

# 核酸による溶血性連鎖状球菌の溶血毒

## 増産現象に関する研究

第 23 報

Trypan blue の Streptolysin-O 溶血に

対する非拮抗性について

金沢大学医学部薬理学教室（主任：岡本肇教授）

正 印 達

（受付：昭和40年7月19日）

1940年、伊藤<sup>1)</sup>\*によつて Trypan blue（以下 T.b. と略記）が Streptolysin-S の溶血作用に対するきわめて強力な特異的拮抗物質であることが実証されて以来、本 Azo- 色素は Streptolysin-S の同定あるいは本溶血毒素と諸他の溶血性物質（St-O を含めて）との識別に利用<sup>3), 4), 5), 6)</sup> されるようになって来たのであるが、いまその根拠を述べれば次のごとくである。すなわち、

- 1) T.b. の Streptolysin-S 溶血に対する抑制能はきわめて強力である<sup>1), 2), 7), 8)</sup>,
- 2) T.b. は Streptolysin-O, Staphylolysin, Sod. Taurocholate, Saponin, AgNO<sub>3</sub>, o-Aminophenol azo-tuberculin, o-Aminophenol azo-albumin, Sod. stearate, Sod. oleate, p-Quinonedichloridiimide, Tetrabromo-2,2'-dihydroxyazobenzene, HgCl<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub>, Tyrothricin, Gramicidin, Tyro-

cidine などによる溶血作用には全く無影響性<sup>1), 9), 10), 11)</sup>である。

しかし、これら溶血性物質のうち Streptolysin-O 溶血に対する T.b. の無効性のことに関しては、当教室では早くより実証されていながらも、その成績は未発表のままであった。

今回の研究は、以上のような事情や、またかの Weld (1934)<sup>12)</sup> の溶連菌生菌体の非働化血清による処置で得られる溶血性上清液（すなわち Serum extract of hemolytic streptococci, あるいは Weld's hemotoxin<sup>13)</sup>）ではその溶血性因子が Streptolysin-S と諸性状において一致していることが生物学的方面からの考查で示されているにもかかわらず、この Weld's hemotoxin 対 T.b. の関係いかんの問題もまだ充分検討されずに残っているといった現状であることにかんがみて行つたものである。

\* 同氏<sup>1)</sup>の *in vitro* 及び *in vivo* 実験では溶連菌の1%イースト核酸加ブイオン培養液及び普通ブイオン培養液の上清液が用いられているが、その後 Trypan blue の抗 Streptolysin-S 効果は高度活性の精製 Streptolysin-S 標品でも実証<sup>2)</sup>された。

## A. Streptolysin-O 及び Streptolysin-S における実験

### 実験方法

#### I. 実験材料

##### 1) Streptolysin-O (St-O):

診断用ストレプトリジン「北研」の4—5検体用の標品 (A群溶連菌のストレプトリジンO産生株を Todd-Hewitt 培地に培養し, その培養上清液を塩化亜鉛法によって精製濃縮し, 塩類及び塩酸システインを加えて活性化すると同時に凍結乾燥し真空溶封したもので, 白色粉状) を用いた。

なお, これまで精製 St-S 標品では, その溶血力測定が重量基準で行われている関係上, St-O 標品の溶血力を重量基準で示すこととした。すなわち, St-O 4-5 検体用のアンプルの内容 (約 435mg) から, 100mg を秤取, これを食塩水 (0.85%) 5ml に溶解し, 室温に10分間放置せしめたものを原液 (すなわち 1:50 液) として直に溶血試験に供した。

##### 2) Streptolysin-S (St-S):

溶連菌 “S”-株の1%イースト RNA 加ブイオン 24 時間培養液より岡本・正印ら<sup>10)</sup>の方法によって分離した INF-Fraction (部分的精製 St-S 標品で溶血限界濃度=1:20 Mill.) を供用した。本 St-S 標品の 10mg を食塩水 12.5ml に溶解したものを原液 (すなわち 1:1,250 液) とした。

