

# 黄色ブドウ球菌の protein A 保有株と非保有株の 多形核白血球殺菌作用に対する抵抗性の相違

川崎医科大学 微生物学教室

山 田 作 夫

(昭和55年9月22日受付)

## Difference in the Resistance to Killing Action by Polymorphonuclear Leukocytes between two Strains of *Staphylococcus* *aureus* with and without Protein A

Sakuo Yamada

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School

(Accepted on September 22, 1980)

黄色ブドウ球菌の二種の異なる菌株，すなわち protein A 保有株 Cowan I 株と非保有株 Wood 46 株の多形核白血球 (PMN と略す) による殺菌作用に対する抵抗性をしらべ，つぎの結果を得た。

(1) 両菌株を不活化ヒト血清でオプソナイズし，ヒト PMN に貪食させると，食菌 2 時間後における Cowan I 株の PMN 内残存生菌数は Wood 46 株のそれよりも 1.5 log 高い値を示した。同様にモルモット PMN を用いた場合に Cowan I 株は Wood 46 株よりも 1.3 log 高い残存生菌数を示した。しかしモルモット PMN による nitroblue tetrazolium (NBT) 還元能には両菌株のあいだに有意の差は認められなかった。

(2) オプソナイズした Cowan I 株を 0.001% (W/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下 4 時間培養した時の生菌数は，同様に処理した Wood 46 株の生菌数よりも 1.1 log 高い値を示した。同様の結果がオプソナイズしない両菌株についても得られた。

これらの結果は，PMN の殺菌作用における両菌株間の抵抗性の相違が，両菌株に対する PMN の殺菌活性の相違に基づくものではなく，PMN 殺菌効果を担うと考えられている  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する抵抗性の相違に依存することを示唆している。

Two different strains of *S. aureus*, Cowan I strain possessing protein A and protein A deficient Wood 46 strain, were studied on the resistance to killing action by polymorphonuclear leukocytes (PMN). The results obtained are as follows:

(1) When both strains were opsonized in inactivated human serum and then ingested into human PMN, the intracellular survival of Cowan I strain at 2 hours after phagocytosis was 1.5 log higher than that of Wood 46 strain. Similarly, the survival of Cowan I strain was 1.3 log higher than that of Wood 46 strain in guinea pig PMN. However, no significant difference between both strains in reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) by guinea pig PMN was detected.

(2) Survival number of opsonized Cowan I strain was 1.1 log higher than that of opsonized Wood 46 strain in the presence of exogenous 0.001 % (W/V)  $H_2O_2$  after 4 hour-incubation. Similar result was obtained for bacteria of both strains without opsonization.

These results suggest that the difference in the resistance between both strains to PMN killing action does not depend on the different bactericidal activity of PMN against both strains, but depends on the difference in the resistance to  $H_2O_2$  which seems to be responsible for the bactericidal effect of PMN.

## はじめに

細菌の多形核白血球 polymorphonuclear leukocytes (PMN と略す) の食菌作用に対する抵抗性は細菌の種類によって異なり、さらに同一菌種の菌株によっても相違のあることが報告されている<sup>1)~3)</sup>。食菌作用において菌株により抵抗性の相違を示す原因の一つとして、菌体表層物質、例えば肺炎レンサ球菌のきょう膜物質、グラム陰性菌の LPS などが抗食菌作用を示すといわれている。このような菌体表層物質の抗食菌作用のメカニズムを明らかにするために、近年、黄色ブドウ球菌の抗食菌作用を示す菌体表層物質の一つとして protein A が注目され、これを保有する菌株と保有しない菌株における食菌作用への抵抗性の相違が検討されつつある。

黄色ブドウ球菌の細胞壁の主成分は peptidoglycan と teichoic acid であるが、ほとんどの菌株がこれらに加えて protein A を保有する。protein A は細胞壁の peptidoglycan に共有結合する分子量 42,000 のタンパク質であり、IgG の Fc 部位と結合する特異性をもつことが知られている<sup>4)~6)</sup>。このような特異性をもつために protein A の抗食菌作用が注目され、protein A 保有株と非保有株間の食菌作用に対する抵抗性の相違、すなわち protein A 保有株が非保有株よりも高い抵抗性を示すことが明らかにされている<sup>7)</sup>。そしてその一因として protein A が PMN の食菌作用、とくに細菌の貪食を容易にするオプソニン作用に必要な補体系の反応を阻害することにあるといわれている<sup>8)</sup>。

