

Original Article

Salazosulphapyridine, Predonizolone の好中球機能に及ぼす影響と Sodium ferrous citrate との併用効果についての検討

秦 政輝^{1,*}, 華 見²⁾, 北村大介¹⁾, 前多 力¹⁾, 瀧田尚仁¹⁾, 北島政幸¹⁾, 坂本一博¹⁾, 落合 匠³⁾, 鎌野俊紀¹⁾, 長岡 功²⁾

¹⁾順天堂大学医学部下部消化管外科, ²⁾同 生化学・生体防御学

³⁾(財)東京都保健医療公社東部地域病院外科

*連絡先: 秦 政輝, 〒113-8431 東京都文京区本郷2-1-1, 順天堂大学下部消化管外科. Tel: 03-3813-3111 (大代表), e-mail: masaki-h@est.hi-ho.ne.jp

Evaluation of the combined effects of salazosulphapyridine, predonizolone and sodium ferrous citrate on neutrophil functions

INTRODUCTION: We previously investigated the effects of sodium ferrous citrate (SFC) on neutrophils *in vitro*, and revealed that SFC inhibited neutrophil functions such as superoxide production and chemotaxis. Salazosulphapyridine (SASP) and predonizolone (PSL) are widely used for treatment of ulcerative colitis (UC). In this study, we evaluated the actions of SASP or PSL on the functions of neutrophils. Moreover, we evaluated the combined effects of SASP or PSL and SFC on neutrophil functions.

METHODS: Neutrophils were incubated with SASP or PSL in the absence or presence of SFC. For determination of superoxide production, neutrophils were further stimulated with phorbol myristate acetate (PMA), complement-opsonized zymosan (OPZ) or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). The superoxide production was measured on the basis of superoxide dismutase-inhibitable cytochrome c. Neutrophil migration was measured by a Boyden chamber assay using zymosan-activated serum (C5a) as a chemotactic factor. To examine the expression of CD11b and CD62L, neutrophils were stimulated with fMLP, and then incubated with phycoerythrin-labeled anti-CD11b and FITC-labeled anti-CD62L monoclonal antibodies, and the expression of CD11b and CD62L were analyzed by flow cytometry.

RESULTS: SASP dose-dependently inhibited the superoxide production induced by all stimuli examined, whereas, PSL did not affect the superoxide production. SASP and PSL inhibited chemotaxis toward C5a in a dose-dependent fashion. Furthermore, SASP and PSL inhibited the fMLP-induced up-regulation of CD11b and down-regulation of CD62L. Interestingly, the combinations of the SASP or PSL and SFC exerted the strong inhibitory actions on the superoxide production and neutrophil migration compared with SASP and PSL alone.

CONCLUSIONS: The present observations suggest that the combined administration of SASP or PSL with SFC may have a potential to reduce mucosal injury by suppressing neutrophil functions in UC.

Rec.10/11/2006, Acc.12/4/2006, pp53-58

Masaki Hata^{1,*}, Jian Hua²⁾, Daisuke Kitamura¹⁾, Tutomu Maeda¹⁾, Naohito Takita¹⁾, Masayuki Kitajima¹⁾, Kazuhiro Sakamoto¹⁾, Takumi Ochiai³⁾, Toshiki Kamano¹⁾ and Isao Nagaoka²⁾

¹⁾Department of Coloproctological Surgery, ²⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

³⁾Department of Surgery, Tobu Chii Hospital, Tokyo Metropolitan Health and Medical Treatment Corporation, Tokyo, Japan

Key words Salazosulphapyridine (SASP), Predonizolone (PSL), Sodium ferrous citrate (SFC), neutrophil function, Ulcerative Colitis

緒言

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis; UC) は大腸粘膜を侵し、しばしばびらんや潰瘍を形成する非特異性炎症性腸疾患である。その成因については細菌や化学物質などの外的因子、免疫機構の異常などが関与すると考えられているが、未だに明確な成因については解明されていない。また、好中球から放出される活性酸素が腸管粘膜の組織障害に関与しているとも言われている¹⁾。

