白血球性発熱物質の遊離機構について

小 川 義 之, 加 納 晴 三 郎

国立衛生試験所 大阪支所*

(昭和49年5月1日)

要約: 家兎腹水系多核白血球 (polymorphonuclear leucocytes, PMN) の *in vitro* での白血球性発熱物質 (leucocytic pyrogen, LP) 生成遊離機構を明らかにするために, まず PMN を培養して経時的に細胞外の LP の発熱活性と, 細胞内各種分画の発熱活性の消長を調べた. つぎに PMN の培養に伴う LP の生成遊離と, lysosome の動態を β -glucuronidase の活性を指標にして測定し, 両者の相互関係を追求して, 次のごとく実験成績がえられた. 1) microsome および lysosome 分画は細胞外 LP と異なる time lag の長い持続的上昇を示す発熱パターンであった. 105,000 g 上清は細胞外 LP と同じく time lag の短い典型的な内因性 pyrogen の発熱パターンを示した. 2) 37°C で PMN を培養したとき, 細胞外 LP の活性は60分がもっとも強く, 105,000 g 上清分画は30分がもっとも強かった. 3) 37°C で PMN を培養したとき細胞外へ遊離される総蛋白は培養30分までにほぼ完了していた. また 105,000 g 上清分画の蛋白量も培養30分までに著明に減少した. 4) PMN を 37°C で細菌性発熱物質 (lipopolysaccharide, LPS) と共に培養すると lysosome の崩壊が促進されたが PMN より分画して得た lysosome と LPS とを 37°C で培養しても lysosome の崩壊は認められなかった.

緒 言

内毒素による発熱反応は内因性発熱物質ことに多核白血球 (polymorphonuclear leucocytes, PMN) を介する白血球性発熱物質 (leucocytic pyrogen, LP) が媒体であろうとされている.

LP の産生ならびに遊離機構については古くから報告がみられる. すなわち Bennet ら¹⁾ は最初にウサギの腹水系 PMN より LP の抽出が可能であることを示し Kaiser および Wood ら²⁾ はウサギの LP は PMN 内で propyrogen として存在しており, これが PMN の *in vitro* での培養によって代謝過程, とくに解糖系の昂進により活性化され LP となって細胞外へ遊離されると述べている. 同様の事実が Nordlund ら³⁾ によりヒトの白血球においても認められておる. この PMN の代謝昂進は細菌性発熱物質 (lipopolysaccharide, LPS) の添加により促進されることが Yunis ら⁴⁾ や Rossi ら⁵⁾ の詳細な研究により明らかにされている.

LP の細胞内分布については最初に, Herion ら⁶⁾ は PMN の細胞内顆粒の発熱性を検討した結果 lysosome 分画に発熱活性があると報告した. また山田ら⁷⁾ は 14,000 g 沈渣の好中顆粒および microsome 分画に発熱性があり, 前者が強い活性を示すと述べている. しかしながら Janoff ら⁸⁾ は Herion らの実験を追試した結果, 活性を認めなかったと報告している. Wood 一門の Hahn ら⁹⁾ も同様に lysosome 分画に発熱性を認めることができなかったが, 9,000 g 上清分画に活性があると報告している.

これらの事実はなお LP の細胞内局在性について十分に明らかにされておらず, また活性化機構と遊離機構がどのような形で行なわれているかについて十分な説明がなされていないことを示している. 一方, さきに著者ら¹⁰⁾ は LP の遊離条件を検討し, LP の遊離パターンが細胞の degeneration と相関性があることを示したが, とくに lysosome が主要な役割を演ずるものではないかと考えられ, 今回は細胞内の顆粒系とくに lysosome と LP との関係について検討した.

* 540 大阪市東区法門坂町 6

実験方法ならびに実験材料

1) 家兎および体温の測定

加納ら¹¹⁾の方法により行なった。

2) 腹水系多核白血球 (PMN) の採取

加納ら¹²⁾の方法により行なった。すなわち家兎に無菌の pyrogen free の 0.15M NaCl 400 ml 腹腔内に注射し、約18時間後に1%クエン酸ソーダを加えた 0.15M NaCl 100 ml を再注射し無菌的に腹水を採取した。この腹水中には約90%以上の PMN が含まれていた。この腹水は 800 r.p.m. 5 分間遠心分離を行ない沈渣の PMN を集めた。

