

口腔内多形核白血球の刺激応答性

秋丸 国広*・山本 昌澄**・岩田 真**・岡添 陽子*
枝重 圭祐***・佐藤 英介****・佐伯 清美**・内海 耕慥*

(*高知医科大学・医学部・生物学教室, ***附属動物実験施設,
岡山大学・医学部・薬理学教室, **日本学術振興会特別研究員)

Stimulus-coupled Responses of Salivary

Neutrophils

Kunihiro AKIMARU*, Masazumi YAMAMOTO**, Makoto IWATA**,
Yoko OKAZOE*, Keisuke EDASHIGE***, Eisuke F. SATO****,
Kiyomi SAEKI** and Kozo UTSUMI*

Department of Medical Biology and*Institute for Experimental Animals, Kochi Medical School, Nankoku-shi, Kochi 783, Japan, **Department of Pharmacology, Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan and ****JSPS Fellowships for Japanese Junior*

Abstract. Salivary neutrophils (SPMN) were isolated from the oral cavity and stimulation-coupled responses were examined. From the morphological study and content of neutrophil specific 39 kDa protein, these cells seem to be similar with those of peritoneal neutrophils. Most of the neutrophils were young stage cells. Stimulation-coupled responses of these cells were observed in superoxide (O_2^-) generation, luminol chemiluminescence (LCL) response, membrane depolarization and changes in intracellular calcium ions. However, strong O_2^- generation was observed without addition of any stimulants. This LCL was inhibited by azide but not by uric acid or superoxide dismutase (SOD). The endogenous LCL decreased from the time after isolation from the oral cavity accompanied by the appearance of FMLP-coupled response. The rate of active oxygen generation by PMA was similar with that of peritoneal neutrophils, but opsonized zymosan (OZ) induced LCL was lower than that of peripheral neutrophils. Furthermore, the activity of active oxygen generation was maintained for a long period (more than 10 hours).

From these evidences, it is concluded that the salivary neutrophils have the specific characteristics of stimulation-coupled responses, and play an important role in the defense mechanism of the oral cavity.

緒 言

生体は正常な環境にあっても、常に種々の外的侵襲に晒され、その防衛に当って白血球系の細胞が重要な役割を果している。特に粘膜組織により直接外界と接触する肺胞や口腔をはじめとする消化器、更には排泄器等は細菌を初め種々の侵襲の大きいところで、強力な生体防衛反応が存在することが予期される。そのために、例えば肺胞内には肺胞マクロファージが存在してその防衛に対処していることはよく知られている。従って、口腔にもそれと同様な防衛手段でこれら多くの侵襲に対処する機構の存在することが予期される。事実口腔内には歯肉間隙 (gingival crevice) や唾液 (salivary) 内に多くの白血球が滲出し、その役割を果していると考えられる¹⁻⁵⁾。このような理由から、疾患時の末梢血白血球に対する研究はかなり進んでいる⁶⁻¹¹⁾。しかし基礎的研究としてのこれら白血球細胞の刺激応答性についての研究は必ずしも十分ではなく、最近になって、この口腔内白血球に関する基礎的研究がようやく始められるようになった¹²⁻¹⁴⁾。我々の研究室ではこれまでに人およびモルモット末梢血や、刺激誘導による腹腔内好中球についてその刺激応答反応やその機構解析を多角的に詳しく進めて来たが¹⁵⁻²²⁾、本研究ではこれらの研究を基礎にして、口腔内多形核白血球の分離分画法並びに種々の刺激応答性やその特異性の解析を試みた。

材料と方法

好中球：口腔内多形核白血球 (SPMN) は健康人 (24歳~62歳) から、十分に歯磨きして1時間後に、約15mlの1%ゼラチンを含む生理的食塩水または Ca^{++} -free の Krebs-Ringer-phosphate (KRP) にて30秒間の含嗽を7回 (合計約200ml) 行い¹³⁾採取した。このようにして採取した SPMN を細かいナイロクロース (500 mesh, 目の開き32 μm) で濾過し、出来るだけ上皮性細胞を除去し、300 x g, 10分の遠心分離により KRP にて3回洗滌し、分離した白血球は4°Cに保存し実験に供した。なお一部の実験にはモルモット腹腔内好中球も使用した。このためには、生理的食塩水に溶解した2%カゼインをモルモット腹腔内に体重の1/10量注入して、16時間後に採取し、KRP にて3回洗滌し実験に供した¹⁵⁾。また、人末梢血多形核白血球 (PPMN) は Ficoll-Paque 遠心法にて分離分画し調製した²³⁾。

細胞の形態及び細胞数：分離された SPMN の白血球細胞の種類や細胞形態を観察するためスメア標本をギムザ染色して観察した。また好中球特異性リコンビナント39kDa タンパク質 (r39 K) の抗体により間接法にて細胞染色を行い、蛍光顕微鏡下にそのタンパク質の分布について観察した²⁴⁻²⁷⁾。なお細胞数の計測はヘマトサイトメーターによった。

39kDa タンパク質のウエスタンブロッティング：分離細胞から、EGTA や種々のタンパク質分解酵素阻害剤を含む溶液中にてホモゲナイズし、その100,000 x g, 30分の遠心分画上清を得た。このようにして得た上清分画を SDS-PAGE にて分離し、それを Durapore filter にブロッ

