

## 原 著

## 食細胞の脂質分解酵素と結核菌

近藤 瑩子・金井 興美

国立予防衛生研究所結核部・細菌第1部

受付 昭和 56 年 6 月 18 日

LIPOLYTIC ENZYME ACTIVITIES OF PHAGOCYTTIC CELLS AS  
AFFECTED BY THE PRESENCE OF TUBERCLE BACILLI

Eiko KONDO\* and Koomi KANAI

(Received for publication June 18, 1981)

Phospholipase A (PLase) and cholesterol esterase (CEase) activities of guinea pig peritoneal leucocytes were examined using a post-unclear fraction as enzyme material. PLase reaction was performed with [ $^{14}$ C]oleate-labeled phospholipids (mainly phosphatidylethanolamine) as substrate and 2.5 mM of  $\text{Ca}^{2+}$ , and the intensity was expressed by % degradation of the substrate as calculated by the released amount of labelled fatty acids. The reaction was inhibited by higher concentrations (e. g. 0.5 mM) of lysolecithin or linoleic acid. CEase activity was measured with cholesteryl [ $^{14}$ C]oleate as substrate at optimum pH of 4.6. This reaction was inhibited by increasing concentrations of lysolecithin but not of linoleic acid.

PLase reaction by the cell fraction was enhanced in the presence of added tubercle bacilli (virulent *M. bovis*), but the CEase reaction was apparently inhibited. Heat-killed mycobacteria did not stimulate the PLase reaction. When the mycobacteria were incubated with the cell fraction, the viable counts decreased during the course of time.

The relation between the enhancement of PLase activity and the mycobactericidal activity in the cell fraction was discussed in view of our previous findings that the artificial biomembrane (liposomes) and the cell fraction of phagocytic cells can kill mycobacteria in the presence of exogenous phospholipase  $A_2$ .

結核感染における宿主寄生体関係は、細胞レベルにおいては食細胞と結核菌との相互作用が中心であるが、私たちはこの相互作用の一つの要因として食細胞の膜構造と菌体表層との関係に注目してきた。

この問題に関する私たちのアプローチは感染動物における細菌学的、生化学的、そして電顕による形態学的方法を総合<sup>1)~3)</sup>したものであるが、同時に、感染組織から収獲したいわゆる“*in vivo* 菌”についての観察も含まれていた。そしてこの研究によつて示唆された局面の一つは、菌との接触による食細胞膜の脂質の動態であり、そ

れがまた感染菌の発育や死滅を支配する要因となる可能性であつた<sup>3,4)</sup>。

この際、食細胞膜の変化が活性化であれ、崩壊であれ、膜脂質の代謝回転や分解には脂質分解酵素が関与しているはずである。私たちは最近の実験において、exogenous のホスホリパーゼ (PLase)  $A_2$  やコレステロールエステラーゼ (CEase) を人工膜 (リポソーム)<sup>5)</sup> や食細胞の膜分画<sup>6)</sup> に添加し、この系に加えられた結核菌が殺され、あるいは増殖抑制をうける現象を捉えた。この実験モデルは菌と接触した細胞膜に内在する PLase や CEase の

\* From the Department of Tuberculosis and the First Department of Bacteriology, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

活性化の検討に発展すべきものであつて、本報告はその線に沿つた最初の試みを記載する。

### 材料と方法

食細胞膜分画の調製：細胞の収獲には体重 500~600g の正常あるいは BCG の 1mg を静注感染したモルモット (Hartley) 雌を用いた。感作 3~4 週時に 9% カゼイン (Hammersten, Merck) の 20ml を腹腔内に注射して 1 日後に、空気塞栓によつて動物を殺し、腹腔をひらいて冷 Hanks 液で腹腔滲出細胞を集めた。この細胞浮遊液をステンレス製 100メッシュのふるいで濾し、1,000 rpm 5 分の遠沈で細胞を集め、さらに Hanks 液で 2 回洗浄した。再び一定量の Hanks 液に浮遊させて細胞数をカウントし、またギームザ染色によつて細胞構成をしらべた。収量は 10 匹当り  $3.5 \times 10^9$  前後であり、常に 90% 以上は多形核白血球であつた。

