モルモット・マクロファージの遊走能におよぼす ビタミン C およびビタミン K の 影響に関する研究

藤 本 平 蔵 森 川 裕 福 田 訓 子
高 山 泰 幸 塚 本 芳 雄 森 政 和

大阪歯科大学薬理学教室（主任：森政和教授）

〔受付：昭和59年2月27日〕

Effect of vitamin C and K on macrophage chemotaxis

Heizo Fujimoto, Yutaka Morikawa, Kuniko Fukuda,
Yasuyuki Takayama, 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: February 27, 1984]

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

Abstract: Vitamin (Vit) C and Vit K influence immune and inflammatory response and are reported to regulate neutrophil metabolism and functions. In this study, in order to investigate the direct effect of Vit C and Vit K on macrophage migration, *in vitro* chemotaxis assay was performed by the membrane filter method using guinea pig macrophages.

Glycogen-induced peritoneal macrophages were placed on the upper wells of chemotaxis chambers, which were separated from 10^{-8} M N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) as chemo-attractant by $5\text{-}\mu\text{m}$ pore size polycarbonate filters. Vitamins were applied to the lower wells and the upper wells at the same concentrations. The chambers were incubated at 37°C for 90 min and the numbers of macrophages which migrated through the filters were quantitated.

The effect of Vit C on macrophage migration was determined with L-ascorbic acid and sodium ascorbate. L-Ascorbic acid (5×10^{-5} M to 10^{-3} M) or sodium ascorbate (5×10^{-5} M to 5×10^{-3} M) did not extend the effect on the macrophage migration to FMLP and to buffer control, whereas 5×10^{-3} M L-ascorbic acid suppressed the chemotaxis to FMLP.

Vit K_3 and K_5 had no effect on the migration to buffer control at the concentrations of 5×10^{-7} M to 10^{-5} M. On macrophage chemotactic response which was induced by 10^{-8} M FMLP, 5×10^{-7} M to 5×10^{-5} M concentrations of Vit K_3 caused a dose dependent suppression. In case of incubation with Vit K_5 , the macrophage chemotaxis was not affected at 5×10^{-7} M to 10^{-5} M concentrations but were completely inhibited at 5×10^{-5} M.

緒 言

ビタミンは微量で生体内の代謝・生理機能を触

媒的な作用により調節する有機化合物であり、欠乏するとそれぞれのビタミンに特有の欠乏症状をきたす。

ビタミンCは、結合組織の基質を生成し、維持

するために必要なビタミンで、タンパク質、および生体にとって異物となる物質の代謝に関与していることが報告されている^{1,2)}。

ビタミンCが欠乏すると、コラーゲンの生成不全により結合組織が脆弱になるが、口腔領域では、歯肉からの出血、創傷治癒の遅延が起こり、歯周疾患が増悪すると報告されている³⁾。

炎症反応の過程において、血管の透過性亢進に続いて、炎症性浸出細胞である好中球や単球が血管外へ遊出するが、好中球は細胞内に高濃度のビタミンCを含むこと⁴⁾、さらに食食機能が活性化された好中球では、細胞内のアスコルビン酸が酸化されることが報告されている⁵⁾。

好中球の機能に障害が認められる患者にビタミンCを投与すると、好中球の運動能が改善され、また遊走機能に障害がある好中球の浮遊液にビタミンCを加えて培養すると、遊走能が改善されることが報告されている⁶⁻⁹⁾。さらに、Goetzlら(1974)は、正常なヒト白血球に 5×10^{-3} M濃度のビタミンCを添加して培養することにより、運動機能が促進されると報告している¹⁰⁾。

好中球につづいて炎症巣に集積するマクロファージは、食食、消化機能を持つだけでなく、体液性および細胞性免疫の調節と発現に関与しているが、モルモットに壊血病を発症させた場合に、腹腔マクロファージの浸出数が減少し、マクロファージのランダム運動能が低下すること、さらに*in vitro*でビタミンCを添加して培養するとマクロファージの運動能が回復することが報告¹¹⁾されていることから、ビタミンCはマクロファージの代謝に影響をおよぼすと考えられる。

