

特殊免疫グロブリンの力価 WHO

- 抗破傷風免疫グロブリン
- 抗狂犬病免疫グロブリン
- 抗B型肝炎ウイルス免疫グロブリン
- 抗水痘免疫グロブリン
- 抗-D（抗-Rho）免疫グロブリン

• >100 IU/mLの特異抗体を含む

静注用免疫グロブリン製剤

- 1. 酵素処理製剤
 - ペプシン処理
 - プラスミン処理
- 2. 完全分子型製剤
 - スルホ化
 - アルキル化
 - PEG処理
 - イオン交換樹脂処理

静注用免疫グロブリンに 求められること

- 毒素、細菌及びウイルスなどに対する抗体が十分に保持されていること
- 生物学的半減期が長いこと
- 非特異的な補体活性化能（抗補体作用）がなく、安全に静注できること
- Fcレセプター保有細胞と結合してオプソニン活性を発揮したり、特異的補体活性化を誘導できるFc活性を保持していること

グロブリン製剤の効能・効果

- 1. 全ての静注用グロブリン
 - 低又は無ガンマグロブリン血症
 - 重症感染症における抗生物質との併用
- 2. 一部のグロブリン製剤
 - 突発性血小板減少性紫斑病（ITP）
- 3. 川崎病の急性期
 - スルホ化人免疫グロブリン

グロブリン製剤の力価

| 免疫グロブリン製剤 | 力価試験 |
|---------------|---------------------|
| 人免疫グロブリン | 麻疹抗体価：>5U/150 mg Ig |
| アルキル化人免疫グロブリン | 麻疹抗体価：>5U/150 mg Ig |
| イオン交換樹脂処理 | 麻疹抗体価：>5U/150 mg Ig |
| スルホ化 | 麻疹抗体価：>5U/150 mg Ig |
| pH 4 処理 | 麻疹抗体価：>5U/150 mg Ig |
| プラスミン処理(液状) | 麻疹抗体価：>5U/150 mg Ig |
| プラスミン処理(乾燥) | 麻疹抗体価：>5U/100 mg Ig |
| PEG 処理 | 麻疹抗体価：>5U/150 mg Ig |
| 抗 HBs(液状) | 抗 HBs 抗体価>200U/mL |
| 抗破傷風(液状) | 破傷風抗毒素価>125U/mL |
| 抗破傷風(乾燥) | 破傷風抗毒素価>50U/m |
| 抗破傷風(PEG 処理) | 破傷風抗毒素価>75U/m |

グロブリン製剤の性状

| | スルホ化 | PEG | pH 4 | アルキル化 | イオン交換 |
|-------------------|-------|-------|--------|-------|-------|
| Fc 活性： オプソニン活性 | + | + | + | + | + |
| Fc 活性： 溶菌活性 | + | + | + | Δ | + |
| 半減期 | 約 25日 | 約 20日 | 16-26日 | 約 21日 | 約 25日 |
| 重症感染症に対する臨床効果 | 60.1% | 55.1% | 58.9% | 52% | 57.1% |
| 副作用発生率 | 0.33% | 0.3% | 3.3% | 0.58% | 1.2% |

免疫グロブリンの管理 WHO

- 静注用免疫グロブリン
 - グロブリン濃度：>30 g/L
 - 少なくとも1,000人以上の健常者の血漿
- 特殊免疫及び筋注用免疫グロブリン
 - グロブリン濃度：100-180 g/L
 - 最終製品中の特異抗体価が重要
 - 供血者数は重要ではない

免疫グロブリン製剤の品質管理

- 力価試験
- 無菌試験
- 安全性試験（異常毒性否定試験）
- 同定試験
- 発熱性物質試験
- 含湿度、水素イオン濃度、安定性

MPO-ANCAの製造・使用

- **製造段階**
 - 高MPO-ANCA血漿の選択
 - 力価の測定法と設定値
 - 免疫グロブリン画分の処理方法
 - 治験薬GMPに準拠
- **治験(臨床試験) 段階**
 - 治験薬製品標準書の作成

治験薬GMP (日本)

- 1. 治験薬の品質の均一性を保証することで、臨床試験の信頼性を確保すること
- 2. 治験薬と市販後製品の同一性を保証することで、製品の有効性と安全性を確保すること
- 3. 治験薬の品質を保証することで、不良な治験薬から被験者を保護すること

免疫グロブリン 小分け製品の試験

| 試験名 | 区分 |
|-------------------|----|
| 外観及び性状試験 | 自規 |
| 含菌度試験 | 生基 |
| 熱安定性試験 | 生基 |
| 比旋光度試験 | 自規 |
| PH試験 | 生基 |
| 免疫グロブリン含量試験 | 生基 |
| セルロースアセテート膜電気泳動試験 | 生基 |
| 免疫化学試験 | 生基 |
| 異種蛋白試験 | 生基 |
| 同定試験 | 生基 |
| 麻疹抗体価試験 | 生基 |
| 発熱試験 | 生基 |
| 異常毒性試験 | 生基 |
| 抗補体性否定試験 | 生基 |
| 無菌試験 | 生基 |