現在 UC の治療においては Mesalazine, Salazosulphapyridine (SASP), Predonizolone (PSL) が治療薬の中心になっているが、実際の臨床現場では、慢性出血、吸収障害および慢性炎症のために鉄欠乏性貧血を来し、鉄剤と上記の UC 治療薬とが併用される症例も見受けられる。われわれは、以前クエン酸第一鉄 (Sodium ferrous citrate; SFC) の好中球機能に対する影響について検討し、SFC が活性酸素生成能、遊走能などの好中球機能を抑制することにより抗炎症効果を発揮することを明らかにした²⁾。さらに、SFC と Mesalazine との併用効果についても検討し、Mesalazine と相加的に活性酸素生成能、遊走能などの好中球機能を抑制することもわかった³⁾。

そこで今回われわれは、*in vitro*において、SASP, PSL による好中球の活性酸素産生、遊走、接着分子の発現などの機能に及ぼす影響を検討し、また SFC との併用効果についても合わせて検討した。

方法

1) 試薬

Sodium ferrous citrate (エーザイ) は 0.025N HCl に溶解し使用した。Salazosulphapyridine (三菱ウェルファーマーファイザー) は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し使用した。Predonizolone (シオノギ) はエタノールで溶解し使用した。ferricytochrome c, phorbol myristate scetate (PMA), zymosan A, N-formyl-menthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), superoxide dismutase (SOD) はすべて Sigma から購入した。

2) 好中球の単離

インフォームドコンセントにて同意を得られた健康人から静脈採取した血液をヘパリンで抗凝固し、Polymorphprep™ (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) にて好中球を単離した。さらに、低張処理にて混入している赤血球を除去し、phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) で洗浄し、2 × 10⁷ cells/ml に調整した。単離した好中球を May/Grünwald/Giemsa を染色して、純度を算定したところ、98% 以上の細胞が好中球であることがわかった。

3) 好中球活性酸素生成能の測定

好中球懸濁液 (1 × 10⁶/ml) に SASP あるいは PSL を 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM となるように加え、また SASP 非添加群には溶媒である 0.1% DMSO を、PSL 非添加群には溶媒である 0.1% エタノールを加えた。さらに SFC 併用では、それぞれに SFC を 5 μg/ml となるように添加した。そして、37℃, 10 分間保温した後、PMA (250 ng/ml), opsonized zymosan (OPZ; 好中球との比率が 1:12) あるいは fMLP (最終濃度 1.0 × 10⁻⁶M) で好中球を刺激した。産生された活性酸素を cytochrome c 還元法 (spectrophotometer を用いて 550 nm における吸光度を測定し、ferricytochrome c の還元量から産生されたスーパーオキシドを算出する) にて測定し nmol/min/10⁷ cells の単位として表した。なお、スーパーオキシド生成量は無刺激群との差で表した。

OPZ は zymosan A (8 mg/ml) とヒト血清を 37℃, 30 分間反応させ、zymosan 顆粒を PBS で洗浄して調製した。

4) 好中球遊走能測定

遊走因子として補体因子 C5a を用い Boyden chamber 法により遊走距離を測定した。

Boyden chamber は 3 μm の millipore filter で分画された上下 2 つ個室を持つ遊走測定装置である。下室には遊走因子として C5a を含む zymosan activated serum を加えた。また、上室には、好中球懸濁液 (3.3 × 10⁶/ml) を 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM SASP あるいは PSL を SFC (1 μg/ml) の存在下または非存在下で 37℃, 20 分間保温したものを加えた。そして、37℃, 20 分間保温した後、フィルターを固定、染色し、好中球が遊走した距離を 1 フィルターあたり 20 視野測定し、平均値を遊走距離とした。

Zymosan activated serum は zymosan A (8 mg/ml) とヒト血清を 37℃, 30 分間反応させ作製した。

5) 好中球の接着分子発現の測定

ヒト全血 100 μl に SASP あるいは PSL を 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM となるように加え、また SASP を加えない Control には溶媒である 0.1% DMSO を、PSL を加えない Control には溶媒である 0.1% エタノールを添加した。そして 20 分間、37℃ 保温した後、fMLP (最終濃度 10⁻⁷M) で 15 分間、37℃ 刺激した。活性化された好中球に Phycoerythrin で標識した抗 CD11b 抗体 (eBioscience) と FITC で標識した抗 CD62L 抗体 (eBioscience) を 30 分間、氷中で反応させ、フローサイトメトリー (FACSscan, Becton Dickinson) で蛍光強度を測定した。データは Cell Quest software (Becton Dickinson) で分析し、CD11b および CD62L の発現量を mean fluorescence intensity (MFI) で比較検討した。

