顆粒球の機能と代謝

——スーパーオキシドアニオンの生成およびその調節機構について——

住本英樹・竹重公一朗・水上茂樹*

Metabolism and function of granulocytes ; Superoxide production and its regulation Phagocytosis or the interaction of certain agents with membrane receptors results in greatly enhanced rates of leucocytes oxygen metabolism (respiratory burst) and production of active oxygens such as superoxide (O_2^-) which rapidly dismutates to yield hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals ($OH\cdot$). Active oxygens produced are used to generate powerful microbicidal agents such as hypochlorous acid ($HOCl$). The respiratory burst results from the activation of an enzyme (NADPH oxidase), dormant in resting cells, which catalyzes the following reaction: $NADPH + 2O_2 \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$. The oxidase is considered to be an FAD-requiring enzyme. Cytochrome b_{558} which is found uniquely in phagocytes is also proposed to be an electron carrier. The mechanism by which the oxidase is activated on stimulation of the cells is not clearly understood. Many informations, however, have been gathered concerning the activation event. Calcium ion is essential for the activation and protein phosphorylation by protein kinase C which is activated by diacylglycerol, produced through phosphatidylinositol turnover, appears to be involved in the activation reaction. Cyclic AMP and the products of arachidonic acid cascade regulate the superoxide production.

Hideki Sumimoto・Koichiro Takeshige・Shigeki Minakami*

*The 2nd Department of Biochemistry, Kyushu University, School of Medicine

key words: granulocyte, superoxide anion, NADPH oxidase

19世紀末に Metchinikoff が食作用の考えを出すまでは、白血球は細菌増殖の場であり、細菌を全身に散布するものであるというのが病理学の常識であった。彼は細胞内殺菌作用を重視したのだが、細胞内水解酵素や殺菌性物質の殺菌能が低いことなどから、半世紀以上にわたり生体防御機構としての食作用は二次的な意義しか与えられなかった。しかし、最近10数年間に白血球の殺菌機能の重要性が、慢性肉芽腫症の研究や活性酸素の研究により認識されるようになった。それは、細胞内殺菌で重要な役割を果たしているのは活性酸素であることが明らかとなったからである。

本総説では、白血球特に顆粒球による活性酸素、特にスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の生成、およびその調節機構について最近の知見を中心に紹介したいと思う。なお、成書^{1,2)}、雑誌の特集号³⁾、総説⁴⁻⁶⁾なども併せて参照されたい。

I. 顆粒球における殺菌機構

異物の組織内侵入に対して、生体は多くの防御機構を備えている。普遍的に存在する非特異的な体液性因子

(リゾチームなど)、異物侵入局所で活性化され、あるいは産生される非特異的防御因子(補体やインターフェロン)、血液や組織に存在する食細胞(顆粒球、単球、およびマクロファージ)やNK細胞などの非特異的な細胞性因子、primitive T cell response、およびクローンの免疫がそれである⁷⁾。このなかで食細胞は微生物を細胞内に取り込み、これを殺菌する。

食細胞が微生物などの殺菌を行う過程はつぎのようなものである。まず食細胞は化学因子の濃度勾配を認識し、微生物の方向へ遊走する(chemotaxis)。つぎに食細胞は微生物を細胞内に取り込み、食胞(phagosome)を形成する(phagocytosis)。食胞内に取り込まれた微生物は殺菌分解されるのだが、その過程は2つに大別される¹⁾(表1)。一つは脱顆粒(degranulation)とよばれる系で酸素に依存しない。食胞は白血球内に存在するアズール顆粒(ミエロペルオキシダーゼ、酸性ホスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、数種の塩基性蛋白質などを含む)および特殊顆粒(アルカリ性ホスファターゼ、ラクトフェリン、リゾチームなどを含む)と融合し、phagolysosomeを形成し、顆粒内容物が放出され、微生物は殺菌分解される。また、脱顆粒時に食胞内のpHを著しく(約pH4まで)低下する。もう一つの過程は、

* 九州大学医学部生化学第二教室

休止期の食細胞にはみられない活性酸素 (O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$ など) の生成である。この過程の重要性は、活性酸素を生成できない白血球をもつ慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease, CGD) 患者では、乳幼児より重篤な感染症を繰り返すことから理解できる。

酸素依存性の殺菌において強力な殺菌能を有すると考えられるのは、次亜塩素酸 ($HOCl$) とヒドロキシラジカル ($OH\cdot$) であり、それらは O_2^- を出発物質としている (図1)。食作用時には O_2^- 生成酵素 (NADPH oxidase) が活性化され、酸素分子は1電子還元を受け O_2^- が生成する。このとき NADPH が消費される。

この食作用時にみられる急激な O_2 消費は respiratory burst と呼ばれている。生じた O_2^- は不均化反応により速やかに O_2 と H_2O_2 を生成する⁸⁾ (この反応はスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) により促進される)。

このとき同時に、 O_2^- 生成性 NADPH oxidase および細胞質のグルタチオン依存性 H_2O_2 解毒系により消費された NADPH の再生のために、五炭糖リン酸回路 (hexose monophosphate shunt, HMP 回路) によるグルコース-6-リン酸の酸化が増加する (図2)。

殺菌への O_2^- 自身の関与は否定的であり、 H_2O_2 もそれだけでは殺菌能は小さいと考えられている。しかし、 H_2O_2 はミエロペルオキシダーゼ (MPO) の作用によりハロゲンイオンを酸化し、強力な殺菌物質を生成する。ちなみに、このようなペルオキシダーゼ H_2O_2 系の殺菌作用の先駆的研究は、本邦において1931年に報告されている⁹⁾。MPO により H_2O_2 と Cl^- から生じる強力な酸化剤は、次亜塩素酸 ($HOCl$) であることがわかっている。

$HOCl$ は、それ自身で種々の生物分子を攻撃するほかに、低分子アミンと反応して殺菌作用を有するクロラミン類を生成する¹⁰⁾。

この好中球や単球におけるもっとも強力な殺菌系と考えられる MPO- H_2O_2 -ハロゲンイオン (X^-) 系は、MPO を Fe^{2+} にかえても強力な殺菌能を有することが cell-free 系で確かめられており、次式に従うものと考えられている。

O_2^- と H_2O_2 から生じるもう一つの強力な酸化剤と考

表1 白血球の殺菌機構

1. 酸素に依存した殺菌
 - a. ミエロペルオキシダーゼ依存の殺菌
 - b. ミエロペルオキシダーゼに依存しない殺菌
 - i) H_2O_2
 - ii) $OH\cdot$
 - iii) O_2^-
2. 酸素に依存しない殺菌
 - a. 酸
 - b. リゾチーム
 - c. ラクトフェリン
 - d. 塩基性蛋白質

図1 活性酸素の生成機構

図中の番号は本文中の反応式の番号を示す。

えられるのはヒドロキシラジカル ($OH\cdot$) である。 $OH\cdot$ は、金属イオン (特に Fe 、ほかに Cu) の共存下で O_2^- と H_2O_2 から生成される (金属イオン触媒の Haber-Weiss 反応)。

もう一つの $OH\cdot$ 生成系として次式が提出されている。

$HO\cdot$ が respiratory burst 時に実際に生成されていることは電子スピン共鳴スペクトル (ESR) 測定から強く示唆されているが、異論もある⁵⁾。

活性酸素の一つである1重項酸素 (1O_2) も respiratory burst 時に生成されると考えられたが、現在のところ確証は得られていない。

II. respiratory burst の測定

respiratory burst の定量は、一般に (1) O_2 消費、(2) cytochrome c 還元による O_2^- 生成、(3) 化学発光などの測定により行われる (図3)。

(1) O_2 消費 (oxygen consumption)

O_2 消費測定には Warburg マノメーター法と酸素電極法があり、respiratory burst の測定には酸素電極法がよく用いられる²⁾。末梢血全血を用いて白血球の O_2 消費を測定する微量測定法もある¹¹⁾。

図2 殺菌機構とそれに伴う代謝変化

図3 respiratory burst の測定

CL: chemiluminescence

LDCL: luminol-dependent chemiluminescence

(2) O_2^- 生成 (generation of superoxide anion)

O_2^- 生成は, cytochrome *c* が O_2^- により還元されたときの 550 nm の吸光増加により測定する¹²⁾.