3) PMN の培養および LP の抽出

Kanoh ら¹⁰⁾の方法で 37°C の回転培養器で一定数の PMN を生理食塩水中で培養し、一定時間後に細胞を遠心分離し、その上清を LP とした。

4) LPS の調製

阪大微研保存株 E.coli UKT-B より Westphal 法¹³⁾により抽出した。

5) 0.34M sucrose による PMN 顆粒分画法

Cohn¹⁴⁾の方法を多少修飾して行なった。すなわち $10^8 \sim 10^9$ PMN cells/ml 0.15M NaCl 浮遊液を 800 r.p.m. 5 分で遠心分離して沈渣の PMN を 5 ml の ice cold 0.34M sucrose で 2 回洗浄して最後に 7 ml の 0.34M sucrose 中 0°C でパスツールピペットで激しく 5 分間ピペッティングを行なった。ついで 250 g 5 分で遠心分離を行ない、沈渣について 0.34M sucrose で同様に操作を行ない得られた上清を合わせて 4°C で保存した。つぎにこの上清を 0°C 400 g 10 分で遠心分離し、さらにその上清を 8,200 g 30 分で遠心分離して得られた沈渣を 0.25M sucrose 1 ml に浮遊させて lysosome 分画とした。8,200 g 上清をさらに 105,000 g 30 分遠心分離し沈渣を 1 ml の 0.25M sucrose に浮遊させたものを microsome 分画とした。

6) 蛋白の定量

Lowry-Folin 法¹⁵⁾で行なった。

7) 顆粒分画の崩壊度の測定

(i) β -glucuronidase; lysosome は marker enzyme として β -glucuronidase 活性を指標となし、また β -glucuronidase の遊離を指標として lysosome の崩壊度を測定した。すなわち Fishman ら¹⁶⁾の方法に従い 0.1 または 0.2 ml 被検液について基質 0.1 ml の 0.01M phenolphthalein glucuronic acid の Na 塩および酢酸緩衝液 (0.1M, pH 4.5) で全量を 1 ml として 38°C で特別な場合を除き、15 時間消化後遊離した phenolphthalein の color density を 550 m μ で測定した。 β -glucuronidase の活性単位は反応液 1 ml 中に遊離した phenolphthalein の μ g/hr/0.1 ml で示した。

(ii) Optical density の変化による方法: Bernheimer ら¹⁷⁾の方法を部分的に修飾して行なった。すなわち 0.25M sucrose に浮遊した顆粒を 37°C で培養し 520 m μ における O.D. の変化を経時的に測定し O.D. の減少をもって崩壊の指標とした。

実験結果

1) PMN 培養による LP 遊離と各分画の発熱活性

腹水系 PMN よりの LP の遊離パターンとそれに伴う PMN の細胞内各分画の発熱性の消長を知るために、PMN を 37°C で回転培養し経時的に PMN より Cohn の方法¹⁴⁾で各分画を調製し、それぞれの発熱性を検討した。この結果 Fig. 1 に示したごとく、105,000 g 上清は LP と同様の time lag の短い典型的な LP の発熱パターンを示した。しかし顆粒分画は time lag の長い持続的発熱上昇パターンを示した。そこでこれらの細胞分画部のうち 105,000 g 上清と細胞外液の発熱性が PMN の培養時間とともにどのように変化するかを測定した。その結果を Fig. 2 に示した。

Fig. 1. Typical fever response curves of the fractions obtained from PMN cells.
 ○—○; extracellular fluid. ●—●; 105,000 g supernatant.
 ×—×; lysosomal fraction. △—△; microsomal fraction.

Fig. 2. Pyrogenicity of extracellular fluid and 105,000 g supernatant of PMN cells after incubation at 37°C in saline.
 Vertical bars; standard error.
 Figures in parenthesis; number of experiments.

図に示されたごとく、細胞外液の発熱性は60分が最高であった。また105,000 g 上清は、30分が最高で、以後その活性は減弱した。またこのときの microsome 分画と lysosome 分画を同時にその発熱性を測定した。その結果を Table 1 に示した。microsome および lysosome 分画は培養時間が長い程それらの発熱量では次第に大となる傾向がみられた。

2) 細胞外液および105,000 g 上清のゲル濾過パターン

上述の実験により105,000 g 上清分画および細胞外液分画の発熱性が培養時間と共に消長することが明らかになったので、この現象をゲル濾過パターンによりさらに明らかにしようと試みた。すなわち、PMN をそれぞれ30, 60および90分培養し得られた105,000 g 上清、細胞外液を Bio-gel P-150 カラムによって溶出パターンを

Table 1. Pyrogenicity of some fractions of PMN cells incubated at 37°C in saline.

