Luminol-dependent Chemiluminescence を応用した 血清オプソニン活性の多検体同時測定法

The Simultaneous Multiple Measurement System of Serum Opsonic Activity Using the Technique of Luminol-Dependent Chemiluminescence

大分医科大学公衆・衛生医学教室

熊 江 隆・菅 原 和 夫・町 田 和 彦・島 岡 章

Takashi Kumae, Kazuo Sugawara, Kazuhiko Machida and Akira Shimaoka

Department of Hygiene and Public Health, Oita Medical College, Oita

The method of luminol-dependent chemiluminescence (LC method) is one of the measurement methods of the neutrophilic phagocytosis, which has been reported to give results similar to other previous methods and has good reproducibility.

We have succeeded in making a simultaneous multiple measurement system using the technique of LC method and also reported some basic findings on the measurement method of serum opsonic activity.

1. To introduce a one-step separation procedure of neutrophil from whole blood, the lag time from drawing blood to starting measurement is shortened.

2. A remodeled Lumiphotometer TD 4000 (Labo Science Co. Ltd.) is used to measure the luminescence. Using a digitizer, each value of measured luminescence (represented in voltage) is fed into the computer. Data of individual samples is printed out in the form of figures; the starting point is the time of adding a neutrophil suspension into the opsonized particles suspension, a horizontal axis means the elapsed time and a vertical axis means the intensity of luminescence.

3. The simultaneous multiple measurement system in this report also exhibits an excellent property of reproducibility. In the region of maximum luminescence, coefficient of variation is a mere 2 or 3% in all cases in this report.

4. According to the results of the simultaneous measurement using a standard serum and same neutrophil, we recognize that the luminescence patterns are characteristic of the particle species.

5. For the purpose of producing the samples graded by the activity of the thermolabile opsonic activator, inactivated serum (56°C, 30 min) and normal serum are mixed in specified proportions. From the results of the simultaneous measurement of these samples of plural particles, we can assume that the heat-inactivation effect on the opsonic activity is different from the particle species.

Key words: Chemiluminescence, Serum opsonin, Simultaneous multiple measurement system

化学発光, 血清オプソニン, 多検体同時測定法

緒 言

生体の持っている防御能力をあらわす一つの指標として、古くから白血球の貪食能は注目されてきた¹⁾。近年、白血球が異物を取り込む際に $O_2^- \cdot$ 、 $O_2 \cdot$ 、 H_2O_2 等を放出することが判明し、それらが安定な状態にもどる際に発光

することを利用して貪食能を測定する方法が開発された²⁾。さらに、ルミノールを添加し、 O_2^- などによる発光をルミノールで増感させる方法である Luminol-dependent Chemiluminescence が開発された^{3,4)}。しかし、これらは液体シンチレーションカウンターで測定されており広く普及するにはいたらなかった。そこで、よ

り手軽にルミノール発光を測定できる装置の開発が望まれたが、Andersen 等⁵⁾によって ATP spectrophotometer による測定法が確立され、以後多くの研究がなされてきている。

Luminol-dependent Chemiluminescence 法（以後 LC 法と略）は、食食の際に放出される活性種の酸素分子等によるルミノール発光の発光量を測定しており、直接的に食食を測定しているわけではない。しかし、正常な白血球においては従来の yeast や細菌を使用しての食食能測定法⁶⁾や標識標的細胞を用いる ⁵¹Cr 放出法⁷⁾と良く一致する。また、LC 法は再現性が良いために、血清のオプソニン活性の測定⁸⁾や種々の粒子に対する血清のオプソニン活性の動力学的研究⁹⁾にも使用されている。さらに、受光部や増巾装置の改良により、現在では赤血球の存在下でも LC 法が行えるようになってきている⁹⁾。

このように、LC 法の開発により白血球の食食能または血清オプソニン活性の研究は目ざましく発展をとげている。そこで、この LC 法を応用して多数の血清オプソニン活性を測定し、種々の血清タンパク質、ミネラル、ビタミンあるいは疾病との関連を研究することは衛生学的に興味あるものと考えた。しかしながら、現行の LC 法では一度に一検体しか測定できず、その測定時間も 30 分程度は必要である。したがって、好中球機能が分離後の時間経過と共に減衰することを考えれば、多数の検体を測定した場合には得られた結果の相対的評価にさえも問題が生じることが考えられる。

