

# Correlation of Intra- and Extr-cellular Hemolysins of Hemolytic Streptococcus Su Strain

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8094">http://hdl.handle.net/2297/8094</a>

## A群溶血性連鎖球菌の菌体内溶血毒素とストレプトリジン-Sとの相互関係に関する研究

金沢大学医学部薬理学講座 (主任: 正印 達教授)

岩 上 栄

(平成1年1月30日受付)

A群溶血性連鎖球菌 Su 株 (Su 菌) の菌体内溶血毒素 (intracellular hemolysin, ICH) と菌体外溶血毒素ストレプトリジン-S (streptolysin S, SLS) の相互関係について検討を行った。リボ核酸分画標品 (ribonuclease-resistant fraction of RNA, core) を1%に加えた3%酵母エキス培地 (yeast extract medium, YE 培地) で Su 菌を培養すると、培養上清液には多量の SLS が産出されるが、培養 Su 菌の ICH は、core を附加しない YE 培地で培養し、少量の SLS 産出をした Su 菌の ICH に比べて明らかに減少していた。しかし、SLS を多量に産出した Su 菌を新鮮な YE 培地で培養すると培養菌の SLS 産出能は元に復し ICH も元に復していた。この事から SLS と ICH は負の相関関係にあり、また、菌体内には溶血毒素、または、ICH の合成系があることが示唆された。Su 菌無細胞抽出液 (cell-free extract, CFE) 中の ICH による溶血活性は CFE を37°Cに加温すると溶血活性を喪失したが、CFE に core を附加して同処理すると溶血活性は逆に増強された。しかし、予め失活した CFE に core を附加して同処理をしても溶血活性の増強は認められなかった。この時 core と共にアデノシン-三-リン酸を加えて処理すると著しい溶血活性の増強が認められた。このことは、ペニシリンによって失活した CFE においても認められた。また、これらのことは、CFE を超遠心 (150,000xG, 60分) し得られた沈殿物において見られ、合成系がある事が確かめられた。

**Key words** hemolytic streptococcus, intracellular hemolysin, streptolysin-S, cell-free extract

溶血性連鎖球菌 (溶連菌) の酸素に安定な溶血毒素としては、リボ核酸によって菌体外に大量に増産されるストレプトリジン-S (streptolysin S, SLS)<sup>1)</sup>、及び細胞結合溶血毒素 (cell-bound hemolysin)<sup>2)</sup> やストレプトリジン-D (streptolysin D)<sup>3)</sup> のほか菌体内溶血毒素 (intracellular hemolysin, ICH) が知られている。これら各溶血毒素についての比較検討は多くの人によって行われているが、各溶血毒素間の相互関係、特に SLS と ICH との相互関係については殆ど検討が行われておらず全くと言っていい程不明で

ある。Koshimura ら<sup>4)</sup> は溶連菌の抗腫瘍性についての実験で、溶連菌の無細胞抽出液 (cell-free extract, CFE) に溶血活性、即ち ICH を認め、これに就いて林<sup>5)</sup> がその性状について検討を行ったことから、本論文では SLS と ICH との相互関係について実験を行った。また、菌体内溶血物質が合成される事が示唆されていることから菌体内溶血物質合成系に関して実験を行うと共に、培養された溶連菌を *in vitro* でペニシリン G 存在下で温度処理すると SLS 産生が認められなくなることから、ICH 並びにその合成

Abbreviations: ATP, adenosin triphosphate; BBM, Bernheimer's basal medium; CFE, cell-free extract; core, リボ核酸分画標品; HU, hemolytic unit; SLS, streptolysin S; Su 菌, 溶血性連鎖球菌 Su 株; YE 培地, yeast extract medium; 生食水, 生理食塩水; 溶連菌, 溶血性連鎖球菌

系に対するペニシリンの影響についても検討を行った。

#### 材料および方法

##### I. 溶連菌株

教室保存のA群溶連菌 Su 株 (ATCC21060, type 3, Su 菌) を使用した。Su 菌の継代培養には普通肉汁ブイヨン (pH7.2) を用いた。

##### II. 3%酵母エキス培地 (yeast extract medium, YE 培地)

Sakurai ら<sup>8</sup>の方法によって作製した。即ち、ビール酵母エキス〈エビオス〉P2G (朝日麦酒, 東京) 30g を蒸留水 1,000ml に溶解した後, 100°Cに60分間加熱し, その濾液の pH を再調整後更に100°C60分間加熱してから3回濾過を行い, 得られた濾液を100°C30分3日間, 間欠滅菌した。

##### III. 前培養培地

YE 培地 25ml に普通肉汁ブイヨン 25ml を加えたものを前培養培地として用いた。

##### IV. アデノシン三リン酸 (adenosin triphosphate, ATP)

和光純薬 (大阪) の ATP を用いた。ATP は蒸留水に溶解し pH を 7.0 に調整して用いた。

##### V. Su 菌の培養

前培養培地 50ml に Su 菌の普通肉汁ブイヨン培養液 1ml を接種して 37°C で 18 時間培養したものを YE 培地 500ml に接種して, 37°C で 24 時間静置培養した。