約  $10^9$  個の細胞を 10ml の 0.2M KCl に浮遊させ、氷冷しつつ 30~60 秒音波処理した。冷凍遠心機により分別遠心し、1,000 rpm と 3,000 rpm 沈渣を除いた上清を 15,000 rpm (25,000g) にかかけ、得られたミトコンドリア、ライソゾームを含む膜分画 (post nuclear fraction) を酵素試料とした。0.2M KCl で 1 回、水で 1 回洗浄し、再び約 5ml の水に浮遊して数十秒音波処理し均等な浮遊液とした。

ホスホリパーゼ A (PLase A) 活性の測定：基質としての標識磷脂質の調製ならびに膜分画の PLase A 活性の測定は基本的に Franson らの報告<sup>7)</sup>に従つた。まず基質の調製<sup>8)</sup>には *E. coli* を 80ml のトリプトソンプイオン培地で 1 晩培養し、2,000 rpm、10 分で菌を集めた。これを 20ml のトリエタノールアミン (TEM) 培地<sup>9)</sup>にうつし、37°C、2 時間培養した。遠沈して上清を捨て、ここに 5  $\mu$ Ci [ $^{14}$ C] オレイン酸 (The Radiochemical Centre, Amersham, Specific activity, 56mCi/m mol) と 0.4ml の 10% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む TEM 培地の 5ml を加えて 37°C、3 時間インキュベイトした。遠沈後、新鮮な TEM 培地で 1 回洗浄し、新たに加えた 10% BSA 0.4ml を含む TEM 培地の 5ml 中で 1.5 時間インキュベイトした。120°C、15 分で加熱後、遠沈して上清を捨て、クロロホルム・メタノール (CM) 2:1 で菌体リピドを抽出した。これを 110°C、1 時間の加熱で活性化した厚さ 2mm の Silica gel G (Merck) の薄層上でクロロホルム・メタノール・水 (65:25:4) で展開させ、*E. coli* で生合成された [ $^{14}$ C]-ホスハチシルエタノールアミンと [ $^{14}$ C]-ホスハチシルグリセロールとを残留する遊離の [ $^{14}$ C]-オレイン酸から分離分画し、CM (2:1) で回収した。溶媒を一旦とばして得た [ $^{14}$ C]-磷脂質は、ベンゼン溶液として -15°C に保存した。

この標識磷脂質 (約 140,000 cpm) を 10ml の試験管

にとつてよくベンゼンをとばし乾燥した。ここに上記食細胞膜浮遊液の 1ml を加えて音波処理し基質 vesicle とした。この 0.1ml を 10ml の試験管にとつて 100 倍希釈した 0.1M クエン酸-0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (McIlvaine) buffer の 0.1ml、10mM  $\text{CaCl}_2$  の 0.1ml を加えて 37°C にインキュベイトし、適宜の時間に CM (2:1) の 2ml を加えて反応を停止させた。1 晩放置後、下層の 1ml をとり、100°C に加熱して殺菌すると同時に溶媒をとばし、Silica gel G の薄層 (厚さ 0.25mm) 上で前記溶媒系で展開した。スキニングチャートから [ $^{14}$ C]-磷脂質の分解率を測定し、遊離した [ $^{14}$ C]-オレイン酸量をもつてホスホリパーゼ A 活性とみなした。菌添加の影響をみる場合には、この反応混液に *Mycobacterium bovis* の 20mg/ml 菌液を 0.1ml 添加し、対照は水 0.1ml を加えた。

コレステロールエステラーゼ (CEase) 活性の測定：Brecher らの方法<sup>10)</sup>に従つた。卵黄レシチン (Sigma, Type III-E, Singleton らの方法によりクロマトグラフィーで精製された製品) 60mg、コレステリルオレート (Sigma, Grade: Approx. 99%) 600  $\mu$ g とコレステリル [ $^{14}$ C]-オレート (New England Nuclear Corporation, Boston, MA, Specific activity 51.0 mCi/m mol) 10  $\mu$ Ci とを 0.1M NaCl-0.01M トリス buffer pH 7.4 (カナマイシンを 100  $\mu$ g/ml に含む) の 6ml 中で音波処理し、これを基質 vesicle とした。