この還元が SOD で阻害されれば, O_2^- によるものと考えられるわけである.

2 波長分光光度計を用い、550–540 nm の吸光増加により測定すれば、試料の濁りや ferricytochrome *c* による吸光などの影響が少なく微量の試料でわずかな変化を測定できる^{2,13)}. これは全血 10 μ l を用いた高感度で簡便な CGD 診断法にも応用されている¹⁴⁾. また cytochrome *c* の代わりに acetylated cytochrome *c* を用いると、自動酸化が少なくまた反応の特異性も上がる¹⁵⁾.

O_2^- 生成能の測定法として臨床検査室などで用いられる方法に nitrobluetetrazolium (NBT) 還元能をみる方

法があり、簡便法なども知られている²⁾. しかし反応の特異性に問題があり、注意を要する.

(3) 化学発光 (chemiluminescence)

好中球は食作用時に微弱な発光がみられるが、好中球刺激時の可視部の総化学発光 (CL) は, O_2^- の測定値との時間的経過が平行であることから O_2^- 生成を反映していると考えられる⁵⁾. しかしこの CL は微弱であるため、luminol を添加しての測定がよく用いられている (luminol 依存性化学発光, LDCL). この LDCL も一般に respiratory burst を反映したものと考えられている. しかし、opsonized zymosan 刺激時の LDCL は, O_2^- 消去剤である SOD によりほとんど阻害されず (注; SOD で部分的に抑制されるという報告が多い) MPO 阻害剤である NaN_3 や反応液から Cl^- を除去することによりほぼ完全に抑制されること、MPO 欠損症の白血球では刺激時に LDCL を示さないことおよび HOCl は luminol を酸化し励起種を生じることなどから、LDCL は O_2^- よりも $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$ 系による HOCl の生成を反映しているものと考えられる⁵⁾. また xanthine oxidase 系による O_2^- 生成時および NaF 刺激による脱顆粒 (したがって MPO 遊離) を伴わない顆粒球の O_2^- 生成時には CL はほとんどみられないことが報告されている. いずれにせよ LDCL による測定は O_2^- 生成を直接反映していないので注意を要する.

以上のほかにもよく用いられる H_2O_2 の測定法については他の文献²⁾ を参照されたい.

III. O_2^- 生成系の活性化機構

食作用時の呼吸増大 (respiratory burst) は 1933 年に

発見された¹⁶⁾が、これはシアンにより阻害されない（シアン耐性呼吸）のでミトコンドリアの呼吸と異なり、またこのとき HMP 回路が活性化されること¹⁷⁾がわかるまで四半世紀を要した。そして respiratory burst 時に H_2O_2 が生成されることが示され殺菌と結びつけられたのは1961年のことであった¹⁸⁾。

最初に食作用時に O_2^- が生成されるのが示されたのは顆粒球¹²⁾であったが、その後単球、マクロファージおよび好酸球でも O_2^- 生成が起こることが報告された。本章では主として顆粒球による O_2^- 生成系の活性化機構について述べる。なお、顆粒球とは好中球、好酸球および好塩基球の総称であるが、特に断わらない限りは好中球が大部分を占めているので（普通 95 % 以上）、好中球と同義語として用いている。また多形核白血球も同様に考えて頂きたい。

顆粒球は細菌などの食作用時ばかりでなく、種々の刺激剤により活性化され O_2^- を生成する。この活性化には複数の経路が存在するが¹⁹⁾、最終的には共通の経路を経て²⁰⁾、同一の O_2^- 生成酵素 (NADPH oxidase) が活性化される²¹⁾と考えられている。また O_2^- 生成系の活性化機構には次のような特徴があることが知られている。(i) 可逆性。NaF²²⁾、アラキドン酸²³⁾、concanavalin (Con-A) A²⁴⁾ 刺激時の O_2^- 生成で可逆性が示されている。ただし、Con-A 再刺激時の O_2^- 生成ではその Ca^{2+} 要求性などが変化する²⁴⁾。(ii) エネルギーを必要とする²⁵⁾。(iii) 食作用に依存しない。可溶性の刺激剤は食作用を伴わない O_2^- 生成を引き起こす。また サイトカラシン B (Cyt-B) で食作用を抑制しても O_2^- 生成は抑制されない。(iv) 脱顆粒 (リソゾーム酵素の放出) を必要としない。NaF 刺激による O_2^- 生成は脱顆粒を伴わない²²⁾。Cytoplasm (後述) を刺激すると O_2^- 生成は起こるが脱顆粒はみられない²⁶⁾。陰イオンチャンネル阻害剤により脱顆粒は阻害されるが O_2^- 生成は抑制されない²⁷⁾。一方 p-diazobenzene-sulfonic acid は O_2^- 生成は阻害するが脱顆粒は抑えない²⁸⁾。(v) 凝集を必要としない。たとえば lipoxin A²⁹⁾、endotoxin³⁰⁾は O_2^- 生成を誘導するが、顆粒球の凝集は引き起こさない。走化性ペプチド N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) は Mg^{2+} 非存在下でも O_2^- 生成を誘導するが、凝集は Mg^{2+} に依存する。PMA は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 非存在下でも O_2^- 生成を引き起こすが、PMA 刺激による凝集は Ca^{2+} と Mg^{2+} の両方に依存する³¹⁾。(vi) adhesion による増強。ペトリ皿 (petri dish) やミリポアフィルターに接着するだけで顆粒球は O_2^- を生成する。endotoxin を顆粒球浮遊液中に添加しても O_2^- 生成はみられないが、ペトリ皿上で顆粒球と incubate すると O_2^- 生成が誘導される³⁰⁾。顆粒球浮遊液に FMLP を添加すると短時間

(2.5 分) の O_2^- 生成が起こるが、ペトリ皿上の顆粒球を FMLP で刺激すると O_2^- 生成は60分間継続する³²⁾。(vii) priming 効果。たとえば顆粒球を走化性 N-ホルミルペプチド (FMLP など) で preincubate したときには、NaF, PMA, オプソニン化ゼイモザン, Con-A, wheat germ agglutinin (WGA) 刺激時の O_2^- 生成が増強される³³⁾。同様の効果は他の走化性因子 (casein, C 5 a), PMA, Con-A, WGA, Ca^{2+} -イオノフォア A 23187 で preincubate したときにもみられる^{33,34)}。(viii) desensitization. priming 効果は異なる刺激間でみられるが、同一の刺激剤を間隔をおいて用いると二度目の刺激による顆粒球の O_2^- 生成は逆に抑制される。この現象は、FMLP, C 5 a, PMA, A 23187, ロイコトリエン B_4 (LTB_4), 血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) などによる刺激時に観察されている^{20,35)}。

respiratory burst は一般に一過性の現象で長くても 30~60 分間しか続かない。長時間 O_2^- を生成した後では顆粒球の O_2^- 生成系は損傷され不可逆的に O_2^- 生成能を失うと考えられており、実際に 20 mM NaF で 60 分間 incubate すると CGD の顆粒球と類似の顆粒球 (食作用、脱顆粒は起こすが O_2^- を生成しない) ができるという³⁶⁾。この過程には、一部は MPO が関与していると考えられている。

顆粒球の O_2^- 生成系の活性化はどのようにして行われるのだろうか。PMA 刺激時の O_2^- 生成は、all-or-none の現象とするものと、graded であるとするものがある。またどのような過程が関与しているのか。残念ながら現在のところ決定的なことはわかっていないが、多くの過程の関与が示唆されている。

(1) 受容体

O_2^- 生成を誘導する物質の一部は受容体を介して作用すると考えられている。顆粒球には Fc-受容体, C 3 b-受容体, C 5 a-受容体のほかに FMLP, LTB_4 , PAF に対する受容体が存在することが知られている。さらに FMLP³⁸⁾ および LTB_4 ³⁹⁾ に対する受容体にはそれぞれ親和性の異なる 2 種類の受容体が存在すると考えられる。凝集 IgG, 抗原抗体複合物などは、Fc-受容体を介して⁴⁰⁾、オプソニン化ゼイモザンおよび C 567 は C 3 b-受容体を介して⁴¹⁾作用し O_2^- 生成を誘導すると考えられている。Con-A, WGA, phytohemagglutinin (PHA) などのレクチンは細胞膜の糖蛋白質の糖鎖部分に作用するものと考えられる²⁴⁾ (Con-A はマンノース残基に^{24,28)}、WGA はグルコサミン残基に⁴²⁾作用して O_2^- 生成を誘導する)。PMA 刺激時の O_2^- 生成も受容体を介すると考えられたが PMA 受容体と考えられたのは protein kinase C (PK-C, 後述) らしい。