PMN に貪食された細菌は PMN 内において殺菌作用を受ける。従来の殺菌機構に関する知見によれば、種々の殺菌物質が PMN 内に貪食された細菌に働いて殺菌効果を表わすとされている<sup>9), 10)</sup>。PMN の貪食作用において protein A 保有株と非保有株間に相違のあることはすでに示唆されている<sup>11)</sup> が、貪食された両菌株の PMN 殺菌作用に対する抵抗性の相違については現在なお不明な点が多い。著者は黄色ブドウ球菌 Cowan I 株 (protein A 保有株) と黄色ブドウ球菌 Wood 46 株 (protein A 非保有株) を用い、両菌株間に認められた PMN 殺菌作用に対する抵抗性の相違について検討し、その発現機序を追求した。

## 材料および方法

**供試菌 および 被検菌液の調整:** 埼玉医科大学、新井義夫助教授より分与を受け当教室で継代保存している黄色ブドウ球菌 Cowan I 株および黄色ブドウ球菌 Wood 46 株を供試菌とした。トリプトソーヤブイヨンにて 37°C 18 時間培養した供試菌液を Eagle minimum essential medium (MEM と略す) で遠心洗浄 (1,360 × g, 15 分) した。洗浄した供試菌液を一定菌数を含むように MEM で希釈調整し、被検菌液として実験に用いた。

**PMN:** ヒト PMN と モルモット PMN を用いた。ヒト PMN は健康成人男子腕静脈血よりヘパリン添加の注射器を用いて 15 ml 採血し、この血液に 6 % (W/V) デキストランを含む生理食塩水 5 ml を加え、室温で 1 時間静置し leukocyte rich plasma を回収した。混在す

る赤血球を低張処理により破壊後、MEM で遠心洗浄 ( $110\times g$ , 8 分, 2 回) し、さらに MEM を用いて一定数の細胞浮遊液に調整し、ヒト PMN 浮遊液とした。

モルモット PMN は、生理食塩水 15 ml をモルモット (雄, 体重 350~400 g) の腹腔内に注射し、4 時間経過後に侵出してくる細胞を採取し実験に用いた。遠心洗浄ならびに調整はヒト PMN の場合と同じである。

**血 清:** 本学中央検査部より十数人分の新鮮正常ヒト血清の分与を受け、これを不活化 ( $56^{\circ}\text{C}$ , 30 分) して被検菌のオプソナイズに用いた。モルモット PMN の NBT 還元能試験には各実験ごとに数匹のモルモットの血液から分離した新鮮モルモット血清を用いた。

**PMN 殺菌作用の測定法:** PMN 内に残存する両菌株の生菌数を、Quie ら<sup>12)</sup>の方法に準じて以下の方法で測定し両菌株の PMN 殺菌作用に対する抵抗性とした。

被検菌液 1.0 ml を遠心集菌 ( $1,360\times g$ , 15 分) し、不活化ヒト血清に浮遊し、 $37^{\circ}\text{C}$  30 分オプソナイズした。この被検菌液を MEM で遠心洗浄 ( $1,360\times g$ , 15 分, 2 回) 後、MEM で 5 ml ( $2\times 10^7/\text{ml}$ ) の浮遊液とした。この浮遊液を PMN 浮遊液 5 ml ( $2\times 10^6/\text{ml}$ ) に加え、 $37^{\circ}\text{C}$  60 分振とう培養 (振とう回数 40 回/分) した。振とう培養後の被検菌貪食 PMN 浮遊液から非貪食細菌を取り除くため、MEM で遠心洗浄 ( $110\times g$ , 8 分, 2 回) し、3.5 ml の MEM に浮遊した。浮遊液を 1.0 ml ずつ 2 本に分け、それぞれに Streptomycin ( $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ )、Penicillin G ( $250\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 各々 0.5 ml を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で静置培養し、培養開始時、培養 2 時間後の PMN 内残存生菌数測定に用いた。残存生菌数は PMN を MEM で 2 回遠心洗浄 ( $110\times g$ , 8 分) し、蒸留水中でミキサー (Thermonics 製) で攪拌 (5 分) して、残存菌を放出させ、混釈法により求めた。

