

赤血球の Streptolysin S 感受性に対する諸種 物質(特にタンニン酸構成物質及び蛋白 質試薬)の影響についての検索

金沢大学結核研究所薬理製剤部(主任: 伊藤亮教授)

川 尻 清

(受付: 昭和35年3月18日)

緒 言

さきに伊藤・松田等¹⁾²⁾によつて、ある種の哺乳動物の赤血球を極めて穏和な条件下でタンニン酸(TA)で処置すると、Streptolysin S(St-S)の溶血作用に対する赤血球の感受性が高度に低下するという注目すべき実証が行われたのであるが、これに引続きこのTAの赤血球のSt-S感受性低下効果(以下“TA効果”と略称す)に関し精緻な考査が進められており、すでに青木³⁾、岡本⁴⁾等によつて甚だ興味ある新知見が得られている。

さて、TA効果発現の原因は何か? この問題に関しては、St-Sの溶血機序やTAの赤血球に対する反応機転が明らかでない現在、全く不明という外はない。所で、TAは化学的には甚だ複雑な集成を有しており、今日なおその化学構造は明らかにされていないが、大体没食子酸 Gallic acid もしくはその誘導体の重合体が

糖類或いは Phloroglucin と結合したものであるとされている。又薬理的には、TAは蛋白質に顕著な親和力を示し、これを変性凝固せしめる性質があり、このためTAは収斂薬として医療及び製革工業に古くから用いられていることは周知の如くである。そこで私は、TA効果発現の機序探究の一環として、ここに

- 1) TA構成物質及びその類似化合物、
- 2) TAと共に収斂薬として知られている重金属塩類、
- 3) 蛋白質に対する特異的試薬、
- 4) 赤血球或いは一般細胞に対し顕著な反応性を示す化合物

等、総計57の物質を選んで、夫々の赤血球のSt-S感受性に対する影響性について検索を行った。ここにその成績を報告する。

実 験 方 法

1. 赤血球. 健常モルモット赤血球を使用した。心臓穿刺によつて採血したヘパリン加血液を遠心し、赤血球は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、食塩水をもつて50%浮遊液とした。

2. Streptolysin S. 溶連菌の1%リボ核酸加ブイオン培養液から分離された精製 St-S 標品⁵⁾(溶血限

界濃度=1:10⁷-2×10⁷)を使用した。

3. 被検物質. 被検物質は、糖類を除いて他はすべて食塩水に溶解し、溶液のpHを検し、もし必要があれば修正して pH 7.2-7.4 としたものを実験に供用した。また被検物質は、糖類では等張溶液とし、その他のものは出来る限り高濃度溶液として用いたが、ある種のもの、例えば金属塩類や表面活性物質の如く、

それ自体溶血活性を呈するものでは、予めその溶血力をしらべて、溶血を起こさない範囲で最高濃度を用いるようにした(第1表参照)。

4. 試薬処置赤血球の調製. 試薬処置赤血球の調製は、タンニン酸処置法¹⁾に準じて次のように行つた:

所定濃度の被検物質溶液 4 ml に 50% 赤血球浮游液 0.4 ml を注加混和し、この混合液を、特に断らない限り、室温に 20 分間放置する。次いで混合液を遠心し、赤血球は食塩水 4 ml で 3 回洗滌した後、食塩水 20 ml に浮遊せしめる(1% 処置赤血球浮游液)。

実験成績

1. タンニン酸構成物質についての実験.

既述の如く TA は没食子酸及びその誘導体の配糖体、もしくはそれらと Phloroglucin との結合体からなる高分子化合物体であるが、私は先ず、これら TA の構成物質並びにそれらの類似化合物体について、赤血球の St-S 感受性に対する影響性の如何を検索した。

(a) 没食子酸及び類似化合物体.

