



Title	モルモット白血球中のリユーコザイムCの諸性状について
Author(s)	深山, 昭雄
Citation	大阪大学, 1961, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/28430">https://hdl.handle.net/11094/28430</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	深 山 昭 雄 み やま あき お
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 234 号
学位授与の日付	昭 和 36 年 10 月 4 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	モルモット白血球中のリユーコザイムCの 諸性状について
	(主 査) (副 査)
論 文 審 査 委 員	教 授 天 野 恒 久 教 授 藤 野 恒 三 郎 教 授 須 田 正 巳

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 目 的

先に教室の関はモルモット白血球より大腸菌をスフェロプラスト化する性質を有し、しかもリゾチームとは異なるリユーコザイムCの存在を明らかにした。本物質は、生体の感染防禦機能に、ある役割を果たしているものと考えられるので、著者は精製を試みてその性状を明らかにしようとした。

#### 方法並びに成績

精製法：健康モルモットの腹腔から多核白血球を採集し、これを凍結乾燥した後、PH7.0, M/15 磷酸緩衝液で抽出した。この粗抽出液を硫酸分画、セファデックスG-25 による処理、等電沈澱 (PH5.2) の各過程を経て精製した。精製リユーコザイムCは、リゾチーム、リユーコザイム A $\alpha$  等の抗菌性物質を全く含まない。その活性は、大腸菌のスフェロプラスト形成により判定し、精製リユーコザイムCでは粗抽出液の約40倍まで純度を高めることが出来る。

#### 性 状

##### 1) 安定性

リユーコザイムCは、易熱性で56°C 1時間の加熱で容易に変性し、4°Cの保存では2日で活性は半分に低下するが、0.1Mグリシンの共存下では4日間は活性を維持することが出来る。又至適 PH は7.0であり、PH6.0以下では活性は急速に消失する。

##### 1) 抗菌スペクトル

大腸菌以外に次の細菌が感受性であった。V.comma, V.tyrogenus, Sal. enteritidis, Sal.typhimurium, Sal.schottmuelleri, Sal.para A, Sal.ballerup, Sal.para C, Sh.flexneri, Sh.sonnei, Kl.pneumoniae, Aerobacter, Serratia, Pseudomonas, N.gonorrhoeae, St.albus, 等であった。St.albus は例外として St.aureus, Streptococcus, Diplococcus, B.subtilis, B.megaterium 等のグラム陽性菌には感

受性がなく主としてグラム陰性菌に作用することが明らかとなった。*Sal.typhosa* は非感受性であるが、これは Vi 抗原の有無に無関係で、Vi 抗原を持つ *Sal.para C*, *Sal.ballerup* は感受性であった。*St.albus* の場合は、グラム陰性になるのみで菌の溶解は起らない。

### 3) 既知加水分解酵素との区別

著者はリユーコザイムCが、その作用から脂質分解酵素ではないかと考えていたので、特にホスファターゼ、エステラーゼ活性の有無に注意した。粗抽出液中にはホスファターゼ、エステラーゼ、活性共に存在するが硫酸沈澱により、酸性ホスホモノエステラーゼを除いて殆んどが消失する。しかし、酸性ホスホモノエステラーゼの至適 PH が5.0であり PH7.0 では活性がなく、反対にリユーコザイムCは PH6.0 以下で活性を示さないこと、及び D.F.P によって全く阻害されないことから、リユーコザイムCは、ホスファターゼ、エステラーゼとは明らかに異なるものである。

### 4) 細菌内毒素に対する作用

コリシン K-O 抗原に対する チモザン処理リユーコザイムCの作用に関して既に著者らが報告したが、更にコリシン K-O 抗原の持つ毒性がリユーコザイムCの作用で変化されるか否かを調べた。毒性の判定は、ザルコーマ37を持ったマウスに内毒素を投与した時起るザルコーマ組織中の出血を観察して行った。硫酸沈澱により粗分画リユーコザイムCの作用を受けた内毒素は明らかに解毒されていることが判ったが、この解毒因子は56°C 1時間の加熱で不活化されない。更に精製リユーコザイムCにも解毒作用を認めるが、この因子は56°C 1時間の加熱で不活化される。従って白血球中には比較的耐熱性の解毒因子と易熱性の解毒因子の二種類を含むと考えられる。