ビタミンKは、血液凝固促進因子であり、全身の組織や器官に分布し、ミトコンドリアの呼吸酵素の一因として働いていることが報告^{12,13)}されている。

ビタミンK₁およびビタミンK₃は、ラットの肉芽腫、およびカオリンによって惹起したラット足浮腫に対して抗炎症作用を持つこと¹⁴⁾、さらに、*in vitro*でビタミンK₃は、好中球の解糖を刺激し、食食能および脱顆粒を抑制することから^{15,16)}ビタミンK類は、炎症過程および好中球の機能に影響をおよぼしていると考えられる。

本実験は炎症反応や好中球の代謝に関与しているビタミンCおよびビタミンK類が、炎症巣に遊出したマクロファージの遊走機能にどのような影響を持つかを知る目的で、グリコーゲンでinduceしたモルモット腹腔マクロファージを用いて、*in vitro*でmembrane filter法による遊走試験を行い、検討した。

実験材料ならびに実験方法

A. モルモット・マクロファージの分離

実験に用いたモルモット・マクロファージは、グリコーゲンでinduceした腹腔浸出細胞を用いた。

モルモット腹腔内に、1%のグリコーゲン(半井化学、京都)phosphate buffered saline溶液(0.02M, pH7.2, 以下PBSと略す)30mlを注入し、4日後に窒息・致死させた後、開腹して、腹腔内を37°Cに温めたヘパリン(20units/ml, Nobo, Denmark)を含むPBSで洗浄することにより、腹腔浸出細胞を採取した。

腹腔細胞は、4°Cのerythrocyte lysing buffer(0.15M・NH₄Cl, 0.01M・KHCO₃, 0.0015M・EDTA, pH7.2)を用いて赤血球を溶血させ、2倍濃度のPBSを加えることにより浸透圧を調整したのち、750×g, 10分間の遠心を2回繰り返すことによりPBSによる洗浄を行った。

B. 細胞浮遊液の調製

モルモット腹腔細胞は、Wahlの報告¹⁷⁾にもとづいて2% bovine serum albumin(半井化学、京都)および20mM・HEPES(半井化学、京都)を加えたGey's balanced salt solution(pH 7.0, 以下Gey's BSAと略す)を用いて、細胞濃度が 2×10^6 cells/mlとなるように浮遊させた。

C. 被験薬物および標準遊走因子

被験薬物は、ビタミンCとしてL-アスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムを、ビタミンKとしてビタミンK₃およびビタミンK₅(和光純薬、大阪)を用いた。

ビタミンCはPBSを用いて 10^{-1} Mの濃度となるように、ビタミンKはエタノール中に 10^{-2} Mの濃度となるように実験直前に溶解したものをビタ

ミン原液とした。

標準遊走因子としては合成遊走因子である N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanine (Sigma, England, 以下 FMLP と略す) を使用した。FMLP は Schiffmann らの報告¹⁸⁾ にもとづいて、エタノール中に 10^{-2} M の濃度となるように溶解したものを FMLP 原液として、 -30°C の冷凍庫内で保存した。

被験薬物および FMLP は、それぞれの原液を、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を加えた Veronal buffer と Gey's BSA を 5 : 7 の割合で混合した溶液 (pH 7.0, 以下 Mix sol. と略す) を用いて規定の濃度となるように希釈して使用した。

D. マクロファージ遊走試験

遊走試験は、48 well micro-chemotaxis chamber (Neuro Probe, U.S.A.) および $5\text{ }\mu\text{m}$ pore size の polycarbonate membrane (Neuro Probe, U.S.A.) を用いた membrane filter 法¹⁹⁾ で行った。

Chamber の bottom well に FMLP 溶液あるいは対照として Mix sol. 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。

なお、ビタミンは、bottom well と top well で同濃度となるように添加した。

培養は、飽和水蒸気・空気相の条件下、 37°C で行い、培養時間は、Wahl の報告¹⁷⁾ にもとづき90分間とした。

E. 固定および染色

Membrane filter の固定および染色は、Falk らの方法¹⁹⁾ に従って行った。

すなわち、培養終了後、chemotaxis chamber から取り外した membrane filter を 37°C の PBS 中で静かに洗浄したのち、Diff Quick (Harleco, U.S.A.) の固定液、第1液および第2液にそれぞれ30秒間浸漬して、固定および染色を行った。

