

溶連菌溶血毒素に及ぼすペニシリンの影響について

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	http://hdl.handle.net/2297/9075

溶連菌溶血毒素に及ぼすペニシリンの影響について

金沢大学医学部薬理学教室 (主任: 正印 達教授)

姫 野 洋 一

(昭和58年4月9日受付)

溶連菌 Su 株 (Su 菌) をペニシリン G と共に 37°C, ついで 45°C にインキュベートすると, 同菌のストレプトリジン S (Streptolysin S, SLS) 産生能が完全に抑制され, 制がん能が増強される。このことから, SLS 産生能, SLS の溶血活性ならびに Su 菌体を破壊してえられる無細胞抽出液の上清液 (CFE-S) にみられる菌体内溶血毒素 (Intracellular hemolysin, ICH) に対するペニシリン G の影響について検討が行われた。Su 菌の生食水浮遊液にペニシリン G (作用濃度 1×10^8 U/ml) を加えて 37°C に 50 分間静置すると, 同処理菌の SLS 産生は完全に抑制され, また ICH の活性も低下していた。また, ペニシリン非処理 Su 菌からの ICH をペニシリン G と共に静置すると ICH の活性は急速に低下し, この減弱度はペニシリン G の濃度が高いほど強かった。このペニシリン G による抑制作用は, アンピシリン, セファリジンおよびセフォタキシムによってもみとめられた。CFE-S をさらに遠心 (15×10^4 g, 60 分) してえられる上清液中にみられる ICH も, CFE-S 中の ICH と同様ペニシリン G によって不活性化された。これに対し, SLS および ICH と RNA のリボヌクレアーゼ抵抗性画分 (core) を作用させて形成した ICH-core complex の溶血活性は, ペニシリン G によって全く影響を受けなかった。ペニシリン G 処理 ICH に core を加えて 37°C に静置するとペニシリン G 処理によって減弱していた活性は約 4 倍増強され, 新たに溶血物質が形成されたと考えられた。core とペニシリン G の混液に ICH を加えて 37°C に静置すると, ペニシリン G を加えずに core と ICH を作用させたのと同様に溶血活性は増強された。これらのことから, ペニシリン G は ICH を不活性化するが, 菌体外溶血毒素としての SLS および ICH-core complex を不活化しないことと, SLS ならびに ICH-core complex と ICH とは化学的に異なるものであることが明らかにされた。

Key words Hemolytic streptococci, Intracellular hemolysin, Streptolysin S, Penicillin

ストレプトリジン S (Streptolysin S, 以下 SLS と略記) 産生能を有する抗がん性溶連菌 Su 株をペニシリン G 加 Bernheimer's basal medium¹⁾ に浮遊させて加温処理すると, 処理菌の抗がん活性は増強するのに対し, 菌増殖性と共に SLS 産生も消失または著しく減弱することが岡本ら²⁾によって報告されている。この実験での Bernheimer's basal medium の組成および浮遊液の種類ならびに温度処理条件などの SLS 産生能および抗がん能に及ぼす影響についてはくわしく検討報告されているが, ペニシリン G の SLS 産生に対する抑制的影響, 殊にその作用機序についてはほとんどふれられていない。

一方, 溶連菌の溶血毒素は菌体外に産生される溶血毒素と菌体内にみられる菌体内溶血毒素 (Intra-

cellular hemolysin, ICH と略記) とに大別され, 菌体外溶血毒素については 1938 年 Okamoto³⁾ がリボ核酸加ブイオン血凍寒天培地で溶連菌 Su 株を培養すると大量の SLS が産生すること, すなわち核酸効果を見出して以来 SLS についての数多くの研究が国内外より発表されている。これに対し ICH⁴⁾ についての報告は少なかったが, 実験方法の進歩にともない, 近年になって幾つかの知見⁵⁾ をみるに至った。しかし, SLS と ICH の関係については不明の点が多く, 最近林⁶⁾ は in vitro で ICH にリボ核酸のリボヌクレアーゼ抵抗性画分 RNase core を作用させた ICH-RNase core complex の理化学的性状が SLS と類似していることを報告し, 両者の関係は漸く明らかになってきている。これらのことから本実験ではペニシリン G の SLS 産生

Influence of Penicillin upon Hemolysin of Hemolytic Streptococci. Yoichi Himeno, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University.

に対する影響の作用機序を明らかにするため、ICH、SLS および ICH-RNase core complex に対するペニシリン G の影響について検討を行った。

材料および方法

1. 溶連菌株

実験には教室保存の抗がん性 A 群溶連菌 Su 株 (ATCC 21060, type 3, SLS およびストレプトリジン O を産生, 以下単に Su 菌と略記) を使用した。Su 菌の継代培養には普通肉汁ブイヨン (pH 7.2) を用いた。

2. 3%酵母エキス培地 (以下 YE 培地と略記)

Sakurai ら¹¹⁾の方法によって作製した。すなわち、ビール酵母エキス P 2 G (エビオス薬品工業株式会社) 30 g を蒸留水 1,000 ml に溶解し、pH を苛性ソーダ液にて 7.4 に調整したのち、100°C に 60 分間加熱し、その滲液の pH を再調整後更に 100°C 60 分間加熱してから 3 回滲過を行い、えられた滲液を 500 ml 宛に分注し、100°C 30 分間滅菌した。培地は実験のつど作製した。

3. 前培養培地

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

4. Su 菌の培養

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

5. Su 菌の無細胞抽出液 (cell free extract, 以下 CFE と略記) の作製

Shoin¹²⁾の方法によって CFE を作製した。すなわち、Su 菌の YE 培地培養液 500 ml を低温下で遠心し、沈澱した生菌体を冷生理食塩水 (以下生食水と略記) で 2 回洗浄したのち、20 ml 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 (ブラウン社製、容量 50 ml) に入れ、これにガラス粒 (直径 0.10~0.11 mm, ブラウン社製) 30 g を加えてセルホモジナイザー (ブラウン社製) にて炭酸ガス噴霧下で 4,000 rpm 2 分間 2 回計 4 分間ホモジナイズした。ついでホモジネート液をガラス滲過器 G 2 で滲過し、ガラス粒を除いた滲液を低温下で遠心 (15,000×g, 15 分間) し、分離した上清液を CFE-S、沈澱物を CFE-P とした。ICH はこれまでの報告¹⁰⁾から CFE-S に存在し、CFE-S の溶血性は ICH によることが示されていることから、CFE-S を ICH として実験に用いた。

6. リボ核酸分画標品 (Ribonuclease-resistant fraction, 以下 RNase core または core と略記) の調製

Bernheimer & Rodbart¹³⁾の変法により RNase

core を作製した。すなわち、酵母リボヌクレイン酸ナトリウム (メルク社製) 100 g を蒸留水 800 ml に溶解し、炭酸ソーダ液で pH を 7.6 に調整したのち、更に蒸留水を加えて全量を 1,000 ml とした。これにリボヌクレアーゼ (5 回結晶, NBCo) 100 mg を加えて室温で pH を 7.4 から 7.6 に調整しながら 24 時間静置した。ついで同容液に醋酸ソーダ 100 g を加えて溶解したのち、99%エタノール 740 ml を加え、生じた沈澱物を遠心により集め、エタノールで 2 回、エチルエーテルで 1 回洗浄したのち RNase core として実験に用いた。

