

〈原著〉

## ミエロペルオキシダーゼに由来する活性酸素による酸化障害

太田 安彦<sup>1)</sup>、秋山 佳織<sup>2)</sup>、徳永 賢治<sup>1)</sup>

### Study of oxidative damage by myeloperoxidase derived reactive oxygen

Yasuhiko Ohta<sup>1)</sup>, Kaoru Akiyama<sup>2)</sup> and Kenji Tokunaga<sup>1)</sup>

**Summary** Neutrophils enhance the production of reactive oxygen as a result of the priming reaction by various cytokines. However, the relationship is still unknown between the priming reaction and releasing of myeloperoxidase (MPO). Furthermore, the oxidized stress disorder has not been fully studied yet.

We examined the activation of neutrophils by various stimulating substances, MPO releasing activity by the priming reaction of TNF- $\alpha$ , and the oxidation disorder from the MPO-derived reactive oxygen.

The study found that priming by TNF- $\alpha$  with f-MLP stimulation enhanced the production of reactive oxygen. The releasing of MPO increased only with f-MLP stimulation, and the priming by TNF- $\alpha$  increased the releasing of MPO even more. The reactive oxygen species derived by the releasing of MPO enhanced the lipoperoxidative reactions and cellular membrane defect.

The above results indicate that MPO-derived reactive oxygen species increase cellular disorder and are related to a clinical condition with oxidized stress.

**Key words:** Myeloperoxidase, Reactive oxygen, Oxidative damage, Tumor necrosis factor- $\alpha$

#### I. 緒言

好中球は生体防御において重要な役割を演じている。病原体の感染に際して、種々の走化因子に反応し内皮細胞上をローリングして強く粘

着後、血管外に遊出し感染巣に到達する。続いて病原体を貪食し、貪食空胞の形成、顆粒及び特殊顆粒が貪食空胞と癒合、脱顆粒により顆粒内のミエロペルオキシダーゼ (MPO)、プロテアーゼなどの成分を放出する。MPOはプロトヘ

<sup>1)</sup>香川県立保健医療大学 臨床検査学科  
761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1

<sup>2)</sup>香川県立中央病院中央検査部  
761-0017 香川県高松市番町5-4-16

受領日 平成23年10月24日

受理日 平成23年11月15日

<sup>1)</sup>Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Science

281-1 Hara, Mure-cho, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan

<sup>2)</sup>Central clinical laboratory, Kagawa Prefectural Central Hospital

5-4-16 Ban-cho, Takamatsu, Kagawa 760-0017, Japan

ムを補欠分子族として含む酵素であり、活性酸素と共同して殺菌作用を発揮する<sup>7)</sup>。しかしながら、好中球の過剰な反応による活性酸素の産生は、細胞や組織の障害を惹き起こし種々の病態に関連することが推測される。

最近、血管炎での血清MPO活性の高値<sup>8)</sup>、動脈硬化病巣でのクロロチロシンの検出<sup>9)</sup>が報告されている。また、高率に血管炎を誘発する冠状動脈炎マウスでは、活性化好中球の存在<sup>9)</sup>、動脈硬化巣の変性脂肪が確認されている<sup>9)</sup>。これらの病態において好中球活性化によるMPO放出反応、さらに放出されたMPOによる病態への関与については不明の点が多い。一方、好中球は種々のサイトカインによるプライミング反応により活性酸素の産生が亢進することが知られている。このプライミング反応とMPO放出の関連性については不明である。さらに、MPO由来の活性酸素種による酸化ストレス障害については十分に研究されていない。そこで、各種刺激物質による好中球活性化に伴うMPOの放出反応、TNF- $\alpha$ によるプライミングに対するMPO放出活性、さらにMPO由来活性酸素による酸化障害について検討したので報告する。

## II. 方法

### 1. 好中球活性化により生成する活性酸素種の測定

各種刺激物質 (formil-methionyl-leucyl-phenylalanine: fMLP、phorbol myristate acetate: PMA、opsonized zymosan: OZ) により好中球を活性化して、生成する活性酸素を測定した。発光試薬として、8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido (3,4-d) pyrodazine-1,4 (2H, 3H) dione (L-012 和光純薬) を用い、測定装置はルミネッセンサーPSN (アトー社) で発光強度を測定した。