F. 遊走能の測定

固定および染色を行った membrane filter は、スライドガラス上で風乾したのち、immersion oil およびカバーガラスで密封し、光学顕微鏡を用いて、membrane filter 下面まで遊走したマクロファージ数を倍率1,000で観察した。

すなわち、接眼レンズに刻まれた5mm、5等分の正方形の glid 内の遊走細胞数を at random に20視野計測し、1視野平均の遊走細胞数 (cells/oil immersion field) を算出して、これを遊走能とした¹⁷⁾。

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 のマクロファージ遊走能におよぼす影響

a. L-アスコルビン酸による影響

10^{-8} M の FMLP に対するマクロファージの遊走能におよぼす L-アスコルビン酸の影響を検討した。

結果は、Fig. 1 に示したように、FMLP に対する遊走能は、L-アスコルビン酸を添加していない場合には、 69 ± 1 の値を示したが、L-アスコルビン酸を 5×10^{-5} M, 10^{-4} M, 5×10^{-4} M および 10^{-3} M の濃度で添加した場合には、それぞれ 68 ± 1 , 71 ± 3 , 71 ± 4 および 69 ± 2 の値を示し、L-アスコルビン酸添加による変化は認められなかった。しかし、 5×10^{-3} M の L-アスコルビン酸を添加した場合には 47 ± 1 の値を示し、遊走能は32%抑制された。

対照として用いた Mix sol. に対するマクロファージの遊走能は、L-アスコルビン酸無添加の場合には 8 ± 1 の値を示し、 5×10^{-5} M, 10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 10^{-3} M および 5×10^{-3} M 濃度の L-アスコルビン酸を添加した場合に、それぞれ、 10 ± 1 , 10 ± 1 , 12 ± 2 , 11 ± 1 および 8 ± 1 の値を示し、L-アスコルビン酸による変化はほとんど認められなかった。

b. アスコルビン酸ナトリウムによる影響

マクロファージの FMLP に対する遊走におよぼすアスコルビン酸ナトリウムの影響を検討した結果は、Fig. 2 に示した。

10^{-8} M の FMLP によって誘起されたマクロファージの遊走能は、FMLP 単独の場合には 63 ± 1 であったが、 5×10^{-5} M, 10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 10^{-3} M および 5×10^{-3} M のアスコルビン酸ナト

Fig. 1 Effect of L-ascorbic acid on macrophage migration. *In vitro* chemotaxis assay was performed by the membrane filter method using glycogen-induced guinea pig peritoneal macrophages and 10^{-8} M of FMLP as chemoattractant.

L-Ascorbic acid was added as the indicated concentrations to both of cell suspension and the FMLP solution. Data represents the mean $\pm$ SE of migrated cells for triplicate filters.

リウムを添加した場合には、それぞれ、 64 ± 1 , 62 ± 0 , 67 ± 1 , 67 ± 2 および 66 ± 2 の値を示し、アスコルビン酸ナトリウムを加えたことによる変化はほとんど認められなかった。

さらに、対照である Mix sol. に対する遊走能は、Mix sol. 単独の場合に 8 ± 1 の値を示したのに対して、 5×10^{-5} M, 10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 10^{-3} M および 5×10^{-3} M のアスコルビン酸ナトリウムを添加することにより、それぞれ 9 ± 1 , 10 ± 2 , 11 ± 1 , 13 ± 1 および 11 ± 2 の値を示し、ほとんど変化は認められなかった。

2. ビタミンKのマクロファージ遊走能におよぼす影響

マクロファージの遊走におよぼすビタミンKの影響を知る目的で、合成ビタミンKであるビタミンK₃およびビタミンK₅を用いて遊走試験を行った。

Fig. 2 Effect of sodium ascorbate on macrophage migration. *In vitro* chemotaxis assay was performed by the membrane filter method using glycogen-induced guinea pig peritoneal macrophages and 10^{-8} M of FMLP as chemoattractant.

