ヒト微量血からの新しい好中球分離法の検討

工 藤 恵美子*¹, 小 松 尚*¹, 中 路 重 之*¹,
菅 原 和 夫*¹, 熊 江 隆*²

*¹弘前大学医学部衛生学教室, *²国立公衆衛生院労働衛生学部

Investigation of a New Method for Separation of Neutrophils from a Small Volume of Human Blood

Emiko Kudoh*¹, Takashi Komatu*¹, Shigeyuki Nakaji*¹,
Kazuo Sugawara*¹ and Takashi Kumae*²

*¹*Department of Hygiene, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki*

*²*Department of Industrial Health, the Institute of Public Health, Tokyo*

We have already reported a neutrophil separation method for the multiple simultaneous measurement of neutrophil chemiluminescence. However, when the reported separation method was used, at least 4 ml of venous blood was needed to collect enough neutrophils for chemiluminescent measurement. Because of this blood volume, there is a limitation on applications of the multiple simultaneous method for neonates, infants, and in some clinical situations.

To expand the application of this neutrophil chemiluminescence measurement into clinical and health science areas, we have developed a new method for separation of neutrophils from a relatively small amount of blood (500 μ l). In addition, the influences of remaining red blood cells and hemoglobin levels in the neutrophil fraction on the chemiluminescence were examined to determine the necessity for elimination procedures.

The new separation method used a capillary tube (length, 130mm; outside diameter, 5mm; thickness, 0.8mm) with density gradient reagents (Histopaque 1077 and 1119). After centrifugal separation (500g, 30min), the neutrophil fraction was isolated with $93.1 \pm 4.7\%$ purity and $60.6 \pm 11.1\%$ yield. This purity and yield were comparable to or better than those with the previously reported method, while levels of remaining red blood cells and hemoglobin were about the same. Remaining red blood cells and hemoglobin in the neutrophil fraction acted on the chemiluminescence as a quencher. For the correct estimation of neutrophil chemiluminescence, elimination of remaining red blood cells and hemoglobin in the neutrophil fraction is necessary.

This new neutrophil separation method is a very useful method, especially for cases in which available blood amounts are limited.

Key words : Neutrophil separation method, Small volume of blood, Chemiluminescence,
Quencher of CL

好中球分離法, 微量血, 化学発光, クエンチャー

緒 言

近年, 白血球が異物を取込む際に, 活性酸素種を放出することが判明し, この活性酸素種が励起状態から基底状態にもどる際に発光することを利用して好中球機能を

評価する方法を, 1972年Allenらが報告した¹⁾。さらに, ルミノールを添加し, 発光量を増加させる方法である luminol-dependent chemiluminescence (以下LDCLと略) が開発され^{2~4)}, AndersonらによってATP-spectrophotometerによる簡便な測定法が確立された⁵⁾。熊江らは,

それを応用して好中球chemiluminescence (以下CLと略)の多検体同時測定法を考案し⁶⁾, 多方面から好中球CLを検討し報告してきている⁷⁻⁹⁾。非特異的感染防御機構をなす好中球機能の低下は, 慢性肉芽腫症, Chediak-東症候群等の疾患を引き起こすことで知られている¹⁰⁾。また, 新生児期の細菌感染症の重篤化の一因としても, 好中球機能の低下が推測されている^{11, 12)}。よって好中球機能を測定することは, 細菌感染症の予防及び予後の予測の上で重要な意味をなすと考えられる。しかし, 好中球機能を測定するのに十分な量の好中球を確保するためには, ある程度の採血量を必要とし, 新生児期のように採血量に制限のある場合の好中球機能の評価は困難で, また集団健診等のスクリーニング検査として活用することもできなかった。

そこで我々は, capillary tubeを用いて, 少量の採血量で好中球を高純度かつ高収率で分離する方法を開発し, 集団健診のスクリーニング検査などに活用できるようにすることを目的として, 研究を行っている。本報では, この新しい好中球分離法で分離した好中球を用いてLDCLを測定し, 分離方法間の差異を従来法と比較検討した。さらに, 分離後の好中球浮遊液中に残存する赤血球が, LDCLに及ぼす影響についても検討したので報告する。