#### 1) 試薬

L-012は50 mmol/l Tris-HCl緩衝液pH7.5で500  $\mu$  mol/lに溶解した。Ca<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液は常法に従い、0.1 mol/lリン酸緩衝液 (pH7.4) 21容、0.15 mol/l NaCl 100容、0.154 mol/l KCl 4容、0.154 mol/l MgCl<sub>2</sub> 1容の割合で混合し、使用前に調整した。

刺激物質の調整は、PMA、fMLPともにエタノールで10 mmol/lに溶解し、使用時に0.5%エタ

ノールCa<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液を用いて、0.2 mmol/l PMA、0.2 mmol/l fMLPを作成した。OZはザイモザン (シグマ) 4 mgを1 mlの20 mmol/lベルナル緩衝液 (pH7.4) に懸濁し、100分間加熱沸騰させた。その後、室温で冷却し、1,900 $\times$ g、10分間遠心、沈殿ザイモザンにヒト新鮮ブルー血清1 mlの割合で加え、37 $^{\circ}$ C、30分間反応させた後、1,900 $\times$ g、10分間遠心し上清を除き、次にCa<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液で2回洗浄し、OZが20 mg/mlになるようにCa<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液を加えた。

発光試薬L-012は、精製水で10 mmol/lに溶解したものを使用した。

#### 2) 試料

Mono-Polyを用いたヒト末梢好中球の分離法  
プラスチック試験管にモノポリ分離剤3 mlを分注し、ヘパリン採血管に採血した全血3.5 mlを重層した。次いで400 $\times$ g、20分間遠後、血漿をパスツールピペットで除き、フラクション2 (好中球) を別の試験管に移した。試験管にCa<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液5 mlを加えて混和し、400 $\times$ g、5分間遠心後、上清をアスピレータで除いた。次いでCa<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液5 mlを加え、400 $\times$ g、5分間遠心した。赤血球が多い場合、次の操作を行った。0.033 mol/l NaCl溶液を5 ml加え混和、30秒後に0.27 mol/l NaCl溶液を5 ml加え混和し、400 $\times$ g、5分遠心する。上清を除きCa<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液を2.5 ml加え、150 $\times$ g、5分遠心後、アスピレータで上清を除き、Ca<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液を加え、好中球液を作成した。

#### 3) 測定方法

試験管にKRP緩衝液195  $\mu$  l、発光試薬20  $\mu$  l、グルコース5  $\mu$  l、好中球20  $\mu$  lを加え混和後、37 $^{\circ}$ C、3分間インキュベーションし、刺激物質10  $\mu$  l、KRP緩衝液25  $\mu$  lを添加して反応を開始した。

### 2. 好中球MPO放出反応

好中球は貪食反応により、リソソームが食胞と融合してファゴリソソームを形成し、リソソームは細胞膜そのものとも融合して内容を外部に放出する。その際にMPOが放出される。このMPO放出反応について、刺激物質による好中球活性化反応、TNF- $\alpha$ によるプライミング反応におけるMPO放出の動態について検討した。

1) 試薬

TNF- $\alpha$  (シグマ) はCa<sup>2+</sup>-free KRP緩衝液で10 ng/mlに調整した。MPOは日本老化制御研究所の血清MPO測定キットにより測定した。

2) 測定方法

刺激物質によるMPO放出反応は、活性酸素測定と同様に試薬と好中球を加え、各刺激物質を添加後、37°Cで15分間反応させ、直ちに氷水中に静置して反応を停止させ、1,500×g、10分間遠心後、上清のMPOをELISA法で測定した。

TNF- $\alpha$ によるMPO放出反応はTNF- $\alpha$ で37°C、10分間処理後、刺激物質で活性化を行った。反応停止後、同様に処理をしてMPOを測定した。