没食子酸、Phloroglucin を中心として諸種フェノール類、フェノール-カルボン酸類等 14 種の化合物体(第1表参照)について考査が行われた。第2表は供試物質中 Gallic acid, Protocatechuic acid, Salicylic acid, Phloroglucin, Pyrogallol, Phenol, Shikimic acid 及び Quinic acid に関する溶血試験の成績を抜き出して掲示したものである。この表に明らかなように、対照列の TA 処置赤血球浮游液では St-S の溶血限界濃度は僅かに 1:200,000 であつて、従つてここでは処置赤血球の St-S 感受性が正常赤血球のその 1/100 に低下している。しかるに Gallic acid, Phloroglucin 等で処置した赤血球にあつては、その St-S 感受性は正常赤血球に比して少しも変わる所がない。また、この表に示したものの以外の化合物体についても、これと全く同様の成績が得られたのであつて、即ち供試物質はいずれも比較的高濃度(1:200-1:2,000)においても赤血球の St-S 感受性に対し何ら影

響を及ぼさないことが実証されたのである。

5. 溶血試験. 溶血試験は慣用の術式²⁾に従つて行つた。即ち St-S の通下稀釈液 1 ml に 1% 処置赤血球浮游液 1 ml 宛を混和し、37°C に 2 時間、更に氷室に一夜静置して溶血成績を判定した。この際対照として、正常赤血球浮游液並びに TA 処置赤血球浮游液をもつての溶血試験を同時に実施し、夫々の場合における St-S 溶血力を相互に比較検討した。溶血成績の判定にあつては、溶血の程度を完全溶血卍; 不完全溶血卍, 卍, +, ±; 非溶血一, として記録した。なお附表の溶血試験には最終判定における成績のみを掲示した。

(b) 糖類.

葡萄糖は配糖体構成において Gallic acid と共に TA の主要組成の一つであつて、従つてこれが TA 効果発現に際し何らかの役割を演ずるのではなからうかとの推想もあながち無理ではない。そこで Xylose, Arabinose, Rhamnose, Glucose, Galactose, Fructose, Mannose, Mannit, Maltose, Lactose, Saccharose 及び Trehalose の 12 の糖類について、夫々の赤血球の St-S 感受性に対する影響性について検討した。因みに糖類と St-S 溶血との影響関係については、さきに大西³⁾によつて、葡萄糖を初めとして諸種糖類の等張液中では、赤血球は St-S 溶血に対し著しい抵抗性を示すということが観察報告されている。

私の実験の結果は、大西の実験の場合と大いに趣を異にして、供試糖類の何れの場合においても、糖類処置赤血球の St-S 感受性と正常赤血球のそれとの間に全く差がないことが実証された(第3表参照)。

以上に述べた TA 構成物質を中心とした化合物体についての実験成績は、TA の赤血球の St-S 感受性低下作用が、TA の組成物質個々の特性に基因するものではないことを明示したものであつて、従つて TA 効果の発現には TA の

複雑な分子構成自体が直接に何らかの機作によつて関与しているものと断ぜざるを得ない次第である。

2. 重金属塩類についての実験.

一般に重金属塩は蛋白質に作用して容易にこれを変性（凝固・沈澱）せしめる特性を有しているため古くからタンニン酸と共に収斂薬として知られている。もし TA 効果が、赤血球に対するタンニン酸の収斂作用によつてもたらされるものとすれば、重金属塩においても亦同じような効果が期待されてもよいわけであつて、この見地から重金属塩による処置が赤血球の St-S 感受性に如何なる影響を与えるかについて検索を行つた。所が、重金属塩には赤血球に対し溶血作用を呈するものが多く、このため予備実験として先ず個々の重金属塩について夫々の溶血活性を測定しておき、本実験において赤血球の重金属塩処置を行うには溶血活性を示さない濃度を使用することとしたのであるが、中には AgNO_3 の如く溶血活性が余りにも強力であるため遂に実験に使用することが出来なかつたものもあつた。供試重金属塩は HgCl_2 , 1:100,000; CuSO_4 , 1:100,000; 酢酸鉛, 1:10,000; ZnSO_4 , 1:1,000; FeCl_3 , 1:100,000; FeSO_4 , 1:100,000; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 1:100,000; CdSO_4 , 1:1,000 の 8 種である。

