

Streptolysin-S のカリウム塩溶液中における 耐熱現象についての知見補遺

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本 肇教授)

西 部 行 雄

(受付昭和34年4月25日)

さきに Bernheimer¹⁾ は KCl 或いは KH_2PO_4 の水溶液中で Streptolysin-S が 50°C, 30' の処置にも耐え得る事を観察し, K⁺には Streptolysin-S の熱非働化を防禦する効果があると報告したが, この研究は, 最近当教室の正印等^{2, 3, 4)} によつて開発された Ag⁺の Streptolysin-S に対する特異的完全耐熱化効果に関する知見と共^{*1}に, Streptolysin-S の精製分離の改善, 並びに本質追求への利用性に関連せしめて甚だ重視すべきものであるに拘らず, 未だ Bernheimer の研究に対する追証が齎らされるに至っていないといつた現状である. そこで私は Bernheimer の報告内容を検討した結果, 同氏による考查範囲では未だ以つて K⁺による Streptolysin-S の耐熱現象の普遍性を肯定するには尚甚だ不充分であるとの見解に到達したので, ここに改めてこの問題に対し諸他の方面から考查し, 其の知見の拡大深化を計るに至つた訳である. 以下其の成績を報告する.

I. I-N-F-Streptolysin-S 標品における実験

本項の実験に使用した精製 Streptolysin-S (以下 St-S と略記す) 標品は何れも溶連菌 (S-株) の 1%酵母核酸加 ブイヨン30時間培養液より正印²⁾の記載に準じて分離した I-N-F-Fractions (溶血限界濃度が, 1: 6,400,000 並びに 1: 12,800,000 の二標品) である.

処で I-N-F-Streptolysin-S Fraction には

a) 活性 St-S の外に非活性化された St-S, 酵母核酸 (その他ポリペプチド或いは蛋白性物質の微量) が混在^{6, 7)}している事, 及び

b) St-S の化学的本質の問題は尚未解決で, これに

は核酸説⁸⁾, 蛋白説⁹⁾, 核蛋白体説^{9, 10)} などがあり, しかもその何れにも否定し難い⁶⁾ものがあること, は已に度々論述されているのであるが, 今回研究の目的に関連して, ここに I-N-F-St-S Fraction は其の分離過程から観じて, 少くともここに混在する酵母核酸 (St-S が Polynucleotide 性であるとする時は本毒素も亦) は Sodium ribonucleate の状態にあるという事を特に註記して置く必要がある.

1) St-S の各種塩類溶液中における 37°C 下での非働化状況の追跡

先ず K⁺の存在において果して St-S の熱非働化に対する防禦的效果を期待し得るであろうかについて考查した.

実験方法

a) 精製 St-S :

I-N-F-St-S Fraction [溶血限界濃度 (M.H.C.) = 1: 6 Mill.]

b) 塩類溶液 :

0.85% NaCl 水溶液, 1.5% KNO_3 水溶液, 2.2% KH_2PO_4 水溶液 (K_2HPO_4 で pH 7.0 としたもの), 及び磷酸緩衝-リンゲル液 [M/15 KH_2PO_4 -M/15 Na_2HPO_4 緩衝液 (pH 7.2) の 1 容量に対し NaCl 0.85%, CaCl_2 0.02%, KCl 0.02%, NaHCO_3 0.01% 組成のリンゲル液 4 容量を加えたもの] の 4 つの塩類 (等張^{*2)} 溶液を調製.

c) St-S 原液 :

各塩類の等張溶液を以つて I-N-F-St-S の千倍 (1: 1,000) 稀釈液 10ml 宛を調製す. 別に St-S を 1: 1,000 濃度に蒸溜水に溶解したもの 10ml を用意す.

*1 血清には Streptolysin-S の熱非働化を防禦する性能があるとは宝達⁵⁾の報告する処であるが, 血清の存在は Streptolysin-S の分離精製での著しい障害となるので, 今回の研究における趣旨に合せない訳である.

*2 供試塩類の等張濃度は, その氷点降下度よりの計算値¹¹⁾, 或いは先人^{12, 13)}の生理的実験の結果を参考としたものである.