**PMN の NBT 還元能試験:** PMN の NBT 還元能試験は Baehner らの方法によった<sup>13)</sup>。

モルモット PMN 浮遊液 0.3 ml ( $2\times 10^6$  あ

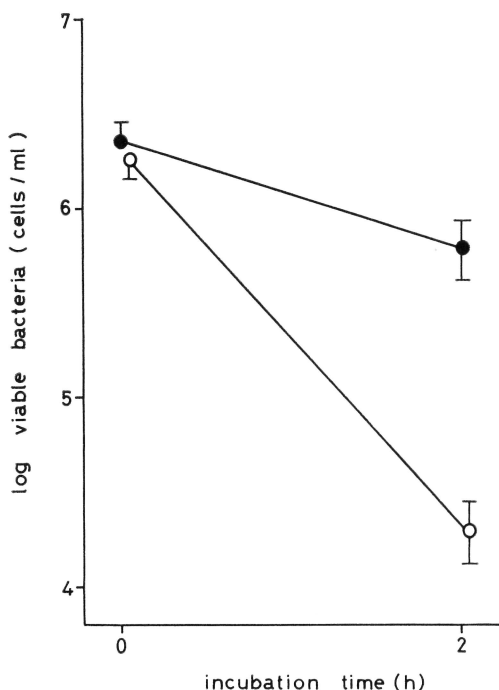
るいは  $1\times 10^6$ ) とモルモット血清 0.1 ml, MEM 0.1 ml さらに被検菌液 0.1 ml ( $10^8/\text{ml}$ ) と 0.1% NBT 溶液 0.4 ml を加え 5%  $\text{CO}_2$  存在下で  $37^{\circ}\text{C}$  1 時間静置培養して PMN の NBT 還元反応を行なった。なお反応系の MEM は Baehner らの 0.01 M KCN に替えて用いたものである。反応終了後 0.75 N HCl 3.0 ml を加え遠沈 ( $110\times g$ , 8 分) し、沈査に 2.5 ml のピリジンを加え、 $100^{\circ}\text{C}$  15 ないし 20 分間、NBT の PMN による還元の結果生じた formazan の抽出を行なった。抽出液を遠沈 ( $1,360\times g$ , 5 分) し上清の 515 nm における吸光度 (O. D.) を測定した。得られた O. D. 値から被検菌未添加時の O. D. 値を差し引いた値を被検菌に対する PMN の NBT 還元能 (O. D. 値) とした。

**$\text{H}_2\text{O}_2$  抵抗性測定法:** 被検菌を不活化ヒト血清で前述と同様にオプソナイズしさらに遠心洗浄 ( $1,360\times g$ , 15 分, 2 回) して調整した被検菌の浮遊液 ( $10^8/\text{ml}$ ) 1.0 ml に、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を所定濃度 [0.002% (W/V) あるいは 0.02% (W/V)] 含む  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.0 ml を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で静置培養した。培養開始時、2, 4 時間後に被検菌の生菌数を混釈法で求めた。オプソナイズをしていない被検菌についても同様に処理して、 $\text{H}_2\text{O}_2$  抵抗性を検討した。

**使用培地および試薬:** トリプトソーヤブイヨンおよび MEM (Kanamycin, phenol red を含まず) は日水製、ヘパリン ( $1,000$  単位/ml) は清水製、デキストラン (分子量 188,700) は半井製、Penicillin G ( $954\text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$ ) および Streptomycin ( $780\text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$ ) は明治製、NBT は Sigma 製、 $\text{H}_2\text{O}_2$  [30% (W/V)] は三菱瓦斯製を用いた。