第 3 表には供試重金属塩中特に、金属塩自体の溶血活性の極めて弱い ZnSO_4 及び CdSO_4 に関する溶血試験の成績が掲げてあるが、これら 2 金属塩は 1:1,000 という高濃度でも赤血球の St-S 感受性に対し何ら影響する所がなかつた。その他の重金属塩もすべて被検濃度——金属塩自体の溶血活性に妨げられ比較的 low 濃度 (1:10,000—1:100,000) において検査を行わねばならなかつたという事情はあつたが——では無影響性であつた。

以上の如く蛋白質に対し顕著な変性作用（収斂作用）を示す重金属塩類が、赤血球の St-S 感受性に対し何ら認むべき影響を与えないとい

うことから、St-S 溶血に際して赤血球の蛋白質組成が直接 St-S の作用発現に参画しているとは考えがたいのであつて、従つてまた TA 効果の発現と TA の対蛋白質作用との関連性についても速断できないものがあることが推想される。そこでこの問題を更に検討するために、種々の蛋白質試薬の影響性について考查を進めた。

3. 蛋白質試薬についての実験.

蛋白質分子内に反応性に富んだアミノ酸残基が存在し、而もそれが蛋白質の生物学的活性の発現に参与している場合には、特定のアミノ酸のみに選択的に反応する試薬を適当な条件下で反応せしめることによつて蛋白質は活性を失うことがある。またその際使用した試薬によつて蛋白質の活性アミノ酸残基を探知することが出来る。TA 処置による赤血球の St-S 感受性の低下が、赤血球蛋白質と TA との反応に起因するものならば、赤血球蛋白質内に St-S 感受性に密接な関係をもつたアミノ酸残基が存在することも可能であるという想定のもとに、蛋白質試薬を赤血球に反応せしめることによつて赤血球の St-S 感受性に如何なる変動が起こるかについて検索を行つた。しかし蛋白質試薬中には、試薬自体が溶血作用を呈したり、或いは試薬との反応によつて赤血球が損傷を受け、その結果溶血をきたすようなものもあつて、結局実験に供した試薬は Iodoacetate, p-Chloromercuribenzoate, p-Aminophenol diazonium Chloride 及び Formalin の 4 種であつた。

a) -SH 基試薬.

Cysteine に由来する -SH 基は蛋白質中で Tyrosine 残基及び Amino 基と共に最も反応性に富んだ基とされている。-SH 基に対する特異試薬中 Iodoacetate 及び p-Chloromercuribenzoate の 2 つについて検査を行つたが、赤血球を前者の 0.1% 溶液、または後者 0.01% の溶液で処置しても、その St-S 感受性には全く変化をきたさないという結果であつた。

b) p-Aminophenol diazonium chloride.

ジアゾニウム化合物は Landsteiner の研究以来, 蛋白質の主として Tyrosine 及び Histidine 残基に対する特異的試薬として生物学研究に広く応用されている。私は, さきに伊藤・越村等⁸⁾⁹⁾によつて行われた Azo-Tuberculin 調製法に準じて, 赤血球に下記術式で p-Aminophenol のジアゾニウム塩をカップルさせた。

実施法:

1) p-Aminophenol diazonium 塩の調製.

p-Aminophenol 0.1 gm を N HCl 2.3 ml に溶解し, 氷冷下で NaNO_2 0.063 gm (水 2.7 ml に溶解) を滴下して型の如くジアゾ化し, 最後に水を追加して総量を 5 ml とする。

(2) カップリング.

