

ニッケルの溶出と炎症誘発作用機構の解析

東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野

平澤 典保

Nickel (Ni) is contained in various alloys, which are widely used in accessories and biomaterials, and causes inflammation and allergy. However, little is known about the regulation of Ni release from alloys *in vivo*. In this study, we established a novel *in vivo* model in which the release of Ni from metal wire could be analyzed quantitatively. A Ni wire (99.9 %; ϕ 0.8 mm \times 5 mm) was implanted subcutaneously in the dorsum of mice. Ni ions in the skin tissue (diameter : 14 mm) on the wire were extracted and quantified by the fluorometry using Newport Green. The content of Ni ion in the tissue was significantly increased from 8 h. When lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g) was injected into the same site immediately after the implantation of Ni wire, the content of Ni ions in the tissue was significantly increased. These results suggest that the release of Ni from metal wires *in vivo* was enhanced by LPS-induced inflammation. The findings were confirmed by *in vitro* model using a macrophage-like cell line RAW264. RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) were seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in the medium containing LPS (0.1, 0.3 and 1.0 μ g/mL). LPS enhanced the release of Ni by RAW 264 cells in a concentration-dependent manner. Interestingly, the enhancement was observed only when the cells were attached with Ni plate. The inhibitor of lysosome chloroquine (10 μ M) and the V-ATPase inhibitor bafilomycin A₁ (1 nM) but not the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) inhibitor amiloride inhibited partially the elution of Ni by unstimulated RAW264 cells. In contrast, chloroquine, bafilomycin A₁ and amiloride potently inhibited that induced by the LPS-stimulated RAW264 cells. These results suggested that LPS-stimulated RAW264 cells caused the release of Ni ions via the release of lysosome and via the activation of V-ATPase and NHE. In conclusion, we established the novel models for the release of Ni from metals *in vivo* and *in vitro* and demonstrated that the activation of inflammatory cells apparently enhanced the release of Ni.

1. 緒言

肌に直接接する装飾品に含まれるニッケルは、汗で溶出されやすくアレルギーや炎症を誘発しやすい金属である。ひとたび金属アレルギーを発症すると、ニッケル以外の金属にも過敏になることが知られており、種々の装飾品により発赤、かゆみなどが生じて、装飾品を身につけることが制限される。また金属イオンにより強い接触皮膚炎を起こし、色素沈着を誘発する場合もあり、コスメトロジーの観点からも大きな問題となっている。ニッケルが金属アレルギーを最も引き起こしやすい金属であることは周知の事実であり、そのアレルギー誘発機構については多くの報告がなされてきた^{1,2)}。従来、ニッケルは組織蛋白に結合しハプテンとなると考えられてきたが、最近ニッケルは直接リンパ球上のMHC複合体に結合して、細胞を活性化することが明らかにされ³⁾、組織蛋白との結合による抗原の形成は必ずしも必要ではないことも示唆された。一方、金属アレルギーの初期段階はニッケルを含む装飾品や金属医用材料からのニッケルイオンの溶出である。しかしこのニッケル

が溶出される分子機構や炎症が生じて金属周囲組織の環境が変化した場合のニッケル溶出の変化の定量的な解析はこれまでなされていない。その最も大きな理由は優れた実験モデルがなかった点にある。

申請者はニッケル線をマウス背部皮下に埋植させる新規モデルを開発し⁴⁾、ニッケルによる炎症反応の誘発とニッケルの溶出を定量的に解析することを可能にした。本研究は、本モデルを用いて、ニッケル線からのニッケル溶出が、その周囲で感染を模倣した炎症を誘発したときに増大することを示した。また、炎症細胞を用いた細胞培養系でのニッケルイオン溶出評価系も確立し、ニッケル溶出の分子機構について解析した。

2. 実験方法

2-1. ニッケル線誘発炎症モデルの作製⁴⁾

Diethyl ether麻酔下、マウス(22-25g)の背部皮下に移植針(13G)を用いて、UV照射滅菌処理したニッケル線(99.98%ニッケル, ニラコ)(ϕ 0.8mm \times 5mm)を埋植した。その直後に、lipopolysaccharide (LPS, 5 μ g/mL) 0.2mLをニッケル線近傍に皮下投与した。対照群としてsalineを0.2ml皮下投与した。