ト後、抗 r39K タンパク質抗体にて前報に準じ²⁵⁾ウエスタンブロットして39K タンパク質の存在を確認した。なおタンパク質はクーマシーブルーにて染色し、その分布を解析した。

スーパーオキシド (O_2^-) 生成: スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により阻害される O_2^- 生成の測定は前報¹⁶⁾に準じて行った。即ち $40 \mu\text{M}$ シトクローム c (Cyt.c), 10 mM グルコース, 1 mM CaCl_2 を含む 37°C の KRP (pH7.4) に好中球 ($1.4\text{--}5.0 \times 10^5 \text{ cells/ml}$) を懸濁し, Cyt. c の還元による 550 nm の吸光度 ($A_{550-540}$) の増大より測定した¹⁶⁾。ここで, O_2^- 生成量は Cyt. c の分子吸光度 $21.0 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ より求めた。また測定はマグネティックスターラーで反応液を攪拌しながら島津二波長分光光度計 (UV-300) にて測定した。

ルミノール化学発光 (LCL): LCL の測定は前報と同様に Allen の方法²⁸⁾に従った。すなわち $100 \mu\text{M}$ のルミノール, 10 mM グルコース, 1 mM CaCl_2 を含む 37°C の KRP (pH7.4) に好中球 ($1.4\text{--}5.0 \times 10^5 \text{ cells/ml}$) を懸濁し, 反応液を攪拌しながら LCL の測定を Ca^{++} analyzer (Jasco CAF-100, Aequorin モード) にて測定した。また測定される LCL は微分値を示すため, 単位時間内の LCL は測定された時間内で示された LCL の面積計算より求めた。

膜電位変化: 好中球の細胞膜電位変化はシアニン系色素 diS- C_3 -(5) の蛍光強度変化より求めた。即ち, 37°C の $2.5 \mu\text{M}$ diS- C_3 -(5) を含む KRP に好中球を懸濁し, 670 nm の励起光による 622 nm の蛍光強度の変化を反応液攪拌装置を備えた島津蛍光分光光度計 (RF-510) にて経時的に測定した¹³⁾。

細胞内 Ca^{2+} : 細胞内 Ca^{2+} の変化については, Fura 2 /AM を予め細胞内に取り込ませ, 37°C の KRP に懸濁し, Ca^{++} analyzer (Jasco CAF-100) により Fura 2 の蛍光変化を測定し, Tsien らの方法により計算した^{29,30)}。

試薬: Cyt. c, formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), phorbol myristate acetate (PMA), Na-arachidonate (AA), SOD, チモーザンはシグマ社のものを, Fura 2 /AM は同人堂化学のものを使用した。また diS- C_3 -(5) は日本感光色素研究所より, ルミノールは片山化学より, カゼイン (nutrose) はコダック社よりそれぞれ購入した。その他の薬物はすべてナカライテスク株式会社の特級試薬を使用した。なお刺激物には細胞表面の受容体に結合する物として FMLP, Ca^{2+} -リン脂質依存性タンパク質リン酸化酵素の活性化物質として PMA, 膜攪乱物質として AA, 貪食機能の亢進物質としてオプソニン化チモーザン (OZ) を使用した。

実験結果

1. 白血球細胞の種類と形態: 口腔内には白血球の他に大量の脱落した粘膜上皮細胞が存在し, 白血球細胞から完全にこれら上皮細胞を除去することはかなり困難である。しかし目の細かい (500 mesh) ナイロンクロスによってかなりの上皮性細胞は除去できた。分離された白血球の形態から, その多くは比較的幼若な好中球と考えられる多形核白血球を主体とし, なかにはマ

クロファージ様の細胞も見られた (図1)。

また抗 r39K 抗体による染色により, これら細胞の多くは弱い反応性が認められ, この細胞が末梢血中の好中球系の細胞と類似することが示唆された (図2)。

さらに, これら細胞や人末梢血好中球のホモゲネートより分離した上清分画の, SDS-PAGE

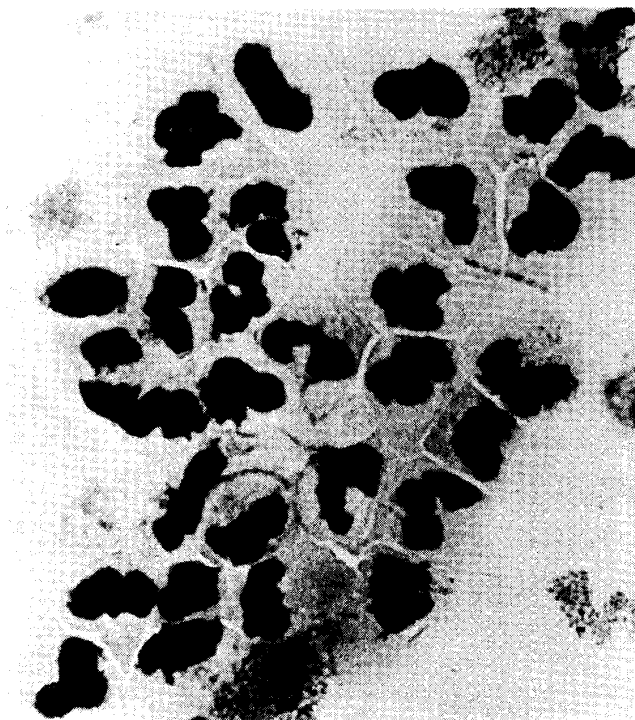


Fig.1. Microscopic structure of SPMN.