##### 3) Trypan blue :

Trypan blue “Merck” の 1:2,000 食塩水溶液を調製す。

##### 4) 赤血球浮遊液 :

1% ウサギ 赤血球浮遊液 (脱繊維血液 2ml に対し 3 回食塩水をもって洗浄) の 200ml を調製, その

a) 100ml に対し Trypan blue 1:2,000 液の 5ml を加えたもの [Trypan blue (1:40,000) 加赤血球浮遊液], と

b) 100ml に対し食塩水 5ml を加えたもの (正常赤血球浮遊液) をそれぞれ用意す。

#### II. 実験術式

St-O 原液 2ml に食塩水 2ml を加え, その 1ml を第 1 管目として型のごとく食塩水で倍加希釈したもの 2 列を作り, その 1 列の各試験管には Trypan blue 加赤血球浮遊液の 1ml 宛を, また他の 1 列の各試験管には正常赤血球浮遊液の 1ml 宛を加う。両列を振とう, 37°C の温浴中に 2 時間静置せしめた後, 溶血の有無強弱を判定した。

同様方式の実験を St-S 原液並びに [St-O 原液 2ml + St-S 原液 2ml] 混液についても行った。

### 実験成績

成績は表 1 に示した。すなわち St-S だけの実験列では 1 : 1,000 ~ 2,000 万の高希釈液までも溶血 (溶血限界濃度=1 : 10 ~ 20 Mill.) を起していながら, Trypan blue 共存の実験列では St-S の最高濃度である 1 : 5,000 液でも全く溶血が起っていないに対し, St-O における実験では全く趣が異り, St-O だけでは 1 : 6,400 の希釈度まで溶血が起り, しかも Trypan blue を共存せしめた実験列でも成績はほとんど不変で

1 : 3,200 ~ 6,400 液まで溶血が起っている。

以上の成績からだけでも T.b. は St-S 溶血に対し拮抗するが, St-O 溶血に無影響性であると断じ得るわけであるが, 他方 [St-O + St-S] 混液における実験の所見, すなわち T.b. 共存下では St-S による溶血の方が完全に抑圧されて, St-O による溶血作用だけが発現 (溶血限界濃度=1 : 3,200) している点に注目すべきであろう。

## B. Serum Extract of Hemolytic Streptococci における実験

### 実験方法

#### 1) 血清 :

健常ウサギ血清に対し 56°C, 30 分の処置を行なった,

#### 2) Serum extract of hemolytic streptococci :

普通ブイオン (pH 7.5) 100ml に溶連菌 (“S”-株) を接種, 37°C, 14 時間培養したものを遠心 (3,5

00 r. p. m., 20') して得た沈査(生菌体)に対し前記の非働化血清5mlを加える。次でこの菌浮遊血清を37°Cの温浴中で15分間ゆるく振とうした後冷却, 遠心して, その上清(Weld's hemotoxin)を分取す。

- 3) 実験術式: Weld's hemotoxin から型のごとく食塩水による倍下希釈液(1ml 宛)の2列を作り, そ

の1列には T.b. 加赤血球浮遊液 1ml 宛を, また他列には正常赤血球浮遊液 1ml 宛を加え, 37°C, 2時間静置せしめてから溶血の有無強弱の判定を行なった。

なお, 同時に [Weld's hemotoxin 2ml+St-S 原液 2ml] 混液についての実験をも併行せしめた。

### 実験成績

表2に示したごとく, Weld's hemotoxin ではその容量基準での溶血限界濃度が1:16,384であるものが T.b. の共存によって1:4液が全く非溶血であるといった具合である。またこれと全く同様の成績が [Weld's hemotoxin +

St-S] 混液における実験でも得られた。すなわち, T.b. による被拮抗性という点では Weld's hemotoxin と St-S とは全く一致しているわけである。

### 結

本研究では溶連菌の産出する Streptolysin-S, Streptolysin-O 及びいわゆる Weld's hemotoxin の三者について, それぞれの溶血作用の発現に及ぼす Trypan blue の影響関係が試験された。その結果,

- 1) Streptolysin-O 溶血に対しては Trypan

### 論

blue は全く抑制能がないに対し,

- 2) Weld's hemotoxin にあつては, その溶血作用が Trypan blue によって抑圧される点では Streptolysin-S におけると同様であることの明確なる証明がもたらされた。

### 文

- 1) 伊藤 亮: 日本薬物学雑誌, 30, 124, 1940.
- 2) 宮地知男: 金大結研年報, 11 (下), 237, 1953.
- 3) Koshimura, S., Shimizu, R., Masusaki, T., Ohta, T. and Kishi, G.: Japan. J. Microbiol., 2, 23, 1958.
- 4) Ginsburg, I. and Grossowicz, N.: Bull. Research Council Israel, 7E, 237, 1958.
- 5) Taketo, A. and Taketo, Y.: J. Biochem. (Tokyo), 56, 552 and 561, 1964.
- 6) 小林 孝: 金大結研年報, 22 (下), 177, 1965.
- 7) Rosendal, K. and Bernheimer, A.W.: J. Immunol., 68, 53, 1952.