##### VI. Su 菌の CFE の作製

Shoin<sup>9</sup>の方法によって CFE を作製した。即ち, Su 菌の YE 培地培養液 500ml を低温下で遠心し, 沈殿した生菌体を冷生理食塩水 (生食水) で 2 回洗浄した後, 20ml の蒸留水に浮遊した。ついでこの Su 菌浮遊液を細胞破壊用ガラス瓶 (容量 50ml) (B. Braun,

FRG) に入れ, これにガラス粒 (直径 0.10~0.11mm) 30g を加えてセルホモジナイザー (B. Braun) にて炭酸ガス噴霧下で 4,000rpm 2 分間 2 回計 4 分間処理した。ついでホモジネート液をガラス濾過器 G2 で濾過し, ガラス粒を除いた濾液を低温下で遠心 (15,000 xG, 15分間) し, 分離した上清液 (CFE) を作製した。ICH はこれまでの報告から CFE に存在し, CFE の溶血性は ICH によることが示されていることから, CFE を ICH として実験に用いた。さらに, CFE1 容量を超遠心 (150,000xG, 60分間) して得た上清液を CFE-S, 沈殿物を 1 容量の蒸留水に浮遊させた液を CFE-P とした。

##### VII. リボ核酸分画標品 (ribonuclease-resistant fraction, core)

Bernheimer ら<sup>8</sup>の変法により core を作製した。即ち, 酵母リボヌクレイン酸ナトリウム (Merk, Darmstadt, FRG) 100g を蒸留水 800ml に溶解し, 炭酸ソーダー液で pH を 7.6 に調整した後, 更に蒸留水を加えて全量を 1,000ml とした。これにリボヌクレアーゼ (5 回結晶) (和光純薬) 100mg を加えて室温で pH を 7.4 から 7.6 に調整しながら 24 時間放置した。ついで同溶液に酢酸ソーダ 100g を加えて溶解した後, 99% エタノール 740ml を加え, 生じた沈殿を遠心により集めエタノールで 2 回, エチルエーテルで 1 回洗浄した後 core として実験に用いた。

##### VIII. Bernheimer の基礎液 (Bernheimer's basal medium, BBM)

Bernheimer によって報告された如く, マルトース 675mg, 20% リン酸-カリウム液 (苛性ソーダー液にて pH を 7.0 に調整) 6ml, 20% 硫酸マグネシウム液 12ml を蒸留水 66ml に溶解したものを BBM として用いた。また, 同量のマルトース, リン酸-カリウム液及び硫酸マグネシウム液を蒸留水 24ml に溶解したも

Table 1. Hemolytic activity of culture supernatant and CFE of Su coccus in YE medium with different concentrations of core

Concentration (%) of core added to YE medium	Hemolytic activity (HU/ml)	
	Culture supernatant	CFE
0	16	1,556
0.2	3,232	448
0.5	8,960	225
1.0	12,800	102

After Su coccus in 500ml of each culture medium was incubated at 37°C for 24 hr, the supernatant of culture was used for hemolytic test and sedimented cells, after washing with physiological saline, were disrupted with Braun's cell homogenizer to prepare cell-free extract (CFE). The CFE was used for hemolytic test.

のを x2BBM として用いた。

#### IX. 静菌法による SLS 産生実験

YE 培地 1 容量で 37°C, 20 時間培養した Su 菌を冷生食水で 3 回洗浄後, 1/20 容量の BBM に浮遊させ, これに同量の 0.2% core-BBM を加えて 37°C, 2 時間静置後遠心し, 上清液について溶血試験を行った。

#### X. Su 菌のペニシリン処理実験

培養液の 1/20 容量のペニシリン含有 BBM に浮遊させた Su 菌液を 37°C, 20 分, 引き続いて 45°C, 30 分の加温処理を行った。なお, ペニシリンは明治製菓 (東京) の結晶ペニシリン-G カリウム (20x 10<sup>4</sup>U/バイアル) を用いた。

#### XI. 溶血試験

被検液の生食水による 1 ml 宛の 2 倍段階希釈液列を作製し, これに馬脱繊維血液 (日本バイオテスト, 国分寺) より作製した 3% 血球浮遊液 1 ml 宛てを加えて 37°C で 2 時間静置後, 各液の溶血の有無強弱を判定した後, 被検液の溶血力価を 50% 溶血単位 (hemolytic unit, HU) で表示した。

#### XII. 超音波処理

不活性化した CFE の超遠心沈殿物浮遊液 (CFE-P) に「core+ATP」を附加して溶血再生処理を行ったものに, 超音波発振器 UO300FS (国際電気, 東京) を用い, 共振周波数 26 K Hz で 15 分間の超音波処理を低温下で行った。

### 成 績

#### 1. SLS 産生量と ICH 量との関係についての実験

Su 菌を 0.2%, 0.5% 及び 1.0%-core 附加 YE 培地及び YE 培地の各 500ml で 24 時間培養した培養上清液の溶血力価並びに各培養液で培養した Su 菌の CFE

