全血法と分離白血球法からみた好中球と 好酸球のルミノール依存性化学発光

——感染症、肺線維症、過敏性肺炎、好酸球増多症において——

小橋 修^{*1)}、小橋悠紀子・柴田真希・橋本修一・友岡真樹・
高橋弘子・今村美奈子・重松信昭^{*2)}

Neutrophil-dependent and eosinophil-dependent chemiluminescence to phorbol myristate and opsonized zymosan with pooled human IgG in the patients with infectious diseases, pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and eosinophilia A rapid microassay of whole blood luminol-dependent chemiluminescence (CL) was carried out in the patients with bacterial infections, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), bronchial asthma, hypersensitivity pneumonitis (HP) and eosinophilia. CL to phorbol myristate acetate (CL-PMA) and CL to opsonized zymosan (CL-OZ) was significantly elevated in the whole blood assay during either acute infections or during acute exacerbation of IPF. CL-PMA not CL-OZ of the separated polymorphonuclear leukocyte (PMNL) was comparable to the whole blood CL responses. Both CL-PMA and CL-OZ in the whole blood assay but not in PMNL CL assay were moderately but significantly elevated in the patients with HP where this elevation of CL-OZ was correlated well with neutrophils ($r=0.856$). In the patients with bronchial asthma, the elevation of CL-OZ was correlated well with eosinophil ($r=0.98$) but not with neutrophils. It is thus concluded that the elevation of CL-OZ in HP depended on neutrophils whereas that in bronchial asthma depended on eosinophils and that whole blood CL assay appeared to be more suitable for clinical evaluation of the disease or disease activities rather than that of PMNL CL assay, possibly through reflection of serum factors in the whole blood assay.

Osamu Kohashi^{*1)}, Yukiko Kohashi・Maki Shibata・Syuichi Hashimoto・Maki Tomooka・
Hiroko Takahashi・Minako Imamura・Nobuaki Shigematsu^{*2)}

^{*1)} Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Kyushu University

^{*2)} Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University

key words: chemiluminescence, neutrophil, eosinophil,
allergy, complement receptor

種々の白血球機能検査法の中でルミノール依存性化学発光(chemiluminescence: CL)は、その生化学的機序は不明な点が多いが、貪食細胞の殺機能とよく相関し^{1,2)}、かつ慢性肉芽腫症やMPO欠損症の診断のための重要な検査の一つとなっている³⁾。白血球の化学発光は細菌感染症の活動期に亢進し、回復期に正常化し⁴⁾、発熱、CRP陽性、赤沈の促進、白血球の変動などの急性炎症性反応と正の相関を示す^{5,6)}。CLの測定法として、分離した白血球¹⁾を用いる方法と、簡便法として血液全体を用いる全血法³⁻⁷⁾とがある。全血法は、採血後ただちに測定できるので、迅速かつ簡便な方法であるが、分離した白血球によるCL値とくらべ、①血清成分の影響を受ける⁷⁻⁹⁾、②好中球のCLが主体であるが、他の細胞成分(好酸球、単球、血小板、NK細胞など)^{7,10,11)}からの化学発光の影響を受ける、③赤血球による化学発光

の抑制(quantenching)を受ける¹²⁾などの問題点をもっている。分離白血球法は、血清や赤血球による直接の影響を除外できるが、白血球を分離してCLを測定するまでに2時間近い時間を要すること、それまでの間に起こる白血球の生理的・生化学的変動の影響が大きいこと、さらに赤血球の溶血操作に伴って白血球膜が障害を受けることなどの問題点をもっている。筆者らは、呼吸器感染症患者における末梢白血球の化学発光を分離白血球法と全血法とで比較し、臨床応用のうえでの全血法の利点を報告した^{5,6)}。

一方、サルコイドーシス患者の単球は、健常人とくらべCLの亢進があり、好中球のCLは正常であったという報告¹³⁾、アレルギー性鼻炎では、好酸球のCLの亢進があり、好中球のCLは正常であったという報告¹⁴⁾、さらに細菌感染症では、PMA、fMLPや新鮮血清でオプソニン化されたザイモザン(OZ)に対して好中球のCLは亢進する^{8,15,16)}という報告があり、CL測定による各種疾患の病態把握の可能性が示唆されている。筆者

