

タンニン酸処置赤血球の Streptolysin S 感受性に関する知見補遺

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤 亮教授）

岡 本 雅 夫

（受付：昭和34年8月29日）

緒 言

Streptolysin S (St-S) の溶血作用に関しては、岡本教授並びに協力者¹⁾²⁾等によつて多数の研究が行われて来ているのであるが、溶血作用の機序については未だ全面的解決を見るに至っていない現状である。

処で最近、伊藤・松田³⁾⁴⁾によつて、“或る種の哺乳動物の赤血球をタンニン酸(TA)で処置すると、その St-S 感受性が低下する、”と

いう注目すべき実証が報告された。この実証に引続き、著者はタンニン酸処置赤血球に対する St-S の影響性について更に検索の歩を進め、その結果として、St-S がタンニン酸処置によつて非溶血性となつた赤血球に対しても、著明な反応性を示すという興味ある知見を得た。ここにその成績を報告する。

実験材料及び方法

1. 赤血球.

本研究には、顕著なタンニン酸効果を示す牛及び山羊赤血球を使用した。ヘパリン加血液を遠心し、赤血球を磷酸緩衝液加生理的食塩水 pH 7.2~7.4 (以下単に食塩水と呼ぶ) で 3 回洗滌した後、食塩水を加えて、(a) タンニン酸処置用として 50% 浮游液として氷冷し、(b) 溶液試験用として 1% 浮游液を作る。

2. Streptolysin S.

本研究に使用した Streptolysin S は、溶連菌の 1% 核酸加ブイオン培養液から分離された精製標品（溶血限界濃度 = 1 : 10,000,000）である⁵⁾。

3. タンニン酸.

実験当日、局方タンニン酸 10mg を食塩水 10ml に溶解したものを原液とし、血球処置用には 1:5,000 又は 1:10,000 稀釈液を使用した。

4. タンニン酸処置赤血球の調整.

TA 処置赤血球の調製は既報³⁾⁴⁾の方式に従つて行つた：

所要数の遠心管にタンニン酸溶液 (1 : 5,000 又は 1 : 10,000) の一定量を入れ予め氷冷しておく。次に各管にタンニン酸の1/10量の 50% 赤血球浮游液を注加混和し、氷水中に 10 分間放置する。TA 処置を終つた赤血球はすみやかに遠心分離し、冷食塩水で 3 回洗滌する。調製した TA 処置赤血球はそのまま直ちに後述の実験に供用された。

5. 溶血試験.

溶血試験は既報⁶⁾の術式に従つた：

St-S 液の通下稀釈液 1ml に 1% 正常赤血球浮游液 1ml を混和し、37°C に 2 時間、更に氷室に一夜静置して溶血の程度を検した。表中記載の溶血成績はすべて最終判定を示し、溶血程度は、Ⅲ 完全溶血；Ⅱ Ⅲ、Ⅱ、Ⅰ、Ⅰ 部分溶血；— 非溶血とした。

実 験 成 績

1. 山羊赤血球を以ての実験.

第 1 表に示した実験例は、TA 処置山羊赤血

球に、いろいろの条件下で、St-S 標品の溶血力から計算して、等量の正常赤血球を完全に溶血せしめるに十分な St-S 量(これを飽和 St-S 量と呼ぶ)を作用せしめた場合の——この際勿論赤血球は溶血を起こさない——St-S 溶血力の変化の有無並びに程度を検索した結果を示したものである。

