ヒト単球の遊走能におよぼすビタミン C, ビタミン K₃ およびビタミン K₅ の影響に関する研究

森 川 裕 藤 本 平 蔵 福 田 訓 子
道 明 幸 治 大 草 修 塚 本 芳 雄
森 政 和

大阪歯科大学薬理学教室 (指導: 森 政和教授)

[受付: 昭和58年12月19日]

Inhibition of monocyte chemotaxis by vitamins *in vitro*

Yutaka Morikawa, Heizo Fujimoto, Kuniko Fukuda,
Koji Domyo, Osamu Okusa, Yoshio Tsukamoto
and Masakazu Mori

Department of Pharmacology, Osaka Dental University,
1-47, Kyobashi, Higashi-ku, Osaka, 540
(Chief: Prof. Masakazu Mori)

[Accepted for publication: December 19, 1983]

Key words: ascorbic acid / vitamin K / monocytes / chemotaxis

Abstract: Vitamin (Vit) C, Vit K₃ and Vit K₅ appeared to be mediators capable of regulating inflammatory cell functions, such as degranulation of mast cells, spreading, migration and phagocytosis of neutrophils. However, the effects of these vitamins on monocyte migration mediated by chemoattractant have not been investigated.

This study was to determine whether Vit C, Vit K₃ and Vit K₅ directly affected monocyte chemotaxis.

The assay of monocyte chemotaxis was performed by the membrane filter method. Human monocytes were isolated by Ficoll-Paque centrifugation from peripheral blood and were placed in chemotaxis chambers. Monocyte suspension was separated from the chemoattractant, N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), by 5 μ m polycarbonate filters. Chambers were incubated at 37°C for 90 min. Then the filters were disassembled and stained for quantitation of cell migration.

Vitamin was dissolved in FMLP solution to determine the effect on monocyte chemotaxis.

Addition of Vit C (5×10^{-5} M to 5×10^{-3} M) suppressed the migration of monocytes to FMLP and the highest depression was detected at 10^{-3} M. There was no effect by 5×10^{-7} M to 10^{-5} M Vit K₃. However, dose-dependent inhibition appeared on the monocyte migration at 5×10^{-5} M and 10^{-4} M of Vit K₃. Vit K₅ as the varying concentrations of 5×10^{-7} M to 10^{-4} M resulted in dose-dependent reduction of the migrated monocytes through the filters.

From these findings, it can be described that Vit C, Vit K₃ and Vit K₅ modulate the numerous neutrophil functions and affect the monocyte migration mediated by chemoattractant *in vivo*.

緒 言

ビタミンは、生体内の生化学的な反応において触媒的な作用を持ち、物質代謝が円滑に行われるために不可欠な物質である。

ビタミンは体内で合成できないため、体外から供給されなければならないが、供給量が不足すると、物質代謝の調節に異常が起り、いろいろな疾患が誘発される。

ビタミンCの欠乏症としては、出血性素因や壊血病が報告されている¹⁾が、歯周疾患と関連した欠乏症としては、歯肉炎あるいは歯周炎が発症しやすくなること、および、増悪する傾向が強くなることが報告されている^{2,3)}。

さらに、ビタミンCを投与することにより、これらの疾患や症状が軽減あるいは消失すると報告⁴⁾されているが、ビタミンCと欠乏症との関係については、ビタミンCが、コラーゲンの生成、含硫アミノ酸代謝、芳香族アミノ酸代謝および還元作用に必須の物質であり、欠乏するとこれらの代謝に異常を来すことが原因であると説明する報告⁵⁾がある。

さらに、ビタミンCは、炎症反応の調節に関与することが知られており、中でも細胞機能との関係について、Weening⁶⁾ら(1981)は、好中球の機能低下を来す Chediak-Higashi syndrome の患者に、ビタミンCを投与すると、好中球の機能が回復することを報告しており、Leibovitz⁷⁾ら(1978)および Thomas⁸⁾ら(1978)は、ビタミンCが、好中球の遊走能および貪食能を促進することを報告している。また、Goetzl⁹⁾ら(1974)は、ビタミンCが、好中球および単球を含む炎症性浸出細胞のランダムマイグレーションを亢進する作用を持つと報告している。