実験方法

1. 対象

一般血清生化学検査20項目(総蛋白, アルブミン, ナトリウム, カリウム, クロール, 尿素窒素, クレアチニン, カルシウム, リン, 尿酸, トランスアミナーゼ(GOT, GPT), アルカリホスファターゼ, コリンエステラーゼ, 乳酸脱水素酵素, γ -グルタミールトランスペプチダーゼ, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, 総コレステロール, 中性脂肪)において異常を認めず, 何らの自覚症状も有さない健康で正常と思われる成人(以下健康正常成人と略)を対象とした。対象者は実験の内容を理解し, 採血に自発的に協力を申し出たものである。好中球分離法を検討する実験においては, 25歳から34歳まで(平均28.4

± 2.2 歳)の健康正常成人10人を対象者とした。また, 赤血球の混入がLDCLに与える影響を検討する実験も, 健康正常成人10人(21歳から34歳, 平均 25.5 ± 3.9 歳)を対象者とした。

2. 好中球分離試薬

好中球分離試薬としてHistopaque-1077, 1119 (Sigma社), Mono-Poly Resolving Medium (以下M-PRMと略, フロウラボラトリーズ社)を用いた。Histopaque-1077, 1119は, Ficollとsodium diatrizoateを比重1.077および1.119になるように混合した溶液である。通常は, buffer等で2倍に希釈した全血と同量ずつ重層して用いる^{13, 14)}。一方のM-PRMは, FicollとHypaqueを比重1.114になるように混合した溶液で, 通常は全血を希釈せずに, この分離液と体積比で1:1の割合で重層して用いる^{15, 16)}。

3. Capillary tubeの選択

通常の遠心器に適応できる長さや硝子管のJIS規格を考慮して, a) 外径2.7mm・肉厚0.35mm・長さ120mm, b) 外径4mm・肉厚0.8mm・長さ130mm, c) 外径5mm・肉厚0.8mm・長さ130mm, およびd) 外径6mm・肉厚1.0mm・長さ120mmの計4種類のcapillary tubeを用意し, それぞれのtubeによる好中球分離能を比較検討した。また, 好中球のガラス壁面への接着を防ぐ目的で, シリコフィルム(半井化学薬品株式会社)によるcapillary tubeのシリコンコーティングも試みた。

4. 好中球分離法

健康成人の肘正中皮静脈から採血し, 血液と同量のヘパリン加Hanks' balanced salt solution (以下HBSSと略, GIBCO社)に加えて2倍希釈全血とした後に, Table 1に記す4通りの重層法を行った。

A法: 従来法。外径16.0mm, 肉厚0.9mm, 長さ100mmのBorosilicate Glass Tubeを用い, Histopaque-1119と1077を4mlずつ重層し, その上に同量(4ml)の希釈全血を重層した。

B法: 外径10.0mm, 肉厚0.6mm, 長さ75mmのBorosilicate Glass TubeにHistopaque-1119と1077, 希釈全血をそれぞれ1mlずつ重層した。

Table 1 Density-gradient method

	blood volume (ml)	Tube				Isolation medium	
		ext.d. (mm)	leng. (mm)	thick. (mm)	number	density	volume (ml)
A	2.0	16.0	100.0	0.9	1	Histopaque-1077 + Histopaque-1119	each 4.0
B	0.5	10.0	75.0	0.6	1		each 1.0
C	0.5	5.0	130.0	0.8	3		each 1.0
D	0.5	5.0	130.0	0.8	2	M-PRM	1.114 1.0

ext.d.: external diameter, leng.: length, thick.: thickness, M-PRM: Mono-Poly Resolving Medium

C法: 外径5.0mm, 肉厚0.8mm, 長さ130mmのCapillary Tubeを用い, Histopaque-1119と1077, 希釈全血をそれぞれ約330 μ lずつ重層した。同じ物を3本作製し, 合計1mlの希釈全血を好中球分離に使用した。

D法: C法と同様のCapillary Tubeに, M-PRMと希釈全血をそれぞれ500 μ lずつ重層した。同じ物を2本作製し, 合計1mlの希釈全血を好中球分離に使用した。

A~D法でそれぞれ重層したものを, 500Gで30分間遠心分離して好中球分画を取り出した。さらに, HBSSで2回洗浄した後に, 混在している赤血球を0.2%NaClを用いる溶血操作で除去した。

各好中球分離法における好中球の選択性及び収率を比較検討するために, 各対象者の全血及びそれぞれの分離法毎の好中球分画の塗抹標本を作製し, Giemsa染色を行って白血球百分率を算定した。

また, 溶血操作後も好中球分画中に残存する赤血球数と色素(Hemoglobin; 以下Hbと略)濃度を自動血球計数装置Sysmex F-300 (東亜医用電子株式会社製)を用いて測定し, Hb濃度として表示した。

