

| | |
|--------------|---|
| Title | 発熱性物質に関する薬理学的研究, 殊に各種細菌性発熱性物質とその発熱機序について |
| Author(s) | 吉田, 稔 |
| Citation | 大阪大学, 1968, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/29424 |
| 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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 吉 田 稔 よし だ のり |
| 学位の種類 | 薬 学 博 士 |
| 学位記番号 | 第 1 3 2 9 号 |
| 学位授与の日付 | 昭 和 4 3 年 2 月 2 9 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 2 項該当 |
| 学位論文名 | 発熱性物質に関する薬理学的研究、殊に各種細菌性発熱性物質とその発熱機序について |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 岩田平太郎 (副査) 教授 川崎近太郎 教授 上原喜八郎 教授 青木 大 |

論 文 内 容 の 要 旨

細菌性発熱性物質の発熱理論に関する研究は現在まで Wood 一門及びその流れをくむ Atkins 一派の広汎な研究が主流となっているが、なお充分な統一解釈は行なわれていない。現在わが国においては医薬品の安全対策の一環として、各種注射液の発熱性物質試験法が第 7 改正日本薬局方に収載され特にブドウ糖及びリンゲル液については国家検定によってそれらの安全性を保つようはかられている。国家機関にある著者はその業務の遂行上発熱性物質試験に関する多くの問題に遭遇し、これらの問題を系統的に明らかにし、より深く発熱理論を進展せしめることを目的として発熱物質に関する薬理学的研究を行なった。

第 1 編

細菌性発熱性物質がグラム陰性菌の細胞膜成分である Lipopolysaccharide を主体とするものであることはすでに明らかなことである。そこで各種細菌より精製発熱性物質を抽出し、化学的、生理学的性状を明らかにした。

1) グラム陰性菌として *E. coli*, 腸炎ビブリオ 5 種, グラム陽性菌として *St. aureus*, *Bac. subtilis*, *Strp. hemolyticus* 及び酵母 *Sac. cerevisiae* の各々のアセトン乾燥菌体を Westphal 法で抽出、精製し各々の精製細菌性発熱性物質を得た。

2) 上記の得られた精製細菌性発熱性物質を常法によってその総燐及び総窒素を分析した。その結果、*E. coli* においては燐及び窒素含有量は夫々 4.5% 及び 4.7% であり、その比はほぼ 1 に近い値が示された。またその他の精製細菌性発熱性物質についても分析を行なった結果、その含有量はいずれも大同小異を示し、特に菌株間に著明な差を認めなかった。さらに坂口反応は疑陽性を示し、Fehling 反応も陽性を示すことから微量の蛋白質と糖等から構成せられていることがわかった。紫外部吸収は 260 m μ において極大吸収を示し、KBr 法により赤外部吸収スペクトルは "Lipid A" の

pattern に類似していることを認めた。

3) 発熱作用については *E. coli* 精製発熱性物質の家兎体温を 0.6°C 以上発熱させるいわゆる最少発熱量は $0.002\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (耳静脈内注射) であり, $0.2\ \mu\text{g}/\text{kg}$ までの Fever Index と投与量の間には, ほぼ直線的な関係がみとめられた。また発熱曲線はいずれも典型的な2峰性を示した。*Bac. subtilis* 精製発熱性物質は $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (耳静脈内注射) で発熱性を示し, 且つ2峰性の発熱曲線を示した。また *St. aureus* 及び *Strp. hemolyticus* のそれはいずれも発熱性が弱く, $100\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 1000\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (耳静脈内注射) 程度の量で発熱性が認められた。しかしながら, これらの発熱曲線はほとんど1峰性のみを示し, その発熱ピークは, *E. coli* による第2峰目とほとんど同じ時間に発現した。腸炎ビブリオの各型の精製発熱性物質はそれぞれ $1\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (耳静脈内注射) の間において1峰性の発熱曲線を示した。酵母 *Sac. cerevisiae* の精製発熱性物質は $10\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (耳静脈内注射) において発熱性を示したが, 発熱曲線は2峰性を示さない。

第2編 白血球性発熱性物質について

前編で述べた如く, 例えば *E. coli* 精製発熱性物質が極めて強い発熱活性を示すが, この様な発熱の機作は Wood 一門によって提唱されている理論によれば細菌性発熱性物質によって血中多核白血球が Conversion をうけ, 所謂白血球性発熱性物質を産出し, これが発熱中枢に直接反応して発熱を惹起するものとされている。しかしながら, それらの機序やその特性についてもなお検討を要する多くの問題が残されている。そこで著者は組織培養の研究に使用されている回転式培養器を新たに白血球性発熱性物質の産出実験に導入し, 以下の実験を行ないその産出過程について考察を加えることができた。