## 実 験 成 績

**Cowan I 株と Wood 46 株の PMN 殺菌作用に対する抵抗性:** 不活化ヒト血清でオプソナイズした Cowan I 株、Wood 46 株の PMN 内残存生菌数をしらべたところ Fig. 1 の結果を得た。両菌株を PMN に貪食させた時の残存生

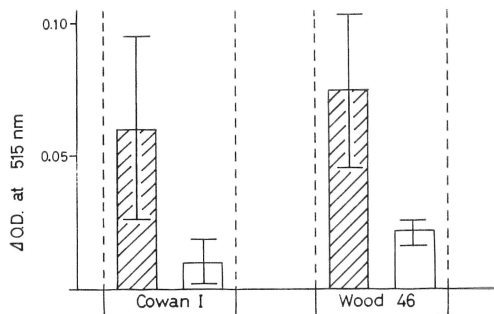


**Fig. 1.** Killing by human polymorphonuclear leukocytes (PMN) of opsonized *S. aureus*, Cowan I (●) and Wood 46 (○). The bacteria were opsonized in inactivated human serum for 30 min prior to being added to PMN. The points represent mean values of three determinations, and each bar indicate one standard deviation (SD) of the mean.

菌数は、両菌株ともに  $2 \times 10^6$ /ml を示したが、それらの PMN を 2 時間培養すると Cowan I 株の残存生菌数は  $6 \times 10^5$ /ml, Wood 46 株は  $2 \times 10^4$ /ml に減少し、Cowan I 株は Wood 46 株に比べ 1.5 log 高い値を示した。この結果はオプソナイズした Cowan I 株が同様に処理した Wood 46 株に比べて PMN 殺菌作用に高い抵抗性を有することを示唆している。

モルモット PMN を用いて同じ実験を行なったところ、培養後 2 時間における Cowan I 株の残存生菌数は Wood 46 株のそれよりも 1.3 log 高く、モルモット PMN を用いた場合もヒト PMN と同様に両菌株のあいだに PMN 殺菌作用に対する抵抗性の相違が認められた。

**両菌株貪食時のモルモット PMN の NBT 還元能:** モルモット PMN の NBT 還元能を Cowan I 株, Wood 46 株を貪食させてしらべた。得られた結果を **Fig. 2** に示す。  $2 \times 10^6$  の PMN を用いた時の結果 (斜線カラム) についてみると、Cowan I 株による PMN の NBT 還元能を示す値 ( $\Delta O.D.$  値) は 0.06 を、また Wood 46 株では 0.07 を示し、  $1 \times 10^6$  の PMN を用いた時は Cowan I 株は 0.01, Wood 46 株は 0.02 を示した。用いた PMN が多い場合の  $\Delta O.D.$  値も少ない場合の  $\Delta O.D.$  値もともに 0.01 程度の差が認められたが、危険率 0.05 で検定したところこの差は有意の差ではなかつ



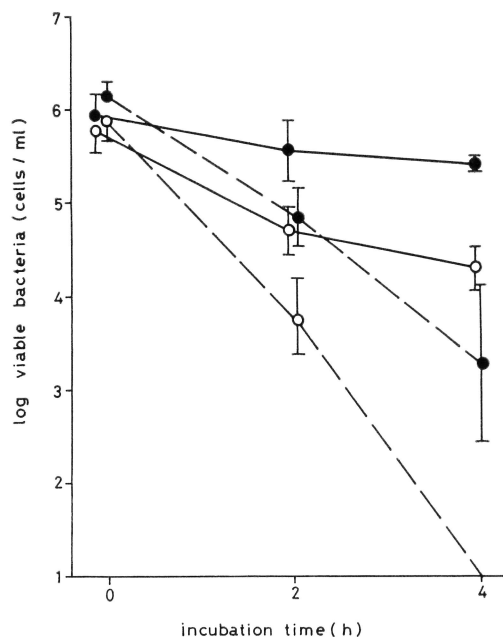
**Fig. 2.** Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction by guinea pig PMN with *S. aureus*, Cowan I and Wood 46.  $\Delta O.D.$  (optical density) was measured as increment at 515 nm from duplicate samples, with and without bacteria. ■:  $\Delta O.D./2 \times 10^6$  cells/60 min. □:  $\Delta O.D./1 \times 10^6$  cells/60 min. The columns represent mean values of four determinations  $\pm$  1SD.