の溶血活性値は表 1 に示した如くである。即ち, core を YE 培養液に加える事で培養上清液の溶血活性は core 附加濃度が増加するにつれて増強 (0.2% 附加で 200 倍, 0.5% 附加で 560 倍, 1.0% 附加で 800 倍) したが, 此等の菌より CFE の溶血活性は逆に減少し core 非附加 YE 培地培養菌に比べ 0.2% で 1/3, 0.5% で 1/7, 1.0% で 1/15 であった。しかし, 1.0%-core 附加 YE 培地で培養した Su 菌液を新鮮な 1.0%-core 附加 YE 培地に植菌して培養すると, 上清液の溶血活性は 13,200 HU/ml と原菌と同程度に SLS を産生し, 新鮮な YE 培地で培養すると培養菌の CFE の溶血活性は 1,600 HU/ml と core 附加 YE 培地培養以前の Su 菌に復していた。Su 菌を 1.0%-core 附加 YE 培地で各時間培養した培養液の溶血活性, 並びに, 各時間培養した菌による静菌状態での SLS 産生実験での溶血成績は表 2 に示した如くである。即ち, 培養時間が 12, 18, 24 及び 48 時間での培養液の溶血活性比は 1 : 1.5 : 1.68 : 1.89 と培養時間が長くなる程溶血活性は強くなるのに反し, 静菌状態での溶血活性比は 1 : 0.5 : 0.36 : 0.1 と SLS 産生は減少しており, 培養上清の溶血活性が強いほど静菌状態での溶血活性は弱く, 両者は逆相関の関係であった。

#### 2. ペニシリン処理 Su 菌の ICH に関する実験

YE 培地培養の Su 菌をペニシリン G 含有 BBM に浮遊させて 37°C, 20 分, 続いて 45°C, 30 分の処置を行ったペニシリン処理 Su 菌による静菌状態での SLS 産生は全く認められなかったが, ペニシリン処理 Su 菌の CFE の溶血活性は, 表 3 に示した如く, 附加ペニシリンが高濃度なほど溶血活性は弱く, ペニシリン作用濃度 10×10<sup>4</sup>U/ml では 212 HU/ml と対照処理菌 (ペニシリン作用濃度 0 U/ml) の 438 HU/ml の

Table 2. Relation between hemolytic activity and incubation period of Su coccus in 1% core-YE medium\*

Incubation period (hr) of Su coccus in 1% core-YE medium	Hemolytic activity (HU/ml)	
	Culture supernatant	Resting cell system
12	12,480	18,176
18	18,816	9,344
24	20,992	6,592
48	23,680	1,856

After Su coccus was incubated for each period at 37°C in 1% core-YE medium, the culture was centrifuged. The supernatant was used for hemolytic test, and the sedimented cells were suspended in BBM containing 0.1% core (0.1% core-BBM). Cell suspension was incubated at 37°C for 2 hr according to the method of resting cell system. Then, the supernatant was used for hemolytic test.

\*YE medium supplemented with 1% core.

1/2であった。

### 3. ペニシリン処理 Su 菌 CFE の溶血物質合成に 関する実験

YE 培地で培養した Su 菌をペニシリン含有 BBM に浮遊させて37°C, 20分, 続いて45°C, 30分の温度処理を行った処理 Su 菌の CFE について行った core な

らびに ATP による溶血活性増強実験の成績は表3に示した如くである。即ち, 無処理 Su 菌の CFE (対照 CFE) と 2% core-BBM との混合液は37°Cで60分置くと溶血活性は2.3倍上昇し, この混合液に ATP (50mg/ml) を加えると溶血活性は12.8倍とさらに上昇した。これに対しペニシリン  $2.7 \times 10^4$  U/ml および10

Table 3. Hemolytic activity of CFE, 「CFE+core」, and 「CFE+core+ATP」 prepared from Su coccus treated with different concentrations of penicillin in BBM

Concentration (U/ml) of penicillin for treatment of Su coccus in BBM	Hemolytic activity (HU/ml)		
	CFE	CFE+core	CFE+core+ATP
0	438	1,024	5,612
$2.7 \times 10^4$	308	988	2,888
$10 \times 10^4$	212	614	1,096

Su coccus cells, after cultivation in YE-medium, were suspended in BBM containing penicillin of various concentrations, incubated at 37°C for 20 min and then at 45°C for 30 min. From this treated cells CFE was prepared, and a part of the CFE was used immediately for hemolytic test. A mixture of 1 volume of CFE and 1 volume of 2% core-x2BBM(CFE+core) or a mixture of 1 volume of CFE and 1 volume of 2% core-BBM containing ATP(50mg/ml)(CFE+core+ATP) was incubated at 37°C. After incubation of 60 min, hemolytic activity was measured.

