

単球スーパーオキサイド産生能に関する研究

第 1 編

単球スーパーオキサイド産生能におよぼす加齢の影響

岡山大学医学部第二内科学教室 (主任: 木村郁郎教授)

三 島 康 男

(昭和63年7月11日受稿)

Key words: スーパーオキサイド, 単球, 加齢

緒 言

微生物の侵入に対して生体は多くの防御機能を備え感染に対処している。すなわち好中球, 単球, マクロファージなどの食細胞は侵入した微生物を細胞内に取り込みこれを殺菌する。また食細胞だけでなく T, B リンパ球もこれと協同して働き複雑な免疫反応をひきおこすことにより生体を感染から守っている。これまで好中球の遊走, 貪食, 殺菌能に関する諸家の報告は多くみられるが, 単球に関して, 特に殺菌能に関しての報告はきわめて少ない。

1973年, Babior¹⁾らが好中球においてチトクローム C 還元法を用いた手法でスーパーオキサイドを証明してから食細胞の貪食, 殺菌における生化学的側面からの解析が行われ諸家により報告されている²⁾³⁾⁴⁾。中でも好中球における報告は多く, 貪食時の生化学的反応として, 好中球の著明な酸素消費, 解糖の促進, 五炭糖リン酸化回路の活性化, また同時に惹起される活性酸素の生成が注目されている⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。貪食によって産生される活性酸素として Superoxide anion (O_2^-), Hydrogen peroxide (H_2O_2), Hydroxyl radical ($OH \cdot$), Singlet oxygen (1O_2) が知られており種々の活性酸素の測定法が研究されているが, なかでも O_2^- に関する研究は多く, 近年では O_2^- 産生におよぼす種々の病態や薬剤などに関する報告もみられる⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。 O_2^- は酸素が一電子還元されてできた不安定な性質のもので強

い毒性を持ち, 殺菌作用, 組織障害性などを有するが, 生体内においてはこの O_2^- を除去し H_2O_2 に転化する Superoxide dismutase (SOD) により生体はその細胞障害性から守られている。

O_2^- の測定に関しては Nakagawara¹²⁾ らが, 異物の貪食という方法によらず好中球の代謝変化を誘導しうる物質を用いる方法を報告してから, O_2^- 産生能の測定が細胞内殺菌能の指標として臨床的に応用されるようになってきた¹³⁾¹⁴⁾。今回筆者は末梢血単球の O_2^- 産生能に注目したわけであるが, 単球においても好中球と類似した機序による代謝変化が起こるとされている¹⁵⁾。単球 O_2^- 産生能の測定に関しては北川¹⁶⁾ らの報告がみられるが筆者の行った方法とは若干異なっている。また臨床的な検討を行った報告はきわめて少ないが, 健常人における各年代毎の単球 O_2^- 産生能を測定することは各種病態を理解する上での臨床応用に関して意義深いものと考えられる。

さて近年, 高齢者人口の占める割合が増加し, その疾病構造にも変化がみられることは周知のところである。かかる高齢者においては一般に易感染性を示すと同時に感染の難治化を来し易いことが特徴とされており, また悪性腫瘍の発生頻度が増加することが知られているが, これは加齢に伴う免疫能の低下によるところが大きいと考えられる。またさらに糖尿病患者においては細菌ならびに真菌の感染に罹患し易く, その合併により治療に抵抗を来しさらに病状を悪化させることはよく経験されることである。か

かる糖尿病の易感染性においても免疫能の低下が想定される。

今回筆者は以上の観点にたち、殺菌能の指標として単球の O_2 産生能に着目し、加齢のおよぼす影響および糖尿病患者における O_2 産生能に関する検討を行ったが、まず本編においては、単球 O_2 産生能に関する基礎的検討を行い、健康成人における単球 O_2 産生能を測定し、それにおよぼす加齢の影響を検討した。

対象および方法

1. 対 象

正常ヒト単球 O_2 産生能の測定においては20—86歳(平均50.3歳、男性32名、女性19名)の健康成人51名を対象とした。基礎的実験は数名の若年健康者を対象として行った。