2-2. 組織中のニッケル量の測定

一定時間後に、エーテル麻酔下マウスを脱血死させ、ニッケル線を中心に、皮打ち抜き用パンチ(内径1.4cm)で皮膚(表皮、真皮及び皮下組織)を打ち抜き、ニッケル



Elution of Ni ions from materials and enhancement by inflammation

Noriyasu Hirasawa

Laboratory of Pharmacotherapy of Lifestyle Related Diseases Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

線を除いた後、皮膚をEppendorf tube (1.5mL) に入れた。その後、Milli Q 水500 μ L加えて、ミンスし、4 $^{\circ}$ Cで24時間ニッケルイオンを抽出した。この上清を希釈し、Newport Green DCF dipotassium saltを最終濃度 1 μ Mとなるように加え、分光蛍光光度計F-2000 (日立ハイテク)を用いてEx 505nm/Em535nmの蛍光を測定した。

2 - 3. マウスマクロファージ様細胞株 RAW-264 細胞によるニッケル溶出の測定

ニッケル板 (99.98%, 厚さ 0.05 mm, ニラコ; 5 \times 5 mm) を 96 well plate の 1 well につき 1 枚ずつ設置し、RAW264 細胞 (1.0 - 5.0 \times 10⁵ cells/ml 10% (v/v) FBS-EMEM) を 200 μ L ずつ播種し、5% CO₂ 存在下 37 $^{\circ}$ C で一定時間培養した。ニッケル板非接着群は 96-well plate にあらかじめ RAW264 細胞を播種し、2 時間後にニッケル板を細胞と接触しないように斜めに設置した。

2 - 4. 薬物処理

細胞を播種した 2 時間後、chloroquine⁵⁾ (最終濃度 10 μ M)、amiloride⁶⁾ (最終濃度 100 μ M)、あるいは bafilomycin A₁⁷⁾ (最終濃度 1 nM) を加え 1 時間前処理した後、LPS (最終濃度 1 μ g/mL) で一定時間刺激した。

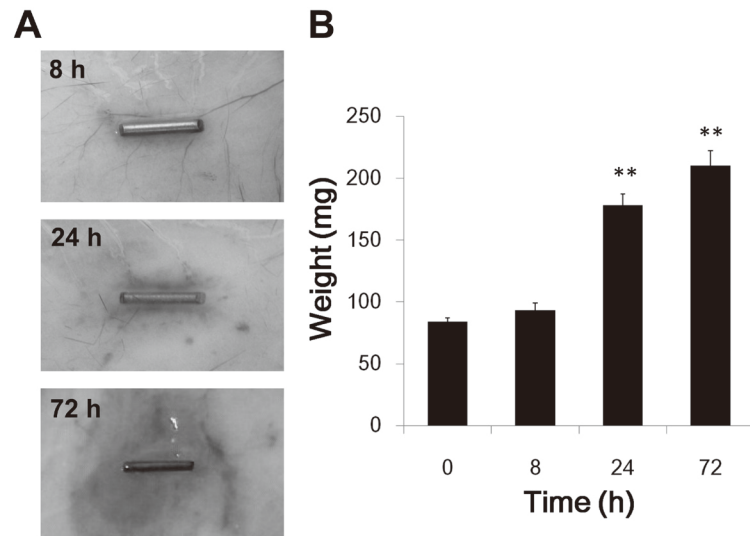


Figure 1. Ni wire-induced inflammation

(A) A Ni wire was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. The mice were sacrificed 8, 24 and 72 h after the implantation, and the skin around the wire was photographed.

(B) The skin tissue (diameter: 14 mm) on the wire was excised and the weight of tissue was measured. The values are the means of four mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; **P<0.01 vs. the 0 h group.