6) 統計処理

得られた結果は、mean ± SD で示した。ANOVA を用い検定した後、必要に応じて Dunnett's multiple range test を用い、*p* < 0.05 以下を有意差ありと判定した。

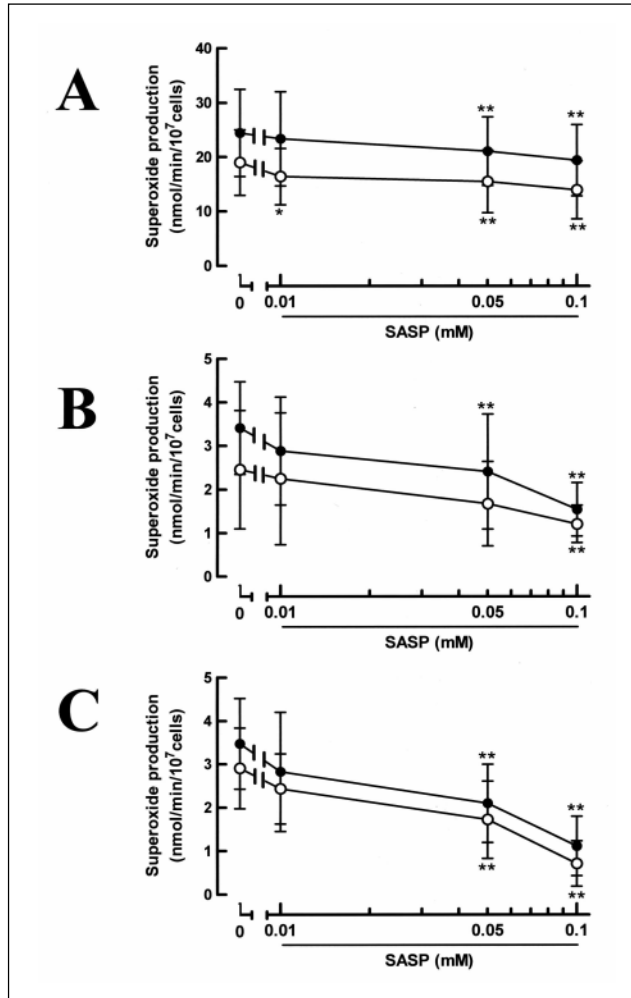


図1 好中球の活性酸素産生に対するSASPとSFCの影響

好中球にPMA (A; n=9), OPZ(B; n=6), fMLP(C; n=10) を作用させ, SASP 単独投与群 (●) と SFC 併用群 (○; 5 μ g/ml) のスーパーオキシド産生に及ぼす影響を検討した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

結 果

1)好中球活性酸素生成能測定

i)SASP 投与によるスーパーオキシド生成能への影響

PMA 刺激において, 単独群, SFC (5 μ g/ml) 併用群では SASP がそれぞれ 0.05 mM, 0.01 mM より高濃度でスーパーオキシド生成を有意に抑制した ($p < 0.05$) (図 1A).

OPZ 刺激において, 単独群では SASP が 0.05 mM より高濃度でスーパーオキシド生成を有意に抑制した ($p < 0.01$). また, SFC 併用群でも SASP が 0.1 mM でスーパーオキシド生成を有意に抑制した ($p < 0.01$) (図 1B).