Studies on the Phenomenon of Thermal-Stability of Streptolysin-S in Solution of Potassium Salts. Yukio Nishibe Department of Pharmacology (Director: Prof. H. Okamoto), School of Medicine, Kanazawa University.

d) 実験術式 :

以上5つの St-S 原液を同時に 37°C の孵卵器中に納め、夫々から逐時的に (直後, 30分, 1時間, 2時間, 4時間, 8時間, 24時間後) 0.5ml 宛を分取して溶血力試験に附す。

e) 溶血力試験 :

先ず型の如く 0.85% 食塩水を以つて 1% 家兎赤血球 (4回食塩水で洗滌) 浮游液を調製用意す。

分取した各被検液については、其の 0.85% 食塩水による倍下稀釈液 (各管の内容は 1ml) を調製し、これに 1% 赤血球浮游液 1ml 宛を加え、よく振つてから 37°C の孵卵器中に 2時間納めた後、更に22時間氷室中に静置せしめてから、溶血の強弱・有無如何を判読記入す。

因に以下特別に註記しない限り、単に溶血力試験に附すとあるは 1% 家兎赤血球浮游液の調製はもとより被検液の倍下稀釈も 0.85% 食塩水を以つてするといつた具合に凡て 0.85% NaCl をメジウムとする方式によつた事を意味す。

実験成績

表 I はその成績を示したものである。

即ち本表では先ず

a) St-S の 0.85% 食塩水溶液を 37°C に静置せしめた実験列 I では原液を調製した直後では 1: 640 万迄溶血が起つているが、30分後に至ると已に溶血力において 1/2 程度 (M.H.C.=1: 320万) の低下があり、以後時間の経過と共に溶血力の低下度が益々著しくなつて、1時間後には 1/4 (M.H.C.=1: 160万)、2時間後には 1/8 (M.H.C.=1: 80万)、4時間以後では 1: 20万液で殆んど溶血が起つていない、これに対し

b) St-S の 1.5% KNO₃ 水溶液を 37°C に静置せしめた実験列 II では30分後では全く溶血力 (M.H.C.=1: 640万) に減弱がなく、1時間後 (M.H.C.=1: 320~640万) に至つて漸く溶血力に低下の兆が現われ、前記 0.85% NaCl における実験で已に 1: 20万が殆んど無効となつた 4時間後でも、尚 M.H.C.=1: 160万の溶血力を保持しており、以後たとひ時間の経過と共に溶血力の低下が進むとはいへ 24時間後でも M.H.C.=1: 40万の力価が保たれている、

c) St-S の 2.2% KH₂PO₄ 水溶液についての 実験列 III では、時間の経過に伴う溶血力低下の関係は前記 b) の KNO₃ 水溶液におけるそれと 大体軌を一につしているが、a) の NaCl 水溶液中におけるとは格段の差がある、しかも

d) St-S の蒸留水溶液についての成績は 食塩水溶液におけるそれと同様である。

という具合に KNO₃ 並びに KH₂PO₄ の水溶液中では St-S の 37°C 下における非働化の進行が、NaCl 水溶液或いは単なる蒸留水中におけるよりも遙に緩慢である事に注目すべきである。しかして磷酸緩衝-リンゲル液についての 実験列 IV では St-S の 37°C 下における非働化経過は KH₂PO₄ に類似しているが、本メジウムの組成が KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, CaCl₂, KCl, NaHCO₃ よりなつているのであるから、熱非働化緩慢の原因が何れに存するかは判断に苦しむのであるが、上述の成績に鑑みて少くとも KH₂PO₄ 及び KCl の存することの意義は否定し得ない処であろう。尚別に St-S 1: 100,000 液を原液として行つた実験でも、其の成績は St-S 1: 1,000 液を原液とした場合と大体同様であつた。

2) 各種の Natrium-, Kalium-並びに Magnesium-塩類における実験

1) の実験では専ら KNO₃, KH₂PO₄ 及び NaCl の 3 塩類についてのみ、それらの St-S の 37°C 下非働化に及ぼす影響が考査されたのであるが、然らば St-S の熱非働化に対する防禦的効果は果して Kalium 塩に通有のものであろうか。本実験はこの間の消息を知るべく行つたものである。

実験方法

a) 精製 St-S :

I-N-F-St-S Fraction [M.H.C.=3,200,000] を使用する。

b) 供試塩類 :

- i) ナトリウム塩 : NaCl, NaBr, NaNO₃, Na₂SO₄, Na₂S₂O₈.
- ii) カリウム塩 : KCl, KBr, KNO₂, KNO₃, K₂SO₄, KJ, KSCN, KH₂PO₄.
- iii) マグネシウム塩 : MgCl₂, MgSO₄.