反応混液は McIlvaine buffer の 0.1ml、基質 vesicle 0.1ml、細胞分画 0.1ml (蛋白量 300~500  $\mu$ g) とし、37°C で適宜の時間インキュベイトした。3ml のベンゼン-クロロホルム-メタノール 1.0:0.5:1.2 (オレイン酸を 0.1mM に含む) を加えて反応を止め、さらに 0.3M NaOH の 0.6ml を加え 15 秒振盪後、遠沈 (1,000g:10min) し、上層の 0.5ml を PCST<sup>TM</sup> (Amersham) の 10ml 中で、遊離した [ $^{14}$ C]-オレイン酸量を測定し、コレステロールエステラーゼ活性とした。

食細胞膜分画を用いた抗菌試験：3本の 10ml 容量の試験管に pH 5.6 の 0.05M acetate buffer 3ml と細胞分画の 0.6ml を分注した。うち 1本は 100°C、20min 加熱した。残りのうちの 1本は 4°C に保存し、最後の 1本および加熱処理した試験管を 37°C で 18時間 preincubate した。次にこれら 3本いずれにも同時に *M. bovis* Ravenel R-KM 0.1mg/ml の 0.3ml と 10mM  $\text{CaCl}_2$  0.1ml を加えて 37°C でインキュベイトをつづけ、4, 8, 24時間目ごとに混液の一部を汲み出し、KM 100  $\mu$ g/ml 含有小川培地に接種して残存生菌数の消長を追つた。

### 成 績

食細胞膜分画の PLase A 活性と菌添加の影響：食細胞膜分画と標識磷脂質 ([ $^{14}$ C]-ホスハチシルエタノール

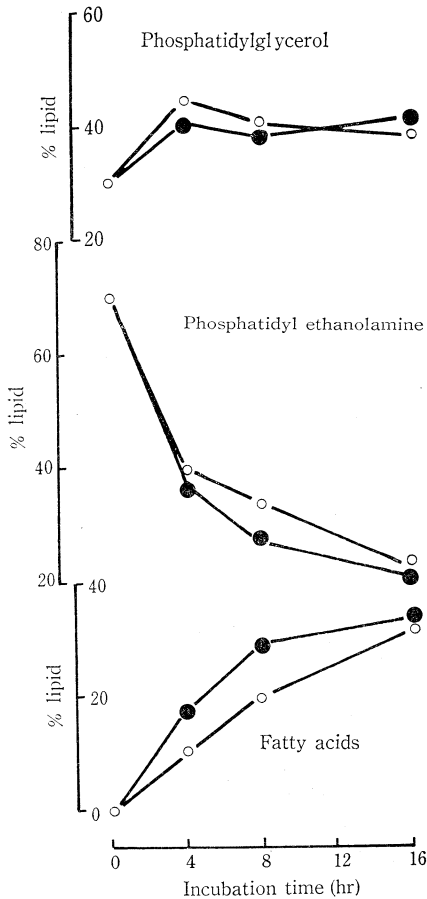


Fig. 1. Time-course observation of phospholipase  $A_2$  activity of a post-nuclear fraction separated from guinea pig peritoneal leucocytes in the presence (●) or absence (○) of added *M. bovis* (Ravenel). .....The incubation mixture contained 0.1 ml of a 1 : 100 dilution of 0.1 M citrate-0.2 M  $Na_2HPO_4$  buffer, 0.1 ml of 10 mM  $CaCl_2$  and 0.1 ml of the cell fraction (protein 375  $\mu$ g, phospholipids 158  $\mu$ g) mixed with [ $^{14}C$ ] oleate-labeled phospholipids (Ca. 140,000 cpm). When the mycobacteria were added, the amount was 0.1 ml of a 20 mg/ml suspension, and the control tube was supplemented with 0.1 ml of distilled water instead.

アミンおよび [ $^{14}C$ ]-ホスホハチシルグリセロール)から成る基質 vesicle を pH 7.2 で  $Ca^{2+}$  存在のもとインキュベートし、経時的に PLase A 反応を測定した。Fig. 1 の示すように、主として分解をうけるものはホスファチジルエタノールアミンであつて、その分解に応じて遊離する脂肪酸も増量している。すなわち基質 vesicle 中の [ $^{14}C$ ]-磷脂質は 4 時間でその 11.5%、8 時間で 20.7% が分解をうけた。そしてこの分解反応が菌添加によつて高まることが表現され、4 時間で 18.4%、8 時間で 30.8%