ビタミンKは、全身の組織中にひろく分布しているビタミンであるが、肝臓でのプロトロンビンの合成に必要な因子であることから、止血機構において重要な役割を果している。

ビタミンKの欠乏症としては、出血、貧血、凝固時間の延長あるいはプロトロンビン量の減少が報告されている^{10,11)}が、さらに、ビタミンKは、実験的に惹起したラットの関節炎に対して、抗炎

症作用を持つことが報告されている^{12,13)}。

Woodin と Wienke¹⁴⁾ら(1966)は、ビタミンKが細菌由来のロイコシジンで刺激した好中球の脱顆粒を阻害すると報告しており、ビタミンKは、炎症性浸出細胞である好中球に作用して、抗炎症作用を発現するのではないかと考えられている。

本実験は、炎症反応の過程において、白血球の機能に影響をおよぼすと考えられるビタミンCおよびビタミンKが、単球の遊走能に対してどのような作用を持つかを知る目的で、ヒト末梢血から分離した単球を用いて、*in vitro* で membrane filter 法による遊走試験を行い、遊走因子によって誘起された単球の遊走能におよぼすビタミンC、ビタミンK₃およびビタミンK₅の影響を検討した。

実験方法ならびに実験材料

A. ヒト単球の分離

遊走試験に用いた単球は、ヒト静脈血から分離した。

血液は、20 units/ml の heparin (Nobo) で処理した plastic syringe (Top) を用いて、ヒト正中皮静脈から採取した。単球の分離は、Böyum¹⁵⁾の方法に準じて行い、採取した静脈血を、0.02M phosphate buffered saline (pH 7.2, 0.85 % NaCl, 以下 PBS と略す) で約3倍に希釈したのち、plastic tube (Corning) 内で、Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals) 上に重層し、室温で 400×g, 35分間遠心を行った。Plastic tube の中央部から採取した単球は、PBS を用いて、室温で 750×g, 10分間の遠心を行うことにより洗浄した。

B. 細胞浮遊液の調製

単球は、2 % bovine serum albumin (半井化学) および 20mM HEPES (半井化学) を含む Gey's balanced salt solution (pH 7.0, 以下 Gey's BSA と略す) に、細胞濃度が 5×10^6 cells/ml となるように suspend した。

C. 被験薬物

被験薬物としては、ビタミンC(和光純薬)、ビタミンK₃(和光純薬)およびビタミンK₅(和

光純薬)を用い、標準遊走因子としては、合成遊走因子である N-formylmethionyl-leucil-phenylalanine^{16,17)} (Sigma, 以下 FMLP と略す) を使用した。

なお、被験薬物および FMLP は、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を加えた Gelatin Veronal Buffer (以下 GVB²⁺ と略す) と Gey's BSA とを 5 対 7 の割合で混和した溶液 (Mix Sol.) に溶解して遊走試験に用いた。

D. 単球遊走試験

遊走試験は、5 μm pore size の polycarbonate chemotaxis membrane filter (Neuro Probe) および 48-well chemotaxis chamber^{18,19)} (Neuro Probe) を用いた membrane filter 法で行った。

Bottom well に、被験薬物を加えた FMLP 溶液を満たし、membrane filter で隔てられた top well に細胞浮遊液を満たしたのち、chamber は 37°C 飽和水蒸気、空気相の培養器内で、90分間、培養を行った。

E. 遊走能の測定

Membrane filter の染色は、Falk¹⁹⁾ ら (1980) の方法に従って行った。培養終了後、chamber から取り出した membrane filter は、37°C の PBS 中で洗浄し、Diff-Quick staining set を用いて、固定・染色を行い、スライド・ガラス上で風乾したのち、immersion oil を滴下して、cover glass で密封した。

遊走能の測定は、光学顕微鏡を用いて membrane filter 下面まで遊走した単球数を、倍率×1,000で観察した。5 mm, 5 等分の正方形 glid を刻んだ接眼レンズを用い、glid 内の遊走細胞数を at random に 20 視野計測し、1 視野平均の遊走単球数 (cells/oil immersion field) を算出した¹⁸⁾。

なお、遊走試験は、すべて triplicate で行い、平均値および標準誤差 (standard error, 以下 SE と略す) を求めた。

実験成績

1. ビタミンCの単球遊走能におよぼす影響

遊走因子である FMLP 溶液 (10^{-8}M) に、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$, 10^{-4}M , $5 \times 10^{-4}\text{M}$, 10^{-3}M および $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 濃度のビタミンCを添加して、遊走因子に