た。このことはモルモット PMN がそれぞれの菌株貪食時に同程度の NBT 還元能を有することを意味している。なお反応系に MEM に替えて 0.01M KCN 0.1 ml を添加した時の  $\Delta O.D.$  値は 0.01~0.02 ( $2 \times 10^6$  PMN 使用時) 減少したが、この値にも有意の差が認められなかった。以上の結果は両菌株に対する PMN の反応には差異がなく、PMN は両菌株に対して同等に反応することを示している。

**両菌株の  $H_2O_2$  抵抗性:** 不活化ヒト血清を用いてオプソナイズした両菌株の  $H_2O_2$  に対する

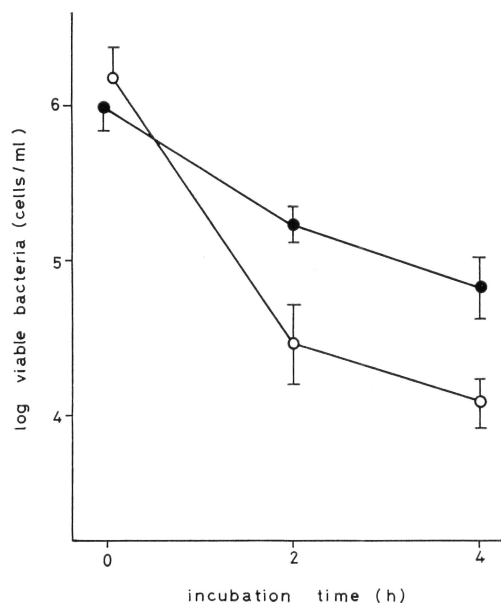


抵抗性をしらべるため、両菌株浮遊液に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を加え培養し、培養後 2, 4 時間における両菌株の生菌数をしらべた。得られた結果を Fig. 3 に示す。0.001 % (W/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いた場合、培養 2 時間後における Cowan I 株の生菌数は Wood 46 株のそれよりも 0.8 log 高い値を示し、4 時間後では Cowan I 株は 1.1 log 高い生菌数を示した。0.01 % (W/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$  の場合、2 時間後における Cowan I 株は Wood 46 株



**Fig. 3.** Killing effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on opsonized *S. aureus*, Cowan I (●) and Wood 46 (○). The bacteria were opsonized in inactivated human serum for 30 min prior to being added to the incubation mixtures. The incubation mixtures contained the opsonized bacteria together with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Solid line: 0.001 % (W/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Broken line: 0.01 % (W/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The points represent mean values of three to four determinations  $\pm$  1SD.

よりも 1.1 log 高い生菌数を示し、4 時間後では Wood 46 株は死滅し、明らかに Cowan I 株の生菌数 ( $2 \times 10^3/\text{ml}$ ) が高い値を示した。これらの結果は不活化ヒト血清でオプソナイズした Cowan I 株が、同様に処理した Wood 46



**Fig. 4.** Killing effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on *S. aureus* Cowan I (●) and Wood 46 (○) without opsonization. The incubation mixtures contained the bacteria together with 0.001 % (W/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The points represent mean values of three determinations  $\pm$  1SD.