7. ICH-core complex の作製

ICH としての CFE-S 1 容量に 2% RNase core 生食水 1 容量を加えた混合液を 37°C で 60 分間静置したものを ICH-core complex として用いた。ICH-core complex の溶血力は CFE-S 1 ml 当りの溶血力に換算して 50%溶血単位 (HU/ml) で表示した。

8. ペニシリン標品

ベンジルペニシリンカリウムとして結晶ペニシリン G カリウム (20×10⁴U/vial, 明治製薬, 以下単にペニシリン G と略記) アンピシリン末 (プリストル社), セファロジンとしてセポラン (鳥居薬品) およびセファタキシムナトリウムとしてセファタックス (中外製薬) を用いた。実験には蒸留水または生食水で適当な濃度に溶解したものを用いた。

9. Bernheimer's basal medium¹¹⁾ (以下単に BBM と略記)

Bernheimer によって報告された如く、マルトーズ 675 mg, 20%リン酸一カリウム液 (苛性ソーダ液にて pH を 7.0 に調整) 6 ml, 2%硫酸マグネシウム液 2 ml を蒸留水 66 ml に溶解したものを BBM として用いた。

10. SLS 標品

1% RNase core 加普通肉汁ブイヨン培地 1,000 ml に Su 菌を接種して 37°C で 30 時間培養したのち、遠心により上清液を分離し、これより Shoin¹⁴⁾の方法によって SLS を分離した。すなわち上清液 1,000 ml に 28%アンモニア水 50 ml を加えて生じた沈澱物を遠心によって除去したのち、上清液の pH を醋酸によって 7.0 に調整し、ついで冷 94%エタノール 620 ml を加え、生じた沈澱物をエタノールにて 2 回洗浄したのち、乾燥したものを A-I Streptolysin (以下単に A-I SLS と略記) として実験に用いた。

11. 静菌法による SLS 産生実験

YE 培地培養 Su 菌を遠心により集菌洗浄後培養液の 1/10 容量の生食水または BBM に浮遊させ、これに等量の 0.2% RNase core 加 BBM 液を加えて 37°C に静置して 2 時間後に菌浮遊液を冷却、遠心し、えら

れた上清液について溶血試験を行った。

12. 溶血試験

被検液の生食水による 1 ml 宛の倍下稀釈液列を作製し、これに 3% 人血球浮遊液 1 ml 宛を加えて 37°C 2 時間静置後、各液の溶血の有無強弱を判定したのち、被検液の溶血力価を 50% 溶血単位 (Hemolytic unit, 以下 HU と略) で表示した。

成 績

1. ペニシリン処理 Su 菌の SLS 産生および ICH に関する実験

Su 菌の 20 時間 YE 培地培養液 2,500 ml から遠心 (6,000 rpm, 20 分間) によって分離した生菌体を冷生食水にて洗浄したのち生菌体を 5 等分し、それぞれを 25 ml ずつの a. 生食水, b. ペニシリン G 含有生食水 (2×10^4 U/ml), c. BBM, d. ペニシリン G 含有 BBM (2×10^4 U/ml) および e. 生食水の 5 液に浮遊させ、それぞれ a 菌液, b 菌液, c 菌液, d 菌液, および e 菌液とした。このうち a 菌液, b 菌液, c 菌液および d 菌液の 4 菌液については 37°C に 20 分間の静置についで 45°C に 30 分間静置し、e 菌液については 0°C で 50 分間静置して対照菌液とした。ついで各 25 ml の処置液を 2 ml と 23 ml とに分け、それぞれを遠心して菌体を分離洗浄したのち 2 ml の処理菌液よりの菌体は 4 ml の 0.1% RNase core BBM 液に浮遊させて、静止菌法により 37°C で 2 時間静置した後、その上清液について溶血力試験を行って SLS 産生の有無強弱を判定した。処理菌液の 23 ml から分離洗浄した菌体は 20 ml の蒸留水に浮遊させたのち実験方法で記した如く

にして菌体を破壊して CFE-S を作製し、これについて溶血試験を行った。これらの成績は表 1 に示した如くである。すなわち、処理菌による SLS 産生実験では、生食水に浮遊し、0°C 下で 50 分間静置した対照菌の産生 SLS 力価は 20,000 HU/ml であるのに対し、浮遊液が生食水で、ペニシリンを附加せずに加温処理を行った a 菌の SLS 産生は著しく減弱し、対照菌の 1/10 であった。これに対し、浮遊液が BBM である c 菌では SLS 産生の減弱はみられず、対照とほぼ同じであった。これら生食水および BBM の浮遊液にペニシリン G を 2×10^4 U/ml 濃度に付加して処置した b 菌ならびに d 菌では両者とも SLS 産生は著しく減弱し、ことに b 菌では SLS 産生は完全に抑制されていた。また各処理菌より作製した CFE-S についての溶血力価は、対照菌では 1,600 HU/ml であり、a, b, c および d の各処理菌の CFE 溶血力価も対照菌のそれとほぼ同じであった。

YE 培地培養液 1,500 ml より前記と同様にして分離し 3 等分した Su 菌を、それぞれ 25 ml の生食水、ペニシリン G 含有生食水 (1×10^5 U/ml) およびペニシリン G 含有生食水 (10×10^4 U/ml) の 3 液に浮遊させ、それぞれを C-菌, P2-菌および P10-菌と命名して 37°C に 50 分間静置したのち、各菌についての静菌法による SLS 産生実験および CFE-S 作製を行い、これについて前記と同様にして溶血試験を行った。これらの成績は表 2 に示した如くである。

静菌法による SLS 産生実験では、C-菌では先の実験とほぼ同じ 16,300 HU/ml の溶血力価を示したのに対し、ペニシリン G 2×10^4 U/ml 含有生食水浮遊液

Table 1. Hemolytic activity of streptolysin S (SLS) and intracellular hemolysin (ICH) of penicillin-treated hemolytic streptococci (Su cocci)

Media in which Su cocci were suspended		Treatment of Su cocci suspension	Hemolytic activity (HU*/ml)	
Basal medium	Presence (+) or absence (-) of penicillin in media (2×10^4 U/ml)		SLS produced by treated Su cocci in resting cell system	ICH of treated Su cocci
Physiological saline (PS)	+	Incubation at 37°C for 20 min followed by incubation at 45°C for 30 min	0	1,480
	-		128	1,328
Bernheimer's basal medium (BBM)	+		16	1,248
	-		18,000	1,555
PS	-	Incubation at 0°C for 50 min	20,000	1,600

* HU: Hemolytic unit

Su cocci were suspended in basal medium with or without penicillin and incubated at 37°C for 20 min followed by incubation at 45°C for 30 min. After the treatment, one part of treated Su cocci were used for SLS formation in resting cell system, i.e., Su cocci were suspended in 0.2% ribonuclease-resistant fraction of RNA (RNase core) -BBM and incubated at 37°C. After 2 hr incubation, the supernatant of Su cocci suspension was tested for hemolytic activity of SLS produced in suspension. The rest of treated Su cocci were homogenized and supernatant (cell free extract-S, CFE-S) of homogenate was tested for hemolytic activity of ICH. Hemolytic activity was expressed as HU/ml of CFE-S.