誘導された O_2^- 生成が持続するためには刺激剤と受容体の結合が持続することが必要である^{24,43)} (脱顆粒に

は持続的な結合は必要ではない)。また、すばやく添加したときには O_2^- 生成を起こすのに十分な濃度の走化性ペプチドを長時間かけて添加すると O_2^- 生成は低下する。 O_2^- 生成の程度は、刺激剤と受容体の結合が閾値に達する速度に依存しており、最終的な結合量には依存しない(このような現象は PMA ではみられない)。さらに、結合速度が遅いときには uncoupling (イノシトールリン脂質代謝の促進(後述)が起こらなくなる)が生じる⁴⁴⁾。

先に述べた priming 効果および desensitization の少なくとも一部は受容体レベルで起こっている。priming 効果には up regulation が関与していると考えられる。PMA 刺激により細胞膜上の FMLP 受容体数が増加し、FMLP 刺激で C3b-受容体数が増すことが知られている⁴⁵⁾(この増加分は細胞内の受容体プールに由来する)。また細胞外液中の Na^+ を除去すると FMLP 受容体数が増加する。一方、desensitization にはつぎのような過程の関与が考えられる。(i) adaptation (高親和性受容体の低親和性受容体への変換あるいは受容体間の負の協同作用)⁴⁶⁾。(ii) down regulation (internalization, リガンドと結合した受容体は細胞内へ endocytosis される)。FMLP⁴⁵⁾、C3b, tuftsin に対する受容体で down regulation が報告されている⁴⁶⁾。血小板第4因子は FMLP の internalization を阻害するという。また食作用により FMLP 受容体の数および FMLP に対する親和性が低下するという。

FMLP は $MPO-H_2O_2$ -halide 系により酸化を受け、受容体との結合能が低下する。これも FMLP による O_2^- 生成の持続が短いことに関与していると思われる⁴⁷⁾。

(2) カルシウムイオン (Ca^{2+})

Ca^{2+} の messenger としての役割は多くの細胞で認められている。顆粒球の O_2^- 生成においても Ca^{2+} が重要な役割をもつと考えられるのはつぎのような理由からである。(i) Ca^{2+} -イオノフォアである A 23187, X 537 A, ionomycin により respiratory burst が起こる^{48,49)}。(ii) A 23187, FMLP, NaF, Con-A, digitonin, 抗原抗体複合物, オプソニン化ザイモザン, ロイコトリエン B_4 (LTB₄) による O_2^- 生成は細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存する^{22,25,49,50)}。(iii) ^{45}Ca を用いた実験によれば, FMLP, C5a, アラキドン酸, LTB₄, Con-A, 抗原抗体複合体, PMA などは顆粒球内への Ca^{2+} 流入を引き起こす。この Ca^{2+} 流入は O_2^- 生成に先立つ⁵¹⁾。(iv) Ca^{2+} チャンネル阻害剤である verapamil および La^{3+} は, FMLP およびオプソニン化ザイモザンによる O_2^- 生成を阻害する。以上のように細胞内に流入した Ca^{2+} が O_2^- 生成を引き起こす trigger として働いていると考えられる(digitonin 刺激では O_2^- 生成が始まった後で Ca^{2+} を除いても O_2^- 生成が継続する²⁵⁾)。 (v) もう一つの機序と

して顆粒球の膜結合性の Ca^{2+} が種々の刺激に応じて細胞内へ放出されると考えられている⁵²⁾。サイトカリン D (Cyt-D) による膜結合性 Ca^{2+} の遊離と O_2^- 生成はよく相関し⁵³⁾、ほかに Con-A, オプソニン化ザイモザン, FMLP, C5a, PMA, Ca^{2+} -イオノフォア, LTB₄, 血小板由来成長因子 (PDGF) などの刺激時に膜結合性 Ca^{2+} の遊離がみられる。(vi) 細胞内 Ca^{2+} 阻害剤 8-(N,N-diethylamino)-octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate (TMB-8) は A 23187⁴⁹⁾, Cyt-D⁵²⁾, FMLP⁵⁰⁾, PMA⁵⁰⁾ などによる O_2^- 生成を阻害するが、TMB-8 による O_2^- 生成阻害と膜結合性 Ca^{2+} 遊離の阻害の程度はよく相関する⁵²⁾。

以上の知見は、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇が O_2^- 生成に関与することを示唆する。実際に、FMLP, LTB₄, C5a, Con-A, 凝集 IgG, アラキドン酸などにより顆粒球の $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが示されている^{48, 53-55)} ($[Ca^{2+}]_i$ は徐々に静止レベル ($0.1 \sim 0.2 \mu M$) に戻るが、これには細胞膜の Ca^{2+} ポンプ (Ca^{2+} -ATPase) が関与しているものと考えられている)。しかし、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と O_2^- 生成は必ずしも相関しない。強力な刺激剤である PMA は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こさないし (PMA は顆粒球の Ca^{2+} ポンプを活性化する⁵⁶⁾)、また FMLP⁵³⁻⁵⁵⁾ および ionomycin⁵⁴⁾ 刺激時の O_2^- 生成において $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は十分条件ではない。

Kakiuchi らにより発見された Ca^{2+} 依存性の調節蛋白質である calmodulin も O_2^- 生成系の活性化に関与していると考えられている^{57,58)}。(i) 顆粒球にも calmodulin が存在する。(ii) calmodulin 阻害剤により O_2^- 生成が阻害される。(iii) O_2^- 生成酵素 (NADPH oxidase) を含む膜分画の活性は calmodulin により増強され、calmodulin 阻害剤で抑制される。しかしながら、最近 calmodulin 阻害剤は同時に protein kinase C を阻害することがわかり、calmodulin の関与については現在の段階でははっきりしない。

(3) 蛋白質リン酸化と protein kinase C (PK-C)

O_2^- 生成を誘導する種々の刺激剤により顆粒球蛋白質のリン酸化が起こる⁵⁹⁻⁶³⁾。同定されているリン酸化蛋白質としては、ミオシン軽鎖、アクチン、lipomodulin、および vimentin などがある。蛋白質のリン酸化は蛋白質リン酸化酵素 (protein kinase, PK) の活性化により引き起こされるが、PK には cAMP, cGMP および Ca^{2+} に依存するものがあり、 Ca^{2+} 依存性の PK としては、calmodulin によって活性化される Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase⁶⁴⁾ と、Nishizuka らにより発見された protein kinase C (PK-C)⁶⁵⁾ が知られている。先に述べたように顆粒球の O_2^- 生成は Ca^{2+} により影響を受けるが、さらに PMA が直接 PK-C を活性化すること、顆粒球にも PK-C が存在することがわかり、 O_2^-