本報告においては、血清のオプソニン活性を測定し、その能力を評価する上で重要な問題である多数の検体の同時測定法の開発を目的として研究を行い、測定機器の改良と測定手法とを考案し、再現性の良い多検体同時測定法を開発し、今回、血清オプソニン活性の測定に関しいくつかの知見を得たので報告する。

実・験 方 法

1. 血清および好中球

大分市医師会立アルメイダ病院検査部と大分県成人病検診センターの協力により、一般血清生化学検査（20項目）において異常値を示さなかった 200 検体より、プール血清を作成し、標準血清とした。この標準血清を 500 μ l ずつサンプルカップに分注し、測定に使用するまでは -70°C にて保存した。

好中球は正常成人の肘静脈より採血した全血をヒストパック 1119 と 1077（アスカ・シグマ社）で処理することにより一段階 30 分で単離された。測定には HEPES-

Salin 緩衝液で洗浄してから使用した。好中球数は、白血球用メランジュール（EKDS, JHS 規格検定品）・Türk 液と EKDS 改良ノイバウエル血球計算器（JHS 規格検定品）を用い、熟練した 1 名の医師が 2 回算出した値の平均値を用いた。

2. 被食食粒子

粒子として Zymosan (Sigma 社)、E. coli 生菌、Staphylococcus aureus 生菌および Pseudomonas aeruginosa 生菌の 4 種類を使用した。E. coli は Endo Agar（栄研）で、St. aureus は Staphylococcus Agar No. 110（栄研）で、P. aeruginosa は Nutrient Agar（栄研）で一夜培養した後に取り出し、HEPES-Salin 緩衝液で二度洗浄して測定に使用した。菌の濃度は比色法により算出した。

3. 多検体同時測定法の基本的操作法

被食食粒子を HEPES-Salin 緩衝液（pH 7.4, 10 mM HEPES, 130 mEq.K, 2.5 mEq.Ca, 4 mM ブドウ糖）400 μ l に浮遊させて、血清（0～140 μ l）を加えて攪拌し、 37°C でインキュベート（0～120 分）する。これにルミノール溶液（0.2 mM）を 100 μ l 加え、次にすみやかに好中球浮遊液（ $0.5\sim 4.0\times 10^6$ 個/ml）を 100 μ l 加えて、3 秒間攪拌⁹⁾し、ただちにサンプルホルダー中にサンプルチューブを入れて、3 秒間ルミノール発光を測定する。次の検体も同様に操作し、一巡後は始めの検体にもどり 3 秒間攪拌してから 2 度目の測定を行う。この操作を好中球を加えてから約 30 分間くり返す。この場合は機器特性や検体交換のため一回の測定に約 8 秒間が必要であり、時間的には、25 検体を同時に測定する場合に一巡して元の検体にもどるのに約 3 分間が必要である。

4. 測定機器および測定値処理方法

ラボサイエンス社のルミフォトメーター TD4000 を改造して測定に使用した。検体の測定時間は 1 から 9 秒間まで設定可能とし、出力は $\times 1$ から $\times 1000$ までの 4 段階に設定可能とした。測定にはポリスチレン製ディスポチューブを用い、サンプルホルダーは 37°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) とした。

食食によって起こる発光は受光部で電気信号に変換され、増巾された後にアナログレコーダー端子より出力されて Fig. 1 で示したように記録紙上に連続的に記録された。記録された各ピークの高さ（発光強度）と好中球添加時点からの記録用紙上の距離とをデジタイザー（OSCON Gradimate A4-10）により読み取った。次にコンピュータ（NEC PC9800E）で処理し各検体毎に好中球を添加した時点を原点として横軸に経過時間を、縦軸に

Fig. 1 Luminol-dependent chemiluminescence from leucocytes after addition of opsonized particles. The chemiluminescence was measured by the remodeled Lumiphotometer TD 4000 and converted into voltage as recorded by an analogue recorder (chart speed: 30 mm/min).