3. MPO由来HOClによる酸化障害

MPO反応により生成するHOClの酸化障害を証明するため、リノール酸を用いて脂質過酸化反応について検討した。酵素反応による活性酸素産生系として、MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl系、好中球由来の活性酸素は刺激物質により活性化した。比較対照としてXOD-ヒポキサンチン系に由来するO<sup>2</sup>および2,2-azobis ( $\alpha$ -amidinopropan) hydrochloride (AAPH)ラジカルを用いた。また細胞障害については、好中球活性化による活性酸素による赤血球膜の脂質過酸化とそれに伴う膜障害について、溶血を指標として測定した。

1) 試薬

リノール酸は50 mmol/lリン酸緩衝液pH7.1 (ツイーン20, 1.2%) で5.5 mmol/l溶解し、超音波処理でミセル化した。25 mmol/lヒポキサンチン溶液を作成し、使用時にEDTA 50 mmol/lリン酸緩衝液pH7.1 (EDTA 0.05 mmol/l) で5倍希釈し、5 mmol/lヒポキサンチン溶液に調整した。0.72 U/l XOD、400 U/l MPOは50 mmol/lリン酸緩衝液pH7.1で調整した。また、24 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、4 mmol/l FeCl<sub>3</sub>、50 mmol/l AAPH 0.2 mlを作成した。過酸化脂質測定はLPO-586分析キット (フナコシ) を用いた。

2) 測定方法

① 脂質過酸化反応

MPO反応に由来するHOClによる過酸化反応は、ミセル化リノール酸1.8 mlに24 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ l、4 mol/l NaCl 50  $\mu$ l、400 U/l MPO 50  $\mu$ l、4 mmol/l FeCl<sub>3</sub> 50  $\mu$ lを加えた。同様にXOD系は、ミセル化リノール酸1.8 mlに5 mmol/lヒポキサン

チン溶液50  $\mu$ l、0.72U/l XOD 50  $\mu$ l、4 mmol/l FeCl<sub>3</sub> 50  $\mu$ l、リン酸緩衝液50  $\mu$ lを加えた。AAPH系はミセル化リノール酸1.8 mlに50 mmol/l AAPH 0.2 mlを加えた。また、対照としてミセル化リノール酸1.8 mlに生食0.2 mlを加えた。これらを37°C、遮光の状態での反応させ、経時的に共役ジエンを測定、過酸化脂質を測定した。

好中球による活性化については、ミセル化リノール酸1.8 mlにグルコース20  $\mu$ l、好中球50  $\mu$ l、FeCl<sub>3</sub> 20  $\mu$ l、KRP緩衝液10  $\mu$ l、PMA 10  $\mu$ lを加えた。また、NaN<sub>3</sub>阻害反応はミセル化リノール酸1.8 mlにグルコース20  $\mu$ l、好中球50  $\mu$ l、FeCl<sub>3</sub> 20  $\mu$ l、NaN<sub>3</sub> 10  $\mu$ l、PMA 10  $\mu$ lを加えた。PMA添加により反応を開始させた。対照としてミセル化リノール酸1.9 mlにグルコース20  $\mu$ l、好中球50  $\mu$ l、KRP緩衝液40  $\mu$ lを加えた。それぞれ、37°C遮光で反応させ、経時的に共役ジエン、過酸化脂質を測定した。

② 赤血球膜障害

試料は、ヘパリン採血した血液を10倍容量の冷生理食塩水で3回洗浄、最後に1,000×g、10分間遠心し、Buff coatを除去してpacked赤血球を得た。赤血球をKRP緩衝液で希釈し、20%赤血球浮遊液を試料とした。

赤血球浮遊液1.8 mlにグルコース20  $\mu$ l、好中球50  $\mu$ l、FeCl<sub>3</sub> 20  $\mu$ l、KRP緩衝液10  $\mu$ lを加え混和後、PMA10  $\mu$ lを添加して反応を開始した。37°C、3時間インキュベーション後、反応液の一部を採り、20倍に希釈し3,000 rpmで10分間遠心後、その上清画分の吸光度 (a) を540 nmで測定する。同時に生理食塩水のかわりに蒸留水を加えて同様の操作を行い、完全溶血サンプルの吸光度をbとする。溶血率 (%) をa/b×100で算出した。

TNF- $\alpha$  プライミングによる、好中球活性化に伴う酸化障害については、TNF- $\alpha$ による前処理後fMLPの再刺激で生成する活性酸素による細胞膜障害を同様に測定した。