^{*1)} 九州大学医学部細菌学教室

^{*2)} 九州大学医学部胸部疾患研究施設

らは血清と補体の安定性を考慮してザイモザンを新鮮血清でオプソニン化せず、補体を含まない正常人プール血清由来の IgG でオプソニン化した。新鮮血清でオプソニン化された OZ は白血球の FcR と C3bR の両者を刺激するが¹⁷⁾、本実験での OZ は白血球の FcR を介した活性酸素産生のみをみる系となっている。全血法の場合には、この OZ が血液中の補体を活性化するので(投稿中)、OZ による化学発光には活性化された補体 (C3b, C5a) による白血球の活性化が同時に反映される^{15,17)}。

今回、細菌感染症患者の他に、気管支喘息患者、過敏性肺炎患者、薬物アレルギーなどのアレルギー疾患患者、および肺線維症患者の末梢白血球を用いて、二つの刺激物質 PMA と OZ とで別個に刺激し、全血法と分離白血球法とによるルミノール依存性化学発光 (CL-PMA と CL-OZ) を測定した。特に全血法では、CL-PMA と CL-OZ との値が各種疾患に特徴的なパターンを示し、アレルギー患者に多くみられるパターンは感染症患者に多くみられるパターンとは異なっていること、かつこのアレルギー患者に多くみられるパターンには好酸球依存性と好中球依存性とがあることを見いだしたので報告する。

対象と方法

九州大学医学部付属病院 呼吸器科入院中の患者(昭和61年1月～昭和62年4月)、外来患者合計90名、対照健康人17名を対象にした。

① 採血と白血球(好中球、好酸球)の分離：ヘパリン加静脈血を2ml 採血し、採血後30分以内に以下に述べる方法でルミノール依存性化学発光 (CL) を測定した。残りの血液1ml にデキストラン(Dextran, MW 60,000) 0.5ml を加えよく混和し、室温に静置した。30～45分後デキストラン層を分離し、これを1:1(v/v)の割合でリンパ球分離液(LSM)のうゑに重層し、1500 rpm 30分室温遠心し、遠心管底の顆粒球(PMN)を分離した。

一方、好酸球と好中球とを同時に分離するときには、5ml のヘパリン加静脈血を採取し、上記のごとくデキストラン層を分画し、percoll 比重遠心法¹⁸⁾に従って、好中球層と好酸球層とを集めた。分取したこれら細胞は HBSS で1回洗浄したあと、各細胞層をチュルク液にて染色し、細胞数をトーマの計算盤にて400倍率の顕微鏡下に算定し、細胞数を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。細胞分画のためには別に塗抹標本をつくり、May Giemza 染色し、白血球を分画した。

② ルミノール依存性化学発光の試薬および測定：白血球の膜刺激物質として、PMA (phorbol myristate acetate, Sigma), zymosan A (Sigma), 溶媒として dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma), リン酸緩衝液 (PBS 0.02 M, pH 7.2), ハンクス液 (HBSS) を使用した。各試薬の

濃度はそれぞれの至適濃度をあらかじめ決定してから以下のように調整した^{5,6)}。PMA (10 mg) を 5 ml の DMSO に溶解し、600 μl (PMA 2 mg/ml) ずつ分注し -20°C に保存した。使用時に、PBS にて4倍に希釈した (PMA 0.5 mg/ml)。zymosan A は 20 mg/ml になるように蒸留水にて調整し、 100°C 60分煮沸後 10 mg/ml になるように HBSS で希釈し分注して 4°C に保存した。オプソニン化ザイモザン (OZ) は、 γ -globulin (ミドリ十字社, 50 mg/ml) を2容に対し zymosan (10 mg/ml) 1容の割合で混ぜ、 37°C 30分反応させたあと、3回 HBSS にて洗浄し、10 mg/ml の濃度に HBSS にて調整し、分注して 4°C に保存した。各操作は無菌的に行った。