2 - 5. 統計処理

棄却検定はTompson's F-testにより行った。有意差検定はStudent-Newman-Keuls testにより行った。

3. 結果

3 - 1. ニッケル線誘発炎症

マウス背部皮下にニッケル線を埋植し、ニッケル線により生じる炎症を観察した。8時間後ではニッケル線周囲の組織において、弱いながらも発赤が認められ、24時間以後においては出血を伴う強い炎症が認められた (Fig. 1A)。また、浮腫のパラメータとして皮膚重量を測定した結果、8時間後の皮膚重量は100mg前後であり有意な増加は認められなかったが、24時間後においては170 - 180mg、72時間後においては200 - 220mgとなり、有意な増加が認められた (Fig. 1B)。

3 - 2. ニッケル線表面の観察

埋植して72時間後のニッケル線の表面を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。未処置のニッケル線の表面と比較して埋植後のニッケル線の表面は腐食が確認され、ニッケルが溶出していることが示唆された (Fig. 2)。

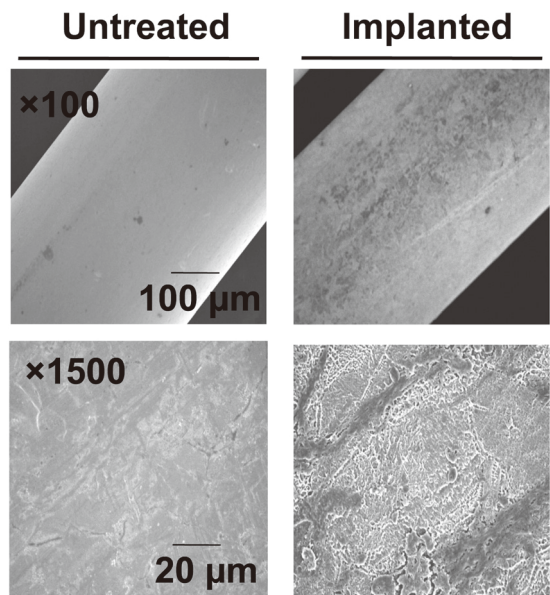


Figure 2. Erosion of the surface of Ni wire

The surfaces of untreated and implanted Ni wire (72 h) were analyzed by scanning electron microscope.

3 - 3. Lipopolysaccharide によるニッケル線周囲組織へのニッケル溶出量の増大

ニッケル線からのニッケル溶出が周囲の炎症反応により影響を受けるか明らかにするため、ニッケル線の埋植と同時に起炎剤 lipopolysaccharide (LPS) を用いて炎症反応を誘発した場合の、ニッケル溶出量の変化を解析した。埋植24時間後のニッケル線周囲組織の切片を作製後、Hematoxylin-Eosin 染色し組織形態を観察した。ニッケル線の埋植によりニッケル線周囲組織の皮膚の肥厚及び好中球やマクロファージなどの炎症細胞の浸潤が認められ、LPSを投与した場合はさらに炎症細胞の浸潤が増大した (Fig. 3A)。このような条件下でニッケル溶出について比較したところ、埋植8時間後及び24時間後においてLPSを注射した群 (LPS群) では、vehicle (Saline) を注射した場合 (Saline群) に比べてニッケル溶出が有意に増加した (Fig. 3B)。従ってLPSで炎症反応を誘発すると、ニッケル線からのニッケル溶出が促進することが明らかになった。

3 - 4. LPS 刺激マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 によるニッケル板からのニッケル溶出の促進

LPSによる炎症反応によりニッケル溶出が促進する現象が *in vitro* においても認められるか明らかにするため、マ

ウス腹腔由来マクロファージ細胞株であるRAW264細胞を用い、培養細胞によるニッケル溶出を検討した。96-well plateの各wellに5mm角のニッケル板を置き、10% FBSを含むEMEM培地を加えて24時間incubateした場合には顕著なニッケル溶出は見られなかった。しかし、ニッケル板上にRAW264細胞 (1.0 及び 3.0×10^5 cells/mL) を播種した場合には細胞数依存的にニッケル溶出が促進した。さらにRAW264細胞をLPSで刺激したところ、ニッケルの溶出量が有意に増加した (Fig. 4A)。