Table 2. Hemolytic activity of SLS and ICH of Su cocci treated with various concentrations of penicillin G

Concentration of penicillin G in PS in which Su cocci were suspended	Treatment of Su cocci suspension	Hemolytic activity (HU/ml)	
		SLS produced by treated Su cocci in resting cell system	ICH of treated Su cocci
2×10 ⁴ U/ml	Incubation at 37°C for 50 min	8,000	1,300
10×10 ⁴ U/ml		0	800
0 U/ml	Incubation at 0°C for 50 min	16,384	1,600

Su cocci were suspended in PS containing penicillin G and incubated at 37°C for min. The treated Su cocci were used for experiments of SLS production in resting cell system and for preparing CFE-S.

Table 3. Influence of penicillin G upon hemolytic activity of ICH

Media with which ICH was mixed	Time of incubation at 37°C (min)	Hemolytic activity of ICH (HU/ml)
PS	0	1,664
	10	553
	20	403
	30	68
PS containing penicillin G (4×10 ⁴ U/ml)	0	1,235
	10	88
	20	19
	30	0

ICH was incubated at 37°C for stated time with or without penicillin G. After incubation, ICH was tested for hemolytic activity.

中で処理された P 2-菌の産生 SLS 溶血力価は 8,000 HU/ml で、先の実験と異なり SLS 産生能を有していたが、C-菌の 1/2 であった。これに対しペニシリン G 10×10⁴U/ml 付加生食水で処理した P 10-菌では溶血力価は 0 と SLS 産生を全くみとめなかった。CFE-S の溶血力価に関しては、K-菌では 1,600 HU/ml であり、P 2-菌では 1,300 HU/ml と 37°C につづいて 45°C の加温処理を行った a, b, c, d および e 菌のそれとほぼ同じであったが、P-10 菌の CFE-S の溶血力価は 800 HU/ml と減弱し、C-菌の約 1/2 であった。

2. ICH に対するペニシリン G の影響

(CFE-S 1 容量+ペニシリン G 加生食水 1 容量) (ペニシリン作用濃度 2×10⁴U/ml) と (CFE-S 1 容量+生食水 1 容量) の 2 液を作製し、37°C に静置して定時的に液を採取して行った溶血試験の成績は表 3 および図 1 に示した如くである(なお溶血力価は CFE-S の稀釈倍数に換算して示した)。CFE-S-生食水液は温度に不安定で 37°C 下では 10 分間で 1/3 に、20 分間で 1/4 に、30 分間で 1/25 と時間の経過と共に溶血活性は

減弱失活した。これに対しペニシリン G を 2×10⁴U/ml に付加した (CFE-S+ペニシリン G 加生食水) ではペニシリン G を加えただけ (0 分時) ですでに若干の減少を示し、さらに時間の経過と共に溶血力価は急激に減弱し、その減弱度は CFE-S-生食水に比べてさらに急で 10 分で 1/20 に減弱し、30 分では溶血活性はほとんど認められなかった。

3. ICH-core complex および SLS に対するペニシリン G の影響

実験方法で記した如くにして作製した ICH-core complex 液 (2,150 HU/ml) および A-I SLS 液 (1,500 HU/ml) を用意し、これに等量の生食水あるいはペニシリン G 含有生食水 (4×10⁴U/ml) を加えて 37°C に静置し、20 分後に溶血試験を行った。その成績は表 4 および図 2 に示した如くである。すなわち対照として行った ICH はペニシリン G を加え、37°C に 20 分処理することで溶血活性が消失するのは先の実験と同様であったが、ICH-core complex および A-I SLS では、ペニシリン G を付加してもしなくても 37°C 20 分の処

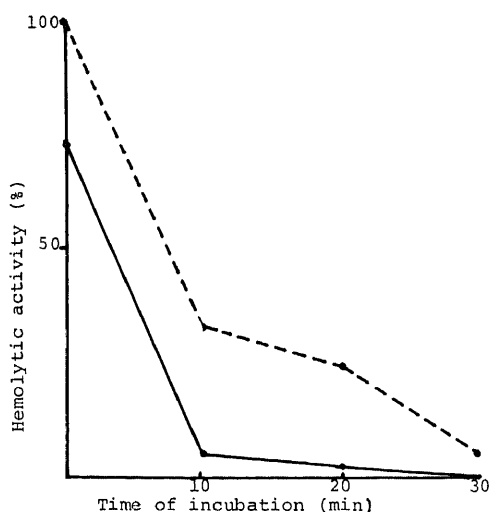


Fig.1. Change in hemolytic activity of ICH by treatment of penicillin G.

ICH was incubated at 37°C for stated time with or without penicillin G and hemolytic activity was tested and expressed as percent calculated by the following formula :

$$\frac{\text{HU of ICH}_t}{\text{HU of ICH}_0} \times 100$$

- ICH_t: ICH incubated for t min
with or without penicillin G
ICH₀: ICH incubated for 0 min
without penicillin G
- ICH incubated with penicillin G
●—● ICH incubated without penicillin G

理では両者の溶血活性には変化はみられず、処理前とほぼ同じであった。

4. ペニシリン G の抑制作用における濃度の影響

各種濃度のペニシリン G 加生食水液 (2×10⁴U/ml, 4×10⁴U/ml および 2×10⁵U/ml) を用意し, ICH, ICH-core complex および A-I SLS 液にそれぞれ等量の各濃度のペニシリン G 生食水液を加えて 37°C に 20 分間静置しておこなった溶血試験の成績は表 5 および図 3, 図 4 に示した如くである。すなわち, ICH はペニシリン G を加えずに 37°C に静置するだけでその溶血活性は減弱し, 10 分間で 1/3 に減弱 (表 3 および図 1 参照) するが, これにペニシリン G を加えることでその減弱度ははさらに高まり, また, その減弱度も付加したペニシリン G 濃度が高いほど強まり, 作用濃度 1×10⁴U/ml では 10 分で 1/4 に, 20 分で 1/60 に, 5×10⁴U/ml および 10×10⁴U/ml では 10 分で溶血活性をみとめなかった。これに対して ICH-core complex と, A-I SLS の両者は互いに似た反応を示し, A-I SLS ではペニシリン G の作用濃度が 10×10⁴U/ml でも 37°C 20 分で溶血活性の減弱をみとめなかった。

5. ペニシリン G の抑制作用に対する温度の影響

CFE-S 3 ml にペニシリン G 生食水 (4×10⁴U/ml) 3 ml を加えた液を 3 等分し, それぞれを 0°C, 20°C ならびに 37°C に静置して 20 分後に各処理液について溶血活性を行った成績は表 6 に示した如くである。すなわち, 0°C 下に静置すると溶血活性の低下は全くみとめられず, 37°C 下ではほとんど溶血活性は消失していた。

Table 4. Influence of penicillin G upon hemolytic activity of ICH-core complex* and SLS

Materials	Presence (+) or absence (-) of penicillin G in media (2×10 ⁴ U/ml)	Time of incubation (min)	Hemolytic activity (HU/ml)
ICH-core complex	+	0	2,000
		10	1,900
		20	1,870
	-	0	2,000
		10	1,950
		20	2,100
SLS	+	0	1,600
		10	1,550
		20	1,570
	-	0	1,600
		10	1,500
		20	1,570

* ICH-core complex was prepared as follows ; 5 ml of CFE-S was mixed with 5 ml of 2% RNase core solution and incubated at 37°C for 60 min. ICH-core complex or SLS was incubated at 37°C for stated time with or without penicillin G and tested for hemolytic activity.

