高分子量 sodium hyaluronate(SL-1010)の ヒト好中球機能に及ぼす影響

坪井 泉*^{1,2)}, 小寺宣生*¹⁾, 七條茂樹*²⁾, 難波和彦*¹⁾, 鈴木和男*³⁾, 横山三男*²⁾

Effect of high molecular weight sodium hyaluronate (SL-1010) on human neutrophil function

The effects of four different average molecular weights(MW); 0.47, 0.95, 1.52 and 2.0×10^6 , respectively of sodium hyaluronate(HA) designated those each as HA-47, HA-95, HA-152 and SL-1010, on the neutrophil functions including chemotaxis, adhesion to the plastic plate, phagocytosis and superoxide generation, and expression of CD44 antigen were studied.

The inhibitory effect of HA on neutrophil chemotaxis was found to be dose ($0.1 \sim 0.4$ mg/ml)- and MW ($0.47 \sim 2.0 \times 10^6$)-dependent. Neutrophils were also observed to be inhibited to adhere to a plastic plate when the cells were treated with $10 \mu\text{g/ml}$ each type of HA. However, only SL-1010 inhibited the cell adhesion at the concentration of $1 \mu\text{g/ml}$. Phagocytosis of FITC-latex particles was also found significantly inhibited by the HA-152 and SL-1010, but not by the HA-47 and the HA-95 at the concentration of 1 mg/ml . These inhibitory effects on the chemotaxis and phagocytosis observed in the presence of HA were similarly observed when neutrophils were pretreated with and washed out SL 1010.

The generation of superoxide anions by stimulation with opsonized zymosan (OZ) was inhibited by the addition of HA, and this effect was also found to be dose- and MW-dependent.

The effect of HA on neutrophil activating antigen, CD44 was analysed after the stimulation with OZ, and the results revealed that the CD44 expression on neutrophil was down-regulated by the stimulation. The down-regulation of CD44 was inhibited by HA in a MW-dependent manner.

These results indicated that HA, especially the high MW SL-1010 might be a modulator against the activation of neutrophil to the inflammatory cascade.

Izumi Tsuboi*^{1,2)}, Nobuo Kotera*¹⁾, Shigeki Shichijo*²⁾,
Kazuhiko Namba*¹⁾, Kazuo Suzuki*³⁾,
Mitchel Mitsuo Yokoyama*²⁾

key words : sodium hyaluronate, neutrophil, chemotaxis, phagocytosis, CD44

SL-1010 は *Streptococcus zooepidemicus* を用いた発酵法により生産された分子量約 180~210 万の sodium hyaluronate(HA)であり, HA は N-acetyl D-glucosamine と D-glucuronic acid を構成単位とする二糖の繰り返し構造からなるグリコサミノグリカンの一種で, 結合組織に広く分布している. 軟骨組織では, HA は他のプロテオグリカンとの結合により巨大な複合体を形成しており, リンクプロテインはこの HA とプロテオグリカンとの両方に結合することにより複合体をさらに安定化させる役割を持っている.

関節液中の成分の一つである HA は, 細胞間隙に水を保持し, 潤滑性や柔軟性を保ち, 機械的な障害から関節を防御していると考えられている. 慢性関節リウマチ(RA)では, 免疫複合体や補体成分により炎症部位に浸潤した白血球が活性化され, ケミカルメディエーターやサイトカインを放出して, 組織を傷害し, 関節の病変が形成される¹⁾. この RA や変形性関節症(OA)の関節液中の HA の分子量および濃度は, 低下していることが報告²⁾されている. 高分子量 HA の関節腔内投与により, 潤滑機能の改善や関節軟骨の保護作用³⁾, 疼痛抑制作用⁴⁾など認められることが報告された. また, 白血球の走化能および貪食能の抑制⁵⁾, 軟骨細胞や滑膜細胞の増殖制御の機能⁶⁾も報告されてきた.