fMLP 刺激において, 単独群, SFC 併用群の両群で SASP が 0.05 mM より高濃度でスーパーオキシド生成を有意に抑

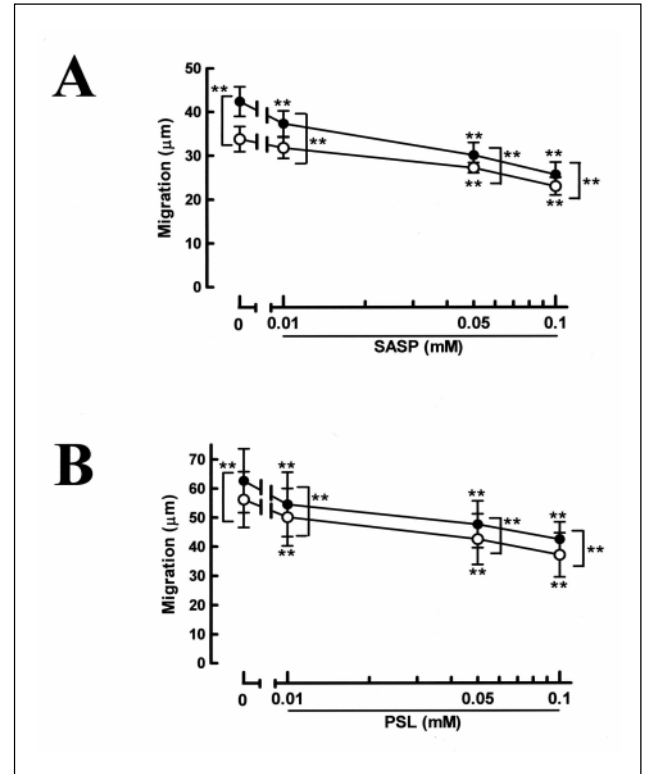


図2 好中球の遊走能に及ぼすSASP, PSLとSFCの影響
補体成分である C5a を遊走因子として用い, 好中球の遊走能に及ぼす SASP (A; n=4) および PSL (B; n=5) の影響を検討した. SASP あるいは PSL の単独群 (●), SFC 併用群 (○; 1 μ g/ml). ** $p < 0.01$.

制した ($p < 0.01$) (図 1C).

また, すべての刺激において, 単独群, SFC 併用群の間には SFC によりスーパーオキシド生成は抑制される傾向にあったが, 有意な差を認めなかった.

ii)PSL 投与によるスーパーオキシド生成能への影響

PMA, OPZ, fMLP いずれの刺激においても, 単独群, SFC 併用群の両群で, PSL のスーパーオキシド生成への影響は認められなかった (data not shown).

2)好中球遊走能の測定

i)SASP 投与による遊走能への影響

SASP は単独群, SFC 併用群のいずれにおいても濃度依存的に好中球の遊走能を抑制する傾向にあり, それぞれ 0.01 mM, 0.05 mM より高濃度で有意に遊走能を抑制した ($p < 0.01$). また, SFC との併用により, さらに遊走能は抑制され, 単独群, SFC 併用群の間には有意な差が認められた ($p < 0.01$) (図 2A).