また細胞播種数を 1.0×10^5 cells/mL とし、RAW264細胞を各濃度のLPSで刺激したところ、LPS濃度依存的にニッケルの溶出量が増加した (Fig. 4B)。以上の結果から、RAW264細胞によりニッケル板からのニッケル溶出は促進され、この溶出作用はLPS刺激により細胞を活性化することにより著しく促進されることが明らかになった。

3 - 5. LPS 刺激 RAW264 細胞の培養上清の pH 解析

LPS刺激後のRAW264細胞の培養上清中のpHを解析した。その結果、培養上清中のpHは細胞数依存的に低下する傾向を示したものの、pH値7.2-7.5程度とその変動はごくわずかであった (Fig. 5A)。また、LPS刺激による培養上清のpH値の変化は認められず (Fig. 5B)、培養上清

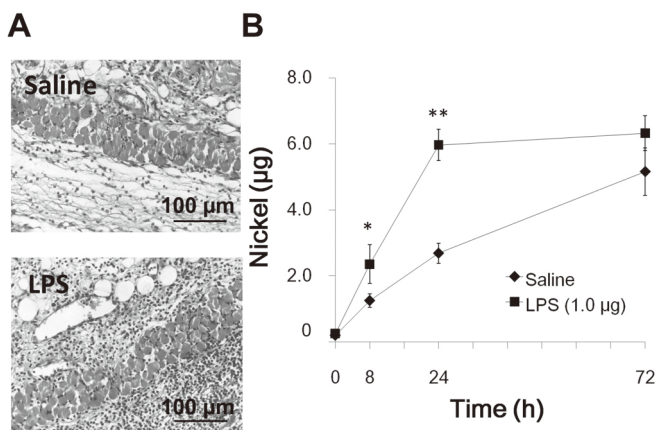


Figure 3. Increase in release of Ni by lipopolysaccharide-induced inflammation

(A) Ni wire was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. Lipopolysaccharide (LPS) was injected into the same site immediately after the implantation. Twenty-four hours after the implantation, the mice were sacrificed and the skin on the wire was dissected. Paraffin section of the tissue was prepared and stained with hematoxylin-eosin.

(B) The skin tissue (diameter: 14 mm) on the wire was excised 8, 24 and 72 h after the implantation of Ni wires and Ni in the tissue was quantified by the fluorometry. The values are the means of five mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; *P<0.05, **P<0.01 vs. the Saline group at the corresponding point.

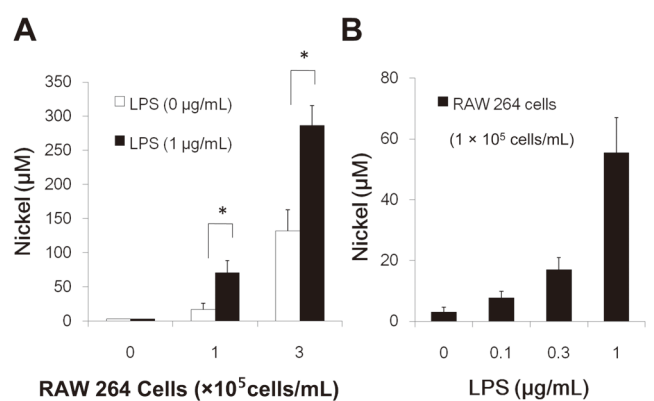


Figure 4. Enhancement of elution of Ni ions from Ni plate by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells

(A) RAW 264 cells (1 and 3×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in the presence (closed columns) or absence (open columns) of LPS (1 μg/mL). The values are the means of five samples with S.E.M shown by vertical bars. Statistical significance; *P<0.05 vs. the corresponding unstimulated group.

(B) RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in containing LPS (0.1 , 0.3 and 1.0 μg/mL). The concentration of Ni in the supernatant was determined after the 24 h incubation. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; *P<0.05 vs. the unstimulated group.