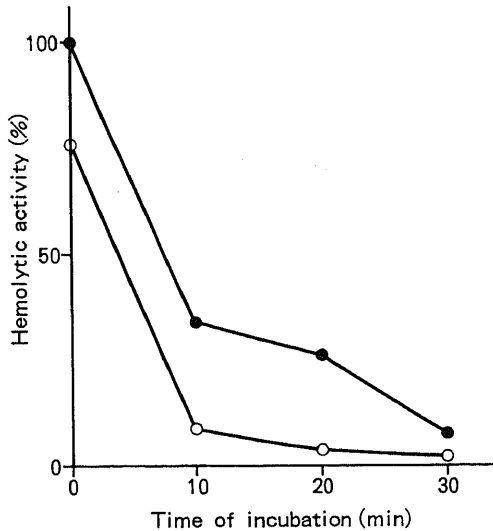


Fig. 1. Change of hemolytic activity of ICH by treatment with penicillin-G. CFE was incubated at 37°C for stated time with (○) or without (●) penicillin-G ( $2 \times 10^4$  U/ml) and then hemolytic activity was measured and expressed as percent calculated by the following formula:  $\text{HU of ICH}_t / \text{HU of ICH}_0 \times 100$  (ICH<sub>t</sub>, ICH incubated for t min with or without penicillin; ICH<sub>0</sub>, ICH incubated for 0 min with or without penicillin).

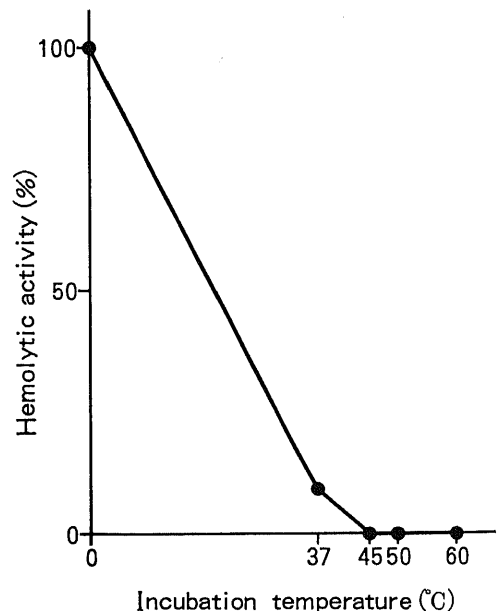


Fig. 2. Change of hemolytic activity of ICH by treatment with various temperatures. ICH was incubated at various temperatures for 30 min. Hemolytic activity was expressed as percent calculated by the following formula:  $\text{HU of ICH}_c / \text{HU of ICH}_0 \times 100$  (ICH<sub>c</sub>, ICH incubated at C temperature; ICH<sub>0</sub>, ICH incubated at 0°C).

$\times 10^4$  U/ml を混合液に加えて温度処理した Su 菌の CFE (2.7 CFE 及び 10 CFE) の溶血活性は 308 HU/ml 及び 212 HU/ml と対照 CFE に比べて弱かったが、これらに core-BBM, 更に ATP を加える事で 2.7 CFE の溶血活性は 3.2 倍, 並びに 9.3 倍に増強し, 10 CFE では 2.9 倍と 5.2 倍に増強した. core 及び ATP によって溶血活性は, 対照 CFE に比べて増強度は弱い, 増強することが認められた.

#### 4. CFE に対する温度, ペニシリン及び core の影響

CFE 1 容量と x2BBM 1 容量の混合液 (780 HU/ml) を 37°C で静置すると, 図 1 に示した如く, 時間の経過と共に溶血活性は減弱し, 30 分で 1/10 に, 60 分では 4 HU/ml となった. また, 混合液を各温度で 30 分間静置すると, 図 2 に示した如く, 45°C, 30 分間で溶血活性は完全に消失し, CFE 中の溶血毒素は温度に不安定なことが示された. 混合液にペニシリン G を  $2 \times 10^4$  U/ml 加えて 37°C に静置すると溶血活性の減弱は更に著しく, 図 1 に示した如く, 37°C, 20 分で 6 HU/ml と約 1/125 に減弱した. しかし, 混合液に core を 1% に附加して 37°C に 60 分置いて溶血活性

は減弱せず, 却って表 4 に示した如く増加した. 但し, 増強された溶血活性は CFE が得られた Su 菌の培養条件によって異なり, 培養時に SLS 産生を多く行った Su 菌の CFE と core の混合液の溶血活性は弱かった.