株よりも  $\text{H}_2\text{O}_2$  抵抗性が高いことを示している。

Fig. 4 にオプソナイズをしていない両菌株の 0.001 % (W/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$  抵抗性をしらべた結果を示す。培養後 2, 4 時間ともに Cowan I 株は Wood 46 株よりも 0.8 log 高い生菌数を示した。このようにオプソナイズをしていない両菌株のあいだにも  $\text{H}_2\text{O}_2$  抵抗性の相違の存在することが認められた。

## 考 察

黄色ブドウ球菌の protein A 保有株に比べ PMN 食菌作用に、より高い抵抗性を示すのは、菌体に表在する protein A がオプソニン作用に必要な補体系の反応を阻害することが一因であるといわれている<sup>11)</sup>。本実験では補体を不活化したヒト血清を用いてオプソナイズした黄色ブドウ球菌の Cowan I 株と Wood 46 株との

PMN 殺菌作用に対する抵抗性を比較検討した。その結果、PMN 殺菌作用に対して Cowan I 株は Wood 46 株に比べ培養 2 時間後において 1.5 log 高い PMN 内残存生菌数を示した。このように不活化ヒト血清でオプソナイズした両菌株間の PMN 殺菌作用に対する抵抗性の相違が示されたが、これは protein A と補体系の相互作用に基づく阻害とは別の阻害機序が存在することを示唆している。

すでに Verhoef ら<sup>11)</sup> は不活化ヒト血清でオプソナイズした Cowan I 株と、同様に処理した Wood 46 株について PMN の貪食率を比較検討し、PMN の Wood 46 株貪食率 (36%) は Cowan I 株貪食率 (15~20%) より高いことを報告した。このことは PMN の貪食作用においてそれらの両菌株間に相違があることを示している。本実験では、ほぼ同数貪食された両菌株のあいだに PMN 殺菌作用に対する抵抗性に相違のあることが示された。

両菌株それぞれ同数を貪食させた時の PMN の応答性 (NBT 還元能) には両菌株間に有意差が認められない事実は、両菌株間の PMN 殺菌作用に対する抵抗性の相違が菌株の相違に基づく PMN の殺菌系の応答性の相違によるものではないことを示している。PMN の NBT 還元能は PMN の NAD(P)H oxidase 活性を表わすといわれている<sup>14)</sup>。また PMN 内において NAD(P)H oxidase が  $H_2O_2$  産生に関与する<sup>15)</sup> ことから、貪食させた菌株の違いにかかわらず還元能に差がないことは、両菌株を貪食した時の PMN の  $H_2O_2$  産生量が等しいことを意味するものと考えられる。それにもかかわらず、両菌株間に PMN 殺菌作用に対する抵抗性に相違があるということは、 $H_2O_2$  を主体とする PMN の殺菌作用に対して両菌株が異なった抵抗性を有していることを示している。

PMN の殺菌物質のなかで酸素に依存した殺菌物質として、従来、 $H_2O_2$ <sup>16)~18)</sup>、myeloperoxidase-halide- $H_2O_2$ <sup>19), 20)</sup> が知られており、近年、さらに superoxide anion ( $O_2^-$ )<sup>21)</sup>、singlet oxygen ( $^1O_2$ )<sup>22)</sup>、hydroxy radicals ( $OH\cdot$ )<sup>23)</sup> の殺菌作用も集目されている。しかし  $O_2^-$  に

よる殺菌効果を疑問視した報告(後述)もあり、 $^1O_2$ 、 $OH\cdot$  の殺菌効果についても未だ疑問な点が多い。一方、酸素に依存しない殺菌物質として lysozyme<sup>24)</sup>、lactoferrin<sup>25)</sup>、cationic protein<sup>26)</sup> が知られている。lysozyme はある種の細菌には殺菌効果を示すことが知られている。lactoferrin は殺菌的よりむしろ静菌的に作用するといわれ、また cationic protein の殺菌作用に関する詳細は不明である。そして PMN 内の pH が酸性を示すことも殺菌作用に関与していることが知られている<sup>27)</sup>。