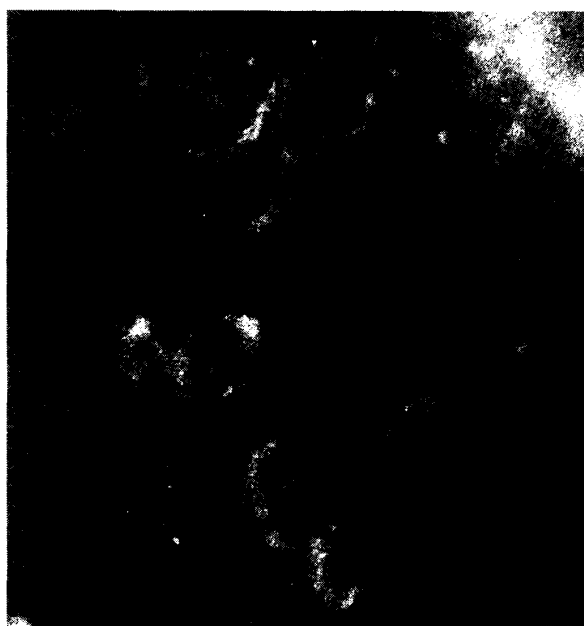


Fig.2. Immunocytochemical staining of salivary neutrophil (SPMN) with neutrophil specific 39K (annexin I) protein antibody.

を用いた抗 r39K タンパク質によるウエスタンブロットによる分析の結果では, SPMN には末梢血好中球と同程度の39kDa タンパク質の含まれることが明らかにされた (図3)。

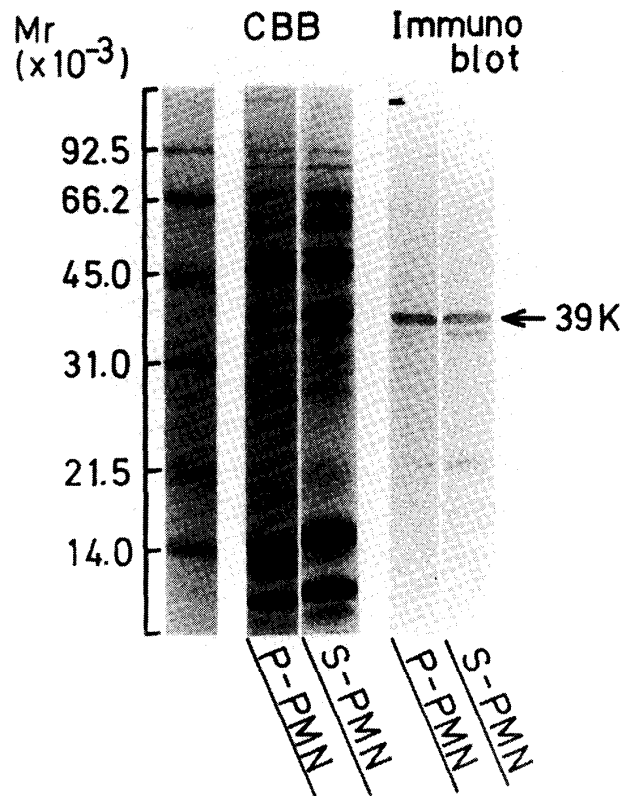


Fig.3. Immunoelectrophoretic blotting of homogenate supernatants obtained from human SPMN and peripheral neutrophils by the polyclonal antibody to the r39K protein. Homogenates were electrophoresed in 12 % SDS-PAGE and transferred to Durapore filters. CBB, coomassie blue staining : Immunoblot, immunoblotting with rabbit anti r39K protein antibody. P-PMN, human peripheral neutrophil : S-PMN, salivary neutrophils.

2. O_2^- 生成 : SPMN は刺激物添加に依存しない, いわゆる内在性の Cyt. c の還元で測定される O_2^- 生成活性が極めて強く, SPMN が口腔内で刺激物に作用されることなく常時 O_2^- を生成し, 血管系から遊出した白血球が口腔内で常時生体防衛に大切な働きをしていることが示唆される (図4)。またこの O_2^- 生成能は, 細胞の分離調製後の時間経過で次第に低下し, 数時間後にはかなり O_2^- 生成活性は小さくなるが, なおその活性は正常末梢血中の好中球に比して大きく, 持続した O_2^- 生成能の強い性質が伺えた。

また SPMN は37°Cの KRP のなかで種々の刺激物添加によって, 刺激物特有の O_2^- 生成を示した。すなわち, いずれの刺激物質によってもかなり強い O_2^- の生成が認められたが, Ashkenazi