#### 5. 非活性化 CFE の溶血物質合成に対する core 及び ATP の影響

YE 培地培養 Su 菌の CFE (1,556 HU/ml) 1 容量に 20% core 溶液 0.2 容量及び x2BBM 0.8 容量を加えた混合液を 37°C に 60 分間静置すると混合液の溶血活性は, 表 4 に示した如く, CFE 値にして 3,740 HU/ml と著しく増強していた. しかし, CFE を 45°C に 30 分間加熱して非活性化 (< 4 HU/ml) した液に core 及び x2BBM を加えて上記の如く 37°C, 60 分間静置しても表 5 に示した如く, 溶血活性は殆ど認められず, 50% 溶血単位は算出できなかった. しかし, CFE と core 及び BBM の混合液に ATP 10mg/ml を加えて処理すると, 混合液の溶血活性は, 表 6 の如く, CFE にして 1,024 HU/ml の溶血活性が認められた. この事より「CFE+core+x2BBM」混合液に ATP を pH 7.0 に調整して, 各種濃度に加えて 37°C に 60 分間静置

Table 4. Relation between hemolytic activity of CFE and culture medium of Su coccus

Culture medium used for cultivation of Su coccus	Hemolytic activity (HU/ml) of CFE incubated with 2% core-x2BBM at 37°C for	
	Omin	60 min
YE	1,556	3,740
0.2% core-YE	448	1,000
1.0% core-YE	102	110

Cell-free extract (CFE) was prepared from Su coccus cultivated in various culture media. One volume of CFE was mixed with 1 volume of 2% core-x2BBM, and the mixture was incubated at 37°C. After incubation, the mixture was used for hemolytic test.

Table 5. Effect of core on hemolytic activity of inactivated CFE

Incubation time of a mixture (min)	Hemolytic activity of the mixture					
	Dilution of CFE					
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
0	—*	—	—	—	—	—
60	—	±	+	+	+	—

After CFE was inactivated by incubating at 45°C for 30 min, 1 volume of inactivated CFE was mixed with 1 volume of 2% core-x2BBM. The mixture was used for hemolytic test after incubation at 37°C.

\* —, no hemolysis; ±, partial hemolysis; +, complete hemolysis.

すると、その溶血活性は、ATP 附加により著しく増強し、その増強は ATP の濃度に相関していた。しかし、ATP の作用濃度が 80mg/ml では 50mg/ml 附加時の溶血活性値とほぼ同じであった。

6. 非活性化 CFE の溶血物質合成に及ぼす BBM の影響

加熱処理 (37°C, 60分間) により溶血活性を失活せしめた CFE 1 容量に 20% core 溶液 0.2 容量, ATP 50 mg/ml 及び x2BBM 0.8 容量を附加して 37°C に静置すると、その溶血活性が著しく増強されたことから、x2BBM の各成分の溶血物質合成系に対する影響について実験を行った。即ち、x2BBM より各成分のマルトース、リン酸-カリウムおよび硫酸マグネシウムを除いた基礎液を x2BBM の代わりに用いて、前記の実験を行った。その成績は表 7 に示した如く、リン酸-カリウムを除いた各基礎液では共通して溶血物質合成の増強は他の成分を除いた基礎液に比べて低下してい

Table 6. Effect of ATP on hemolytic activity of a mixture of inactivated CFE, core and BBM

Concentration (mg/ml) of ATP in a mixture	Hemolytic activity (HU/ml) of the mixture
0	<160
10	1,024
30	1,925
50	3,994
80	4,210

ATP was added in various concentrations to a mixture of inactivated CFE, core and BBM, and then incubated at 37°C for 60 min. The mixture was used for hemolytic test.

た。

7. ペニシリン処理 CFE の溶血物質合成に関する実験

Su 菌の CFE にペニシリンを附加して 37°C に 20~30 分静置すると、CFE の溶血活性が殆ど失われたことから、CFE にペニシリン G を附加 ( $2.7 \times 10^4$  U/ml) して、37°C, 30 分の処理により非活性化した CFE に core または「core+ATP」を附加して溶血活性の再生の有無・強弱について行った実験成績は表 8 に示した如くである。非活性化された CFE の溶血活性は core または「core+ATP」の附加により再び認められ、その増強度はペニシリンを附加せずに非活性化した CFE よりペニシリンを附加して非活性化した

Table 7. Effect of BBM on hemolytic activity of a mixture of inactivated CFE and core

Medium added to inactivated CFE (<4HU/ml) with core and ATP	Hemolytic activity (HU/ml) of a mixture
x2BBM	778
x2BBM deficient in	
Maltose	701
MgSO <sub>4</sub>	656
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	189
Maltose+MgSO <sub>4</sub>	489
Maltose+KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	242
MgSO <sub>4</sub> +KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	223
Physiological saline	228

CFE was inactivated by incubation at 37°C for 60 min. A mixture of 1 volume of inactivated CFE, 0.2 volume of 20% core solution containing ATP (50mg/ml) and 0.8 volume of BBM, BBM deficient in component or physiological saline was incubated at 37°C for 60 min, and the mixture was used for hemolytic test.

Table 8. Effect of penicillin on hemolytic activity in hemolysin-synthetic system of CFE

Hemolytic activity (HU/ml) before penicillin treatment	Hemolytic activity (HU/ml) of CFE after incubation with (+) or without (-) penicillin	Hemolytic activity (HU/ml) of inactivated CFE after incubation at 37°C for 60 min with	
		core	core+ATP
912	(-) 52	1,378	3,392
	(+) 11	634	2,622

CFE was incubated with or without penicillin ( $2.7 \times 10^4$  HU/ml) at 37°C for 30 min, and then incubated with 2% core or 2% core containing ATP (50mg/ml) at 37°C for 60 min. These CFEs were used for hemolytic test.

