

タンニン酸処置赤血球の Streptolysin S 感受性に及ぼす蛋白質の影響について

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤 亮教授）

青 木 康 三

（受付：昭和34年10月21日）

緒 言

Streptolysin S (St-S) 溶血に関し最近、伊藤・松田^{1) 2)}によつて、哺乳動物の赤血球をタンニン酸 (TA) で処置すると、赤血球は St-S に対する感受性を喪失し、大量の St-S の存在下でも溶血を起こさない、という注目すべき実証が報告された。これに引続き著者は、TA 処置によつて極度に低下した赤血球の St-S 感受性に対する諸種物質の影響を検索しているうち

に偶々、TA 処置赤血球を或る種の蛋白質で処置すると、血球の St-S 感受性が容易に回復するというを観察した。そこで多数の蛋白並びに類似物質等について、この新しい生物学的特性に関し系統的に攻査が押し進められ、その結果、興味ある新知見が得られた。ここにその成績を報告する次第である。

実験材料及び方法

1. 赤血球.

本研究には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モルモット血液（ヘパリンを加えて凝血を防ぐ）を遠心し、赤血球を3回磷酸緩衝生理的食塩水 pH. 7.2~7.4（以下単に食塩水と呼ぶ）で洗滌した後、食塩水を加えて血液の2倍量とし（50%赤血球浮游液）氷水中に置く。

2. 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³⁾（溶血限界濃度=1:20,000, 000）を使用した。

3. タンニン酸処置赤血球の調製.

タンニン酸 処置赤血球の調製は既報²⁾の術式で行つた。50%赤血球浮游液 0.4 ml をタンニン酸 1:10, 000 液 4 ml に注加し、氷冷下で10分間放置し、次いで赤血球を3回冷食塩水で洗滌する。調製した TA 処置赤血球は直ちに後述の如く実験に供された。

4. 溶血試験.

St-S 溶血力の測定は従来⁴⁾の方式によつて行つた。St-S の通下稀釈液 1 ml に被検赤血球浮游液 1ml を混和し、37°C 2時間、後更に氷室に一夜静置して溶血成績を判定した。表中記載の成績は最終判定を示し、溶血程度は、卍完全溶血；卅，卅，+，±部分溶血；— 非溶血とした。

実 験 成 績

第1表はタンニン酸処置によつて著明に低下したモルモット赤血球の St-S 感受性に対する、卵アルブミンの作用を検索した実験成績を示したものである。

実施法： 7本の遠心管に夫々 1:10,000 タンニン酸液 4 ml を入れ氷冷しておく。これに 50%赤血球浮游液 0.4 ml 宛を混じ、氷冷下10分間処置し、次いで赤血球を3回洗滌した後、

表記の如く諸種濃度 (1:200 ~ 1:50,000) の卵アルブミン液 4ml 及び食塩水 4ml (対照管) に浮遊せしめ, 37°C, 20分間孵置する。孵置後, 赤血球は冷食塩水でよく洗滌し, 最後に食塩水 20ml に浮遊せしめ, この 1% 赤血球浮遊液を以て, St-S の溶血試験を行った。

第 1 表の溶血試験成績から重要事項を摘記すれば次の如くである。

1) 正常赤血球並びに TA 処置赤血球に対する St-S の溶血限界濃度は夫々 1:20,000,000 及び 1:500,000 であつて, TA 処置によつて赤血球の St-S 感受性は約 $\frac{1}{40}$ に低下したことが判る。

2) TA 処置後, 更に

(a) 卵アルブミンの 1:200 並びに 1:1,000 液中に 37°C, 20分間 孵置した赤血球に対しては, St-S は正常赤血球におけると同等の溶血効力を発揮し,

(b) 卵アルブミン 1:5,000, 1:10,000 並びに 1:20,000 液で処置した赤血球に対する St-S の溶血限界濃度は夫々 1:5,000,000, 1:5,000,000 並びに 1:2,000,000 であり,

(c) 卵アルブミン 1:50,000 液に 孵置した赤血球に対する St-S 溶血効力は, 対照の TA 単独処置赤血球のそれと比べて変わる処がなかつた。

以上の成績から, TA 処置によつて一旦低下した赤血球の St-S 感受性が, 卵アルブミンの 1:200 ~ 1:1,000 液で処置することによつて容易に而も完全に復原することが明らかとなつた。

第 2 及び 3 表は卵アルブミン処置における温度及び時間の影響を検索した実験成績を示したものである。第 2 表 実験から, 卵アルブミンの St-S 感受性回復作用は, 処置温度 37°C において最も顕著であつて, 温度の低い程弱くなることが判る。而して, 氷冷下では高濃度 (1:200) 卵アルブミン液で処置しても, TA 処置赤血球の St-S 感受性回復は完全ではなかつた。又, 処置時間の影響について検討した第 3 表の実験では, 20分処置と 40分処置とでは卵アルブ