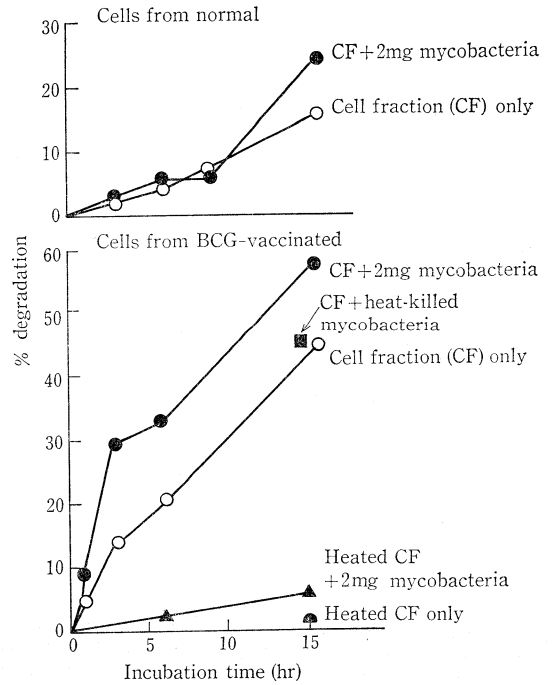


Fig. 2. Time-course observation of phospholipase  $A_2$  activity in post-nuclear fractions (CF) of peritoneal leucocytes obtained from normal or BCG-vaccinated guinea pigs. .....The reaction was conducted in the presence (●) or absence (○) of added *M. bovis* (Ravenel). The incubation conditions were the same as those in Fig. 1 except the cell fractions employed (680  $\mu$ g protein and 156  $\mu$ g phospholipids in the sample of the normal animals; 250  $\mu$ g protein and 79.2  $\mu$ g phospholipids in the sample of BCG-animals).

と分解率の増強が認められた。このような傾向は細胞分画標本が、BCG 接種動物由来である場合には一般的に認められたが、Fig. 2 には、正常動物由来の細胞分画と の比較が示されている。正常動物由来の細胞分画における反応 (Fig. 2, 上) は、9 時間までは菌添加による影響が全く認められなかつたが、BCG 感作動物由来 (Fig. 2, 下) の場合には 3 時間ですでに 15% の活性の上昇がみられ、以後 6 時間、16 時間までこの増強傾向が維持されている。しかし添加菌体が加熱死菌の場合にはこの増強効果がみられず、また細胞分画を加熱した場合には反応は全く起こらなかつた。したがつてこの加熱細胞分画に生菌を添加したときのわずかの反応は、菌それ自体の活性とみられる。

食細胞分画 PLase A 活性に及ぼすリゾレンチンならびに脂肪酸添加の影響: 反応に対するリゾレンチンまたは脂肪酸添加による影響をみた (Fig. 3)。反応混液にリゾレンチン (Sigma, Type I, Grade: Approx. 98%,

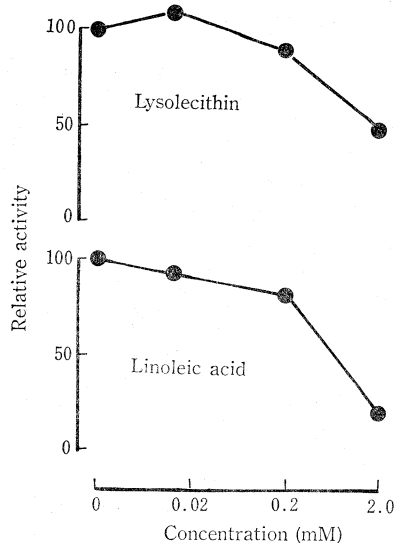


Fig. 3. The effect of the concentrations of added lysolecithin or linoleic acid on the phospholipase A activity of a post-nuclear fraction of guinea pig peritoneal leucocytes. ...The incubation conditions were the same as those of Fig. 2, in 9 hours for lysolecithin and 18 hours for linoleic acid.

