Deoxycholate による細菌性発熱物質の 不活化作用について

持 田 研 秀, 加 納 晴 三 郎

(国立衛生試験所大阪支所)

(昭和45年8月3日受付〔特〕)

細菌性発熱物質 (Pyrogen) としての内毒素は、リボ多糖が主要な成分であるが、1966年 Ribi ら¹⁾は、Pyrogen と Deoxycholate (DOC) を混合して家兎に静注するとき、発熱反応が著しく減少し、透析または希釈によって DOC を除去すると再び発熱活性が回復するという事実を認めた。Ribi らはこの現象について、つぎのような説明を与えた。すなわち、一般に Pyrogen は親水性および疎水性を示すリボ多糖であって、ミセルを形成し、その分子量は40ないし70万を示す巨大分子である。この高分子ミセル構造が界面活性作用をもつ DOC によって崩壊し、低分子化され発熱活性が失われる。さらに、DOC を透析または希釈によって除去するとき、低分子化されたリボ多糖は再び会合し、巨大ミセルに復元し、発熱活性も回復すると述べている。しかし、界面活性作用を有する Dodecylsulfate あるいは Polyoxyethylenglycol などは、DOC のような Pyrogen の不活化作用を示さない事実は²⁾、上述の解釈に疑問をいだかせるものであり、他の作用機序を考慮するべきであろう。

一般に Pyrogen の発熱作用は、血中に投与された Pyrogen が直ちに脳幹に達し、視床下部における発熱中枢を刺激し、初期の発熱としてあらわれる発熱曲線の第一峰を形成する。さらに、Pyrogen は血中の多核白血球 (Polymorphonuclear leucocyte, PMN) を含む網内系細胞に捕捉され、その結果としてこれらの細胞群よりいわゆる内因性発熱物質を産生し、これが二次的に発熱中枢を刺激することにより、後期の比較的持続する第二峰の発熱反応が惹起されるものと考えられており、Bennett³⁾、山田ら⁴⁾、Wood⁵⁾、Atkins ら⁶⁾によって提唱されている発熱機構の理論として受け入れられている。

また、この内因性発熱物質のうち、最も重要なものは、PMN から遊離される白血球性発熱物質 (Leucocytic pyrogen, LP) の内因性発熱物質があり、他とほぼ同一の生理的特性をもつことが報告されている^{6,7)}。

著者らは、このような Pyrogen の発熱機構にたいして、DOC による不活化作用が単なるミセル崩壊のみによって説明し得るものかについて疑問をもち、さきに述べた発熱機序に如何なる影響をおよぼすかについて、若干の検討を加えた。

実験材料ならびに方法

1) 実験動物と発熱試験

実験動物は、体重 2.0~2.5kg の雄性家兎のみを使用した。発熱試験は、日本薬局方第七版に準拠し、発熱量 (Fever Index, FI) の測定は、加納ら⁸⁾の方法に従った。

2) 細菌性発熱物質の調製

阪大微研より分譲された大腸菌 UKT-B 株を常法によりブイヨン培地中で、37°C 18^h 培養したのち集菌し、アセトン乾燥菌体として、Phenol 法⁹⁾により細菌性発熱物質 (Lipopolysaccharide 分画, LPS) を得た。

3) 多核白血球の調製

家兎に滅菌生理食塩水 400ml を腹腔内に注射し、18^h 後に 2.5% のクエン酸ナトリウム液 20ml および滅菌生理食塩水 80ml を混合して再び腹腔内に注射し、直ちに腹水を無菌的に採取する。約 200ml の白濁した浸出液が得られる。このものは約90%以上の多核白血球を含んでいる。この浸出液を軽く遠沈したのち、上清を捨て、再び滅菌生理食塩水を加えて 10⁷cells/ml の多核白血球浮遊液を調製する¹⁰⁾。