よって誘起された単球の遊走能に対するビタミンCの影響を検討した。

結果は、Fig. 1 および Table 1 に示したように、ビタミンC無添加の場合に、FMLP に対する単球の遊走能は 92 ± 5 の値を示したが、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ から $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 濃度の範囲のビタミンCを添加することにより、遊走能は濃度依存的に抑制された。なお、ビタミンCの濃度が 10^{-3}M のときに遊走能は 47 ± 4 の値を示し、抑制効果は最も強く、抑制率は49%を示した。

Fig. 1 Depressed monocyte chemotaxis to 10^{-8}M FMLP by addition of vitamin C. Vitamin C was diluted to the indicated concentrations and tested for monocyte chemotaxis. Data represented the mean $\pm$ 1SE of migrated cells per oil immersion field (20 fields counted) for triplicate filters.

対照として用いた Mix Sol. に対する単球の遊走能は、ビタミンCを添加していない場合には 9 ± 1 の値を示し、ビタミンCを加えた場合には 3 ± 1 から 15 ± 0 の範囲の値であり、ビタミンCを添加したことによる影響は認められなかった。

2. ビタミン K₃ の単球遊走能におよぼす影響

単球の FMLP に対する遊走能におよぼすビタミン K₃ の影響を検討した結果は、Fig. 2 および Table 1 に示した。

10^{-8}M 濃度の FMLP に対する単球の遊走能は、

Fig. 2 Depressed monocyte chemotaxis to 10^{-8} M FMLP by addition of vitamin K_3 . Vitamin K_3 was diluted to the indicated concentrations and tested for monocyte chemotaxis. Data represented the mean $\pm$ 1SE of migrated cells per oil immersion field (20 fields counted) for triplicate filters.

ビタミン K_3 無添加の場合に、 94 ± 1 の値を示したが、 5×10^{-7} M、 10^{-6} M、 5×10^{-6} M および 10^{-5} M 濃度のビタミン K_3 を添加した場合には、それぞれ 89 ± 2 、 88 ± 6 、 92 ± 1 および 93 ± 2 の値を示し、ビタミン K_3 添加の影響は認められなかった。しかし、 5×10^{-4} M および 10^{-4} M 濃度のビタミン K_3 を添加した場合には、濃度依存的に遊走能は抑制され、抑制率は、それぞれ 17% および 68% を示した。

さらに、 5×10^{-7} M から 10^{-4} M 濃度のビタミン K_3 を、対照として用いた Mix Sol. に溶解して遊走能を測定した場合には、 3 ± 2 から 14 ± 0 の範囲の値を示し、ビタミン K_3 を添加していない Mix Sol. 単独の場合の遊走能 9 ± 1 の値と比較して、ほとんど変化が認められなかった。

3. ビタミン K_5 の単球遊走能におよぼす影響

単球の遊走能におよぼすビタミン K_5 の影響は、 10^{-8} M 濃度の FMLP に対する遊走試験を行って検討した。

結果は、Fig. 3 および Table 1 に示したよう

Fig. 3 Depressed monocyte chemotaxis to 10^{-8} M FMLP by addition of vitamin K_5 . Vitamin K_5 was diluted to the indicated concentrations and tested for monocyte chemotaxis. Data represented the mean $\pm$ 1SE of migrated cells per oil immersion field (20 fields counted) for triplicate filters.

Table 1 Inhibition of monocyte chemotaxis by vitamins

Vitamins	Concentrations (M) ^{a)}					
	% Inhibition ^{b)}					
	5 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5 × 10 ⁻⁴	10 ⁻³	5 × 10 ⁻³	10 ⁻⁴
Vitamin C	13	13	33	49	17	
Vitamin K ₃	5	6	2	1	17	68
Vitamin K ₅	-2	2	11	15	49	88

a) Vitamins were dissolved in FMLP solution as the indicated concentrations, and assayed for chemotaxis.

b) Per cent inhibition of chemotaxis was quantitated from monocyte migration to FMLP as the positive control.