ii)PSL 投与による遊走能への影響

PSL は単独群, SFC 併用群のいずれにおいても濃度依存

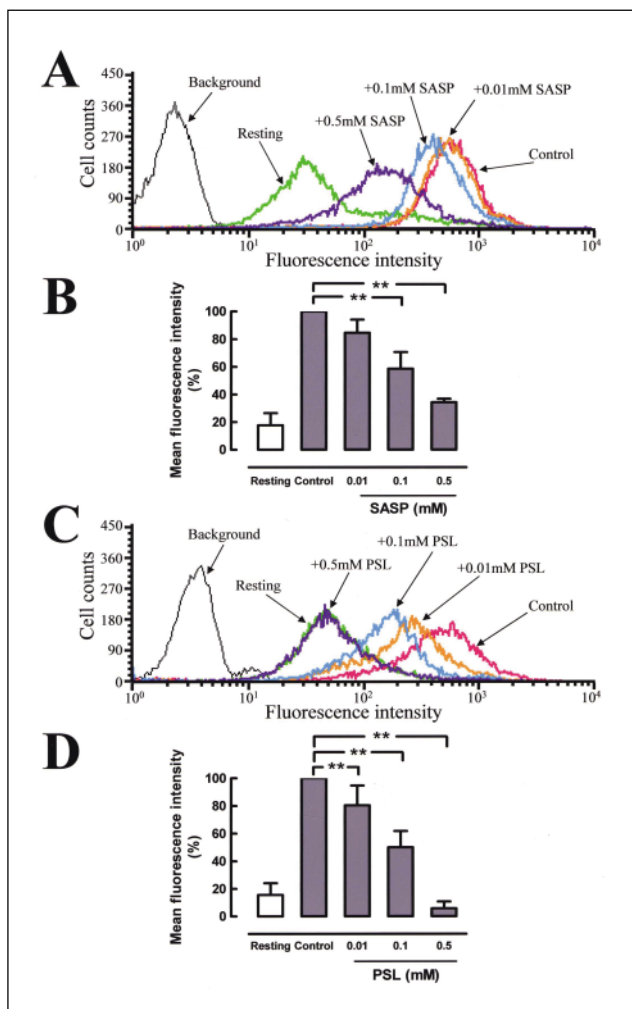


図3 接着分子CD11bの発現に及ぼすSASP, PSLの影響

好中球を fMLP で刺激した際にみられる接着分子 CD11b の発現増強に及ぼす SASP (A,B), PSL (C,D) の影響を蛍光標識した抗 CD11b 抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。Control は SASP の溶媒である 0.1% DMSO, もしくは PSL の溶媒であるエタノールを加えたものを示す。Resting は fMLP を加えないものを示す。データは代表例を A, C に示し, Control を 100% とし, mean $\pm$ SD を B (n=9), D (n=8) に示す。** $p < 0.01$ 。

的に好中球の遊走能を抑制する傾向にあり, 0.01 mM より高濃度で有意に遊走能を抑制した ($p < 0.01$)。また, SFC との併用により, さらに遊走能は抑制され, 単独群, SFC 併用群の間には有意な差が認められた ($p < 0.01$) (図 2B)。

3) 好中球の接着分子発現の測定

i) 接着分子 CD11b の発現への影響

SASP は 0.1 mM で fMLP 刺激による CD11b の発現増強を有意に抑制した ($p < 0.01$) (図 3A,B)。また, PSL は 0.01

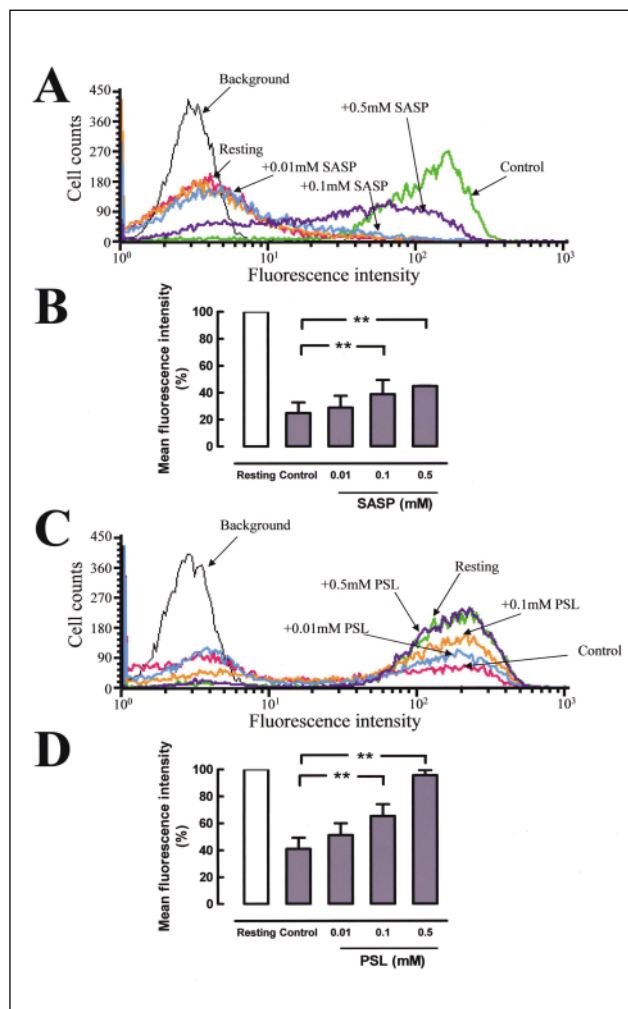


図4 接着分子CD62Lの発現に及ぼすSASP, PSLの影響

好中球を fMLP で刺激した際にみられる接着分子 CD62L の down regulation に及ぼす SASP (A,B), PSL (C,D) の影響を蛍光標識した抗 CD62L 抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。Control は SASP の溶媒である 0.1% DMSO, もしくは PSL の溶媒であるエタノールを加えたものを示す。Resting は fMLP を加えないものを示す。データは代表例を A, C に示し, Resting を 100% とし, mean $\pm$ SD を B (n=8), D (n=5) に示す。** $p < 0.01$ 。