1) 白血球性発熱性物質の産生条件

多核白血球数と白血球性発熱性物質産生の関係について検討した。

即ち, 多核白血球を採取するため健常家兎に無菌生理食塩水を腹腔内に注射, 約18時間後, 全腹水を無菌的に採取, 遠沈分離した。

この一定血球量を 41°C , 1時間 incubate 後遠沈し, その上清の白血球性発熱性物質の産生量をみた処白血球数に対応することを認めた。

また白血球性発熱性物質の産生に対する incubation temperature の影響を検索する目的で 0° , 25° , 37° , 41° , 43°C の各温度で1時間 incubate し, incubation 後遠沈, 上清に産生された白血球性発熱性物質について検討した結果, 41°C で incubate した場合がその産生に最適であることを認めた。この温度は正常家兎体温よりも $2^{\circ}\sim 3^{\circ}\text{C}$ 高いことであり, これは細菌性発熱性物質の注射による体温上昇と何らかの関係を有するものと考えられる。

次に白血球性発熱性物質の産生に対する incubation time について検討した。即ち 0° , 25° , 37° , 41°C の incubation temperature においてその incubation time を30分, 1時間, 2時間について行なった結果, 白血球性発熱性物質の産生は30分, 1時間において最高に達した。

またその産生に対する血清の影響を検討した。その結果, incubation medium 中に正常家兎血清を加えることにより産生は著明に抑制された。又血清中に含まれる Ca^{++} についても同様の効果を示すことも判った。

多核白血球における白血球性発熱性物質の産生の由来は全く不明である。そこでこの問題を解明する目的で次の如き実験を行なった。即ち、生理食塩水 medium と生理食塩水に正常家兎血清を附加した medium についてそれぞれ白血球を浮遊させ 41°C で incubate し、遠沈後その白血球を超音波処理し、intracellular fraction とし、先の上清を extracellular fraction として検討した。その結果、生理食塩水 medium 中では発熱性物質は intracellular fraction におけるよりも extracellular fraction により多く存在していることが証明された。血清附加 medium (medium 中に発熱性物質を放出することを抑制する) 中では extracellular fraction の発熱性物質は附加血清濃度の増加に従って減少し、intracellular fraction においても発熱性物質は殆んど存在しなくなることが証明された。以上のことから白血球性発熱性物質が細胞内で産出され細胞外に放出されると考えるならば、白血球性発熱性物質の放出を抑制する条件、即ち附加血清 medium 中では intracellular fraction における発熱性物質量は増加するはずである。しかるに実際には増加しないので、白血球性発熱性物質は細胞内で不活性の状態が存在し、細胞膜を通過して細胞外に放出されるとき活性化されるのではないかと考えられる。

Incubation による多核白血球のエオジン染色性を検討し、白血球性発熱性物質の産生が多核白血球の細胞活性と如何なる関係にあるかを考察した結果、白血球のエオジン染色能の増大が白血球性発熱性物質の産生の増大と平行していることが判った。この事から、白血球性発熱性物質の産生は白血球の degeneration に関係しているものと考えられる。

2) 白血球性発熱性物質の特性

化学的特性として蛋白質沈殿試薬で沈殿する。Folin 試薬に陽性であり、紫外部吸収は著明な吸収を示さず、270 m μ にわずかな吸収が認められた。加熱に対する安定度は 56°C、30分間で完全に不活化された。磷酸緩衝液、蒸留水で透析しても発熱活性部分は透析されない。さらに平均 80,000 \times g で 240 分間超遠沈してもその上清中に発熱活性が存在し、沈渣部分にはその活性を認めなかった。また振盪によりその活性が減少することから白血球性発熱性物質の構造が極めて不安定であることを示すものと考えられる。

生物学的特性として家兎耳静脈内注射したとき、その発熱活性は一定の範囲内では投与量に対応して Fever Index は増大するが、ある範囲を越えた場合、hyperthermic ceiling 現象を示す。発熱曲線は 1 峰性である。一方家兎に対する頻回耳静脈内注射を行なっても耐性現象を生ぜず耳静脈内注射によっても leukopenia は認められない。

第 3 編 家兎に対する細菌性発熱性物質の耐性現象について

細菌性発熱性物質を家兎に頻回注射するとき、家兎の発熱反応が次第に減弱し、発熱性物質に対して耐性を獲得することが知られている。かかる耐性発現の現象を解明する目的で *E. coli* 精製発熱性物質の発熱に対する耐性獲得の過程を明らかにし、更に抗体産生と如何なる関係にあるかについて実験を行なった。

1) 精製発熱性物質の投与間隔と耐性形成速度との関係について検討した。即ち、*E. coli* 精製発熱性物質 0.02 μ g/kg (耳静脈内注射) の投与により第 1 回目は典型的な 2 峰性の発熱曲線を示す、この発熱が正常体温に回復したことを確かめてから第 2 回目の投与を行なった。かかる操作を約 1 昼夜