生成系の活性化に PK-C の関与が考えられる。この 1 年間に PK-C の O_2^- 生成系の関与を示唆する報告がつぎつぎに現われた。(i) PK-C は Ca^{2+} と diacylglycerol (DG) により協同的に活性化されるが、細胞膜を通過可能な DG である 1-octyl-2-acetyl-glycerol (OAG) により O_2^- 生成が誘導される⁶⁶⁾。また、OAG は PMA と同様の蛋白質リン酸を引き起こし、このとき $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を伴わない⁶⁶⁾。(ii) OAG, PMA, FMLP などによる O_2^- 生成は PK-C の阻害剤 retinal で抑制される⁶⁶⁾。また O_2^- 生成を阻害する calmodulin 阻害剤、局所麻酔剤などは、PK-C を阻害することがわかっている。(iii) PMA は Ca^{2+} と協同的 (synergetic) に PK-C を活性化するが、 O_2^- 生成においても PMA と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は協同的に作用する⁶⁷⁾。さらに、PMA と Ca^{2+} -イオノフォア A 23187⁶⁸⁾、OAG と A 23187、OAG と FMLP はそれぞれ協同的に O_2^- 生成を誘導する。(iv) 強力な O_2^- 生成誘導剤であるアラキドン酸などのシス不飽和脂肪酸²³⁾も直接顆粒球の PK-C を活性化する⁶⁹⁾。(v) 顆粒球に phospholipase C を添加すると $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を伴わない O_2^- 生成が起こるが、このとき DG が生成されている⁷⁰⁾。また、FMLP, A 23187、およびオプソニン化ザイモザンによりイノシトールリン脂質代謝回転 (inositol turnover) が促進されることが知られている⁷¹⁾。このとき生じた DG と Ca^{2+} により PK-C が活性化されると考えられる。 Ca^{2+} 潤渴顆粒球を FMLP で刺激後 2 分以上してから Ca^{2+} を添加しても O_2^- 生成は起きない⁵³⁾。これは生成された DG が速やかに phosphatidate に変換されることを反映していると思われる。(vi) 発癌プロモーターである teleocidin, meze-rein も PK-C を活性化するが、両者とも顆粒球の O_2^- 生成を誘導する⁷²⁾。また数種の phorbol ester の PK-C を活性化する程度と O_2^- 生成を引き起こす程度^{56, 72)} は相関している。

最近では、ホルモンなどの刺激時の inositol turnover の促進において重要な基質は phosphatidylinositol よりむしろ phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI-4, 5P₂) と考えられている⁷³⁾。PI-4, 5P₂ の phospholipase C による分解産物である DG と inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) が 2nd messenger として重要な役割を果たす。IP₃ は細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を引き起こすことが顆粒球でも知られている⁷⁴⁾。FMLP 刺激時には PI-4, 5P₂ の分解が促進される。生成された IP₃ は $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させて DG と協同して PK-C を活性し、 O_2^- 生成系の活性化に至るものと考えられる。

(4) サイクリック AMP と G 蛋白質

サイクリック AMP (cAMP) は顆粒球の O_2^- 生成に関しては抑制的に働く。サイトカラシン E (Cyt-E)¹³⁾、

Cyt-D⁸⁾、FMLP^{75, 76)} による O_2^- 生成は dibutyryl-cAMP により抑制され、その抑制効果は theophylline などの phosphodiesterase 阻害剤により増強される。プロスタグランジン E₁ (PGE₁)⁷⁵⁾、PGE₂⁷⁵⁾、PGI₂⁷⁶⁾、isoproterenol などの β -刺激剤⁷⁵⁾、および histamine は FMLP による O_2^- 生成を阻害するが、これは cAMP を介しているものと考えられている。一方、PMA, NaF, OAG, オレイン酸による O_2^- 生成は dibutyryl-cAMP により阻害されない^{66, 67)}。cAMP の作用機序としては、(i) Ca^{2+} 流入の阻害 (ただし、貯蔵部位あるいは膜結合性 Ca^{2+} の遊離は阻害しない)、(ii) inositol turnover の阻害が考えられているが、 O_2^- 生成の抑制には (ii) の機序が重要と思われる⁷⁷⁾。cAMP の作用発現は cAMP-dependent protein kinase を介すると考えられている⁶¹⁾。cGMP は顆粒球の O_2^- 生成には影響を与えない^{13, 66)}。

細胞膜 adenylate cyclase 系は、受容体、GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質または N 蛋白質という)、触媒部 (ATP から cAMP を生成する) からなり、さらに G 蛋白質には、触媒部に促進的に作用する Gs と抑制的に作用する Gi が存在する⁷⁸⁾。顆粒球にも Gs および Gi が存在する。Gi を百日咳毒素で ADP-リボシル化すると Gi は抑制されるが、このような処理によりおそらく Ca^{2+} 流入が阻害されるために FMLP による O_2^- 生成が抑制される⁷⁹⁾。さらに顆粒球の β -受容体、FMLP 受容体の高親和性と低親和性受容体の相互変換には G 蛋白質が関与していると考えられている³⁸⁾。

(5) アラキドン酸カスケードと O_2^- 生成系 (図 4 参照)

顆粒球を、オプソニン化ザイモザン⁸⁰⁾、 Ca^{2+} -イオノフォア^{71, 80)}、FMLP⁷¹⁾ などでは刺激するとアラキドン酸の遊離が起こる (PMA 刺激ではアラキドン酸の遊離はみられない⁸⁰⁾)。アラキドン酸は種々のリン脂質から遊離されるが、そのなかの 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (1-O-alkyl-2-arachidonoyl-GPC) はアラキドン酸と血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) の共通の供給源と考えられている。アラキドン酸²³⁾も PAF⁸¹⁾も顆粒球の O_2^- 生成を誘導するが、低濃度のアラキドン酸は FMLP や NaF による O_2^- 生成を抑制する⁸²⁾。アラキドン酸は cyclooxygenase および lipoxygenase (LOX) により代謝されるが、顆粒球では LOX 系による代謝が中心と考えられている。5-LOX 系により leukotriene B₄ (LTB₄)、C₄、D₄、E₄ などが生成される⁸³⁾。LTB₄ は顆粒球の O_2^- 生成を誘導する⁵⁰⁾。LTB₄ は細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こすが、PI-4, 5-P₂ (前述) の分解は起こさない。また LTB₄ は FMLP による O_2^- 生成を増強するという。LTB₄ は顆粒球に特異的な NADPH 依存性の ω -水酸化を受ける⁸⁴⁾が、その産物である 20-OH-LTB₄ も顆粒球の化学発光を誘導する⁸⁵⁾。5-LOX と 12-LOX による double

図4 アラキドン酸カスケードと O_2^- 生成#印は顆粒球の O_2^- 生成を誘導する物質

1-O-alkyl-2-arachidonyl-GPC: 1-O-alkyl-2-arachidonyl-sn-glycerol-3-phosphocholine,
 PAF: platelet activating factor,
 HPETE: hydroperoxyeicosatetraenoic acid,
 HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid,
 DHETE: dihydroxyeicosatetraenoic acid,
 LT: leukotriene, PG: prostaglandin, TX: thromboxane, LX-A: lipoxin A.

oxygenation の産物である 5S, 12S-dihydroxyeicosatetraenoic acid (5S, 12S-DHETE)⁸⁶⁾, 15-LOX 系により生成される 14, 15-DHETE⁸⁷⁾ はともに LTB_4 による O_2^- 生成を抑制する. 15-LOX と 5-LOX 両者の作用で生じる lipoxin-A (LX-A) も顆粒球の O_2^- 生成を誘導する²⁹⁾. また cyclooxygenase による産物 prostaglandin E_2 (PGE_2), E_1 , I_2 などは, FMLP, オプソニン化ザイモザンによる O_2^- 生成を阻害するが, $PGF_{2\alpha}$ の阻害効果は弱い^{75, 76)}. 一方, PMA やアラキドン酸による O_2^- 生成は PG で阻害されない⁷⁶⁾.

LT は, $OH\cdot$, $MPO-H_2O_2$ -halide 系により不活化される (LTC_4 , D_4 , E_4 は, $MPO-H_2O_2$ -halide 系により 6-trans- LTB_4 および相当する sulfoxide 誘導体に変換される⁸⁸⁾. したがって, 顆粒球の O_2^- 生成は LT の不活化にも関与していると考えられる. 一方, CGD 患者の顆粒球で LT⁸⁹⁾ および thromboxane B_2 (TXB_2) の生成能低下は認められないので, LT および TX の生成に O_2^- の関与はないと考えられる.

アラキドン酸およびその代謝産物が O_2^- 生成の 2nd messenger として働いている可能性については, (i) 細胞外 Ca^{2+} 非存在下でも FMLP による O_2^- 生成は (Ca^{2+} 存在下より弱い⁷⁾ 起こる⁵³⁾ が, アラキドン酸の遊離は起こらない⁷¹⁾ こと, (ii) アラキドン酸による O_2^- 生成は LOX 阻害剤などで抑制されないことなどから否定的である.