2. 方 法 (図1)

1) 単核球の分離

肘静脈よりヘパリン加静脈血を10ml採取し、6%デキストラン生食水2mlを加え混合した後、室温にて45分間静置後得たバッフィコートをプラスチック遠沈管にとり、Ficoll-Hypaqueを重

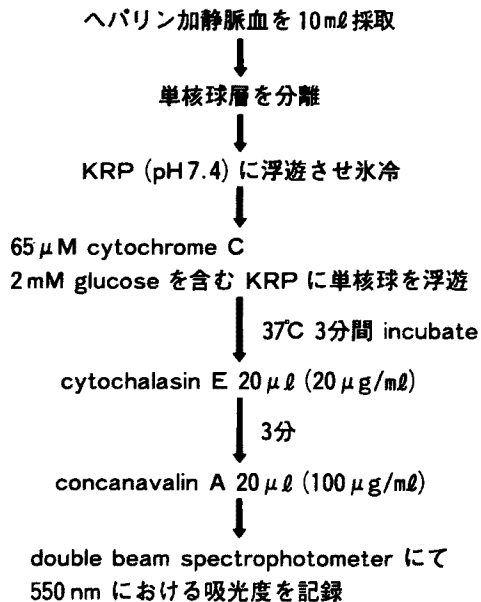


図1 実験方法

層し1,600rpm, 45分遠沈後単核球層を採取し、Krebs-Ringer-Phosphate buffer (KRP) (pH 7.4)を添加し、混じた赤血球を低張処理にて除いた後等張に戻し、1,600rpm, 10分間遠沈し上清を除去した後 KRP に浮遊させ氷冷中に静置しつつ実験に供した。

2) O_2 測定法

65 μ M 酸化型チトクローム C, 2 mM グルコースを含む KRP に単核球を $0.5\sim 1.0\times 10^6$ cells/ml の濃度に加え37 $^{\circ}$ C, 3分間 incubate し次いでサイトカラシン E (CytE) を加え、さらに37 $^{\circ}$ C, 3分間 incubate した後、コンカナバリン A (ConA) を加え最終反応液量を2.0mlとした。CytE, ConA の最終濃度はそれぞれ20 μ g/ml, 100 μ g/ml とした。なお CytE は dimethylsulfoxide (DMSO) に、ConA は生食水に溶解した。生成された O_2 によるチトクローム C の還元を550 nm における吸光度変化としてとらえ、2波長分光光度計 UV-210A (島津) にて測定した。なお単球 O_2 産生能は、単核球浮遊液中の細胞数を測定した後塗抹標本を作成し May-Giemsa 染色後単球の割合を求め、単球10 6 個あたりの産生能として表した。またリンパ球からは O_2 の産生はみられないことから、単核球層から生成された O_2 はすべて単球によるものとして実験を行った。また実験施行ごとに単球の viability をトリパンブルー染色により観察し、95%以上のものを実験に供した。

実験結果

1. 単球の O_2 産生曲線 (図2)

単核球を37 $^{\circ}$ Cで数分間 incubate し、基線が水平になった時点で CytE を加え、3分後に ConA を加えると O_2 産生の開始が認められる。その後 O_2 産生能は定常状態となり直線化し、数分後には反応は停止する。一方途中で SOD を添加すると O_2 の産生の阻害が認められた。

2. CytE, ConA の至適濃度の検討

CytE の至適濃度を知るために、CytE の濃度を、5, 8, 10, 20 μ g/ml に調整し、3分後に ConA 100 μ g/ml を添加して O_2 産生能をみたところ、それぞれ6.2, 8.2, 9.0, 9.8 nmol/min/ 10^6 cells であり CytE 20 μ g/ml において最大かつ安定し

たO₂⁻の産生がみられた(図3, a).