Ⅲ. 結果

1. TNF- $\alpha$ によるプライミング反応に対する活性酸素産生

末梢血中において、好中球の活性化は抑制されているが、一旦サイトカインやエンドトキシ

ンで処理した後、再刺激を与えることにより活性化反応が増強することが知られており、これはプライミング現象と呼ばれている。そこでTNF- $\alpha$ を用いて、プライミング反応における活性酸素産生能について検討した。

TNF- $\alpha$ の濃度とインキュベーション時間について、0~500 ng/mlを用いて、0~20分間のインキュベーションについて調べた。結果は10 ng/mlおよび、10分間以上で活性酸素産生量の低下が認められ、10 ng/ml、10分間を至適条件とした。この条件でTNF- $\alpha$ によるプライミング後、各刺激物質による好中球活性化はFig. 1に示した。fMLP刺激が最も活性化され、次いでOZであった。PMAについては、逆にTNF- $\alpha$ により抑制される結果が得られた。

2. TNF- $\alpha$ によるプライミング反応に対するMPO放出反応

好中球活性化に伴うMPO放出は、Fig. 2のごとくfMLP刺激のみで放出が認められた。さらにプライミングにより有意差はないが、MPOの放出が亢進した。これは好中球活性化により活性酸素の産生と、MPOを放出することを示している。

3. 活性酸素による酸化障害

好中球活性化により活性酸素産生とMPO放出が確認されたので、酸化障害について脂質過酸化反応および細胞膜障害を検討した。

1) リノール酸の酸化障害

MPO由来HOCl、XOD反応で生成するO<sup>2</sup>およびAAPHラジカルによりリノール酸の過酸化反

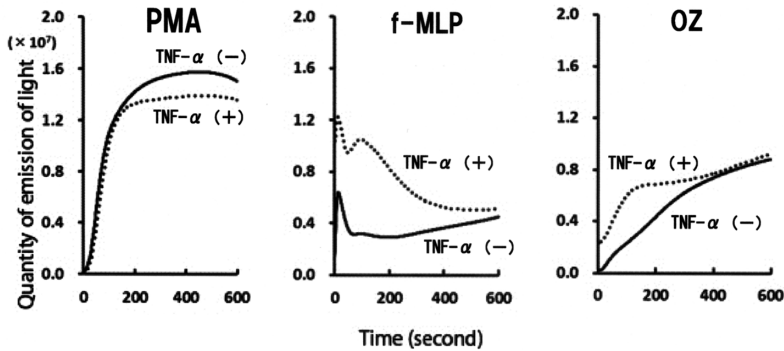


Fig. 1 Production of reactive oxygen as a result of priming reaction by TNF- $\alpha$ .

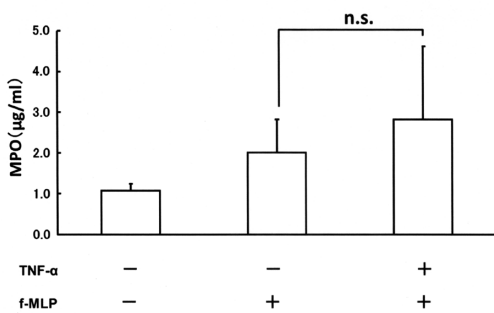


Fig. 2 Releasing of MPO as a result of priming reaction by TNF- $\alpha$ .

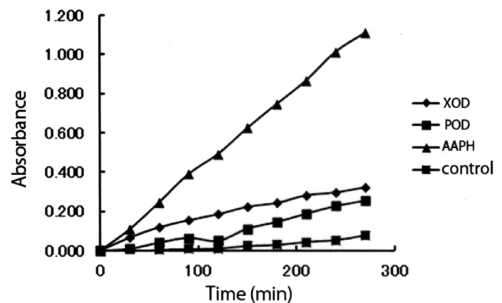


Fig. 3 Oxidation disorder of linoleic acid caused by reactive oxygen.