に、ビタミン K_5 無添加の場合に、単球の遊走能は 94 ± 1 の値を示したが、 5×10^{-7} M および 10^{-6} M 濃度のビタミン K_5 を添加した場合には、 92 ± 4 および 96 ± 3 の値を示し、遊走能におよぼ

すビタミン K₅ の影響は認められなかった。

しかし、 5×10^{-6} M および 10^{-5} M 濃度のビタミン K₅ の添加は、単球の遊走能をわずかに抑制し、 5×10^{-4} M および 10^{-4} M 濃度のビタミン K₅ を添加した場合には、明らかな遊走抑制効果が認められ、それぞれの抑制率は 11%, 15%, 49% および 88% を示した。

なお、対照として用いた Mix Sol. に対する単球の遊走能は、ビタミン K₅ を添加していない場合には 9 ± 1 の値を示し、 5×10^{-7} M から 10^{-4} M 濃度の範囲のビタミン K₅ を添加した場合には、 2 ± 1 から 10 ± 1 の範囲の値を示し、ビタミン K₅ 添加による影響はほとんど認められなかった。

考 察

ビタミン C、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ は、生体内で物質代謝を調節する作用を持つ重要な因子であり、炎症反応の過程においては、好中球の機能を調節する作用を持つことが報告されている²⁰⁾。

好中球に対するビタミン C の作用としては、遊走能および貪食能を促進する作用、ライソゾーム由来の酵素を活性化して殺菌作用を高める作用、およびフリーラジカルの産生能を増強する作用を持つこと^{7,8)}、さらに免疫反応の過程では、細胞あるいは組織の機能に対する調節因子として作用することが報告²⁰⁾されている。

Rossi と Zoppi²¹⁾ ら (1966) は、ビタミン K₃ が、hexose monophosphate shunt を増強すること、およびスルヒドリン基類の酸化を促進することにより、好中球の貪食能を阻害すると報告している。

さらに、Gallin²²⁾ ら (1982) は、好中球に対して、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ が、伸展、貪食能、ライソゾームの脱顆粒、殺菌作用、フリーラジカルの産生能を阻害する作用を持つこと、およびマイクロチューブの集合を阻害して、遊走機能を抑制する作用があると報告している。

本実験は、遊走因子によって誘起されたヒト単球の遊走能におよぼすビタミン C、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ の影響を *in vitro* で遊走試験を行うことにより検討した。

5×10^{-5} M から 5×10^{-3} M 濃度の範囲のビタミン C は単球の遊走能に対して、 10^{-3} M 濃度で最も強い抑制率 (49 %) を示す濃度依存的な抑制作用を示した。

Anderson²³⁾ ら (1979) は、5 % serum 存在下で、 10^{-4} M 濃度のビタミン C を添加することにより好中球の遊走能が増強されること、および 5 % serum 無添加の場合には、ビタミン C の添加により遊走能が抑制されることを報告している。

さらに、Gonzalez²⁴⁾ ら (1979) は、腹腔から採取したラット肥満細胞のヒスタミン遊離を、 2.9×10^{-3} M 濃度のビタミン C が抑制することを明らかにし、この作用は、ビタミン C が細胞内 cyclic AMP レベルを上昇させることに由来すると報告している。

Sandler²⁵⁾ ら (1975) および Gallin²⁶⁾ ら (1978) は、 5×10^{-3} M 濃度のビタミン C の添加が単球の遊走を促進すると報告しているが、本実験では、 5×10^{-5} M から 5×10^{-3} M 濃度の範囲のビタミン C を添加して、ビタミン C の濃度と遊走に対する作用との関係を検討したところ、促進効果は認められず、 10^{-3} M 濃度で最も強い抑制率を示す濃度依存的な遊走抑制作用が認められた。

Gallin²²⁾ ら (1982) は、好中球に対するビタミン K₃ およびビタミン K₅ の作用として、伸展、および貪食能に対する抑制作用、ライソゾームの脱顆粒、殺菌作用およびフリーラジカルの産生能に対する抑制作用とともに、遊走能を抑制する作用を報告しているが、本実験では、 5×10^{-5} M より高い濃度のビタミン K₃ は、単球の FMLP に対する遊走能を濃度依存的に抑制すること、および 5×10^{-6} M 濃度以上のビタミン K₅ が抑制効果を示したことから、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ は、好中球の機能に対する調節作用を持つだけでなく単球の遊走能に対する抑制作用を持つことが明らかである。

結 論

好中球に対して、貪食能、遊走能あるいはライソゾームからの脱顆粒などを調節する作用を持つビタミンが、ヒト単球の遊走能にどのような影響を与えているかを知る目的で、*in vitro* において、

membrane filter 法を用いた遊走試験を行い、ビタミンC、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ が単球の遊走におよぼす影響を検討し、以下の成績を得た。