4) 多核白血球の呼吸測定

滅菌生理食塩水に所定濃度の多核白血球を浮遊させ、ワールブルグ検圧計をもちい、常法¹¹⁾により酸素吸収度を測定した。血清は正常家兎の心臓採血を行なったものを用いた。また、大腸菌を加熱して得た 10^{8-9} cells/ml の不活化菌をもちい、Phagocytosis 効果を観察した。

5) 乳酸量の測定

乳酸量を Baker ら¹²⁾の方法に従い測定した。

6) 末梢血管色素透過性の測定

Ranadive ら¹³⁾の方法に従い、家兎背部を脱毛し、中心線の両側に 0.1ml づつ Pyrogen または LP の溶液を皮下注射し、べつに 0.2% Trypan-blue 溶液を 5ml/kg を耳静脈より注射する。一定時間後に皮下注射部位 2 箇所平均青色部分の直径を測定する。反応が陰性のものを－、0.5cm 以下のものを±、0.5～1.5cm のものを＋、1.5cm 以上のものを＋としてあらわした。

7) その他

その他必要な実験方法は、結果の項に記述した。

実 験 結 果

〔1〕 DOC による Pyrogen の発熱活性抑制について

Pyrogen の 1.0 μ g/ml を無菌的かつ Pyrogen を含まない生理食塩水にとかし、これに DOC を 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 および 0.031% 終濃度に添加し、20～30^m 間室温に放置する。これを一群 2～3 羽の家兎に 1ml/kg づつを静注し、その発熱曲線より FI-5 を求めたところ、図 1 に示すような結果が得られた。すなわち、DOC は Pyrogen の発熱活性を 0.125～0.5% までの濃度範囲で抑制され、この抑制効果は一週間の透析によって DOC を除去すると回復する。また、滅菌水で 10 倍希釈するときも部分的に回復される。

〔II〕 *in vitro* における DOC と Pyrogen の相互作用

(1) 家兎の発熱耐性獲得と DOC の影響

家兎に Pyrogen を反復注射すると、家兎の発熱反応は次第に低下し、耐性の獲得がみられることは良く知られている。このような耐性獲得は、内毒素のさまざまな生理活性に共通にみられる現象であって、網内系機能の変化と密接な関係にあることが、Beeson ら¹⁴⁾の研究によって認められている。

著者らは Pyrogen の耐性現象について、DOC の影響を検討するために、Pyrogen, Pyrogen と DOC の混合、DOC の三者を家兎に注射し、耐性獲得の様相を観察し、その結果を図 2 および図 3 に示した。

すなわち、図 2 の A 群の第一日目に 0.5 μ g/kg の Pyrogen を静注した家兎は、典型的な二峰性の発熱曲線を示し、第二日目に同量の Pyrogen を静注するとき、第一峰は消失し一峰性となる。また、発熱反応も減弱しいわゆる耐性獲得が認められる。一方、B 群の DOC を添加し不活化された Pyrogen を静注すると、第一日目は発熱反応を認めないが、第二日目に同量の Pyrogen を静注するとき、A 群と同様に二峰性を失い発熱反応に若干の変化が認められる。さらに、第一日目に DOC のみを静注した C 群は、第二日目の Pyrogen の静注により二峰性の発熱曲線が得られ、DOC の影響を受けないことがわかった。

Fig. 1. Effect of deoxycholate (DOC) on the *E. coli* pyrogen.

Fig. 2. Typical fever curves of the pyrogen treated with deoxycholate (DOC).

Fig. 3. Effect of Deoxycholate (DOC) on the pyrogenicity of bacterial pyrogen. DOC; 0.5 % of DOC/ml/kg i. v. bacterial pyrogen; 0.1 μ g/kg. i. v.