5. 好中球LDCL測定の基本操作

すでに報告⁶⁾したように, 被食食粒子として, 基準血清でオプソニン化したZymosanを用いた。

好中球数は, 自動血球計数装置Sysmex F-300を用いて 3.0×10^6 cells/mlに調製し, LDCLの測定に用いた。Lumiphotometer TD-4000にコンピューター(NEC PC9801 UV)を接続して, 熊江らの報告した好中球CL多検体同時測定法⁶⁾に準じて行った。

測定値は, すでに報告⁶⁾したように, それぞれ各検体の最大発光時間(Peak Time; 以下PTと略)と最大発光量(Peak Height; 以下PHと略)を算出して評価した。

6. 残存赤血球のLDCLへの影響

ヘパリン加全血を用い, 遠心して赤血球を得た。赤血球を, HBSSで2回洗浄した後に同液で希釈して, Hb量に換算して0.0g/dlから1.4g/dlの赤血球浮遊液を作った。なお, Hb濃度0.1g/dlは, 自動血球計数装置で測定したところ, 赤血球数 $3.80 (\pm 0.56) \times 10^4$ cells/ μ lに相当していた。この赤血球浮遊液50 μ lを, 好中球浮遊液(Hb量0.1g/dlを含む)50 μ lに混和して, 好中球数 3.0×10^6 cells/mlで赤血球混入量(Hb量に換算して)0.1~0.8g/dlの検体を作製した。この8段階の赤血球混入好中球浮遊液を前述の好中球LDCL法で測定し, 残存赤血球がLDCLに与える影響の検討を行った。

7. 統計的検定方法

得られた測定値の平均値と標準偏差値を求めた。測定値間の有意差については, Studentのt検定を用い, 危険率5%以下を有意とした。また, 相関係数の有意性の検定も, 危険率5%以下を有意とした。

結 果

1. 好中球分離用capillary tubeの検討

前述のa) b) c) 及びd)の4種類のcapillary tubeを用いて比較検討した。その結果, 外径が4mm以下で遠心器に設定できる長さのtubeを選択すると, 1本の容量が500 μ l以下となり, LDCLの測定に必要な好中球量を得るためには, 1検体当たり5本以上のtubeを用いなければならず重層等の操作に時間がかかった。また, tubeが太すぎると好中球層を取り出す操作がしにくくなり, かつ収率が低下した。よって, c)の外径5mm・肉厚0.8mm・長さ130mmのcapillary tubeが最も適当と考えられた。

capillary tubeのシリコンコーティングに関しても検討したが, ブレインの場合と収率の面で有意差がなく, 操作をより簡便にするために, シリコンコーティングは施さないまま使用することとした。

2. 分離法間の比較

Table 1に示す各々の分離法を選択し, それぞれにおける好中球の収率および純度を比較検討した。遠心操作を加えると, Fig. 1に示すようにそれぞれそのtube内で上から順に, ①血漿層, ②リンパ球・単球層, ③好中球層, ④赤血球層の4層に分離できた。従来M-PRMは, 全血と体積比で1:1の割合で重層して用いられている^{15, 16)}が, 今回好中球の選択性を上げるために, 全血をHBSSで2倍希釈して重層した。それにもかかわらずD法では, Fig. 1の右端に示すように, リンパ球・単球層が著明に狭くなっていた。これら4通りの分離法について, Table 2に好中球の選択性および収率, 残存赤血球量を示した。分離液としてHistopaqueを用いるC法が, 好中球の収率 $60.6 \pm 11.1\%$ と最も高値を示し, かつ好中球の選択性においては $93.1 \pm 4.7\%$ と従来法であるA法の $94.8 \pm 3.5\%$ とはほぼ同等であった。分離液としてM-PRMを用いるD法では, 好中球の収率は, 従来法より若干高めめの $49.3 \pm 25.3\%$ となったが, 好中球の選択性が $87.8 \pm 7.7\%$ と低下しており, かつ溶血操作後の残存赤血球量も, Hb濃度に換算して 0.8 ± 1.1 g/dlと他の3法に比べ有意($p < 0.001$)に高かった。

Fig.1 The results from each density gradient method.

Main contents of each fraction are as below.