これら各塩類についてはその等張水溶液を調製す。

c) St-S 原液 :

供試塩類の等張水溶液を以つて I-N-F-St-S の 1: 100,000 液を 10ml 調製す。

d) 実験術式 :

前記 1) 実験の成績で明かな様に、塩類の St-S に対する耐熱効果の有無如何は 37°C 下で 4時間静置したものについての溶血力試験で判別し得られる事に鑑み、本実験は専らこの条件下で考査を進めることとした。即ち被検 St-S 原液 10ml から 5ml を分取し、これを直ちに氷水中に静置せしめると共に、残りの 5ml を 37°C の浴槽中に浸す。かくて 4時間後にこの両者について同時に溶血力試験を行

つた。

実験成績

表IIはナトリウム塩5種、カリウム塩8種及びマグネシウム塩2種の夫々について、St-Sの熱非働化に対する影響関係を37°C、4時間の条件下で考査して得た成績を総括展示したものである。

即ちナトリウム塩類における実験にあつては陰イオンの方がCl⁻ だとBr⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻ 或いはS₂O₃²⁻ だとを不問、何れも37°C、4時間の静置でSt-Sの1:200,000液が已に溶血作用を呈しなくなつており、同様の成績は亦MgCl₂ 並びにMgSO₄ を以つての実験でも得られているに対し、Kalium塩類における実験では大いに趣の異なる処があつて、KCl、KBr、KNO₂、KNO₃、K₂SO₄、KJ、KSCN、KH₂PO₄の何れの水溶液中でもSt-S溶血力における減弱度が低く、37°C下4時間静置後も尚M.H.C.=1:80~160万の力価を保持していることを見る。

即ち本実験では少くとも

- 1) St-S に対する耐熱化効果は Kalium 塩類に通有性のものであつて、Na-塩、Mg-塩*は無効性である事、従つて
- 2) Kalium 塩の存在下で St-S が熱非働化に対し抗し得る事には K⁺ の方に重要な意義があり、陰イオンの方は無関係性である事の証明がもたらされているといえよう。そしてこの事は亦、彼の血清が St-S の熱非働化に対し防禦効果⁵⁾を呈することについて、血清中に存在する K⁺ の影響性の無視し得ないことを推想せしめるものである。

因に、表IIの実験では St-S 原液を調製した塩類が NaCl だと KNO₃ だとの如何を不問、凡て 0.85% NaCl をメジウムとしての溶血力試験が行われたのであるが、この場合溶血力試験のメジウムとして等張 Kalium 塩溶液を用いてもその溶血成績は、等張食塩水をメジウムとした場合に対比して、殆んど差異する処がない事は表III提示の如くである。そして今これら一連の実験は何れも

(A) St-S 標品の被検無機塩溶液における 37°C、4時間の処置 →

(B) Na⁺ 又は K⁺ 含有の等張メジウム中 37°C、2時間 incubation の条件での溶血試験 →

(C) 溶血成績の判読

なる三過程を経て行われている事に留意するならば、その間の Kalium 塩類における St-S の耐熱化成績は専ら (A) 過程で起つた K⁺ の対 St-S 作用の反

映であると解し得よう。

3) St-S の耐熱現象における K⁺ の濃度的関係

以上 K⁺ による St-S の耐熱現象についての実験では何れも被検塩類の等張液を以つて St-S の原液が調製されたのであるが、この度は KCl を選んで、その St-S 原液における濃度関係からの考査が行われた。

即ち表IVはその成績を示したものであるが、ここに St-S 原液における KCl の濃度が 0.1%、0.5%、1.1% (等張)、或いは 5% の何れの場合にあつても 37°C、4時間の処置に対する耐熱成績は同一であつてその間に差異するところが無いに対し、KCl を含まない St-S 原液 (即ち St-S 水溶液) にあつては 37°C、4時間の処置で高度に溶血力低下が起つているという所見は、少くとも St-S の耐熱化には K⁺ の存在が必要である。然したとひ K⁺ の濃度を大ならしめたとしても、これに対応して耐熱化効果の増大を期待し得ない事を教示しているものといえよう。