中のpHはLPS刺激の有無に関わらず、一定に保たれていることが明らかになった。従って、LPSによるニッケル溶出の増大は、培養上清のpHが低下したためではないことが示唆された。

3 - 6. LPS 刺激 RAW264 細胞によるニッケル溶出促進の経時変化

RAW264細胞をニッケル板上に播種し、LPSで刺激した時のニッケル溶出の経時変化を解析した。Mediumのみでincubateした場合、及びニッケル板上でRAW264細胞を培養した場合では、培養上清中のニッケル濃度は、24時間経過後もわずかに増加した程度であった。しかし、LPSでRAW264細胞を刺激した場合には培養液のニッケル濃度は播種4時間後から増加し始め、8時間以後ではLPSで刺激していない群と比較して有意に増加した (Fig. 6)。

3 - 7. RAW264 細胞によるニッケル溶出促進におけるニッケル板と細胞間の接着

RAW264細胞をLPSで刺激すると、ニッケル溶出が促進するメカニズムとして細胞とニッケル板の接着部位の微小環境において酸性化が生じニッケルが溶出する可能性が考えられる。この点を明らかにするために、RAW264細胞

をニッケル板上に播種しニッケル板と細胞を接着させた場合、あるいはニッケル板と細胞を接着させずに培養した場合のニッケル板からのニッケル溶出を比較した。その結果、LPSで刺激していない条件下ではRAW264細胞とニッケル板との接着及び非接着に関わらず、RAW264細胞のニッケル溶出量に差は認められなかった。しかし、RAW264細胞をニッケル板上に播種しニッケル板に接着させた場合では、RAW264細胞をLPSで刺激すると、ニッケル溶出が有意に促進したのに対し (P < 0.01)、ニッケル板がRAW264細胞と接着しない条件下においては、LPSで刺激を加えてもニッケル溶出の促進は認められなかった (Fig. 7)。従ってRAW細胞におけるLPS刺激によるニッケル溶出促進作用の発現には、ニッケル板と細胞との接着が必要であることが示唆された。

3 - 8. リソソーム阻害薬及びプロトン輸送阻害薬のRAW264 細胞によるニッケル溶出抑制作用

RAW264細胞によるニッケル溶出効果のメカニズムを明らかにするため、LPS非存在下リソソーム阻害薬 chloroquine (10 μ M)、Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) 阻害薬 amiloride (100 μ M)、vacuolar-type (H⁺)-ATPase (v-ATPase) 阻害薬 bafilomycin A₁ (1 nM) の各薬物

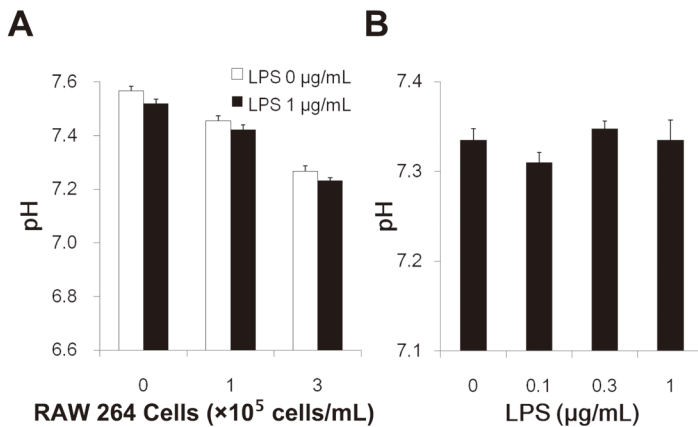


Figure 5. pH in the culture medium of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells

(A) RAW 264 cells (1 and 3 $\times 10^5$ cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in the presence (closed columns) or absence (opened columns) of LPS (1 μ g/mL). The pH of the culture medium was determined with pH meter. The values are the means of five samples with S.E.M shown by vertical bars.

(B) RAW 264 cells (1 $\times 10^5$ cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5mm square) and incubated for 24 h in containing LPS (0.1, 0.3 and 1.0 μ g/mL). The pH in the culture medium was determined with pH meter. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars.