細菌感染による炎症反応として局所に食細胞が走化, 集簇し, 細菌は貪食され消化される. この感染防御機能の最初に細胞接着が関与していると考えられるが, 非特異的に組織細胞に接着し活性化されることは, 食細胞から放出される活性酸素や種々の蛋白分解酵素による組織傷害を生じることになる. このため, 食細胞の接着機能は細胞接着分子を介して制御されている可能性も報告された⁷⁾. リンクプロテインの HA 結合部位と CD44 のアミノ末端のドメインとが類似していることよ

*¹⁾ Hikone research laboratories, MARUHO Co., LTD. マルホ株式会社研究所彦根分室

*²⁾ Department of Immunology, Kurume University School of Medicine 久留米大学医学部免疫学講座

*³⁾ Department of Antibiotics, National Institute of Health 国立予防衛生研究所抗生物質部

り、細胞接着分子のなかで CD44 が HA に結合する可能性が示唆されている^{8,9)}。

今回、筆者らは、好中球の走化および貪食能に及ぼす SL-1010 の影響を検討し、平均分子量 47 万、95 万および 152 万の 3 種類の HA と比較した。また、好中球の活性化抗原の発現量の変化についても検討したので報告する。

材料と方法

(1) ヒト末梢血からの好中球の分離

健康人からヘパリン加末梢血を採取し、6% デキストラン(MW: 180,000, ナカライテスク)を 5:1(v/v)の割合で混合し、その上清を 58% Percoll (比重 1.077 g/cm³, 4°C, Pharmacia)を用いた比重遠心法により好中球を分離した¹⁰⁾。好中球を phosphate buffered saline (PBS)で洗浄後、Krebs-Ringer phosphate buffer(KRPG, pH 7.4, 5 mM glucose および 0.6 mM CaCl₂を含む)に、 2.0×10^6 cells/ml となるように浮遊させた。

(2) 走化能検査

chamber(Neuro Probe Inc.)の下室に 10% の非働化したウシ胎児血清(Flow Laboratories)を加えた RPMI-1640(Gibco)に溶かして調製した 10^{-7} M の N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP, Sigma)を 0.2 ml 加えた。このうえにフィルター(mixed cellulose esters filter, Millipore)を装着し、chamber 上室に好中球浮遊液を 0.2 ml 入れ、炭酸ガス培養器で 37°C, 3 時間インキュベートした。インキュベート後、フィルターを取り出し、固定、染色後に顕微鏡下でフィルターの裏面に遊走した好中球数を算定して、5 視野の平均値を求めた¹¹⁾。

(3) 細胞接着能の測定

96 multi well plate(Flow Laboratories)を用いて、好中球浮遊液を 0.1 ml/well を加え 37°C で 5 分間プレインキュベート後、分子量の異なる HA を添加し 10 分間インキュベートした。インキュベート後、プレートに接着していない細胞数を測定した。なお、PBS を加えて同じように好中球を処理したものを対照とした。

(4) 貪食能検査

ヘパリン加末梢血 0.1 ml に分子量の異なる HA と fluoresbrite carboxylate microspheres(直径 2.17 μ m, Polyscience)を 5 μ l 加え、37°C の恒温槽

内で振盪した。振盪後、氷水中で冷却し赤血球を溶解液 (NH₄ Cl 8.26 g/l, KHCO₃ 1.0 g/l, EDTA・Na₄ 0.0037 g/l)で溶血させた。これを 4°C, 250×g で遠心し、得られたペレットを 3 mM EDTA 添加 PBS 2 ml に再浮遊させて、フローサイトメトリー(Profile, Coulter)にて陽性率を求めた¹²⁾。

(5) 好中球の薬剤処理

好中球 2.0×10^6 cells/ml に対して SL-1010 を 0.25, 0.5 および 1.0 mg/ml 濃度になるように加え、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、好中球を PBS で 2 回洗浄し、 1.0×10^6 cells/ml に調整したのち、貪食および走化能の測定に用いた。なお PBS を加えて同じように好中球を処理したものを control とし、好中球浮遊液の生存率はトリパンブルーによる色素排除法で調べた。

(6) 好中球からの O₂⁻ 放出の測定

1 ml のキュベットに 7 mg/ml の cytochrome C(cyt-C, Sigma)溶液を 100 μ l (75 μ M) および KRPG を 145 μ l 入れ、これに好中球浮遊液 0.5 ml を加えて 37°C で 3 分間インキュベートした。この細胞浮遊液に opsonized zymosan(OZ, Sigma)を 1 mg/ml になるように加え、分光光度計(島津 UV-260, 波長 550 nm)を用いて 37°C で経時的に O₂⁻ 産生量を測定した¹³⁾。cyt-C の molar extinction coefficient は 19.1×10^{-3} とした。