ルミノール発光強度（電圧で表示）を取り、各検体毎に作図した。

結 果

1. 好中球単離

血清のオプソニン活性を評価するためには同一の好中球を一定の条件下で作用させることが肝要である。また、でき得る限り採血後測定に使用するまでの時間を短くし、かつ好中球のみを選択的に高収率で得ることが望まれる。本報告では採血後、ただちに分離液上に全血を重層し遠心分離を行うという方法を採用した。この方法により採血から測定にかかるまで1時間以内と単離時間を短縮することが可能となった。また、好中球の選択性は95%以上、全血からの好中球の収率も50%以上とデキストラン法^{10,11)}よりも良好であった。

2. 多検体同時測定法の再現性

LC法の再現性が良いことは以前より報告されている^{6,8)}が、本報告の多検体同時測定法では1回の計測時間が3秒間と短いこと、また同時に測定する検体数を増やせば1検体毎の測定間隔が長くなることにより再現性が低下する可能性が考えられた。

そこで再現性を検討した結果を Fig. 2 と Fig. 3 に示したが、粒子として Zymosan を使用した場合は25検体

Fig. 2 Reproducibility of this measurement system and effect of neutrophil concentration upon reproducibility. The measurement was run at 37°C with mixing. Opsonized zymosan (400 μ l, 1 mg/ml) was used as the particle. Variation of cell concentration was as follows; A : B : C = 2 : 1.5 : 1. Each line is the average of eight observations and the vertical bar shows the standard deviation. Horizontal axis: minutes, the time required since phagocytosis started. Vertical axis: millivolts, the intensity of luminescence transformed into voltage signals.

Fig. 3 Reproducibility of this measurement system and effect of neutrophil concentration upon reproducibility. Opsonized E. coli (400 μ l, 2.0×10^9 /ml) was used as the particle. Variation of cell concentration was as follows; A : B = 2 : 1. Each line is the average of five observations and the vertical bar show the standard deviation.

を同時測定し、その中の同一の血清を使用した8個ずつ3組の検体について検討した。Fig. 2のA, B, Cは好中球の濃度が再現性に及ぼす影響を示しており、好中球濃度が高いほど発光量も多くなり、再現性も最大ピーク付近で変動係数(CV)が2.3% ($\pm 0.3\%$)と最も安定していた。同様にE. coliを使用した場合は15検体を同時測定し、その中の同一の血清を使用した5個ずつ2組の検体について検討した。Zymosanの場合と同じく好中球濃度が高いほど再現性も良く、最大ピーク付近でのCVは2.9% ($\pm 0.6\%$)となった。したがって、好中球が十分に存在する条件下では再現性は良好といえる。

3. 測定条件の検討

現在までにLC法に関して多くの研究がなされている。これらの報告をもとに各粒子毎に本報告の多検体同時測定法における至適条件を検討した。その結果、基本的条件としては、測定中の温度 37°C 、緩衝液はHEPES-Saline緩衝液、また添加するルミノール量は最終濃度が $0.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ となるようにした。

粒子としてZymosanを使用した場合のIncubation時間による発光量の変化をFig. 4に示した。発光量はIncubation時間30分の場合に最も大きくなった。1時間では発光量が少し低下したが、発光のパターンには著明な変化を認めなかった。

Fig. 4 Effect of incubation time upon the chemiluminescence response when stimulated by opsonized zymosan. Incubation time was changed; 0 min, 30 min, and 1 h. The measurement was run at 37°C with mixing. The medium was HEPES buffer and the luminol final concentration was $3 \times 10^{-5} \text{ M}$. Other measurement conditions were neutrophil concentration; $3.0 \times 10^6/\text{ml}$, serum amount; $60 \mu\text{l}$, and zymosan concentration; 1 mg/ml . Details of measurement conditions are described in the text.

さらに血清量による発光量の変化を見るためにIncubation時間を固定して測定を行った(Fig. 5)。添加する血清が、 $20 \mu\text{l}$, $40 \mu\text{l}$ そして $60 \mu\text{l}$ と増加するにしたがって発光量は大きくなり、最大発光となる時間も早くなった。しかし、 $60 \mu\text{l}$ を越えると最大発光となる時間にはほとんど変化が認められないのに発光量は小さくなった。

次にZymosanの濃度を変化させた場合を検討した(Fig. 6)。濃度を 1 mg/ml から 10 mg/ml まで変化させ

Fig. 5 Effect of the opsonizing serum amount upon the chemiluminescence response of peripheral blood leucocytes stimulated by zymosan. The opsonizing serum amount was changed; $20 \mu\text{l}$ ($\circ$), $40 \mu\text{l}$ ($\bullet$), $60 \mu\text{l}$ ($\triangle$), $80 \mu\text{l}$ ($\blacktriangle$), $100 \mu\text{l}$ ($\square$), $120 \mu\text{l}$ ($\blacksquare$), and $140 \mu\text{l}$ (*). Other measurement conditions were neutrophil concentration; $3.5 \times 10^6/\text{ml}$, incubation time; 30 min, and zymosan concentration; 1 mg/ml .