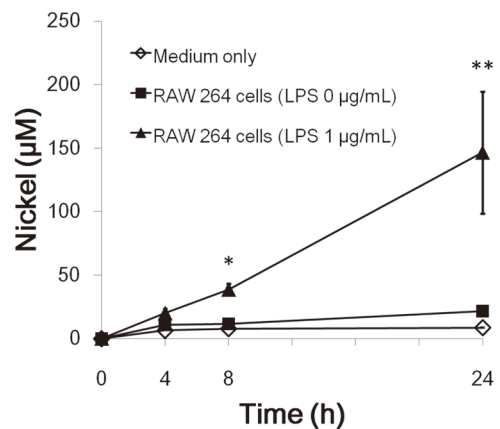


Figure 6. Requirement of cell attachment Enhancement of elution of Ni ions from Ni plate by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells RAW 264 cells (1 $\times 10^5$ cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 4, 8, and 24 h in the presence or absence of LPS (1.0 μ g/mL). The concentration of Ni in the culture medium was determined. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; *P<0.05, **P<0.01 vs. the corresponding unstimulated group.

を添加し、これらの薬物の影響を解析した。その結果、chloroquine 添加により非刺激RAW264細胞による24時間培養でのニッケル溶出は部分的に抑制され、bafilomycin A₁も有意差はなかったもののニッケル溶出を抑制する傾向が認められた。一方、amilorideにはニッケル溶出抑制効果が認められなかった (Fig. 8)。

また、RAW264細胞をLPSで刺激した場合の8時間でのニッケル溶出促進効果に対する効果を同様に解析した。その結果、chloroquine、amiloride及びbafilomycin A₁はいずれもLPSによるNi溶出促進を有意に抑制した (Fig. 9)。

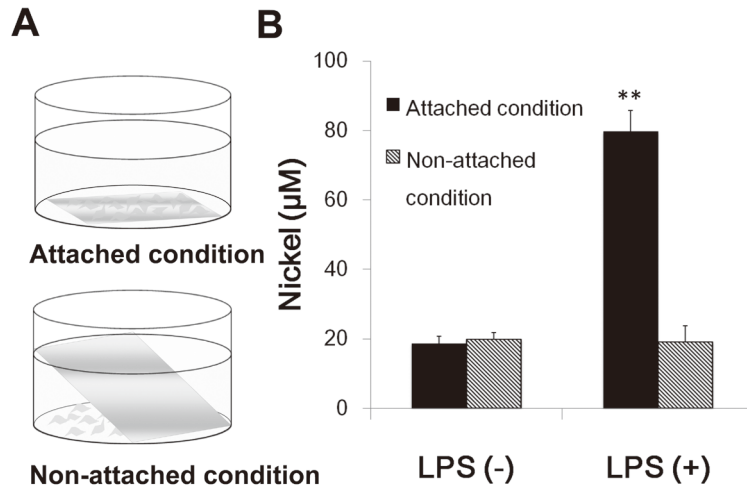


Figure 7. Enhancement of elution of Ni ions from Ni plate by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells on Ni plate

(A) Experimental scheme of culture condition of RAW 264 cells.

(B) RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on (attached condition) or under a Ni plate (non-attached condition) were incubated for 24 h in presence or absence of LPS (1.0 µg/mL). The concentration of Ni in the culture medium was determined. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; **P<0.01 vs. the corresponding LPS (-) group.