そこで、Pyrogen 静注の前後に DOC を投与するときの発熱反応の変化を図3に示した。いずれの場合も DOC による影響は認められなかった。

2) *in vitro* における PMN にたいする DOC の作用

a) PMN の酸素消費におよぼす DOC の影響

Pyrogen の発熱反応における LP の動態には、その反応の過程の重要な媒体であることが知られている。著者らも *in vitro* において、LPS を trigger として PMN の LP 産生条件について報告した¹⁵⁾。一方、流血中の白血球は Pyrogen 投与によって、初期に減少し後期にやや増加することが認められている。これらの事実は、DOC による Pyrogen の不活化作用と PMN にたいする DOC の作用について相関性を明確にする必要がある。

そこで、PMN の酸素消費をワールブルグ検圧計を用いて測定するとき、 2.5×10^{-4} M 濃度の DOC (約 1%) を加えたもの、これに 10% の家兎血清を添加したものおよび PMN に加熱死菌として大腸菌 10^8 cells/ml を添加して Phagocytosis 過程にあるものについて検討を行なった。図4および図5に示すように、DOC の添加により PMN の呼吸は著しく抑制を受けるが、血清の添加によって抑制は回復し、拮抗がみられる。さらに Phagocytosis 過程にある呼吸は増加するが、DOC の添加によって抑制を受ける。また、血清の添加によりさきと同様 PMN の呼吸は回復し、DOC と拮抗することが確かめられた。

b) PMN の *in vitro* における乳酸産生におよぼす DOC の影響

Pyrogen 投与による発熱反応時に、家兎の血中乳酸量が増加することは古くから知られている。しかし、PMN から LP が産生する過程において、DOC の作用との相関性は明らかにされていない。そこで、PMN の浮遊液 6.7×10^7 cells/ml にたいして DOC が 0.015, 0.03, 0.06 および 0.125% (終濃度) になるよう添加し、一定時間 incubate したのち、乳酸産生量を測定したところ、表1に示したような結果を得た。

すなわち、乳酸の産生は DOC の各濃度段階で抑制を受けた。しかし、Pyrogen を添加するとき乳酸産生

Fig. 4. Effect of deoxycholate (DOC) on the respiration of polymorphonuclear leucocytes in vitro. DOC was added at final concentration from 2.5×10^{-4} to 10^{-5} M.

Fig. 5. Effect of deoxycholate on the respiration of polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis with *E. coli* cells. Phagocytosis was carried out by the addition of 10^8 cells/ml of heat-killed *E. coli* into PMN suspension.

Table 1 Effect of DOC on the production of lactic acid from PMN *in vitro*.

Conc. of DOC (%)	Production of lactic acid (μg)
0.125	40.1
0.06	45.0
0.03	52.5
0.015	60.0
—	74.0
1 μg/ml of LPS	105.0

6.7×10^7 cells/ml of PMN (polymorphonuclear leucocytes) was used. PMN were incubated at 37°C for 24 hours with shaking in saline.

Fig. 6. Effect of Deoxycholate (DOC) on the pyrogenicity of leucocytic pyrogen.

After 10 mg/ml of leucocytic pyrogen was mixed with DOC and incubated at 25°C for 10 min. the mixtures were injected 1 ml/kg i.v.

は促進した。

c) LP にたいする DOC の直接不活化作用

さきに述べたように, DOC は Pyrogen にたいして 0.125~0.5%濃度において発熱活性を抑制した。しかし, 発熱反応の媒体となる LP にたいする効果は明らかではない。そこで, LP 10mg/ml に DOC 0.5~0.005% (終濃度) を添加したものを, 家兎に 1ml/kg を静注し, その発熱活性を比較したところ, 図6のような結果が得られた。すなわち, DOC は *in vitro* でほとんど LP の発熱活性を不活化しないと考えられる。

d) PMN より LP 遊離におよぼす DOC の影響

PMN 浮遊液にたいして, DOC を 0.5~0.005% (終濃度) に添加し, さらに, Pyrogen を 0.1 μ g/ml または 0.01 μ g/ml (終濃度) に添加し, incubate したのち, 各々の遠心上清を家兎に静注して, 発熱活性を比較したところ, 表2のような結果を得た。

Table 2 Effect of the mixture of pyrogen and DOC on the production of leucocytic pyrogen from polymorphonuclear leucocytes *in vitro*.