4) K⁺ 存在下 St-S の耐熱現象の濃度的関係

Bernheimer は K⁺ による St-S の耐熱実験で、専ら温度条件を 50°C と定め、この温度で 30'、60' 及び 120' で処置することによる溶血力の変化状況を試験するという方法を採用しているが、K⁺ による St-S の耐熱現象は濃度的には如何なる程度迄これを証し得るであろうか。この問題に対して吟味を加えた。

実験方法

I-N-F-St-S Fraction から

a) 1.1% KCl を以つて 1: 50,000 St-S 溶液 20ml 及び

b) 蒸留水を以つて 1: 50,000 St-S 溶液 20ml の二つを調製し、夫々を原液として 0°C に保存す。次いで各原液から 2ml 宛を分取したものについて夫々 20°C、30' ; 37°C、30' ; 60°C、30' 及び 100°C、30' の処置を施した二列を用意す。かくて両列について一斉に溶血力試験を行う。

実験成績

即ち表Vはその成績を示したものであるが、これによつて K⁺ の St-S に対する耐熱化能は高々 60°C、30分迄を限度とし、100°C の加熱に対しては到底抗し得べくもないものである事を知る。

II. Na⁺ を完全に除去した St-S 標品における実験

I-N-F-St-S Fraction には、St-S 以外に尚多量の

* Bernheimer¹⁾ は Potassium ion に比しては微弱であるが Ammonium, Magnesium, 及び Barium ions にも St-S 熱非働化防禦の効があると述べているが、

RNA-Na が混在していることは已述の如くである。従つて I-N-F-St-S 標品を使用して行われた前項の諸実験では、その何れにあつても、たとひ微量であるとはいえ原液には RNA-Na (St-S の本質が核酸性であるとすれば本毒素にあつても亦同様) に由来する Na⁺ が混在するものについて St-S の K⁺ 存在下における耐熱性が考査されたといううらみがある訳である。この事に鑑みて本項では Na⁺ を完全に除去した St-S 標品 (Na⁺-free St-S 標品) についてその K⁺ のみの存在下における耐熱性如何が考査された。

実験方法

1) Na⁺-free St-S 標品の調製 :

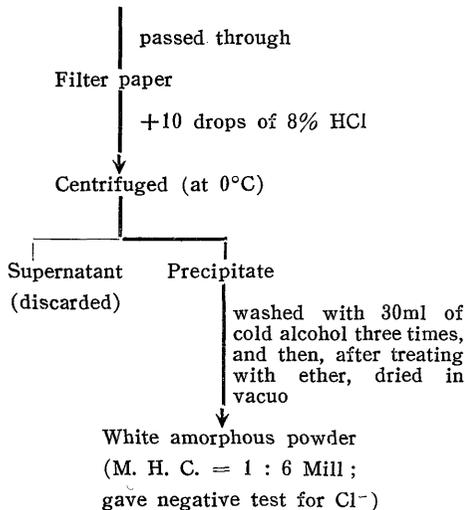
I-N-F-St-S Fraction (M.H.C.=1: 640~1,200万) 300mg を蒸留水 30ml に溶解, 氷冷下に 8% HCl 10滴を加え, 生起した白色沈澱を直に冷却遠心に附す。次いで沈澱に対し 1 回 30ml 宛の氷冷アルコールを以つてする洗滌操作を 3 回施した後, エーテル処置を一回行つて真空乾燥に附す。

収量 280mg. 白色無晶形粉末, 水に不溶, アルカリ可溶, Cl⁻ 反応陰性, M.H.C.=1: 640万

Table VIa

Preparation of Na-free streptolysin-S sample

300mg of a purified streptolysin-S sample (I-N-F-Fraction; M. H. C.=1: 6~12 Mill.) was dissolved in 30ml of cold distilled water



2) St-S 原液の調製 :

Na⁺-free St-S 標品 5mg を秤取し, これに 0.01% K₂CO₃ 5 滴を加え乍ら供試 Kalium 塩の等張液 5ml に溶解せしめ, この溶液から更に同一 Kalium 塩の等張液を以つて Na⁺-free St-S の 1: 100,000

液を調製す。

Kalium 塩としては KNO₃, K₂SO₄, KCl, KSCN, KBr 及び KJ の 6 種を供用す。

別に同様な方法によつて Na⁺-free St-S 標品を 0.01% Na₂CO₃ (5 滴) と 0.85% NaCl を以つて溶解した 1:100,000 液を調製す。

3) 耐熱性試験の術式 :