mM 以上で fMLP 刺激による CD11b の発現増強を有意に抑制した ($p < 0.01$) (図 3C,D)。

ii) 接着分子 CD62L の発現への影響

SASP は 0.1 mM 以上で fMLP 刺激による CD62L の down regulation を有意に抑制した ($p < 0.01$) (図 4A,B)。また, PSL は 0.1 mM 以上で fMLP 刺激による CD62L の down regulation を有意に抑制した ($p < 0.01$) (図 4C,D)。

考 察

UCは非特異性炎症性腸疾患であり、その発症に大腸の局所防御機構が破綻した結果起こる炎症反応が関与するといわれている。炎症の中心的な役割を果たす好中球は、炎症の際に内皮細胞の間隙を通り炎症部位へ遊走し、炎症部位において異物を貪食する際に、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、次亜塩素酸などの活性酸素を生じる。これら活性酸素は殺菌機構を有し、生体防御機構において重要な役割を果たしているが⁴⁾、過剰に産生されるとその局所において組織を傷害すると言われており、UCにおいても好中球から放出される活性酸素が腸管粘膜組織を障害すると考えられている^{5,6)}。実際、潰瘍性大腸炎患者の血中の白血球で、また大腸粘膜の食細胞で活性酸素生成能が亢進し、また大腸患部の組織ではスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、次亜塩素酸が生じていることを示唆する報告がされている⁷⁾。

以前われわれは、SFCの好中球機能に及ぼす影響について検討した²⁾。その結果、SFCは好中球の遊走を抑制した。さらに、スーパーオキシド生成酵素であるNADPH oxidaseの活性化とその酵素活性を抑制することにより、好中球のスーパーオキシド生成を抑制することがわかった。また、われわれは、UCの重要な治療薬であるMesalazineの好中球機能に及ぼす影響とSFCとの併用効果について検討した³⁾。その結果、Mesalazineは接着分子(CD11b)の発現を抑制することにより、血管内皮細胞への接着を抑制し、それに引き続き起こる遊走を抑制し、さらにスーパーオキシド生成を抑制する可能性が考えられた。また、SFCとの併用においてもスーパーオキシド生成、遊走などの好中球機能において、相加的に好中球機能が抑制されることがわかった。そこで、今回UCのその他の治療薬である、SASP、PSLの好中球機能抑制のメカニズムについて検討した。

SASPの活性酸素に対する作用として、中丸らは、SASPはスーパーオキシドに対し0.025 mM～0.1 mMの濃度で用量依存的に消去作用を示したと報告している⁸⁾。また、Williamsらは、SASPはスーパーオキシドに対する消去作用は認めなかったと報告しており⁹⁾、その作用機序は明らかにされていない。秋山らは、炎症性腸疾患患者にSASP 4gを単回経口投与した場合に、最高血中濃度が約0.05 mMに達すると報告している¹⁰⁾。そこで、今回われわれは、0.01 mM～0.1 mMのSASP濃度で実験を行ったが、SASPはすべての刺激において好中球スーパーオキシド生成を濃度依存的に抑制した。この結果より、SASPは報告されているスーパーオキシド消去作用だけでなく、生成そのものを抑制すると考えられ、そのため生体内においても活性酸素生成を阻害し、抗炎症作用を発揮すると推測される。