免疫グロブリン 小分け製品の試験

| | |
|-----------------|----|
| 重量偏差試験 | 自規 |
| ガラス容器試験 | 自規 |
| 不溶性異物試験 | 自規 |
| ペプシン残存否定試験 | 自規 |
| アミノ酢酸含量試験 | 自規 |
| 塩化ナトリウム含量試験 | 自規 |
| 浸透圧比試験 | 自規 |
| 免疫グロブリンG重合体否定試験 | 自規 |
| 溶解時間測定試験 | 自規 |
| 透過率試験 | 自規 |
| HBs 抗原試験 | 自規 |
| HCV 抗体試験 | 自規 |
| HCV 抗原試験 | 自規 |
| HIV-1 抗体試験 | 自規 |
| HIV-2 抗体試験 | 自規 |
| HTLV-1 抗体試験 | 自規 |

厚生科学研究費補助金（高度先進医療研究事業）

分担研究報告書

人工抗体に関する研究

分担研究者 内田隆史 東北大学 加齢学研究所 助教授

研究要旨：ScFv 抗体作製技術の検討とマウス MPO 抗体の cDNA ライブラリーの作製を行い、最終的には MPO の多用なエピトープに対応する各種 ScFv 抗体を作製する。

A. 研究目的

1. マウスの ScFv 抗体（一本鎖 V 領域断片）抗体を作成する技術を確立することを目的とする。）
2. マウス MPO 抗体 cDNA ライブラリーの作製。
3. ヒト型 ScFv 抗体を作成する為に準備をする。

B. 研究方法

1. モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから mRNA を精製して、cDNA を調製し、マウスの IgG の H 鎖と L 鎖の保存配列に相当するプライマーを用いて、PCR を行う。この抗体遺伝子の断片を 15 アミノ酸に相当する DNA で連結した ScFvDNA を pCANTAB プラスミド（ファルマシア社、ScFv 抗体作製試薬）に組み込み、大腸菌 TG-1 株に transformation する。pCANTAB プラスミドが導入された菌がとれたら、ヘルパーファージを感染させて、ファージの膜蛋白質と融合させた ScFv を発現させる。目的とする抗原と反応する ScFv 抗体発現ファージをパンニングで単離

する。

2. MPO で免疫したマウスの脾臓から mRNA を採取して、抗 MPO 抗体を ScFv 化する。B-1 で記した方法と同様にして、PCR で調製した H 鎖と L 鎖の断片を連結して、pCANTAB プラスミドに組み込む。この場合には、実際存在する異常に人工的な抗体が作られる。従って、抗 MPO 抗体を選択するためには多くのクローンを調べる必要がある。
3. データベースでヒト IgG のアミノ酸配列を比較して、共通の配列を探す。

C. 研究結果

1. TNF に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから mRNA を精製して、cDNA を調製した。H、L 両鎖の保存配列を市販の ScFv 抗体作製試薬（ファルマシア社）をもちいて PCR で増幅して各々の断片 DNA を得た。それらを 15 アミノ酸に相当する DNA で連結した。この H、L 両鎖を連結した ScFv 抗体遺伝子を pCANTAB ベクター

ラスミドに挿入した。このプラスミドを大腸菌 TG-1 株に transformation した。この transformation 効率が非常に悪い結果であったが、とりあえず、産生ファージを抗原でコートしたプレートで選択して、目的とした抗 TNP- ScFv 抗体発現ファージを単離することに成功した。

2.

MPO で免疫したマウス脾臓から mRNA を精製して、H、L 両鎖の断片 DNA を増幅して、ScFv 抗体産生用プラスミド pCANTAB に組み込んだ。MPO を可溶化するのに用いた SDS、または、リコンビナント MPO で免疫したマウス脾臓から mRNA を調製して各々の IgG の H、L 両鎖の断片 DNA も同様に pCANTAB に組み込んだ。

3.