③ biolumat LB9500T による CL 値の測定：1検体用の biolumat 2台を用いて、一方に PMA を、他方に OZ を加え、同時に白血球の化学発光 (CL-PMA と CL-OZ) を測定した。すなわち、1台には全血または PMN 層 10 μl を HBSS 490 μl に加え、ただちに luminol 10 μl を加えよく混和し測定を開始した。 37°C で5分間反応させたあと、PMA 10 μl を加えよく混ぜたあと、さらに 37°C で計30分間反応させた。同時に、もう1台に全血または PMN 層 10 μl を HBSS 490 μl に加え、さらに OZ 10 μl と luminol 10 μl を加えたサンプルをもう一つの biolumat に入れ、CL を測定した。

CL 値はピーク値前後の3分間の合計値でもってあらわし、PMA による白血球の非特異的刺激によって得られる CL 値を CL-PMA、オプソニン化ザイモザン OZ 刺激による CL 値を CL-OZ と便宜上あらわした^{5,6)}。

2検体以上の複数検体を同時に測定する必要がある場合には、6チャンネル用 biolumat (LB 9505) (福岡大学医学部微生物教室) を使用した。

結果

(1) 呼吸器感染症、肺線維症、気管支喘息、過敏性肺炎の各患者の活動期と回復期における化学発光の特徴 (全血法と分離白血球法の比較)

表1に示したように、感染症の急性期(活動期)には、全血法の CL-PMA と CL-OZ とはともに有意に上昇し ($P < 0.001$)、CL-PMA と CL-OZ の比が健康人よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。データには示していないが、好中球数と CL-PMA および CL-OZ との間には正の相関があり、それぞれの相関係数は $r = 0.706$, $r = 0.790$ ($n = 83$) であった。同時に測定された分離白血球法の CL-PMA は有意に ($P < 0.001$) 上昇したが、CL-OZ の上昇は有意ではなかった。

肺線維症の急性増悪期(活動期)の化学発光は、感染症の場合と同じ傾向を示し、全血法と分離白血球法の CL-PMA がともに有意に上昇した ($P < 0.001$)。ただし、

表 1

	whole blood CL assay				PMN CL assay ($10^6/\text{ml}$)		
	WBC mean $\pm$ SD (count/mm ³)	CL-PMA mean $\pm$ SD ($\times 10^4/3\text{min}$)	CL-OZ mean $\pm$ SD ($\times 10^4/3\text{min}$)	ratio (CL-PMA vs CL-OZ)	CL-PMA/PMN mean $\pm$ SD ($\times 10^4/3\text{min}$)	CL-OZ/PMN mean $\pm$ SD ($\times 10^4/3\text{min}$)	ratio (CL-PMA vs CL-OZ)
healthy adult (n=36)	4573 ± 1093	17.6 ± 9.5	16.6 ± 7.3	1.1 ± 1.3	37.5 ± 24.0	52.3 ± 31.7	0.7 ± 0.8
infections							
acute periods (n=119)	8233*** ± 2890	125.7*** ± 110	54.5*** ± 34.8	2.3* ± 3.2	132.9*** ± 99.7	65.6 ± 34.7	2.0** ± 2.9
convalescence (n=44)	5648** ± 1711	29.3*** ± 13.0	18.5 ± 9.9	1.6 ± 1.3	44.6 ± 27.3	31.1*** ± 18.4	1.4* ± 1.5
IPF							
acute periods (n=39)	7135*** ± 3202	122.5*** ± 72.3	35.3*** ± 19.1	3.5*** ± 3.8	105.8*** ± 49.4	52.6 ± 27.5	2.0*** ± 1.8
stable periods (n=19)	4443 ± 1819	28.4*** ± 12.3	16.6 ± 8.4	1.7 ± 1.5	87.8*** ± 64.4	68.0 ± 34.0	1.3 ± 1.9
br. asthma (n=35)	7974*** ± 4425	35.7*** ± 20.4	45.0*** ± 37.1	0.8 ± 0.5	30.3 ± 17.3	65.3 ± 78.6	0.5 ± 0.2
HP							
acute periods (n=10)	9090** ± 4027	57.9*** ± 30.2	50.7*** ± 19.3	1.1 ± 1.6	31.9 ± 16.3	38.8 ± 19.9	0.8 ± 0.8
stable periods (n=11)	5746 ± 1578	21.3 ± 6.5	20.5 ± 12	1.0 ± 0.5	38.7 ± 17.6	59.1 ± 43.8	0.65 ± 0.4

student's t test. *** $P < 0.001$. ** $P < 0.01$. * $P < 0.05$. IPF: idiopathic pulmonary fibrosis.

br. asthma: bronchial asthma, HP: hypersensitivity pneumonitis.