(7) SOD 活性測定

分子量の異なる HA の SOD 様活性について、SOD 活性測定試薬(和光純薬工業)を用いて測定した¹⁴⁾。この活性測定法は、キサントシンとキサントシンオキシデースより生成する O₂⁻ とニトロブルーテトラゾリウムとの反応によりホルマザンが形成され、この反応中に SOD が共存するとホルマザンの形成が阻害される測定系であり、阻害率で SOD 様活性を求めた。

(8) 細胞膜抗原の解析

好中球浮遊液に分子量の異なる HA とともに OZ を 1 mg/ml になるように加え、37°C の恒温槽で 20 分間インキュベートした。インキュベート後、ただちに氷水中で冷却して反応を止め、4°C, 250×g で遠心した。上清を除去し、蛍光標識 CD44, CD11b および CD16 抗体(Becton-Dickinson)液を加え、氷水中で 30 分間インキュベ

表 1 SL-1010 の走化能に及ぼす影響

SL-1010(mg/ml)	抑制率(%)
0.1	40±4*
0.2	57±2*
0.4	73±5*

*: P<0.01

control の好中球 (2×10^6 cells/ml) の走化に対する SL-1010 添加群の抑制率を mean±SD(n=5) で示した。

図 1 走化能に及ぼす sodium hyaluronate の分子量による影響

好中球浮遊液に SL-1010, HA-152, HA-95, HA-47 を 0.1 mg/ml (■) および 0.2 mg/ml (▨) 添加して走化させ、抑制率を mean±SD(n=5) で示した。

*: P<0.05, **: P<0.01

ートした。インキュベート後、PBS を加え 4°C, 250×g で遠心し、得られたペレットを PBS に再浮遊し、フローサイトメトリーにて解析した。

(9) 薬 剤

分子量約 180~210 万の HA(SL-1010), これを加熱処理して得られた分子量約 152 万の HA(HA-152), 95 万の HA(HA-95) および 47 万の HA(HA-47) は、資生堂より 10 mg/ml 濃度の生理食塩液で提供され、各好中球機能測定には PBS で希釈して使用した。

(10) 検 定

有意差の検定は、多重比較検定により行った。

結 果

(1) 走化能

好中球浮遊液に SL-1010 を終濃度 0.1, 0.2 および 0.4 mg/ml になるように加えて走化能を測定した結果、control に比較して濃度依存的な抑制を示した(表 1, P<0.01)。SL-1010 および他の分子量の HA を添加した結果、0.1 mg/ml よ

図 2 好中球のプレートへの接着に及ぼす SL-1010 の影響

図 3 接着に及ぼす sodium hyaluronate の分子量による影響

SL-1010, HA-152, HA-95, HA-47 の 10 μg/ml (■) および 1 μg/ml (▨) 添加し、control に対する接着の抑制率を mean±SD(n=3) で示した。

*: P<0.05, **: P<0.01

りも 0.2 mg/ml 濃度の HA が、より control に比較して走化能を抑制した(図 1)。また、分子量の異なる HA を比較すると、0.1 mg/ml では、HA-95, HA-152 および SL-1010 の順に、17, 17 および 35% と走化能を抑制しており、HA-95 と HA-152(P<0.05) に比較して SL-1010 が顕著な抑制を示した(P<0.01)。

(2) 細胞接着能

好中球のマイクロプレートへの接着を調べた結果、control に比較して、SL-1010 は濃度に依存して接着を抑制した(図 2)。また、1 ならびに 10 μg/ml 濃度で分子量の異なる HA を比較した結果、10 μg/ml では SL-1010 および他の分子量の HA は、control に比較して有意に接着を抑制し、1 μg/ml では SL-1010 のみに有意な抑制が認められた(図 3, P<0.01)。

(3) 貪食能

末梢血に蛍光標識 ビーズとともに SL-1010 を

表 2 SL-1010 の食食に及ぼす反応時間の影響

反応時間(min)	抑制率(%)
5	42±2*
10	59±2*
20	53±3*

*: P<0.01

蛍光標識ビーズと SL-1010 (1 mg/ml) の共存下における各反応時間の control に対する食食の抑制率を, mean±SD(n=3) で算出した。

図 4 食食に及ぼす sodium hyaluronate の分子量による影響

蛍光標識ビーズと SL-1010, HA-152, HA-95, HA-47 を 0.25 mg/ml (■), 0.5 mg/ml (▨) および 1.0 mg/ml (灰色棒) 添加後, 10 分間の食食率を測定し, 抑制率を mean±SD(n=6) で比較した。

*: P<0.05. **: P<0.01

1.0 mg/ml となるように加えて, 食食に及ぼす反応時間を検討した結果, 10 分間の反応時間が control に対して 59% と食食を強く抑制した(表 2, P<0.01). この反応時間で, 分子量の異なる HA による食食率を比較した結果, control に対して 0.5 および 1.0 mg/ml では, SL-1010 は 32 および 51% (P<0.01), HA-152 は 23 および 47% (P<0.05, 0.01) と濃度依存的な抑制を示した(図 4). また, 0.25 mg/ml では, SL-1010 のみが 18% と有意な抑制を示した(P<0.01).

