic syndrome according to the FAB cooperative group's proposal. *Scand J Haematol* (1983) **32**, 531—535.
 - 14) Gold EJ, Conjalka M, Pelus LM, Jhanwar SC, Broxmyer H, Middleton AB, Clarkson BD and Moore MAS : Marrow cytogenetic and cell-culture analysis of the myelodysplastic syndromes; Insight to pathophysiology and pathogenesis. *J Clin Oncol* (1983) **1**, 627—634.
 - 15) Mufti GJ, Stevens JR, Osecier DG, Hamfiln TJ and Machin D : Myelodysplastic syndromes; A scoring system with prognostic significance. *Br J Haematol* (1985) **59**, 425—433.
 - 16) Tricot G, Boogaerts MA, De Wolf-Peeters C, Van den Berghre H and Verwilghen RL : The myelodysplastic syndromes; Different evolution patterns based on sequential morphological and cytogenetic investigations. *Br J Haematol* (1985) **59**, 659—670.
 - 17) Weisdorf DJ, Oken MM, Johnson GJ and Rydell RE : Chronic myelodysplastic syndrome: Short survival with or without evolution to acute leukemia. *Br J Haematol* (1983) **55**, 691—700.
 - 18) Foucar K, Langdon RM, Armitage JO, Olson DB and Carroll TJ : Myelodysplastic syndromes; A clinical and pathologic analysis of 109 cases. *Cancer* (1985) **56**, 553—561.
 - 19) Vallespi T, Torradabella M, Julia A, Irrigible D, Jaen A, Asebedo G and Triginer J : Myelodysplastic syndromes; A study of 101 cases according to the FAB classification. *Br J Haematol* (1985) **61**, 83—92.
 - 20) 仲田浩之, 高橋 功, 竹内 誠, 長田 健, 関藤典子, 林 直樹, 青山重男, 稲垣登稔, 西村正隆, 大本英次郎, 依光聖一, 木村郁郎, 真田 浩, 喜多嶋康一 : Myelodysplastic with hypoplastic marrow の検討. *臨血* (1987) **28**, 206—212.
 - 21) 高久史麿, 平井久丸, 西田淳二 : 前白血病状態におけるトランスフォーミング遺伝子. *癌と化学療法* (1987) **14**, 2170—2175.

- 22) Schreiner A and Solberg CO : Neutrophil dysfunction and granulomatous in the preleukemic state. *Scand J Infect Dis* (1976) **8**, 53—55.
- 23) Schofield KP, Stone PCW, Kelsey P, Leyland MJ and Stuart J : Quantitive cytochemistry of blood neutrophils in myelodysplastic syndromes and chronic granulocytic leukemia. *Cell Biochem Funct* (1983) **55**, 217—227.
- 24) Martin S, Baldock SC, Ghoneim ATM and Child JA : Defective neutrophil function and microbicidal mechanisms in the myelodysplastic disorders. *J Clin Pathol* (1983) **36**, 1120—1128.
- 25) Boogaerts MA, Nelissen V, Roelant C and Goossens W : Blood neutrophil function in primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* (1983) **55**, 217—227.
- 26) Takahashi I, Ohnoshi T, Kohi F, Ohmoto E and Inagaki N : Superoxide anion (O_2^-) production by neutrophils in leukemia and related disease. *Acta Haematol Jpn* (1983) **46**, 1497—1505.
- 27) Kitagawa S and SITO M : Functional and biochemical alternations during differentiation of human granulocytes. *Acta Haematol Jpn* (1983) **46**, 1462—1469.
- 28) Clark RF, Hoy TG and Jacobs A : Granulocytes and monocytes surface membrane marker in the myelodysplastic syndrome. *J Clin Pathol* (1983) **38**, 301—304.
- 29) Kere J, Ruutu T and Chappelle A : Monosomy 7 in granulocytes and monocytes in myelodysplastic syndrome. *N Engl J Med* (1987) **316**, 499—503.
- 30) Koeffler HP : Myelodysplastic syndrome (Preleukemia). *Semin Hematol* (1986) **23**, 284—299.
- 31) 堀池重夫, 谷脇雅史, 稲澤讓治, 奥田 司, 横田昇平, 彌重博巳, 西田一弘, 藪田精昭, 三澤信一, 阿部達生, 瀧野辰郎, 丸尾直幸, 前川 平, 藤井 浩 : Myelodysplastic Syndrome の細胞遺伝学的検討 — 予後因子としての染色体分析の意義. *Acta Haematol Jpn* (1986) **49**, 1377—1389.
- 32) 鶴池直邦, 橋本 通, 武市尚久, 小鶴三男 : 骨髓異常形成症候群における末梢好中球スーパーオキシド産生能低下 — 骨髓細胞染色体核型との関連について —. *臨血* (1989) **30**, 830—834.
- 33) 木村郁郎, 高橋 功 : 抵抗力減弱時の感染症 — 白血病 —. *総合臨床* (1981) **30**, 2135—2140.
- 34) Hanblin JJ and Oscier DG : The myelodysplastic syndrome; a practical guide. *Hematol Oncol* (1987) **5**, 19—34.
- 35) Varela BL, Chang C, Woll JE and Bennett JM : Modification in the classification of primary myelodysplastic syndromes; the addition of a scoring system. *Hematol Oncol* (1985) **3**, 55—63.