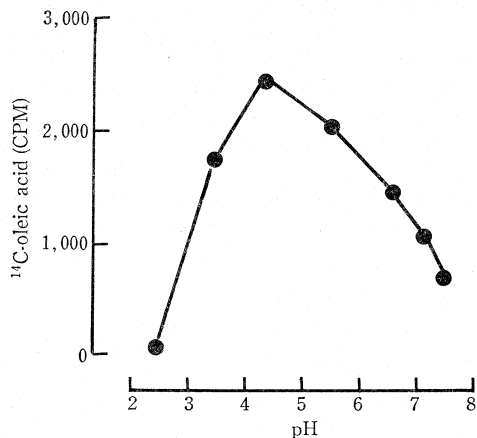


Fig. 4. The effect of pH on the hydrolysis of cholesteryl [1-<sup>14</sup>C]oleate by a post-nuclear fraction of guinea pig peritoneal leucocytes. ...Each incubation tube contained 0.1 ml of 0.1 M citrate-0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer pH 2.6-7.6, 0.1 ml of the cell fraction (protein 500 μg, phospholipids 168 μg) and 0.1 ml of vesicles containing cholesteryl-[1-<sup>14</sup>C]oleate. The tubes were incubated at 37°C for 60 min.

主としてパルミチン酸とステアリン酸を含む)の 0.02, 0.2, 2 mM 水溶液の 0.1 ml を添加して9時間あるいはリノール酸 (Sigma, Approx. 99%) の 0.02, 0.2, 2 mM 水懸濁液の 0.1 ml を添加して18時間インキュベ

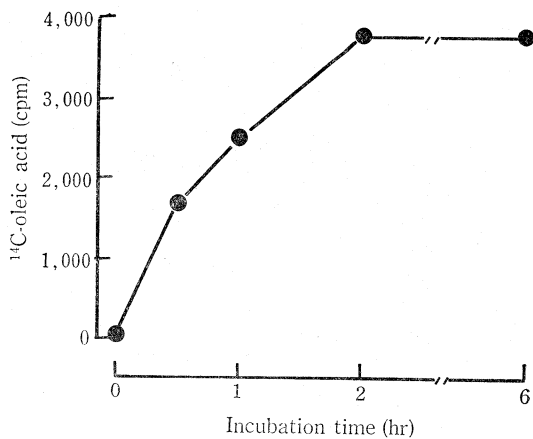


Fig. 5. The effect of incubation time on cholesteryl ester hydrolysis at pH 4.6 by a post-nuclear fraction of guinea pig peritoneal leucocytes. .... The incubation conditions were the same as those of Fig. 4.

Table 1. Cholesterol Esterase Activity of a Cell Fraction of Guinea Pig Peritoneal Leucocytes in the Presence or Absence of Mycobacteria, Lysolecithin or Linoleic Acid

Added with		Relative activity
None (Cell fraction only)		100
Living <i>M. bovis</i> (Ravenel)	2 mg	18
Sonicated <i>M. bovis</i> (BCG)	2 mg	19
Sonicated <i>M. bovis</i> (BCG)	0.2 mg	36
Lysolecithin	2 mM	55
Lysolecithin	0.2 mM	77
Lysolecithin	0.02 mM	92
Linoleic acid	2 mM	99
Linoleic acid	0.02 mM	95

The incubation conditions were the same as those of Fig. 4 and 5.

イトすると, PLase A 活性はそれぞれの 2 mM 添加で強く阻害された。

食細胞分画の CEase 活性および添加物の影響: 細胞分画中の CEase 活性の pH 曲線を Fig. 4 に, 経時の変化を Fig. 5 に示す。至適 pH は 4.6 であった。この CEase 活性は菌もしくは菌体破壊物の存在下で強く阻害をうけた。またリゾレシチン添加によつても阻害をうける dose response を示したが, 脂肪酸添加で阻害をうけることはなかつた (表 1)。

食細胞分画による抗菌現象: 食細胞分画と菌とを pH 5.6 の 0.05 M 醋酸緩衝液中でインキュベートし, 経時的に菌数の消長をみた (Fig. 6)。混合インキュベ

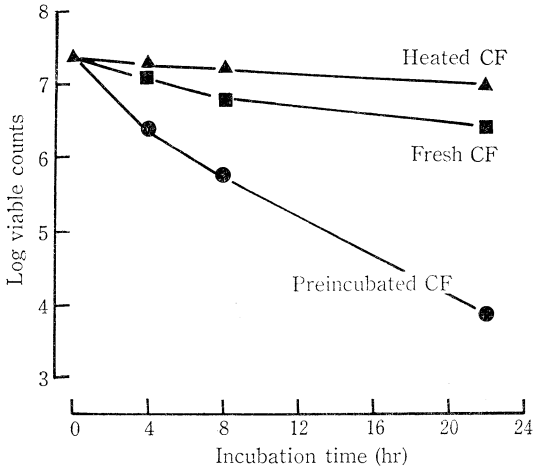


Fig. 6. Decline of viable counts of *M. bovis* in the incubation mixture. ....4 ml of the mixture contained 3 ml of 0.05 M acetate buffer pH 5.6, 0.6 ml of a post-nuclear fraction (CF) (protein 3 mg, phospholipids 1mg), 0.1 ml of 10mM CaCl<sub>2</sub> solution, and 0.3 ml of a 0.1 mg per ml suspension of *M. bovis* (Ravenel). The here-employed cell fractions were the fresh, preincubated, or heated (100°C, 20 min) ones.