PSLの有する抗ショック作用は、リソソーム膜の安定

化、膜透過性亢進の抑制などの機序により発揮され、そのほかに抗炎症作用、抗アレルギー作用、抗体産生の抑制などの薬理作用を有している。活性酸素生成に対する抑制効果に関しては、Nelsonらは、PSLが1.0 mM～6.0 mMの濃度で¹¹⁾、吉川らは0.1 mM～1 mMの濃度で¹²⁾、また、厚井らは1.0 mM以上の濃度でのスーパーオキシド消去作用を示唆している¹³⁾。ところが、血中濃度において、桑島らは、PSL 60 mgを単回経口投与した場合に、最高血中濃度が約0.0012 mMに達すると報告している¹⁴⁾。また、NorroらはPSL 1250 mgを単回経口投与した場合に、2時間後に最高血中濃度が約0.01 mMに達すると報告している¹⁵⁾。そこで、今回われわれは、0.01 mM～0.1 mMのPSL濃度で実験を行ったが、すべての刺激において好中球スーパーオキシド抑制効果は示さなかった。これらの結果より、PSLは生体内においてはスーパーオキシドに対して抑制効果は認めず、その他の作用により抗炎症効果を発揮すると思われる。

炎症の際には、炎症巣から大量の遊走因子が産生され、遊走因子により好中球は炎症部位に浸潤遊走する。酸化的に細胞障害を引き起こすスーパーオキシドは好中球の遊走を惹き起こし、さらに白血球の血管内皮への接着を促すと考えられている^{16,17)}。また、過酸化水素によりC5aが生じることが報告されている¹⁸⁾。今回、このC5aを介した好中球遊走能についてSASP、PSLの作用を0.01 mM～0.1 mMの濃度で検討したところ、ともに0.01 mMより濃度依存性に好中球の遊走を抑制することがわかった。また、遊走機序において、好中球のセレクチン分子(CD62L)のshedding(down-regulation)またはCD11bなどのインテグリンの発現増加により、好中球がrollingや接着しながら、終局的に炎症部位に浸潤する¹⁹⁾。そこで、今回、好中球の遊走の抑制機序を調べるために、CD11bとCD62Lの発現についてSASP、PSLの影響を検討した。SASP、PSL(0.01 mM～0.1 mM)は両方ともに濃度依存的にCD62Lのdown regulationとCD11bの発現増強を抑制した。以上のことから、SASP、PSLは、好中球の接着分子を制御することにより、好中球の遊走を抑制し、結果として抗炎症作用を発揮すると考えられる。また、図3,4のC,Dで示したように、PSLが0.5 mMの濃度において完全にCD11bの発現とCD62Lのdown regulationを抑制したことに対して、SASP(図3,4のA,B)が40～60%しか抑制しなかったことから、高濃度のPSL(0.5 mM)はSASPより強く好中球の遊走を阻害する可能性が示唆された。

われわれの以前の研究より、1～10 μg/mlのSFCは好中球の活性酸素生成、遊走などの好中球機能を抑制することにより抗炎症効果を発揮することが明らかになっている²⁾。そこで、今回スーパーオキシド生成能に関してはSFC濃

度5 μ g/ml, 遊走能に関してはSFC濃度1 μ g/mlを使用し, SASP, PSLとの併用効果について検討した. SASP単独群と比較し, SFC併用群ではスーパーオキシド生成が抑制される傾向が認められた. さらに, SASP, PSL単独群と比較し, SFC併用群では好中球遊走能は有意に抑制された. これらの結果より, PSLは好中球の遊走能, またSASPは活性酸素生成能と遊走能に対して, SFCと相加的な作用を発揮すると考えられた. 実際の臨床においても, 症状増悪期に鉄剤を投与することにより症状の改善を認めることがしばしばみられ, 鉄剤がこれらの作用を発揮したためと思われる.

今回, SASP, PSLの好中球機能に及ぼす影響を検討した. SASPは濃度依存的に好中球のスーパーオキシド産生を抑制した. また, SASP, PSLは, 接着分子の発現を制御することにより好中球の遊走能を抑制することが考えられた. さらに, SFCとの併用において, PSLは遊走能, SASPは活性酸素生成と遊走能をSFCと相加的に阻害することがわかった. このように, SASPは以前検討したMesalazineと同様³⁾にSFCとの併用において効果を発揮することがわかった. したがって, SASP, PSLはUCに対して活性酸素生成あるいは遊走能を抑制することにより抗炎症効果を発揮する可能性が考えられ, さらに, SFCを併用することにより, さらなる抗炎症効果が高まる可能性が示唆された.