ConAにおいては, CytE 20μg/mlに対しConAの濃度を20, 40, 50, 75, 100, 200, 300μg/mlに調整しO₂⁻産生能をみると, それぞれ0.8, 3.0, 5.8, 8.2, 9.3, 9.8, 9.3nmol/min/10⁶ cellsとConA 100μg/mlにて安定し, それ以上の濃度においても変化はみられなかった(図3, b). 以上の結果より以後の実験はCytE 20μg/ml, ConA 100μg/mlを至適濃度として行い, 反応液のpH, 反応温度は北川らの方法に準じてpH7.4, 37°Cを反応系の至適条件して行った.

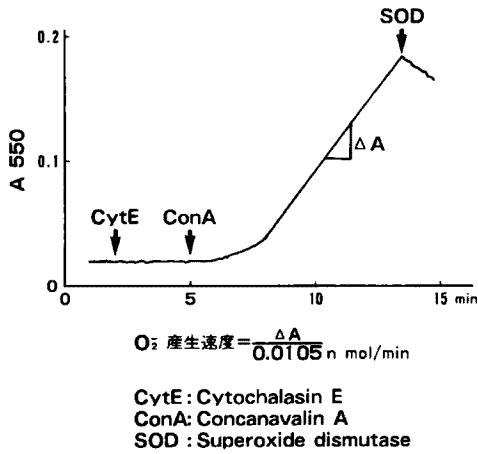


図2 O₂⁻産生曲線

3. 採血後測定開始までの時間経過がO₂⁻産生におよぼす影響(図4)

検体を採取し冷蔵庫保存にて, 採取後の保存の可否を検討した. 採血直後, 3時間後, 6, 7.5, 12時間後に実験を開始したところO₂⁻産生能はそれぞれ9.5, 9.4, 7.0, 6.0 nmol/min/10⁶ cellsであり12時間後にはO₂⁻はほとんど検出されなかった. 採血直後から3時間までは特に変化はみられなかったが正確を期すためにすべての実験を採血後1時間以内に開始した.

4. 正常ヒト単球O₂⁻産生能の検討

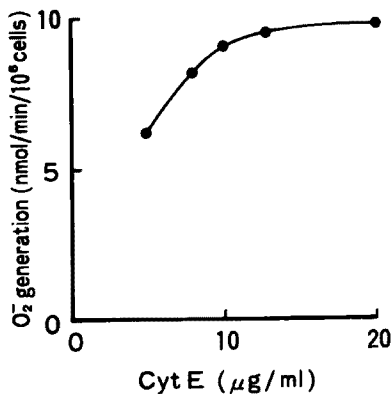
20~86歳の健常成人51名を対象として単球O₂⁻産生能を測定し, 性別および加齢のおよぼす影響について検討した.

1) 性別にみた単球O₂⁻産生能(図5)

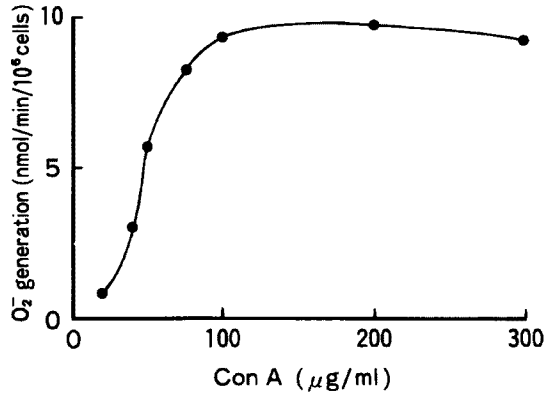
健常成人における単球O₂⁻産生能を男女間で比較すると, 男性12.0±2.9 nmol/min/10⁶ cells, 女性12.9±2.9 nmol/min/10⁶ cellsであり両群間に有意な差はみられなかった.

