Me-NPM については、室温におけるスペクトルおよびシミュレーションを Fig. 3 に示した。-20° においては、室温と同じパターンを示し、メチル基の立体障害により一定のある角度になっているものと推定される。この化合物の中性分子については、 $\theta_1=75^\circ$, $\theta_2=71^\circ$ というねじれ角が報告されている^{3b)} がアニオンラジカルについては、解析した hfs の分裂幅と、分裂に寄与する水素原子の数を説明できる程度に、よく一致した計算値を得ることができないため、原因について検討中である。

Fig. 5. Numbering for MO Calculations

The parameters are $\alpha_8=\alpha+2.0\beta$,
 $\beta_{7,8}=1.0\beta$, $\lambda=1.2$.

謝辞 電子計算機の使用の便を計っていただいた静岡県庁電子計算課に謝意を表します。また元素分析を測定して頂いた、本学総合研究センター化学分析部の諸先生方に感謝いたします。

〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
98 (4) 553-556 (1978)

UDC 615.273.3.015.2.015.4.076.9:612.112-08

パロチンの白血球増加効力に対するウサギの血清および各種臓器 ホモジェネートの影響¹⁾

篠田雅人, 清水素行, 櫛 泰典
星薬科大学²⁾

Effects of Rabbit Serum and Various Organ Homogenates on Leukocytosis Promoting Activity of Parotin¹⁾

MASATO SHINODA, MOTOYUKI SHIMIZU and YASUNORI KUSHI

Hoshi College of Pharmacy²⁾

(Received September 17, 1977)

Effect on the leucocytosis-promoting activity of Parotin was examined by incubation of Parotin with rabbit serum or organ homogenate at 37° for 60 min, and the following facts were found.

1) The leucocytosis-promoting activity of Parotin was inactivated by incubation with rabbit serum or with homogenate of the bile, liver, or spleen.

2) This activity was not affected by incubation with the homogenate of the heart, kidneys, adrenal, thymus, thyroid, testis, sublingual gland, parotid gland, or submaxillary gland.

Keywords—salivary gland; parotin; serum; bile; liver; spleen; leukocyte; leukocytosis inhibition

ウシ耳下腺から分離されたパロチンはウサギ循環総白血球数を一時減少した後増加する作用（白血球効力と略す）を有することが知られているが^{3,4)} 著者らはこの増加作用が顆粒球により引き起こされることを認め⁵⁾ また、副腎皮質刺激ホルモン、菌体内成分、サリバ・パロチン・A などによる白血球増加反応とは異なる作用機構によることをすでに報告している⁶⁾ 他方、生体内に投与されたパロチンは比較的短時間で血液中より消失するこ

1) 日本薬学会第 97 年会で発表, 東京, 1977 年 4 月.

2) Location: 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo.

3) Y. Takaoka, T. Yamaguchi, K. Kosaka, *Tohoku J. Exp. Med.*, **57**, 11 (1952).

4) Y. Ito, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**, 228 (1960).

5) 篠田雅人, 高木良成, 玉置文一, 薬誌, **86**, 911 (1966).

6) 篠田雅人, 鴨川 旭, 市川雅子, 中陳静男, 清水素行, 薬誌, **96**, 407 (1976).

とが知られている。⁷⁻⁹⁾ そこで、パロチンの白血球調節作用を検討する一環として、パロチンをあらかじめウサギ血清とインキュベートしたところ白血球効力が減少することを認めたので、さらに、ウサギの各種臓器についてもパロチンの白血球効力に対する影響を検討した。