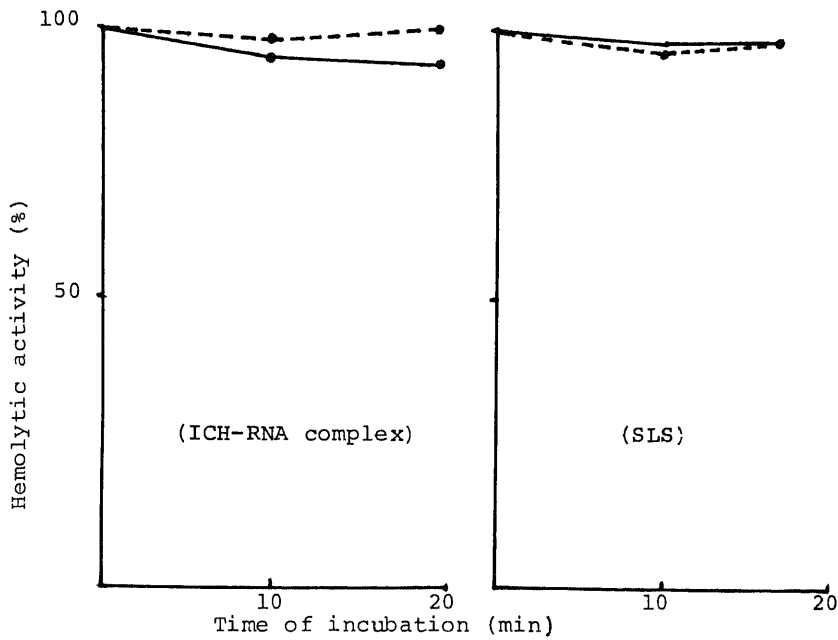


Fig. 2. Changes in hemolytic activity of SLS and ICH-core complex by treatment with penicillin G

SLS or ICH-core complex was incubated at 37 °C for stated time with or without penicillin G and hemolytic activity was expressed as percent calculated by the following formula :

$$\frac{\text{HU of SLS}_t}{\text{HU of SLS}_0} \times 100 \quad \frac{\text{HU of ICH-core complex}_t}{\text{HU of ICH-core complex}_0} \times 100$$

SLS_t and ICH-core complex_t : Hemolysin incubated for t min with or without penicillin G

SLS₀ and ICH-core complex₀ : Hemolysin incubated for 0 min without penicillin G

- Hemolysin incubated with penicillin G
- - ● Hemolysin incubated without penicillin G

Table 5. Influence of various concentration of penicillin G upon hemolytic activity of ICH-core complex and SLS

Materials	Concentration of penicillin G in media (U/ml)	Hemolytic activity (HU/ml)			
		Time of incubation (min)			
		0	10	20	30
ICH	0	1,400	448	336	56
	1 × 10 ⁴	1,235	150	60	30
	2 × 10 ⁴	1,120	90	20	10
	5 × 10 ⁴	1,050	10	0	0
	10 × 10 ⁴	1,050	0	0	0
ICH-core complex	0	2,000	2,000	2,100	2,020
	2 × 10 ⁴	2,000	2,000	2,000	2,100
	10 × 10 ⁴	2,000	1,950	1,900	1,860
SLS	0	1,600	1,620	1,580	1,550
	2 × 10 ⁴	1,600	1,600	1,580	1,550
	10 × 10 ⁴	1,600	1,550	1,500	1,500

To each solution of ICH, ICH-core complex and SLS were added various concentration of penicillin G. The mixture was incubated at 37°C for stated time. After incubation, the solution was tested for hemolytic activity.

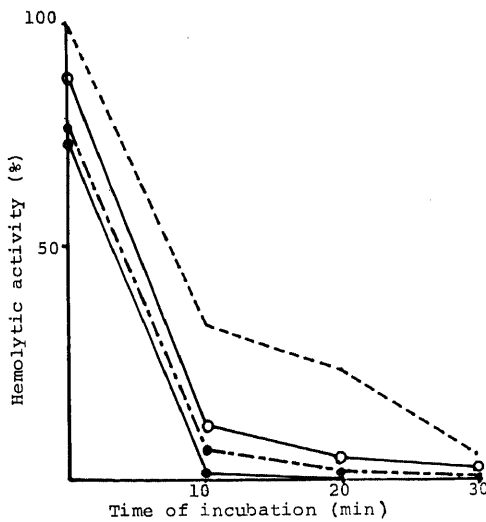


Fig. 3. Change in hemolytic activity of ICH by treatment with various concentration of penicillin G

ICH was incubated at 37°C for stated time with various concentration of penicillin G, and hemolytic activity was expressed as percent.

- 0 U/ml of penicillin G
- 1×10⁴ U/ml of penicillin G
- 2×10⁴ U/ml of penicillin G
- 5×10⁴ U/ml of penicillin G

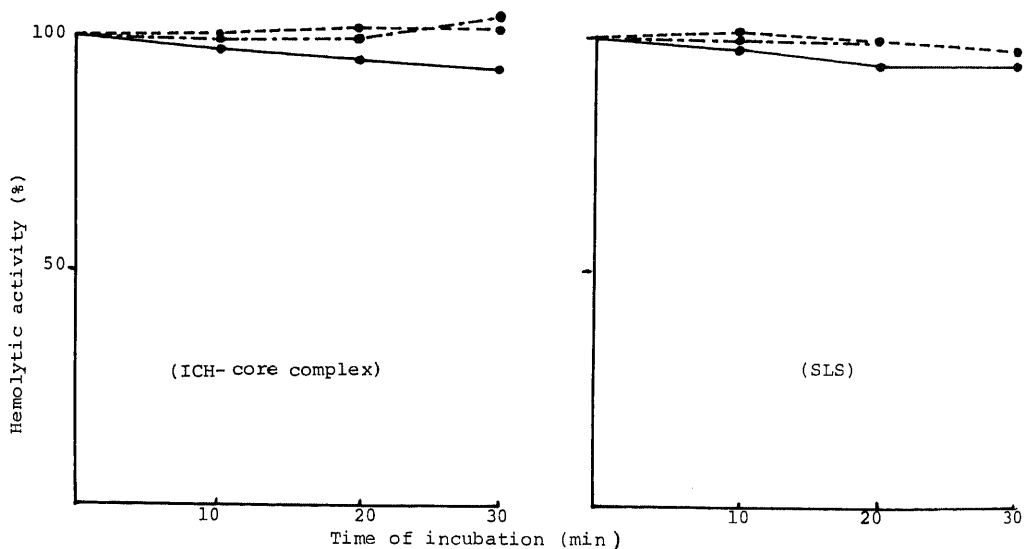


Fig. 4. Change in hemolytic activity of SLS and ICH-core complex by treatment with various concentration of penicillin G

SLS and ICH-core complex were incubated at 37°C for stated time with or without penicillin G, and hemolytic activity was expressed as percent.