Fig. 6 Effect of zymosan concentration on the luminescence response of peripheral blood leucocytes. The zymosan concentration was changed; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 mg/ml . Other measurement conditions were neutrophil concentration; $2.0 \times 10^6/\text{ml}$, serum amount; $60 \mu\text{l}$, and incubation time; 30 min.

た場合には、発光量や発光パターンに著明な変化は認められなかった。

上記の検討をくり返して至適測定条件を確認し、さらにこの条件下で好中球数を変化させた場合を検討した。結果を Fig. 7 に示したが、発光量は好中球数に正比例して増加した。

Fig. 7 Effect of neutrophil concentration on the luminescence response when stimulated by opsonized zymosan. The neutrophil concentration was changed; 4.0 , 3.0 , 2.0 , 1.5 , 1.0 , and $0.5 \times 10^6/\text{ml}$. Other measurement conditions were zymosan concentration; 1 mg/ml , serum amount; $60 \mu\text{l}$, and incubation time; 30 min .

したがって粒子として Zymosan を使用する場合にはより均質な浮遊液を作り易い 1 mg/ml の濃度とし、血清量 $60 \mu\text{l}$, Incubation 時間 30 min , 添加する好中球の濃度は $2.0 \times 10^6/\text{ml}$ 以上であることが至適測定条件であった。

同様にして他の粒子も至適測定条件を検討した。E. coli, P. aeruginosa, St. aureus の至適菌濃度はそれぞれ 2.0×10^6 , 1.0×10^6 , $7.0 \times 10^5/\text{ml}$ と異なっていたが、血清量・Incubation 時間にはほとんど差がなく、またそれぞれの条件は Zymosan の至適測定条件と良く一致していた。

4. 粒子による発光パターンの変化

本報告で使用した 4 種類の粒子の発光パターンを検討した結果を Fig. 8 に示した。これらの発光パターンはそれぞれの粒子の至適測定条件において観測されたものである。

Fig. 8 Effect of the opsonized particle species on the luminescence pattern of peripheral blood leucocytes. The particle species were ●; Zymosan (1 mg/ml), ○; E. coli ($2 \times 10^9/\text{ml}$), ▲; Pseudomonas aeruginosa ($1 \times 10^9/\text{ml}$), and △; Staphylococcus aureus ($7 \times 10^9/\text{ml}$). Other measurement conditions were neutrophil concentration; $4.5 \times 10^6/\text{ml}$, serum amount; $60 \mu\text{l}$, and incubation time; 30 min .

Zymosan は好中球添加直後から 10 分経過付近までは他の粒子より発光量は小さいが、20 分を経過したあたりで最大発光量となり、他の粒子よりも発光量は大きかった。E. coli の発光パターンはこれらの粒子の中で最も急峻であり、最大発光量となる時点が Zymosan より早かったが、発光量の低下は Zymosan と良く似ていた。P. aeruginosa はこれらの粒子の中で最もおそく最大発光量を示し、発光量の上昇も下降もゆるやかであった。St. aureus は好中球添加直後より 10 分を経過する時点までの間は他の粒子より発光量も大きく、最大発光となる時点が他の粒子より早かった。また、発光量の低下はこれらの粒子の中で最もゆるやかであった。

このように同一の好中球と標準血清を用いて、同時に測定を行っても粒子によって発光パターンは大きく変化した。またこれらの測定においては前述したように、最大ピーク付近での CV はいずれも $2 \sim 3\%$ であった。

5. 非動化血清による発光パターンの変化

標準血清の一部を取り出し 56°C で 30 分間熱処理を行い非動化血清とした。この非動化血清と -70°C にて保存した標準血清を混合して検体とし測定を行った。保存血清は 37°C 水浴ですみやかに解凍した。