ヒトの IgG のアミノ酸配列については現在、本研究班の国際医療センターの中田光班員と共同研究を行っている。

D. 考察

モノクローナル抗体産生株の mRNA を材料にした ScFv 化はできた。しかし、TG-1 株への transformation の効率が非常に悪いので、多種多様な抗を産生している脾臓やリンパ球を材料にして mRNA を調製して、これから目的とする抗原を認識する抗体を産生しているファージまたは菌を選択することは現在は困難である。

また、抗体の発現をファージの系で行うことが果たしているのかどうか考察を加える必要がある。ファージの ScFv 発現系は抗原に結合する抗体を選択するには有効であるが、選択が必要でない場合（すなわち、ハイブリドーマを材料にする時とか、イム

ノグロブリン製剤のように特異性があまり問題にならない場合）には産生量が多い、大腸菌での一般的な発現系のほうがむしろ適していると考えられる。

MPO で免疫したマウスの脾臓を材料として、抗体の ScFv 化を試み、pCANTAB に組み込んだ。この場合には、抗原と結合する ScFv を選択する必要があることから、ScFv のファージ産生系が有効であると考えられる。ScFv 産生ファージの選択は、EIA システムが構築されている感染研/鈴木班長のところで行う予定である。

E. 結論

マウスモノクローナル抗体を ScFv 化した。ポリクローナル抗体の ScFv 化を行い目的とする抗体産生ファージを単離精製することを現在検討中。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権

本研究に関する研究発表、知的財産権の出願、登録は今年度はまだない。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

ANCA 関連腎炎及び血管炎の好中球機能の検討とγグロブリン療法の効果に関する研究

| | | | |
|-------|-------|--------------|----------|
| 分担研究者 | 武曾恵理 | 京都大学大学院医学研究科 | 循環病態学 講師 |
| 研究協力者 | 猪原登志子 | 京都大学大学院医学研究科 | 循環病態学 |
| | 小野孝彦 | 同 | |
| | 松岡俊行 | 国立感染症研究所 | 生物活性物質部 |
| | 橋本ゆき | 同 | |
| | 大川原明子 | 同 | |

1. 糸球体腎炎における好中球機能についての検討

A. 研究目的

半月体形成性腎炎や血管炎に好中球自己抗体 MPO-ANCA(Myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody)の上昇が認められ、臨床マーカーとして利用されている。本抗体の対応抗原である Myeloperoxidase(MPO)は好中球に固有のライソゾーム酵素で、殺菌、殺ウイルス作用に重要な働きをしている。また、抗体価の上昇に伴って血中には活性化好中球が循環していることが明らかになっている。この活性化された好中球は、さらに炎症や感染によって腎炎や血管障害を誘発すると推察される。一方、MPO-ANCA が高値を示しても、必ずしも病態の重篤化と関連していないため、単に MPO-ANCA が自己免疫疾患を誘発しているとは考えにくい。すなわち、病態に密接に関与した抗原・抗体反応によって好中球が活性化され、病態の重篤化を招くと予想される。

糸球体腎炎においてもその発症に血管炎

と同様、好中球の活性化が関与している可能性が推察されるため、糸球体腎炎における好中球機能を、組織学的所見との関連について検討した。

B. 対象と方法

対象

各腎疾患群と健常成人での好中球を検討した。腎疾患患者群(RD 群)24 例、コントロール群(C 群)16 例を健常成人より採血検体を採取した。RD 群はさらに、血管炎群(V 群) 4 例、炎症性腎炎群(GN 群)13 例、非炎症性腎疾患群 (Non-GN 群) 7 例に細分類を行った(Table 1)。V 群は MPO-ANCA 関連血管炎の患者 4 例であり、GN 群には IgA 腎症 9 例、膜性増殖性腎症 1 例が含まれた。Non-GN 群には IgM 腎症 2 例、膜性腎症、微小変化群、巣状糸球体硬化症、糖尿病腎症、アミロイド腎症をそれぞれ 1 例が含まれた。GN 群においてはいずれも治療前の検体を用いた。

方法

1) 好中球からの MPO 放出活性 (MPO

release)

ヘパリン化全血 20ml よりリンホブレップデキストラン法にて好中球を分離。好中球 2×10^6 個を Hank's balanced salt solution(HBSS)に浮遊させた好中球懸濁液を作成。その後、脱顆粒誘発のための Cytochalasin B(CB) $5 \mu\text{g/ml}$ と細菌由来ペプチド fMet-Leu-Phe(FMLP) 10^{-6}mol/L を用いて刺激。細胞外液と Cell homogenate を作成。MPO 活性はテトラメチルベンジジンおよび H_2O_2 を基質として用い、650nm の吸光度の増加を分光高度計を用いて測定した¹⁾²⁾ (Table 2)。求められた MPO 放出活性より、%MPO release と FMLP 感受性を計算にて求めた(table 3)。

2) 活性酸素産生の初速度

ヘパリン化全血 20ml より HBSS 浮遊好中球懸濁液 (2×10^6 個) を作成。Cytochrome C とともに 37°C で加温後、Cytochalasin B と FMLP を添加し、活性酸素(O_2)産生を Cytochrome C の還元能を用いて 550nm の吸光度の変化からその初速度を計算した¹⁾²⁾ (Table 4)。