- 0U/ml of penicillin G
- 2×10⁴U/ml of penicillin G
- 10×10⁴U/ml of penicillin G

20°Cでは0°C処理液と37°C処理液の中間を示し、対照液の1/4に減弱し、処理温度による影響がみとめられた。

6. CFE-Sの超遠心上清液に対するペニシリンGの影響

CFE-Sをさらに遠心(15×10⁴g, 60分)してえられる上清液CFE-SSについて、CFE-Sで行ったと同じようにしてペニシリンGの影響を検討した。すなわちCFE-SS 1容量に各種濃度のペニシリンG加生食水1容量を加えて、37°Cに20分間静置したのち、それぞれについて溶血試験を行った。その成績は表7, 図5に示した如くである。CFE-Sをさらに遠心することで、その溶血力は若干低下するが、溶血活性は遠心上清液にみとめられ、CFE-SSの溶血活性も37°C処理により減弱するが、その減弱度はCFE-Sに比して弱く、37°C20分ではCFE-Sの溶血活性が1/4に減弱したのに対し、CFE-SSでは約2/5であった。また、CFE-SSにペニシリンGを加えると、CFE-SSの溶血活性はCFE-Sと異なってペニシリンGを加えただけ(0分)で低下することはなかった。ペニシリンGを加えて37°C処理すると、ペニシリンGを加えずに処理したCFE-SSに比べて減弱度は強かったが、この減弱度はCFE-Sの時と同様にペニシリンGの濃度と相関し、

Table 6. Effect of temperature on inactivation of ICH by penicillin G

Material	Temperature at that the mixture was incubated	Hemolytic activity of ICH (HU/ml)	
		Time of incubation (min)	
		0	20
Mixture of ICH and penicillin G	0°C	1,114	1,010
	20°C	1,100	461
	37°C	1,080	0

A mixture of ICH and penicillin G was incubated at various temperature for 20 min, and hemolytic activity was tested.

Table 7. Influence of penicillin G upon ICH of CFE-SS*

Material	Concentration of penicillin G in the mixture (U/ml)	Hemolytic activity of ICH (HU/ml)	
		Time of incubation (min)	
		0	20
Mixture of CFE-SS and penicillin G	0	530	200
	1×10^4	520	132
	2×10^4	530	80
	5×10^4	530	2

* CFE-SS: The supernatant obtained by centrifugation of CFE-S at 15×10^4 g for 60 min. ICH of CFE-SS was mixed with various concentration of penicillin G and incubated at 37°C for 20 min. After incubation, hemolytic activity was tested.

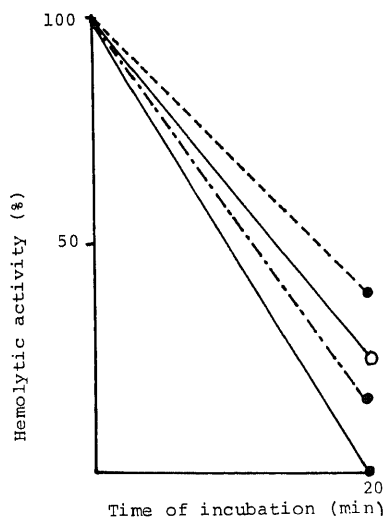


Fig. 5. Change in hemolytic activity of ICH of CFE-SS by treatment with penicillin G
ICH of CFE-SS was incubated at 37°C for 20 min with various concentration of penicillin G and hemolytic activity was expressed as percent calculated by the following formula:

$$\frac{\text{HU of ICH}_t \text{ of CFE-SS}}{\text{HU of ICH}_0 \text{ of CFE-SS}} \times 100$$

ICH_t: ICH of CFE-SS incubated for 20 min with or without penicillin G

ICH₀: ICH of CFE-SS incubated for 0 min without penicillin G

- 0 U/ml of penicillin G
- 1×10^4 U/ml of penicillin G
- 2×10^4 U/ml of penicillin G
- 5×10^4 U/ml of penicillin G

作用濃度が 1×10^4 U/ml では 37°C 20 分で 2/5 に、 2×10^4 U/ml では 1/4 に、 5×10^4 U/ml では溶血活性は完全に消失した。しかし、この減弱度は、CFE-S ではペニシリン G が 1×10^4 U/ml では 1/20 に、 2×10^4 U/ml では 1/50 となる (図 1 参照) のに比べて CFE-SS の減弱度の方が遙かに弱かった。

7. ICH 合成系に対するペニシリン G の影響

まず、(CFE-S 1 容量 + 4×10^4 U/ml ペニシリン G 生食水 1 容量) と (CFE-S 1 容量 + 生食水 1 容量) の 2 液を用意し、これを 37°C にインキュベートして所定の時間 (t) に溶液を採取したものを PC-t 分間前処理 CFE および C-t 分間前処理 CFE-S として RNase

Table 8. Effect of RNase core on hemolytic activity of penicillin G-pretreated CFE-S

Materials	Pretreatment	Hemolytic activity of pre-treated CFE-S (HU/ml)	Hemolytic activity of pre-treated CFE-S incubated with RNase core (HU/ml)
	Time of incubation (min)		
Mixture of CFE-S and penicillin G (2×10^4 U/ml)	0	883	3,328
	10	116	416
	20	35	140
Mixture of CFE-S and PS	0	1,142	2,944
	10	276	830
	20	163	448

CFE-S was incubated at 37°C for stated time with or without penicillin G. This pretreated CFE-S was mixed with 2% RNase core solution in ratio of 1 to 1 in volume and, after incubation at 37°C for 60 min the mixture was tested for hemolytic activity. The hemolytic activity was expressed as HU/ml of CFE-S.

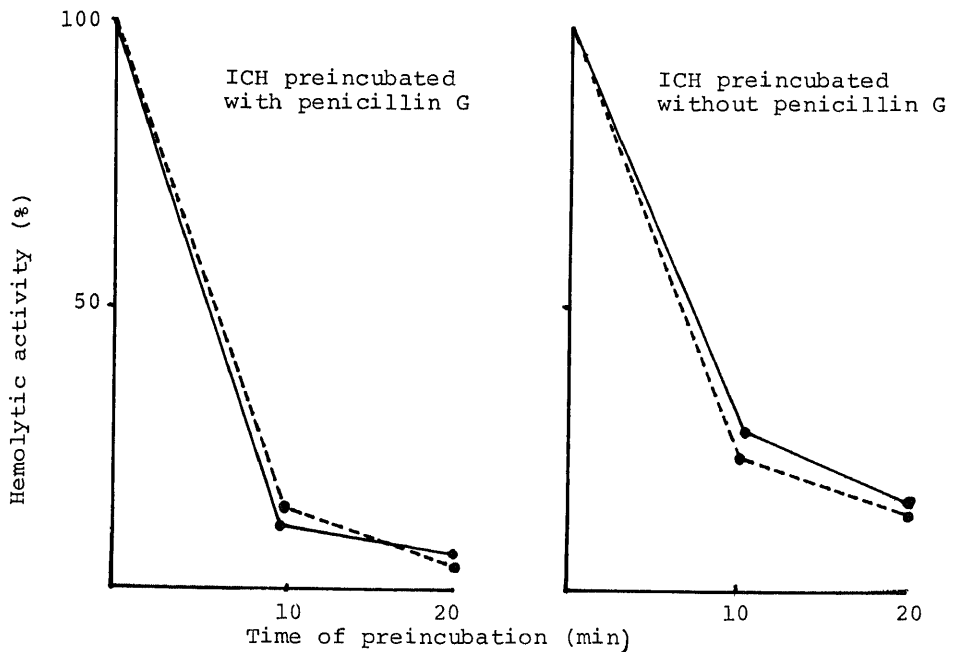


Fig. 6. Changes in hemolytic activity enhanced by RNase core of penicillin-pretreated ICH. ICH preincubated at 37°C for stated time with or without penicillin G was mixed with 2% RNase core solution in ratio of 1 to 1 in volume and incubated at 37°C for 60 min. Then, hemolytic activity was tested and expressed as percent calculated by the following formula:

$$\frac{\text{HU of PC}_t}{\text{HU of PC}_0} \text{ or } \frac{\text{HU of C}_t}{\text{HU of C}_0} \times 100 \quad (\bullet - - - \bullet)$$

$$\frac{\text{HU of PC}_t\text{-Core}}{\text{HU of PC}_0\text{-Core}} \text{ or } \frac{\text{HU of C}_t\text{-Core}}{\text{HU of C}_0\text{-Core}} \times 100 \quad (\bullet - \bullet)$$