Sodium ascorbate was added as the indicated concentrations to both of cell suspension and the FMLP solution. Data represents the mean $\pm$ SE of migrated cells for triplicate filters.

a. ビタミンK₃による影響

結果はFig. 3に示したように、 10^{-8} MのFMLPに対するマクロファージの遊走能は、ビタミンK₃無添加の場合に 76 ± 2 であったが、 5×10^{-7} M, 10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 10^{-5} M および 5×10^{-5} M 濃度のビタミンK₃を添加した場合には、それぞれ 70 ± 1 , 70 ± 2 , 67 ± 3 , 55 ± 3 および 44 ± 2 の値を示し、ビタミンK₃の濃度に依存した遊走能の低下が認められた。

対照として用いた Mix sol. に対する遊走能は、Mix sol. 単独の場合に 15 ± 2 の値を示し、 5×10^{-7} M, 10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 10^{-5} M および 5×10^{-5} M 濃度のビタミンK₃を加えた場合には、それぞれ 15 ± 4 , 15 ± 1 , 15 ± 1 , 15 ± 1 および 7 ± 0 の値を示し、 5×10^{-5} M 濃度のビタミンK₃を添加した場合に遊走能の低下が認められた。

Fig. 3 Effect of vitamin K₃ on macrophage migration. *In vitro* chemotaxis assay was performed by the membrane filter method using glycogen-induced guinea pig peritoneal macrophages and 10⁻⁸M of FMLP as chemoattractant. Vitamin K₃ was added as the indicated concentrations to both of cell suspension and the FMLP solution. Data represents the mean ± SE of migrated cells for triplicate filters.

b. ビタミンK₅による影響

結果は Fig. 4 に示したように、FMLP に対する遊走能は、ビタミンK₅ 無添加の場合には85 ± 1の値を示し、5 × 10⁻⁷M, 10⁻⁶M および 5 × 10⁻⁶M 濃度のビタミンK₅ を加えた場合には、それぞれ85 ± 3, 84 ± 6 および 87 ± 3の値を示し、5 × 10⁻⁷M から 10⁻⁵M の範囲の濃度ではビタミンK₅ 添加による変化は認められなかった。しかし、5 × 10⁻⁵M 濃度のビタミンK₅ を加えることにより、マクロファージの遊走能は完全に阻害された。

また、対照の Mix sol. に対するマクロファージの遊走能は、5 × 10⁻⁷M から 10⁻⁵M 濃度の範囲のビタミンK₅ を加えた場合には、それぞれ 13 ± 1の値を示し、ビタミンK₅ 無添加の場合の 14 ± 2との間に差はなく、Mix sol. に対するマクロファージの遊走に変化は認められなかった。しかし、

Fig. 4 Effect of vitamin K₅ on macrophage migration. *In vitro* chemotaxis assay was performed by the membrane filter method using glycogen-induced guinea pig peritoneal macrophages and 10⁻⁸M of FMLP as chemoattractant. Vitamin K₅ was added as the indicated concentrations to both of cell suspension and the FMLP solution. Data represents the mean ± SE of migrated cells for triplicate filters.

5 × 10⁻⁵M 濃度のビタミンK₅ を添加した場合には、遊走は完全に阻害された。

考 察

ビタミンCおよびビタミンKは、ともに生体内の代謝系を調節する因子であり、炎症および免疫反応の過程に影響をおよぼしていること、さらに好中球の機能に対する調節作用を持つことが報告されている^{5,15,16}。

本実験は、合成遊走因子である FMLP により誘起されたモルモット・マクロファージの遊走能におよぼす L-アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、ビタミン K₃ およびビタミン K₅ の影響を検討した。

Boxer ら²⁰) は、*in vitro* で 5 × 10⁻⁸M 濃度のビタミンCを添加して培養すると、ヒト好中球の微小管の配列が促進されること、および遊走能が増

強されることを報告し、Anderson ら²¹⁾は、ヒト好中球に 10^{-2} M 濃度以下のビタミンCを添加して培養した場合に、遊走能に変化は認められず、 5×10^{-3} M および 10^{-1} M 濃度のビタミンCを添加した場合に遊走の抑制が起こると報告している。