(6) 膜電位変化

顆粒球の O_2^- 生成を誘導する刺激剤により膜電位変化が起こることが知られている⁹⁰⁾. 刺激後に出現する脱分

極は, (i) O_2^- 生成と相関する, (ii) O_2^- 生成に先立つ, (iii) CGD の顆粒球ではみられないなどの理由から, O_2^- 生成系の活性化に関与するものと解釈された. さらに HL-60 細胞 (ヒト前骨髄球性白血病の cell line) を分化させたときの O_2^- 生成能と脱分極能の出現は相関することが知られている⁹¹⁾. しかし, 脱分極と O_2^- 生成が相関しない例も多く知られている^{56, 92)}. たとえば, gramicidin (Na^+ および K^+ に対するイオノフォア) や ouabain (Na^+ , K^+ ポンプの阻害剤) により脱分極は起こるが O_2^- 生成は起こらない⁵⁶⁾ し, 細胞外 Na^+ 濃度を下げると PMA や FMLP による脱分極は抑えられるが O_2^- 生成は抑制されない (FMLP による O_2^- 生成はむしろ増強される⁵⁶⁾. 膜電位変化と O_2^- 生成は直接には coupling していないとみるほうが妥当かと思われる.

(7) その他の因子

顆粒球の O_2^- 生成が種々の serine protease の阻害剤で抑えられることから, O_2^- 生成系の活性化に serine protease の関与が示唆されている. しかし, その根拠は阻害剤の効果だけであり, また阻害剤の特異性, 純度などの点から疑問が出されている^{58, 93)}. 一般にプロテアーゼ (protease) による細胞機能調節は少なくとも短期的には不可逆と考えられるが, 前述のように O_2^- 生成系の活性化は可逆的な現象であり, serine protease の関与は考えにくいのではなかろうか.

cytochalasin B (Cyt-B) は, それだけでは O_2^- 生成を誘導しないが, FMLP, A 23187, Con-A, PHA, WGA LTB_4 , PAF など多くの刺激剤による O_2^- 生成を促進す

る (PMA による O_2^- 生成は影響されない). Cyt-B は, Ca^{2+} の移動に影響する^{51,55)}ほか, inositol turnover の促進を増強することが知られている.

微小管 (microtubule) の重合を促進する作用をもつ重水 (D_2O) は O_2^- 生成を誘導する⁹⁴⁾. 一方, 微小管の重合を阻害する colchicine などの薬剤はそれ自身では O_2^- 生成を誘導しないが, Cyt-D, 走化性ペプチドなどの O_2^- 生成を増強する⁹⁵⁾. 微小管と O_2^- 生成系の関係は現在のところわかっていない.

生理的な物質としては, adenosine, ビタミン K などが O_2^- 生成を抑制することが知られている.

(8) cytoplasm

顆粒球の cytoplasm (Cyt-B 処理により核や顆粒成分を除いたもの) は, 種々の刺激剤により respiratory burst を起こし, intact な細胞と同程度の O_2^- を生成する²⁶⁾. したがって O_2^- 生成系およびその活性化経路は保たれた状態で他の成分が若干除かれたもの (O_2^- 生成系の部分精製) と考えられ, O_2^- 生成酵素⁹⁶⁾および活性化経路⁹⁷⁾の解析に用いられている.

(9) 無細胞系 (cell-free system) における活性化

O_2^- 生成酵素の活性化は intact な細胞あるいは cytoplasm でしか起こせないと考えられていたが, 最近顆粒球⁹⁸⁾およびマクロファージ⁹⁹⁾のホモジネートを用いて O_2^- 生成酵素 (NADPH oxidase) の活性化に成功したとの報告がなされた. 活性化は, オレイン酸, アラキドン酸などのシス脂肪酸によりなされるが, 膜分画 (NADPH oxidase が存在する) のほかに細胞質成分が必要という. この系は O_2^- 生成系の活性化機構の解析に有用となる可能性がある.

(10) 分化に伴う O_2^- 生成能の出現

ヒト骨髓細胞を用いた実験によれば PMA および NaF 刺激時に NBT の還元を引き起こすのは後骨髓球 (metamyelocyte) 以後であるので, 後骨髓球以後の白血球が O_2^- 生成能を有すると考えられている. またヒト前骨髓球性白血病の cell line である HL-60 細胞は O_2^- 生成能をもたないが, dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF) などにより顆粒球系の細胞に分化すると刺激時に O_2^- を生成するようになる^{91, 100)}.

O_2^- 生成能の増強 (第2の意味での " O_2^- 生成系の活性化") についてはマクロファージ (Mφ) を用いた研究がなされている. ヒト単球を数日以上培養すると Mφ に分化する (単球由来 Mφ) が, その O_2^- 生成能は極端に低下しており, これは組織の resident Mφ の機能を示すものと考えられる¹⁰¹⁾. 一方, 単球由来 Mφ を interferon- γ などの lymphokine と培養すると刺激時の O_2^- 生成能は増強する¹⁰²⁾. このような "活性化" には, O_2^- 生成酵素 (NADPH oxidase) の NADPH に対する親

和性の増大 (K_m の低下) が関与するものと考えられている¹⁰³⁾.

IV. O_2^- 生成酵素 (NADPH oxidase)

O_2^- 生成酵素 (NADPH oxidase) の本態は精製されていない現在不明であるが, つぎのような性質が知られている. (i) 細胞膜に存在する¹⁰⁴⁾. (ii) 電子供与体として NADPH を必要とする¹⁰⁵⁾. 試験管内の反応では NADH も電子供与体となりうるが, NADPH に対する親和性のほうがずっと高い (NADPH に対するミカエリス定数 $[K_m]$ は $0.025 \sim 0.05$ mM, NADH に対する K_m は $0.5 \sim 1$ mM)^{104, 106)}. 1 分子の NADPH から 2 分子の O_2^- が生成する (I. 式 1 参照)^{104, 106, 107)}. HA-DPH 結合部位は細胞膜の細胞質側, O_2 結合部位はその反対側に存在する¹⁰⁸⁾. O_2 に対する K_m は約 0.03 mM である¹⁰⁹⁾. (iii) O_2^- 生成反応の至適 pH は中性付近 (pH 7 前後) である^{104, 107)}. (iv) O_2^- 生成活性は Mg^{2+} により増加する.

NADPH oxidase は顆粒球のほかに, ヒト単球¹¹⁰⁾, ヒト初乳マクロファージ¹¹⁰⁾, マウスおよびモルモット腹腔マクロファージ¹⁰³⁾, ウサギ肺胞マクロファージにも存在することが確かめられている. 一方, CGD 患者の顆粒球は NADPH oxidase を欠く. ある種の CGD では, NADPH oxidase の NADPH に対する親和性が低い (K_m が $1/5 \sim 1/10$) ことがその原因であると考えられている¹¹¹⁾.

NADPH oxidase には, フラビン蛋白質 (flavoprotein), b 型チトクローム (b-type cytochrome), ユビキノン (ubiquinone) の関与が示唆されている.

(1) フラビン蛋白質 (flavoprotein)

フラビン蛋白質の関与はつぎのような根拠から主張されている. (i) flavin adenine dinucleotide (FAD) は可溶化された NADPH oxidase の粗精製標品の O_2^- 生成活性を上昇させる^{108, 107)}. ただし, FAD は無効との報告もある. (ii) FAD のアナログ¹⁰⁶⁾ や quinacrine (flavin のアナログ)¹¹²⁾ が可溶化標品の O_2^- 生成活性を阻害する. (iii) CGD の顆粒球には NADPH oxidase 分画に FAD が欠損しているものがある¹¹³⁾.

一方, 細胞膜分画を可溶化した後ゲル濾過クロマトグラフィーにて得た NADPH oxidase 分画の FAD 含量が少ない (この分画の b 型チトクロームの含量は多い) ことから, フラビン蛋白質の関与に疑問をもつ報告もある¹¹⁴⁾.