- ①Top fraction: Plasma ②Second fraction: Lymphocytes & Monocytes
③Third fraction: Granulocytes ④Bottom fraction: Erythrocytes

Table 2 Isolation of neutrophils with each density-gradient method

Method	Differential counts (%)					Neutrophil yield (%)	Number of remaining RBC converted into Hb concentration (g/dl)
	Neutrophils	Eosinophils	Basophils	Lymphocytes	Monocytes		
A	94.8±3.5	2.7±3.0	0.2±0.3	2.3±1.1	0.2±0.3	29.2±10.1	0.1±0.0
B	91.7±5.3*	1.9±1.3	0.2±0.6	6.3±4.8*	0.0	27.4± 7.9	0.1±0.0
C	93.1±4.7	3.1±2.9	0.0	3.2±1.6	0.0	60.6±11.1***	0.1±0.0
D	87.8±7.7**	3.1±2.9	0.3±0.5	8.7±6.3*	0.1±0.3	49.3±25.3*	0.8±1.1***

Each value indicates Mean±S.D. (n=10)

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001; significant difference from method A.

RBC: red blood cell, Hb: hemoglobin.

3. LDCLに及ぼす分離法の影響

A, B, C, Dのそれぞれの分離法で分離した好中球を用いてLDCLを測定し, PT及びPHを求めた(Table 3)。どの分離法で得られた好中球を用いても, PTには有意差はなかったが, PHは, D法で分離した好中球を用いた場合, 他の3法に比べて著明に低下していた。

4. 残存赤血球のLDCLへの影響

先に述べたように, A法からD法までの4通りの方法で分離した場合の残存赤血球量は, Hb量に換算してA,

B, C法では0.1g/dlであったのに対して, D法では, 0.8g/dlと8倍の高濃度を示していた(Table 2)。この残存赤血球量の差が, LDCLにおけるPHの差をもたらす一因と考え, 検討した。

残存赤血球濃度をHb換算量で0.1g/dlから0.8g/dlの8段階に調節した好中球浮遊液を作製し, 残存赤血球がLDCLに及ぼす影響を検討した結果をFig.2に示した。赤血球濃度が濃くなるにつれて, PHが低下したが, PTに対する影響はなかった。健康成人10人の好中球を用いて行った結果を, Table 4に平均値±標準偏差で表示した。残存赤血球濃度は, 通常行っている溶血操作では, Hb濃度に換算して0.1g/dl以下とする事は困難なので, この0.1g/dlの濃度を基準として, 他の濃度でのPT, PHを%表示した。残存赤血球濃度が高くなればなるほどPH(%)は低下したが, PTには有意差が認められなかった。さらに, Fig.3に残存赤血球濃度と対数変換したPH(%)との関係を示した。残存赤血球濃度と%表示したPHの対数変換値の間には, 有意の負の相関($r = -0.99$, $P < 0.001$)が認められた。

Table 3 Influence of differences among the neutrophil-separation methods on chemiluminescent response

Method	PT (min)	PH (mV)
A	13.1±1.6	2113.2±427.7
B	14.1±1.1	2155.7±460.6
C	13.8±1.6	2010.8±434.9
D	14.5±2.4	1470.6±710.5*

Each value indicates Mean±S.D. (n=10)

*: p<0.05, significant difference from method A.

PT: peak time, PH: peak height

Fig. 2 Effect of remaining RBC on the luminol-dependent chemiluminescence response when stimulated by opsonized zymosan.

The number of remaining RBC converted into hemoglobin concentration.

Hemoglobin concentrations were 0.1(○), 0.2(●), 0.3(△), 0.4(▲), 0.5(□), 0.6(■), 0.7(◇) and 0.8(◆)g/dl.

Table 4 Effect of remaining RBC on Luminol-dependent chemiluminescence

concentration of remaining RBC (converted into Hb (g/dl))	LDCL			
	PT (min)	PT (%)	PH (mV)	PH (%)
0.1	13.6±2.8	100.0±0.0	2169.9±573.1	100.0±0.0
0.2	13.6±2.3	100.9±3.5	1823.5±494.9	84.1±7.3
0.3	13.7±2.6	101.1±3.1	1539.2±442.6	70.9±6.5
0.4	13.4±2.1	99.6±6.6	1372.3±371.9	63.3±5.4
0.5	13.8±2.3	101.5±4.5	1189.4±318.2	55.1±6.0
0.6	12.3±0.9	98.9±4.6	1252.9±207.1	51.3±6.3
0.7	12.1±1.3	98.5±7.7	1125.5± 99.4	45.4±4.4
0.8	12.3±0.9	98.3±8.7	1048.1±118.0	43.5±4.9

Each value indicates Mean±S.D. (n=10)

Hb 0.1g/dl is equivalent to RBC $3.80 (\pm 0.56) \times 10^4$ cells/ μ l.