応で生成する共役ジエンを測定した。Fig. 3に示すように、MPO、XOD系で生成するHOCl、 $O_2^-$ による過酸化反応はAAPHラジカルに比して弱い結果であった。しかしながら、過酸化反応の進行を示した。

2) 好中球活性化によるリノール酸の過酸化反応  
好中球をPMAで刺激して産生する活性酸素による過酸化反応を検討した。経時的に共役ジ

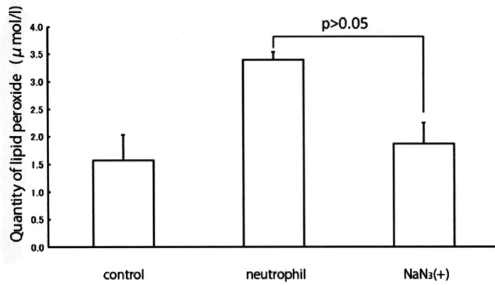


Fig. 4 Peroxidation reaction of linoleic acid caused by neutrophil activation.

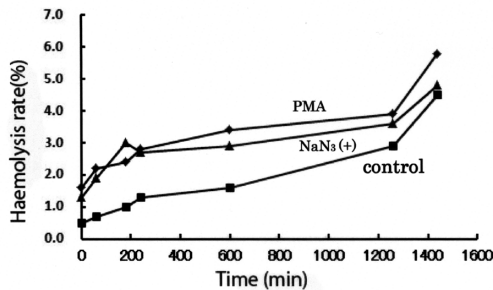


Fig. 5 Cellular disorder caused by neutrophil activation.

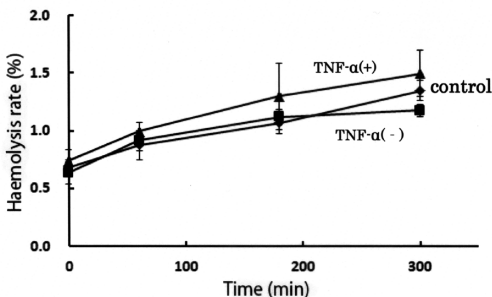


Fig. 6 Impact of TNF- $\alpha$  on the red blood cellular disorder caused by neutrophil activation.

ンが増加し、またTBA法による過酸化脂質の上昇が認められた。これらの反応はいずれもNaN<sub>3</sub>で有意に阻害された (Fig. 4)。

3) 好中球活性化による細胞傷害

好中球活性化に伴う活性酸素による脂質過酸化と細胞膜障害について、赤血球を用い溶血を指標として検討した。PMA添加試料では未添加の対照と比較してわずかに溶血率が増加し、NaN<sub>3</sub>で阻害された (Fig. 5)。また、この障害は、TNF- $\alpha$ によるプライミングにより溶血率の上昇が認められた (Fig. 6)。

#### IV. 考察

従来、好中球由来活性酸素による酸化障害は、NADPH酸化酵素により生成した $O_2^-$ が測定対象にされてきた。しかしながら $O_2^-$ は活性酸素としての酸化反応は弱く、細胞膜の脂質から過酸化の開始反応である水素の引き抜きは出来ない。一方、好中球の貪食反応により放出されるMPOは、 $H_2O_2$ と塩素イオンを基質にしてHOClを生成する。HOClは生体防御機構である、酸素依存性殺菌作用としての役割を果たしている。

最近、好中球がサイトカインによりプライミングされると、再刺激により活性酸素産生が増強することが報告されている。しかしながら、プライミング反応とMPO放出については不明である。一方、MPO放出に伴うHOClの過剰な産生は、酸化障害により各種病態に関連することが考えられる。したがってMPOの放出は、活性酸素による酸化ストレス障害の解明に重要である。

本研究では、TNF- $\alpha$ によるプライミングに伴うNADPH酸化酵素の活性化による活性酸素の産生、MPO放出反応、MPOに由来する活性酸素の酸化障害への関連性を調べ、MPOによる酸化ストレス障害を明らかにするのが目的である。

そこで、好中球をあらかじめTNF- $\alpha$ で前処理して、プライミング後、刺激物質で再刺激し生成する活性酸素を測定した。用いた刺激物質、PMA、fMLP、OZの中でfMLPは最も活性酸素産生能が増加した。この刺激物質による差は、TNF- $\alpha$ によるプライミングの刺激伝達と刺激物質のNADPH酸化酵素に対する活性化の刺激伝達経路が異なることが考えられる。