CFE において強く、特に「core+ATP」を附加した CFE において著明に認められた。

#### 8. CFE 超遠心沈殿物の溶血物質合成に関する実験

CFE の超遠心による上清液 (CFE-S) 並びに、沈殿物浮遊液 (CFE-P) を 45°C, 30 分の温度処理により不活性化した液に core または「core+各種濃度の ATP」を附加して 37°C, 60 分静置した液について行った溶血実験成績は表 9 に示した如くである。即ち、CFE-S については、単に core を附加しても溶血活性は認められず、また、ATP も 50mg/ml 以上附加して初めて溶血活性が認められたが、増強度は CFE-P に比べてかなり低かった。これに対し、CFE-P では単に core を附加しても溶血活性は認められ、ATP を附加することで更に強い溶血活性が認められた。特に、ATP 50mg/ml で最も強い溶血活性が認められた。不活性化した CFE-P に前記の如く core または「core+

ATP」を附加して溶血活性再生処理を行った後、各混合液を 2 分して一部は溶血試験を、一部はこれに超音波処理を行ってから溶血試験を行った実験成績は表 10 に示した如くである。不活性化 CFE-P は core または「core+ATP」附加により、溶血活性が増強されることは前記の如くであるが、これら処理混合液を更に超音波処理することで全ての処理液の溶血活性は更に増強された。

#### 考 察

酸素に安定でリボ核酸により増産される溶連菌菌体外溶血毒素 SLS については、Okamoto ら<sup>11,12,13</sup>、Bernheimer<sup>14</sup>、Koyama<sup>15,16</sup> および Hosoya ら<sup>17</sup> によってリボ核酸と共にその生物・理・化学的性状などについて多くの知見が発表されている。一方、Ginsburg<sup>18</sup> は Tween 40, 60 及び 80 などの還元剤によって溶血物質ストレプトリジン-D が形成されるこ

Table 9. Effect of ATP on hemolytic activity of CFE-S and CFE-P of CFE

Material	Hemolytic activity (HU/ml) of material before and after inactivation		Hemolytic activity (HU/ml) of inactivated material after incubation at 37°C for 60 min with 1% core and ATP (mg/ml) of			
	Before	After	0	30	50	80
CFE-S	5,775	<4	<4	<4	793	937
CFE-P	1,403	<4	783	2,662	3,379	3,092

CFE was centrifuged at 150,000xG for 60 min. Then supernatant (CFE-S) and suspension of precipitate (CFE-P) were used for hemolytic test before and after inactivation by incubation at 45°C for 30 min. To inactivated CFE-S or CFE-P were added core in the concentration of 1% and ATP of various concentrations, and each mixture was used for hemolytic test after incubation at 37°C for 60 min.

Table 10. Effect of sonication on hemolytic activity of inactivated CFE-P

Treatment done to inactivated CFE-P	Hemolytic activity of inactivated CFE-P after treatment	Hemolytic activity (HU/ml) of inactivated CFE-P incubated at 37°C for 60 min with core and ATP (mg/ml) of			
		0	30	50	80
None	<4	1,208	2,396	3,645	2,765
Sonication	8	2,048	4,710	5,529	3,625

CFE-P was inactivated by incubation at 45°C for 30 min, and 0.5 volume of inactivated CFE-P was sonicated in the condition of 26K Hz for 15 min. The other inactivated CFE-P was not sonicated. To the sonicated CFE-P or the non-sonicated CFE-P were added core in the concentration of 1% and ATP of various concentrations. These mixture were incubated at 37°C for 60 min and then used for hemolytic test.