また, SL-1010 で前処理した好中球を用いて走化能および食食能に及ぼす影響を検討した結果, control に対して両機能ともに抑制されることが認められた(図 5). 走化能については, 0.25, 0.5 および 1.0 mg/ml 濃度で処理することにより, それぞれ 32, 61 および 71% と濃度依存的に抑制(P<0.01)を示した. 食食能に対して, 0.5 および 1.0 mg/ml では 17 および 33% と有意に抑制された(P<0.05, 0.01).

図 5 SL-1010 で処理した好中球の走化および食食能に及ぼす影響

SL-1010 の 0.25 mg/ml (■), 0.5 mg/ml (▨) および 1.0 mg/ml (灰色棒) の濃度で, 37°C, 30 分間インキュベート後, 調製した細胞 (1×10^6 cells/ml) を用いて走化および食食能を測定し, 抑制率を mean±SD(n=5) で示した. *: P<0.05. **: P<0.01

図 6 好中球の O_2^- 産生に及ぼす SL-1010 の影響
opsonized zymosan 刺激による O_2^- 産生速度 (nM/ 10^6 cells/min) を control より SL-1010 添加群の抑制率を示した。

(4) O_2^- 産生能

OZ 刺激による O_2^- 産生を測定した結果, control に比較して, SL-1010 の濃度に依存して O_2^- 産生は抑制された(図 6). 分子量の異なる HA を比較した結果, 0.5 mg/ml では HA-47 に比較して HA-95, HA-152 および SL-1010 の順に O_2^- 産生を抑制し, 0.25 mg/ml では HA-47 および HA-95 に比較して HA-152 および SL-1010 が O_2^- 産生を抑制した(図 7). なお, 分子量の異なる HA の 2.5 および 5 mg/ml 溶液の SOD 様活性を測定した結果, SL-1010 および他の分子量の HA とともに約 10% の阻害率を示した。

(5) 細胞膜抗原の変化

OZ 刺激による抗原量の変化を解析した結果, CD11b の抗原量は増加し, CD16 および CD44

図 7 sodium hyaluronate の分子量による好中球の O_2 産生に及ぼす影響

分子量の異なる HA を 0.25 mg/ml(■), 0.5 mg/ml(▨)添加し, opsonized zymosan 刺激による O_2 産生速度を control に対する抑制率で示した。

図 8 sodium hyaluronate 処理による CD44 抗原量の変化

細胞(1×10^6 cells/ml)に分子量の異なる HA を 0.5 mg/ml となるように添加し, インキュベート後の CD44 抗原量を測定した。

の抗原量は減少することが認められた。OZ とともに HA を添加すると, CD44 抗原量の減少は軽度抑制され, SL-1010 は他の分子量の HA に比較して強く抑制した(表 3)。また, 好中球に KRPG を加えて 37°C でインキュベートすることにより, CD44 抗原量は減少し, この抗原量の減

表 3 opsonized zymosan 刺激による CD44 抗原量の変化

SL-1010	138
HA-152	118
HA-95	110
HA-47	104

好中球 (1×10^6 cells/ml) を opsonized zymosan (1 mg/ml) 刺激した control の CD44 の抗原量を 100 として, 分子量の異なる HA (0.5 mg/ml) による抗原量の変化を測定した。

少は OZ 刺激に比較して軽度であった。この系に分子量の異なる HA を添加することにより, CD 44 抗原量の減少が抑制され, SL-1010 は他の分子量の HA に比較して顕著に抑制した(図 8)。

考 察

HA は関節軟骨の変性疾患である OA に適用され, 免疫異常に基づく慢性炎症である RA にも有効性が示唆されている¹⁵⁾。そこで, 高分子量の HA である SL-1010 の作用を知る目的で, 好中球の走化能, 貪食能および O_2 産生能を指標に分子量の異なる HA の影響を比較検討した。