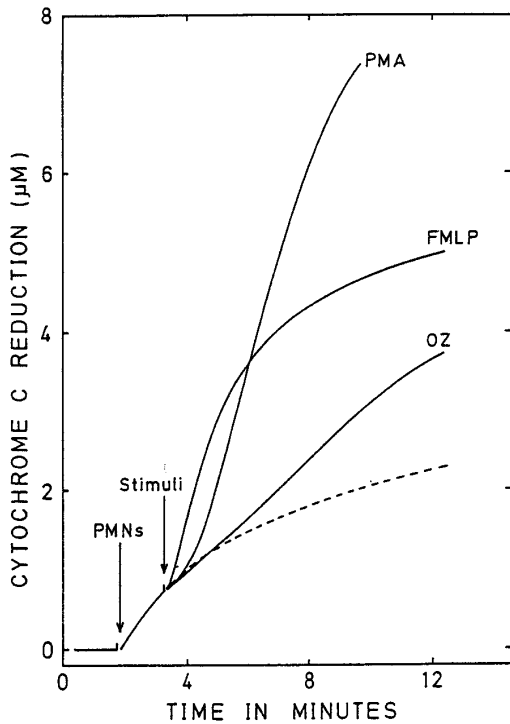


Fig.4. Endogenous and stimulation-coupled generation of superoxide from SPMN.

SPMN (2.5×10^5 cells/ml) were incubated in the medium of Krebs-Ringer-phosphate (KRP) solution containing 10 mM glucose, 1.0 mM CaCl_2 , 20 μM cytochrome c and 1 mM azide at 37°C . SOD inhibitable cytochrome c reduction was monitored by dual beam spectrophotometer (Shimadzu, UV 300). Total reaction mixture was 2 ml. Concentrations of FMLP, PMA and opsonized zymosan (OZ) were 1.25×10^{-8} M, 1×10^{-10} M and 400 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

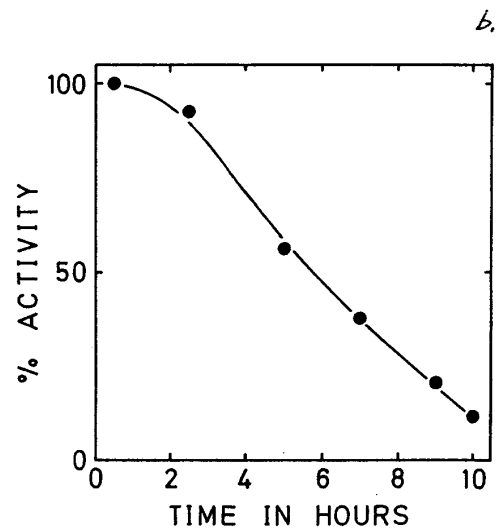
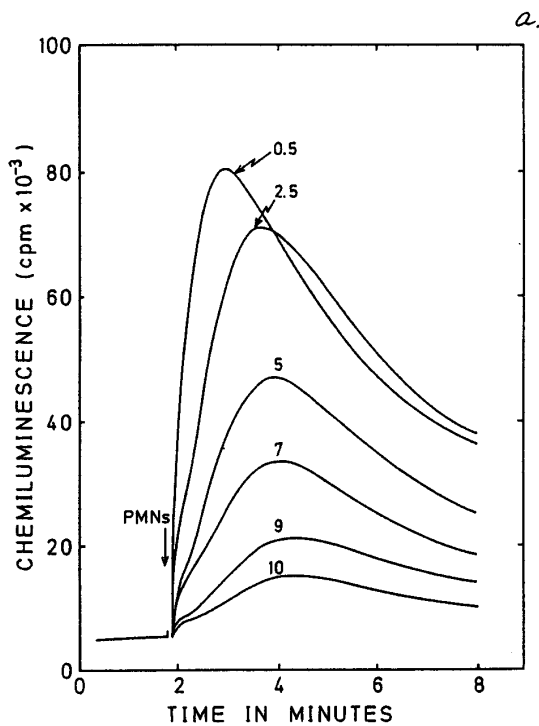


Fig.5. Time dependent decrease in luminol chemiluminescence (LCL) of SPMN.

LCL were measured in the same medium of Fig. 4 except 100 μM luminol was added instead of cytochrome c. LCL was measured by Ca^{++} analyzer (Jasco CAF-100, Aequorin mode). a, traces of LCL of SPMN without any stimulation: b, percent changes in LCL after isolation from oral cavity.

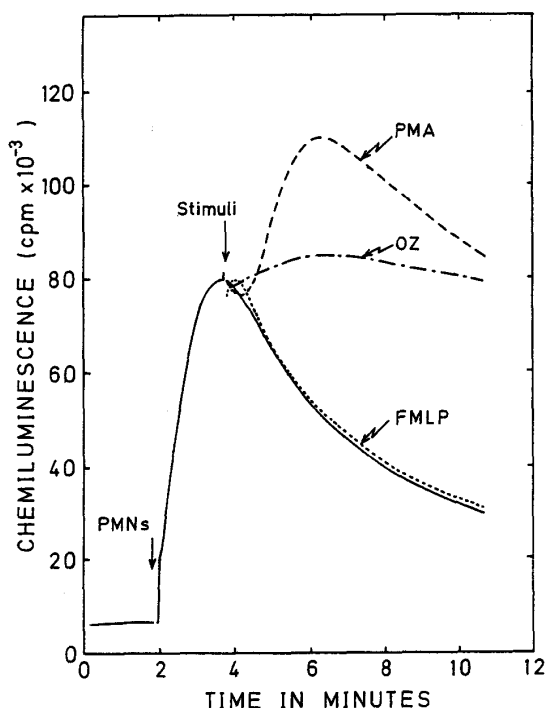


Fig.6. Effect of various stimuli on the LCL of SPMN at the peak of endogenous LCL. Experimental conditions were the same as describe in Fig. 5. All the stimuli concentrations were the same as in Fig. 4.