本実験では、 5×10^{-5} M から 10^{-3} M 濃度のL-アスコルビン酸、および 5×10^{-5} M から 5×10^{-3} M 濃度のアスコルビン酸ナトリウムを添加してマクロファージの遊走試験を行ったところ、 5×10^{-3} M のL-アスコルビン酸を添加した場合のみ、FMLP に対する遊走能に抑制効果が認められ、 5×10^{-5} M から 10^{-3} M 濃度のL-アスコルビン酸、および 5×10^{-5} M から 5×10^{-3} M 濃度のアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合には、遊走能に変化は認められなかった。

モルモット血清中および好中球内のビタミンC濃度は、それぞれ約 5×10^{-5} M および 5×10^{-4} M から 10^{-3} M 濃度であると報告されており^{5,22)}、本実験で用いた 5×10^{-5} M から 10^{-3} M 濃度のビタミンCは、モルモットの血中および組織中で生理的に存在する濃度であることから、マクロファージの遊走能に影響をおよぼさなかった可能性が考えられる。

また、ヒト白血球に 1.7×10^{-4} M 濃度のビタミンCを添加して培養した場合に、2時間から4時間後に白血球内のアスコルビン酸濃度が2倍から2.4倍に増加することが報告されている²³⁾。

本実験では、マクロファージの遊走試験に90分間のincubationを行ったが、マクロファージは試験開始後数分以内に遊走因子を認識し遊走を始めることから、遊走因子を認識し遊走を開始する時点では、ビタミンCが効果を現わす濃度にまでとりこまれなかった可能性が考えられる。

つぎに、マクロファージの遊走能におよぼすビタミンK₃およびビタミンK₅の影響を検討した。

5×10^{-7} M から 5×10^{-5} M 濃度のビタミンK₃を添加した場合には、FMLP に対する遊走能は濃度依存的に抑制された。しかし、 5×10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度のビタミンK₃を添加することによって、対照として用いたMix sol. に対する遊走能に変化は認められず 5×10^{-5} M濃度のビタミンK₃により抑制効果が認められた。

ビタミンK₅を添加した場合には、 5×10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度の範囲では、FMLP およびMix sol. に対する遊走能にほとんど変化はなく、 5×10^{-5} M 濃度のビタミンK₅を添加した場合には遊走能は完全に阻害された。

ビタミンK₃はtubulinと結合することが報告されており²⁴⁾、Gallin ら²⁵⁾は、ビタミンK₃が好中球の微小管の配列を直接阻害すること、および 10^{-5} M 以上の濃度のビタミンK₃、K₅がヒト好中球の走化性に対して濃度依存的な抑制作用を持つことを報告していることから²⁵⁾、本実験においてビタミンK₃およびビタミンK₅を添加することによりマクロファージの遊走能が抑制された理由として、ビタミンK類が微小管に対して影響をおよぼしたことが考えられる。

なお、L-アスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合に、対照として用いたMix sol. に対するマクロファージの遊走能がわずかながら増強される傾向が認められた。

本実験では遊走因子によって誘起されたマクロファージの遊走に対するビタミンCおよびビタミンK類の影響について検討したが、ビタミンCは、マクロファージのchemokinesisを増強する可能性のあること、ビタミンK₃およびビタミンK₅は、遊走能に対する抑制作用を持つことが明らかとなり、ビタミンは生体内においてマクロファージの遊走を調節しているものと考えられる。

結 論

炎症反応あるいは好中球の代謝に関与しているビタミンCおよびビタミンK類が、炎症巣に遊出したマクロファージの遊走機能にどのような影響を持つかを知る目的で、*in vitro*におけるmembrane filter法を用いて、モルモット腹腔マクロファージの遊走試験を行い、以下の成績を得た。

1. L-アスコルビン酸あるいはアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合には、 5×10^{-3} M 濃度のL-アスコルビン酸を加えた場合にのみ、FMLP に対する遊走能に抑制効果が認められ、 5×10^{-5} M から 10^{-3} M 濃度のL-アスコルビン酸、および 5×10^{-5} M から 5×10^{-3} M 濃度のアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合には、FMLP 対