I 項の 2) に準ず。

実験成績

表 VIb の成績と I 項の 2) における I-N-F-St-S 標品を使用した実験成績とを対比照合すると, 両者はその耐熱成績において軌を一つにしている処がある事が看取されよう。そしてここにはじめて Kalium 塩溶液中で St-S が或る程度の耐熱性を示す現象は溶媒中に単に St-S と K⁺ が共存していることだけで起り, 他のカチオンを全然必要としないものであると断じ得る事となつた訳である。

Bernheimer はその論著において K⁺ による St-S の安定化現象は St-S を取り扱う場合, 或いは本毒素の分離精製実験に際し利用し得るだろうと述べているが, この見解は私の今回の実験成績に徴しても理論的には先ず支持されてよい訳である。

然らば K⁺-効果の利用面についての具体的なもの是如何という事になるが, これには差当り

- 1) St-S を蒸留水又は食塩水に溶解する代りに KCl 溶液に溶解する方が長期保存上有利であろう事,
- 2) St-S の分離精製実験ではその酸沈澱物に対する溶解過程で Na₂CO₃ よりも K₂CO₃ を選んだ方が合理的であろう事

などが考えられよう。

処で, 今 St-S の本質が Polyribonucleotide 性であるという見解^{6, 8)} に立つて, 今回実験の各成績を綜合考察すると, カリウム溶液中で St-S が熱非働化に対し或る程度の安定性を示す現象の発現には

- 1) St-S は核酸の磷酸部分における塩形成 (Na-或いは K-塩) は無関係であろう, 然し
- 2) St-S が K⁺ 含有メジウム中に溶存するという St-S-K⁺ 系においては, K⁺ が St-S 分子における有機的構成部 (Base, Ribose) に対し影響 (化学的交換反応, 或いは Chelate 結合化によるか) して本毒素をして何らか特異な状態をとらしめる事に関係しているだろう

ことが推想されるのであつて, これは彼の酵素反応過程において無機カチオン (Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Mn⁺⁺,

Co⁺⁺, Zn⁺⁺, K⁺等)が重要な意義を有する事に考え合わせて¹⁾, 特に註記に値する処であろうか。

III. Ag-Streptolysin-S-Complex の耐熱性に及ぼす K⁺の影響についての検討

Ag⁺の St-S に対する耐熱効果は 100°C, 数時間の処置にも耐え得る程顕著である事は已に正印²⁾, 山本³⁾, 有沢⁴⁾等によつて実証報告せられた処である。そして前項 I 及び II の St-S における実験成績に鑑みても, ここに当然 Ag-St-S-Complex についてはその耐熱性が K⁺の存在下で如何なる影響を蒙るかの問題が提起して来た訳である。

即ち表 VII は I-N-F-St-S Fraction [M.H.C.=1:12,800,000] から正印記載²⁾の方法によつて調製した Ag-St-S-Complex [M.H.C.=1:12,800,000] 標品を使用して, この問題に対し吟味を加えた成績である。今本表における

- St-S は 1.1% KCl 中 100°C, 30' の処置で溶血力を消失している。
- Ag-St-S-Complex にあつては蒸留水中 100°C, 30' の処置でも殆んど溶血力に減弱が招来されていない。
- Ag-St-S-Complex は 1.1% KCl 中 100°C, 30' の処置で其の溶血力に軽度ながら (1/2程度) 減弱が起つている

という所見に注目するならば, 少なくとも K⁺は Ag-St-S-Complex の耐熱性に対し却つて減弱的に影響する処があると断じ得るであろう。勿論その原因については加熱によつて, KCl における Cl⁻と Ag-St-S-Complex における Ag との間に交換反応が或る程度起つて St-S が遊離して来る事によると解すべきであろう。

綜括並びに結論

I. I-N-F-Streptolysin-S 標品における実験で

- KNO₃ 溶液, KH₂PO₄ 溶液及び磷酸緩衝-リンゲル液中では St-S の 37°C 下における非働化の進行は, NaCl 溶液並びに蒸留水中におけるよりも遙かに緩慢である事。
- KCl, KBr, KNO₂, KNO₃, K₂SO₄, KJ, KSCN 及び KH₂PO₄ 等の Kalium 塩類は何れも St-S に対し耐熱化効果を示すに對し, NaCl, NaBr, NaNO₃, Na₂SO₄ 及び Na₂S₂O₃ 等の Natrium 塩類, 並びに MgCl₂ 及び MgSO₄ は全く無効性である事。
- Kalium 塩の St-S に対する耐熱化能は高々 60°C, 30' 迄を限度とし, 100°C の加熱に対しては到底抗