ミンの効果に差異が認められなかつた。

以上の卵アルブミンにおける観察に引続き, 諸種蛋白質並びに核酸, 多糖類等の多数の物質について, TA 処置赤血球の St-S 感受性回復作用の有無強弱を精査して第 4 表掲示の如き成績を得た。その重要事項を述べれば次の如くである。

1) TA 処置赤血球の St-S 感受性を回復せしめるには, 被検蛋白質中 Gelatin が最も有効であつた。即ち, 第 5 表 実験に示した如く, Gelatin は, その 1:20,000 ~ 50,000 の濃度において, TA 処置赤血球の St-S 感受性を完全に復原せしめ, 更に 1:200,000 の高稀釈液においても, なおよく回復効果を発揮しうるものであることが判る。

2) 牛血清アルブミン (IV. Fraction of bovine sera, U. S. A.) は TA 処置赤血球の St-S 感受性に対し, 前記卵アルブミンと同等の強い回復作用を示し, その最小有効濃度は 1:20,000 であつた。

3) γ -グロブリン (国産品並びに Behringwerke 製品) は gelatin, アルブミンに比して効力遙かに劣り, その最小有効濃度は何れも 1:2,000 であつた。

4) Protamin は 1:1,000 液でも TA 処置赤血球の St-S 感受性に対し影響がなかつた。

5) ペプトン類の効力も甚だ微弱であつて, 1:200 の高濃度において TA 処置赤血球の St-S 感受性を僅かに増進せしめ得たに過ぎなかつた。又 Casein hydrolysate は 1:40 においても無効であつた。

6) リボ核酸 (酵母) の 1:100 液は, TA 処置赤血球の St-S 感受性に対し, 認むべき影響を示さなかつた。他方, デオキシリボ核酸 (DNA) についての実験では, 被検標品中の一つ (精子からの DNA; 国産品) は, 1:1,000 液で弱い感受性回復作用を示したが, 他の一つ (仔牛脾臓からの高重合性 DNA; 国産品) は, 1:500 液でも殆んど効果がないという成績であつた。

7) 多糖類9種の中, グリコーゲン, 可溶性澱粉, デキストリン, イスリン, アラビヤゴム, アルギン酸及びヘパリンの如き糖類は何れも1:100~500液において, TA 処置赤血球の St-S

感受性に対し全く影響がなかつた。然るに, コンドロイチン硫酸及びムチンの二物質は, TA 処置赤血球に対しアルブミンに匹敵する程度の感受性回復作用を示した。

考 察

上述の実験成績は, タンニン酸処置によつて著明に低下したモルモット赤血球の St-S 感受性が, 蛋白質で処置することによつて容易に復活することを実証したものである。ここで注目すべきは, TA 処置赤血球に対する St-S 感受性復活作用が, Gelatin のように甚だ強大な効力を示すものもあれば, プロタミンの如く全然影響性のないものもあり, 又血清蛋白質でもアルブミンとグロブリンでは顕著な効力の差異があるというように, 蛋白質の種類によつて著しく異なっていることである。この事実に加えるに, ペプトン類では TA 処置赤血球の St-S 感受性に対し影響性が甚だ微弱であり, 更に Casein hydrolysate では全く無効であるということから, 蛋白質における St-S 感受性復活作用が, その分子構成と密接な関係のあることが推想される。この事は逆に, TA 処置赤血球の St-S 感受性復活作用を指標とした溶血試験が, 蛋白質構造究明の研究法として利用しうる可能性をも

唆示するものである。

蛋白質では Gelatin が最も強い作用を発揮したことに關しては, 古来タンニン酸の皮革製造工業における応用によつて周知されている如く, タンニン酸の Gelatin (Collagen) に対する特殊親和性が重要な意義をもっていることは想像に難くない。

多糖類中では Mucopolysaccharide に属する Chondroitin 硫酸や Mucin が可成りの程度の作用を示したことは, 一応注目に値するのであるが, しかしこの事については, これら多糖類の生体分布状態が Gelatin 或いは Collagen の分布と密接に關連していることを考慮する必要がある。殊に Chondroitin 硫酸と同じく多糖類硫酸エステルであるヘパリンの無効性に鑑みる時, ここに觀察された両 Mucopolysaccharide の St-S 感受性復活作用も, 強力活性の蛋白質の混在に基づくものではなからうかとの疑いを否定できない。

結 論

タンニン酸処置によつて Streptolysin S 溶血に対し高度抵抗性となつたモルモット赤血球を, 種々の蛋白質で処置すると容易に毒素に対する感受性を回復することが実証された。而もこの Streptolysin S 感受性復活効力は, 蛋白質の種類によつて異なり, Gelatin が最強, Albumin これに次ぎ, γ -Globulin は微弱, Protamin,

Peptone 及び Casein hydrolysate は無効であつた。

核酸類及び多糖類についても同様に検索を行つたが, 被檢物質中 Chondroitin Sulfate 及び Mucin の 2 Mucopolysaccharide が相当強い効力を示したのみであつて, 他はすべて無効であつた。

文 献

- 1) Ito, R. : (unpublished) 2) 松田雅夫:
金大結研年報, 16(下), 499, 1958. 3)
Okamoto, H. et al. : Jap. J. Med. Sci., IV.