即ち、先ず8本の遠心管に、1:5,000 TA 液 5ml 及び50%山羊赤血球浮游液 0.5ml を入れ、上述の術式で TA 処置赤血球をつくる。次いで各管に 1:100,000 St-S 液 2.5ml 宛を注加し、血球を混和浮游せしめた後、夫々 37°C で15分(第1管)、30分(第2管)、1時間(第3管); 室温(29°C)で30分(第4管)、1時間(第5管)、2時間(第6管); 及び氷水中で1時間(第7管)、2時間(第8管)静置する。なおこの際、St-S の温度による影響を考慮して、別に St-S のみの対照管3本を設け、夫々 37°C に15分、30分、1時間孵置した。作用時間の終りに各管内容を遠心し、その上清液(何れも澄明であつて溶血は認められなかつた)について、正常山羊赤血球に対する溶血力を測り、各対照 St-S 液のそれと比較検討した。一方各遠心管の残留血球は、夫々冷食塩水で3回洗滌した後、食塩水に浮游せしめ、浮游液をそのまま 37°C に孵置して溶血発現の有無を検した。溶血試験の成績は次の如くであつた: 原St-Sの溶血価は 1:10,000,000であり、又対照の St-S のみを 37°C に15分、30分、60分間孵置したものの溶血価は夫々 1:10,000,000, 1:5,000,000, 1:2,000,000 であつた。然るに St-S を TA 処置赤血球と共に 37°C に孵置した場合には、孵置15分後における上清液の溶血価は 1:1,000,000 であつて、対照 St-S 溶血力の $\frac{1}{10}$ に過ぎない。孵置30分及び60分後の上清液では溶血価は夫々 1:500,000 及び 1:100,000 であつて、対照管の溶血力の $\frac{1}{10}$ 及び $\frac{1}{20}$ に低下している。次ぎに、St-S 赤血球混合液を室温(29°C)で作用せしめた場合では、37°C 実験例に比べれば幾分軽度ではあるが、なお且つ上清液の溶血力は著明に減弱

し、孵置30分、60分、120分後における上清液の溶血価は何れも対照 St-S の約 $\frac{1}{10}$ に過ぎない。然るに、St-S・赤血球混合液を氷水中で作用せしめた実験では、2時間後においても上清液の溶血力には殆んど変化がなかつた。

なお第1表実験では、St-S 作用後の TA 処置赤血球について、これをよく洗滌した後、37°C に置いて溶血の発現如何をも検したのであるが、室温及び氷水中実験例における赤血球(第4—8管)では、何れもその際全く溶血は起こらなかつた。処が 37°C 実験例では(第1—3管)、血球は溶血を起こし、殊に上清液中 St-S 活性の消失が最も著しかつた第3管(37°C, 60分作用)の赤血球では完全溶血が見られた。而もこの際における溶血発現は、正常赤血球に St-S を作用せしめた場合と異なつて、洗滌血球を氷室中に放置しても起こることが確かめられた。

2. 牛赤血球を以ての実験.

上記山羊赤血球実験によつて、St-S と TA 処置赤血球を 37°C で孵置すると、St-S 活性が迅速に消失することが実証されたわけであるが、次ぎに牛赤血球を用いて St-S と TA 処置赤血球の相互の量的変化と St-S 活性消失の程度との関係について検索を行つた。

第2表は牛赤血球を以て行つた4種の実験を一括表示したものである。先ず8本の遠心管に50%牛赤血球浮游液を第I実験(第1, 2管) 0.5ml, 第II実験(第3, 4管) 1ml, 第III実験(第5, 6管) 2ml 及び第IV実験(第7, 8管) 0.5ml を入れ、次ぎに各管に10倍量の 1:5,000 TA 液を加えて型の如く TA 処置赤血球を作る。第1—6管の赤血球に対しては夫々飽和量の St-S (第1, 2管には 1:100,000 液 2.5ml, 第3, 4管には 1:50,000 液 2.5ml, 第5, 6管には 1:25,000 液 2.5ml) を加え、第7, 8管には赤血球量に比して著しく大量の St-S 量(1:25,000 液 2.5ml) を加え、全管を一斉に 37°C に孵置する。なお St-S 1:25,000 液 2.5ml のみの対照管2本をも同時に孵置した。而して孵

置時間を、第I, II, III実験及び対照管では30分及び60分、又第IV実験では20分及び50分とした。所定解置時間後に各管を遠心し、その上清液について、正常牛赤血球を以て溶血試験を行い、溶血力を対照 St-S のそれと比較検討した。

溶血試験の成績は次の如くである。

(1) St-S 1:100,000 液 2.5ml に対し、これに相応する血球量即ち 50% 血球液 0.5ml を作用せしめた場合(第1, 2管)には、前項山羊血球実験と同様に上清液の溶血力は速かに減少し、30分解置後の上清液では対照 St-S 液の $\frac{1}{10}$ の溶血価を示したに過ぎない。

(2) St-S 量並びに血球量を夫々2倍にした第II実験(第3, 4管)でも、これと同様の結果が得られた。

(3) St-S 及び赤血球を更に倍加して、St-S, 1:25,000 液 2.5ml と血球液 2ml を作用せしめた第III実験(第5, 6管)では、解置後30分後には上清液の溶血力は対照 St-S の $\frac{1}{10}$ に、又60分後には $\frac{1}{4}$ に減少したのであるが、St-S 活性の減少度は前2実験例に比して遙かに軽微であつた。