実験の部

材料および実験方法

パロチン ウシ耳下腺から伊藤、水谷の方法¹⁰⁾

に準じて分離精製した凍結乾燥粉末であり、本研究に使用したパロチンはウサギに対して Fig. 1 に示すような白血球効力を示した。

パロチンと血清あるいは臓器ホモジェネートとの処理

一夜絶食した成熟雄性ウサギを頸動脈採血により瀉血し、さらに開腹後ただちに各種臓器を摘出した。血清は血液を 3000 rpm, 15 min 遠心分離後に分取して使用した。また、胆嚢は胆汁を含有する状態で、他の臓器もそのまま細切し、いずれも生理食塩水を用い 10% (w/v) 濃度となるように氷冷下でホモゲナイズした後、3000 rpm, 15 min 遠心分離し、上澄液を使用した。パロチンと血清あるいは臓器ホモジェネートとを反応させるには、生理食塩水に溶解したパロチン溶液を 10 ml ずつ分注した試験管に、血清あるいは各種臓器のホモジェネート 0.5 ml を加え、密封し、よく攪拌後 37°, 60 min 振盪しながらインキュベートした。処理後氷冷したのち効力試験に供した。

白血球効力試験

体重 3 kg 前後の成熟した雄性ウサギを用い、3—5 匹を 1 群とした。試料は注射液量を 0.42 ml/kg となるように生理食塩水に溶解し、耳静脈内に注射した。注射直前および 2, 4, 6, 8 hr 後に他側の耳静脈から白血球用メランジュールを用い採血し、Türk 液で希釈したのち、Bürker-Türk 算定盤により計数し、注射直前に対する変動率を算出した。パロチンの白血球効力の判定法として、Fig. 1 の 250 μ g/kg 以上の投与量の場合のように変動率の平均が 30% 以上一時減少した後 100% 以上の増加作用を認めた場合を+、100—125 μ g/kg の場合のように減少応反を認めず 100% 以上の増加作用を示す場合を±、50 μ g/kg 以下の場合のように増加が 100% 未満、あるいは一定した増加反応を示さない場合を-として判定した。

Fig. 1. Effect of Injection (*i.v.*) of Parotin on Peripheral Leukocyte Number in Rabbits

○—○, 1000 μ g/kg, ●—●, 500 μ g/kg,
 ●—●, 250 μ g/kg, △—△, 125 μ g/kg,
 △—△, 100 μ g/kg, ▲—▲, 50 μ g/kg.
 Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 3 to 5 rabbits.

結果

I. 37°, 60 min 処理に対するパロチンの白血球効力の安定性

In vitro, で、312—5000 μ g/ml の濃度のパロチン溶液を 37°, 60 min インキュベートした処理液について、パロチンの白血球効力の安定性を検討し、Fig. 2 に示す結果を得た。投与量 500—2000 μ g/kg の範囲ではパロチンの白血球効力は一時的減少した後増加する作用が認められた。しかし、250 μ g/kg 以下ではその効力が±以下であった。

II. パロチンの白血球効力に及ぼすウサギ血清および各種臓器ホモジェネートの影響

I の実験において、インキュベートしてもパロチンの白血球効力に影響を認めない 1250 μ g/ml の濃度を含有するパロチン溶液 (投与量 500 μ g/kg に相当する) に対して、ウサギ血清あるいは各種臓器ホモジェネートの影響を検討し、Table I の結果を得た。血清および胆汁とのインキュベートによりパロチンの白血球効力の明らかな減少を認めた。しかし、他臓器ホモジェネートによっては影響を認めなかった。なお、血清、胆汁、各種臓器ホ

7) S. Tanaka, Y. Ito, *Endocrinol. Jpn.*, 5, 55 (1958).

8) S. Tanaka, Y.E. Kim, Y. Ito, *Endocrinol. Jpn.*, 5, 65 (1958).

9) 奥村 一, 藤沢宗駿, 早川 秀, 須藤忠満, 難波脩一, 唾液腺シンポジウム, 18, 31 (1973).

10) 伊藤四十二, 水谷 彰, 薬誌, 72, 244 (1952).

Fig. 2. Effect of Injection (*i.v.*) of Parotin, which was incubated at 37° for 60 min, on Peripheral Leukocyte Number in Rabbits

○—○, 2000 µg/kg, ○—○, 1000 µg/kg,
●—●, 500 µg/kg, ●—●, 250 µg/kg,
△—△, 125 µg/kg.
Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 3 to 5 rabbits.