Dose of pyrogen (μ g/ml)	No. of PMN (cell/ml)	Conc. of DOC (%)	FI-3
—	10 ⁸	—	28.5
—	"	0.5	3.0
—	"	0.05	19.0
—	"	0.005	27.0
0.1	5.0 $\times$ 10 ⁷	—	22.5
"	"	0.5	3.0
"	"	0.05	23.0
"	"	0.005	21.5
0.01	2.5 $\times$ 10 ⁷	—	18.0
—	"	—	20.0
0.01	—	—	35.0

Pyrogen and DOC are mixed into saline and made to the above final concentration with PMN (polymorphonuclear leucocytes) and incubated for one hour at 41°C in roller tubes.

すなわち, DOC は PMN に Pyrogen を添加の有無にかかわらず, ほとんど影響はかわらない。

したがって, LP の遊離における DOC の作用は顕著ではないといえる。

〔Ⅲ〕DOC の二・三の薬理作用

(1) Pyrogen および LP の血管色素透過性にたいする DOC の作用

一般に, 炎症反応では末梢血管の透過性の亢進がみられる。Pyrogen および LP も同じ性質を示すことが確かめられ, 発熱反応の解析に必要な属性と考えられている。したがって, この血管色素透過を促進する因子にたいする DOC の作用を検討することが必要である。

そこで, Pyrogen 1.0, 5.0, 10.0 μ g/ml/kg および LP 10⁸cells/ml/0.1ml 相当量を DOC の 0.03~0.4% 濃度に単独または共存下で家兎背部に皮下注射し, トリパンプルー溶液を静注したのち, 背部皮下注射部位の色素漏出度を測定した結果を, 表3に示した。表3のように, Pyrogen は 1.0 μ g/ml/kg で色素透過性の亢進がみられ, 投与量に対応して, 色素漏出度の増大が認められた。DOC の 0.4%濃度は, 投与したのち直ちに漏出度の亢進がみとめられ, 時間の経過によって変化しないという特徴がある。また Pyrogen の色素透過促進作用にたいして, DOC は著明な変化を認めなかった。さらに, 表4に示すように, LP においても DOC は影響をおよぼさない。

(2) DOC の溶血作用

DOC の皮下注射部位に出血斑を認めたことから, その溶血作用に注目し, 家兎脱繊維素血球を DOC 0.03

Table 3 Effect of DOC on the permeability of pyrogen in rabbit.

Conc. of DOC (%)	Conc. of Pyrogen (μ g/ml/site)	Permeability			
		0.5	1.0	2.0	3.0
0.4	without	+	+	+	+
0.04	"	—	—	—	±
0.004	"	—	—	—	—
0.0004	"	—	—	—	—
without	1.0	+	+	+	+
0.04	"	+	+	+	+
0.004	"	+	+	+	+
0.0004	"	+	+	+	+
without	5.0	+	+	+	+
0.04	"	+	+	+	+
0.004	"	+	+	+	+
0.0004	"	+	+	+	+
without	10.0	+	++	++	++
0.04	"	+	++	++	++
0.004	"	+	++	++	++
0.0004	"	+	++	++	++

Permeability is expressed as follows; ++, mean diameter is 1.5cm or over. +, mean diameter is 1.0cm.

Table 4 Effect of DOC on the permeability of leucocytic pyrogen in rabbit.

Conc. of DOC (%)	Conc. of LP (0.1ml/site)	Permeability (hrs)**			
		0.5	1.0	2.0	3.0
saline	sup.* of suspension	+	+	+	++
0.4	of 10^8 /ml at 41°C for	+	+	+	++
0.04	1hr <i>in vitro</i>	+	+	+	++
0.004		+	+	+	++
0.0004		+	+	+	++

* Sup. Supernatant of suspension of 10^8 cells/ml after centrifugation at 700g $\times$, 15min.