1. 単球の遊走能は、 5×10^{-5} M から 5×10^{-3} M 濃度のビタミンCを添加することにより濃度依存的に抑制され、ビタミンCの濃度が 10^{-3} M のときに抑制作用は最も強く、その抑制率は49%であった。

2. 5×10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度の範囲のビタミン K₃ を添加した場合には、単球の遊走能に対する影響は認められなかったが、 5×10^{-5} M および 10^{-4} M 濃度のビタミン K₃ を添加した場合には

明らかな抑制効果が認められ、抑制率はそれぞれ17%および68%であった。

3. ビタミン K₅ は、 5×10^{-7} M および 10^{-6} M 濃度のときに、単球の遊走能に対する影響を認めなかったが、 5×10^{-6} M から 10^{-4} M 濃度のビタミン K₅ を添加した場合には、濃度依存的な遊走抑制効果が認められ、それぞれの抑制率は、11%、15%、49%および88%を示した。

4. 以上の実験成績から、ビタミンC、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ は、好中球の機能を調節するだけでなく、単球の遊走能に対する調節作用を持つものと考えられる。

抄録：ビタミンC、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ は、炎症性浸出細胞の機能を調節する作用を持つ因子で、好中球の伸展、遊走および貪食能、そして、肥満細胞の脱顆粒に影響をおよぼすことが明らかにされている。しかしながら、ヒト単球の遊走能に対するビタミンC、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ の影響について検討した報告はない。本研究は、ビタミンC、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ が、単球の遊走能に対してどのような作用をおよぼすかを検討した。

遊走試験は、membrane filter 法で行った。単球は Ficoll-Paque を用いた比重遠心法によりヒト末梢血から分離し、chemotaxis chamber の bottom well に、合成遊走因子である N-formylmethionyl-leucil-phenylalanine (FMLP) 溶液を満たし、 $5 \mu\text{m}$ pore size の polycarbonate membrane filter で隔てられた top well に細胞浮遊液を満たしたのち、chamber は 37°C 飽和水蒸気の培養器内で90分間、incubate した。

遊走能の測定は、membrane filter を固定・染色した後、filter 下面まで遊走した単球数を計測することにより行った。

なお、ビタミンは、FMLP 溶液中に規定の濃度となるように溶解して用いた。

5×10^{-5} M から 5×10^{-3} M 濃度のビタミンCを添加して単球の遊走能におよぼす影響を検討した結果、 10^{-3} M 濃度のときに最も強い抑制率を示す、遊走抑制効果が認められた。

5×10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度の範囲のビタミン K₃ を添加した場合には、FMLP に対する単球の遊走能に影響は認められなかったが、 5×10^{-5} M および 10^{-4} M 濃度のビタミン K₃ を添加することにより単球の遊走能は濃度依存的に抑制された。

5×10^{-7} M から 10^{-4} M 濃度のビタミン K₅ を添加することにより、単球の遊走能は濃度依存的に抑制されることが認められた。

以上の結果から、ビタミンC、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ は、好中球の機能に対する調節作用を持つだけでなく、*in vivo* において、遊走因子により誘起された単球の遊走に影響をおよぼしていることが示唆された。

文 献

- 1) Wolbach, S. B. and Howe, P. R.: Inter-cellular substances in experimental scorbutus. Arch. Path. Lab. Med. 1 : 1-24, 1926.
- 2) Glickman, I.: Acute vitamin C deficiency upon the response of the periodontal tissues of the guinea pig to artificially induced inflammation. J. Dent. Res. 27 : 201-210, 1948.
- 3) Glickman, I.: Acute vitamin C deficiency and periodontal disease. 1. The periodontal tissues of the guinea pig in acute vitamin C deficiency. J. Dent. Res. 27 : 9-23, 1948.
- 4) Waerhaug, J.: Effect of C-avitaminosis on the supporting structures of the teeth. J. Periodontol. 29 : 87-97, 1958.