TABLE I. Influence of Incubation with Rabbit Serum and Various Organ Homogenates on Leukocytosis Promoting Activity of Parotin

Organ	Leukocyte response	
	With parotin ^{a)}	Without parotin ^{b)}
—	+	—
Serum	—	—
Bile	—	—
Liver	±	—
Spleen	±	—
Heart	+	—
Kidney	+	—
Adrenal	+	—
Thymus	+	—
Thyroid	+	—
Testis	+	—
Sublingual gland	+	—
Parotid gland	+	—
Submaxillary gland	+	—

a) Ten ml of parotin (1250 µg/ml) was incubated with 0.5 ml of rabbit serum or various organ homogenates at 37° for 60 min.
b) Parotin was omitted to incubate procedure.

モジュネートについて、パロチンを含まない条件でインキュベートし、それぞれの成分のみによる白血球数への影響を検討したが、この実験条件ではいずれも循環総白血球数の変動を認めなかった。

考 察

パロチンは分子量 132000 の蛋白質であり、¹¹⁾ sodium dodecylsulfate 処理により分子量 45000 のサブユニットが分離されるという。¹²⁾ パロチンの白血球効力はトリプシン消化では速やかに減退するが、¹³⁾ キモトリプシン消化には比較的安定であることを報告し、¹⁴⁾ ¹³¹I-標識パロチンを用いた生体内分布の測定からは血液中より速やかに消失し、5—20 min で特異的にラットの肝臓、脾臓に大量に分布することが知られ、^{7,8)} さらに、パロチン蛋白はラット顎下腺ホモジュネートにより分解される可能性が報告されている。¹⁵⁾ しかし、生理作用の生物学的指標にはウサギを使用しているがウサギの生体内での安定性に関する報告をみないことから、パロチンの白血球効力に対するウサギの血清および臓器ホモジュネートの影響を検討した。パロチンを白血球効力によって graded response として定量する方法はまだ設定されていない。著者らは白血球効力を示す最少量をもって効力を測定している。¹⁶⁾ 本報もこれに準じて実験方法に示した判定法を設定した。さらに、37°, 60 min 処理にともなうパロチンの安定性を検討したが、Fig. 2 の結果から、2 倍倍数希釈による最少有効量が 500 µg/kg であり、Fig. 1 と比較すると操作のみによりパロチンの活性の約半分が失活したものと考えられる。そこで、Table I に示すごとく、血清あるいは臓器ホモジュネートとの処理には 500 µg/kg になるように調製し、また半量以上の不

11) Y. Ito, Y. Kubota, Y. Shibuya, *J. Biochem. (Tokyo)*, **47**, 422 (1960).

12) 青沼 繁, 小浜靖弘, 中陳静男, 屋敷伸治, 江川 宏, *日内分泌誌*, **50**, 1468 (1974).

13) Y. Ito, M. Shinoda, *Endocrinol. Jpn.*, **5**, 221 (1958).

14) Y. Ito, M. Shinoda, *Endocrinol. Jpn.*, **8**, 20 (1961).

15) Y.E. Kim, *Endocrinol. Jpn.*, **5**, 208 (1958).

16) M. Shinoda, S. Nakajin, T. Oikawa, M. Shimizu, A. Kamogawa, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, "submitted".

活性化が起これば、白血球効力に影響が認められるように考案しておこなった。その結果、血清と胆汁では強く、肝臓と脾臓では弱いながら減少する作用が認められた。なお、血清あるいは臓器のみの単独投与では白血球数に変化が起こらないことから、この変化はパロチンの白血球効力に対する直接作用によるものとする。血清および胆汁に認められた作用について現在検討中である。

総 括

ウサギを用い、パロチンの白血球効力に対する血清および各種臓器ホモジェネートの影響を検討し、血清、胆汁、肝臓および脾臓に不活性化因子が存在することを認めた。