血液 6 ml を遠心し, 赤血球を食塩水で 3 回洗滌した後, 90 ml の磷酸緩衝液食塩水 (0.15 M Na_2HPO_4 と 0.85% NaCl の等量混合液) に浮游し, よく氷冷しておく。この赤血球浮游液を 30 ml 宛に 3 等分し, その各々に前項のジアゾニウム塩溶液を夫々 0.5 ml, 1 ml, 及び 3.5 ml 宛混和し, 混合液を氷水中に 2 時間放置する。次いで各混合液を遠心し, 赤血球は食塩水で 3 回洗滌した後, 食塩水をもつて夫々 1% 浮游液とする。

このようにしてアゾ化の程度を異にした 3 種類の赤血球の p-Aminophenol diazonium 誘導体 (アゾ赤血球と呼ぶ) を調製した。この 3 種のアゾ赤血球並びに正常赤血球をもつて St-S 溶血試験を行つた結果, アゾ赤血球は, そのアゾ化の程度の如何に拘わらず, St-S に対する感受性において正常赤血球と何ら変わる所がないことが確かめられた。

c) Formalin.

蛋白質に対する Formalin の反応については従来遊離 Amino 基への添加反応がよく研究されているが, この外 Indol, Guanidyl 及び Amido 基も Formalin によつて変化を受けるとされており, 従つて Formalin による蛋白質の変化には甚だ複雑多岐なものであることが予想される。Formalin は組織固定や, 細菌毒素の Toxoid 生成のように生物学研究上興味ある

特性を有していることは周知の如くであるが, また最近 Cole and Farrell 等¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾によつて Formalin で処置した赤血球の免疫学的性状等に関して注目すべき研究が報告されている。そこで私は赤血球の St-S 感受性に対する Formalin の影響如何の問題について次のように実験を行つた。

実施法: Formalin は局方試薬 (30% Formaldehyde 溶液) を使用し, 赤血球としてモルモット赤血球の外に兎赤血球も用いた。その他に関しては, 実験方法に記載された術式に従つた。

第 4 及び 5 表は主要実験成績を示したものである。第 4 表は Formalin 処置赤血球をもつての St-S 溶血試験の成績であつて, ここで特に注目されることは, 高濃度 (1:4 または 1:10) Formalin 溶液で長時間 (24 時間) 処置したモルモット赤血球に対しては, St-S が全然溶血作用を呈しないことである。しかし Formalin の 1:200 稀釈溶液で処置した赤血球では, その St-S 感受性は正常赤血球のそれと少しも異なる所がなかつた。なお, その中間の濃度溶液や, 或いは高濃度溶液でも処置時間を短縮して 3 時間, 或いは 1 時間等とした場合には, Formalin 処置後の洗滌操作中に赤血球が溶血を起こしてため検査を遂行することが出来なかつた。

以上の実験成績は, Formalin が適当な条件下では赤血球の St-S 感受性に対しタンニン酸の如く抑制的影響を發揮する物質であることを示すものであるが, 考査が進むにつれて両者の抑制効果には大いに趣を異にするものあることが明らかとなつた。即ち,

a) タンニン酸の場合には, 赤血球の St-S 感受性に対する抑制効果の程度が, 動物の種類によつて著しく不同であつて, 兎赤血球の如きはタンニン酸処置を施してもその St-S 感受性は少しも変化をきたさなかつたのである¹⁴⁾。所が Formalin の場合には, 第 4 表にも示したように, 兎赤血球にあつてもモルモット赤血球と同様に Formalin 処置によつてその St-S 感受性が全く失われてしまうことが実証されたの

であつて、この事から Formalin の抑制効果には動物の種類による変差のないことがうかがえる。

b) タンニン酸効果では処置赤血球をある種の蛋白質、就中 Gelatin で再処置すると一旦消失した St-S 感受性が容易に復活することが実証されている¹³⁾。そこで Formalin 処置赤血球についても蛋白質による St-S 感受性の復活的影響の如何を検討した。第5表に示した実験成績から明らかなように、対照実験であるタンニン酸処置赤血球の場合には、処置赤血球を Gelatin の 1:50,000 溶液で 37°C, 20分間処置すると St-S 感受性は殆んど正常に回復したのに対し、Formalin 処置赤血球では同様の Gelatin 再処置を施しても消失した St-S 感受性が再現されるという徴候は全く見られなかつた。