PMN の殺菌物質のなかでどの殺菌物質が最も有効であるかについて検討が進められている。McRipley ら<sup>16)</sup> は嫌気的狀態における PMN は  $H_2O_2$  を形成できないと同時に殺菌効果が減少する知見を得た。この知見は PMN の殺菌作用における  $H_2O_2$  の重要性を示している。さらに Mandell<sup>17)</sup> は、嫌気的狀態下の PMN の黄色ブドウ球菌に有効な殺菌物質は  $O_2$  から産生される  $O_2^-$  と  $H_2O_2$  であると考えた。そして彼は  $O_2^-$  を  $O_2$  と  $H_2O$  に転換する superoxide dismutase (SOD) 活性、ならびに  $H_2O_2$  を分解する catalase 活性と黄色ブドウ球菌のマウス致死率との相関をしらべ、SOD 活性と致死率には相関がなく、catalase 活性と致死率に相関がある成績を示した。このように黄色ブドウ球菌に対する PMN の殺菌作用においては  $H_2O_2$  が最も有効に作用していることが示唆されている。本実験では、0.001% (W/V)  $H_2O_2$  の存在下において不活化ヒト血清でオプソナイズした Cowan I 株は同様に処理した Wood 46 株よりも培養 4 時間後において 1.1 log 高い生菌数を示し、0.01% (W/V)  $H_2O_2$  の存在下 (4 時間) における Cowan I 株は Wood 46 株よりも 2.2 log 高い生菌数を示す結果が得られた。さらにオプソナイズをしない両菌株についても、Cowan I 株は Wood 46 株よりも 0.001% (W/V)  $H_2O_2$  に対する抵抗性が高い (0.8 log) ことが培養 2, 4 時間後ともに認められ、オプソナイズの有無にかかわらず両菌株間に  $H_2O_2$  抵抗性の相違のあることが判明した。これらの結果は両菌株間の殺菌物質に

対する抵抗性の相違が  $H_2O_2$  に対する抵抗性の相違に依存することを示唆している。しかし他の殺菌物質に対する両菌株の抵抗性についても否定できないため、その相違が  $H_2O_2$  抵抗性の相違にだけ依存するかどうかについては今後の検討を要する。

PMN の殺菌物質に対する菌株間の抵抗性の相違がその他の細菌について報告されている<sup>30)</sup>。しかし、黄色ブドウ球菌の protein A 保有株と非保有株の PMN の殺菌物質に対する抵抗性が詳細に検討された報告はない。その理由は、protein A による補体活性の阻害により両菌株間に PMN 食菌作用に対する抵抗性の相違が生ずると考えられていることから、PMN の殺菌物質に対する抵抗性の相違については重要視されていなかったためと思われる。

本実験で著者が見いだした Cowan I 株と

Wood 46 株のあいだの  $H_2O_2$  抵抗性の相違は、それぞれの菌株の菌体表層物質が異なるために生じた結果によるもので、 $H_2O_2$  に対する抵抗性の相違に protein A が関与していることが考察できる。さらにこの結果は、Verhoef ら<sup>11)</sup>の報告「黄色ブドウ球菌菌株間の PMN 殺菌作用に対する抵抗性の相違が、菌株による効果的なオプソニン作用に必要な血清因子の違いに基づく結果である」とする報告、とは別の抗食菌作用機構によるものと考えられる。

謝辞：稿を終わるにあたり御指導と御鞭達さらに御校閲を賜りました本学微生物学教室、東昇教授に深謝の意を表します。また御校閲の労をとられた微生物学教室、松本明助教授、美禰弘子講師、別所敬子助手に厚くお礼申し上げます。