C. 結果

1) 各疾患群における好中球機能

MPO release と FMLP 感受性の間に正の相関を認めた(Fig. 1)。FMLP 感受性は腎疾患群(RD 群)で有意に高値を示し(Fig.2)、特に GN 群で C 群に比較し、有意に高値であった。MPO release も同様の傾向がみられ、GN 群の MPO release は C 群、non-GN 群に比較し優位に高値を示した。一方、 O_2 産生については RD 群と C 群の間に差を認めず、V 群で C 群、non-GN 群に比較し優位に低値を示した(Fig.3)。

2) 組織学的検討

腎疾患群(RD 群)について組織学的検討を行った。血管炎の有無、半月体形成の有無、間質細胞浸潤の程度、間質繊維化の程度について検討した。FMLP 感受性は非血管炎群で血管炎群に比べ有意に高値を示した。FMLP 誘導 O_2 産生は血管炎群でコントロール群と非血管炎群にくらべ、有意に低値を示した (Fig.4)。半月体形成群で比較したところ FMLP 感受性は半月体非形成群で半月体形成群に比べ有意に高値を示した。FMLP 誘導 O_2 産生は半月体形成群で半月体非形成群に比較し優位に低値を示した。CB+FMLP 同時誘導における O_2 産生はコントロール群、半月体非形成群に比べ、半月体形成群において低値を示した(Fig.5)。間質細胞浸潤軽度群、高度群において好中球機能を検討したところ、FMLP 感受性は軽度群で有意に低値を示した。 O_2 産生は軽度群で高値を示す症例がみられたが、高度群では有意に低値を示した(Fig.6)。間質繊維化の程度を軽度群、高度群で比較した (Fig.7)。FMLP 感受性は間質繊維化軽度群で有意に高値であった。

D. 考察

腎炎患者では MPO release は炎症性反応の程度に応じて高値を示した。MPO release は組織活動性と相関するが、 O_2 産生は重篤な活動型病変発症例ではむしろ低下しており、好中球の過刺激後の産生枯渇状態を推測させ、組織学的活動期以前のより早期における O_2 産生過剰が存在していたことが示唆された。

E. 参考文献

1) Suzuki K et al. Measurement of active phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes by fluorescence liberation from phagocytized microspheres. J Leuko Biol 1986; 39:475-88

2) Suzuki K et al. Assay method for myeloperoxidase In human polymorphonuclear leukocytes. Anal Biol 1983; 132: 345-52

2. ANCA 関連急速進行性腎炎患者に対するγグロブリン療法の効果

A. 研究目的

ANCA 陽性の急速進行性腎炎血管炎に対しては、強力な免疫抑制療法が必要で、比較的患者に老年者が多いこともあり、治療の継続が困難となることもしばしばある。これに対し、経静脈的γグロブリン療法 (IVIg) は、免疫抑制を起こすことなく患者の免疫能を変化させて効果を上げる可能性があり、試みられるべき療法と考えられる。以下に、肝炎ウイルス抗原陽性のために免疫抑制療法が十分に行えず、IVIg 療法を施行し、さらにこの療法による好中球機能の変化を経過を追って観察し得た症例を報告し、その効果の発現機序に関して考察する。

B. 症例：82才女性

主訴：高熱、咳、喀痰

家族歴：特記事項無し

既往歴：40才より高血圧（治療中）

現病歴：平成12年中旬より誘因無く、鼻汁が多くなり、やがて発熱をきたす。近医にて検査をうけ、尿に蛋白、潜血強陽性で

あり、入院。CRP、ANCA の高値を認め、精査のため転院。

現症：身長、148cm。体重、69.9kg。血圧、172/76mmHg。

眼瞼結膜、貧血無し。頸部リンパ節、触知せず。

心、肺、異常音なし。腹部膨満。両下肢に浮腫あり。

入院時検査所見：尿量、550ml/day。潜血+++、蛋白+++、一日蛋白量 1.5g。

尿沈査、RBC 70-80/HPF, WBC 4-5/HPF, 顆粒、赤血球円柱陽性。赤沈 119mm/hr、Htc 25.7%, Hb 8.1g/dl, WBC5700, 血小板 54 万、フィブリノゲン 623mg/dl. GOT 42 IU/L, GPT 28 IU/L TP 6.4g/dl, Alb 3.0 g/dl, Cr 2.3 mg/dl, Ccr 12.1 ml/min, CRP13.2mg/dl, 抗核抗体陽性、補体価 >51U/ml, p-ANCA 239 U, HBsAg 180.6, HbeAb 95.7