(2) b 型チトクローム (b-type cytochrome)

顆粒球に特徴的な b 型のチトクロームは本邦において発見され, 酸化還元差スペクトラムで 558 nm に吸収をもつことから cytochrome b_{558} (cyt. b_{558}) と命名された¹¹⁵⁾. 1978 年英国で再発見され, その後 NADPH

oxidase との関連からの研究が盛んに行われている。NADPH oxidase における cyt. b_{558} の関与は以下の根拠から主張されている。(i) cyt. b_{558} の酸化還元電位 ($E_{m,7.0}$) は -245 mV であり (このことから cytochrome b_{-245} とも呼ばれる), これは O_2 を O_2^- に還元するのに十分な低さである (O_2/O_2^- の $E_{m,7.0}$ は -160 mV). (ii) cyt. b_{558} は細胞膜に存在し¹¹⁶⁾, 食作用時には食胞に移行する. cyt. b_{558} の一部は特殊顆粒に存在するとされる¹¹⁶⁾が, 90% 以上が特殊顆粒に存在し刺激時には細胞膜に移行するというもの¹¹⁷⁾, 主として第3顆粒に存在するというもの¹¹⁸⁾もある。(iii) 嫌氣的条件下において顆粒球を PMA で刺激すると cyt. b_{558} の還元が起こり, 酸素添加により cyt. b_{558} は速やかに酸化される。(iv) 嫌氣的条件下で, 刺激後の顆粒球より得た膜分画 (NADPH oxidase 活性を含む) に NADPH を添加すると cyt. b_{558} の還元が起こる^{119,120)}. 酸素¹¹⁹⁾あるいは $NADP^+$ ¹²⁰⁾の添加により cyt. b_{558} は酸化される. この NADPH 依存性の cyt. b_{558} の還元は O_2^- 生成能と相関し, 刺激していない顆粒球から得た膜分画の cyt. b_{558} では NADPH による還元は著しく遅い¹¹⁹⁾. (v) cyt. b_{558} は O_2^- 生成能を有する細胞, すなわち好中球, 好酸球, およびマクロファージには存在するが, 他の細胞ではみられない。(vi) HL-60 細胞の分化による O_2^- 生成能の出現と cyt. b_{558} の出現は相関する¹⁰⁰⁾. (vii) CGD の顆粒球には cyt. b_{558} が存在しないか, 存在しても NADPH 依存性の還元を受けない¹²¹⁾. (viii) NADPH 依存性の還元を受けない cyt. b_{558} をもつ CGD の単球と cyt. $b_{556(-)}$ の CGD の単球を融合させると, NBT 還元能を有するようになる¹²²⁾. (ix) NADPH oxidase の粗精製過程で O_2^- 生成活性と cyt. b_{558} は co-purify される¹¹⁴⁾. なお cyt. b_{558} は一酸化炭素と結合するが, その結合は光により解離されることが知られている¹¹⁹⁾.

一方, 嫌氣的条件下での NADPH 依存性の cyt. b_{558} の還元速度は O_2^- 生成速度に比して著しく遅いので, cyt. b_{558} の NADPH oxidase への関与に対して疑問視する向きもある¹²⁰⁾が, 好氣的条件下では cyt. b_{558} の還元速度と O_2^- 生成速度は一致するとの報告が最近なされた¹²³⁾.

(3) 電子伝達系 (electron transport system) 説

NADPH oxidase は, フラビン蛋白質と cyt. b_{558} からなる複合体であるという可能性が考えられている. つまり, NADPH からフラビン蛋白質を経て cyt. b_{558} に伝達された電子が最終的に O_2^- に渡され O_2^- が生じるというものである.

この根拠とされるのは以下のようなものである。(i) O_2^- 生成活性を有する分画に FAD と cyt. b_{558} が 1:1~1:2 (FAD: cyt. b_{558}) の割合で存在する^{96,117,120,124)}. (ii) CGD の顆粒球には FAD か cyt. b_{558} のどちらか一方を欠く型, 異常な cyt. b_{558} をもつ型などがある¹¹³⁾. FAD を欠く CGD の顆粒球では, NADPH 依存性の cyt. b_{558} の還元が起こらない¹¹³⁾. (iii) NADPH oxidase は 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCIP) 還元活性を有すると考えられる¹¹²⁾が, この DCIP の還元はフラビン蛋白質から電子を直接受け取るものと考えられる¹¹²⁾. つまり p-chloromercuribenzenate (PCMB) により O_2^- 生成および cyt. b_{558} の還元は阻害される¹¹⁹⁾が, DCIP 還元は阻害されない¹¹²⁾. ただし, DCIP 還元活性は O_2^- を介しているとする意見もある¹²⁵⁾. (iv) FAD を伴わない cyt. b_{558} は NADPH 依存性の還元を受けず¹²⁶⁾, また O_2^- 生成能を有しない¹²⁶⁻¹²⁸⁾. 逆に cyt. b_{558} を伴わないフラビン蛋白質は NADPH 依存性の還元を受けるが, O_2^- 生成能はない¹²⁶⁾. しかし, NADPH oxidase 粗精製標品にごく少量の FAD しか含まれなかった (cyt. b_{558} : FAD $\approx$ 19:1) ことからフラビン蛋白質の関与に疑問が出されている¹¹⁴⁾.

電子伝達系の一部としてユビキノ (ubiquinone) の関与も考えられている^{118,129)}が, NADPH oxidase 分画¹³⁰⁾および cytoplasm⁹⁶⁾にユビキノが検出されないことからその O_2^- 生成への関与は否定的である.

おわりに

顆粒球の殺菌機構の一つとして重要な O_2^- 生成系について最近の知見を中心に紹介した. O_2^- 生成系の活性化機構および O_2^- 生成酵素 (NADPH oxidase) の分子レベルでの解明は始められたばかりといっても過言ではなく, これからの研究の発展が待たれる. したがって今後 cell-free 系における NADPH oxidase の活性化とその精製が研究の大きな2つの目標となるであろう.

なお, 本稿においては O_2^- 生成とその制御機構に焦点を絞って紹介したため, 生成した活性酸素がどのようにして侵入した細菌などの異物を無毒化 (殺菌) するのか, そのメカニズムについてはまったく省略した. また活性酸素は, 殺菌や炎症ばかりではなく, adult respiratory distress syndrome (ARDS, shock lung) や発癌にも関与しているという報告もあるが, これらの詳細はほか^{6,131)}に譲る.

文 献

- 1) Klebanoff, S.J. & Clark, R.A.: The Neutrophil. Function and Clinical Disorders. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978.
- 2) 水上茂樹, 柿沼カッ子 (編): 白血球と食作用.

講談社, 1979.