混合率は、1) 正常血清 100% , 2) 正常血清 $80\% +$ 非動化

Fig. 9 Effect of the graded inactivation of serum thermolabile opsonic activity on the luminescence response of peripheral blood leucocytes. The particles were (a) Zymosan, (b) *P. aeruginosa* and (c) *E. coli* and concentrations of particles were the same as Fig. 8. The graded inactivation serums were made from inactivated (56°C, 30 min) and normal serum. Inactivated serum: normal serum ratio used for opsonization were ○ (0 : 100), ● (20 : 80), △ (40 : 60), and ▲ (60 : 40). Other measurement conditions were neutrophil concentration; $4.0 \times 10^6/\text{mL}$, serum amount; $60 \mu\text{L}$, and incubation time; 30 min.

血清20%, 3) 正常血清60%+非動化血清40%, および4) 正常血清40%+非動化血清60%とした。粒子として Zymosan を使用した場合を Fig. 9(a) に示しているが、非動化血清が増すに従って最大発光量が下がってきており、また最大発光となる時間もおくれてきている。次に Fig. 9(b) に *P. aeruginosa* の結果を示したが、Zymosan ほど顕著ではないが同様の傾向を示した。これらの粒子と異なり *E. coli* を使用した場合 (Fig. 9(c)) には最大発光量には差がほとんど認められなかった。しかし、非動化血清が60%と過半数を占めた場合には最大発光となる時間におくれが認められた。

考 察

白血球が食作用を行う時に過酸化水素や酸素のフリーラジカルであるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) を放出することは良く知られており、それらの測定法¹²⁾ も報告されている。さらに、Andersen 等⁵⁾ によって ATP Spe-

crophotometer を使用する LC 法が開発され、比較的安価な測定器機で、少量の白血球しか必要とせず暗室操作もなく測定が可能となり飛躍的に食食に関する研究が進むようになった。また、この LC 法は、従来の食能測定法とも一致^{6,7)} し、再現性も優れている^{6,8)} ことが報告されている。

そこで、この LC 法を応用して多数の血清のオプソニン活性を同時に測定し得る測定方法の開発を試みた。現在入手し得る測定器機では同時に多数の検体を測定することはできない。したがって、市販の ATP spectrophotometer (ルミフォトメータ TD4000・ラボサイエンス社) を改造することとした。種々の方法を検討した結果、測定の前後にサンプルホルダーと受光部との間に自動的にシャッターが入るようにした。この改造によって多数の検体を測定することが可能となった。しかし、発光量は Fig. 1 で示したように記録され、デジタイザーを使用してコンピュータに入力しなければならなかった。入力に

要する時間は10分程度ではあるが、デジタイザーによる入力時間を省き、さらに測定精度を向上させるために、発光量を直接コンピュータへ入力可能にする予定である。

また好中球を測定する上で単離法は重要な問題である^{8,10,11)}。単離後の時間経過と共に好中球の活性が落ちていくことも良く知られており、それに対処する方法も考えられてはいる⁸⁾。しかしながら、本報告では採血後、直ちに分離液上に全血を重層し遠心分離を行うという方法を採用し、デキストラン法^{10,11)}よりも短時間かつ高収率で好中球を単離した。

この多検体同時測定法において、最も心配されたことは再現性であった。それは、検体を多くするほど測定間隔が長くなるために、1回の計測時間を極力短くしたことにある。本報告の結果はすべて計測時間3秒で行っているが検体の攪拌や出し入れのため1回の測定につき7～8秒を必要とした。したがって25検体では測定間隔が約3分であった。しかし、Fig. 2, 3に示したように本法は良い再現性を有していた。特に最大発光量付近では変動係数 (CV) が2～3%であった。このCVは検体作成時点から起こり得るすべての誤差を含んでいるものであることを考えれば測定の再現性はかなり良好と言える。

次に測定条件を検討したが、食食が温度により影響を受けること⁵⁾や、使用する培地、緩衝液によっても影響を受けること^{5,13,14)}は良く知られている。本報告では測定中の温度は37°Cとし、緩衝液はHEPES-Saline緩衝液のみを使用した。また、添加するルミノール量にも至適濃度があることが報告されているが、今回検討を行った結果も前報⁸⁾とほぼ同様であり最終濃度が 0.3×10^{-4} Mになるように調整した。