胸部X。P：CTR 61%, 両下肺野間質陰影増強。

腎エコー：右腎, 116mm, 左腎, 109mm. 表面平滑

腎生検所見：18 個の糸球体を検査したが、全硬化に陥っている 2 個をのぞく 16 個のうち 13 個の糸球体に細胞性または細胞線維性半月体形成を認め (Fig.8)、一部は壊死性病変を伴っていた。これらを取り巻く間質も細胞浸潤が強く、好中球、リンパ球ともに浸潤していた。血管に関しては、動脈硬化病変は明らかながら、一部の小動脈に軽度の細胞浸潤と平滑筋細胞の膨化を認めるのみで、明らかな血管炎所見は無かった。蛍光抗体法検査では明らかな免疫グロブリンや補体の沈着はなく、pauci-immune タイプの壊死性半月体形成性腎炎と診断した。

入院後経過 (Fig.9) : 入院後発熱は軽快しつつあったが、CRPは上昇したままで、腎機能が悪化し急速進行性腎炎の像を呈した。腎生検所見より早期に治療が必要とされたが、HBsAg 強陽性であり、ステロイドや免疫抑制療法を強力に行うことがためらわれ、まずIVIg療法を施行することとし、乾燥スルホ化人免疫グロブリンG (献血ベニロンI) 400mg/kg/day を5日間投与した。これにより発熱、喀痰を中心とする本人の自覚症状の改善のみならず、CRPは低下し始め、Cr値は上昇が止まり、白血球数も低下した。その後、少量のステロイド(プレドニン 20mg/day) とエンドキサン 50mg/day の併用を行い、さらなる炎症反応の低下、腎機能の改善を得ており、肝機能に変化はなく軽快中である。

IVIg 前後での好中球機能の変化 (Table 5) : 表に示すごとく、IVIg治療前に比し、後ではMPO release, FMLP感受性ともに上昇しており、また末梢血好中球中のMPO含量は著明に上昇した。さらにO₂-productionは前では正常者に比し低値を示していたが、これも正常域に戻った。

C. 考察

各種血管炎に対するIVIgの報告は限られてはいるが一定の効果を見ている。その効果発現機序に1) 免疫抑制の上昇、2) Fcレセプターのブロック、3) 補体調節、4) T細胞機能調節、5) イディオタイプネットワークの調節などが挙げられている。ANCA陽性の腎炎・血管炎におけるANCAの病変への関与については議論のあるところであるが少なくとも一部のANCAは病態活動性と連動しており、これらに対する

IVIgのおそらく一部は抗イディオタイプ抗体としての抑制的な働きが期待される。本症例ではIVIg後に血中のANCAの値の低下は著しいものではなかったが、炎症反応の低下は明らかで、同時に急速に進行していた腎機能の悪化も停止した。前後で測定した好中球機能は、治療前ではむしろ低下していたが、これは1の糸球体腎炎と好中球機能に関する研究の、半月体型生成活動型腎炎の結果と一致する所見で、何らかの刺激で好中球表面に提示されているMPOに対するANCAの結合による好中球の過刺激状態が考えられる。IVIg治療によりこれに含まれるANCAに対する抗イディオタイプ抗体がANCAのMPOへの結合を阻止し、好中球の過刺激状態を解除した可能性がある。この結果は病態に関わるANCAに対する抗体を作成して治療に用いることの妥当性を示しており、今後の特異的抗体の開発が待たれる。

D. 結論: 免疫抑制剤の使用困難なANCA陽性半月体腎炎・血管炎にたいし、IVIgは試みるべき療法の一つと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Yashiro M, Muso E, Itoh.Ihara T, Oyama A, Ono T and Sasayama S: Significantly High Incidence and High Morbidity of Acute Renal Failure with Respiratory Tract Involvement of p-ANCA-Related Angitis Revealed in Kobe

City and the Environs after the Kobe Earthquake in 1995. Clinical Nephrology (Letter) 51(3):190-191, 1999.

・ Yashiro M., Muso E., Itoh.Ihara T., Oyama A., Hashimoto k., Kawamura T., Ono T., Sasayama S.: Significantly high regional morbidity of MPO-ANCA related angitis and/or nephritis with respiratory tract involvement after the great earthquake of Kobe in 1995. Am J. Kid Dis.. 35(5) 889-895. 2000.

2. 学会発表

・ T.Ito-Ihara, E.Muso, S.Sasayama, A.Ishida-Okawara, Y.Hashimoto, K.Suzuki: Studies on Neutrophil Function and Glomerulonephritis. 9th International ANCA Workshop, 12-15 April 2000, Groningen, The Netherlands.

・ 猪原登志子、武田敏也、陶山勝郎、橋本ゆき、大川原明子、鈴木和男、武曾恵理、篠山重威：糸球体腎炎における好中球機能についての検討。第43回日本腎臓病学会学術総会、平成12年5月11日、13日、名古屋。

・ 猪原登志子、武田敏也、陶山勝郎、小野孝彦、武曾恵理、篠山重威、橋本ゆき、大川原明子、鈴木和男：糸球体腎炎における好中球機能についての検討。第30回京都腎臓免疫研究会、平成12年6月3日、京都。

・ 猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、橋本ゆき、大川原明子、鈴木和男：糸球体腎炎

における好中球機能の検討。第6回MPO研究会、平成12年6月24日、25日、熱海。

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

Table 1

Patients

RD group : Patients with renal disease (N = 24)

All measurement were performed before treatment.