とを報告している。これに対し、Maruyama ら<sup>16)</sup>、Koshimura ら<sup>4)</sup>、Taketo ら<sup>19)19)</sup>、Calandar ら<sup>20)~22)</sup>、Shoin<sup>47)</sup>及び姫野<sup>17)</sup>はそれぞれの方法によって ICH を調整し、その性状についても報告している。これらの報告では ICH と SLS には共通した性状もかなりみられるが、温度に対する安定性及び酵素に対する反応にはかなりの違いが認められる。これらのことから、ICH の成分がリボ核酸または、core や還元剤などの担体に移行・結合し、担体の種類によって SLS やスリレプトリジン-D になると考えられており、性状の違いは担体の種類によると考えられている。また、Su 菌を core 附加 YE 培地で培養し SLS が著しく増産されると同菌の ICH が SLS 産生量に逆相関して減少することも林<sup>9)</sup>によって報告されているが、本実験に於いても SLS 産出量と ICH は負の相関関係にあり、core 附加 YE 培地での培養時間と ICH も負の相関関係にあり、また core 附加 YE 培地培養 Su 菌による静菌法での SLS 産出実験においても同様なことが認められ、ICH が core と結合し SLS となって菌体外に産出されることが確認された。しかし、高濃度の core を附加しても、また培養時間を長くしても、ICH がゼロにならないことや ICH の含有量が減少した Su 菌を新鮮な培地で培養すると同菌の ICH の含有量は元にもどり、core によって SLS が再び増産される事は Su 菌体内で ICH が合成されるものと考えられる。しかし、このことは ICH も合成系も共に CFE にあって両者の分離は困難である為、これまで合成系の証明は困難であったが ICH は温度に不安定であり、合成系には ATP が有効なことが認められ、これについてのいろいろな実験から CFE には ICH とは別に ICH 合成系があることが本論文において実証された。また、Su 菌をペニシリン処理すると SLS 産出が抑制されることは、Okamoto ら<sup>10)</sup>によって既に報告されているが処理に用いられたペニシリンが高濃度な程、ICH は減少しており、ペニシリン無処理 Su 菌の CFE にペニシリンを附加して温度処理すると、附加せずに処理した CFE に比べて溶血活性の減少はより著しいことは、本論文においても姫野<sup>17)</sup>と同様な成績を得ている。このペニシリン処理 CFE に core を附加して処理すると溶血活性は増強されるが、ペニシリン無処理 CFE の約1/2である。しかし、core と共に ATP を附加すると溶血活性は更に増強され、その程度はペニシリン処理の有無に拘らず両者はほぼ同じであった。このことは、ICH が core と結合して菌体外に産出されること、並びに ICH はペニシリンによって影響されるが、ICH 合成系は、ペニシリンによって

影響されない事を示すものであり、ICH とその合成系は別のものであることを示すものである。このことからペニシリンの ICH に対する作用点については、更に検討を要するものと考えられる。CFE を超遠心 (150,000xG, 60分) にかけて得られる沈殿物の浮遊液に core 及び ATP を附加すると強い溶血活性が認められることは、リボゾームが溶血物質の合成系に関係あることを示すものであり、また、これらの混合液に超音波をかけた時に最も強い溶血活性が認められることは、超音波処理によって溶血物質あるいは合成系がリボゾームより遊離してくるためと考えられる。このことは、Calandar<sup>20)21)</sup>が CFE に超音波をかけると溶血活性の増強が認められるとした報告とよく一致するものであり、更に検討が必要である。

## 結 論

Su 菌並びに core によって SLS を増産させた Su 菌の CFE を用いて菌体外溶血毒素 SLS と菌体内溶血毒素 ICH の相互関係について実験を行い、次の如き結論を得た。

1. SLS 産出量と ICH とは負の関係にあり、SLS 産出量が多いと菌体内の ICH 量は減少する。しかし、SLS を増産せしめた Su 菌を再び新鮮な培地で培養すると、菌体内 ICH はもとに復し、SLS 産出能ももとに復した。此等の事より SLS は core 等の担体と ICH が結合して産出されるものと考えられ、ICH は菌体内の合成系によって合成されることが示唆された。

2. 温度処理により溶血活性を失った CFE に core 及び ATP を附加することで溶血活性が強く認められた事から、溶血物質合成系があることが確認された。

3. ICH は温度に対し不安定であったが、その合成系はより安定であった。また、ICH はペニシリンにより、より早く溶血活性を喪失したが、ICH 合成系はペニシリンによって影響されなかった。

4. ICH 合成系は CFE を超遠心 (150,000xG, 60分) した沈殿物にあることが認められ、沈殿物浮遊液に core 及び ATP を附加して超音波をかけた時に、最も強い溶血物質の合成が認められた。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師正印 達教授に衷心より深甚な謝意を表します。さらに、貴重な御指導、御助言をいただいた川尻博男講師、小久保 護博士に厚く御礼申し上げます。また、実験遂行にあ