Fractions	Incubation time (min)	Number of experiments	Dose (mg/kg)*	Pyrogenicity (FI-3)
Extracellular	0	1	0.11	non pyrogenic
	30	4	0.45	13.3±2.22**
	60	4	0.59	15.7±1.93
	90	1	0.68	18.4
105,000 g supernatant	0	5	0.74	8.4±1.93
	30	3	0.70	9.2±1.23
	60	4	0.69	6.2±1.36
	90	1	0.27	non pyrogenic
Microsomal	0	2	0.09	4.0±0.60
	30	1	0.16	6.8
	60	1	0.13	7.8
	90	1	0.13	10.0
Lysosomal	0	1	0.15	non pyrogenic
	30	1	0.27	7.6
	60	1	0.14	non pyrogenic
	90	1	0.13	8.6

10⁸ PMN cells/ml were incubated at 37°C in saline.

* mg of protein/kg i.v. ** Mean±S.E.

調べた。その結果を Fig. 3 に示した。細胞外液では溶出量 60 ml を peak とする第一の分画と溶出量 160～170 ml を peak とする第二の分画が得られた。著者らは発熱性が主として第一の分画に存在することをすでに確めている（未発表）。培養時間に伴って第一分画の peak がわずかに大となる他はそれらのパターンに大差は認められなかった。

105,000 g 上清分画では細胞外液の第一分画よりも早く溶出される分画と、細胞外液と同じ溶出位置の第一および第二の分画が得られた。第二の分画に相当する分画が相対的に多く、培養を始めて30分後の 105,000 g 上清分画は培養しないときに比べて、溶出量 60 ml を peak とする第一の分画が著しく減少していた。

3) 培養による PMN 細胞内 lysosome の崩壊

以上の実験結果から in vitro で PMN を培養すると、LP の生成遊離は培養時間と共に細胞内外で変動を示していることが明らかになった。そこで細胞内 lysosome の崩壊がこの現象とカップルしているかを調べた。lysosome の崩壊度を β -glucuronidase 活性の消長を指標として調べた。その結果は Fig. 4 に示されているごとく、lysosome 分画は培養時間と共に β -glucuronidase の活性が減少した。とくに培養開始後30分までが著明であった。105,000 g 上清分画も lysosome 分画と同様な態度を示した。 β -glucuronidase の細胞外への遊離は培養時間と共に増加した。また、このときのこれら3分画の蛋白量を測定しその結果を Fig. 5 に示した。lysosome 分画および 105,000 g 上清分画は培養時間と共に蛋白量が減少した。その減少の状態は β -glucuronidase 活性の減少とはほぼ一致していた。細胞外への蛋白の遊離は30分までに著明に認められ、それ以後はほとんど認められなかった。

すでに腹水系 PMN に in vitro で LPS を添加することにより LP の遊離が促進されることは Moore ら¹⁸⁾により明らかにされているが、LPS を PMN に添加して培養したとき顆粒分画の酵素活性の消長についてはなお明らかでない。そこで LPS を最終濃度でそれぞれ 10, 100 および 1,000 μ g/ml となるように 4×10^9 cells/ml の PMN 浮遊液に添加して、37°C 30分間培養したのち、細胞外液、105,000 g 上清分画および lysosome 分画を調製し、それぞれの β -glucuronidase 活性を LPS 無添加の control と比較した。その結果を Table 2 に

Fig. 3. Elution patterns of extracellular fluid and 105,000 g supernatant on bio-gel P-150. 10^8 PMN cells/ml in saline were incubated at 37°C for 30, 60 and 90 min. Extracellular fluid and 105,000 g supernatant, 5 ml and 4 ml respectively, were applied on the column (2.5×28 cm) and eluted with PBS (0.1 M, pH 7.4).