これらの好中球機能は HA の添加濃度に依存して, 高分子量の HA になるほど control に比較して抑制されることが認められたが, 各機能に対する HA の抑制濃度は異なっていた。走化能を抑制する HA 濃度は 0.1 mg/ml より認められたが, 貪食能および O_2 産生能に対しては 0.25 あるいは 0.5 mg/ml の濃度より有意に抑制した。貪食能および O_2 産生能に対する抑制は, 走化能の抑制に比較して高い HA 濃度を必要としており, 機能による差が認められた。各分子量の HA で抑制作用を比較すると, 走化能に対しては平均分子量 95 万より有意な抑制が認められたが, 貪食能および O_2 産生能では平均分子量 152 万以上で抑制が認められた。

インドメタシンは貪食能や O_2 産生能を 10^{-4}M で 50% 抑制することが報告されていることから¹⁶⁾, 今回の SL-1010 と比較した。SL-1010 は, 1.0 mg/ml で貪食能および O_2 産生能を 50% 以上抑制していることから, 平均分子量約 200 万として換算すると, 1.0 mg/ml では $0.5 \times 10^{-5}\text{M}$ となり, インドメタシンと同等以上の抑制作用を持つと考えられた。

また、OZ 刺激による HA の O_2^- 産生抑制については、HA に SOD 様活性が軽微であることから、 O_2^- を捕捉する作用でないことが示唆された。

生体防御機能を担う好中球は、炎症局所に浸潤し、その機能を発揮すると考えられる。この細胞浸潤は、血管壁に接着後、走化性因子の濃度勾配に従って運動し、移動することによって炎症局所に選択的に動員されることから、細胞の接着が重要な段階と考えられる。マイクロプレートへの好中球の接着を確認した結果、HA の添加濃度に依存して接着が抑制され、 $1 \mu\text{g/ml}$ の添加により SL-1010 のみが有意に抑制することが認められた。このことから、HA は好中球の走化能を抑制するばかりでなく、接着も抑制することが示唆された。HA は 2 糖の繰り返し構造であり、高分子量であることから粘性などの物理的な作用として、好中球機能に影響することが報告されてきた¹⁷⁾。

しかし、平均分子量約 70 万の HA と同じ粘度を有する methylcellulose を用いた抗炎症作用の比較より、たんなる物理的作用ではなく HA そのものの作用であることが示された⁴⁾。

今回、SL-1010 で前処理した好中球を用いた走化能および貪食能は、共存下に比較して抑制作用は弱いものの、有意に好中球の両機能を抑制したことから、HA の粘性による影響のみではないと考えられた。これらのことは、HA により細胞機能が調節されている可能性を示唆している。

HA は食細胞であるマクロファージに対して親和性が高いとの報告¹⁸⁾もあることから、好中球の細胞膜表面抗原について解析するため、OZ 刺激による影響について検討した。好中球の活性化抗原を認識するモノクローナル抗体のなかで、CD 11b は活性化により抗原量が増加するのに対して、CD 16 は減少することが報告されている¹⁹⁾。

今回、OZ 刺激による影響を確認した結果、CD 11b の抗原量は増加し、CD 16 の抗原量は減少することから、OZ による抗原量の変化は活性化による影響と考えられた。好中球で発現されている CD 44 抗原についても、OZ 刺激で減少することから、活性化により抗原量が減少する抗原であることが示唆された。HA の添加により、特に CD 44 抗原量の減少が抑制され、SL-1010 が強い

抑制を示した。また、好中球を緩衝液中でインキュベートすることにより、OZ 刺激に比較して軽度ではあるが、CD 44 抗原量が減少し、この系に SL-1010 を添加すると顕著に減少を抑制した。CD 44 分子については、HA レセプターとして機能しているとの報告⁸⁾もあるが、今回用いた抗 CD 44 抗体と HA のブロッキング試験を行った結果、競合作用は認められていないことから(未発表データ)、使用した抗体とのエピトープの違いにより HA を認識しなかったとも考えられる。

また、HA レセプターが CD 44 抗原に近似した部位に存在する²⁰⁾ことや、抗 CD 44 抗体の量に依存して単球の IL-1 産生が増強する²¹⁾ことも報告されている。これらのことから、HA は細胞膜上の HA レセプターに作用し、好中球の活性化を調節していると考えられる。