### 献

- 8) Okamoto, H.: Biochemical study of the streptolysin-S inducing effect of ribonucleic acid: A review. 金大結研年報, 19 (3), 165~197, 1962.
- 9) 大西 淳: 金大結研年報, 10 (下), 26, 1952.
- 10) Shoin, S.: Japan. J. Exp. Med., 24, 13, 1954.
- 11) 秋山万里子, 南部利汎, 宮本乙男: 金大結研年報, 20 (下), 161, 1962.
- 12) Weld, J. T.: J. Exp. Med., 59, 83, 1934; 61, 473, 1935.
- 13) Todd, E. W.: J. Path. & Bact. 47, 423, 1938.

Table 1. Effect of trypan blue on the hemolytic activity of streptolysin-O and streptolysin-S

Hemolysis experiment with							
Streptolysin-O			Streptolysin-S			A mixture of Streptolysin-O (2%) and Streptolysin-S (0.08%), aa	
Dilution (on a weight basis)	R	R + T	Dilution (on a weight basis)	R	R + T	R	R + T
1 : 200	###	###	1 : 5,000	###	—	###	###
1 : 400	###	###	1 : 10,000	###	—	###	###
1 : 800	###	###	1 : 20,000	###	—	###	###
1 : 1,600	###	##	1 : 40,000	###	—	###	++
1 : 3,200	++	++	1 : 80,000	###	—	###	+
1 : 6,400	+	±	1 : 160,000	###	—	###	—
1 : 12,800	—	—	1 : 320,000	###	—	###	—
1 : 25,600	—	—	1 : 640,000	###	—	###	—
1 : 51,200	—	—	1 : 1,280,000	###	—	###	—
1 : 102,400	—	—	1 : 2,560,000	###	—	###	—
1 : 204,800	—	—	1 : 5,120,000	##	—	++	—
1 : 409,600	—	—	1 : 10,240,000	++	—	++	—
1 : 819,200	—	—	1 : 20,480,000	±	—	+	—
1 : 1,638,400	—	—	1 : 40,960,000	—	—	—	—

The hemolysis experiment was carried out in the absence (R) or in the presence (R+T) of trypan blue (1:40,000).

The streptolysin-O sample (liophilized) was purchased from the Kitasato Co., Japan. The sample was dissolved in 0.85% NaCl at concentration of 1:50 (original solution).

The purified streptolysin-S preparation was isolated from 24-hour 1% RNA-broth culture fluid of *Streptococcus hemolyticus*, "S" -strain, according to the method described previously, and a 0.08% solution of the preparation in saline was used as the original solution.

###=Complete hemolysis; ##, ++, +=Partial hemolysis; —=No hemolysis.

Table 2. Effect of trypan blue on the hemolytic activity of  
Weld's hemotoxin and streptolysin-S

Hemolysis experiment with					
Weld's hsmotoxin (Serum extract of hemolytic streptococci)			Streptolysin-S		
Dilution (on a volume basis)	R	R + T	Dilution (on a weight basis)	R	R + T
1 : 4	###	—	1 : 5,000	###	—
1 : 8	###	—	1 : 10,000	###	—
1 : 16	###	—	1 : 20,000	###	—
1 : 32	###	—	1 : 40,000	###	—
1 : 64	###	—	1 : 80,000	###	—
1 : 128	###	—	1 : 160,000	###	—
1 : 256	###	—	1 : 320,000	###	—
1 : 512	###	—	1 : 640,000	###	—
1 : 1,024	###	—	1 : 1,280,000	###	—
1 : 2,048	###	—	1 : 2,560,000	###	—
1 : 4,096	###	—	1 : 5,120,000	###	—
1 : 8,192	++	—	1 : 10,240,000	++	—
1 : 16,384	+	—	1 : 20,480,000	+	—
1 : 32,768	—	—	1 : 40,960,000	—	—

Weld's hemotoxin : Living hemolytic streptococci obtained, by centrifugation, from 14-hour broth culture fluid were suspended in 5 ml of inactivated rabbit serum. The cocci suspension was then incubated at 37°C for 15 minutes, and centrifuged. The clear supernatant thus obtained was used for the hemolysis experiments.