

溶連菌の Streptolysin S 産出能に対する菌毒力 (Virulence) の無関係性についての実験的研究

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本 肇教授)

中 永 金 弥

(昭和32年7月25日受付)

Some Experiments Showing the Non-Correlation between Streptolysin-S Producing Ability and Virulence of Hemolytic Streptococci

KINYA NAKANAGA

*Department of Pharmacology, School of Medicine,
Kanazawa University*

(Director : Prof. Dr. Hajime Okamoto)

Marmorek¹⁾ が連鎖状球菌類の中に赤血球溶解毒 (Streptolysin) を産出するもの、即ち溶血性連鎖状球菌の存在を発見し、本菌の溶血性と毒力 (Virulence) との間には関係があると発表したのは1895年のことである。爾来年を経ること60有余年——尤もこの間には溶血毒形成は本菌の毒力に密に関係するとした M'Leod (1911—12年)²⁾ の報告、両者間には何等関係がないとした Gminder (1912年)³⁾ の報告、或る程度の関係があり得るとした Schottmüller (1903—10年)^{4), 5)}、Lyll (1914年)⁶⁾、金井 (1920年)⁷⁾ 等の記載はあるが、何れも1938年 Todd^{8), 9)} によつて本菌の産出する溶血毒は単一でなく Oxygen-labile Streptolysin O (St-O) と Oxygen-stable Streptolysin S (St-S) の2種があることが指摘される迄のものであつて、上記各研究者の成績が果して St-S と St-O の何れを意

味したものかは知るに由なく——溶血毒産出能と毒力との関係如何の問題は、本菌に因する幾多の疾患に鑑みて重要視されながらも、未だこれに対する明確なる実証がもたらされていない。

私は従来培養法によつて本問題に対する考查を行つたのでは、溶血毒の産出が甚だしく僅微であるため、実験成績に対する明確なる判断は到底期待し得べくもない処であろうとなし、茲にさきに岡本教授によつて発見された「リボ核酸による溶連菌の Streptolysin S 増産現象」^{10), 11)} に基き、改めて本問題についての考查を進めた処、以下記載する如く、少なくとも Streptolysin S 産出能に関する限り、これとマウスに対する毒力とは無関係のものであると断じ得る証査を得た。

I. 強毒力溶連菌と無毒力溶連菌についての St-S 産出能の比較実験

本項では先ず強毒性の溶連菌 Sv-株とこれをブイヨンに継代培養中突然毒力の消失を来たした Sa-株とについて、Streptolysin S 産出能に差異あるかを検して得た成績を記載する。

A. 培養法における試験

実験方法

1) 菌株：

a) 強毒力溶連菌 Sv-株：

本菌株は20数年来当教室においてマウス通過、

マウス脾臓の乾燥保存、ブイヨン培養等を続けて保存された菌株 (即ちこれ迄単に“S”-株と呼称して来たもの) であつて、その普通ブイヨン24時間培養の1千万倍稀釈液0.5ccの腹腔内注射はマウスを24~48時間内に菌血症のもとに致死せしめる。

b) 無毒力溶連菌 Sa-株：

本菌株は前記の強毒力 Sv-株をブイヨンに継代培養中に分離せられたもので、その無毒性は

恒定しておりマウス通過でも毒力の増強復帰を来たさず、而も普通ブイオン中での発育は Sv-株におけると同様甚だ良好であるにかかわらず、その24時間培養液の2倍希釈液 0.5cc の腹腔内注射でもマウスは全く健全に生存するという程の無毒力さである。

2) 培養法 :

a) 培地 :

普通ブイオン, pH=7.6

1%酵母核酸加ブイオン, pH=7.6

(調製法は岡本等の方法¹⁰⁾による)

b) 実験術式 :

i) 1%核酸加ブイオン (pH 7.6) の 5cc に対し Sv-株の普通ブイオン 20 時間培養液の 1 滴を、又

ii) 1%核酸加ブイオン (pH 7.6) の 5cc に対し Sa-株の普通ブイオン 20 時間培養液の 1 滴を

移植した後、37°C で 30 時間培養する。両培養液を同時に遠心 (3,000 r.p.m., 15分) して上清液と沈渣 (菌体) に分別し、夫々について次の実験を行う :

i) 上清液の溶血力試験

被検上清液の生理的食塩水 (0.85%) による倍下希釈液各 1cc に対し 1%家兎赤血球浮游液 1cc 宛を加え、振盪・混和した後 37°C, 2 時間に静置して成績の判読を行う。

ii) 沈渣 (菌体)