示した。すなわち細胞外液分画ではLPSの添加により β -glucuronidaseの遊離増加がみられ、またlysosome分画および105,000 g上清分画においては、LPSの10および100 μg により β -glucuronidase活性が増加した。しかし1,000 μg では活性は抑制される傾向にあった。これらの結果よりPMNを生理食塩水中で 37°C の培養によりおこったlysosomeの崩壊が、LPSを添加して培養すると、さらにこの現象が促進されることが明らかになった。

4) LPSをlysosomeとin vitroで直接培養したときの影響

前の実験において細胞レベルでLPSが添加されたとき、lysosomeの崩壊がおこり、 β -glucuronidaseが遊離することが明らかになったので、この現象がlysosomeに対する直接作用であるかを知るため、lysosomeとLPSを0.25M sucrose中で 37°C で培養し次の(i)および(ii)の方法により検討した。

i) β -glucuronidaseの遊離におよぼす影響。

LPSとlysosomeを90分培養したのち、8,200 gで遠心分離してその上清の β -glucuronidase活性を測定

Fig. 4. β -Glucuronidase activity of the three fractions of PMN during the cells incubation in vitro at 37°C.

After incubation of 5 ml of PMN suspensions (8×10^8 cells/ml) at 37°C in saline, these were fractionated into three; extracellular (5 ml), lysosomal (1 ml) and 105,000 g supernatant (7 ml). The β -glucuronidase activity was measured (in 0.2 ml of each fraction).

Fig. 5. Protein content of the fractions during PMN cells incubation in vitro at 37°C.

Table 2. Effect of LPS on the β -glucuronidase in PMN fractions.

Dose of LPS (μ g/ml)	Extracellular fluid	Lysosomal fraction (Units)	105,000 g supernatant
—	0	13.0	5.2
10	0	33.0	7.2
100	2.5	34.0	13.8
1,000	7.5	10.5	10.0

After incubation of 8 ml of PMN suspensions (4×10^8 cells/ml) with LPS at 37°C for 30 min in saline, these were fractionated into three; extracellular (8 ml), lysosomal (1 ml) and 105,000 g supernatant (7 ml). The β -glucuronidase activity was measured in 0.1 ml of each fraction.

した。その結果を Table 3 に示した。LPS の量に対応して β -glucuronidase の遊離がやや抑制される傾向にあった。

ii) Turbidity の変化。

lysosome を 0.25M sucrose に浮遊させ 37°C で培養したとき、turbidity の減少がおこるか、またそれに伴って β -glucuronidase 活性が増加するかを調べた。さらに Tween-20 で処理したときの影響も調べた。その結果を Fig. 6 に示した。lysosome は培養により turbidity の減少と β -glucuronidase 活性の増加がおこ

Table 3. Effect of LPS on the β -glucuronidase activity of the lysosomal fraction.

Experiments	Lysosome (Protein mg/ml)	Dose of LPS (μ g/ml)	β -glucuronidase (Units)
I	1.24	—	42.5 $\pm$ 0.5*
		10	41.8 $\pm$ 0.7
		100	40.5 $\pm$ 0.5
		1,000	39.8 $\pm$ 0.8
II	0.18	—	18.3 $\pm$ 0.7
		5	18.5 $\pm$ 0.5
		50	14.8 $\pm$ 0.7
		500	14.5 $\pm$ 1.0

After incubation of lysosomal fraction with LPS at 37°C for 90 min, the mixture was centrifuged at 8,200 $\times$ 30 min and the β -glucuronidase activity of the supernatant was measured.

* Mean $\pm$ S.E.

Fig. 6. Effect of Tween-20 on the optical density and β -glucuronidase of lysosomal fraction during the incubation at 37°C.
 ○—○; O.D. of the control.
 ×—×; O.D. of Tween-20 (0.2%) treatment.
 —; β -glucuronidase activity of the control.
 ·····; β -glucuronidase activity of Tween-20 (0.2%) treatment.

Fig. 7. Effect of LPS and Tween-20 on the turbidity of lysosome suspensions at 37°C.
 ○—○; control.
 ×—×; LPS 5 μ g/ml.
 ●—●; LPS 50 μ g/ml.
 △—△; LPS 500 μ g/ml.
 ▽—▽; Tween-20, 0.2%.
 # The mean value of two experiments.