考 察

CL法は、1972年Allenら¹⁾が報告して以来、様々な改良が加えられ、その再現性の良さや簡便性から、好中球機能を検討する際に広く活用されてきた。現在では、各種の増感剤を用いることにより、好中球より発生する活性酸素種の種類別の測定まで試みられてきている¹⁶⁾が、1回の測定には 1×10^6 cells/ml 以上の好中球数を必要とする。デキストラン法よりも収率が良くかつ操作も簡便迅速なHistopaqueを用いる比重勾配法⁶⁾で好中球を分離し、LDCLの測定を行うためには、最低でも4 ml 以上の採血量を要した。したがって、集団健診等におけるスクリーニング検査や新生児等の採血量に制限のある

検体を対象として、CL法で好中球の機能を検討するのは困難であった。

1988年にThomasら¹⁸⁾は、遠心操作により好中球に富むbuffy coatを取り出してLDCLを行い、新生児期の好中球機能を論じているが、buffy coatの構成細胞分画を明確にしていない。また、細胞数をそろえずにLDCLを測定し、好中球数とPHが正比例関係にあるものとして、好中球数1000個当たりの発光量に換算して報告している。他にも好中球を単離せずに全血のままでもCLを測定し、単位好中球当たりの発光量に換算した報告はある^{19, 20)}が、それぞれ測定結果がまちまちであり、好中球を単離せずに全血のままでも測定し、単位好中球当りで表している点に問題があると考えられた。

Fig.3 Relationship between remaining RBC and peak height of the luminol-dependent chemiluminescence.

The number of remaining RBC converted into hemoglobin concentration.

The percentage of peak height was converted into a common logarithm.

Hb: Hemoglobin, PH: Peak height.

今回の少量採血による好中球分離法を検討した結果では、500 μ lの採血量で好中球を高収率高純度で単離するには、外径5mm・肉厚0.8mm・長さ130mmのcapillary tubeが最も適していた。

分離液として今回我々は、HistopaqueとM-PRMを使用してみた。M-PRMは、比重1.114 Ficoll-Hypaque混合溶液で、重層の手間なく好中球を単離できる利点がある^{15, 16)}が、実際使用してみたところリンパ球・単球層が狭く、好中球層にリンパ球の混入が多かった。また赤血球が好中球層に混入する率がHistopaqueを重層した場合より高かった。Histopaque-1077および1119の重層法は、重層の手間が1回多いが好中球の分離状況からみると有用であると考えられる。また、M-PRMを用いて好中球を単離した場合はLDCLでPHの低下が認められた。溶血操作後も残存する赤血球およびHbが、CLの妨げになることが論じられており^{5, 20, 21)}、好中球分画に赤血球の残存が多いことが、D法で分離した好中球を用いてLDCLを測定した場合のPHの低下をもたらす一因と考えられた。そこで、残存赤血球がLDCLに及ぼす影響について検討してみた。Fig.2およびTable 4に示すように、残存赤血球濃度が高くなるほどPHは低下するが、PTには影響は認められなかった。このPHの低下を引き起こす原因として、Hbの色素による色クエンチング作用²¹⁾が考えられる。また、好中球にsuperoxide dismutase (SOD)を添加した場合にも、今回の結果と同様にPTにはほとんど影響が認められずPHのみが低下す

る¹⁷⁾ことから、赤血球中に存在するSOD²²⁾が、活性酸素種を除去する方向に働くことも推測できる。残存赤血球量とPHとの間に認められた高い負の相関関係をもとに、D法より分離した好中球のPH値を、Fig.3の直線回帰式を用いて補正してみたところ 2180.5 ± 378.7 mVとなり、A法でのPHと近似した値となった。したがって、このことから残存赤血球が、PHの低下をもたらす原因となっていたものと考えられた。

以上より500 μ lの少量採血量でも、LDCL測定に十分な好中球を分離できる方法が確立された。今後、感染症が重篤化しやすい新生児期の免疫機能検査や集団健診等のスクリーニング検査の一項目として、この好中球分離法を用いた好中球機能の検討が活用できるものと思われる。

結 語

LDCL測定を500 μ lという少量採血量で行うために、好中球を高純度高収率で分離する方法を検討し、以下の結果を得た。

1. 重層に用いるtubeの規格を検討した結果、外径5mm・肉厚0.8mm・長さ130mmのcapillary tubeが、遠心等の操作が可能で、取扱いやすく、収率の面でもすぐれていた。
2. 分離液としては、M-PRMよりもHistopaque-1077と1119を重層して用いたほうが、好中球の選択性の面で優れていた。