V group : Patients with vasculitis (N=4)

MPO-ANCA associated glomerulonephritis N= 4

GN group : Patients with glomerulonephritis (N=13)

IgA nephropathy N= 9

Mesangioproliferative glomerulonephritis N= 4

Non-GN group : Patients with non inflammatory nephropaties (N=7)

Membranous nephropathy N= 1

Minimal change nephrotic syndorome N= 1

Focal glomerulosclerosis N= 1

IgM nephropathy N= 2

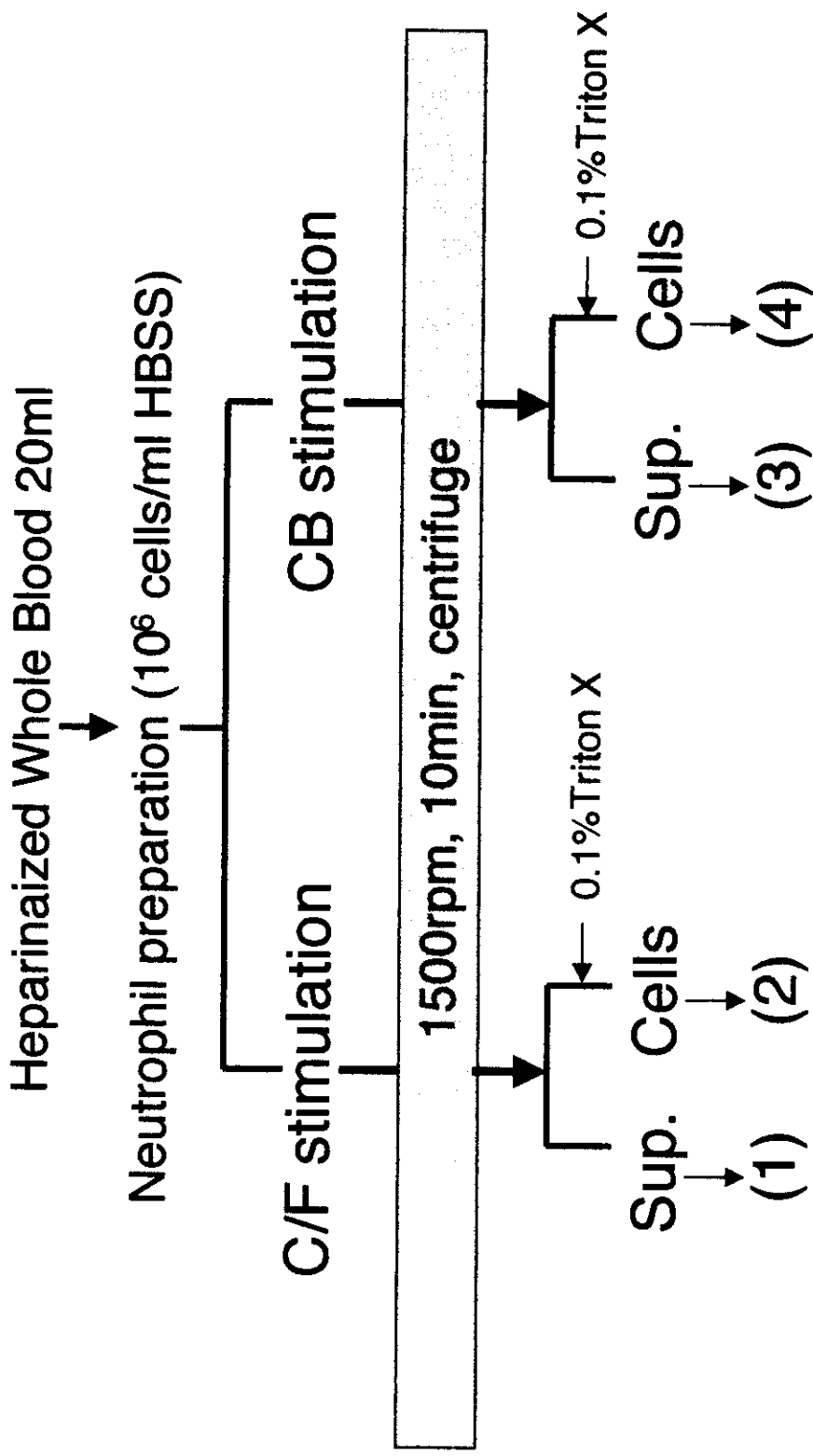
Diabetic nephropathy N= 1

Amyloid nephropathy N= 1

C group : Adult healthy controls (N=16)

Table 2

Measurement of MPO release



Release of MPO was calculated by released MPO activity (Sup.) and remaining activity of MPO (cell homogenage).