2) 単球O₂⁻産生能におよぼす加齢の影響(図6)

健常成人51名の単球O₂⁻産生能を一括してみると12.4±3.0 nmol/min/10⁶ cellsであった. O₂⁻産生能の各年代毎の平均値を示すと, 20台12.7±2.5, 30台12.6±3.3, 40台13.1±2.3, 50台13.3±2.7, 60台11.9±4.2, 70台12.2±4.1, 80台11.0±2.9 nmol/min/10⁶ cellsであり加齢



a. 単核球0.9×10⁶/ml, Con A 100μg/mlと種々の濃度のCyt Eを添加



b. 単核球1×10⁶/ml, Cyt E 20μg/mlと種々の濃度のCon Aを添加

図3 O₂⁻産生におよぼすCytE, ConAの濃度変化の影響

と共に低下する傾向がみられた。つぎに65歳以上の老年者群とそれ以下の非老年者群とを比較すると図7に示すごとく単球O₂産生能はそれぞれ11.2±3.3, 12.9±2.6 nmol/min/10⁶ cellsであり老年者群における単球O₂産生能は非老年者群に比して有意の (p<0.05) 低値を示した。

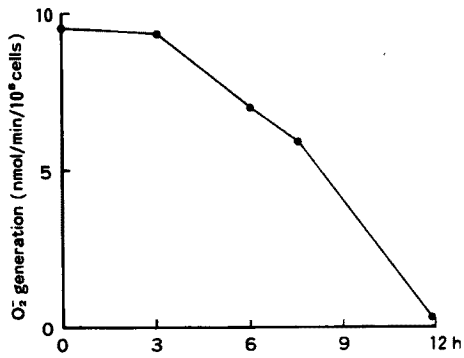


図4 採血後の時間経過がO₂産生におよぼす影響

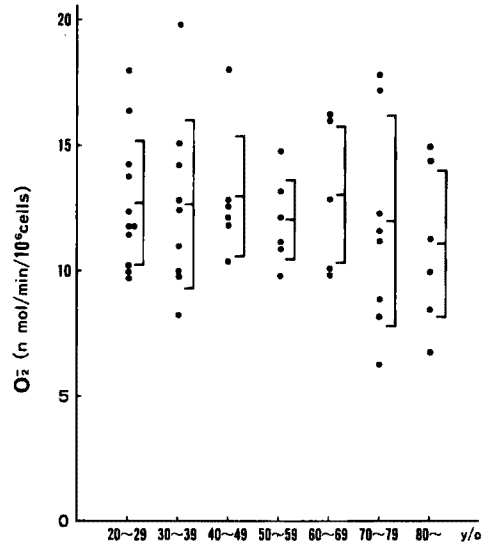


図6 年齢層別にみた正常人の単球O₂産生能

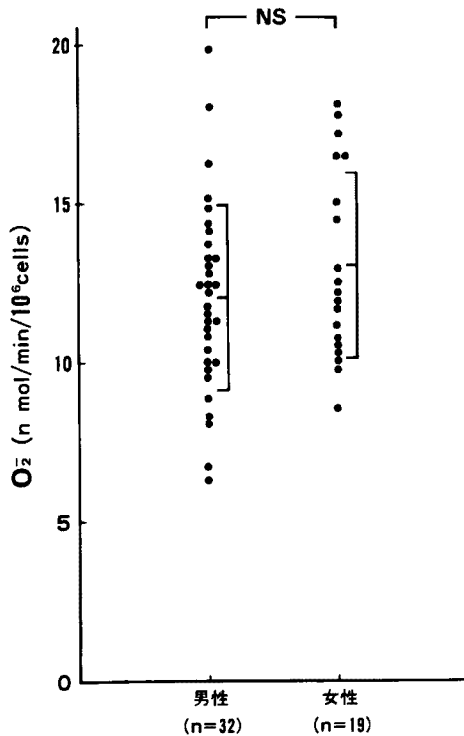


図5 性別と単球O₂産生能

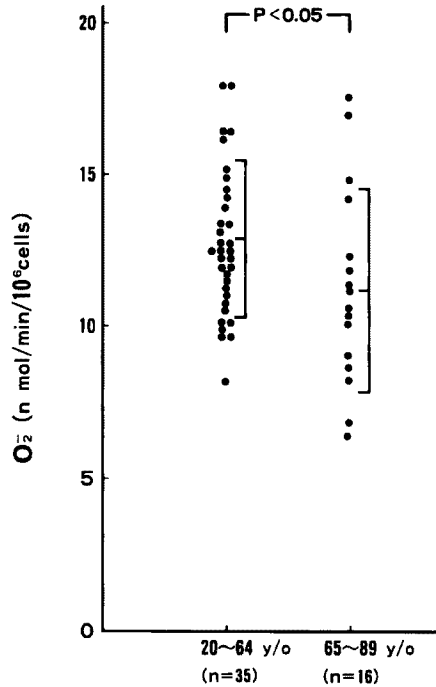


図7 単球O₂産生能におよぼす加齢の影響

考 察

これまで単球機能の評価として生物学的、形態学的には走性能、貪食能、殺細胞性などが行われ¹⁷⁾、生化学的にはライソゾーム酵素活性¹⁸⁾、などの検討がなされて来たが、近年食細胞における細胞内殺菌作用に酸素代謝、活性酸素が強く関与していることが諸家により報告されている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、細胞内殺菌に関しては好中球において研究が進められ、1969年 McCord と Fridovich¹⁹⁾ が Superoxide dismutase (SOD) を発見して以来急速に進歩している。それによると殺菌機構で主たるものはミクロペルオキシダーゼに依存する系とミクロペルオキシダーゼに依存しない系、すなわち活性酸素による殺菌があるとされている。また単球においても好中球と類似の殺菌機構を有し感染に対処しているとされている¹⁵⁾。