し得べくもない事。

- St-S の耐熱化には Kalium 塩の存在が必要である, 然したとひ Kalium 塩の濃度 (0.1%→5%) を大ならしめたとしても, これに相応して耐熱化効果の増大を期待し得ない事が実証された。

II. Na⁺を完全に除去した St-S 標品における実験

I-N-F-St-S 標品には相当量の RNA-Na が混在している処から, この I-N-F-St-S 標品に対し HCl 処理法を施して Na⁺を含まない St-S 標品が調製された。そしてこれが純粋なる Kalium 塩類 (KCl, KBr, KNO₃, K₂SO₄, KJ, KSCN) 中での耐熱性如何が吟味せられ, その結果として Kalium 塩溶液中で St-S が或る程度の耐熱性を示す現象は溶媒中に単に St-S と K⁺が共存していることだけで起り, 他のカチオンを全然必要としないものである事が明らかとなつた。

斯くて今回実験の成果として, ここに St-S に対する耐熱化効果は Kalium 塩類に通有性のものであり, 従つて Kalium 塩の存在下で St-S が熱非働化に対し或程度抗し得る事には K⁺の方が重要であり, 陰イオンの方は無関係性である事が明示され, 更にこの K⁺-効果の包蔵する意義として

- この効果は, たゞ軽度であるとはいえ, St-S の分離精製法の改善に役立つだろう事, 及び
- St-S が Polyribonucleotide 性であるという見解に立つ時, K⁺存在下における St-S の耐熱現象の発現には St-S 核酸の磷酸部における塩形成は無関係で, むしろ St-S 分子の有機的構成部 (Base, Ribose) に対する K⁺の影響性が関与しているだろう事

の二つが推定されて来た訳である。

III. Ag-St-S-Complex の耐熱性 (100°C, 30分)に及ぼす K⁺の影響についての吟味で, Kalium 塩の存在下では Ag-St-S-Complex はその耐熱性において幾分減殺的影響を蒙るという結果が得られた。

報筆するに当り正印 達博士の御教導を感謝します。

文 献

- Bernheimer, A. W: J. Exp. Med., 92, 129, 1950.
- Shoin, S: Jap. J. Exp. Med., 24, 13, 1954.
- 山本 泰: 十全医学会雑誌, 57, 2200, 1955.
- 有沢和夫: 十全医学会雑誌, 53, 54, 1956.
- 宝達 務: 金沢大学結核研究所年報, 13, (中), 195, 1955.

- 6) 岡本 肇 : 細胞化学 シンポジウム, **3**, 145, 1954. 7) 紺井忠彌 : 十全医学会雑誌, **61**, 137, 1959. 8) 岡本・松田・京田 : 日本薬物学雑誌, **33**, 370, 1941. 9) Bernheimer, A. W : J. Exp. Med., **90**, 373, 1949. 10) 細谷・林・本間・江上・下村・八木 : 基礎と臨床, **3**, 120, 1949. 11) 清水藤太郎 : 薬劑学入門, 95頁, 1955. 12) Miculicich, M : Zentralbl. f. Physiol., **24**, 523, 1910; Höber, R : Physikal. Chemie der Zellen u. Gewebe, 5 Aufl., S. 367~544, 1922. 13) 大西 淳 : 金沢大学結核研究所年報, **10**, (下), 29, 1952. 14) Fruton and Simmonds : General Biochemistry, 2nd Edition 1958, pp. 907.

Abstract

It was reported by Bernheimer in 1950 that K^+ ions have a property to prevent streptolysin-S from thermal inactivation carried out at $50^\circ C$. However, potassium salts employed in his work were confined to KCl and KH_2PO_4 .

The purpose of this paper is to re-investigate and extend the Bernheimer's finding.

The principals of the present work are as follows:

1) In the experiments, in which the solution of streptolysin-S (purified streptolysin-S samples having M.H.C. of 1:6~10 Mill.) in potassium salt to be tested was placed at $37^\circ C$, and then examined by following the hemolytic activity at various intervals of time, it was found that KCl, KBr, KNO_2 , KNO_3 , K_2SO_4 , KJ, KSCN and KH_2PO_4 , were all effective in protecting streptolysin-S from thermal inactivation, whereas NaCl, NaBr, $NaNO_3$, Na_2SO_4 , $Na_2S_2O_3$, $MgCl_2$ and $MgSO_4$, all failed to prevent thermal inactivation.