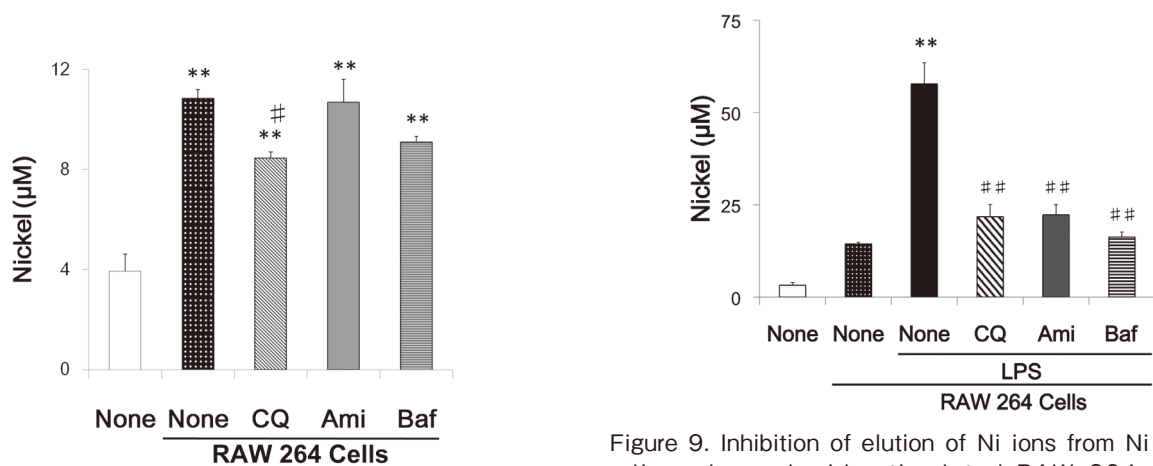


Figure 8. Effects of drugs on elution of Ni ions from Ni plate by unstimulated RAW 264 cells

RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) were seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in the medium containing chloroquine (CQ; 10 µM), amiloride (Ami; 100 µM) and bafilomycin A₁ (Baf; 1 nM). The concentration of Ni in the supernatant was then determined. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; **P<0.01 vs. medium alone (None) group, #P<0.05 vs. unstimulated RAW 264 cells group.

Figure 9. Inhibition of elution of Ni ions from Ni plate by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells by chloroquine, amiloride and bafilomycin A₁

RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) were seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 1 h in the medium in the presence of chloroquine (CQ; 10 µM), amiloride (Ami; 100 µM) and bafilomycin A₁ (Baf; 1 nM). Then the cells were stimulated with LPS (1.0 µg/mL) for 8 h. The concentration of Ni in the supernatant was then determined. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; **P<0.01 vs. unstimulated RAW 264 cells, ##P<0.01 vs. LPS control.

4. 考 察

種々の装飾品に対する金属アレルギーは皮膚の健康を考える上で、極めて大きな問題である。金属アレルギー誘発の初期段階として当然ながら金属イオンの溶出が必須である。したがって生体内での金属からの金属イオンの溶出を評価し、その溶出に伴う生体応答を明らかにすることは極めて重要である。しかしこれまで、生体内において金属溶出を詳細に解析できる実験系はなかった。そこで私たちは、ニッケル線をマウス背部皮下に埋植する炎症モデルを確立し、ニッケルの溶出を定量的に解析できるモデルを構築した。

ニッケル線をマウスの背部皮下に埋植し、LPSにより炎症反応を誘発するモデルは、金属製のバイオデバイスを外科的に体内に埋植した際に感染が生じた状態を模倣している。このような条件下で、金属からのニッケル溶出が増大することが明らかになったことは、医療材用の安全性評価の上で極めて重要なことである。

炎症細胞の活性化によりニッケル溶出が促進される現象は *in vitro* においても認められた。すなわち、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞がニッケルを溶出する作用をもつこと、さらに同細胞が起炎物質 LPS により活性化されると、ニッケル溶出効果が増大することが明らかになった。ニッケルに限らず、金属が腐食しイオンを溶出する原因として最も一般的なものが金属表面での酸性化である。本研究では LPS でニッケル溶出が促進した場合でも培養液中の pH は低下しなかったことと、ニッケル板上に播種した RAW264 細胞を LPS で刺激するとニッケル溶出が促進したのに対し、ニッケル板と接着しない条件下においては、LPS で刺激を加えてもニッケル溶出の促進は認められなかったことから、RAW264 細胞における LPS 刺激によるニッケル溶出の促進作用はニッケル板と細胞との接着面で生じ、この局所環境において LPS 刺激により酸性化が生じていることが示唆された。

マクロファージは体内に侵入した異物を除去する機構を備えており、貪食した分解すべき異物を含むファゴソームの形成と、細胞由来の様々なタンパク分解酵素を含むリソソームを融合しファゴリソソームを形成して消化分解する。リソソーム内のタンパク分解酵素は至適 pH が酸性であるため、リソソーム膜にある V-ATPase により細胞質内プロトン積極的に取り込んでいる。Chloroquine は弱塩基性の化合物で細胞内に取り込まれリソソーム内に取り込まれ中和する作用がある。無刺激のマクロファージによるニッケルの溶出はリソソームを中和する chloroquine 及びリソソームを酸性化を抑制する V-ATPase 阻害薬 bafilomycin A₁ により抑制されたことから、未活性状態のマクロファージによるニッケル溶出はリソソームの放出が関与して