(4) 処で、血球 0.5ml に対し飽和量の4倍に相当する大量の St-S (1:25,000 液 2.5ml) を作用させた第IV実験(第7, 8管)においても、上清液の溶血力は対照 St-S の $\frac{1}{10}$ に減弱した。

即ち、これらの実験によつて、TA 処置赤血球に St-S を作用せしめた際に起こる St-S 活性の消失が、両者の量的関係によつて影響され、而も一定の範囲内では St-S と赤血球量との間に大体比例的定量関係の成立することが判る。

3. St-S 作用後の TA 処置赤血球の溶血発現

に対する Trypan Blue 影響。

第1表実験に示した如く、TA 処置山羊赤血球に飽和量の St-S 液を混じり 37°C に解置すると、上清液の溶血活性は速かに消失し、而もこれと平行して作用後の血球を十分洗滌して再び 37°C に解置すると溶血が起こる。処で、正常赤血球の St-S による溶血に対しては Trypan blue の如き一群の Bisazo 色素が強大な阻止作用を示すことが実証されているのであるが⁷⁾、然らば St-S 作用後の TA 処置赤血球の溶血発現に対する Trypan blue の態度如何。この問題に関して次の実験を行つた。

先ず50%山羊赤血球液 0.4ml を 1:10,000 タンニン酸 4ml で処置した後、St-S 1:100,000 液 2.5ml を混じり 37°C に50分間解置する。次いで血球を十分洗滌した後、20ml 食塩水に浮游せしめ、その 1ml 宛を予め用意した Trypan blue の2倍通下稀釈液列(1:20,000~1:50,000, 000 液 1ml)に加え、振盪混和した後、2時間 37°C に静置して溶血の有無強弱をしらべた。なおこの際対照として、St-S を 1:1,000,000 に含有した食塩水で Trypan blue の同様稀釈液列を作り、これに 1% 正常山羊赤血球液 1ml 宛を混和して同時に解置し、正常血球の St-S 溶血に対する Trypan blue の阻止作用を検した。

第3表に示す如く対照管列の正常血球の St-S 溶血に対しては Trypan blue は 1:2,000,000 稀釈液迄完全に溶血を阻止した。これに反し、TA 処置血球管列では全管に殆んど完全な溶血が認められたのであつて、この成績から St-S 作用後の TA 処置血球の溶血発現に対しては Trypan blue が無効であることが判る。

考

以上の実験成績からタンニン酸処置によつて St-S に対し非感受性となつた赤血球を St-S 溶液に加え、37°C に解置すると St-S 溶液の溶血活性が急速に消失するという知見が得られたの

察

である。ここでこの St-S 活性消失の原因について考えて見たい。第一の可能性として、St-S の TA 処置赤血球による吸着が考えられる。第1表実験に示した如く溶血作用の消失が温度に

よつて著しい影響を受け、低温では全然起こらないことや——この温度的関係は、正常赤血球に対する St-S 溶血作用において実証されている温度関係と全く一致している——溶血活性消失の程度と St-S 及び血球との間に相互比例的定量関係の成立すること等は吸着説に対する有力な証拠と言える。更に、適当な条件下では上清液中の St-S 活性の消失と平行に、作用後の血球に溶血が発現するという事実も亦吸着説を裏付けるものである。而してこの考えを更に押し進めて、正常赤血球に対する St-S 溶血の作用機序を次のように理解することが出来る。St-S を適温 37°C で赤血球に作用せしめると、先ず毒素は血球に吸着し——低温では吸着は起こらない！——次いでこの温度で血球構造に何等かの変化を生ぜしめるに至る。このようにして St-S 侵襲を受けた赤血球は膜構造の破損更に進んで溶解を起こし、遂に血色素の漏出即ち溶血を来す——低温でも起こる！——に至るのであろう。しかしながら本研究では、St-S の消失を単に上清液の溶血作用の消失ということから間接的に推定したわけであつて、溶血作用の消失現象が真に St-S 自体の消失によるものかの点については、なお疑念がないわけではない。例えば、ここに観察された溶血活性の消失が、孵置中に TA 処置血球から放出されたある種の物質によつて St-S が不活性化されたものであるとも考えられる。従つてこの問題の解決には、上清液中の St-S の検出が必要となつてくるのであるが、溶血作用以外には St-S に対する特異的検出反応が知られていない現状では、この点を明らかにすることは不可能である。そこで著者は、紫外線吸収スペクトル測定法を試みて、この問題解決への手懸りを得んと努めた。即ち TA 処置血球と孵置して溶血作用の全く消失した St-S について、紫外線吸収スペクトルを測定して、原 St-S 液のそれと比較検討したのであるが、両者の間には何等異なる処が認められないという成績であつた。勿論、最純 St-S 標品の紫外線吸収スペクトル曲線が