沈渣に普通ブイオン 5cc (即ち原培養液量) を加え、充分に振盪して菌を浮游せしめ、この菌浮游液から普通ブイオンで十進法による希釈液列を調製する。次いで各希釈液の 0.5 cc 宛をマウス (17-20g) の腹腔内に注射し、試獣の菌血症による生・死如何を観察する。

実験成績

第 I A 表に示したように、強毒 Sv-株の 1%核酸加ブイオン培養の上清液では 1:25,600 の高希釈液迄溶血作用があり、而も無毒力 Sa-株における実験でも亦上清液はこれと同様の溶血力価 (1:25,600) を有する。

他方、夫々の菌沈渣を以つてマウスに対する毒力試験を行つた実験では、第 I B 表の如く、Sv-株では菌浮游液の 1:10,000,000 液、0.5cc の注射でもマウスは菌血症のもとに斃死しておるに対し、Sa-株では菌浮

游液の 1:2 液、0.5cc の注射でもマウスは生存している。即ち

- 1) Sv-株と Sa-株の 1%核酸加ブイオン培養における Streptolysin S 産出度は全く同等であること、
- 2) Sv-株は依然その強毒性を保持し、Sa-株は無毒力性であり、この性質が本実験の前後で変つていないこと、
- 3) 従つて菌毒力の著大なる相違にも不拘、その 1%核酸加ブイオン培養における Streptolysin S 産出度は全く同等であり、その間に些の差異もないことを知る。

処で、第 II 表は比較考査に資すべく、Sv-株と Sa-株について、夫々の普通ブイオン 30 時間培養における Streptolysin S 産出能と毒力との関係を考査した成績を示したものであつて、本表においては

- 1) 培養上清液の溶血限界濃度は Sv-株では 1:5, Sa-株では 1:5~10 で、この両者間の差異は全く実験誤差の範囲であること、
- 2) Sv-株のマウスに対する最少致死量は 1:10 Mill., 0.5cc であるに対し、Sa-株は 1:2, 0.5cc でも無毒力であること

に注目すべきであらう。

そして、本表と第 I 表の成績を対比することによつて核酸による St-S 産出の増進が、Sv-株と Sa-株とでは同程度 (即ち 1%核酸加ブイオン培養では普通ブイオン培養の 5,000 倍) に起つていることが知られよう。

B. 静菌法における試験

実験方法

静菌状態溶連菌の St-S 産出実験は伊藤等¹⁰⁾の方式に準じた。即ち

1) 濃厚菌浮游液の調製 :

Sv-株及び Sa-株について、夫々の普通ブイオン 20 時間培養液 100cc を遠心して菌沈渣を得。次いでこの菌沈渣を、3 回生理的食塩水で洗滌した後、磷酸緩衝-Ringer 液、(pH 7.2), [PBR] 5cc に浮游せしめる。勿論濃厚菌浮游液は実験の直前に調製する。

2) 実験術式

先ず 3 本の試験管に夫々の内容が

- i) (Sv-Suspension, 1.0cc + PBR, 0.8cc + 10% RNA-Na Solution, 0.2cc),
- ii) (Sa-Suspension, 1.0cc + PBR, 0.8cc + 10% RNA-Na Solution, 0.2cc),

iii) [PBR, 1.8cc+10% RNA-Na Solution 0.2 cc].