る遊走能に変化は認められなかった。

2. L-アスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合に、buffer control に対する遊走能はわずかながら濃度依存的に増強される傾向が認められた。

3. 5×10^{-7} M から 5×10^{-5} M 濃度のビタミンK₃ を添加した場合には、マクロファージの FMLP に対する遊走能は濃度依存的に抑制されたが、buffer control に対する遊走能は、 5×10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度のビタミン K₃ を添加した場合に変化は認められず、 5×10^{-5} M 濃度の時に抑制効果が認められた。

4. ビタミン K₅ を添加した場合には、 5×10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度の範囲では、FMLP および buffer control に対する遊走能にほとんど変化はなく、 5×10^{-5} M 濃度のビタミン K₅ を添加した場合には完全に阻害された。

5. 以上の成績から、ビタミンCは、マクロファージの chemokinesis を促進する可能性のあること、ビタミンK₃ およびビタミンK₅ は、遊走能に対する抑制作用を持つことが明らかとなり、ビタミンは生体内においてマクロファージの遊走を調節しているものと考えられる。

抄録：ビタミンCおよびビタミンKは、免疫および炎症反応に影響をおよぼし、好中球の代謝および機能を調節することが報告されている。本実験はマクロファージの遊走機能に対するビタミンCおよびKの直接作用を知る目的で、*in vitro* における membrane filter 法を用いて、モルモット・マクロファージの遊走試験を行い検討した。

Chamber の lower well に buffer control あるいは遊走因子として用いた 10^{-8} M・FMLP 溶液を満たし、 $5 \mu\text{m}$ pore size の polycarbonate filter で隔てられた upper well に、グリコーゲンで induce した腹腔マクロファージ浮遊液を満たした。ビタミンを lower well と upper well で同濃度となるように添加し、 37°C , 90 分間の incubation を行い、filter 下面に遊走したマクロファージ数を測定した。

ビタミンCとしては、L-アスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムを用い、 5×10^{-8} M の L-アスコルビン酸を添加した場合にのみ FMLP に対する遊走能に抑制効果が認められたが、 5×10^{-8} M から 10^{-6} M 濃度の L-アスコルビン酸、および 5×10^{-8} M 濃度のアスコルビン酸ナトリウムを添加した場合には、遊走能にほとんど変化はみられなかった。

5×10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度のビタミンK₃ および K₅ を添加した場合には、buffer control に対する遊走に変化は認められず、 5×10^{-5} M 濃度の時に抑制効果が認められた。 10^{-8} M の FMLP に対する遊走は、 5×10^{-7} M から 5×10^{-5} M 濃度のビタミンK₃ を添加した場合には濃度依存的に抑制され、ビタミンK₅ を添加した場合には、 5×10^{-7} M から 10^{-5} M 濃度の範囲では変化は認められず、 5×10^{-5} M 濃度で完全に抑制されたことから、ビタミンCおよびビタミンK類は、マクロファージに対する直接作用を持ち、遊走能を調節することが明らかとなった。

文 献

- 1) Niedermeier, W., Dobson, C. and Laney, R. P.: Studies on the ascorbic acid-induced depolymerization of hyaluronic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **141** : 366-373, 1967.
- 2) Bobb, D.: Ascorbic acid protection against toxicity of an azo dye carcinogen for *neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta.* **78** : 795-797, 1963.
- 3) Glickman, I. B. S.: Acute vitamin C deficiency and periodontal disease. 1. The periodontal tissue of the guinea pig in acute vitamin C deficiency. *J. Dent. Res.* **27**(1): 9-23, 1948.
- 4) DeChatelet, L. R., McCall, C. E., Cooper, M. R. and Shirley, P. S.: Ascorbate levels in phagocytic cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145** : 1170-1173, 1974.
- 5) Stankova, L., Gerhardt, N. B., Nagel, L. and Bigley, R. H.: Ascorbate and phagocyte function. *Infect. Immun.* **12**(2) : 252-256, 1975.
- 6) Corberand, J., Nguyen, F., Frayse, B. and Enjalbert, L.: Malignant external otitis and polymorphonuclear leukocyte migration impairment. *Arch. Otolaryngol.* **108** : 122-124, 1982.