- 5) Ross, R. and Beneditt, E. P. : Wound healing and collagen formation. 1. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11** : 677-700, 1961.
- 6) Weening, R. S., Schoorel, E. P., Roos, D., van Schaik, M. L. J., Voetman, A. A., Bot, A. A. M., Batenburg-Plenter, A. M., Willems, Ch., Zeijlemaker, W. P. and Astaldi, A. : Effect of ascorbate on abnormal neutrophil, platelet and lymphocyte function in a patient with the Chediak-Higashi syndrome. *Blood* **57** : 856-865, 1981.
- 7) Leibovitz, B. and Siegel, B. V. : Ascorbic acid, neutrophil and the immune response. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **48** : 159-164, 1978.
- 8) Thomas, W. R. and Holt, P. G. : Vitamin C and immunity : An assesment of the evidence. *Clin. Exp. Immunol.* **32** (2) : 370-379, 1978.
- 9) Goetzl, E. J., Wasserman, S. I., Gigli, I. and Austen, K. F. : Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid. *J. Clin. Invest.* **53** : 813-818, 1974.
- 10) Jackson, C. M. and Suttie, J. W. : Recent developments in understanding the mechanism of vitamin K action in blood coagulation. *Prog. Hematol.* **10** : 333-359, 1977.
- 11) Owen Jr. A. C. and Walter Bowie, E. J. : Rat coagulation factors 5, 8, 11 and 12 : Vitamin K dependent. *Haemostasis* **7** : 189-201, 1978.
- 12) Eichbaum, F. W., Selmer, O. and Zyngier, S. B. : Anti-inflammatory effect of warfarin and vitamin K₁. *Naunyn-Schmeidberg's Arch. Pharmacol.* **307** : 185-190, 1979.
- 13) Görög, P., Kovács, I. B. and Szporny, L. : Anti-inflammatory and anti-anaphylactic action of vitamin K₁ and vitamin K₃. *Arzneim. Forsch.* **18** : 227-230, 1968.
- 14) Woodin A. M. and Wieneke, A. A. : The modification of the cytotoxic effect of leukocidin by N-ethylmaleimide, flavine mononucleotide and menadione. *Biochem. J.* **99** : 469-478, 1966.
- 15) Böyum, A. : Isolation of mononuclear cells and glanulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21** : 77-89, 1977.
- 16) Schiffmann, E., Corcoran, B. A. and Wahl, S. M. : N-Formylmethionyl peptides as chemottractants for leucocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72** (3) : 1059-1062, 1975.
- 17) Aswanikumar, S., Schiffmann, E., Corcoran, B. A. and Wahl, S. M. : Role of peptidase in phagocyte chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73** (7) : 2439-2442, 1976.
- 18) Falk, W., Goodwin Jr., R. H. and Leonard, E. J. : A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol. Methods* **33** (3) : 239-247, 1980.
- 19) Harvath, L., Falk, W. and Leonard, E. J. : Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis : use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multi well assembly. *J. Immunol. Methods* **37** : 39-45, 1980.
- 20) Lewin, S. : "Vitamin C : Its molecular biology and medical potential" 1st edn., Academic Press, London. 1976.
- 21) Rossi, F. and Zoppi, G. : Effect of menadione on the phagocytic activity of guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *Experientia* **22** : 433-434, 1966.
- 22) Gallin, J. I., Seligmann, B. E., Cramer, E. B., Schiffmann, E. and Fletcher, M. P. : Effects of vitamin K on human neutrophil function. *J. Immunol.* **128** : 1399-1408, 1982.
- 23) Anderson, R. and Theron, A. : Effects of ascorbate on leucocytes. Part 1. Effects of ascorbate on neutrophil motility and intracellular cyclic nucleotides levels *in vitro*. *S. Afr. Med. J.* **56** : 394-400, 1979.
- 24) González, R. G., Garcia, M., Saad, H. P. and de la Vega, A. R. : Comparative study of ascorbic acid and disodium cromoglycate in some models of experimental anaphylaxis. *Allergol et Immunopathol.* **7** (3) : 211-216, 1979.
- 25) Sandler, J. A., Gallin, J. I. and Vaughan, M. : Effects of serotonin, carbamylcholine, and ascorbic acid on leukocyte cyclic GMP and chemotaxis. *J. Cell Biol.* **67** : 480-484, 1976.
- 26) Gallin, J. I., Sandler, J. A., Clyman, R. I., Manganiello, V. C. and Vaughan, M. : Agents that increase cyclic AMP inhibit accumulation of cyclic GMP and depress human monocyte locomotion. *J. Immunol.* **120** (2) : 492-496, 1978.