食細胞が貪食あるいは何らかの細胞膜刺激を受けるとまず O_2^- が産生されるが、 O_2^- の消去酵素である SOD により H_2O_2 に変化し H_2O_2 はカタラーゼにより失活する。また生体内においては O_2^- 、 H_2O_2 はもとより、 $OH\cdot$ や 1O_2 も各種のスカベンジャーにより瞬時にその姿を変えるものである。種々の活性酸素のなかでどの種が殺菌的に働くのか、あるいは組織障害性に働くのか、また殺菌作用、膜脂質の過酸化を引き起すのかなどに関しては未だ明らかにされていないが、いずれの機序によっても酸素依存性の殺菌機構が作動する系においては、まず最初に O_2^- が産生されることが必須である。

今回筆者は活性酸素種の中でも中心的な役割を担う O_2^- に着目し、免疫担当細胞のひとつである単球における O_2^- 産生能の測定を行ったが、この検討を行うことは種々の病的状態を解明する上で重要であるといえる。単球 O_2^- 産生能を測定する上で実験条件においては北川の方法¹⁶⁾ に準じて行ったが、原法と若干の相違のあることからまず本実験系における代謝誘導物質である CytE と ConA の至適濃度を検討した結果、図 3 に示したごとく CytE 20 μ g/ml、ConA 100 μ g/ml を至適濃度として実験を行った。

次に検体の保存時間による産生能への影響をみた実験では、検体採取後 3 時間まで O_2^- 産生能

はほぼ採血直後と同様であったが、以後急速にその産生能を減じた。単球機能の保存による変化を検討した Nielsen の報告²⁰⁾ によると、15—20℃の室温で24時間保存をしても単球の走化能、貪食能、生存率はほとんど変わらないとしている。保存温度に差はみられるが時間経過と共に O_2^- 産生能の低下することは、酸素に依存した殺菌作用は他の単球機能とは異った面から考える必要があると思われる。

現在までのところ健康人における単球 O_2^- 産生能に関して、その宿主要因としての性別および加齢による変動についての検討はほとんどみられない。この検討を行うことは種々の病的状態の解析をする上できわめて重要であると共に、加齢の及ぼす影響を検討することは、未だ解明されていない老化の機序を考える上で非常に意義深いものといえる。今回筆者は20—86歳の正常人51名を対象として単球の O_2^- 産生能を検討したが、性別による差はみられなかった。各年代毎の平均値は図 6 に示すごとく加齢と共に低下する傾向がみられた。また65歳以上の老年者においては O_2^- 産生能は 11.2 ± 3.3 nmol/min/ 10^6 cells であり、非老年者群の 12.9 ± 2.6 nmol/min/ 10^6 cells と比べて有意の低下を示した。この事実は老年者の易感染性を考える上で重要な情報を提供すると考えられる。