なる混液を調製する。次いで各管を一斉に 37°C, 2 時間静置した後, 各内容を遠心沈澱に附し上清液と菌沈渣に分別する。

(第iii管では菌沈渣はない)。

斯くして

- a) 上清液は溶血力の比較試験に, 又
- b) 菌沈渣はマウスに対する毒力試験に附す。

この場合菌沈渣に対しては, これを先ず普通ブイヨン 2.0cc (即ち元の混液量に該当) に一旦浮游せしめ, 然る後この菌浮游液から, 型の如く, 十進法による稀釈液を調製し, 各稀釈液の 0.5cc 宛

をマウスの腹腔内に注射する。

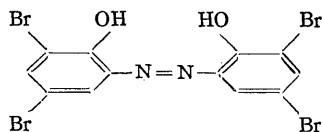
実験成績

第Ⅲ A. B 表はその一実験例を示したものであつて, ここでは

- 1) 上清液は, Sv-株における実験たると, Sa-株における実験たるとを不問, 何れも 1:1,024 液迄溶血作用を呈している。そして,
 - 2) 菌沈渣の毒力試験では, Sv-株にあつてはそのマウスに対する最少致死量=1:10 Mill., 0.5cc なるに對し, Sa-株にあつてはその 1:2, 0.5cc がマウスに對し全く無害である。
- という成績である。

Ⅱ. 2,2'-Dihydroxy-3,3':5,5'-tetrabromoazobenzene による 強毒力溶連菌の Streptolysin 産出能と毒力との離解実験

前項の実験ではマウスに對し強毒性である溶連菌株 (Sv) とその変異無毒株 (Sa) を使用して, 溶連菌の St-S 産出能に對しては菌毒力は直接的關係がないことの証明が齎されたのであるが, ここには当然「若し St-S 産出能と毒力とが無關係性のものならば, 溶連菌でありながら, St-S 産出能が異なる」という逆の場合があり得ることが推想されよう。即ちこれに關聯するものとして本項ではさきに伊藤等¹²⁾によつて見出された溶連菌の St-S 産出に對する強力なる抑制物質 2,2'-Dihydroxy-3,3':5,5'-tetrabromoazobenzene (以下 4 BrDO と略記) を以つて, 強毒溶連菌のマウスに對する毒性を損滅せしめることなく St-S 産出を高度に抑圧せしめ得た実験成績について記載する。



2,2'-Dihydroxy-3,3':5,5'-tetrabromo-
azobenzene (4 BrDO)

実験方法

- 1) 溶連菌: 強毒力 Sv-株を使用。
- 2) 4 BrDO の原液調製:
4 BrDO の純品 10mg を秤取し, N/10 NaOH を滴下して蒸溜水 10cc に溶解せしめ, これに對し 100°C, 30' の処置を施したものを原液 (1:1,000; 濃褐色) とす。

3) 実験術式:

4 BrDO を一定濃度に含む〔濃厚菌浮游液 1.0cc+磷酸緩衝-Ringer 液 0.8cc+10%核酸原液 0.2cc〕-混液を調製し, 37°C に 2 時間静置した後, 遠心して上清液と菌沈渣に分別す。勿論対照として 4BrDO を含まない単なる〔濃厚菌浮游液 1.0cc+磷酸緩衝-Ringer 液 0.8cc+10%核酸原液 0.2cc〕-混液の実験を併行せしめた。

而して各上清液についてはその溶血力の比較実験を行う, 菌沈渣については型の如くマウスに對する毒力試験を行う。なお 4 BrDO によつて菌体が褐色調に染色されているので, 各菌沈渣については, その 1 滴を載物ガラス上に置き鏡見による着色度を観察した。

先ず伊藤等の記載に準じて 4 BrDO の Sv-株の St-S 産出に及ぼす影響度を調べた所, 第 IV 表に示したように本物質は 1:10 Mill. の高稀釈度でもなお St-S 産出に對し抑制的であることを知つたので, その中等度の濃度たる 1:100,000 液及び 1:500,000 液の二つを選んで, これら濃度の 4 BrDO 液の存在下で強毒 Sv-株の St-S 産出能と毒力とが如何に影響されるかの実験を行うこととした。即ちこの実験では, 第 V 表に示した如く,

- 1) 何ら 4 BrDO を含まない〔濃厚菌浮游液 1.0cc+磷酸緩衝-Ringer 液 0.8cc+10%核酸原液 0.2cc〕メヂウムにおける対照実験では, 上清液は 1:1,024 の稀釈度迄溶血作用を呈してをり, 而も菌のマウスに對する毒力試験では最少致死量=1:10 Mill., 0.5

cc である。これに対し

2) 4 BrDO 1:500,000 を含んだメジウムにおける実験では、菌の毒力は前記対照実験におけると変りはなく最少致死量=1:10 Mill., 0.5cc であるが、上清液の溶血力価は僅々 1:64 (即ち対照の $\frac{1}{16}$) に過ぎない、而して