即ち TA 処置の場合には、極めて穏和な条件下でも高度の而も可逆性の効果が現われることから、St-S 感受性の低下が赤血球の表在性に限局した極く微妙な理化学的性状の変化によるものであろうことが推測されるのであるが、これに反し Formalin 処置による赤血球の性状変化は遙かに激烈・広範なものであつて、そのため処置赤血球は St-S 作用を受けても最早細胞膜の崩壊やヘモグロビン溶出のような溶血現象を呈しないような状態に固定されたものと考えられる。

以上の如く、蛋白質試薬における実験からは、赤血球蛋白質内に St-S 溶血に密接な関係を有する特定アミノ酸残基の存在性、ひいては TA 効果の発現と TA の対蛋白質作用との関連性を首肯せしめるような知見は得られなかつた。

4. その他の諸種薬物についての実験.

赤血球の細胞構成に何らかの変化を与える可能性があると考えられる物質の中から、下に示した 19種を選び、その各々について赤血球の St-S 感受性に対する影響性を検索した。

- 1) Acetylcholine 及び関連物質
Acetylcholine (1:1,000)
Eserine salicylate (1:1,000)
Parathione (1:1,000)
Methylparathione (1:1,000)
- 2) 表面活性物質
Cetyltrimethylammonium bromide
(CTAB) (1:100,000)
Tween 80 (1:5,000)
- 3) Hemoglobin 作用性物質
Hydroxylamine (1:200)
Hydrazine (1:200)
 α, α' -Dipyridyl (1:200)
8-Hydroxyquinoline (1:200)
- 4) 酸化・還元剤
Potassium bichromate (M/100)
Potassium ferrocyanide (M/100)
Sodium thiosulfate (M/10)
- 5) その他
Alloxan (1:1,000)
Phlorhizin (1:1,000)
Nitromin (1:100)
Sarkomycin (1:500)
Azan (1:500)
Vitamin B₁₂ (1:10,000)

実験の結果は供試物質のいずれの場合においても、処置赤血球の St-S 感受性は正常赤血球のそれに比して少しも異なる所がないという成績であつた。しかし、ここに特に附記すべきことは、

a) 赤血球内における K イオンの分布及びその細胞膜透過性等に重要な影響性をもつものとして近來特に研究者の注目を集めている Acetylcholine 並びに Cholinesterase 阻害剤等¹⁴⁾が、赤血球の St-S 感受性に対しては無影響性であつたこと、

b) 表面活性物質である Tween 80 は、さきに大西¹⁵⁾によつてその St-S 溶血に対する抑制的影響が実証されているのであるが、赤血球の St-S 感受性には些の影響も呈しなかつたこと、

c) Hydroxylamine や Hydrazine をもつて Hemoglobin に著明な化学的变化を与えても、

赤血球の St-S 感受性には影響がなかつたこと、等である。

総 括

この研究においてタンニン酸効果の発現機序探究の見地から、一方においてはタンニン酸の化学組成について検討が加えられ、その結果タンニン酸の個々の構成物質は赤血球の St-S 感受性に対して全く影響性のないことが確かめられた。他方、タンニン酸の対蛋白質作用、所謂収斂作用に関連して、諸種の重金属塩類や特殊蛋白質試薬等の影響性を指向した検索では、あらたに Formalin が赤血球の St-S 感受性に対して特異な抑制効果——しかしタンニン酸効果と著しく趣を異にする所がある——を呈する物

質であることが見出されたが、これを除いては他はすべて無影響性であるという結果が得られたのであつて、これらの実験成績からは、タンニン酸効果をタンニン酸の対蛋白質作用に帰着せしめるような有意な知見は得られなかつた。