今回、好中球の走化能および貪食能に対する HA の影響を検討した結果、HA 共存下および HA で前処理しても抑制作用が認められ、好中球の活性化抗原に対しても HA で処理することにより活性化を抑制することが示された。分子量の異なる HA と比較すると、高分子量の HA である SL-1010 が顕著に抑制作用を示したことから、細胞接着能の抑制と併せて抗炎症作用が示唆された。

文 献

- 1) 赤星 透, 柏崎 禎夫: 関節炎と IL-1. 炎症 11: 117-126, 1991.
- 2) 近藤 仁: 正常および病的ヒト関節液の粘性に関する研究. 北里医学 10: 485-497, 1980.
- 3) 坂本 崇, 水野 祥二, 榎 智子, 鈴木 啓太郎, 山口 敏二郎, 岩田 久: ヒアルロン酸と関節軟骨. 整形外科基礎科学 11: 264-266, 1984.
- 4) 後藤 幸子, 宮崎 匡輔, 女屋 純一, 坂本 崇, 徳安 清親, 並木 脩: ラットにおける実験的関節疼痛モデルとヒアルロン酸ナトリウムの鎮痛作用. 日薬理誌 92: 17-27, 1988.
- 5) 宮崎 匡輔, 後藤 幸子, 大河原 宏子, 山口 敏二郎: Sodium Hyaluronate (SPH) の鎮痛作用および抗炎症作用. 応用薬理 28: 1123-1135, 1984.
- 6) Goldberg, R.L., Toole, B.P.: Hyaluronate inhibition of cell proliferation. Arthritis Rheum. 30: 769-778, 1987.
- 7) 宮坂 昌之, 玉谷 卓也, 反町 典子: 接着分子と免疫異常. 蛋白質核酸酵素 36: 2532-2539, 1991.
- 8) Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B.: CD 44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 61: 1303-1313, 1990.

- 9) Miyake, K., Underhill, C.B., Lesley, J., Kincade, P.W.: Hyaluronate can function molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 172: 69-75, 1990.
- 10) Watt, S.M., Burgess, A.M., Metcaef, D.: Isolation and surface labelling of murine polymorphonuclear neutrophils. *J. Cell. Phys.* 100: 1-22, 1979.
- 11) Snyderman, R., Pick, M.C.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, physiology, and clinical implications. (ed. by Gallin, J.I., Quine, P.G.), Raven Press, New York, 1978, p 73.
- 12) 多賀千之, 関 秀俊, 谷口 昂: フローサイトメトリーを用いた微量全血法による好中球機能検査. *臨床免疫* 17: 490-498, 1985.
- 13) Nakagawara, A., Minakami, S.: Generation of superoxide anion by leukocytes treated with cytochalasin E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 760-765, 1975.
- 14) 坪井 泉, 松浦 豪, 七條茂樹, 横山三男: 好中球の O_2^- 産生・遊離に及ぼすムコ多糖体多硫酸エステルの効果. *炎症* 8: 131-135, 1988.
- 15) 上尾豊二, 奥村秀雄, 清水和也, 笠井隆一: 慢性関節リウマチの膝ステロイド注入においてヒアルロン酸ナトリウム添加による関節液性状への変化. *炎症* 11: 169-173, 1991.
- 16) Simchowize, L., Mehta, L., Spilberg, I.: Chemotactic factor-induced generation of superoxide radicals by human neutrophils. *Arthritis Rheum.* 22: 775-763, 1979.
- 17) Forrester, J.V., Balazs, E.A.: Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* 40: 435-446, 1980.
- 18) 宮崎匡輔, 鈴木啓太郎, 新名正由, 菊池寿幸, 下村 裕: マクロファージ機能に対するヒアルロン酸ナトリウムの影響. *整形外科基礎科学* 13: 614-617, 1986.
- 19) 横山三男, 原 昭典: ヒト好中球活性化抗原を認識するモノクローナル抗体. *日本臨床* 48: 1119-1124, 1990.
- 20) Lesley, J., Schulte, R., Hyman, R.: Binding of hyaluronic acid to lymphoid cell lines is inhibited by monoclonal antibodies against Pgp-1. *Exp. Cell. Res.* 187: 224-233, 1990.
- 21) Denning, S.M., Le, P.T., Singer, K.H., Haynes, B.F.: Antibodies against the CD44 p80, lymphocyte homing receptor molecule augment human peripheral blood T cell activation. *J. Immunol.* 144: 7-15, 1990.