### 5) コリシン K-O 抗原に対する作用

リユーコザイムCの作用を受けたコリシンK産生菌が細胞壁よりコリシンK蛋白を溶出するのと同様に、精製コリシン K-O 抗原にも作用してトリクロル酢酸不溶性、100° 10分加熱で変性するコリシン蛋白の分離が起ることを証明した。この作用を有するリユーコザイムCは 56°C 1時間の加熱で不活化され、EDTA, Mg イオンの存在で影響されない。又作用をうけたコリシン K-O 抗原を、Zone electrophoresis により研究した結果、作用をうけない対照に比べ多糖体のパターンが異なることを明らかにした。

### 6) 白血球内に於ける局在性

白血球を0.34Mの冷蔗糖液中で破壊し、分画遠心を行った結果、400g 10分で沈澱する核分画、8200g 15分で沈澱する顆粒分画には活性を見出せず、20.000g20分で沈澱する分画に活性を認めた。

### 総 括

本物質は酵素であるのか否かについては未だに断定出来ないが、細菌の細胞壁を構成する主成分である多糖体—脂質—蛋白質複合体に変化を与えるものであることは明らかである。

## 論文の審査結果の要旨

生体の感染防禦機構に白血球が重要な役割を果していることは周知の事実である。*Metchnikoff* はこの白血球が侵襲細菌に対して示す抵抗性が喰細胞による喰菌の結果、喰細胞中に存在する“Cytase”による

と考えたが、具体的にかかる活性物質を抽出することに失敗した。

当教室に於ては、白血球より、既に他の研究者により報告された lysozyme 及 leukin とは異なる溶菌性物質を抽出し、Pfeiffer の現象を始めとして、生体内で行われる現象を試験管内に於て、再現し、そのメカニズムを明らかにすべく努力して来た。leucozyme C も、かかる一連の実験に於て白血球より抽出された溶菌性物質であった。しかしかかる溶菌性物質が生物学的に種々の活性を有している反面、酵素的に多分の研究の余地を残している。特に leucozyme C が大腸菌の溶菌を起すという点に於て、従来不解明の点の多いグラム陰性細菌に対する作用を酵素化学的に追究することは、白血球内に於ける溶菌性物質の果す役割を理解する上に於て、重要な意義を持つと考える。

1. 本研究はかかる目的で行われたもので、先ず leucozyme C を精製することによって白血球中の他の溶菌性物質と分離し、従来生体内で抗菌作用或は抗菌体内毒素作用を持つと考えられていた lysozyme, Alkaline phosphatase, acid phosphatase 等とは明らかに異なる活性物質であることを示した。

2. 精製 leucozyme C の感受性試験の結果、サルモネラの中で *Salm. typhosa* のみが、又大腸菌の中で *E. coli* K235L-O のみが非感受性である以外は、極めて広汎圀のグラム陰性菌に作用することが判明した。同時に leucozyme C の作用点が、かかるグラム陰性菌の細胞壁に存在することを確かめ代表的な例として、*E. coli* K235L+O の細胞壁主成分であるコリミン K-O 抗原に対する作用を観察し、精製 leucozyme C が O-抗原複合体に包蔵されているコリシンK活性を TCA 不溶性、100°C 10分の加熱で不活化するように変化せしめた。無処理のものは極めて安定で、TCA 可溶性である。そしてその変化を zone electrophoresis によって観察した結果、対照に比較して、陽極に速く移動する多糖質成分が出現することを見出したが、主成分は対照と同じ移動度をもつに拘らずコリシンK活性だけが、上記の処理に不安定になることを示した。

一方、該 O- 抗原に leucozyme C が作用した結果還元糖の増量を全然示さない点より考えて、著者は、O- 抗原複合体中の多糖体を互に集合せしめている。セメント様物質に作用するものと考えている。

3. 細胞成分の生物学的、化学的变化に加えて、同時にコリシン K-O 抗原のもつ菌体内毒素作用にも影響を及ぼし、毒素が持つ肉腫壊死作用を用いた判定から leucozyme C が無毒化作用を持つことを明らかにした。

著者は leucozyme C がグラム陰性菌の細胞壁に対する作用の一端を示し、同時に菌体内毒素の無毒化が白血球抽出液によって起ることを始めて報告したものである。白血球内に於て、leucozyme C の果す役割を考える時、これが特にグラム陰性菌の侵襲及、菌体内毒素に対する生体防禦機構の一翼を担っていることは、本研究より想像しうる所である。この点に於いて、本研究は、細菌学の分野に寄与すること大であると考えらる。