次に、TNF- $\alpha$ によるMPO放出反応について検討した。fMLP単独の刺激によりMPO放出が増加し、さらに、TNF- $\alpha$ の前処理によりMPO放出は増加した。MPOの放出は貪食が引き金となることが認められているが、今回、刺激物質による刺激のみでMPO放出を確認した。刺激物質に対する反応について、Hoshinoら<sup>10)</sup>はfMLP刺激でMPO分子が細胞表面に表出することを報告している。その結果、MPOが細胞外に放出されたと推測される。

これらの結果より、プライミング反応がNADPH酸化酵素による活性酸素生成とMPO放出の両者に作用することが確認された。TNF- $\alpha$ によるプライミング作用は、チロシンキナーゼ阻害剤で抑制される<sup>11)</sup>ことから膜受容体を介する活性化機構に関連することが示唆される。MPO放出との関連性については、どのようなシグナル伝達を経て放出されるのか刺激伝達系を含め今後の研究が必要である。

好中球活性化によるMPO放出と活性酸素の産生が確認されたので、次にMPOの酸化障害について、リノール酸の脂質過酸化反応を検討した。まず、MPO、XOD反応およびAAPHラジカルによるリノール酸の過酸化反応として共役ジェンを測定した。AAPHラジカルに比して、MPO、XOD系で生成するHOCl、O<sup>2-</sup>はリノール酸に対する過酸化反応が低いものの過酸化反応は上昇し、TBA法による過酸化脂質値も同様の結果を示しMPO反応により脂質過酸化を認めた。次に、好中球由来の活性酸素による障害について、刺激物質による活性化、プライミングによる酸化障害について検討した。まず、好中球をPMAで刺激してリノール酸の過酸化反応を検討した。好中球の活性化にともなう活性酸素により経時的に共役ジェンの増加が認められ、過酸化脂質値も上昇した。この反応はNaN<sub>3</sub>により抑制された。これらの結果は、好中球活性化により放出されたMPO由来HOClによる過酸化反応が生じていることを示している。この点について、HOCl<sup>12)</sup>および好中球活性化<sup>13)</sup>によるタンパク質の修飾、MPOノックアウトマウスの炎症モデルで酸化ストレスマーカーの減少<sup>14)</sup>が報告されている。

プライミング反応によるMPO放出にともなう細胞障害については、わずかに溶血が上昇した。

今回、用いた赤血球は健常人であるため、抗酸化作用により障害の程度が低い結果であると考えられる。MPO由来活性酸素による細胞膜障害については、好中球活性化により赤血球細胞膜を障害し、溶血の上昇が観察された。この赤血球細胞膜障害について、Margretら<sup>15)</sup>のHOClを用いた研究で、HOClが細胞膜を通過しGSHの酸化を惹き起こし、溶血することが報告されている。本研究においても好中球MPO由来HOClが溶血を惹き起こしたと考えられる。また、小林ら<sup>16)</sup>は、雑種犬を用いて、再灌流障害においてフリーラジカルが赤血球の流動性を低下させ、形態に変化を及ぼすことを報告している。さらに、末梢血中でのMPOの反応についてZhangら<sup>17)</sup>が、MPOは抗酸化物質の多い血液中でLDL酸化を惹き起こす能力があることを報告した。また、MPO由来のHOClと血漿タンパクの酸化障害マーカーとしてAdvanced oxidation protein products (AOPP) の検出が報告されている<sup>18)</sup>。以上の結果は、好中球の過剰な活性化により生成する活性酸素、さらに放出されたMPO由来のHOClは酸化ストレス障害として脂質過酸化反応を増幅させて、細胞傷害を惹起することを示唆する。