** Permeability was expressed as follows; ++, mean diameter was 1.5cm or over. +, mean diameter was 1.0cm.

～0.25%濃度を含む生理食塩水に1滴ずつ添加し、37°における溶血作用を表5に示した。すなわちDOCの0.03%濃度で若干の溶血性を認めたが、正常家兔血清はDOCの溶血作用を抑制した。

なお、対照のSaponinは、0.0009%濃度で溶血作用を示した。

(3) Pyrogenの発熱反応におよぼすSaponinの影響

DOCの溶血作用とPyrogenの不活化作用に何等かの関連があると考え、SaponinのPyrogen発熱反応におよぼす影響を検討した。さきの実験〔II〕と同様DOCに代わりSaponinをもちいたところ、図7に示すような結果を得た。すなわち、Pyrogenの発熱反応にたいして、Saponinは不活化作用を示さず、むしろ発熱反応を増強する効果を認めた。また、最初にSaponinを静注したのち、Pyrogenを投与するとき、Pyrogenの発熱反応が増強された。したがって、DOCの溶血作用は、Saponinを対照とする実験においては、Pyrogenの不活化作用との関連性はないと考えられる。

Table 5 Hemolytic activity of DOC on rabbit blood cells *in vitro*.

Conc. of DOC or saponin (%)	Conc. of serum (%)	Incubation time (min)			
		0	10	30	60
DOC					
0.25	without	++	++	++	++
0.125	"	—	++	++	++
0.06	"	—	++	++	++
0.03	"	±	±	±	±
DOC					
0.25	10.0	++	++	++	++
0.125	"	+	+	+	+
0.06	"	—	±	±	±
0.03	"	—	—	—	—
Saponin					
0.0035	without	++	++	++	++
0.0018	"	—	—	+	++
0.0009	"	—	±	±	±
Saline	without	—	—	—	—

++; completely hemolysed, ±, partially hemolysed. —, no hemolysis.

Fig. 7. Effect of saponin on the fever response of pyrogen injection separately. (A); control pyrogen (0.5 µg/kg), (B); saponin (0.5 % of saponin/0.5ml/kg) plus pyrogen (0.5 µg/kg), (C); saponin and pyrogen were separately injected.

考 察

発熱物質の活性は、DOC の一定濃度範囲で不活化され、その抑制限界濃度はほぼ0.125%, 3.1×10^{-6} Mであった。一方、発熱物質とDOCの相対モル比は $1:10^{-6}$ となり、発熱反応の不活化作用が発熱物質の分子構造の変化に由来するとは説明しにくい。そこで、著者らは、発熱物質の呈する反応の過程が、さまざまな薬理作用の集積であるとされつつある現状において、この過程にたいするDOCの作用を逐次解析することによって、発熱物質の不活化作用を明らかにすることを試みた。

一般に、発熱物質による発熱機序は、最初に生体内に投与されるとき、発熱物質は直接発熱中枢に作用して発熱曲線に示される第一峰を形成し、ついで発熱物質が多核白血球を含む網内系細胞に捕捉され、いわゆる内因性発熱物質が産生し、比較的持続的な第二峰の発熱曲線を形成するといわれている。

したがって、最初DOCを添加し、混合させて注射するとき、発熱物質は低分子化され発熱反応を惹起しないが、第二日目に再び発熱物質を反復投与するとき、図2に示すようにほとんど差違を認めなかった。したがって、DOC処理した発熱物質は、発熱反応におけるreceptorに結合しえないものと考えられる。