3) 4 BrDO 1:100,000 を含んだメジウムの実験では、菌の毒力は著しく低下して最少致死量=1:1,000, 0.5cc (即ち対照の $\frac{1}{10,000}$ 程度) であり、同時に上清液の溶血力価も微弱で溶血限界濃度=1:4 (即ち対照の $\frac{1}{256}$) に過ぎない

という成績が得られた。

処で、ここに St-S 産出と毒力とが共に低下した(3) 実験の成績からだけでは恰も St-S 産出能と毒力とが 4 BrDO によつて平行的に侵襲されるようにも思われるが、毒力に些の低下もなくただ St-S 産出だけが低下している(2) 実験の成績は 4 BrDO が毒力よりも St-S 産出能に対してより強力侵襲性であることの表示と解されよう。兎に角、このように 4 BrDO によつて毒力と St-S 産出能とが離解した(2) 実験の成績は、菌毒力が同等であつても St-S 産出能が必ずしも同一でない場合のあることを暗示しているのであつて、甚だ重視すべき処といえよう。

結

本研究では溶連菌の Streptolysin S 産出が核酸加メジウムで高度であることを利用して、マウスに対する毒力の強大である溶連菌株 (Sv) とその無毒力化した変異株 (Sa) を使用し、溶連菌における Streptolysin S 産出能と菌毒力との関係如何の問題に対し考查された。

その成果の要点を略記せば次の如くである：

1) 強毒力菌株たるとその無毒力化変異株たるとを問わず、その Streptolysin S 産出能が同等であることを、1%核酸加ブイオン培養実験、1%核酸加メジウムを用いる静菌状態溶連菌の Streptolysin S 産出実験、並びに普通ブイオン培養実験によつて確か

文

- 1) Marmorek, A. : Ann. Inst. Pasteur, 9, 593, 1895. 2) M'Leod, J. W. : Path. Bact., 16, 321, 1911-12. 3) Gminder :

* * *

以上の諸成績を綜合考察すると「溶連菌の St-S 産出能とマウスに対する毒力(毒性)との間には直接的関係がない」ということにならう。しかし一般に細菌の動物に対する毒力と人体に対する毒力或いは病原性(Pathogenicity)との間には同一に論ぜられないものがあるとせられており¹³⁾、又溶連菌は少なくとも Fibrinolysin (Streptokinase), Erythrogenic Toxin (Dick Toxin), Streptolysin-S, Leucocidin (Streptolysin O), Streptodornase (Desoxyribonuclease), Proteinase 等諸他の毒素並びに酵素類¹⁴⁾を産出しているといつた複雑な事情もあることであるから、今回のような単純化された条件下での実験で得られた成果を以つて直ちに実地臨床上における溶連菌感染症の場合に普適することには聊か無理があると思われる。

とはいえその反面には又 St-S 産出能は菌感染を起すことには意義は少なく、一旦感染した後初めて生体はその影響——生体細胞における Ribo-核酸系の混乱、核酸の犠牲によつて化成した St-S による貧血^{11), 12)}——を受けるのでないかという考え方も成り立つ訳である。

論

め得た。

- 2) 強毒力溶連菌において、2,2'-Dihydroxy-3,3' : 5,5'-tetrabromoazobenzene が菌毒性に対するよりも Streptolysin S 産出能を強く侵襲し、本物質の適当濃度液の作用下で菌毒力は不変で Streptolysin S 産出のみに著しい低下が起ることを 1%核酸加メジウムを用いる静菌状態溶連菌の Streptolysin S 産出実験で証明し得た。
- 3) 斯くて、溶連菌においてはその Streptolysin S 産出能とマウスに対する毒力との間には直接的関係がないと論結されるに至つた。

献

- cited from Zentr. of Bakteriologie, 1912. 4) Schottmüller, H. : Münch. med. Wochenschr., 50, 848, 1903. 5) Schottmüller, H. :