リボ核酸のそれと全く識別し得ないという事実や⁹⁾、本研究に使用した St-S 標品には相当量のリボ核酸 或いは分離中不活性化された St-S の混在が考慮されねばならないこと¹⁰⁾を思う時、以上の成績も当然予想されるものである。

更に著者は、St-S が TA 処置血球によつて吸着されることを直接確かめようとして、St-S と孵置した後の TA 処置赤血球から St-S を溶出しようと試みたのであるが、この実験は遂に成功するに至らなかつた。

一方、TA 処置血球による St-S 活性の消失現象が、St-S 自体の消失によるものではなくて、TA 処置血球から放出されたある種の物質によつて、St-S 溶血作用が阻止されたためであるとすれば、その阻止物質を除去することによつて、一旦消失した溶血活性の復活も期待しうるのである。この想定から、TA 血球と孵置して溶血作用の全く消失した St-S 上清液に透析試験を行つたのであるが、消失した溶血作用の再生は起こらなかつた。

なお最近、岡本研究室の小寺¹⁰⁾は、低温で St-S を作用せしめた正常家兎赤血球を、よく洗滌した後 37°C に孵置すると溶血が起こることを観察して、St-S 溶血が、毒素の吸着、次いで血球溶解の二過程によつて行われるものであろうと述べている。ここで注目すべきは、小寺の実験では、St-S 吸着並びに血球溶解に対する温度の影響が著者の実験成績と全く異なつていことである。この事は、両者の実験条件の差異（赤血球の種属差や、正常赤血球と TA 処置赤血球の性質の相違等）によるものとも考えられるのであるが、他方 St-S 溶血の機序の複雑さを示すものとも言えよう。

Trypan blue の抗 St-S 作用機序に関して宮地¹¹⁾は、Trypan blue が直接 St-S に対し抗毒効果を発揮するのではなく、むしろ赤血球に作用して、これを St-S 侵襲から保護するものであろうと述べているのであるが、更に著者今回の TA 処置血球の溶血発現に対する Trypan blue 実験の成績から、Trypan blue の対血球作用

は、単に St-S の血球への接触或いは附着を阻止するものであつて、一旦 St-S の吸着が起こつて血球侵襲が始まつた後では Trypan blue

は最早 St-S 溶血の発現に阻止的效果を発揮し得ないことが判る。

結 論

タンニン酸処置赤血球(牛及び山羊)に対する Streptolysin S の効果について検討を行つて次の如き結果を得た。

1) タンニン酸処置赤血球を Streptolysin S 溶液に浮游して 37°C に孵置すると、溶血は起こらないにも拘わらず、上清液の溶血活性は急速に減弱する。而もこの際、

(a) 上清液の溶血活性消失の程度と血球及び Streptolysin S との間には定量的關係が成立する。

(b) 孵置温度が低い程、溶血力の消失は輕微であり、氷水中では溶血力は全く變化を來たさない。

2) タンニン酸処置赤血球に適量の Streptolysin S を作用せしめた後、赤血球をよく洗滌して食塩水に浮游したものは、37°C 下では速かに、又氷室中에서도徐々に溶血が起こる。この溶血発現に対し Trypan blue は阻止的效果を示さない。

文 献

- 1) 岡本肇：細菌学の新領域，106，1953.
- 2) Okamoto, H. et al. : Z. Krebsforsch., 62, 408, 1958. 3) Ito, R. : (Unpublished)
- 4) 松田雅夫：金大結研年報，16(下)，499, 1958.
- 5) Okamoto, H. et al. : Jap. J. Med. Sci., IV. Pharmacology, 14, 99, 1941. 6) 伊藤亮：日本薬物学雑誌，28, 41, 1940. 7) 伊藤

献

- 亮：日本薬物学雑誌，30, 124, 1941. 8)
- 岡本肇，他：金大結研年報，14(上)，131, 1956.
- 9) 紺井忠彌：金大十全医学会雑誌，61, 137, 1959. 10) 小寺一英：金大十全医学会雑誌，59, 986, 1957. 11) 宮地知男：金大結研年報，11(下)，237, 1953.