- 3) 水上茂樹 (編): 食作用の生化学. 炎症 3 (Suppl. 1), 1983.
- 4) 竹重公一朗, 水上茂樹: 代謝 17: 1719-1730, 1980.
- 5) 中野 稔, 牛島義雄: 炎症 4: 191-200, 1984.
- 6) Babior, B.M.: Blood 64: 959-966, 1984.
- 7) 野本亀久雄: 炎症 4: 93-99, 1984.
- 8) Nabi, Z. F., Takeshige, K., Hatae, T. & Minakami, S.: Exp. Cell Res. 124: 293-300, 1979.
- 9) Kojima, S.: J. Biochem. 14: 95-109, 1931.
- 10) Grisham, M. B., Jefferson, M.M., Melton, D.F. & Thomas, E.L.: J. Biol. Chem. 259: 10404-10413, 1984.
- 11) Nakamura, M., Nakamura, M.A., Okumura, J. & Kobayashi, Y.: J. Lab. Clin. Med. 91: 568-575, 1978.
- 12) Babior, B.M., Kipnes, R. S. & Curnutte, J.T.: J. Clin. Invest. 52: 741-767, 1973.
- 13) Nakagawara, A. & Minakami, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 64: 760-767, 1975.
- 14) Takeshige, K., Matsumoto, T., Shibata, R. & Minakami, S.: Clich. Chim. Acta 92: 329-335, 1979.
- 15) Kakinuma, K. & Minakami, S.: Biochim. Biophys. Acta 538: 50-59, 1978.
- 16) Baldrige, C.W. & Gerard, R.W.: Am. J. Physiol. 103: 235-236, 1933.
- 17) Sbarra, A. J. & Karnovsky, M.L.: J. Biol. Chem. 234: 1355-1362, 1959.
- 18) Iyer, G.Y.N., Iram, M.F. & Quastel, J.H.: Nature 192: 535-541, 1961.
- 19) Yamashita, T., Someya, A. & Tsuzawa-Kido, Y.: Eur. J. Biochem. 145: 71-76, 1984.
- 20) McPhail, L.C., Clayton, C.C. & Snyderman, R.: J. Biol. Chem. 259: 5768-5775, 1984.
- 21) McPhail, L.C. & Snyderman, R.: J. Clin. Invest. 72: 192-200, 1983.
- 22) Curnutte, J.T., Babior, B.M. & Karnovsky, M.L.: J. Clin. Invest. 63: 637-647, 1979.
- 23) Badwey, J.A., Curnutte, J.T., Robinson, J.M., Berde, C.B., Karnovsky, M.J. & Karnovsky, M.L.: J. Biol. Chem. 259: 7870-7877, 1984.
- 24) Cohen, H.J., Whitin, J.C., Chovaniec, M.E., Tape, E. H. & Simons, E. R.: Blood 63: 114-120, 1984.
- 25) Cohen, H.J. & Chovaniec, M.E.: J. Clin. Invest. 61: 1088-1096, 1978.
- 26) Roos, D., Voetman, A.A. & Meerhof, L. J.: J. Cell Biol. 97: 368-377, 1983.
- 27) Korchak, H. M., Eisenstat, B. A., Smolen, J. E., Rutherford, L. E., Dunham, P. B. & Weissmann, G.: J. Biol. Chem. 257: 6916-6922, 1982.
- 28) Goldstein, I. M., Cerqueira, M., Lind, S. & Kaplan, H.B.: J. Clin. Invest. 59: 249-254, 1977.
- 29) Serhan, C.N., Hamberg, M. & Samuelsson, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5335-5339, 1984.
- 30) Dahinden, C. & Fehr, J.: J. Immunol. 130: 863-868, 1983.
- 31) Whitin, J.C. & Cohen, H.J.: J. Immunol. 134: 1206-1211, 1985.
- 32) Dahinden, C.A., Fehr, J. & Hugli, T.E.: J. Clin. Invest. 72: 113-121, 1983.
- 33) Bender J.G., McPhail, L.C. & Van Epps, D.E.: J. Immunol. 130: 2316-2323, 1983.
- 34) Nakagawara, A. & Minakami, S.: Biochim. Biophys. Acta 584: 143-148, 1979.
- 35) Smith, R.J., Iden, S.S. & Bowman, B.J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 121: 695-701, 1984.
- 36) Matzner, Y., Brass, L.M., McMurrich, B.J., Peters, W.A., Andre-Schwartz, J. & Babior, B. J.: Blood 60: 822-826, 1982.
- 37) Bass, D.A., Parce, J.W., DeChatelet, L.R.: Szejda, P., Seeds, M.C. & Thomas, M.: J. Immunol. 130: 1910-1917, 1983.
- 38) Koo, C., Lefkowitz, R.J. & Snyderman, R.: J. Clin. Invest. 72: 748-753, 1983.
- 39) Goldman, D.W. & Goetzl, E.J.: J. Exp. Med. 159: 1027-1041, 1984.
- 40) Weiss, S.J. & Ward, P.A.: J. Immunol. 129: 309-313, 1982.
- 41) Nauseef, W.M., Root, R.K., Newman, S.L. & Malech, H.L.: Blood 62: 635-644, 1983.
- 42) Ozaki, Y., Iwata, J. & Ohashi, T.: Blood 64: 1094-1102, 1984.
- 43) Korchak, H.M., Wilkenfeld, C., Rich, A.M., Radin, A. R., Vienne, K. & Rutherford, L.E.: J. Biol. Chem. 259: 7439-7445, 1984.
- 44) De Togni, P., Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., Di Virgilio, F. & Rossi, F.: Biochim. Biophys. Acta 838: 23-31, 1985.
- 45) Berger, M., O'Shea, J., Cross, A.S., Folks, T.M., Chused, T.M., Brown, E.J. & Frank, M.M.: J. Clin. Invest. 74: 1566-1571, 1984.
- 46) Sklar, L. A., Finney, D. A., Oades, Z. G., Jesaitis, A.J., Painter, R. G. & Cochrane, C.G.: J. Biol. Chem. 259: 5661-5669, 1984.
- 47) Stendahl, O., Coble, B.-I., Dahlgren, C., Hed, J. & Molin, L.: J. Clin. Invest. 73: 366-373, 1984.
- 48) Lew, D.P., Wollheim, C.B., Waldvogel, F.A. & Pozzan, T.: J. Cell Biol. 99: 1212-1220, 1984.
- 49) Matsumoto, T., Takeshige, K. & Minakami, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 88: 974-979, 1979.
- 50) Sumimoto, H., Takeshige, K. & Minakami, S.: Biochim. Biophys. Acta 803: 271-277, 1984.
- 51) Korchak, H.M., Rutherford, L.E. & Weissmann, G.: J. Biol. Chem. 259: 4070-4075, 1984.
- 52) Takeshige, K., Nabi, Z.F., Tatscheck, B. & Minakami, S.: Biochem. Biophys. Res. Com-