血清量とIncubation時間とさらに使用する粒子とによる差も問題となる。これらに関しては以前より検討が行われてきており^{15,16)}、また粒子によるオプソニン活性化の動力学的な差異の検討⁶⁾も行われている。これらの報告をもとに、繰り返し測定条件を検討した結果、各粒子毎の本報における至適測定条件を見出すことができた。

さらに、被食食粒子を変化させた場合に本報が受ける影響を検討した。血清のオプソニン活性化能は使用する粒子によっても変化することは知られており⁶⁾、同一の菌種であっても株によって差が生じることも知られている¹⁷⁻¹⁹⁾。LC法では使用する粒子によって、また細菌を使用する場合には生菌であるか死菌であるかによっても発光のパターンが変化すると報告^{6,16)}もある。

本報においても、Fig. 8に示したように、粒子によって

その発光パターンは異なっていた。また、*St. aureus* は他の粒子に比較し、かなり高濃度にしなければ十分な発光量が得られなかった。

本報は再現性に優れ、また使用する粒子によって特徴的な発光パターンを示すことが確認された。そこで、これらの粒子による特徴的な発光パターンが、実験的に血清のオプソニン活性を変化させた際にそれに応じて変化し得るかを検討した。

血清中のオプソニン作用を示すものには耐熱性と熱不安定性の物質が存在することは古くから知られている²⁰⁾。この熱不安定性成分を非働化 (56°C・30分) することにより不活性化させた。この非働化血清と正常の血清とを種々の割合に混合して検体とし測定を行った。結果をFig. 9に示したが、非働化による影響は粒子によって異なっており、それぞれ特徴的にオプソニン活性の変化を反映しているものと思われた。すなわち、Zymosan は熱不安定性成分により強くオプソニン化され、逆に *E. coli* では耐熱性成分の寄与が大きいものと考えられた。

このように、数種類の血清を使用して複数の粒子でのオプソニン活性の変化を標準血清といっしょに同時に短時間で測定することは従来の方法では困難であった。さらに、本報では好中球機能障害が疑われる患者やあるいはそのキャリアと思われる被検者の好中球と健常者の好中球とで同時に標準血清によりオプソニン化された複数の粒子を用いて測定することにより、好中球の食食能を多面的に評価することも可能である。

本報の多検体同時測定法は、白血球食作用阻害あるいは促進物質の添加実験や、臨床面では液性免疫の推移を観察するといった応用も可能であり有力な新手段であるといえる。

現在、種々の疾病による血清オプソニン活性の変化を検討中である。

結 論

白血球が食作用を行う時に放出する O_2^- 等とルミノールとの反応を利用する、Luminol-dependent Chemiluminescence 法 (LC 法) は従来の食食能測定法と良く一致し、再現性が良いことも報告されている。このLC法を応用して血清のオプソニン活性を同時に多数測定し得る方法を開発することを目的として研究を行い、その開発に成功し、また血清のオプソニン活性の測定に関していくつかの知見を得た。

1. 全血より好中球を一段階で単離する方法を採用し、採血から測定にかかるまでの時間を短縮した。

2. ルミフォトメータ TD4000 (ラボサイエンス社) を改造して測定に用いた。測定された発光量 (電圧で表示) をデジタイザーでコンピュータに入力し、各検体毎に好中球を添加した時点からの発光量の時間的变化として作図した。

3. 本報告の多検体同時測定法は再現性においても優れていた。最大発光量付近では粒子によらず変動係数は 2 ~ 3 % であった。

4. 標準血清でオプソニン化し、同一の好中球を用いて同時に測定を行い、発光パターンが粒子によって特徴的であることを認めた。

5. 非働化した血清と正常な血清を混合することにより、熱不安定性のオプソニン活性化物質の活性を変化させた検体を作った。それらを同時に複数の粒子を用いて測定し、粒子によってオプソニン活性に及ぼす非働化の影響が異なっていることを見出した。