PC_t or C_t: ICH preincubated with (PC) or without (C) penicillin G for t minutes

PC₀ or C₀: ICH preincubated for 0 min with or without penicillin G

PC_t-Core or C_t-Core: PC_t or C_t incubated with RNase core

PC₀-Core or C₀-Core: PC₀ or C₀ incubated with RNase core

coreによる溶血力増強試験を行った。すなわち、前処理 CFE-S 1容量に 2% RNase core 生食水 1容量を加えて 37°C に 60 分間静置後溶血試験を行い、各溶液の溶血力価を次の如くとした。

PC-t 分間前処理 CFE の溶血力価：HU-PCt

C-t 分間前処理 CFE の溶血力価：HU-Ct

PC-t 分間前処理 CFE-S の RNase core

による増強溶血力価：HU-PCt-Core

C-t 分間前処理 CFE-S の RNase core

による増強溶血力価：HU-Ct-Core

t：インキュベーション時間（分）

これらの成績は表 8 および図 6 に示した如くである。なお溶血力価は CFE-S の稀釈倍数に換算して表示した。すなわち、CFE-S は前処理でペニシリン G が存在すると否にかかわらず、その溶血活性は減弱するが、C-t 分間前処理 CFE-S では t=0 分間に比して 10 分間で 1/4 に、20 分間で 1/7 に減弱するのに対し、ペニシリン G を加えた PC-t 分間前処理 CFE-S では 10 分間で 1/8 に、20 分間で 1/25 とより急激に減弱したことは先の実験と同様であった。

溶血力増強試験で、前処理 CFE-S に RNase core を加えてインキュベートすると、前処理時にペニシリン G があってもなくても溶血力は増強した。これらの個々の溶血力価は表 8 に示した如くであり、前処理時間が長ければ長いほど増強溶血力価は減弱していた。また、PC 前処理 CFE-S と C 前処理 CFE-S とを比較すると、図 6 に示した如く、PC 前処理の方が C 前処理より増強溶血力は弱かった。また、HU-Ct-Core/HU-Ct 比は、t=0 分間で 2.58、t=10 分間で 2.96、t=20 分間で 2.72 とほぼ一定しており、同様な関係はペニシリン G を用いて行った HU-PCt-Core/HU-PCt 比に於てもみられ、t=0 分間で 3.77、t=10 分間で 3.59、t=20 分間で 4.0 とほぼ一定の値を示したが、増強比はペニシリン G を加えて前処理した CFE-S の方に高い傾向がみられた。

また、RNase core による増強溶血力価間の比較において、HU-Ct-Core/HU-Co-Core 比で t=10 分間では 1/3、t=20 分間では 1/7 と増強溶血力価比は減弱しているが、これは HU-Ct/HU-Co 比の t=10 分間で 1/4、t=20 分間で 1/7 と両者は図 7 に示した如くよく似た減弱傾向を示していた。これと同様なことは、ペニシリン G を加えて前処理した CFE-S においてもみられ、HU-PCt-Core/HU-PCo-Core 比で、t=10 分間で 1/8、t=20 分間で 1/16 と減弱しており、これに対する HU-PCt/HU-PCo 比では t=10 分間で 1/8、20 分間で 1/25 と両者は似た減弱傾向図 7 を示していた。

8. ICH に対する RNase core とペニシリン G の

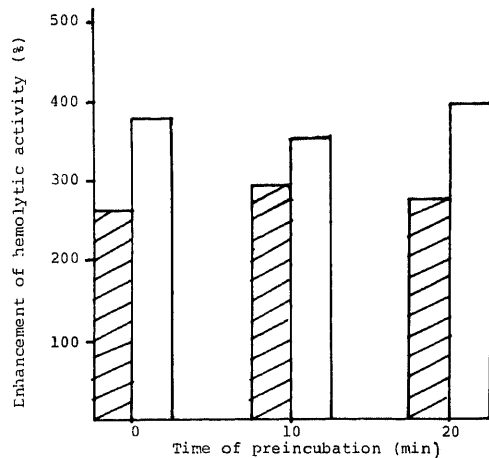


Fig. 7. Rate of enhancement of hemolytic activity of penicillin pretreated ICH by RNase core. ICH preincubated with or without penicillin G was incubated with RNase core. Hemolytic activity of preincubated ICH was tested before and after incubation with RNase core. Enhancement of hemolytic activity was expressed as percent calculated by the following formula.

$$\frac{\text{HU of PC}_t\text{-Core}}{\text{HU of PC}_t} \text{ or } \frac{\text{HU of C}_t\text{-Core}}{\text{HU of C}_t} \times 100$$

▨ ICH preincubated without penicillin G

□ ICH preincubated with penicillin G

作用に関する実験

4% RNase core BBM 液 0.5 ml とペニシリン G-BBM 液 (8×10^4 U/ml) 0.5 ml を予め混和しておいた液に CFE-S 1 ml を加えて、37°C に 20 分間静置した後溶血力試験を行った。なおこの他に、(CFE-S 1 ml + 2% RNase core-BBM 液 1 ml)、(CFE-S 1 ml + BBM 液 1 ml) および (CFE-S 1 ml + ペニシリン G 加 BBM 液 1 ml) (ペニシリン G 作用濃度 2×10^4 U/ml) の 3 液を用意し、上記と同じように 37°C 20 分間静置して溶血力試験を行った。その成績は表 9 に示した如くである。すなわち、ペニシリン G と RNase core の混合液に CFE-S を加えた直後では (CFE-S + BBM) の 1,600 HU/ml に比べて溶血力は若干増加しているが、37°C 20 分後では (CFE-S + BBM) がおおいに減弱しているのに対し、(RNase core + ペニシリン G + CFE-S) では混合直後の 1,800 HU/ml の約 7 倍となっていた。同時に行った (CFE-S + RNase core) では、20 分後には直後の 2,400 HU/ml の約 5.5 倍と上昇しており、何れも RNase core による増強作用がみとめられ、ペニシリン G と RNase core が同時に作用液に存在する時にはペニシリン G は、RNase core による CFE-S の溶血力増強作用に何らの影響も与えないことが

Table 9. Comparative experiments on competition between RNase core and penicillin G for ICH

Mixture				Hemolytic activity	
Medium I		Medium II		Time of incubation of mixture	
				0	20
10% RNase core	0.2 ml	CFE-S	1 ml	1,800	12,549
Penicillin G (20×10^4 U/ml)	0.2 ml				
PS	0.2 ml				
CFE-S	1.0 ml	PS	0.8 ml	2,400	13,152
10% RNase core	0.2 ml				
CFE-S	1.0 ml	PS	0.8 ml	1,500	0
Penicillin G	0.2 ml				
CFE-S	1.0 ml	PS	1.0 ml	1,600	400

After Medium I and II had been prepared under the cold, two media were mixed and incubated at 37°C for 20 min. Then, the hemolytic activity of the mixture was tested.