- mun. 95: 410-415, 1980.
- 53) Nakagawara, M., Takeshige, K., Sumimoto, H., Yoshitake, J. & Minakami, S.: *Biochim. Biophys. Acta* 805: 97-103, 1984.
 - 54) Pozzan, T., Lew, P.D., Wollheim, C.B. & Tsien, R.Y.: *Science* 221: 1413-1415, 1983.
 - 55) Korchak, H. M., Vienne, K., Rutherford, L.E., Wilkenfeld, C., Finkelstein, M.C. & Weissmann, G.: *J. Biol. Chem.* 259: 4076-4082, 1984.
 - 56) Mottola, C. & Romeo, D.: *J. Cell Biol.* 93: 129-134, 1982.
 - 57) Takeshige, K. & Minakami, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99: 484-490, 1981.
 - 58) Curnutte, J. T., Badway, J. A., Robinson, J.M., Karnovsky, M.J. & Karnovsky, M.L.: *J. Biol. Chem.* 259: 11851-11857, 1984.
 - 59) Irita, K., Takeshige, K., & Minakami, S.: *Biochim. Biophys. Acta* 803: 21-28, 1984.
 - 60) Irita, K., Takeshige, K. & Minakami, S.: *Biochim. Biophys. Acta* 805: 44-52, 1984.
 - 61) Huang, C.-K., Hill, J. M., Jr., Bormann, B.-J., Mackin, W.M. & Becker, E.L.: *Biochim. Biophys. Acta* 760: 126-135, 1983.
 - 62) Okamura, N., Ohashi, S., Nagahisa, N. & Ishibashi, S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 228: 270-277, 1984.
 - 63) White, J.R., Huang, C.-K., Hill, J.M., Jr., Naccache, P.H., Becker, E.L. & Sha'afi, R.I.: *J. Biol. Chem.* 259: 8605-8611, 1984.
 - 64) Kakiuchi, S. & Sobue, K.: *Trends Biochem. Sci.* 8: 59-62, 1984.
 - 65) Nishizuka, Y.: *Nature* 308: 693-698, 1984.
 - 66) Fujita, I., Irita, K., Takeshige K. & Minakami, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 318-324, 1984.
 - 67) Di Virgilio, F., Lew, P.D. & Pozzan, T.: *Nature* 310: 691-693, 1984.
 - 68) Robinson, J.M., Badwey, J.A., Karnovsky, M.L. & Karnovsky, M.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 734-739, 1984.
 - 69) McPhail, L.C., Clayton, C.C. & Snyderman, R.: *Science* 224: 622-625, 1984.
 - 70) Grzeskowiak, M., Della Bianca, V., De Togni, P., Papini, E. & Rossi, F.: *Biochim. Biophys. Acta* 844: 81-90, 1985.
 - 71) Takenawa, T., Homma, Y. & Nagai, Y.: *J. Immunol.* 130: 2849-2855, 1983.
 - 72) Troll, W., Witz, G., Goldstein, B., Stone, D. & Sugimura, T.: *Carcinogenesis* 7 (Hecker E. et al. editors), Raven Press, New York, 593-597, 1982.
 - 73) Berridge, M.J. & Irvine, R.F.: *Nature* 312: 315-321, 1984.
 - 74) Prentki, M., Wollheim, C.B. & Lew, P.D.: *J. Biol. Chem.* 259: 13777-13782, 1984.
 - 75) Wong, K. & Freund, K.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59: 915-920, 1981.
 - 76) Fantone, J.C. & Kinnes, D.A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113: 506-512, 1983.
 - 77) De Togni, P., Cabrini, G. & Di Virgilio, F.: *Biochem. J.* 224: 625-629, 1984.
 - 78) 堅田利明, 宇井理生: 蛋白質核酸酵素. 30: 209-219, 303-313, 1985.
 - 79) Okajima, F. & Ui, M.: *J. Biol. Chem.* 259: 13863-13871, 1984.
 - 80) Walsh, C.E., Waite, B.M., Thomas, M.J. & DeChatelet, L.R.: *J. Biol. Chem.* 256: 7228-7234, 1981.
 - 81) Shaw, J.O., Pinckard, N., Ferrigni, K.S., McManus, L.M. & Hanahan, D.J.: *J. Immunol.* 127: 1250-1255, 1981.
 - 82) Wong, K. & Chew, C.: *J. Cell Physiol.* 119: 89-95, 1984.
 - 83) Samuelsson, B.: *Science* 220: 568-575, 1983.
 - 84) Sumimoto, H., Takeshige, K., Sakai, H. & Minakami, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 615-621, 1984.
 - 85) Palmblad, J., Gyllenhammer, H., Lindgren, J.Å. & Malmsten, C.L.: *J. Immunol.* 132: 3041-3045, 1984.
 - 86) Claesson, H.-E. & Feinmark, S.J.: *Biochim. Biophys. Acta* 804: 52-57, 1984.
 - 87) Radmark, O., Serhan, C., Hamberg, M., Lundberg, U., Ennis, M.D., Bundy, G.B., Oglesby, T.D., Aristoff, P.A., Harrison, P.W., Slomp, G., Scahill, T.A., Weissmann, G. & Samuelsson, B.: *J. Biol. Chem.* 259: 13011-13016, 1984.
 - 88) Lee, C.W., Lewis, R.A., Tauber, A.I., Mehrotra, M., Corey, E.J. & Austen, K.F.: *J. Biol. Chem.* 258: 15004-15010, 1983.
 - 89) Henderson, W.R. & Klebanoff, S.J.: *J. Biol. Chem.* 258: 13522-13527, 1983.
 - 90) Whitin, J.C., Chapman, C.E., Simons, E.R., Chovaniec, M.E. & Cohen, H.J.: *J. Biol. Chem.* 255: 1874-1878, 1980.
 - 91) Kitagawa, S., Ohta, M., Nojiri, H., Kakinuma, K., Saito, M., Takaku, F. & Miura, Y.: *J. Clin. Invest.* 73: 1062-1071, 1984.
 - 92) Seeds, M.C., Parce, J.W., Szejda, P. & Bass, D.A.: *Blood* 65: 233-240, 1985.
 - 93) Tsan, M.-F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 671-677, 1983.
 - 94) Nakamura, M., Nakagawara, A. & Minakami, S.: *Exp. Cell Res.* 102: 439-431, 1976.
 - 95) Kitagawa, S. & Takaku, F.: *Biochim. Biophys. Acta* 719: 589-598, 1982.
 - 96) Lutter, R., van Zwieten, R., Weening, R.S., Hamers, M.N. & Roos, D.: *J. Biol. Chem.* 259: 9603-9606, 1984.
 - 97) Gennaro, R., Pozzan, T. & Romeo, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1416-1420, 1984.
 - 98) Hyneman, R.A. & Vercauteren, R.E.: *J. Leukocyte Biol.* 36: 751-759, 1984.
 - 99) Bromberg, Y. & Pick, E.: *Cell Immunol.* 88: 213-221, 1984.
 - 100) Newburger, P.E., Speier, C., Borregaard, N., Walsh, C.E., Whitin, J.C. & Simons,

- E.R.: J. Biol. Chem. 259: 3771-3776, 1984.
- 101) Nakagawara, A., Nathan, C.F.; & Cohn, Z.A.: J. Clin. Invest. 68: 1243-1252, 1981.
 - 102) Nakagawara, A., DeSantis, N.M. & Nathan, C.F.: J. Clin. Invest. 70: 1042-1048, 1982.
 - 103) Tunawaki, S. & Nathan, C. F.: J. Biol. Chem. 259: 4305-4312, 1984.
 - 104) Suzuki, Y. & Lehrer, R.I.: J. Clin. Invest. 66: 1409-1418, 1980.
 - 105) Nakamura, M., Baxter, C.R. & Masters, B.S.S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 98: 743-751, 1981.
 - 106) Wakeyama, H., Takeshige, K., Takayanagi, R. & Minakami, S.: Biochem. J. 205: 593-601, 1982.
 - 107) Light, D.R., Walsh, C., O'Callaghan, A.M., Goetzl, E.J. & Tauber, A.I.: Biochemistry 20: 1468-1476, 1981.
 - 108) Yamaguchi, T. & Kakinuma, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 104: 200-206, 1982.
 - 109) Kakinuma, K. & Kaneda, M.: Biochemistry and Function of Phagocytes (Rossi, F. and Patriarca, P., editors), Plenum Publishing Corp., New York, 351-360, 1982.
 - 110) Tsuda, H., Takeshige, K., Shibata, Y. & Minakami, S.: J. Biochem. 95: 1237-1245, 1984.
 - 111) Lew, P.D., Southwick, F.S., Stossel, T.P., Whitin, J.C., Simons, E. & Cohen, H.J.: N. Engl. J. Med. 305: 1329-1333, 1981.
 - 112) Wakeyama, H., Takeshige, K. & Minakami, S.: Biochem. J. 210: 577-581, 1983.
 - 113) Gabig, T.G. & Lefkar, B.A.: J. Clin. Invest. 73: 701-705, 1984.
 - 114) Bellavite, P., Jones, O.T.G., Cross, A.R., Papini, E. & Rossi, F.: Biochem. J. 223: 639-648, 1984.
 - 115) Hattori, H.: Nagoya J. Med. Sci. 23: 362-378, 1961.
 - 116) Garcia, R.C. & Segal, A.W.: Biochem. J. 219: 233-242, 1984.
 - 117) Borregaard, N. & Tauber, A.I.: J. Biol. Chem. 259: 47-52, 1984.
 - 118) Mollinedo, F. & Schneider, D.L.: J. Biol. Chem. 259: 7143-7150, 1984.
 - 119) Cross, A.R., Parkinson, J.F. & Jones, O.T.G.: Biochem. J. 223: 337-344, 1984.
 - 120) Gabig, T.G., Schervish, E.W. & Santinga, J.T.: J. Biol. Chem. 257: 4114-4119, 1982.
 - 121) Segal, A.W., Cross, A.R., Garcia, R.C., Borregaard, N., Valerius, N.H., Soothill, J.F. & Jones, O.T.G.: N. Engl. J. Med. 308: 245-251, 1983.
 - 122) Hamers, M.N., de Boer, M., Meerhof, L.J., Weening, R.S. & Roos, D.: Nature 307: 553-555, 1984.
 - 123) Cross, A.R., Parkinson, J.F. & Jones, O.T.G.: Biochem. J. 226: 881-884, 1985.
 - 124) Cross, A.R., Jones, O.T.G., Garcia, R. & Segal, A.W.: Biochem. J. 208: 759-763, 1982.
 - 125) Bellavite, P., Della Bianca, V., Serra, M.C., Papini, E. & Rossi, F.: FEBS Lett. 170: 157-161, 1984.
 - 126) Gabig, T.G. & Lefker, B.A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 118: 430-436, 1984.
 - 127) Harper, A.M., Gunne, M.J. & Segal, A.W.: Biochem. J. 219: 519-527, 1984.
 - 128) Pember, S.O., Heyl, B.L., Kinkade, J.M., Jr. & Lambeth, J.D.: J. Biol. Chem. 259: 10590-10595, 1984.
 - 129) Takeshige, K., Wakeyama, H. & Minakami, S.: Biochim. Biophys. Acta 798: 127-131, 1984.
 - 130) Cross, A.R., Jones, O.T.G., Garcia, R. & Segal, A.W.: Biochem. J. 216: 765-768, 1983.
 - 131) 竹重公一朗: 活性酸素 (八木國夫監修, 中野稔, 二木鋭雄, 島崎弘幸編). 医歯薬出版, 1985 (印刷中).