2) The thermo-stabilizing effect of K^+ could not be expected in the experiment, in which the solution of streptolysin-S in potassium salt was placed at temperature higher than $60^\circ C$ for 30 minutes.

3) In the experiment, in which the solution of Ag-streptolysin-S-complex (M.H.C. = 1:10Mill.) in KCl was heated at $100^\circ C$ for 30 minutes, there was appreciable loss of the hemolytic activity, while the aqueous solution of Ag-streptolysin-S-complex maintained its activity after heating at $100^\circ C$ for 30 minutes.

4) Some discussions were held on the possible mechanism of the thermal stabilization effect of K^+ on streptolysin-S.

Table I
Change in hemolytic activity of streptolysin-S (St-S) in aqueous solution of various salts during the course of incubation at 37°C

Exper. Series	Original St-S (1 : 1,000) solution : 10mg of a purified St-S sample was dissolved in 10ml of	Hemolysis test Time of incu- bation of original St- S solution at 37°C (in hours)	Dilution of St-S									Control (without St-S)	
			200,000 1 : 1	400,000 1 : 1	800,000 1 : 1	1,600,000 1 : 1	3,200,000 1 : 1	6,400,000 1 : 1	12,800,000 1 : 1	25,600,000 1 : 1	51,200,000 1 : 1		
I	0.85% NaCl	0	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	-
		1/2	###	###	###	##	++	±	-	-	-	-	-
		1	###	###	##	++	-	-	-	-	-	-	-
		2	##	++	±	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	1.5% KNO ₃	0	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	
		1/2	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	
		1	###	###	##	++	+	±	-	-	-	-	
		2	###	###	++	++	+	-	-	-	-	-	
		4	##	##	++	+	-	-	-	-	-	-	
		8	##	++	+	-	-	-	-	-	-	-	
		24	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
III	2.2% KH ₂ PO ₄ (neutralized with K ₂ HPO ₄)	0	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	
		1/2	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	
		1	###	###	##	++	+	±	-	-	-	-	
		2	###	##	++	+	-	-	-	-	-	-	
		4	##	++	+	±	-	-	-	-	-	-	
		8	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
		24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IV	Phosphate-buffered Ringer's solution (pH 7.2)	0	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	
		1/2	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	
		1	###	###	##	++	+	±	-	-	-	-	
		2	###	##	++	+	-	-	-	-	-	-	
		4	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	
		8	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
V	Distilled water	0	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	
		1/2	###	###	###	##	++	±	-	-	-	-	
		1	###	##	++	+	-	-	-	-	-	-	
		2	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
		4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Hemolysis test : In testing hemolytic activity, 0.85% NaCl solution was used as the medium, unless otherwise stated; i. e., 1ml of 1% washed rabbit's red cell suspension (in 0.85% NaCl) was added to each of 1ml of the graduated solutions of St-S to be examined. The tubes were placed in an incubator at 37°C for 2 hours. Reading taken after standing overnight in an ice box.

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

Table II

Effect of Na⁺, K⁺ and Mg⁺⁺ on stability of streptolysin-S at 37°C

Preparation of original St-S solution :

- a) 10mg of a purified St-S sample was dissolved in 10ml of isotonic solution of salt to be examined, the concentration of the St-S sample was thus 1 : 1,000.
 b) To 0.1ml of the 1 : 1,000 St-S solution was added 9.9ml of isotonic solution of the same salt, thus giving 1 : 100,000 St-S solution.

Kind of salts used for preparing the original St-S solution (in per cent)	Minimum hemolytic concentration in hemolysis test carried out with 1 : 100,000 St-S solution	
	after keeping at 0°C for 4 hours	after placing at 37°C for 4 hours
NaCl (0.85%)	1 : 6,400,000	[1 : 200,000]※
NaBr (2.0%)	1 : 6,400,000	[1 : 200,000]
NaNO ₃ (1.3%)	1 : 6,400,000	[1 : 200,000]
Na ₂ SO ₄ (1.4%)	1 : 6,400,000	[1 : 200,000]
Na ₂ S ₂ O ₃ (2.7%)	1 : 6,400,000	[1 : 200,000]
KCl (1.1%)	1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
KBr (1.8%)	1 : 6,400,000	1 : 800,000
KNO ₂ (1.3%)	1 : 6,400,000	1 : 400,000
KNO ₃ (1.5%)	1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
K ₂ SO ₄ (2.1%)	1 : 6,400,000	1 : 3,200,000
KJ (2.5%)	1 : 6,400,000	1 : 800,000
KSCN (1.5%)	1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
KH ₂ PO ₄ (2.2%)	1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
MgCl ₂ (1.1%)	1 : 6,400,000	[1 : 200,000]
MgSO ₄ (5.9%)	1 : 6,400,000	[1 : 200,000]