さらに、発熱反応における重要な媒体 LP を生産する PMN にたいする作用をしらべたところ、*in vitro* における酸素消費は、DOC の $10^{-4}M$ 濃度で抑制をうけるが、血清の添加によって回復する。また、PMN の Phagocytosis 過程における酸素消費は数倍に増加するが、DOC の $10^{-4}M$ 濃度で抑制が認められ、さきと同様に血清の添加によって回復する。さらに、呼吸系の抑制されるのに併行して、表 1 に示すように乳酸の産生が抑制をうける。したがって、DOC の呼吸抑制は特異的ではなく、流血中の PMN にたいして DOC の作用は顕著な影響を示さないと考えられる。一方、PMN から LP の遊離される過程と、LP にたいする DOC の直接不活化作用は図 6 および表 2 に示すように著明な作用を認めなかった。また、炎症反応の重要な指標となる末梢血管透過性を促進する因子は、PMN から遊離する LP に混在しており、この因子にたいする DOC の作用を検討したところ、表 4 に示すように、DOC は対照と比較して著しい抑制効果を示さなかった。したがって、DOC は炎症反応に特異的に作用するものとは考えにくい。また、DOC はわずかに溶血作用を示すが、血清によって阻止されること、溶血能を有するサポニンは逆に発熱反応を増強するという事実から、DOC による発熱物質の不活化作用は、溶血性が原因ではない。

以上の事実から、DOC の発熱物質の不活化作用は、DOC の示す薬理作用から説明することは困難であるが、その他の作用機序が介在するものと考えられ、今後の検討が必要である。

結 論

細菌性発熱物質は、その発熱活性が界面活性能を有する DOC によって不活化されることを確認した。この不活化機序について、DOC の示す二・三の薬理作用と関連して検討した。

1. DOC は発熱物質にたいして、0.125% 以上で不活化作用を示し、透析あるいは希釈によって発熱活性は回復する。
2. DOC は *in vivo* で発熱物質の不活化作用を示さない。
3. 発熱反応の媒体となる白血球性発熱物質の遊離阻害あるいは直接的な不活化作用を認めなかった。
4. 白血球の呼吸にたいして特異的な抑制作用を示さなかった。
5. 血管透過性促進因子にたいして影響を与えなかった。
6. DOC はわずかに溶血性を示すが、血清によって阻止される。溶血能を有するサポニンは、DOC とは逆に発熱反応を増強する。

以上の事実から、DOC の不活化作用については、他の原因が考えられる。

本論文の要旨は第36回日本薬理学会近畿部会（昭和44年、大阪）で発表した。

謝 辞

本研究にあたり御教示を戴いた京都大学薬学部高木博司教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Ribi, E., Anacker, R. L., Brown, R., Haskins, B. and Malmgran, K. C.: J. Bacteriol. 92, 1493 (1966).
- 2) Rudbach, A. J. and Milner, K. C.: Canadian J. Microbiol. 14, 1173 (1968).
- 3) Bennett, I. L. and Beeson, P. B.: J. Exp. Med. 98, 493 (1953).
- 4) 山田 肇: 臨床薬理学大系VI, 67 (1963). 中山書店, 東京.
- 5) Wood, W. B.: Lancet 2, 53 (1958).
- 6) Atkins, E.: Physiol. Rev. 40, 580 (1960).
- 7) Wood, W. B. and King, M. K.: J. Exp. Med. 107, 293 (1958).
- 8) 加納, 川崎, 吉田: 日薬理誌62, 135 (1966).
- 9) Westphal, O. and Luderitz, O.: Angew. Chem. 66, 407 (1954).

- 10) *Kaiser, H. K. and Wood, W. B.:* J. Exp. Med. **115**, 27 (1962).
- 11) *Sbarra, A. J. and Karnovsky, M. L.:* J. Biol. Chem. **234**, 1355 (1959).
- 12) *Baker, S. B. and Summerson, W. H.:* J. Biol. Chem. **138**, 535 (1941).
- 13) *Ranadive, N. S. and Cochrane, C. G.:* J. Exp. Med. **124**, 605 (1968).
- 14) *Beeson, P. B.:* J. Exp. Med. **86**, 39 (1947).
- 15) *Kanoh, S., Kawasaki, H., Yoshida, M. and Mochida, K.:* Japan J. Pharmacol. **17**, 125 (1967).