いると考えられる。一方、マクロファージが LPS 刺激により活性化すると、細胞膜にある V-ATPase や Na⁺-H⁺ Exchanger (NHE) などのイオン輸送系が活性化することが明らかになっている⁸⁻⁹⁾。Amiloride は細胞膜上に発現している NHE の阻害薬であり、bafilomycin A₁ はリソソーム膜上の V-ATPase と同様に細胞膜上に発現している V-ATPase も阻害する。今回の実験では LPS により活性化されたマクロファージの Ni 溶出促進効果を bafilomycin A₁ 及び amiloride が強く抑制した。以上のことから、マクロファージは金属表面ではこれを異物と認識してプロトンを含むリソソームのエキソサイトーシスにより、また LPS で活性化するとリソソームの放出に加え細胞膜の V-ATPase や NHE が活性化され、細胞外への H⁺ 放出をさらに増大させて著しくニッケル溶出が促進されると考えられる。

5. 総 括

本研究において、生体内でのニッケル溶出は炎症細胞の活性化により促進されることが明らかになった。そのため装飾品や医用金属材料の安全性評価には従来の試験管内での耐汗性試験、耐唾液性試験では不十分である可能性が示唆された。特に LPS 刺激したマクロファージ様細胞株を用いたニッケル溶出系は、金属性装飾品等の安全性評価に有用であると考えられる。また、コスメトロジーの観点からは、皮膚のバリア機能をはじめ、健康な皮膚を維持することが金属アレルギーの低減につながるものと考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。また、本研究にご協力くださいました東北大学大学院工学研究科大津浩教授ならびに成島尚之教授に深く御礼いたします。

(引用文献)

- 1) Basketter, D.A., Briatico-Vangosa, G., Kaestner, W., Lally, C., Bontinck, W.J. (1993) Nickel, cobalt and chromium in consumer products: a role in allergic contact dermatitis? *Contact Dermatitis*, **28**:15-25.
- 2) Sato, N., Kinbara, M., Kuroishi, T., Kimura, K., Iwakura, Y., Ohtsu, H., Sugawara, S., Endo, Y. (2007) Lipopolysaccharide promotes and augments metal allergies in mice, dependent on innate immunity and histidine decarboxylase. *Clin. Exp. Allergy*, **37**: 743-751.
- 3) Thierse, H.J., Moulon, C., Allespach, Y., Zimmermann, B., Doetze, A., Kuppig, S., Wild, D., Herberg, F., Weltzien, H.U. (2004) Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni²⁺ to TCR/MHC contact sites in nickel-

- specific human T cell activation. *J. Immunol.* **172** : 1926-1934.
- 4) Hirasawa, N., Goi, Y., Tanaka, R., Ishihara, K., Ohtsu, H., Ohuchi, K. (2010) Involvement of prostaglandins and histamine in Nickel wire-induced acute inflammation in mice. *J. Biomedical Materials Res. Part A*, in press.
- 5) Schneider, P., Korolenko, T.A., Busch, U. (1997) A review of drug-induced lysosomal disorders of the liver in man and laboratory animals. *Micros. Res. Tech.*, **36** : 253-75.
- 6) Kleyman, T.R., Cragoe, E.J. Jr. (1988) Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.*, **105** : 1-21.
- 7) Bowman, E.J., Siebers, A. and Altendorf, K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 7972-7976.
- 8) Brisseau, G.F., Grinstein, S., Hackam, D.J., Nordström, T., Manolson, M.F., Khine, A.A., Rotstein, O.D. (1996) Interleukin-1 increases vacuolar-type H⁺-ATPase activity in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* **271**: 2005-2011.
- 9) Vairo, G., Royston, A.K., Hamilton, J.A. (1992) Biochemical events accompanying macrophage activation and the inhibition of colony-stimulating factor-1-induced macrophage proliferation by tumor necrosis factor- α , interferon- γ , and lipopolysaccharide. *J. Cell. Physiol.*, **151**:630-641.