一般に高齢者は易感染性を示すと同時に感染の難治化、遷延化を来しやすくとされ²¹⁾、また悪性腫瘍の発生頻度が増加することが知られている。これは高齢者においては免疫能が低下したためと想定されるが、加齢に伴う免疫能の変化に関しては多くの研究がなされており、T細胞の減少²²⁾²³⁾、B細胞の抗体産生能の低下²⁴⁾などがみられ細胞性免疫と体液性免疫の両者が低下している一方、血清中のガンマグロブリンの増加²⁵⁾、自己抗体の出現がみられ自己免疫の亢進した状態にもあるとされている。しかし単球機能に及ぼす加齢の影響に関してはほとんど報告がみられない。

老年者においては単球 O_2^- 産生能は非老年者と比べて有意に低下したわけであるが、なぜ O_2^- 産生能が低下するかというのはきわめて興味ある問題と思われる。 O_2^- 産生に関しては細胞膜²⁷⁾²⁸⁾、

解糖系および五炭糖リン酸化回路系の関与¹⁾⁵⁾⁶⁾, また血小板を中心とした血球成分との相互反応²⁹⁾³⁰⁾や内因性活性物質などの関与が考えられるが³¹⁾³²⁾, 老年者においては, 骨髄機能の低下による白血球の機能不全と相まって, 加齢により細胞膜脂質の過酸化が起こり膜構造の変化, さらに老化に伴う膜結合酵素活性の低下などにみられる膜機能の低下へと進むことにより O_2 産生能の低下することが推測される。

このように老化に伴う易感染性の一因として単球 O_2 産生能の低下が考えられるが, 近年老化を考える上での生化学的なアプローチとして老化と活性酸素との関与があげられる。木畑ら³³⁾は単球が貪食を行う際, 過酸化脂質が産生されこれはSODで抑制されるとしている。またHarmann³⁴⁾は癌, アテローム硬化, 老化に伴う免疫不全などはすべてフリーラジカルに起因するとして, 遊離基病という概念を提唱しているが, 老化と活性酸素との関連については具体的なデータに乏しくむしろ活性酸素と関連の深い過酸化脂質と老化の関係から研究されているのが現状であり, O_2 に関する一定した報告はみられない。

老化と過酸化脂質との関連についてみると, 脂質過酸化物は老化に伴って上昇するのではないかと考えられるが, Suematsuら³⁵⁾は20-60歳にかけて増加し60歳以後は安定すると報告し, 内藤³⁶⁾は脂質過酸化物は60歳以後加齢と共に低下するとしている。また大内ら³⁷⁾は脂質過酸化物は70歳以後は減少すると報告している。その理由として大内らは血清中の抗酸化物質の増加, 不飽和脂肪酸にとむ脂質の減少, 生体内の活性酸素の産生低下によるものではないかと推測しているが, 活性酸素に関しての検討は行われておらず, 今回の O_2 と加齢に関する筆者の成績は大内らの仮説をうら付けるものと考えられる。

以上本編においては単球 O_2 産生能に及ぼす加齢の影響を明らかにした。老年者における単球 O_2 産生能の低下は, 老年者の易感染性が単球における細胞内殺菌能の低下に多少でも関わりがあることを示唆させるものであり, また複雑な生体反応である老化現象を解明する上でも重要な情報を提供するものと考えられさらに今後の

多角的な検討が望まれる。

結 論

老年者における易感染性を解明することを目的とし, 細胞内殺菌能の指標として健常成人において単球 O_2 産生能を測定した。まず測定する上での基礎的検討を行い, 次いで宿主因子としての性別, 加齢の単球 O_2 産生能におよぼす影響について検討した。その結果

1. O_2 産生を促す代謝誘導物質としてのCytE, ConAの至適濃度はそれぞれ20 μ g/ml, 100 μ g/mlであった。検体採取後3時間後まで単球 O_2 産生能には変化はみられなかったが, それ以後は経時的に低下を示した。

2. 20-86歳の健常成人51名の単球 O_2 産生能を一括して算出すると12.4 \pm 3.0nmol/min/ 10^6 cellsであった。性別において比較すると男性12.0 \pm 2.9, 女性12.9 \pm 2.9nmol/min/ 10^6 cellsであり, 両者に有意な差は認められなかった。