り、また Tween-20 を最終濃度 0.2% で処理した場合、turbidity の著明な減少とそれに伴って β -glucuronidase 活性は約 2 倍に増加した。

つぎに lysosome 浮遊液に LPS を添加したときの turbidity の変化を経時的に control と比較した。その結果を Fig. 7 に示した。LPS 添加により、培養 15 分後にやや turbidity の減少促進がみられたが、30 分後

では control と同程度になり, 30分以後では逆に control よりも turbidity の減少は抑制を受ける傾向が認められた. Tween-20 処理では15分までに著明に turbidity は減少し, それ以後変化はほとんどみられなかった.

考 察

著者らは腹水系 PMN における LP の局在性をまず明らかにするため, 細胞外液, 105,000 g 上清, microsome, lysosome 分画について, それぞれの分画の発熱性が PMN 培養時間に応じてどのような推移をみせるかを検討した. Fig. 2 に示したように 105,000 g 上清には培養しない PMN 中にすでに発熱性が認められた. 発熱パターンでは Fig. 1 に示したごとく, 105,000 g 上清はいわゆる内因性 pyrogen の発熱パターンで, time lag が短く 1 時間前後に最高の発熱を示した. これに対して microsome および lysosome は time lag の長い持続的発熱上昇パターンを示した. さらにこれら兩顆粒について, Ribi ら¹⁹⁾ の示したごとく deoxycholate や Tween-20 などの界面活性剤で処理することにより発熱性の変化がみられるか否かを検討し, また, さきに著者ら²⁰⁾ が LPS について超音波処理を行ないその特性の変化を明らかにするなどの物理化学的処理を行なって可溶化したのち, 投与したが発熱パターンおよび発熱活性に変化はみられなかった. また, これら兩顆粒の発熱活性と投与量との間に相関性はあまり認められなかった.

このような実験結果により, 細胞内の LP は腹水系 PMN では顆粒 free の 105,000 g 上清に局在するものと考えられる.

そこでこの細胞内 LP の遊離と lysosome の崩壊度との関係を追求した. Fig. 4 に示されたごとく lysosome の崩壊は PMN 培養30分までに著明におこった. 同時に細胞外えの蛋白の遊離も30分までにそのほとんどが完了していた. さらに, LP の生成遊離を促進させる LPS を PMN に添加して培養すると lysosome の崩壊は促進された (Table 2). すなわち lysosome の崩壊現象は Fig. 2 において示された LP の遊離ならびに Fig. 3, 5 に示した細胞内 free protein の細胞外えの遊離とよく一致して生じることが判った.

そこで直接 LPS を lysosome に添加して培養すると lysosome の崩壊が促進されるかを調べた. しかしその結果は β -glucuronidase の遊離および turbidity の減少を指標とした lysosome の崩壊はむしろ逆に control よりもやや抑制の傾向がみられた (Table 3, Fig. 7). このような結果は Bernheimer および Schwartz ら¹⁷⁾ の Serratia endotoxin を用いた成績とも一致する.

Weissman ら²¹⁾ も endotoxin は作用部位として細胞膜あるいは soluble cytoplasm であろうと彼等の実験成績より推定している. また Kaplan ら²²⁾ はヒトの PMN に phospholipase C を作用させて, とくに Hexose Monophosphate Schunt 活性の上昇を認め, 細胞膜の変化が細胞の代謝に重要な影響を与えると報告している.

LPS による解糖系の昂進と呼吸の増加⁹⁾ と LP の遊離促進²⁰⁾ も LPS による細胞膜の変化が trigger になるものと考えられる. LPS あるいは K-free の塩類溶液との培養により細胞膜の変化が生じ, 代謝系の昂進に伴って, lysosome の崩壊が時間的によく一致しておこり, その結果 lysosome から遊離して来た酵素により細胞の自己融解が誘起されると考えられる. 105,000 g 上清分画に存在していた LP が細胞の自己融解により他の細胞内容物と共に, 細胞外え遊離するものと推定できる. この遊離過程は細胞の viability が保たれている間で, もし細胞が自己融解により完全に死亡したら, 細胞膜の integrity が完全に破壊されて, 細胞外えの遊離はおこらないと思われる. このような考え方は Kanoh ら¹⁰⁾ が LP の遊離と cell viability の相関性を示した成績から支持できるであろう.

lysosome 中のある種の酵素が細胞膜の透過性に影響を与える 可性も考えられ追求すべきことと思われる. また, 細胞内 LP が活性化を受ける機構が, lysosome の崩壊すなわち lysosomal enzymes の作用と関係しているものかなどの点を今後明確にする予定である.