全血法での CL-OZ の上昇が感染症にくらべて軽度であったので、CL-PMA と CL-OZ の比は感染症よりもさらに有意に大きかった ($P < 0.001$).

気管支喘息では、発作時、非発作時の患者が含まれているためか標準偏差が大きくなったが、CL-PMA と CL-OZ はともに軽度ではあるが有意の上昇を示し ($P < 0.001$)、かつ CL-OZ のほうがより高値を示したため、その比は 1 より小さくなった。分離白血球では CL-PMA が減少傾向にあったが、健康人との間に有意差はなかった。

過敏性肺炎患者が、抗原に暴露されてから数時間以後に発熱、咳嗽、白血球増加などの臨床症状を示した活動期には、全血法の CL-PMA と CL-OZ とがともに中等度ではあるが有意に高値を示した ($P < 0.001$)。CL-PMA と CL-OZ の比は健康人のそれと有意差はなかった。分離白血球の CL-PMA は有意差なく、CL-OZ は有意ではなかったが低値を示した ($P < 0.3$)。

(2) 好酸球増多を示した患者における全血法で測定された白血球化学発光の特徴

図 1 に好酸球増加を示した 21 名の患者 (好酸球 0~63%) で好酸球が 8% 以上のとき ($n=40$) と以下のとき ($n=59$) との 2 群にわけ、両群において白血球数、好中球数、好酸球数と全血法による化学発光値のそれぞれの平均値と標準偏差を図示した。表 2 には各群における各項目の相関係数を示した。好酸球増加群 ($\geq 8\%$) におい

て、CL-OZ は好酸球数と強い相関 ($r=0.716$, $n=40$) を示し、CL-PMA は好中球とより相関する ($r=0.708$, $n=40$) 傾向がみられた (おのおのの相関図を図 2 と図 3 に示した)。

一方、好酸球増加がなかった群では、CL-OZ、CL-PMA とともに好中球数との間に強い相関がみられた (図 4, 5) が、好酸球との間には相関が認められなかった。この 21 名の患者のなかに気管支喘息患者でステロイド中止後、急速に好酸球が増加し、平行して CL-OZ が有意に CL-PMA より高値を示した症例 1 (29 歳女性、気管支喘息 + アスピリン喘息) の経過を図 6 に示した。ステロイド中止後、急速に好酸球が増加するにつれ (0→63%)、CL-OZ が有意に CL-PMA より高値を示した。ステロイド再開により急速に好酸球が減少すると平行して、CL-PMA と CL-OZ はともに正常化した。ステロイド減量中にふたたび軽度の好酸球増加 (0→20%) が認められ、同時に CL-OZ も上昇した。この間の好酸球数と CL-OZ との間の相関係数は $r=0.98$ ($n=22$) であった。このような好酸球と CL-OZ との強い相関関係は、他の好酸球増多症、好酸球性肺炎の患者でもみられた。

(3) 過敏性肺炎患者における抗原暴露時の白血球化学発光の特徴

過敏性肺炎患者のうち、抗原暴露前から十分な経過の追えた患者 (症例 2) について白血球の CL の経過を図 7

図 1

表 2

correlation coefficient	eosinophils* $\geq 8\%$ (n=40)		eosinophils** $< 8\%$ (n=59)	
	CL-PMA	CL-OZ	CL-PMA	CL-OZ
neutrophils	0.708	0.399	0.795	0.731
eosinophils	0.148	0.716	-0.118	0.111

* eosinophilia (8~63%), ** eosinophilia (0~7%)

図 2

に示した。抗原暴露後に発熱と好中球増加がみられ、急峻な CL-PMA と CL-OZ の有意な上昇がみられた。この期間中の好中球数は54~75%、好酸球数は0~5%で、好中球数と CL-PMA および CL-OZ との相関係数はそれぞれ $r=0.802$, $r=0.856$ ($n=11$)であった。

(4) 全血法における CL-PMA 優位パターン(感染パターン)と CL-OZ 優位パターン(アレルギーパターン)