最後に、赤血球のイオン透過性や Hemoglobin の化学的性状に甚大な変化を与えるような物質が、赤血球の St-S 感受性に少しも影響を呈しないという実証は、St-S の溶血機序の面から見て興味ある成績といえよう。

結 論

タンニン酸構成物質 (没食子酸, Phloroglucin, 糖類) 及びその類似化合物等26, 重金属塩類8, 蛋白質試薬4, その他種々の化合物19 (Acetylcholine, 抗 Cholinesterase 剤, 表面活性物質, Hemoglobin 試薬等), 総計57の物質について、夫々の赤血球の Streptolysin S 感受性に対する影響性について検索し、次の結果が得られた。

1. モルモット並びに兎赤血球を Formalin の

濃厚溶液で長時間処置すると、赤血球はいずれも Streptolysin S に対し高度に非溶血性となる。しかしこの際 Formalin 処置赤血球を Gelatin で再処置しても、タンニン酸処置赤血球において見られたような Streptolysin S 感受性の復活は起こらなかつた。

2. その他の物質はすべて、実験に使用した濃度では、モルモット赤血球の Streptolysin S 感受性に対し何ら影響を呈しなかつた。

文 献

- 1) Ito, R. et al. : (unpublished) 2) 松田雅夫 : 金大結研年報, 16(下), 499, 1958.
- 3) 青木康三 : 同上, (印刷中).
- 4) 岡本雅夫 : 同上, (印刷中).
- 5) Okamoto, H. et al. : Jap. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 14, 99, 1941. 6) 伊藤亮 : 日本薬物学雑誌, 28, 41, 1940. 7) 大西淳 : 金大結研年報, 10(下), 26, 1952.
- 8) Ito, R., & Koshimura, S. : Jap. Med. J., 2, 185, 1949. 9) 伊藤亮, 他 : 金大

- 結研年報, 9(上), 1, 1950. 10) Cole, L. R., & Farrell, V. R. : J. Exp. Med., 102, 631, 1955. 11) Lawlis, J. F., Jr. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 300, 1958.
- 12) Ingraham, J. S. : Ibid., 99, 452, 1958.
- 13) Fauconnier, B., & Barua, D. : Nature, 183, 629, 1959. 14) Gale, G. R. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 297, 1958.

Table 1

List of substances tested for their effect on streptolysin-S
susceptibility of guinea pig erythrocyte

substances	ineffective at concen- tration of:	substances	ineffective at concen- tration of:
I. phenols and phenolic acids		ZnSO ₄	1 : 1,000
gallic acid	1 : 2,000	FeCl ₃	1 : 100,000
protocatechuic acid	1 : 2,000	FeSO ₄	1 : 100,000
gentisic acid	1 : 2,000	Al ₂ (SO ₄) ₃	1 : 100,000
vanillic acid	1 : 2,000	CdSO ₄	1 : 1,000
p-hydroxybenzoic acid	1 : 2,000		
salicylic acid	1 : 2,000	IV. protein reagents	
phloroglucin	1 : 200	monoiodoacetate	1 : 1,000
pyrogallol	1 : 2,000	p-chloromercuri- benzoate	1 : 10,000
pyrocatechol	1 : 2,000	p-aminophenol diazonium chloride	.
resorcinol	1 : 2,000	formalin	effective
hydroquinone	1 : 1,000		
phenol	1 : 1,000	V. miscellaneous	
shikimic acid	1 : 1,000	acetylcholine	1 : 1,000
quinic acid	1 : 1,000	eserine salicylate	1 : 1,000
		parathione	1 : 1,000
II. carbohydrates		methylparathione	1 : 1,000
xylose	4.5%	cetyltrimethyl ammonium bromide	1 : 100,000
arabinose	4.5%	tween 80	1 : 5,000
rhamnose	4.5%	alloxan	1 : 1,000
glucose	5.1%	phlorhizin	1 : 1,000
galactose	5.1%	K ₂ Cr ₂ O ₇	M/100
fructose	5.1%	K ₃ Fe(CN) ₆	M/100
mannose	5.1%	sodium thiosulfate	M/10
mannit	4.3%	NH ₂ OH	1 : 200
maltose	9%	NH ₂ NH ₂	1 : 200
lactose	9%	α, α'-dipyridyl	1 : 200
sucrose	9%	8-hydroxyquinoline	1 : 200
trehalose	9%	nitromin	1 : 100
III. metal salts		sarkomycin	1 : 50
HgCl ₂	1 : 100,000	azan	1 : 200
CuSO ₄	1 : 100,000	Vitamin B ₁₂	1 : 10,000
lead acetate	1 : 10,000		