たり御協力頂いた早川俊子文部技官, 教室諸兄に感謝致します。

## 文 献

- 1) Okamoto, H.: Über die hochgradige Steigerung des Hämolytin-dildungesvermögens des *Streptococcus hemolyticus* durch Nukleinsäure. I Mitt. Japan J. Med. Sci., IV Pharmacol., **12**, 167-207 (1940).
- 2) Ginsburg, I. & Grossowicz, N.: A cell-bound hemolysin of group A streptococci. Bull. Res. Coun. Israel, E7, 237-246 (1958).
- 3) Ginsburg, I.: Streptolysin S. In T. C. Montie, S. Kadis & S. J. Aji (eds.), Microbial Toxins Volume III, p99-171. Academic Press, New York and London, 1970.
- 4) Koshimura, S. & Shoin, S.: Experimental anticancer studies Part 13. On the streptolysin S-synthetizing and anticancer activities of cell-free extract from living hemolytic streptococci. Gann, **51**, 301-318 (1960).
- 5) 林 義則: ストレプトリトジン S 形成に及ぼすリボ核酸の影響について. 十全医会誌, **91**, 561-573 (1982).
- 6) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagaki, Y.: Tumor inhibiting effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). Cancer Chemother. Rep., Part 1, **56**, 9-17 (1972).
- 7) Shoin, S.: Studies on the anticancer factor (s) from group A streptococci Part 1. Isolation and fractionation of cell-free extract from streptolysin S-forming streptococci. Gann, **67**, 661-667 (1976).
- 8) Bernheimer, A. W. & Robart, M.: The effect of nucleic acids and of carbohydrates on the formation of streptolysin. J. Exp. Med., **88**, 149-168 (1948).
- 9) Bernheimer, A. W.: Formation of a bacterial toxin (streptolysin S) by resting cells. J. Exp. Med., **90**, 373-392 (1949).
- 10) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming activities of hemolytic streptococci. Jpn. J. Microbiol., **11**, 323-336 (1967).
- 11) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S.: Streptolysin S-forming and antitumour activities of group A streptococci. In J. Jeljaszewicz & Wadstrom (eds.), Bacterial Toxins and Cell Membranes, 1st ed., p259-289, Academic Press, London, 1978.
- 12) Bernheimer, A. W.: Streptolysins and their inhibitors. In M. Mc Carty (ed.), Streptococcal Infections, p19-38, University Press, New York, 1954.
- 13) Koyama, J., Sokawa, Y. & Egami, F.: Chemical nature and biosynthesis of streptolysin S. Biochem. Z., **338**, 206-216 (1963).
- 14) Koyama, J.: Biochemical studies on streptolysin S. IV. Properties of the oligo-ribonucleotide portion. J. Biochem., **56**, 355-360 (1964).
- 15) Hosoya, S., Hayashi, T., Homma, Y., Egami, F., Shimomura, M & Yagi, V.: Studies on the hemolysin of hemolytic streptococci Part II. The hemolysin obtained by shaking a mixture of hemolytic streptococci with nucleic acid solution. Jpn. J. Exp. Med., **20**, 25-36 (1949).
- 16) Maruyama, Y., Sugai, S. & Egami, F.: Formation of streptolysin S by streptococcal protoplasts. Nature, **184**, 832-833 (1959).
- 17) 姫野洋一: 溶連菌溶血毒素に及ぼすペニシリンの影響について. 十全医会誌, **92**, 460-474 (1983).
- 18) Taketo, A. & Taketo, Y.: Biochemical studies in streptolysin S formation. I. Streptolysin S formation in cell free system. J. Biochem., **56**, 552-561 (1967).
- 19) Taketo, A. & Taketo, Y.: Biochemical studies on streptolysin S formation. III. Intracellular streptolysin. J. Biochem., **57**, 787-792 (1965).
- 20) Calandra, G. B. & Oginsky, E. L.: Cellular streptolysin S-related hemolysins of group A streptococcus C203S. Infect. Immun., **12**, 13-28 (1975).
- 21) Calandra, G. B. & Cole, R. M.: Membrane and cytoplasmic location of streptolysin S precursor. Infect. Immun., **31**, 386-390 (1981).
- 22) Calandra, G. B.: Relationship of cellular potential hemolysin in group A streptococci to extracellular streptolysin S. Infect. Immun., **13**, 813-817 (1976).
- 23) Calandra, G. B.: Effect of detergents on streptolysin S precursor. Infect. Immun., **29**, 306-310 (1980).

24) Calandra, G. B. & Whitt, R. S.: Activation of streptolysin S-related cellular potential hemolysin by grinding with glass beads. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 326-328 (1981).

25) Theodore, T. S. & Calandra, G. B.: Streptolysin S activation by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.*, **33**, 326-328 (1981).

**Correlation of Intra- and Extr-cellular Hemolysins of Hemolytic Streptococcus Su Strain** Sakae Iwakami, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med. Soc.*, **98**, 175—184 (1989)

**Key words** hemolytic streptococcus, intracellular hemolysin, streptolysin S, cell-free extract

#### Abstract

Correlation of intracellular hemolysin (ICH) and extracellular hemolysin, streptolysin S (SLS), of hemolytic streptococcus Su strain (Su coccus) was studied. When Su coccus was cultured in 3% yeast extract medium (YE medium) containing ribonuclease-resistant fraction of RNA (core), a large amount of SLS was produced. The amount of ICH of cells from the culture, however, was distinctly less than that of cells from culture in YE medium without core, in which the organism produced a small amount of SLS. When Su coccus culture in YE medium containing core was transferred into fresh YE medium without core and incubated, the amount of SLS and ICH of this culture were the same as those of original Su coccus culture in YE medium without core, indicating that ICH and SLS are in reverse correlation and that ICH was synthesized intracellularly. Hemolytic activity of ICH in cell-free extract (CFE) was enhanced remarkably by incubating CFE in the presence of core at 37°C, but it was inactivated by incubating CFE in the absence of core at 37°C. Hemolytic activity of inactivated ICH was not recovered or enhanced by incubating the CFE in the presence of core. However, hemolytic activity of inactivated ICH was remarkably enhanced by incubating the CFE in the presence of ATP and core. The recovery of hemolytic activity was also observed in penicillin-inactivated ICH. In addition, this recovery phenomenon of ICH occurred in precipitates of CFE by ultracentrifugation (150,000×G, 60min).