図8に感染症患者、肺線維症患者(表1)と、過敏性肺炎患者および気管支喘息や薬物アレルギーで好酸球増加を示した患者($n=60$)の、活動期(acute)と回復期(stable)

図 3

図 4

図 5

における全血法の CL-PMA と CL-OZ を示した。過敏性肺炎、気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患では、その活動期に CL-PMA と CL-OZ とがともにほぼ同程度に上昇する。感染症の活動期には CL-PMA と CL-OZ がともにより高値を示すが、CL-OZ の上昇にくらべ CL-PMA の上昇がより高かった。肺線維症の活動期も感染症と似ていたが、CL-PMA の上昇にくらべて、CL-OZ の上昇の度合は少なかった。以上の成績から、CL-PMA と CL-OZ がともに上昇し、かつ CL-PMA が優位の場合を感染パターンと呼び、CL-OZ 優位の場合をアレルギーパターンと呼んで、便宜上区別し

図6 effect of steroids on eosinophilia and CL response

図7

ている。

(5) 分離白血球(好中球と好酸球)の化学発光

患者6名より好中球と好酸球とを分離し、分離された好中球(>95%)と好酸球(>95%)それぞれの化学発光を比較し、全血法との関係を図9に示した。好酸球数と全血法の CL-OZ との相関係数は $r=0.735$ ($n=15$)であったが、他の組合せにおいては、好中球、好酸球、CL間に有意の相関はみられなかった($P<0.5$)。

考察

各種疾患患者由来の白血球を2種類の膜刺激物質 PMA と OZ(human IgG coated zymosan で補体を結合していない)で別個に刺激し、全血法と分離白血球法とによるルミノール依存性化学発光(CL)を測定した。PMA は白血球の C-kinase を介して¹⁹⁾、OZ は白血球膜の FcR を介して¹⁷⁾活性酸素産生を刺激している。感染症の活動期には、全血法の CL-PMA と CL-OZ とがともに有意に上昇するが、CL-PMA の上昇が優位なため、CL-PMA と CL-OZ の比は2以上であった。これらの CL は好中球数と正の相関(それぞれ $r=0.706$, $r=0.796$, $n=83$)を示した(表1)。同時に分離された分

離白血球の CL-PMA は有意に上昇したが、CL-OZ の上昇は有意でなかった(表1)。

一般に、新鮮血清でオプソニン化された OZ で刺激された白血球の CL-OZ は、感染症の活動期に著明に上昇すると報告されている^{4,15)}。新鮮血清でオプソニン化されたグロブリンと補体を結合した OZ は、白血球膜の2つのレセプター FcR と C3bR とを介して活性酸素産生を刺激している¹⁷⁾ので、白血球膜上の FcR と C3bR とが感染症の活動期には活性化されていると推測される。

本実験で用いられた OZ は、補体成分がついていないので、白血球膜の FcR のみを刺激していると考えられる。しかしこの OZ は血液中の補体を活性化し得るので、全血法で測定するときには、分離白血球法とは違って白血球の FcR と C3bR の両方のレセプターを介した化学発光が測定される(投稿中)。したがって、本実験の急性感染症患者の白血球の CL-OZ に関して、全血法で有意に増加したが、分離白血球法で有意の増加がみられなかったことは、感染症の活動期には白血球の C3bR が FcR より強く活性化されていることを示唆している。また、補体を結合していない OZ を用いた全血法は、患者の血清中の補体価を間接的に反映しているとも考えられるので¹⁵⁾、感染症の病態を把握するうえで大変有用であると考えられる。

過敏性肺炎患者は、抗原暴露から数時間から12時間前後に発熱と好中球優位の白血球増加を示すことが多いが、そのときの全血法による CL-PMA と CL-OZ とはともに有意に、同程度の増加を示した(表1)。この CL-OZ の増加は好中球数と強い正の相関($r=0.856$, $n=11$)を示した(図7)。逆に、分離白血球の CL-OZ は有意ではなかったが低値を示したので、全血法の CL-OZ の増加は、なんらかの血清因子の増強効果によることが推測された^{7,9,10,15)}。分離白血球法の CL-OZ が低