FMLP: formylmethionyleucylphenylalanine, CB:cytochalasin B,
C/F:CB (5 μg/ml) and FMLP(10⁶mol/L), HBSS: Hank's balance salt solution

Table 3

Calculation

$$\text{MPO release(\%)} = \frac{\text{Released enzyme activity in sup.(1)}}{\text{Total enzyme activity (1)+(2)}} \times 100$$

Sensitivity to FMLP (%) =

$$\frac{\text{Enzyme activity in sup. with CB and FMLP (1)}}{\text{Enzyme activity in sup. with CB(3)}} \times 100$$

Table 4

Measurement of O_2^- production

Heparinized Whole Blood 20mL



Neutrophil suspension (2×10^6 cells/mL, $100 \mu\text{L}$)

← Ferricytochrome C ($66 \mu\text{mol/L}$)



FMLP stimulation

C/F stimulation

FMLP-induced O_2^- production
(nmol/min per 10^6 cells)

C/F-induced O_2^- production
(nmol/min per 10^6 cells)

Active oxygen (O_2^-) production was measured from the initial velocity of cytochrome C reducing activity.

FMLP: formylmethionyleucylphenylalanine, CB: Cytochalasin B,
C/F:CB($5 \mu\text{g/mL}$) and FMLP(10^{-6} mol/L)

Table 5: 好中球機能

| 採血日 | 2001.1.21 | | 2001.2.1 | |
|--|-----------|--|----------|--|
| | 治療前 | | 治療後 | |
| グロブリン治療前後 | | | | |
| MPO release(%) | 36.7 | | 44.0 | |
| Sensitivity to FMLP(%) | 283 | | 383 | |
| MPO in PMN(units/2x10 ⁶ cells) | 9.2 | | 45.0 | |
| O ₂ -(C/F) (nmol/min/10 ⁶ cells) | 11.2 | | 22.4 | |
| O ₂ -(FMLP)(nmol/min/10 ⁶ cells) | 14.2 | | 26.4 | |