Table 2 Influence of gallic acid and related compounds on streptolysin-S susceptibility of guinea pig erythrocyte, in comparison with the effect of tannic acid

hemolysis test		dilution of streptolysin S								
		100,000	200,000	500,000	1,000,000	2,000,000	5,000,000	10,000,000	20,000,000	50,000,000
red cells treated with:		1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :
gallic acid (1:2,000)		###	###	###	###	###	##	+	±	-
protocatechuic acid (1:2,000)		###	###	###	###	##	++	+	-	-
salicylic acid (1:2,000)		###	###	###	###	##	++	+	±	-
phloroglucin (1:200)		###	###	###	###	##	++	+	±	-
pyrogallol (1:2,000)		###	###	###	###	##	++	+	-	-
phenol (1:1,000)		###	###	###	###	##	++	+	±	-
shikimic acid (1:1,000)		###	###	###	###	##	++	+	±	-
quinic acid (1:1,000)		###	###	###	##	++	+	±	-	-
tannic acid (1:5,000)		###	±	-	-	-	-	-	-	-
normal red cell		###	###	###	###	##	++	+	±	-

= complete hemolysis ; ##, ++, +, ± = partial hemolysis ; - = no hemolysis.

Table 3 Streptolysin hemolysis tests with erythrocytes treated with carbohydrates, metal salts, and tannic acid

hemolysis test		dilution of streptolysin S								
		100,000	200,000	500,000	1,000,000	2,000,000	5,000,000	10,000,000	20,000,000	50,000,000
red cells treated with:		1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :
carbohydrates	arabinose (4.5%)	###	###	###	##	++	+	±	-	-
	glucose (5.1%)	###	###	###	##	++	+	±	-	-
	maltose (9%)	###	###	###	##	++	+	-	-	-
	sucrose (9%)	###	###	###	###	++	+	±	-	-
metal salts	ZnSO ₄ (1:1,000)	###	###	###	##	++	+	-	-	-
	CdSO ₄ (1:1,000)	###	###	###	###	##	++	+	-	-
tannic acid (1:5,000)		###	##	+	-	-	-	-	-	-
normal red cell (control)		###	###	###	##	++	+	±	-	-

Table 4 Effect of formalin on streptolysin-S susceptibility of guinea pig and rabbit erythrocytes

red cells			dilution of streptolysin S								
animal	treated with formalin		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
	dilution	time hr	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :
guinea pig	1 : 4	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 : 10	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 : 200	24	###	###	###	###	###	##	++	±	-
	normal red cell		###	###	###	###	##	++	+	±	-
rabbit	1 : 4	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	normal red cell		###	###	###	##	++	+	±	-	-

Table 5 Effect of gelatin on the lost streptolysin-susceptibility of formalinized erythrocytes of guinea pig, in comparison with that of gelatin on tanned red cells

hemolysis test		dilution of streptolysin S								
red cells		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
normal red cell		###	###	###	###	###	##	++	+	-
treated with formalin (1:4)	treated with gelatin (1:50,000)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	without gelatin treatment	-	-	-	-	-	-	-	-	-
treated with tannic acid (1:10,000)	treated with gelatin (1:50,000)	###	###	###	###	##	++	+	-	-
	without gelatin treatment	###	++	±	-	-	-	-	-	-

Gelatin treatment was carried out at 37°C for 20 minutes.