3. 単球 O_2 産生能を年代毎にみると, 加齢と共に低下する傾向がみられた。65歳以上の老年者群とそれ以下の非老年者群とを比較すると, 前者は11.2 \pm 3.3であるのに対し, 後者は12.9 \pm 2.6nmol/min/ 10^6 cellsであり老年者群において有意の低下がみられた。

以上の結果が得られたが, 老年者における単球 O_2 産生能の低下は, 老年者の易感染性が単球における細胞内殺菌能の低下に, その一部が起因するものであることを示唆するものである。

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致すとともに, 終始懇切なる指導と助言をいただいた木畑正義講師に深謝致します。

尚本論文の要旨は第25回日本老年医学会総会において発表した。

文 献

- 1) Babior BM, Kipnes RS and Curnutte JT : Biological defence mechanisms. The production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* (1973) **52**, 741—744.
- 2) Klebanoff SJ : Antimicrobial mechanism in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Semin Hematol* (1975) **12**, 117—142.
- 3) Curnutte JT and Babior BM : Biological defence mechanisms. The effect of bacterial and serum on superoxide production by granulocytes. *J Clin Invest* (1974) **53**, 1662—1672.
- 4) Badwey JA and Karnovsky ML : Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann Rev Biochem* (1980) **49**, 695—726.
- 5) Kakinuma K : Metabolic control and intracellular pH during phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J Biochem* (1970) **68**, 177—185.
- 6) Weening RS, Wever R and Roos D : Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes. *J Lab Clin Med* (1975) **85**, 245—25.
- 7) Baehner RL, Murrmann SK, Davis J and Johnston RB : The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis-associated oxidative metabolic reactions. *J Clin Invest* (1975) **56**, 571—576.
- 8) Cohen 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.
- 9) Dahinden CA, Fehr J and Hugli TE : Role of cell surface contact in the kinetics of superoxide production by granulocytes. *J Clin Invest* (1983) **72**, 113—121.
- 10) Torres M and Coates T : Neutrophil cytoplasts : Relationships of superoxide release and calcium pools. *Blood* (1984) **64**, 891—895.
- 11) Ichinose Y, Hara N and Motohiro A : Influence of chemotherapy on superoxide anion-generating activity of polymorphonuclear leukocytes in patients with lung cancer. *Cancer* (1986) **58**, 1663—1667.
- 12) 中川原章, 水上茂樹 : 新しい白血球機能検査法—小児慢性肉芽腫症診断への応用. *医学のあゆみ* (1978) **104**, 102—104.
- 13) 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.
- 14) 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2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.
- 15) Reiss M and Roos D : Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils. *J Clin Invest* (1978) **61**, 480—488.
- 16) 北川誠一, 高久史磨, 坂本 忍 : ヒト末梢血単球のスーパーオキシド産生能. *医学のあゆみ* (1979) **111**, 647—649.
- 17) Territo M and Cline M : Monocyte function in man. *J Immunol* (1977) **118**, 187—192.
- 18) 志摩 清, 樋口定信, 岳中耐夫, 津田富康, 渡辺春海, 徳臣晴比古 : 肺癌患者の流血中 Monocyte の β -galactosidase および多核白血球 NTB test. *癌の臨* (1975) **21**, 1308—1312.
- 19) McCord JM and Fridovich I : Superoxide dismutase : an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* (1969) **244**, 6049—6055.