※ [1 : 200,000] indicates no hemolysis even in a concentration of St-S 1 : 200,000

Table III

Showing the result of comparative titration of hemolytic activity of streptolysin-S in different hemolysis test media

Expt. Group	Concentration in per cent of salt in original 1 : 100,000 St-S solution	Treatment of original St-S solution	Kind of salt solution employed for		Minimum hemolytic concentration in hemolysis test carried out with the started solution after placing for 4 hrs. at	
			preparing 1% red cell suspension	hemolysis test medium	0°C	37°C
I	1.5% KNO ₃	For control purpose, an aliquot was removed from the original St-S solution and kept at 0°C for 4 hours, and the remaining solution was placed in a 37°C bath for 4 hours. Two solutions were then tested for hemolytic activity	1.5% KNO ₃		1 : 6,400,000	1 : 3,200,000
			0.85% NaCl		1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
	0.85% NaCl		1.5% KNO ₃		1 : 6,400,000	1 : 200,000
			0.85% NaCl		1 : 6,400,000	1 : 200,000
II	1.5% KSCN	For control purpose, an aliquot was removed from the original St-S solution and kept at 0°C for 4 hours, and the remaining solution was placed in a 37°C bath for 4 hours. Two solutions were then tested for hemolytic activity	1.5% KSCN		1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
			0.85% NaCl		1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
	0.85% NaCl		1.5% KSCN		1 : 6,400,000	1 : 200,000
			0.85% NaCl		1 : 6,400,000	1 : 200,000

Table VIb

Experiment on the behavior of streptolysin-S in entirely Na⁺-free but K⁺-containing medium against thermal inactivation carried out at 37°C

Preparation of original St-S solution

- 1) 5mg of Na⁺-free St-S sample was firstly dissolved in 5ml of isotonic solution of a potassium salt to be examined by adding 5 drops of 0.01% K₂CO₃, and this solution was further diluted with the isotonic solution of the same potassium salt to give a dilution of the St-S sample 1 : 100,000.
- 2) 5mg of Na⁺-free St-S sample was dissolved in 5ml of 0.85% NaCl by adding 5 drops of 0.01% Na₂CO₃, and this solution was further diluted with 0.85% NaCl to give a concentration of the St-S sample 1 : 100,000.

Kind of salts used for preparing the original solution of Na ⁺ -free St-S sample (in per cent)	Minimum hemolytic concentration after placing for 4 hours at	
	0°C (control)	37°C
KNO ₃ (1.5%)	1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
K ₂ SO ₄ (2.6%)	1 : 6,400,000	1 : 800,000
KCl (1.1%)	1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
KSCN (1.5%)	1 : 6,400,000	1 : 3,200,000
KBr (1.8%)	1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
KJ (2.5%)	1 : 6,400,000	1 : 1,600,000
NaCl (0.85%)	1 : 6,400,000	[1 : 200,000]

Table VII

Experiment on the heat-stability of Ag-streptolysin-S-complex in KCl solution
Ag-St-S-complex was prepared according to the method described by Shoin.

Original solution	Treatment of original solution	Dilution of Ag-St-S-Complex or St-S								
		200,000	400,000	800,000	1,600,000	3,200,000	6,400,000	12,800,000	25,600,000	51,200,000
10mg Ag-St-S-complex in 10ml of 1.1% KCl	100°C, 30'	###	###	###	##	+	±	-	-	-
	0°C, 30'	###	###	###	###	##	##	+	-	-
10mg Ag-St-S-complex in 10ml of distilled water	100°C, 30'	###	###	###	###	##	+	±	-	-
	0°C, 30'	###	###	###	###	##	##	+	-	-
10mg St-S sample in 10ml of 1.1% KCl	100°C, 30'	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0°C, 30'	###	###	###	###	##	##	+	-	-