Table 10. Influence of penicillines upon hemolytic activity of ICH

Penicillines	Time of incubation (min)	Hemolytic activity of ICH (HU/ml)
Ampicillin	0	1,300
	20	10
Cepharidine	0	1,200
	20	8
Cefotaxim natrium	0	1,150
	20	7
Penicillin G	0	1,000
	20	10
None	0	1,216
	20	108

Penicillines were added to ICH in the concentration of 10 mg/ml and incubated at 37°C for 20 min. Hemolytic activity was tested before and after incubation.

みとめられた。因に CFE-S にペニシリン G を作用させた試験液、およびこのペニシリン G 処理をうけた CFE-S に RNase core を作用させた試験液、ならびに CFE-S をあらかじめ RNase core で処理したもの、すなわち ICH-core complex にペニシリン G を作用させた試験液の結果はそれぞれ表 3、表 7、および表 4 に示した如くである。これからもみられる如く、RNase core が存在しなければペニシリン G の影響が強くなり、RNase core が既に或いは同時に存在すればペニシリン G の影響はほとんどみとめられない成績が得られた。

9. その他のペニシリンの影響に関する実験

ペニシリン G カリウム以外の薬剤として、アンピシリン、セファロリジン (セボラン) およびセフォタキシナトリウム (セフォタックス) を用いて ICH に対する影響について実験を行った。CFE-S 1 ml に各薬品の 20 mg/ml 含有生食水 1 ml を加えて 37°C 20 分間静置後溶血試験を行った実験の成績は表 10 に示した。なおペニシリン G の作用濃度は 2×10^4 U/ml であったが、質量に換算して表示した。その結果、ペニシリン非添加 CFE-S の溶血力は 37°C 20 分で 9/100 に減少し、この減少度はペニシリン G の付加によりさらに顕

著となったが、アンピシリン、セファロジン、およびセフォキシムナトリウムもペニシリンGと同じようにCFE-Sの溶血力を減少させ、またその抑制程度もペニシリンGとほぼ同程度であった。

考 察

抗がん性でSLS産生能を有する溶連菌Su株(Su菌)をペニシリンG含有(2.7×10^4 U/ml)BBMに浮遊させて37°C20分ついで45°C30分の加温処理を行うと、処理菌の抗がん性は著しく高まるのに反し、菌増殖性とSLS産生能が消失または著しく減弱することが岡本ら²¹⁾によって報向されている。この中では温度処理の条件、BBMの組成成分の影響、ならびにペニシリンGの濃度による影響などについては詳しく述べられているが、ペニシリンGのSLS産生に対する抑制的作用についての説明はほとんどなされていない。SLS産生については、1938年、岡本⁴⁾がリボ核酸によるSLS増産現象(核酸効果)を発見して以来、SLSの研究はおおいに進展し国内国外より数多くの成果が発表^{4)~79)}されている。一方、1956年Schwab⁸⁾は、菌体を超音波で破壊した上清液に溶血性物質が存在することを見出し、これに菌体内溶血物質(Intracellular hemolysin, ICH)と名付けた。しかし、菌体を破壊する方法、条件などが充分でなかったため、その後何人かの研究者により実験¹⁵⁾¹⁶⁾が行われたが、ICHの溶血活性は何れも弱く、研究を遂行する上での大きな支障となっていたが、林¹⁰⁾は菌体を破壊するのにBraun's cell homogenizerを利用することで高活性のICHを得、これを用いてICH, ICH-core complexおよびSLSの比較実験を行い、ICHとSLSの関係を明らかにすると共にICHの合成系があることを示唆した。

本研究において菌体を加温処理する際、単にPSSに浮遊させて処理すると処理菌の静菌法でのSLS産生は著しく減弱し、BBMに浮遊して処理するとSLS産生は非処理菌と同等または、より強くなること、ならびにペニシリンGを 2×10^4 U/mlにPSS、またはBBMに加えて処理するとSLS産生が共に消失、または減弱することは岡本ら²¹⁾の成績と同一であったが、これら処理菌のICH溶血活性には、処理時におけるペニシリンG(2×10^4 U/ml)および浮遊液の種類による影響はみられなかった。しかし、ペニシリンGの作用濃度を 10×10^4 U/mlとし、PSS中で37°C50分処理すると同処理菌のSLS産生が消失すると共にICHも1/2に減弱し、高濃度にペニシリンGが作用することでICHも影響を受けることが実証された。このことからICHにペニシリンGを直接作用する実験を行ったのであるが、ICH自体は温度に対して不安定で37°C30

分で容易に失活するが、ICHにペニシリンGを加えることでその失活はより急激となり、また、この失活はペニシリンGの作用濃度と相関して濃度が高いほど失活も急激であった。これに対し、ICHにRNase coreを作用させたICH-core complexおよび培養液中から核酸効果によって増産・分離したSLSでは、これらにペニシリンGを加えて処理しても、また、ペニシリンGの作用濃度を高くしても共に自然失活以上の失活はみとめられなかった。このことはICHとICH-core complexならびにSLSとは化学的に異なることを意味するものであろう。

ICHにペニシリンGを加えて温度処理する際、ペニシリンGを加えた直後にICHの活性が低下したのはペニシリンGの親和性の強いことを示すものと考えられる。しかし、ICH-core complexにペニシリンGを作用させても、その抑制作用がみとめられぬこと、ならびに(ペニシリンG+RNase core)の混液にICHを加えてもICH溶血活性の減弱、低下がみられず、却って溶血活性が増大することが観察されたが、これはペニシリンGとRNase coreのICHに対する親和性がRNase coreの方がより大であるためと、ICH+RNase core → ICH-core complexの反応がさらに促進したためと考えられた。

近年、ペニシリン感受性菌にはplasmic membraneなどにペニシリン結合タンパク^{17)~19)}penicillin binding proteinが存し、ペニシリンGはこれと結合することが報告されている。また、Calandar²⁰⁾²¹⁾は、ICHは原形質よりもplasmic membraneまたはperiplasmic membraneに存在すると報告している。これらのことからCFE-Sをさらに遠心(15×10^4 g, 60分間)して各membraneを除いた上清液(CFE-SS)について実験を行い、その結果、ICHは上清液にあることを実証し、このCFE-SSに対しペニシリンGが依然として抑制的に作用することを実証した。このことから、ペニシリンGはpenicillin binding proteinとはまた異った作用点をICHに持つと考えられ、ペニシリンGの新たな生物活性を見出したものと言えよう。しかし、CFE-SSに各種濃度のペニシリンGを加えると濃度の高低にかかわらず、0分時の溶血活性は全て同一であり、これに対し、CFE-SではペニシリンGが高濃度の場合ほどペニシリンGを加えるだけで溶血活性の低下が起こることは、何らかの意味でICHが関係していると考えられる。

菌体内にはICHのほかICHの合成系が存在することは己に林¹⁰⁾によって示唆されており、ICHとICH合成系の温度による安定性の違いも報告されているが、今回の実験においてはペニシリンG処理による

CFE-Sの溶血力減弱はHU-PCt/HU-PCoから、 $t=10$ 分で $1/8$ 、 $t=20$ 分で $1/25$ であり、一方ペニシリンG処理CFE-SのRNase coreによる増強溶血力価においてはHU-PCt-Core/HU-PCo-Coreから $t=10$ 分で $1/8$ 、 $t=20$ 分で $1/16$ となっており、両者は似た値を示している。このことはペニシリンGを加えずに温度処理したCFE-SのHU-Ct/HU-CoとHU-Ct-Core/HU-Co-Coreの間に於ても同様な関係がみられる。このことと、HU-Ct-Core/HU-CtおよびHU-PCt-Core/HU-PCtの値が常に一定であることを考えれば、ICHとICH合成系とは異なったものとしても極めて類似していると考えられる。