3. 好中球分画中に残存する赤血球量と, LDCLのPHの間には高い負の相関関係が認められた。したがって, 好中球分画中の残存赤血球量はなるべく少なくすることが望ましいと考えられる。

文 献

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) Allen, R.C.: Evaluation of serum opsonic capacity by quantitating the initial chemiluminescent response from phagocitizing polymorphonuclear leukocytes, *Infect. Immun.*, **15**, 828-833 (1977).
- 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) 熊江 隆, 菅原和夫: 好中球Chemiluminescenceの多検体同時測定法, *日血会誌*, **50**, 949-957 (1987).
- 7) 佐分利能生, 熊江 隆, 那須 勝, 糸賀 敬, 長門 宏: 珪肺患者における好中球Chemiluminescenceの検討, *日胸疾患会誌*, **27**, 57-63 (1989).
- 8) Kumae, T., Saburi, Y., Nasu, M., Misumi, J. and Kawata, N.: Effects of cefbuperazone on the chemiluminescence of human neutrophils, *Chemotherapy*, **35**, 260-266 (1989).
- 9) Osanai, T., Shiroto, C., Mikami, Y., Kudoh, E., Komatsu, T., Nakaji, S., Kumae, T., Sugawara, K. and Sasaki, M.: Measurement of GaALAs diode laser action on phagocytic activity of human neutrophils as a possible therapeutic dosimetry determinant, *Laser Ther.*, **2**, 123-133 (1990).
- 10) Quie, P.G.: In "Nelson textbook of pediatrics, 13 edition" (Editor: Nelson, W.E.), p.476, W.B. Saunders Company, Philadelphia and Tokyo (1987).
- 11) Wright, W.C., Ank, B.J., Herbert, J. and Stiehm, E.R.: Decreased bactericidal activity of leukocytes of stressed newborn infants, *Pediatrics*, **56**, 579-584 (1975).
- 12) Mills, E.L., Thompson, T., Bjorksten, B., Filipovich, B.S. and Quie, P.G.: The chemiluminescence response and bactericidal activity of polymorphonuclear neutrophils from newborns and their mothers, *Pediatrics*, **63**, 429-434 (1979).
- 13) Boyum, A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, suppl. 97, 9-109 (1968).
- 14) English, D. and Andersen, B.R.: Single-step separation of red blood cells, Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque, *J. Immunol. Meth.*, **5**, 249-252 (1974).
- 15) Ferrante, A. and Thong, Y.H.: A rapid one-step procedure for purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood using a modification of the hypaque-ficoll technique, *J. Immunol. Meth.*, **24**, 389-393 (1978).
- 16) Needham, P.L.: The separation of human blood using mono-poly resolving medium, *J. Immunol. Meth.*, **99**, 283-284 (1986).
- 17) 小松 尚, 工藤恵美子, 中路重之, 熊江 隆, 菅原和夫: Luminol-dependent Chemiluminescenceによる好中球産生活性種酸素の測定, *弘前医学*, **43**, 328-337 (1992).
- 18) Thomas, V.L., Sanford, B.A., Driscoll, M.S., Casto, D.T. and Ramamurthy, R.S.: Luminol-dependent chemiluminescence microassay for phagocytic function, *J. Immunol. Meth.*, **111**, 227-232 (1988).
- 19) 松木隆任, 上野範博, 大川正人, 鹿野高明, 外岡 立, 松本脩三: 全血利用luminol依存性Chemiluminescence, *日臨免疫誌*, **6**, 195-203 (1983).
- 20) Tonooka, T., Ueno, N., Ohkawa, M. and Matsumoto, S.: Chemiluminescence of whole blood. 1. A simple and rapid method for the estimation of phagocytic function of granulocytes and opsonic activity in whole blood, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **26**, 66-75 (1983).

- 21) 佐倉伸夫, 小林陽之助, 臼井朋包: 白血球殺菌能試験—Chemiluminescence, 細胞性免疫機能検査のすべて(月刊Medical Technology 編), p.31, 医歯薬出版, 東京 (1985).
- 22) Hartz, J.W. and Deutsch, H.F.: Subunit structure of human superoxide dismutase, J. Biol. Chem., **247**, 7043-7050 (1972).
(受付 1991年9月10日 受理 1991年12月18日)