- Münc. med. Wochenschr., 57, 617, 1910.
- 6) Lyall, H. W. : J. Med. Research., 30, 487, 1914. 7) 金井 : 細菌学雑誌, 299, 459, 1920. 300, 553, 1920. 8) Todd, E. W. : J. Path. Bact., 47, 423, 1938.
- 9) Todd, E. W. : J. Hyg., 39, 1, 1939.
- 10) 岡本 : 細胞化学シンポジウム, 3, 146, 1954. 11) 岡本 : 細菌毒素シンポジウム, 1, 94, 1955. 12) Ito, R., Okami, T., Yoshimura, M. and Sagara, S : Japan. Med. J., 1, 260, 1948. 13) Zinsser's Textbook of Bacteriology 9th Ed. 138, 1948.
- 14) Dubos, R. J. : Bacterial and Mycotic Infections of Man. 276, 1952.

Table I

Culture Experiment on the Ability of Virulent and Avirulent Hemolytic Streptococci to Produce Streptolysin S in Broth Containing Sodium Yeast Ribonucleate

The virulent strain of Streptococcus hemolyticus, designated Sv, and an avirulent mutant of this strain, designated Sa, were used.

5cc. of 1% RNA-broth (pH 7.6) was inoculated with one drop of a 20-hour broth-culture of the Sv, and 5cc. of 1% RNA-broth (pH 7.6) with one drop of a 20-hour culture of Sa.

After incubating for 30 hours at 37°C., each culture was centrifuged to obtain a clear supernatant and a cocci sediment.

(A) Comparative Hemolysis Test with Sv- and Sa-Supernatants

Serial dilution method was employed : 1cc. of 1% washed rabbit's red cells suspension was added to 1cc. of the diluted supernatant.

The results were read after placing the tubes at 37°C. for 2 hours.

Culture medium	Supernatant of	Dilution of supernatant										Control (without supernatant)	
		200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800	25,600	51,200	102,400		204,800
1% RNA-broth	Sv-culture	###	###	###	###	##	##	++	+	-	-	-	-
	Sa-culture	###	###	###	###	##	##	++	+	-	-	-	-

Remarks : ### = Complete hemolysis ;
 ##, ++, +, ± = Partial hemolysis ;
 - = No hemolysis.

(B) Comparative Virulence Test with Sv- and Sa-Cocci Sediments

The cocci sediment was resuspended, with vigorous stirring, in 5cc. of ordinary broth. The cocci suspension thus obtained was then diluted with broth serially. A 0.5cc. dose of the cocci dilutions was injected into the peritoneal cavity of a white mouse.

Culture medium	Cocci sediment of	Dilution of cocci suspension															
		2	5	10	20	50	100	200	500	1,000	10,000	100,000	1Mill.	10Mill.	100Mill.	1,000Mill.	
1% RNA-broth	Sv-strain	†	†	†	†	†	†	†	†	†	0	0
	Sa-strain	0	0	0	0	0	0	0	0

Remarks : † = Died of streptococcal septicaemia ;
0 = Lived.

Table II

Culture Experiment on the Ability of Sa- and Sv-Strains of Hemolytic Streptococci to Produce Streptolysin S in Ordinary Broth

Broth culture of	Comparative hemolysis test with supernatants							Comparative virulence test
	Dilution of supernatant							Minimum lethal dose for mice of cocci
	2	5	10	20	50	100	200	
Sv-strain	++	+	-	-	-	-	-	1 : 10 Mill., 0.5cc. i. p.
Sa-strain	++	++	+	-	-	-	-	1 : 2, 0.5cc. i. p. was found to be not lethal for mice

Table III

Resting Cells System Experiment on the Streptolysin S Producing Ability of Hemolytic Streptococci in Relation to their Virulence

1) Thick cocci suspension :

100cc. of a 20-hour broth culture of the Sv-strain (or Sa-mutant) was centrifuged. The sedimented cocci, after washing three times with Ringer's solution, were suspended in 5cc. of phosphate-buffered Ringer's solution (PBR, pH 7.2).

2) Streptolysin S production in resting cells system :

Three test-tubes of following constituents were set up :

i) (Sv-suspension, 1.0cc. + PBR, 0.8cc. + 10% RNA-Na solution, 0.2cc.)

ii) (Sa-suspension, 1.0cc. + PBR, 0.8cc. + 10% RNA-Na solution, 0.2cc.)

iii) (PBR, 1.8cc. + 10% RNA-Na solution, 0.2cc.)