ICHに対する抑制的作用はペニシリンGのほか、その抑制度の違いはあるにしても、アンピシリン、セファロリジン、およびセフォタキシムナトリウムにもみとめられることは、化学構造と相関性があると考えられるが、これについてはさらに多くのペニシリン、およびその他の抗生物質について検討する必要があると考えられる。

結 論

抗がん性でSLS産生溶連菌Su株(Su菌)をペニシリンG加生食水に浮遊させて加温処理を行うとSu菌のSLS産生が消失することから、ペニシリンGのSLS産生ならびにSu菌の溶血毒素に対する影響について実験を行い、次の如き結果を得た。

1. ペニシリンG(作用濃度 2×10^4 U/ml)を生食水に加えSu菌を処理すると、同菌のSLS産生は完全に抑制されたが、同処理菌の菌体内溶血毒素(ICH)活性は影響を受けなかった。しかし、ペニシリンGの作用濃度を 10×10^4 U/mlとするとICHの溶血活性は減弱した。

2. ICHに直接ペニシリンGを作用させるとICHの活性は急速に減弱し、この減弱はペニシリンGの作用濃度が高いほど強かった。

3. ICHにRNAのリボヌクレアーゼ抵抗性画分(RNase core)を作用させたICH-core complexおよび、SLSの溶血活性はペニシリンGによって影響されなかった。

4. ペニシリンGで前処理したCFE-SをRNase coreとインキュベートすると溶血力は増強したが、非処理CFE-Sのと比較して溶血力価は弱く、ICH合成系もペニシリンの影響を受けることが認められた。

5. ペニシリンG以外のペニシリンにおいても、溶血活性に対して抑制的作用がみとめられた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜わり

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。

文 献

- 1) Bernheimer, A. W.: Formation of a bacterial toxin (streptolysin S) by resting cells. *J. Exp. Med.*, **90**, 373-392 (1954).
- 2) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming activities of hemolytic streptococci. *Jap. J. Microbiol.*, **11**, 323-336 (1967).
- 3) Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S.: Streptolysin S-forming and antitumour activities of group A streptococci, p 259-289. *In* J. Jeljaszewicz & T. Wadström (ed.), *Bacterial toxins and cell membranes*, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1978.
- 4) Okamoto, H.: Über die hochgradige Steigerung des Hämolyse - bildungsvermögens des Streptococcus hemolyticus durch Nukleinsäure. *I Mitt. Japan J. Med. Sci., IV Pharmacol.*, **12**, 167-208 (1940).
- 5) Bernheimer, A. W.: Properties of certain rapidly acting bacterial toxins as illustrated by streptolysin O and S. *Bacteriol. Rev.*, **12**, 195-202 (1948).
- 6) Bernheimer, A. W.: Streptolysins and their inhibitors, p 19-38. *In* M. McCarty (ed.), *Streptococcal infections*, University Press, New York, 1954.
- 7) Hosoya, S., Hayashi, T., Homma, Y., Egami, F., Shimomura, M. & Yagi, Y.: Studies on the hemolysin of hemolytic streptococci with nucleic acid solution. *Jpn. J. Exp. Med.*, **20**, 25-36 (1949).
- 8) Schwab, J. H.: An intercellular hemolysin of group A streptococci I. Influence of sonic energy and pH on hemolytic potency. *J. Bacteriol.*, **71**, 94-99 (1956).
- 9) Ginsburg, I.: Streptolysin S, p 99-171. *In* T. C. Montie, S. Kadis & S. J. Aji (ed.), *Microbial toxins Volume III*, Academic Press, New York and London, 1970.
- 10) 林義則: ストレプトリジン-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).
- 11) 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).

- 12) **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).
- 13) **Bernheimer, A. W. & Rodbart, M.** : The effect of nucleic acids and of carbohydrates on the formation of streptolysin. *J. Exp. Med.*, **88**, 149-168 (1948).
- 14) **Shoin, S.** : On the stabilizing effect of silver salts upon streptolysin S. *Jpn. Exp. Med.*, **24**, 13-19 (1954).
- 15) **Koshimura, S. & Shoin, S.** : Experimental anticancer studies Part 13 On the streptolysin S-synthesizing and anticancer activities of cell-free extract from living hemolytic streptococci. *Gann*, **51**, 309-318 (1960).
- 16) **Taketo, A. & Taketo, Y.** : Biochemical studies in streptolysin S-formation. I. Streptolysin

S formation in cell free system. *J. Biochem., Tokyo*, **56**, 552-561 (1967).

- 17) **Spratt, B. G. & Pardee, A. B.** : Penicillin-binding proteins and cell shape In *E. coli*. *Nature*, **254**, 516-517 (1975).
- 18) 松橋通生・野口浩・玉城成夫 : ペニシリン結合蛋白質—理論と実際—*Chemotherapy*, **27**, 827-840 (1979).
- 19) **Rogers, H. J., Perkins, H. S. & Ward, J. B.** : Microbial cell walls and membranes, p 298-382 (1980) London New York Chapman and Hall, 150 th anniversary.
- 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).

Influence of Penicillin upon Hemolysin of Hemolytic Streptococci Yoichi Himeno, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — *J. Juzen Med. Soc.*, **92**, 460—474 (1983)

Key words: Hemolytic streptococci, Intracellular hemolysin, Streptolysin S, Penicillin.

Abstract

The streptolysin S (SLS)-producing activity of hemolytic streptococci Su strain (Su cocci) has been found to be inhibited, while the anticancer activity is enhanced, by incubating Su cocci at 37°C and subsequently at 45°C with penicillin G. Therefore, the present experiment was carried out to test influence of penicillin G upon the SLS-producing activity, hemolytic activity of SLS and upon intracellular hemolysin (ICH) which was found in the supernatant of cell-free extract (CFE-S) of Su cocci. When Su cocci suspension in physiological saline was incubated at 37°C for 50 min with penicillin G at the concentration of 1×10^5 U/ml, SLS production was completely inhibited and hemolytic activity of ICH of the treated Su cocci was less potent than that of non-treated Su cocci. Furthermore, when ICH of non-treated Su cocci was incubated at 37°C with penicillin G, the activity of ICH was rapidly decreased. The degree of inactivation was proportional to the concentration of penicillin G. Such inactivating effect was also seen with ampicillin, cepharidine and cefotaxim natrium. ICH in the supernatant obtained by centrifugation of CFE-S at 1.5×10^5 g for 60 min was also inactivated by penicillin G similar to ICH in CFE-S. On the other hand, the hemolytic activity of SLS and ICH-core complex, which was formed by incubating ICH with ribonuclease resistant fraction of RNA (core), was not inactivated at all by penicillin G. Decreased activity of penicillin-treated ICH was enhanced about fourfold by incubating with core at 37°C for 60 min, indicating that hemolysin was newly synthesized.

After ICH was added to a mixture of core and penicillin G and incubated, the hemolytic activity was enhanced as much as the activity of ICH was enhanced by incubation with core in the absence of penicillin G. These results suggest that penicillin G inactivates ICH but does not do extracellular hemolysin SLS and ICH-core complex, and that ICH is chemically different from SLS and ICH-core complex.