らの報告¹³⁾の様に、特に FMLP 刺激に依存した O_2 生成が強く、OZ のそれは著しく弱かった。それに比し PMA 刺激による O_2 生成は正常の末梢血好中球のそれと大差なかった。ここで OZ 依存性の O_2 生成の低いことに就いては、この細胞の多くは口腔内細菌等により既にプライミングを受けている可能性が高いため、あらたな OZ 刺激に反応しなくなっていることが示唆される。しかし、この問題に就いては、今後さらに検討する必要がある (図 4)。

3. 刺激物依存性の LCL: SPMN の LCL は $37^\circ C$ の反応液中で、 O_2 生成にみられたと同様に無刺激でも内在性の LCL が極めて強かった。この内在性の強い LCL もまた細胞を分離調製後、 $4^\circ C$ の KRP 中に保存するだけで時間と共に低下したが、細胞分離後約 10 時間でもなお無刺激の下で分離直後の 1/10 量の LCL が示された (図 5 a, b)。さらに O_2 生成に見られたように SPMN はまた刺激物に依存した強い LCL も示した。この刺激物依存性の LCL は、分離直後の高い内在性 LCL を示す細胞と、分離後数時間 $4^\circ C$ に放置して内在性の LCL の低下した細胞との間で、FMLP 刺激に対する反応性に著しい相違が示された。すなわち、分離直後の細胞で内在性の高い LCL を示す時点においては、FMLP を添加しても全く応答は示されないが、PMA の添加に対しては反応し、かなり強い LCL のより一層の増大が誘導された。また同じ時点で

OZ 刺激では O_2 生成にもみられたと同様に LCL のより一層の増大は見られないが、刺激に見られた LCL がかなり長時間持続した (図 6)。これに対し、内在性の LCL が incubation によって低下した時点で種々の刺激物を添加すると、PMA 刺激に対する応答は同様に認められるのに対し、OZ 刺激に対しての応答は極めて小さく、FMLP 刺激に対する応答は逆に著しく強かった (図 7)。この傾向は細胞分離後、長時間 (5~6 時間) 経過しても、刺激物依存性の応答反応図は 7 a に示したものと極めて類似していた (図 7)。この様な刺激応答性の反応を末梢血好中球のそれと比較すると、次の様な相違が注目される。すなわち、FMLP 刺激による LCL は末梢血のそれに比して 5~10 倍高く、PMA 刺激による LCL は逆に 1/5~1/10 に低下していた。また OZ 刺激による LCL は著しく小さく、口腔内の微生物等によるプライミングによることが示唆された。また、SPMN の無刺激で示された高い内在性 LCL も口腔内に常在する多くの微生物によるプライミングや、滲潤細胞が比較的幼若であるためと考えられる。これらのことを総合すると、SPMN はかなり特色ある性質を持つと結論される。

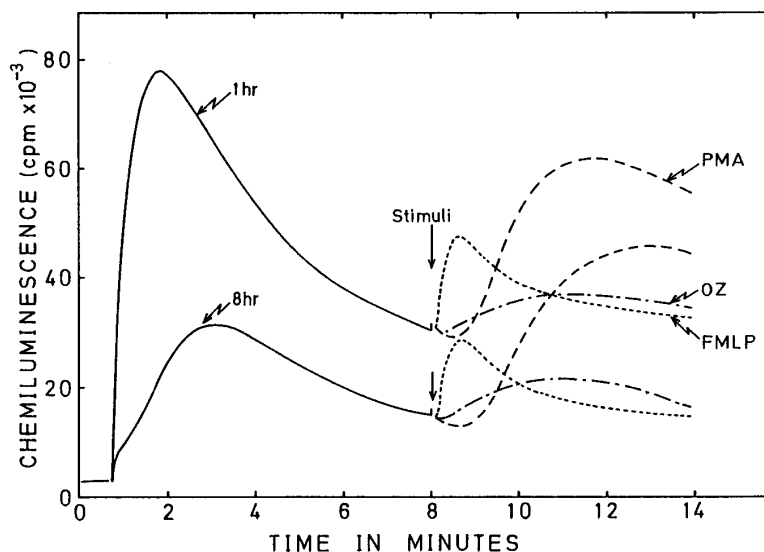


Fig.7. Effect of various stimuli on the LCL of fresh and aged SPMN.

Experimental conditions were the same as described in Fig. 6. All the stimuli were added at about 8 minutes after incubation. a, one hour after isolation ; b, 8 hr. after isolation.