- Pharmacology, 14, 99, 1941. 4) 伊藤亮:
日本薬物学雑誌, 28, 41, 1940.

Table 3

Effect of Time on the Restoration Activity of Egg Albumin
upon the Streptolysin Susceptibility of the
Tanned Erythrocytes

Hemolysis test		Dilution of streptolysin S									
		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	
Red cells	Normal	###	###	###	###	##	++	+	±	-	
	treated with tannic acid	no further treatment		###	###	##	+	-	-	-	-
treated with egg albumin of the concentrations at 37°C for	20 minutes	1 : 200	###	###	###	###	###	##	++	+	-
		1 : 1,000	###	###	###	###	##	++	+	±	-
		1 : 5,000	###	###	###	###	##	+	-	-	-
	40 minutes	1 : 200	###	###	###	###	###	##	++	+	±
		1 : 1,000	###	###	###	###	##	++	+	-	-
		1 : 5,000	###	###	###	##	++	±	-	-	-

Table 4
Effect of Proteins, Nucleic Acids, and Polysaccharides
on the Streptolysin Susceptibility of the
Tanned Erythrocytes

Substances	Grade of restoration	Minimum restoration concentration
Proteins :		
egg albumin	++	1 : 20,000
bovine albumin	++	1 : 20,000
γ -globulin from human sera	+	1 : 2,000
γ -globulin from bovine sera	+	1 : 2,000
gelatin	+++	1 : 200,000
protamin from salmon roe	-	(in 1 : 1,000)
Peptones :		
polypeptone	+	1 : 200
bacto-casitone	+	1 : 200
Casein hydrolysate	-	(in 1 : 40)
Nucleic acids :		
deoxyribonucleic acid from sperm	+	1 : 1,000
deoxyribonucleic acid from calf thymus (highly polymerized)	-	(in 1 : 500)
yeast ribonucleic acid	-	(in 1 : 100)
Polysaccharides :		
glycogen	-	(in 1 : 100)
soluble starch	-	(in 1 : 100)
dextrin	-	(in 1 : 100)
inulin	-	(in 1 : 100)
arabic gum	-	(in 1 : 100)
sodium alginate	-	(in 1 : 200)
heparin	-	(in 1 : 500)
chondroitin sulfate	++	1 : 10,000
mucin	+	1 : 5,000

+++ , ++ , + , \pm are arbitrarily assigned to express the relative restoration activity.

- indicates no activity in specified concentrations.

Table 5
Restoration by Gelatin of the Streptolysin Susceptibility
of the Tanned Erythrocytes

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		1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :
Untreated		##	##	##	##	##	##	++	+	-
Treated with tannic acid (1: 10,000), and subsequently with gelatin of :	1 : 20,000	##	##	##	##	##	##	++	+	-
	1 : 50,000	##	##	##	##	##	++	+	-	-
	1 : 100,000	##	##	##	##	+	+	-	-	-
	1 : 200,000	##	##	+	+	-	-	-	-	-
	1 : 500,000	##	##	+	-	-	-	-	-	-
	1 : 1,000,000	##	+	+	-	-	-	-	-	-
Treated with tannic acid alone		##	+	+	-	-	-	-	-	-

Table 6
Effect of Mucopolysaccharides on the Streptolysin
Susceptibility of the Tanned Erythrocytes

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		1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	
Untreated		##	##	##	##	##	++	+	+	-	
Treated with tannic acid, and subsequently treated with	saline	##	##	+	-	-	-	-	-	-	
	heparin 1 : 500	##	##	+	-	-	-	-	-	-	
	chondroitin sulfate	1 : 1,000	##	##	##	##	##	++	+	+	-
		1 : 5,000	##	##	##	+	+	-	-	-	-
		1 : 20,000	##	##	+	+	-	-	-	-	-
		1 : 100,000	##	##	+	-	-	-	-	-	-
	mucin	1 : 2,000	##	##	##	##	+	+	+	-	-
		1 : 5,000	##	##	##	+	+	-	-	-	-
		1 : 10,000	##	##	+	+	-	-	-	-	-
		1 : 20,000	##	##	+	-	-	-	-	-	-