文 献

- 1) 北洞哲治, 伊藤ひろみ, 仲村 洋, 吉田武史, 鈴木紘一, 土屋雅春: 腸疾患とフリーラジカル. 活性酸素・フリーラジカル, 2: 595-600, 1991.
- 2) 前多力, 華 見, 秦 政輝, 北村大介, 瀧田尚仁, 北島政幸, 落合 匠, 長岡 功, 鎌野俊紀: Sodium ferrous citrate の好中球機能に及ぼす影響. 炎症・再生, 26: 54-58, 2006.
- 3) 北村大介, 華 見, 秦 政輝, 前多力, 瀧田尚仁, 北島政幸, 落合 匠, 長岡 功, 鎌野俊紀, 他: Mesalazine (Pentasa) の好中球機能におよぼす影響と Sodium ferrous citrate (SFC) との併用効果についての検討. 炎症・再生, 26: 49-53, 2006.
- 4) Root RK, Metcalf J, Oshino N, Chance B: H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. J Clin Invest, 55: 945-955, 1975.
- 5) Wandall JH, Binder V: Leukocyte function in ulcerative colitis. Quantitative leukocyte mobilization to skin windows and in vitro function of blood leukocytes. Gut, 23: 758-765, 1982.
- 6) Dubbins OW: Colonic epithelial cells and the polymorphonuclear leukocytes in ulcerative colitis. An electron-microscopic study. Dig Dis, 20: 236-252, 1975.
- 7) 丹羽博美: 潰瘍性大腸炎の大腸粘膜より産生される活性酸素の検討. 日消誌, 86: 493, 1989.
- 8) 中丸幸一, 菅井利寿, 木下宣祐, 佐藤雅子, 谷口 偉, 川瀬重雄: 炎症性腸疾患治療薬メサラジンの活性酸素消去作用およびロイコトリエン B₄ 生合成抑制作用. 日薬理誌, 104: 447-457, 1994.
- 9) Williams JG, Hallett MB: Effect of sulphasalazine and its active metabolite, 5-amino-salicylic acid, on toxic oxygen metabolite production by neutrophils. Gut, 30: 1581-1587, 1989.
- 10) Azhad Khan AK, Truelove SC: The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man. Br J Clin Pharmacol, 13: 523-528, 1982.
- 11) Nelson DH, Ruhmann-Wennhold: A inhibition of leukocyte superoxide production by cortisol administration to normal subjects. J Clin Endoclinical Metab, 46: 702-705, 1977.
- 12) 吉川敏一, 市川 寛, 高野裕久, 高橋周史, 安田光徳, 田崎直宏, 近藤元治: 多形核白血球よりのスーパーオキシド産生に及ぼすメチルプレドニゾロンの影響. 医学のあゆみ, 156: 139-140, 1991.
- 13) 厚井文一, 大本英次郎, 渡辺清一郎, 高橋 功, 喜多嶋康一, 木村郁郎, 真田 浩: 抗白血病剤の好中球 superoxide 産生能に及ぼす影響. 癌と化学療法, 10: 71-77, 1983.
- 14) 桑島勢津子: 経口投与によるプレドニゾロンの生体内代謝について. 金沢大学十全医学会雑誌, 92: 645-658, 1983.
- 15) Morrow SA, Stoian CA, Dmitrovic J, Chan SC, Metz L: The bioavailability of IV methylprednisolone and oral prednisone in multiple sclerosis. Neurology, 63: 1079-1080, 2004.
- 16) Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-Endothelial adhesion Molecules. Blood, 84: 2068-2101, 1994.
- 17) Martin W, Loschen G, Gunzler WA, Flohe L: Superoxide dismutase inhibits LTB₄-induced leukotaxis. Agents Actions, 16: 48-49, 1985.
- 18) Del Maestro RF, Thaw HH, Bjork J, Planker M, Arfors K-E: Free radicals as mediators of tissue injury. Acta Physiol Scand Supp, 492: 43-57, 1980.
- 19) Shingu M and Nobunaga M: Chemotactic activity generated in human serum from the fifth component of complement by hydrogen. Am J Pathol, 117: 201-206, 1984.