4. 刺激物応答性 LCL の障害物感受性と活性酸素分子種：以上のように SPMN には強い内在性の LCL があり、そしてその反応はかなり特徴的な活性酸素に依存していることが示唆された。そこで、この内在性の LCL がどのような活性酸素分子種に依存しているかを解析するため障害実験を行った。その結果、図 8 に示すようにこの LCL は低濃度のアザイドで強く障害さ

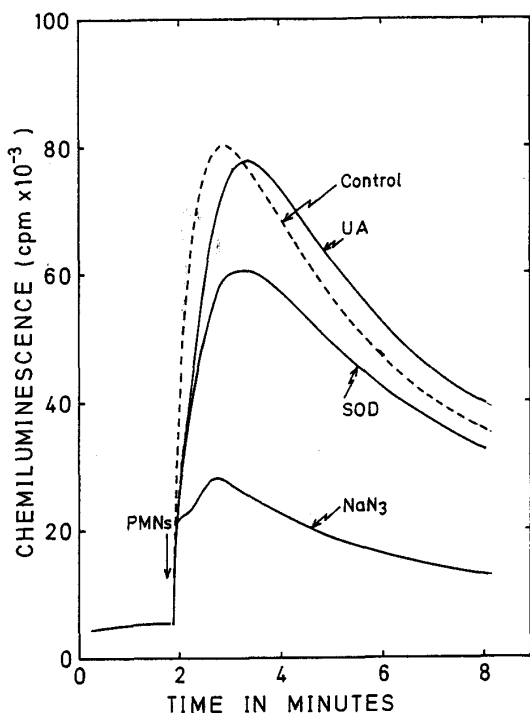


Fig.8. Effect of various reagents on the endogenous LCL of SPMN.

Experimental conditions were the same as described in Fig. 5. The concentration of uric acid, SOD and NaN_3 were $5 \mu\text{M}$, 200 unit/ml, and 1 mM, respectively.

れ、SOD によっては僅かに、尿酸によってはまったく阻害されず、これが OCI^- を主体とする活性酸素分子種であることが示唆された(図8)。もちろん、この他に FMLP, PMA, OZ 刺激に伴う LCL は先の報告³⁾の様にそれぞれ $\cdot\text{OH}$, OCI^- , 及び OCI^- と未解析の活性酸素によることは変りない。これらのことは、SPMN が口腔内で常時 O_2^- をはじめ種々の活性酸素を生成して、その防護機能に重要な働きをしていることを示唆している。

5. 刺激物依存性膜電位変化：現在その詳細な機構や生物学的機能についてはなお明らかでないが、末梢血中の正常な好中球は、種々の刺激物に応答して一過的な細胞膜の脱分極反応を示す。分離直後の SPMN は反応液中の疎水性プローブ [$\text{diS-C}_3-(5)$] を取り込み、高い細胞膜電位を示唆した。しかし、十分に分極し定常状態に達した細胞に FMLP や PMA などの刺激物を添加しても応答反応としての速やかな脱分極は極めて僅少で、その後より一層の過分極方向の反応を示し、正常の好中球の応答反応とは著しい差異がみられた(図9)。これは、口腔内という細胞にとってはかなり苛酷な条件下にあって、イオン環境や膜の物性を最も敏感に反映する膜電位変化は著しく障害されているためと考えられる。このことは同時に、これら膜電位変化が NADPH oxidase の活性化やその他の活性酸素生成反応にそれほど大きな関与をしていない可能性も示唆している。

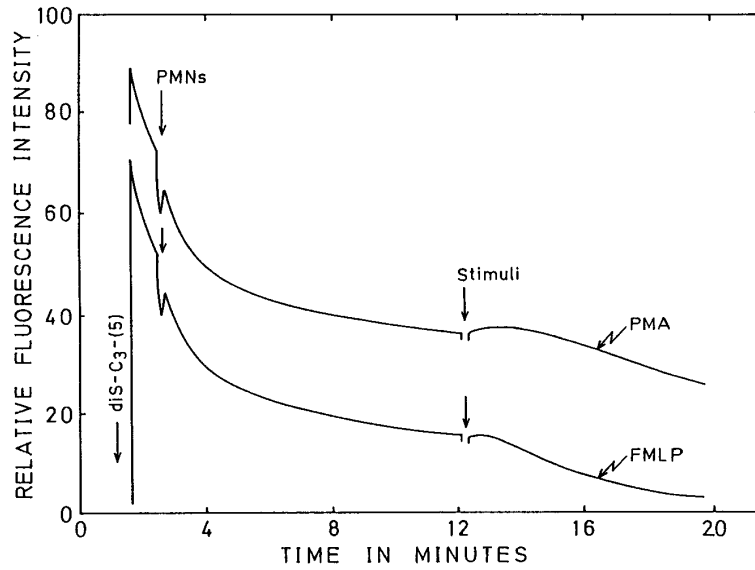


Fig.9. Stimulation-coupled membrane potential change of SPMN. 2.5×10^5 cells/ml of SPMN were incubated in the medium of KRP solution (pH 7.4) containing 10 mM glucose, 1.0 mM CaCl_2 and $2.5 \mu\text{M}$ diS- C_3 -(5) at 37°C . Fluorescence changes were measured by the spectrofluorometer (Shimadzu, RF-510). The concentrations of PMA and FMLP were the same as in Fig. 4.