Fig. 1

MPO release and sensitivity to FMLP

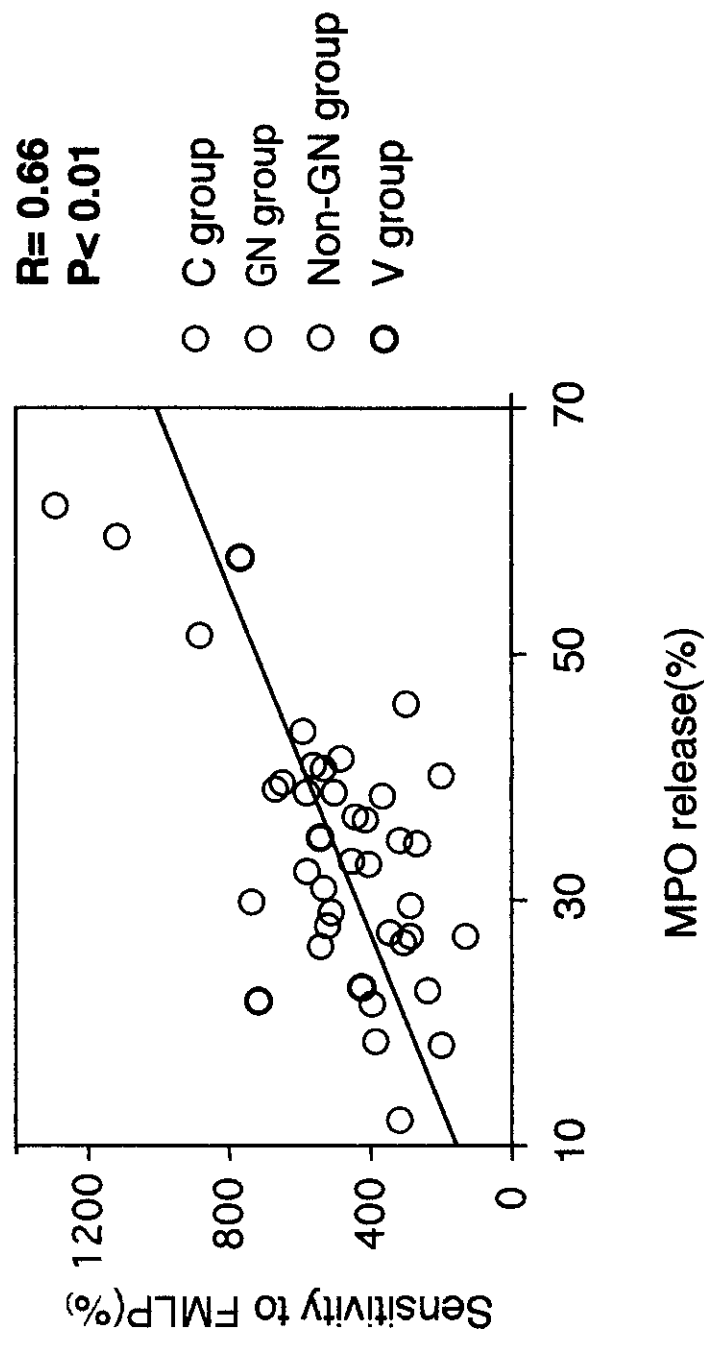
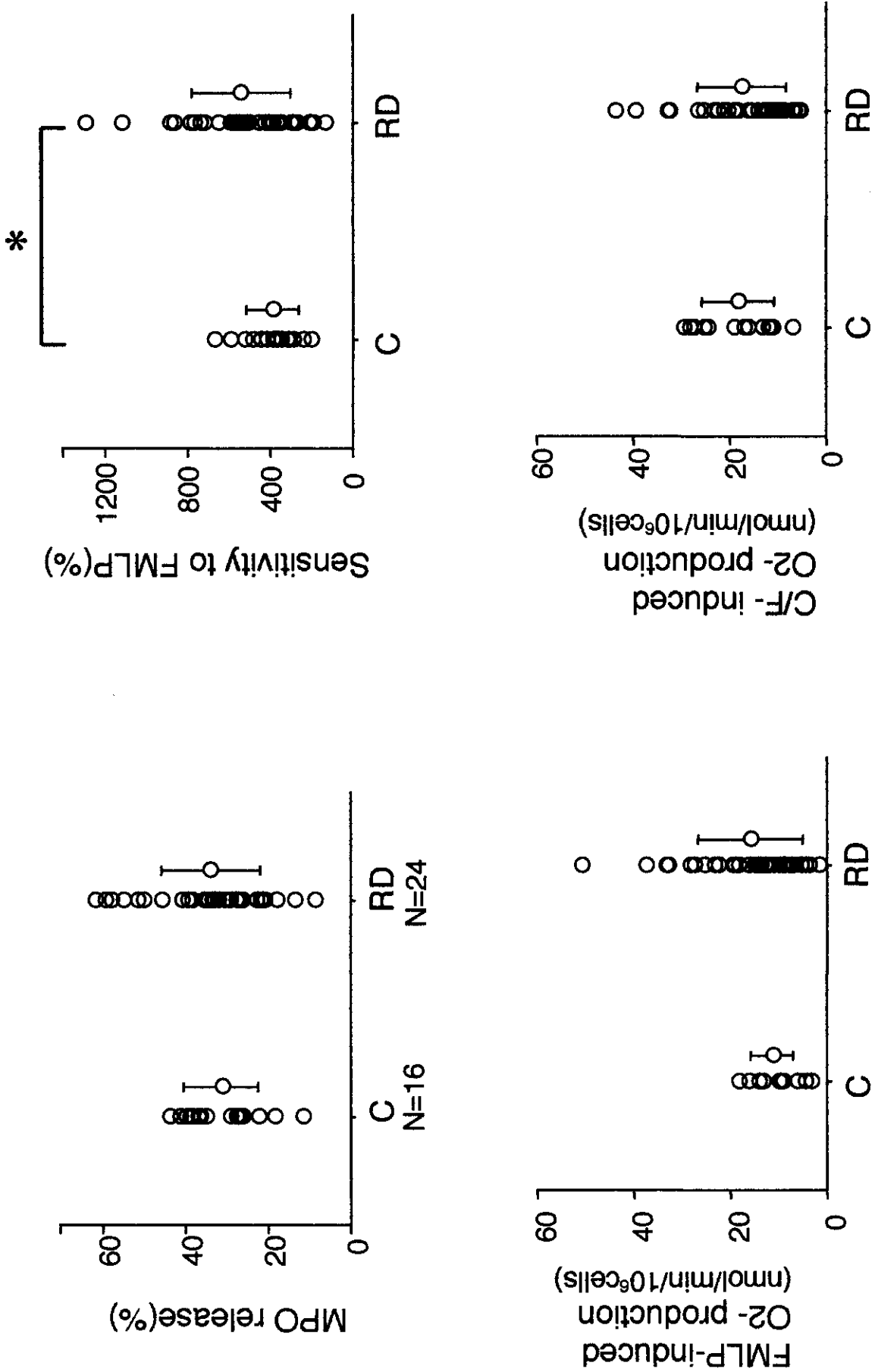


Fig.2

PMN function in renal diseases



C group; N=16, RD; N=24, *; P<0.05