繰返した結果、第2回目以後の投与では初回と異なり発熱曲線も1峰性となり、最高発熱度も漸減し、減衰方向をたどっていくことがわかった。また長時間反復注射の場合(2~3日間隔で数週間)精製発熱性物質を投与し、耐性形成の様相を観察した。その結果、耐性は早期に形成され、約10日前後に於いて感受性は約1/2に減少した。その後は進行度も著明でなく、除々に一定となった。

2) *E. coli* ワクチンの反復投与により抗体価は著明に上昇するが、発熱度はそれ程著明に減少しない。またこの様な0抗原に対する免疫家兎は同一の細菌から得た精製発熱性物質に対する Fever Index も余り減少されず抗体は精製発熱性物質に対応するものとは考え難い。

第4編 ブドウ糖による細菌性発熱性物質の活性増強作用に関する研究

ブドウ糖溶液中に発熱性物質が混在する場合、その濃度と発熱活性の関係を検討した。その結果、活性の増強することが明らかとなり、その機作を究明するために2,3の実験系で検討した。

1) ブドウ糖液各濃度及びリンゲル液 1 ml 及び 10 ml と1定量の *E. coli* 精製発熱性物質とを混合し投与した場合、発熱活性は両者共 1 ml/kg 投与では対照と差はない。ブドウ糖 10 ml/kg 投与では濃度に対応して著明にその活性は増大したが、リンゲル液 10 ml/Kg 投与ではその活性は減弱した。

2) 2,4-dinitrophenol の発熱活性に対しても、*E. coli* 精製発熱性物質の場合と同様の結果を得た。

3) In vitro で各種濃度ブドウ糖液及びリンゲル液 medium 中での白血球性発熱性物質の産生を検討した。その結果ブドウ糖液濃度の増加によりかえって白血球性発熱性物質の産生は抑制された。

4) 上記実験系に *E. coli* 精製発熱性物質を附加した場合について検討した。その結果、上記同様糖濃度上昇に伴って抑制された。

5) 血液コロイド滲透圧の変化が、発熱性の発現に関与しうることが考えられるので、高張食塩水注射による *E. coli* 精製発熱性物質活性に対する影響を検討した。その結果、その活性は増強されず、むしろ減弱することが明らかとなった。

第5編 発熱性物質に対する各種解熱剤の効果に関する研究

精製細菌性発熱性物質及び白血球性発熱性物質に対する解熱剤の効果について比較検討し、両発熱性物質の発熱機構を解明する一助とするため以下の実験を行ない検討した。

1) Aspirin, Antipyrene, Aminopyrine, Phenacetin, Quinine 及び Barbital の家兎正常体温に及ぼす影響を検討した。その結果、Aminopyrine は経口、耳静脈内注射によってやや低下を示した。その他は殆んど影響を示さなかった。

2) *E. coli* 発熱性物質の耳静脈内注射 (0.001 $\mu\text{g}/\text{kg}$) による1峰性の発熱に対する解熱効果(経口投与)の強さは Aminopyrine > Quinine > Antipyrene > Aspirin > Phenacetin の順となり Barbital においては解熱効果を認めなかった。

3) 白血球性発熱性物質 (20 mg/kg) 耳静脈内注射による発熱に対する解熱効果は Antipyrene においては、認められず、Aminopyrine は著明な効果を示した。また Barbital もわずかな抑制効果を示した。

結 論

精製細菌性発熱性物質として Westphal の原法によって抽出，精製し発熱活性の高いものを得た。従来発熱反応を誘発させるには発熱性物質の多量投与が必要であり，多量投与による発熱以外の生体に対する種々の毒作用の誘発により発熱現象を説明する上に支障を来たしていたが，精製発熱性物質を用いることによりこれを除き得ることが出来たと信ずる。

また従来充分に出来なかった発熱に関与する多核白血球の *in vitro* 実験系における態度を観るため組織培養の回転式培養器を使用し，実験時間を短縮し，*in vitro* の実験系として適切な操作法とすることが出来た。その結果，種々の incubation の至適条件等を見出し得た。

更にブドウ糖が少量の細菌性発熱性物質の発熱活性を増強することを見出し，この現象が白血球を介する系或いは血液コロイド滲透圧の変化によるものでない他の機作によることを明らかにした。

また発熱性物質の発熱機序を検討する一助として，解熱剤をもちい細菌性及び細菌性及び白血球性両発熱性物質による発熱に対する解熱効果を比較検討し，発熱機序と解熱剤の作用機序との間の関連性を示すものとして興味ある知見を得たと考える。

論文の審査結果の要旨

本論文は細菌性発熱物質の抽出精製を行ない発熱活性の高いものを得，その薬理学的性質について検討し，又発熱に関与する白血球性発熱性物質の産生条件と形成の要因につき説明を行なったもので，両物質間の干渉，ブドウ糖による発熱活性の増強等について幾多の新知見を含んでおり学位論文として価値があると考えらる。