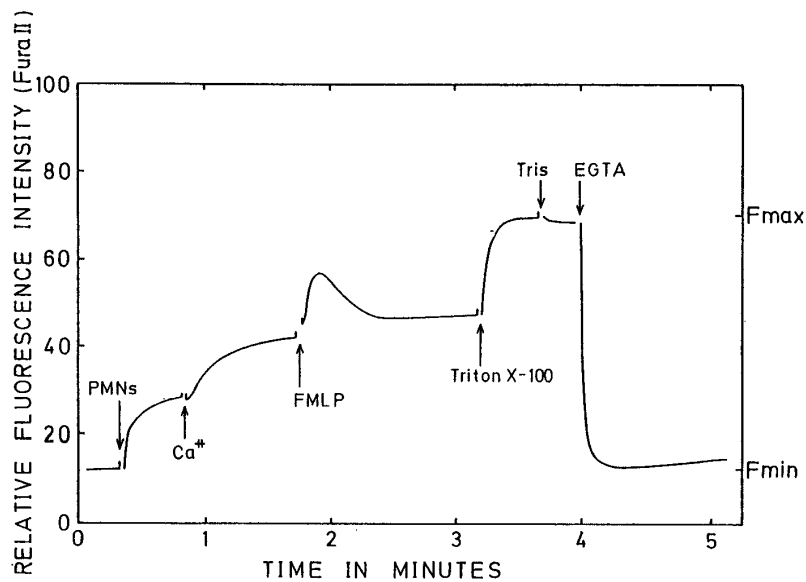


Fig.10. Stimulation-coupled change of intracellular calcium ion concentration in SPMN. Fura 2 loaded SPMN (2.5×10^5 cells/ml) were incubated in the medium of KRP solution containing 10 mM glucose. Change of fluorescence were measured by Ca^{++} analyzer (Jasco CAF-100) at 37°C . Concentrations of calcium and FMLP were 1.0 mM and 1.25×10^{-8} M, respectively.

6. 細胞内 Ca^{2+} 変化: 正常の末梢血好中球は刺激に应答して細胞内 Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の一過的で急激な増加が示され, これが細胞のシグナル伝達に重要な働きをしていることが明らかにされている^{16,18,24-27,29,30,31}). エステル型の Fura 2/AM を細胞質内に取り込ませると, それはエステラーゼで分解され遊離の Fura 2 となり, 遊離の Ca^{2+} との反応で Ca^{2+} の濃度に依存して蛍光を示す。この様な方法で, 正常な好中球は刺激物, とくに FMLP に反応して一過的な強い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を示す。この様な反応は SPMN においても認められ, この細胞におけるシグナル伝達においても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が大切な役割を果していることが示唆された (図10)。

結 論

口腔内には細菌を初め生体にとって異物と考えられる多くの物質が取り込まれる。従って, これらに対する防護機構は極めて良く発達し, その一つの機構として口腔内白血球による防護が考えられる。このことを明らかにする目的で人口腔内より多形核白血球を分離しその形態的ならびに生化学的性質を検索し, その結果次の様な性質をもつ細胞であることを明らかにした。

1. ギムザ染色による細胞形態の観察より, この細胞は幼若な好中球系の細胞が主体を成し, 好中球にかなり特異性の高い r39K タンパク質含有量も正常末梢血中のそれに類似していた。
2. SPMN は刺激物添加に依存することなく, 強い O_2 生成やルミノール化学発光を示し, これら活性酸素生成により口腔内での防護反応を担っていることが示唆された。
3. SPMN はまた刺激物にも应答して活性酸素の生成をするが, 無刺激の LCL が小さくなった時には FMLP による LCL が強くなり, 細胞表面受容体数の変化が示唆された。しかし PMA 刺激のそれは正常好中球と変り無いが OZ による活性酸素生成は極めて弱く, 口腔内の微生物によるプライミングが示唆された。
4. SPMN はまたこの他の刺激应答反応も認められ, 特に FMLP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は正常の好中球と変わらないが, 膜電位変化は極めて低下していた。

以上のことは SPMN は末梢血好中球と色々な点で特色をもち, 口腔内で積極的に種々の活性酸素を生成して生体防護反応に大切な機能を果していることを示唆する。

文 献

- 1) Sharry, J.J. and Krasse, B. Observation on the origin of salivary leukocytes. *Acta Odontol Scand.* 18, 348-358, 1960
- 2) Schioltz, C. R. and Loe, H. The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. *J. Periodont. Res.* 5, 36-41, 1970
- 3) Cox, M. O., Crawford, J.J., Lundblad, R.L. and McFall, W.T. Oral leukocytes and gingivitis in the primary dentition. *J. Periodont. Res.* 9, 23-28, 1974
- 4) Klinkhamer, J.M. Human oral leukocytes. *J. Am. Soc. Periodontics.* 1, 109-117, 1963
- 5) Murray, P.A. and Patters, M.R. Gingival crevice neutrophil function in periodontal lesions. *J. Periodont. Res.* 15, 463-469, 1980