謝 辞

標準血清を作成するにあたり、御協力をくださいました大分市医師会立アルメイダ病院と大分県成人病検診センターの杉田肇先生と野崎秀俊先生に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 広川太刀雄, 石川清文, 海原正三, 斉藤鎌一: 白血球貪食能の検査法について, 産業医学, **2**, 1-5 (1960).
- 2) Allen, R.C., Stjernholm, R.L. and Steele, R.H.: Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity, Biochem. Biophys. Res. Commun., **47**, 679-684 (1972).
- 3) Allen, R.C. and Loose, L.D.: Phagocytic activity of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages, Biochem. Biophys. Res. Commun., **69**, 245-252 (1976).
- 4) Wilson, M.E., Trush, M.A., van Dyke, K., Kyle, M.J., Mullet, M.D. and Neal, W.A.: Luminol-dependent chemiluminescence analysis of opsonophagocytic dysfunctions, J. Immunol. Meth. **23**, 315-326 (1978).
- 5) Andersen, B.R. and Brendzel, A.M.: Use of a

- unique chemiluminescence spectrometer in a study of factors influencing granulocyte light emission, J. Immunol. Meth., **19**, 279-287 (1978).
- 6) Williams, A.J., Hastings, M.J., Easmon, C.S.F. and Cole, P.J.: Factors affecting the in vitro assessment of opsonization: a study of the kinetics of opsonization using the technique of phagocytic chemiluminescence, Immunology, **41**, 903-911 (1980).
 - 7) 松本美富士, 小川勝己, 伊藤 歩: Chemiluminescence (化学発光) 法によるヒトの natural killer (NK) 細胞活性測定の検討, 臨床病理, **29**, 1253-1256 (1983).
 - 8) Easmon, C.S.F., Cole, P.J., Williams, A.J. and Hastings, M.: The measurement of opsonic and phagocytic function by luminol-dependent chemiluminescence, Immunology, **41**, 67-74 (1980).
 - 9) Kato, T., Wokalek, H., Schof, E., Eggert, H., Ernst, M., Rietschel, Th. and Fischer, H.: Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood, Klin. Wochenschr., **59**, 203-211 (1981).
 - 10) Johnston, R.B. Jr., Klemperer, M.R., Alper, C.A. and Rosen, F.S.: The enhancement of bacterial phagocytosis by serum: The role of complement components and two cofactors, J. Exp. Med., **129**, 1275-1290 (1969).
 - 11) 辻 芳郎, 楊井正紀, 柳 忠道: 好中球の走化能, 臨床免疫, **13**, 371-374 (1981).
 - 12) Takeshige, K., Matsumoto, T., Shibata, R. and Minakami, S.: Simple and rapid method for the diagnosis of chronic granulomatous disease, measuring hydrogen peroxide and superoxide anions released from leukocytes in whole blood, Clinica Chimica Acta, **92**, 329-335 (1979).
 - 13) Nelson, R.D., Herron, M.J., Schmidtke, J.R. and Simmons, R.L.: Chemiluminescence response of human leukocytes: influence of medium components on light production, Infect. Immun., **17**, 513-520 (1977).
 - 14) Andersen, B.R. and Amirault, H.J.: Important variables in granulocyte chemiluminescence, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **162**, 139-145 (1979).

- 15) Miller, M.E.: Phagocytosis in the newborn infant: Humoral and cellular factors, *J. Pediatrics*, **74**, 255-259 (1969).
- 16) 楊井正紀, 森 剛一, 福田友子, 辻 芳郎: ヒト多核白血球のルミノール添加による Chemiluminescence 測定の検討, *医学のあゆみ*, **112**, 594-596 (1980).
- 17) Giebink, G.S., Verhoff, J., Peterson, P.K. and Quie, P.G.: Opsonic requirements for phagocytosis of streptococcus pneumoniae types VI, XVIII, XXII and XXV, *Infect. Immunity*, **18**, 291-297 (1977).
- 18) Stephens, C.G., Williams, R.C. and Reed, W.P.: Classical and alternative complement pathway activation by pneumococci, *Infect. Immunity*, **17**, 296-302 (1977).
- 19) Verhofe, J., Peterson, P.K., Kim, Y., Sabath, L.D. and Quie, P.G.: Opsonic requirements for staphylococcal phagocytosis. Heterogeneity among strains, *Immunology*, **33**, 191-197 (1977).
- 20) Wright, A.E. and Douglas, S.R.: An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis, *Proc. Roy. Soc. Ser. B Biol. Sci.*, **72**, 357-370 (1903).
(受付 1985年7月30日 受理 1985年12月26日)