ンをつづけることによつて生菌数は次第に減少した。この抗菌現象は膜をあらかじめ加熱することによつてほぼ失われた。また菌添加以前に18時間インキュベートした細胞分画によつてはこの抗菌効果はさらに強まった。

### 考 察

本報告においては、食細胞膜分画の PLase A 活性が結核菌の添加によつて高まり、CEase は逆に抑制をうけ、さらにこのような条件下で膜と接触することによつて菌が殺されるという3つの独立した観察を述べた。これらの現象の間の相互関係については今後の検討を待つとして、得られた成績はすくなくとも私たちがこれまで人工膜や細胞膜分画に exogenous に PLase A<sub>2</sub> を添加し、この系に存在する菌が殺される<sup>5)6)</sup> という現象に矛盾しない。

一般に PLase は膜に内在し、レセプターを介した膜の刺激に応じて活性化されることは、それによつて膜磷脂質が分解し、プロスタグランジン生成材料であるアラキドン酸が用意されることなどを例<sup>11)</sup>としてよく知られている。小林ら<sup>12)</sup>は標的細胞のレセプター site に結合したリンホトキシンは膜に内在する PLase A を活性化し、膜磷脂質の脂肪酸が遊離して細胞毒性を発揮する可能性を示した。最近、加藤ら<sup>13)</sup>はブドウ球菌の  $\alpha$  毒素が白血球膜上のガングリオシド GM<sub>1</sub> とレシチンをレセプターとして、PLase A<sub>2</sub> を活性化することを報告した。これらの報告の示唆するところは、膜活性物質の効果が

生理的範囲のものであつても、あるいは膜の崩壊と細胞死につながるものであつても、その際膜に内在する脂質分解酵素の役割が非常に大きいことである。

私たちは結核感染組織の電顕観察を通して、細胞内結核菌と食胞膜との密な接触像に注目し、こうした部位がしばしば膜ならびに菌双方の崩壊の原点である可能性を示唆してきた<sup>1)</sup>。これは接触部位における膜の PLase の活性化、磷脂質の分解、脂肪酸の遊離、その遊離脂肪酸による菌の傷害、という一連の相互作用を想定したものである。

PLase A 活性については、再アシル化の問題もあり、また膜分画を用いた *in vitro* のモデルと *in vivo* の全細胞の条件とは大きなへだたりがあるが、いづれにせよ菌添加による反応の上昇は観察できたわけである。この際、菌自体のもつ PLase 活性が関与し、さらに相互に活性化される可能性もまた否定できない。抗菌菌における PLase 活性の存在は西島ら<sup>14)</sup>により *M. phlei* で証明されている。Franson ら<sup>15)</sup>はウサギの腹腔多形核白血球より得られた PLase が酸性、中性いづれにおいても働く A<sub>2</sub> 型で Ca<sup>2+</sup> 活性化されることを示した。私たちのモルモットの腹腔多形核白血球の細胞分画における観察によつても PLase A 活性は Ca<sup>2+</sup> の存在で酸性(成績未発表)、中性いづれにおいても認められた。この活性がリゾレシチンあるいは脂肪酸の過剰によつて抑制されるのは、反応生成物フィードバックであろう。また、結核菌添加に替えてブドウ球菌あるいは大腸菌を加えたときには、PLase A 活性は対照よりかなり低下した(成績未発表)。これは菌体磷脂質の分解によつたもの、つまり基質の希釈の結果であるのか、あるいは基質磷脂質が菌の生合成に利用されたためと考える。Weiss と Els-bach<sup>16)</sup>によれば、食細胞由来の PLase A 活性をもつ抗菌物質が、PLase A-less 大腸菌を用いて検討すると菌体磷脂質の25%を分解せしめるという。