**Superoxide anion (O_2^-) production by neutrophils
in myelodysplastic syndrome (MDS)**

Noritoshi INAGAKI

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Myelodysplastic syndrome (MDS) are hematological disorders with the potential of progressing to acute leukemia. MDS patients occasionally die of infection despite the absence of severe pancytopenia prior to overt leukemia. Superoxide anion (O_2^-) production leads to intracellular bactericidal activity by neutrophils, particularly in an oxygen-dependent system. In this paper, O_2^- production by neutrophils in 15 MDS patients [11 patients with refractory anemia with excess of blasts (RAEB) and 4 patients with RAEB in transformation (RAEB-t)] was examined to evaluate possible causes of enhanced susceptibility to infection and to gain information concerning the pathophysiology and prognosis. The following results were obtained :

(1) The O_2^- production by neutrophils (O_2^- production) in 15 MDS patients was lower than that in healthy controls (3.75 ± 2.93 vs 6.20 ± 1.53 nmol/min/ 10^6 neutrophils, $p < 0.05$). Three of the 15 MDS patients showed little O_2^- production.

(2) There was inverse correlation between O_2^- production and the percentage of leukemic cells in the marrow in acute leukemia ($r = 0.55$, $p < 0.01$), but not in MDS.

(3) The O_2^- production in 5 MDS patients showing morphological anomalies in a high percentage of neutrophils significantly lower than that in 10 MDS patients showing morphological anomalies in a low percentage of neutrophils (1.04 ± 1.37 vs 5.15 ± 2.50 nmol/min/ 10^6 neutrophils, $p < 0.05$).

(4) The O_2^- production in 5 patients with frequent fever ($\geq 38^\circ\text{C}$) -episodes was significantly lower than that in 10 MDS patients with infrequent fever-episodes (2.22 ± 2.15 vs 4.49 ± 2.83 nmol/min 10^6 neutrophils, $p < 0.05$).

(5) Comparison of the O_2^- production between MDS patients with and without progression to overt leukemia showed no significant difference (4.25 ± 3.26 vs 3.28 ± 2.76 nmol/min/ 10^6 neutrophils).

These findings suggest that impaired O_2^- production by neutrophils, probably due to the faulty differentiation from abnormal hematopoietic clones, is one possible cause of enhanced susceptibility to infection in MDS, and may provide clues for clinical management of infection, but is not useful for early detection of progression to overt leukemia.