After placing at 37°C. for 2 hours, the content of each tube was centrifuged to obtain a clear supernatant and a cocci sediment.

(A) Hemolysis Test with Supernatant

Strain used	Experim. No.	Dilution of supernatant											Control (without supernatant)
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	
Sv	i	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
Sa	ii	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
Control (without cocci)	iii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(B) Virulence Test with Cocci Sediments

The cocci sediment was resuspended in 20cc. of broth (corresponds to original culture volume), and then diluted with broth serially.

One mouse received intraperitoneally a 0.5cc. dose of the cocci dilutions.

Strain used	Experim. No.	Dilution of cocci suspension														
		2	5	10	20	50	100	200	500	1,000	10,000	100,000	1Mill.	10Mill.	100Mill.	1,000Mill.
Sv	i	•	•	•	•	•	†	†	†	†	†	†	†	†	0	0
Sa	ii	0	0	0	0	0	0	0	0	•	•	•	•	•	•	•

Table IV
 Experiment on the Inhibitory Effect of 2,2'-Dihydroxy-3,3':5,5'-Tetrabromoazobenzene
 (4BrDO) against the Streptolysin S Formation by Resting Cells

Test-tube No.	1	2	3	4	5	6	
Concentration of 4BrDO (Na-salt) in 2cc. of resting cells system	1 : 50,000	1 : 100,000	1 : 500,000	1 : 1,000,000	1 : 10,000,000	Control (without 4BrDO)	
After standing for 2 hours at 37°C., each content was centrifuged : 1) The clear supernatant was tested for hemolytic power. 2) The sediment (cocci) was microscopically examined for brownish coloration of bacterial body.							
↓							
Dilution of supernatant in hemolysis test	1 : 2	±	++	###	###	###	###
	1 : 4	—	+	###	###	###	###
	1 : 8	—	—	###	###	###	###
	1 : 16	—	—	###	###	###	###
	1 : 32	—	—	##	##	###	###
	1 : 64	—	—	++	##	###	###
	1 : 128	—	—	+	++	##	###
	1 : 256	—	—	—	+	++	##
	1 : 512	—	—	—	—	+	++
	1 : 1,024	—	—	—	—	—	+
	1 : 2,048	—	—	—	—	—	—
1 : 4,096	—	—	—	—	—	—	
Brownish coloration of bacterial body	{##}	{++}	{+}	{+}	{—}	{—}	

Resting cells system = (thick cocci suspension, 1.0cc. + phosphate-buffered Ringer's solution (pH 7.2), 0.8cc. + 10% RNA-Na solution, 0.2cc.)

Table V
Experiment on the Influence of 4BrDO upon Streptolysin S Producing Ability and Virulence of Virulent Hemolytic Streptococci in Resting Cells System

After standing for 2 hours at 37°C., the [1.0cc. of thick Sv-suspension + 0.8cc. of phosphate-buffered Ringer's solution + 0.2cc. of 10% RNA-Na solution]—mixture containing the stated concentration of 4BrDO was centrifuged. The clear supernatant thus obtained was tested for hemolytic power on the one hand, and the sediment (cocci), after being resuspended in 20cc. of broth, was tested for virulence and examined microscopically for brownish coloration of bacterial body on the other.

Test		4BrDO concentration in resting cells system		Control (without 4BrDO)	
		1 : 100,000	1 : 500,000		
Hemolytic power	Dilution of supernatant	1 : 2	++	###	###
		1 : 4	+	###	###
		1 : 8	—	###	###
		1 : 16	—	##	###
		1 : 32	—	++	###
		1 : 64	—	+	###
		1 : 128	—	—	##
		1 : 256	—	—	##
		1 : 512	—	—	++
		1 : 1,024	—	—	+
		1 : 2,048	—	—	—
1 : 4,096	—	—	—		
Virulence	Dilution of cocci suspension	1 : 100	†	†	†
		1 : 1,000	†	†	†
		1 : 10,000	0	†	†
		1 : 100,000	0	†	†
		1 : 1Mill.	0	†	†
		1 : 10Mill.	0	†	†
		1 : 100Mill.	0	0	0
Microscopic examination of bacterial body	Grade of brownish coloration	{++}	{+}	{—}	