- 7) Patrone, F., Dallegri, F., Lanzi, G. and Sacchetti, C.: Prevention of neutrophil chemotactic deactivation by ascorbic acid. *Br. J. Exp. Path.* **61** : 486-489, 1980.
- 8) Patrone, F., Dallegri, F., Bonvini, E., Minervini, F. and Sacchetti, C.: Effects of ascorbic acid on neutrophil function. Studies on normal and chronic granulomatous disease neutrophils. *Acta Vitaminol. Enzymol.* **4**(1-2) : 163-168, 1982.
- 9) Anderson, R.: Assessment of oral ascorbate in three children with chronic granulomatous disease and defective neutrophil motility over a 2-year period. *Clin. Exp. Immunol.* **43** : 180-188, 1981.
- 10) Goetzl, E. J., Wasserman, S. I., Gigli, I. and Austen, K. F.: Enhancement of random migration and chemotactic response of human leucocytes by ascorbic acid. *J. Clin. Invest.* **53** : 813-818, 1974.
- 11) Ganguly, R., Durieux, M. F. and Waldman, R. H.: Macrophage function in vitamin C-deficient guinea pigs. *Am. J. Clin. Nutr.* **29** : 762-765, 1976.
- 12) Anderson, W. W. and Dallan, R. D.: The effect of vitamin K₁ on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria irradiated with ultraviolet light. *J. Biol. Chem.* **234** : 409-411, 1959.
- 13) Beyer, R. E.: The effect of ultraviolet light on mitochondria. *J. Biol. Chem.* **234** : 688-692, 1959.
- 14) Görög, P., Kovács, I. B., Szporny, L. and Fekete, G.: Antiinflammatory and antianaphylactic action of vitamins K₁ and K₃. *Arzneim. Forsch.* **18** : 227-230, 1968.
- 15) Rossi, F. and Zoppi, G.: Effect of menadione on the phagocytic activity of guinea-pig polymorphonuclear leucocytes. *Experientia* **22** : 433-434, 1966.
- 16) González, R. G., Garcia, M., Saad, H. P. and de la Vega, A. R.: Comparative study of ascorbic acid and disodium chromoglycate in some models of experimental anaphylaxis. *Allergol et Immunopathol.* **7**(3) : 211-216, 1979.
- 17) Wahl, S. M.: Corticosteroid inhibition of chemotactic lymphokine production by T and B lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **256** : 375-385, 1975.
- 18) Schiffman, E., Corcoran, B. A. and Wahl, S. M.: N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** : 1059-1062, 1975.
- 19) 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** : 239-247, 1980.
- 20) Boxer, L. A., Vanderbilt, B., Bonsib, S., Jersild, R., Yang, H. H. and Baehner, R. L.: Enhancement of chemotactic response and microtubule assembly in human leukocytes by ascorbic acid. *J. Cell. Physiol.* **100** : 119-126, 1979.
- 21) Anderson, R. and Theron, A.: Effects of ascorbate on leucocytes. Part I. Effects of ascorbate on neutrophil motility and intracellular cyclic nucleotide levels *in vitro*. *S. A. Med. J.* **56** : 394-400, 1979.
- 22) Bartley, W., Krebs, H. A. and O'Brien, J. R. P.: Vitamin C requirement of human adults. A report by the vitamin C subcommittee of the accessory food factors committee. *Med. Res. Counc. Spec. Rep. Lond.* (No. 280) 1953.
- 23) Loh, H. S. and Wilson, C. W. M.: The origin of ascorbic acid stored in the leucocytes. *Proc. Brit. Pharmacol. Soc.* **40** : 169-170, 1970.
- 24) Patumraj, K., Gould, A., Subramaniam, S., Zacharewicz, D. and Slaby, F.: Menadione inhibits colchicine binding to tubulin. *J. Cell. Biol.* 1979 : MT 336 (Abstr.), 1978.
- 25) Gallin, J. I., Seligmann, B. E., Cramer, E. B., Schiffman, E. and Fletcher, M. P.: Effects of vitamin K on human neutrophil function. *J. Immunol.* **128**(3) : 1399-1408, 1982.