放出されたMPOと病態との関連性についてヒト冠状動脈硬化巣の凍結切片を用いた免疫組織化学的解析を行った結果、急性冠症候群を発症した不安定プラーク部位に好中球の浸潤が高度に認められている<sup>19)</sup>。一方、末梢血中のプライミングされた好中球の存在として、炎症疾患であるRA患者において、静止期の状態で健常者よりも活性化されていることが確認されている<sup>20)</sup>。最近、好中球機能異常症の新しい病態としてSIRS (Systemic inflammatory response syndrome: 全身性炎症反応症候群) では、高サイトカイン血症により好中球がプライミングされており、もう一度刺激をうけることにより強く活性化し、活性酸素、プロテアーゼを放出し、生体臓器の破壊を生じることが提唱されている<sup>21)</sup>。本研究から、これらの病態の把握には血中MPO、好中球活性酸素産生能の測定が重要であることが示唆された。

## V. 結語

好中球活性化、TNF- $\alpha$ によるプライミングに

伴う活性酸素の産生、MPO放出反応、MPOに由来する活性酸素の酸化障害への関連性を調べた。刺激物質による活性化によりMPOの放出が認められ、さらに、プライミング反応はMPO放出を増強した。これらの反応による活性酸素は、細胞障害を亢進し酸化ストレスによる病態に関連することが考えられた。

文献

- 1) Kiryu C, Makiuchi M, Miyazaki J, Fujinaga T, Kakinuma K: Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-chloride system. *Fed Eur Biochem Soc*, 443: 154-158, 1999.
- 2) Holtschke T, Löhler J, Kanno Y, Fehr T, Gies N, Rosenbauer F, Lou J: Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP Gene. *Cell*, 87: 307-317, 1996.
- 3) Hanzan SL, Crowley JR, Mueller DM, Henecke JW: Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive and specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. *Free Radic Biol Med*, 23: 909-916, 1997.
- 4) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Maeda N, Koyama H: Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Disease*, 182: 1276-1279, 2000.
- 5) Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Vimani R, Heinecke JW, Libby P: Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implication in acute coronary syndromes. *Am J Pathol*, 158: 879-891, 2001.
- 6) Hoshino A, Nagao N, Ito-Ihara T: Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in murine systemic vasculitis and glomerulonephritis model mice. *Microbiol Immunol*, 51: 551-566, 2007.
- 7) Utsumi T, Klostergaard J, Akimura K, Edashige K, Sato EF, Utumi K: Modulation of TNF- $\alpha$ -priming and stimulation-dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors. *Arch Biochem Biophys*, 294: 271-278, 1992.
- 8) Fu S, Wang H, Davies M, Dean R: Reactions of hypochlorous acid with tyrosine and peptidyl-tyrosyl residues give dichlorinated and aldehydic products in addition to 3-chlorotyrosine. *J Biol Chem*, 275: 10851-10858, 2000.
- 9) Masuda M, Suzuki T, Friesen MD, Ravanat JL, Cadet J, Pignatelli B, Nishino H, Ohshima H: Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils. *J Biol Chem*, 276: 40486-40496, 2001.
- 10) Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda C, Hazen SL: Myeloperoxidase function as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem*, 277: 46116-46122, 2002.
- 11) Vissers MCM, Winterbourn CC: Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. *Biochem J*, 307: 57-62, 1995.
- 12) 小林 明, 渡辺裕司, 小沢一仁, 宮田晴夫, 林 秀晴, 山崎 昇: フリーラジカルの再灌流障害発症機序について. *脈管学*, 30: 89-92, 1990.
- 13) Zhang R, Shen Z, Nauseef WM, Hazen SL: Defects in leukocyte-mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subject: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood*, 99: 1802-1810, 2002.
- 14) Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Druke T, Santangelo F, Descamps-Latscha B: AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: Apotential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int*, 64: 82-91, 2003.
- 15) Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, Komatsu R, Ikura Y, Ogami M, Shimada Y, Ehara S, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Beckeret AE: Neutrophil Infiltration of Culprit Lesions in Acute Coronary Syndromes. *Circulation*, 106: 2894-2900, 2000.
- 16) 徳永賢治, 土居 修, 宍野宏治, 村瀬光春, 武内 望, 篠原力雄, 石黒伊三雄: 慢性関節リウマチにおける活性酸素産生能の検討. *臨床化学*, 18: 196-200, 1989.
- 17) 小川道雄: サイトカインによる好中球の活性化と臓器障害. *医学のあゆみ*, 169: 845-849, 1994.