Table 2
The Rate of Decrease in the Lytic Activity of Streptolysin S after
Incubation with the Tannic Acid-Treated Bovine Erythrocytes.

[illegible]

Table 3
Comparison of the Effect of Trypan Blue on the Hemolysis of the TA-Treated Goat Erythrocytes after Incubation with Streptolysin S and the Hemolysis Induced by the Lysin of the Normal Erythrocytes

TA-treated erythrocytes experiment: 0.4 ml of 50% suspension of goat erythrocytes was treated with 4 ml of tannic acid (1 : 10,000) in cold for 10 minutes, the cells washed, and suspended in 2.5 ml of St-S (1:100,000), followed by incubation at 37°C for 50 minutes. The cells were then washed, and resuspended in 20 ml saline. One ml portions of the red cell suspension were added to a series of tubes of 1 ml portions of two-fold serial dilutions of trypan blue. The tubes were incubated at 37°C.

Normal erythrocytes experiment: One ml portions of two-fold serial dilutions of trypan blue in saline containing St-S at a final concentration of 1:1,000,000 were mixed with 1 ml portions of 1% suspension of normal erythrocytes. The tubes were incubated at 37°C.

Hemolysis test Red cells	Dilutions of trypan blue											Control
	1 : 20,000	1 : 50,000	1 : 100,000	1 : 200,000	1 : 500,000	1 : 1,000,000	1 : 2,000,000	1 : 5,000,000	1 : 10,000,000	1 : 20,000,000	1 : 50,000,000	
TA-treated	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Normal	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++

赤血球の Streptolysin S 感受性に及ぼす 諸種酵素の影響について

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤 亮教授）

川 尻 清
岡 野 務
佐 々 恵 一

（受付：昭和34年8月20日）

緒 言

Streptolysin S (St-S) 溶血については、これ迄も幾多の研究がなされているのであるが、その作用機序に関しては今なお不明の点が多い。処で、従来知られている溶血現象の中には、例えば Saponin 溶血の際の Cholesterin や蛇毒溶血における Lecithin の如く、溶血発現が溶血物質と赤血球の特定成分との結合・反応

に基づくことが明らかとなつているものがある。しかし St-S 溶血では、このような特定成分、換言すれば St-S 作用に対する基質については全く知られていない。著者等は今回、この St-S 溶血における基質問題に関連して、赤血球の St-S 感受性に対する諸種酵素の影響を検索した。

実験材料及び方法

1. Streptolysin S.

溶連菌の1%核酸加ブイオン培養液から分離された精製 Streptolysin S 標品（溶血限界濃度=1:20,000, 000)²⁾ を使用した。

2. 酵 素.

次の如き市販酵素標品を用いた。

(a) 蛋白分解酵素：

Pepsin, 1:10,000 (和光); Trypsin (Grübler); Papain (Merck); Subtilisin (Crystalline proteinase from *B. subtilis*; Bioprax, 長瀬産業); Erepsin (東京化成)。

(b) Lipase (石津)。

(c) 糖類分解酵素：

α -Amylase (石津); β -Amylase (Nutritional Biochem. Corp., U. S. A.); Hemicellulase (東京化成); β -Glucosidase (Nutritional Biochem. Corp., U. S. A.); Hyaluronidase (Spractor, 塩野義)。

この中、Papain, Erepsin 及び Lipase の3標品は

食塩水に不溶性であるので、酵素標品の一定量を食塩水によく磨砕懸濁し、その遠心上清液を酵素原液として実験に供した。又この際の酵素濃度を、例えば酵素標品の1%懸濁液の上清液では“1:100”として表記した。

3. 酵素処置赤血球の調製。

家兎血液 0.3 ml (クエン酸を加えて凝血を防ぐ) を遠心し、赤血球を食塩水で3回洗滌し、これを酵素溶液 3 ml (緩衝液を加え至適 pH に修正した食塩水溶液) に浮游して、37°C に一定時間孵置する。孵置後、赤血球を食塩水で3回洗滌し、最後に食塩水 30 ml に浮游し、この1%赤血球浮游液を以つて St-S 溶血試験を行つた。なおこの際における酵素の濃度並びに作用時間に関しては、予備実験として1%正常赤血球浮游液に各酵素を加え、至適 pH, 37°C で2時間作用せしめて、酵素自体による溶血発現の有無を逐次観察し、しかる後、本実験には溶血を起こさない限りにおいて最強の酵素作用を発揮しうる如く実験条件