さらに、本学実験補助者、大森幸代、丸川始子の両氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Cohn, Z. A. and Morse, S. I.: Interactions between rabbit polymorphonuclear leucocytes and staphylococci. J. exp. Med. 110 : 419—443, 1959
- 2) Roe, E. A. and Jones, R. J.: Intracellular killing of different strains of *Pseudomonas aeruginosa* by human leucocytes. Br. J. exp. Path. 55 : 336—343, 1974
- 3) Kreutzer, D. L., Dreyfus, L. A. and Robertson, D. C.: Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of *Brucella abortus*. Infect. Immun. 23 : 737—742, 1979
- 4) Forsgren, A. and Sjöquist, J.: Protein A from *S. aureus*. J. Immun. 97 : 822—827, 1966
- 5) Sjöquist, J., Movitz, J., Johansson, I. B. and Hjelm, H.: Localization of protein A in the bacteria. Eur. J. Biochem. 30, 190—194, 1972
- 6) Movitz, J.: A study on the biosynthesis of protein A in *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. 48 : 131—136, 1974
- 7) Dossett, J. H., Krovall, G., Williams, Jr., R. C. and Quie, P. G.: Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A. J. Immunol. 103 : 1405—1410, 1969
- 8) Forsgren, A. and Quie, P. G.: Effects of staphylococcal protein A on heat labile opsonins. J. Immunol. 112 : 1177—1180, 1974
- 9) Klebanoff, S. J.: Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Semin. Hematol. 12 : 117—142, 1975
- 10) DeChatelet, L. R.: Oxidative bactericidal mechanisms of polymorphonuclear leukocytes. J. infect. Dis. 131 : 295—303, 1975
- 11) Verhoef, J., Peterson P. K., Kim, Y., Sabath, L. D. and Quie, P. G.: Opsonic requirements for staphylococcal phagocytosis. Immunol. 33 : 191—197, 1977
- 12) Quie, P. G., White, J. G., Holmes, B. and Good, R. A.: *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. J. clin. Invest. 46 : 668—679, 1967

- 13) Baehner, R. L. and Nathan, D. G.: Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* 278 : 971—976, 1968
- 14) Humbert, J. R., Gross, G. P., Vatter, A. E. and Hathaway, W. E.: Nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils: Biochemical and ultrastructural effects of methylene blue. *J. Lab. clin. Med.* 82 : 20—30, 1973
- 15) Baehner, R. L., Nathan, D. G. and Karnovsky, M. L.: Correction of metabolic deficiencies in the leukocytes of patients with chronic granulomatous disease. *J. clin. Invest.* 49 : 865—870, 1970
- 16) McRipley, R. J. and Sbarra, A. J.: Role of the phagocyte in host-parasite interactions. *J. Bacteriol.* 94 : 1417—1424, 1967
- 17) Mandell, G. L.: Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 9 : 337—341, 1974
- 18) Mandell, G. L.: Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. *J. clin. Invest.* 55 : 561—566, 1975
- 19) Klebanoff, S. J.: Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.* 95 : 2131—2138, 1968
- 20) Klebanoff, S. J.: Iodination of bacteria: A bactericidal mechanism. *J. exp. Med.* 126 : 1063—1078, 1967
- 21) Klebanoff, S. J.: Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. biol. Chem.* 249 : 3724—3728, 1974
- 22) Krinsky, N. I.: Singlet excited oxygen as a mediator of the antibacterial action of leukocytes. *Science* 186 : 363—365, 1974
- 23) Gregory, E. M. and Fridovich, I.: Oxygen metabolism in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 117 : 166—169, 1974
- 24) Carroll, S. F. and Martinez, R. J.: Role of rabbit lysozyme in vitro serum and plasma serum bactericidal reactions against *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.* 25 : 810—819, 1979
- 25) Masson, P. L., Heremans, J. F. and Schonke, E.: Lactoferin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. exp. Med.* 130 : 643—658, 1969
- 26) Zeya, H. I. and Spitznagel, J. K.: Cationic proteins of polymorphonuclear lysosomes. *J. Bacteriol.* 91 : 750—762, 1966
- 27) Mandell, G. L.: Intraphagosomal pH of human polymorphonuclear neutrophils. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 134 : 447—449, 1970
- 28) Rest, R. F., Cooney, M. H. and Spitznagel, J. K.: Susceptibility of lipopolysaccharide mutants to the bactericidal action of human neutrophil lysosomal fractions. *Infect. Immun.* 16 : 145—151, 1977
- 29) Finch, J. E. and Brown, M. R. W.: Effect of growth environment on *Pseudomonas aeruginosa* killing by rabbit polymorphonuclear leukocytes and cationic proteins. *Infect. Immun.* 20 : 340—346, 1978
- 30) Tagesson, C. and Stendahl, O.: Influence of the cell surface lipopolysaccharide structure of *Salmonella typhimurium* on resistance to intracellular bactericidal systems. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand [B]*. 81 : 473—480, 1973