- 6) Van Dyke, T.E. Role of the neutrophil in oral disease : Receptor deficiency in leukocytes from patients with juvenile periodontitis. *Rev. Infect. Dis.* **7**, 419-425, 1985
- 7) Miller, D.R., Lamster, I.B. and Chasens, A.I. Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. *J. Clin. Periodontol.* **11**, 1-15, 1984
- 8) Genco, R.J. and Slots, J. Host responses in periodontal diseases. *J. Dent. Res.* **63**, 441-451, 1984
- 9) Cohen, M.S., Leong, P.A. and Simpson, C.M. Phagocytic cells in periodontal disease : Periodontal status of patients with chronic granulomatous disease of childhood. *J. Periodontol.* **56**, 611-617, 1985
- 10) Fine, D.H. and Mandel, I.D. Indicators of periodontal disease activity : An evaluation. *J. Clin. Periodontol.* **13**, 533-546, 1986
- 11) Kowolik, M.J. and Raeburn, J.A. Functional integrity of gingival crevicular neutrophil polymorphonuclear leukocytes as demonstrated by nitroblue tetrazolium reduction. *J. Periodont. Res.* **15**, 483-491, 1980
- 12) Scully, C. and Wilkinson, P.C. Inflammatory polymorphonuclear neutrophil leukocytes : Orientation, chemotactic locomotor and phagocytic capabilities of neutrophils from human gingival crevice. *J. Clin. Lab. Immunol.* **17**, 69-73, 1985
- 13) Ashkenazi, M. and Dennison, D.K. A new method for isolation of salivary neutrophils and determination of their functional activity. *J. Dent. Res.* **69**, 1256-1261, 1989
- 14) Utsumi, K., Sugiyama, K., Miyahara, M., Naito, M., Awai, M. and Inoue, M. Effect of concanavalin A on membrane potential of polymorphonuclear leukocyte monitored by fluorescent dye. *Cell Struct. Funct.* **2**, 204-209, 1977
- 15) Kuroki, M., Kamo, N., Kobatake, Y., Okimasu, E. and Utsumi, K. Measurement of membrane potential in polymorphonuclear leukocytes and its changes during surface stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* **693**, 326-334, 1982
- 16) Morimoto, Y.M., Sato, E., Nobori, K., Takahashi, R. and Utsumi, K. Effect of calcium ion on fatty acid-induced generation of superoxide in guinea pig neutrophils. *Cell Struct. Funct.* **11**, 143-155, 1986
- 17) Sato, E., Edashige, K., Utsumi, T., Inoue, B., Miyahara, M. and Utsumi, K. Metabolic response of polymorphonuclear leukocyte to arachidonic and linoleic acids. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.* **18**, 79-87, 1986
- 18) Matsuno, T., Orita, K., Sato, E., Nobori, K., Inoue, B. and Utsumi, K. Inhibition of metabolic response of polymorphonuclear leukocyte by biscochlorin alkaloids. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 1613-1616, 1987
- 19) Miyahara, M., Watanabe, S., Okimasu, E. and Utsumi, K. Charge-dependent regulation of NADPH oxidase activity in guinea-pig polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **929**, 253-262, 1987
- 20) Miyahara, M., Okimasu, E., Uchida, H., Sato, E.F., Yamamoto, M. and Utsumi, K. Charge-dependent regulation of NADPH oxidase activities in intact and subcellular systems of polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **971**, 46-54, 1988
- 21) Matsuno, T., Orita, K., Edashige, K., Kobuchi, H., Sato, E.F., Inoue, B., Inoue, M. and Utsumi, K. Inhibition of active oxygen generation in guinea-pig neutrophils by biscochlorin alkaloids. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1255-1259, 1990
- 22) Takahashi, R., Edashige, K., Sato, E.F., Inoue, M., Matsuno, T. and Utsumi, K. Active oxygen dependent luminol chemiluminescence in activated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* in press, 1990

- 23) Ferrante, A. and Thong, Y.H. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human peripheral blood by the hypaque-Ficoll method. *J. Immunol. Methods* **36**, 109-119, 1980.
- 24) Utsumi, K., Sato, E., Okimasu, E., Miyahara, M. and Takahashi, R. Calcium-dependent association of 33 kDa protein in polymorphonuclear leukocytes with phospholipid liposomes containing phosphatidylserine or cardiolipin. *FEBS Lett.* **201**, 277-281, 1986
- 25) Sato, E.F., Morimoto, Y.M., Matsuno, T., Miyahara, M., and Utsumi, K. Neutrophil specific 33 kDa protein : its Ca^{2+} -and phospholipid-dependent intracellular translocation. *FEBS Lett.* **214**, 181-186, 1987
- 26) Sato, E.F., Tanaka, Y and Ursumi, K. cDNA cloning and nucleotide sequence of lipocortin-like 33 kDa protein in guinea pig neutrophils. *FEBS Lett.* **244**, 108-112, 1989
- 27) Sato, E.F., Tanaka, Y., Edashige, K., Kobuchi, H., Morishita, S., Sugino, Y. M., Inoue, M. and Utsumi, K. Expression of the cDNA encoding lipocortin-like 39 kDa protein of guinea pig neutrophils in yeast. *FEBS Lett.* **255**, 231-236, 1989
- 28) Allen, R.C. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence : A kinetic approach to analysis. *Method in Enzymol.* **133**, 449-493, 1986
- 29) Poenie, H., Alderton, J., Tsien, R.Y. and Steinhardt, R.A. Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle. *Nature* **315**, 147-149, 1985
- 30) Ozaki, Y. and Kume, S. Functional responses of aequorin-loaded human neutrophils. Comparison with fura-2-loaded cells. *Biochim. Biophys. Acta* **972**, 113-119, 1988

(1990年 7月16日受理)