文 献

- 1) BENNETT, I. L. and BEESON, P. B.: *J. exp. Med.* 98, 493 (1953)
- 2) KAISER, H. K. and WOOD, W. B. Jr.: *J. exp. Med.* 115, 27 (1962)
- 3) NORDLUND, J. J., ROOT, R. K. and WOLF, S. M.: *J. exp. Med.* 131, 727 (1970)

- 4) YUNIS, A. A. and HARRINGTON, W. J.: *J. Lab. clin. Med.* **55**, 584 (1960)
- 5) ROSSI, F. and ZATTI, M.: *Brit. J. exp. Pathol.* **45**, 548 (1964)
- 6) HERION, J. C., SPITZNAGEL, J. K., WALKER, R. I. and ZEYA, H. I.: *Amer. J. Physiol.* **211**, 693 (1966)
- 7) 山田 肇, 田中千賀子, 寺岡章雄: *日薬理誌* **62**, 187§ (1966)
- 8) JANOFF, A. and ZWEIFACH, B. W.: *J. exp. Med.* **120**, 747 (1964)
- 9) HAHN, H. H., CHEUK, S. F., ELFENBEI, C. D. S. and WOOD, W. B. Jr.: *J. exp. Med.* **131**, 701 (1970)
- 10) KANO, S., KAWASAKI, H., YOSHIDA, M., NISHIO, A. and MOCHIDA, K.: *Japan. J. Pharmacol.* **17**, 125 (1967)
- 11) 加納晴三郎, 吉田 稔, 川崎浩之進: *日薬理誌* **62**, 135 (1966)
- 12) 加納晴三郎, 川崎浩之進, 吉田 稔, 持田研秀, 小川俊太郎: *日薬理誌* **62**, 291 (1966)
- 13) WESTPHAL, O. and LÜDERITZ, O.: *Angew. Chem.* **66**, 407 (1954)
- 14) COHN, Z. A. and HIRSH, J. G.: *J. exp. Med.* **112**, 983 (1960)
- 15) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- 16) FISHMAN, W. H., SPRINGER, B. and BRUNETTI, R.: *J. biol. Chem.* **173**, 449 (1948)
- 17) BERNHEIMER, A. W. and SCHWARTZ, L. L.: *J. Bacteriol.* **87**, 1100 (1964)
- 18) MOORE, D. M., MURPHY, P. A., CHESNEY, P. J. and WOOD, W. B. Jr.: *J. exp. Med.* **137**, 1263 (1973)
- 19) RIBI, E., ANACKER, R. L., BROWN, R., HASKINS, W. T., MALMGRAN, B., MILNER, K. C. and RUDBACK, J. A.: *J. Bacteriol.* **92**, 1493 (1966)
- 20) KANO, S., MOCHIDA, K. and OGAWA, Y.: *Biken. J.* **13**, 233 (1970)
- 21) WEISSMANN, G. and THOMAS, L.: *Bacterial Endotoxins, Edited by Landy, M. and Braun, W.*, p. 602, *Rutgers University Press, New Brunswick* (1964)
- 22) KAPLAN, S. S., FINCH, S. C. and BASFORD, R. E.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **140**, 540 (1972)

Abstract—Yoshiyuki OGAWA and Seizaburo KANO (National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch, Higashi-ku, Osaka 540, Japan). Mechanisms of release of leucocytic pyrogen. *Folia pharmacol. japon.* **71**, 263~271 (1975).

Mechanisms of the production and release of leucocytic pyrogen (LP) from peritoneal polymorphonuclear leucocytes (PMN) from rabbits were studied *in vitro*. The following results were obtained. 1) The fever curves of the microsomal and the lysosomal fractions had a later onset and were longer lasting than those from the extracellular fluid. The fever curves of the supernatant of 105,000 g showed the typical response of endogenous pyrogen characterized by a rapid onset and short lasting fever, as shown by the extracellular fluid. 2) The pyrogenicity of LP was the most potent at 60 min while the 105,000 g supernatant was most potent at 30 min after PMN incubation at 37°C. 3) The extracellular protein attained the maximum level at 30 min after incubation of PMN, while the protein content in the supernatant of 105,000 g of PMN decreased gradually to the constant level at 30 min. 4) It was observed that the lysosomal degradation was stimulated with bacterial pyrogen (LPS) at 37°C but LPS did not directly affect the lysosomal fraction of PMN.