図 8

図 9

値を示すのは感染症の回復期にも認められたので(表1), 分離白血球の CL-OZ の低値の原因として白血球膜レセプター, 特に FcR になんらかの変化(数または機能の変化)が起こっていたのかもしれない。さらに, 副腎ステロイドホルモン剤や抗炎症剤によって CL が抑制されるという報告²⁰⁾があるので, 患者の治療に用いられた薬剤が白血球の CL-OZ に影響している可能性も否定できない。

肺線維症の活動期には, 感染症の場合と同様に, 全血法の CL-PMA と CL-OZ とはともに有意に上昇するが, CL-PMA の上昇にくらべて CL-OZ の増加ははるかに小さかった。したがって, CL-PMA と CL-OZ の比は感染症の 2.3 に対して肺線維症は 3.5 と有意に大き

くなった。肺線維症患者は副腎ステロイドホルモン剤や抗炎症剤が使われているので, この相対的な CL-OZ の低値には, これらの薬剤に関連したなんらかの血清因子(補体や補体活性化因子の欠損), あるいはこれらの薬剤の直接作用による CL の抑制があったのかもしれない^{9,10)}(現在各種疾患患者血清の CL に及ぼす効果を検討中である)。

前述した感染症や過敏性肺炎の場合には, 全血法の CL-OZ の上昇と好中球数の増加とはよく相関していたが, 好酸球増加を伴ったアレルギー疾患(表2), 特に症例1の気管支喘息の場合には(図6), 好酸球数の増加に伴って CL-OZ が有意に増加し, かつ好酸球数の変動と CL-OZ の変動が非常によく相関($r=0.98$, $n=22$)していた。また好酸球数の変動と副腎ステロイドホルモン剤使用量との間に, 強い負の相関がみられる症例があった。これらの多くの症例で, 副腎ステロイドホルモン剤使用時には CL-PMA に比し CL-OZ の相対的な低下がみられた。その作用機序は不明な点が多いが, 副腎ステロイドホルモン剤が前述したように血清補体価の減少や白血球膜の FcR の数と機能に影響し, その結果として CL-OZ が抑制された可能性もある²⁰⁾。

好酸球の化学発光に関して, 花粉によるアレルギー性鼻炎患者において, 花粉のシーズンとは無関係に好酸球の CL は亢進し, 好中球の CL は健常人と変わらなかったという報告¹⁴⁾がある。筆者らは好酸球増加を示した21名の患者で, 好酸球増加と CL-OZ の上昇とはよく相関することを示した($r=0.716$, $n=40$)(表2)。このうち12名の分離好酸球と好中球についてみたかぎりでは,

アレルギー患者の好酸球のCLが有意に亢進しているという成績は得られなかった。しかし図9で示した個々の症例のなかには、好酸球の機能も高まっている場合があったので、好酸球の数の増加のみでなく、好酸球の機能の亢進もあったのかどうかに関して、さらに症例を重ねて検討する必要がある。

以上まとめると、感染症と肺線維症の活動期には全血法のCL-PMAとCL-OZとは有意に高値を示し、その比は2以上を示した(便宜上、筆者らはこれを感染パターンと呼んでいる)。過敏性肺炎の場合はCL-PMAとCL-OZとは同程度に中等度の上昇を示し、その比は1前後で相対的なCL-OZ優位を示し、かつ好中球と正の相関を示した(便宜上好中球依存性のアレルギーパターンと呼んでいる)。好酸球増加を示したアレルギー患者では、その活動期にCL-PMAとCL-OZとがともに軽度上昇し、その比が1以下で、過敏性肺炎の場合よりさらにCL-OZの上昇が強く、かつこのCL-OZの増加は好酸球増加と正の相関を示した(好酸球依存性のアレルギーパターン)。

本実験で補体結合OZを用いなかった理由はOZの安定性のためであった。ルミノール依存性化学発光の測定、特に全血法は少量の血液で、簡単に、しかも迅速に測定できるので、繰り返し必要に応じて測定可能である。新鮮血清でオプソニン化したOZも加えて、各種膜刺激物質に対する白血球の化学発光を同時に測定することによって、いろいろな病態における白血球のFcR、C3bRの反応性や白血球の化学発光に関係する代謝系を含めた白血球の機能を間接的に解析できる検査法の一つとして、たいへん有用であることが示唆された。