CEase に関しては菌による抑制という結果であるが、これは CEase 活性それ自体の阻害の可能性よりも、菌あるいは食細胞膜中のエステル化活性による逆方向の反応の共存の結果であろうと考えている。Schubert ら<sup>17)</sup>は BCG と *M. phlei* に、そして私たちは強毒、弱毒結核菌のいずれにもコレステロールエステル化活性を認めた<sup>18)</sup>。細胞分画の CEase 反応系において、リゾレシチン添加により dose-response を示す抑制が認められたが、これは CEase によつて遊離した脂肪酸が試料酵素によるリゾ体のアシル化に消費された結果と考える。脂肪酸の添加によつては抑制のみられない事実もこの想定を支持する。

以上の実験においては、脂質分解酵素活性の試料として、収量の得易い多形核白血球由来の細胞分画を使用した。この細胞が結核菌感染に対する防御にどの程度関

与しているかについては、いまだ結論が得られているわけではない。モルモットでは多量のマクロファージを腹腔から純粋に収獲しにくいと、以上に行なつたような酵素活性の検討はまだすすめていないが、カゼイン誘出3日後 (BCG 感染10日目) で単核白血球が24%に増えた時期に収獲した細胞より得た分画では pH 5.6, 7.2 いずれの環境でも PLase A 活性は観察された。その分解率は18時間で14.8%と4.7%であり、結核菌の添加によつて44.2%と35.8%という活性の上昇を認めた。マクロファージの PLase A 活性については、多量収獲の可能なウサギ細胞マクロファージによる報告があり、最近では Lanni と Franson<sup>19)</sup>が細胞内顆粒の膜に associate している PLase A<sub>2</sub> を CM-BioGel で精製し、比活性の高い分画を得ている。このものの至適 pH は中性で、Ca<sup>2+</sup> 依存性、EDTA またはインドメサシンで阻害された。

形態学的観察による<sup>20)</sup>と、感染組織において、多形核白血球は多数の菌をとりこみ、自身も膜の崩壊を来している像がしばしばみられる。マクロファージにとりこまれる以前に、菌はこのような多形核白血球によつて対応をうけるので、今回得られた成績は今後の研究に対する基礎データとしての意味をもちうると考えている。

Fig. 6 は食細胞分画の PLase A と CEase によつて細胞膜磷脂質あるいはエステル化されたコレステロールから遊離した脂肪酸が抗菌的に作用することを想定した実験である。細胞分画を菌と接触させる以前に18時間インキュベートしておいたときに抗菌活性がつよまるのは、遊離脂肪酸量の増加にのみ依存するのか、あるいはインキュベーションの過程で生成される他の抗菌物質も影響しているのかはまだ明らかではない。加熱膜においては抗菌活性は失われており、加熱膜で PLase A 活性の失活している事実 (Fig. 2) と矛盾しない。多形核白血球の抗菌物質や機構としては、水解酵素活性をもつた塩基性蛋白<sup>21)</sup>、また殊に最近では酸化代謝に伴つて発生する活性酸素の役割が重視されている<sup>22)</sup>。

私たちは *in vitro* で食細胞膜分画に exogenous の PLase A<sub>2</sub> を添加して菌とインキュベートして抗菌活性を認め、ここに CEase を加えると一層強い活性の発揮されることを経験した<sup>6)</sup>。この結果は抗菌力の発現に膜由来の脂肪酸の動態が重要な役割を果たしているという一つの証明であつた。本報告に述べたように、この細胞分画に含まれている endogenous PLase A は菌の存在で活性化され、一方 CEase は抑制をうけることが認められ、これらの脂質分解酵素が感染に影響を与えることが推量される。

Shlager と Meltzer<sup>23)</sup> はリンホカインによつて活性化されたマクロファージの tumoricidal activity の高まる時期に、脂質に含まれる脂肪酸の不飽和度の上昇するこ