(酵素濃度及び作用時間)を選定した。

4. 溶血試験。

溶血試験は既報³⁾の術式に従った：

St-S の通下稀釈液 1 ml に被検赤血球の 1%浮游液 1 ml 宛を加え、37°C に孵置し、30分、1時間及

び2時間目に溶血結果を判定した。表中記載の溶血成績は、特に断らない限りすべて2時間目の成績を示し、溶血程度は、Ⅲ完全溶血、Ⅱ、Ⅰ、+、± 部分溶血、- 非溶血とした。

実 験 成 績

第1表は蛋白分解酵素5種(Pepsin, Trypsin, Papain, Subtilisin, Erepsin), Lipase 並びに糖類分解酵素5種 (α -及び β -Amylase, Hemicellulase, β -Glucosidase 及び Hyaluronidase), 総計11種の酵素を以て、赤血球の St-S 感受性に及ぼす各酵素の影響を検索した成績を一括表示したものである。この成績から、酵素処置赤血球に対する St-S 溶血力が、どの酵素実験においても、正常赤血球に対する St-S 溶血力に比して殆んど変わる処がないということがわかる。

更に第2表は、第1表実験の中から Trypsin 処置赤血球及び正常赤血球に対する St-S 溶血比較試験の詳細を示したものであるが、この表によつて、ただに St-S のこれら2種の赤血球

に対する溶血価に差異がないばかりでなく、溶血の発現過程においても両実験の間に全く異なる処がないことが看取される。

酵素処置赤血球の生物学的性状に関しては最近、Pickles 等、その他の人々^{4), 5)}が, Trypsin, Papain 等の蛋白分解酵素 処置赤血球の凝集性について注目すべき報告を行つているのであるが、著者等の今回の St-S 溶血現象についての実験成績は、赤血球の St-S 感受性が諸種酵素によつて全く影響を受けないことを示したものである。

なお、以上の結果からは、St-S 作用における基質が赤血球の如何なる成分であるかに関しては、何ら有意義な知見を得ることは出来なかつた。

結

家兎赤血球に、蛋白分解酵素 (Pepsin, Trypsin, Papain, Subtilisin, Erepsin), Lipase 及び糖分解酵素(α -及び β -Amylase, β -Glucosidase, Hemicellulase, Hyaluronidase) を作用せしめて、

論

その Streptolysin S 感受性に及ぼす影響を検索したが、これら酵素 処置赤血球はその Streptolysin S による溶血性において、正常赤血球と全く異なる処がなかつた。

文

- 1) 岡本隆：細菌学の新領域, 106, 1953.
- 2) Okamoto, H. et al. : Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacology, 14, 99, 1941.
- 3) 伊藤亮：日本薬学雑誌, 28, 41, 1940.
- 4) Mor-

献

- ton, J. A., and Pickles, M. M. : Nature, 159, 779, 1947.
- 5) Kuhns, W. J., and Bailey, A. : Am. J. Clin. Path., 20, 1067, 1950.

Table 1
Streptolysin-S Susceptibility of Enzyme-Treated Erythrocytes

Enzyme-treated red cells		Dilution of streptolysin S								
Enzymes (concentration)	Experimental conditions	1 : 100,000	1 : 200,000	1 : 500,000	1 : 1,000,000	1 : 2,000,000	1 : 5,000,000	1 : 10,000,000	1 : 20,000,000	1 : 50,000,000
pepsin (1:300)	acetate buffer pH 5.0, 37°C 2 hr.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
trypsin (1:200)	phosphate buffer pH 7.4, 37°C 2 hr.	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
subtilisin (1:10,000)	phosphate buffer pH 7.2, 37°C 1 hr.	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
papain ("1:200")	phosphate buffer pH 7.2, 37°C 2 hr.	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
erepsin ("1:200")	phosphate buffer pH 7.2, 37°C 2 hr.	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
lipase ("1:1,000")	phosphate buffer pH 7.2, 37°C 30 min.	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
α -amylase (1:200)	phosphate buffer pH 7.2, 37°C 2 hr.	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
β -amylase (1:200)	"	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
hemicellulase (1:200)	"	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
β -glucosidase (1:100)	"	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
hyaluronidase (5,000 units per ml)	"	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
normal cells (control)		+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-