文 献

- 1) Allen, R.C., Stjernholm, R.L., Steel, 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) Cheson, B.D., Christensen, R.L., Sperling, R., Kohler, B.E., Babior, B.M.: The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. *J. Clin. Invest.* 58: 789-796, 1976.
- 3) Rosen, H., Klebanoff, S.J.: Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase-deficient leukocytes. *J. Clin. Invest.* 58: 50-60, 1976.
- 4) McCarthy, J.P., Bodroghy, R.S., Jahrling, P.B., Sobocinsky, P.Z.: Differential alterations in host peripheral polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence during the course of bacterial and viral infections. *Infect. Immun.* 30: 824-831, 1980.
- 5) Kohashi, O., Kohashi, Y., Yamaguti, S., Muranishi, H., Miyazaki, M., Nakanishi, M.,

- Hayashi, S., Ishibashi, M., Ikeda, T., Shigematsu, N.: Role of whole blood luminol-dependent chemiluminescence on monitoring acute bacterial infections. *Jap. J. Inflammation* 6(2): 134-140, 1986.
- 6) Kohashi, O., Kohashi, Y., Yamaguti, S., Muranishi, H., Kuwano, K., Hirose, N., Shigematsu, N.: Simultaneous measurement of luminol-dependent chemiluminescence to PMA and opsonized zymosan of whole blood of patients during acute and chronic bacterial infections—infectious pattern of CL response—. *Jap. J. Inflammation* 7(2): 151-157, 1987.
 - 7) Kato, T., Wakalek, H., Schopf, E., Eggert, H., Ernst, M., Reitschel, E. Th., Fischer, H.: Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood. I. Role of granulocytes, platelets, and plasma factors in zymosan-induced chemiluminescence. *Klin. Wochenschr.* 59: 203-211, 1981.
 - 8) Westrick, M.A., Shirley, P.S., DeChartelet, L.R.: Generation of chemiluminescence by human neutrophils exposed to soluble stimuli of oxidative metabolism. *Infect. Immun.* 30: 385-390, 1980.
 - 9) Faden, H., Maciejewsky, N.: Whole blood luminol-dependent chemiluminescence. *J. Reticuloendothel. Soc.* 30: 219-226, 1981.
 - 10) Mills, E.L., Gerrard, J.M., Filipovich, D., White, J.D., Quie, P.G.: The chemiluminescence response of human platelets. *J. Clin. Invest.* 61: 807-814, 1978.
 - 11) Helfand, S.L., Werkmeister, J., Roder, J.C.: Chemiluminescence response of human natural killer cells. I. The relationship between target cell binding, chemiluminescence, and cytolysis. *J. Exp. Med.* 156: 492-505, 1982.
 - 12) Tsuji, Y., Yanai, M., Kanbe, M., Tohya, Y.: Studies of chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Med.* 102: 161-163, 1979.
 - 13) Martin, R.R., Lawrence, E.C., Teague, R.B., Gottlieb, M.S., Putnam, M.: Chemiluminescence of lung macrophages and blood leukocytes in sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: 298-301, 1986.
 - 14) Shult, P.A., Graziano, F.M., Busse, W.W.: Enhanced eosinophil luminol-dependent chemiluminescence in allergic rhinitis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 77: 702, 1986.
 - 15) Allen, R.C.: Evaluation of serum opsonic capacity by quantitating the initial chemiluminescence response from phagocytizing polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 15: 828-833, 1977.
 - 16) McPhail, L.C., Snyderman, R.: Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different trans-

- ductional mechanisms. *J. Clin. Invest.* 72: 192-200, 1983.
- 17) Wright, S.D., Silverstein, S.C.: Receptor for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* 158: 2016-2023, 1983.
- 18) Shult, P.A., Graziano, F.M., Wallow, I.H., Buuse, W.W.: Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J. Lab. Clin. Med.* 106: 638-645, 1985.
- 19) Huang, C.K., Oshana, S.C.: Partial characterization of protein kinase C and inhibitor activity of protein kinase C in rabbit peritoneal neutrophils. *J. Leukocyte Biology* 39: 671-678, 1986.
- 20) Levine, P.H., Hardin, J.C., Scoon, K.I., Krinsky, N.I.: Effects of Corticosteroids on the production of superoxide and hydrogen peroxide and the appearance of chemiluminescence by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 5: 19-27, 1981.