と、そして遊離コレステロール量が増し、エステル型コレステロール量が減少することを指摘しており、結核感染における食細胞の役割と共通の問題を含んでいる。

稿の終りにのぞみ、標識化合物実験操作をご指導いただいた本研究所技術部の駒井知好博士に謝意を表する。

## 文 献

- 1) Kanai, K. and Kondo, E.: Review, chemistry and biology of mycobacteria grown *in vivo*, Japan J Med Sci Biol, 27: 135, 1974.
- 2) Kanai, K. et al.: An electron microscopy of intracellular mycobacteria in experimental mouse tuberculosis, Tubercle, 62: 187, 1981.
- 3) 近藤瑩子・金井興美: 総説 結核感染における宿主脂質 III. 長鎖脂肪酸と結核菌, 結核, 56: 109, 1981.
- 4) 金井興美・近藤瑩子: 総説 結核感染における宿主脂質 IV. 補遺とまとめ, 結核, 56: 257, 1981.
- 5) Kondo, E. and Kanai, K.: Antimycobacterial activity of lecithin-cholesterol liposomes in the presence of phospholipase A<sub>2</sub>, Japan, J Med Sci Biol, 31: 249, 1978.
- 6) Kanai, K. and Kondo, E.: Phospholipase A<sub>2</sub>-induced antimycobacterial activity in the membrane fraction from peritoneal exudate cells of guinea pigs, Japan J Med Sci Biol, 33: 87, 1980.
- 7) Franson, R. et al.: Phospholipid metabolism by phagocytic cells. Phospholipase A<sub>2</sub> associated with rabbit polymorphonuclear leukocyte granules, J Lipid Research, 15: 380, 1974.
- 8) Patriarca, P. S. et al.: Phospholipases and phospholipid turnover in *Escherichia coli* spheroplast, Biochim Biophys Acta, 260: 593, 1972.
- 9) Simon, E. J. and Van Praag, D.: Inhibition of RNA synthesis in *Escherichia coli* by levorphanol, Proc NAS, 51: 877, 1964.
- 10) Brecher, P. et al.: Effect of atherosclerosis on lysosomal cholesterol esterase activity in rabbit aorta, J Lipid Research, 18: 154, 1977.
- 11) Suzuki, T. et al.: Studies of Fcγ receptors of human B lymphocytes: Phospholipase A<sub>2</sub> activity of Fcγ receptors, Biochemistry, 19: 6037, 1980.
- 12) 小林芳郎他: Guinea pig lymphotoxin (GLT) の細胞傷害機構, 日本免疫学会総会記録, 8: 227, 1978.
- 13) 加藤 巖: 総説 プドウ球菌α毒素とロイコシジンの構造と毒作用, 日細誌, 36: 445, 1981.
- 14) Nishijima, M. et al.: Purification and properties of a membrane-bound phospholipase A<sub>1</sub> from *Mycobacterium phlei*, J Biol Chem, 249: 5658, 1974.
- 15) Franson, R. et al.: Phospholipid metabolism by phagocytic cells. Phospholipase A<sub>2</sub> associated with rabbit polymorphonuclear leukocytes granules, J Lipid Research, 15: 380, 1974.
- 16) Weiss, J. and Elsbach, P.: The use of a phospholipase A-less *Escherichia coli* mutant to establish the action of granulocyte phospholipase A on

- bacterial phospholipids during killing by highly purified granulocyte fraction, *Biochim Biophys Acta*, 466 : 23, 1977.
- 17) Schubert, K. et al.: Veresterung von Sterinen mit Fettsäure und mit Bernsteinsäure in Mykobakterien, *Biochim Biophys Acta*, 176 : 163, 1969.
  - 18) 近藤瑩子・金井與美: 総説 結核感染における宿主脂質 II. コレステロール, *結核*, 56 : 41, 1981.
  - 19) Lanni, C. and Franson, R. C.: Localization and partial purification of a neutral-active phospholipase A<sub>2</sub> from BCG-induced rabbit alveolar macrophages, *Biochim Biophys Acta*, 658 : 54, 1981.
  - 20) Kanai, K. et al.: Ultrastructural study of mycobacteria in experimentally produced lung lesions of mice, *Japan J Med Sci Biol*, 32 : 327, 1979.
  - 21) Weiss, J. et al.: Partial characterization and purification of rabbit granulocyte factor that increases permeability of *Echerichia coli*, *J Clin Invest*, 55 : 33, 1975.
  - 22) Rosen, H. and Klebanoff, S. J.: Bactericidal activity of superoxide anion-generating system, A model for the polymorphonuclear leukocyte, *J Exp Med*, 149 : 27, 1979.
  - 23) Schlager, S. I. and Meltzer, M. S.: Macrophage activation for tumor cytotoxicity: analysis of cellular lipid and fatty acid content during lymphokine activation, *J Reticuloendothel Soc*, 29 : 227, 1981.