- 20) Nielsen H, Blom J and Larsen SO : Human monocyte function in vitro : influence of conditions during transport of blood from patient to laboratory. *J Immunol Methods* (1981) **46**, 205—209.
- 21) 松本慶蔵 : 老人の感染症. *最新医学* (1976) **31**, 1258—1264.
- 22) Kishimoto S : Age-related changes in the subsets and functions of human T lymphocytes. *J Immunol* (1978) **121**, 1773—1780.
- 23) Teasdale C : Age dependence of T lymphocytes. *Lancet* (1976) **1**, 1410—1411.
- 24) Goidl EA, Innes JB and Weksler ME : Immunological studies of aging 2 . Loss of IgG and high avidity plaque-forming cells and increased suppressor cell activity in aging mice. *J Exp Med* (1976) **144**, 1037—1048.
- 25) 五島雄一郎 : 生理生化学的臨床検査成績に基づいた加齢変化. *日老医学会誌* (1979) **16**, 91—101.
- 26) Hallgren HM, Buckley CE, Gilbertsen VA and Yunis EJ : Lymphocyte phytohemagglutinin responsiveness, immunoglobulins and autoantibodies in aging humans. *J Immunol* (1973) **111**, 1101—1107.
- 27) Dewald B, Baggiolin M, Curnutte JT, Babior BM : Subcellular localization of the superoxide forming enzyme in human neutrophils. *J Clin Invest* (1979) **63**, 21—29.
- 28) Briggs RT, Drath DB, Karnovsky ML and Karnovsky MJ : Localization of NADH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. *J Cell Biol* (1975) **67**, 566—586.
- 29) 木畑正義 : Superoxide に関する 2—3 の検討—特に白血球血小板相互反応について—, 脳虚血と細胞障害—活性酸素とフリーラジカルの関与— (佐野圭司, 半田 肇, 浅野孝雄編), にゅーろん社 (1980) 150—153.
- 30) Levine PH, Sladdin DG and Krinsky NI : Superoxide, xanthine oxidase and platelet reactions : further studies on mechanisms by which oxidants influence platelets. *Thrombos Haemostas* (1981) **45**, 290—293.
- 31) Sumimoto H, Takeshige K and Minakami S : Superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by leukotriene B₄. *Biochim Biophys Acta* (1984) **803**, 271—277.
- 32) Gay JC, Beckman JK, Brash AR, Oates JA and Lukens JN : Enhancement of chemotactic factor-stimulated neutrophil oxidative metabolism by leukotriene B₄. *Blood* (1984) **64**, 780—785.
- 33) 佐野 清, 宮原 潔, 正路浩二郎, 木畑正義, 木村郁郎 : 単球における貪食作用と過酸化脂質生成能, 過酸化脂質研究 (1978) **2**, 63—65.
- 34) Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM and Harman D : Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* (1987) **107**, 526—545.
- 35) Suematsu T, Takeda T, Abe H, Kikuchi S and Yagi K : Serum lipoperoxide level in patients suffering from liver diseases. *Clin Chim Acta* (1977) **79**, 267—270.
- 36) 内藤周幸, 山中 健 : 動脈硬化性疾患と過酸化脂質. *日老医学会誌* (1978) **15**, 187—200.
- 37) 大内栄悦, 大久良晴, 千葉正康, 三浦利彦 : 加齢と免疫からみた臨床予防医学. *臨床病理* (1987) **35**, 740—747.

**Studies on superoxide anion production
by human monocytes**

Part 1. The effect of aging

Yasuo MISHIMA

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Superoxide anion (O_2^-) plays an important role in the bactericidal activity of human monocytes. Stimulation of human monocytes by concanavalin A (Con A) and cytochalasin E (Cyt E) results in superoxide production. In this study, the O_2^- generation of monocytes was assessed for variation with age. Monocytes obtained from 51 normal subjects were assessed.

The optimal concentrations of Cyt E and Con A were $20\mu\text{g/ml}$ and $100\mu\text{g/ml}$, respectively. There was no significant difference in O_2^- production between males and females. O_2^- production in older subjects (65-86years) was significantly lower than that in younger subjects (20-64years) ($p < 0.05$). The values were 11.2 ± 3.3 nmol/min/ 10^6 cells in the former, and 12.9 ± 2.6 nmol/min/ 10^6 cells in the latter. These findings suggest that impaired O_2^- production might be one of the factors accounting for the impaired bactericidal activity of mononuclear leucocytes in the aged.