

Ag-Streptolysin S-Complex についての脱銀試験

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本肇教授)

大 門 弘 文

(昭和31年9月4日受付)

A Study for Removing the Silver from Ag-Streptolysin S-Complex

Hirofumi Daimon

*Department of Pharmacology, School of
Medicine, Kanazawa University, Japan
(Director : Prof. Dr. Hajime Okamoto)*

緒 言

最近当研究室において、偶々 AgNO_3 溶液を加えた酵母核酸或いは精製 Streptolysin S 水溶液では NaCl を追加しても AgCl の沈澱が起らないことが観察せられ、これに端を発して核酸化学並びに Streptolysin S 研究に新展開を予想せしめる重要な知見が齎された。

即ち、その一は清水^{1),5),6)}による「核酸には Ag^+ と結合して錯塩を形成する性能があり、この Ag-核酸(或いは精製 Streptolysin S) 結合の量的関係は核酸(或いは精製 Streptolysin S) 1mg : Ag 0.16mg の量的関係である」という化学的方面における実証であり、その二は正印等^{2),3),4),5),6)}による「Streptolysin S は銀塩によつて完全に耐熱化状態となる、そしてこれは Ag-Streptolysin S-Complex 形成による」という生物学的方面における研究である。ところで、清水⁷⁾はその後、銀-核酸-錯塩 (Ag-RNA-Complex) の性状に関して、この錯塩はアンモニア-アルカリ性において H_2S を通ずることによつて完全脱銀の目的を達し、而もこの場合高度に純化した RNA 標品を収得し得るといふ点まで考査の歩を進めたのであるが、しからば Ag-Streptolysin S-Complex に対し果して脱銀によつて活性の Streptolysin S を収得し得るもの

であろうか。このことは Streptolysin S の精製法の改善、本質問題等に関連せしめて甚だ重要な意義を有すと考えられるのであるが、既に報告されているように Streptolysin S は水溶液状態においては極めて易熱性^{1),2)}であるばかりでなく酸・アルカリに対しても不安定^{3),5)}であつて非働化され易いこと、及び最近伊藤(佐)⁴⁾によつて Ag-Streptolysin S-Complex は Cysteine, Thioglicolic acid, 黄血塩, チオ硫酸ソーダ等の還元剤に対して抵抗弱く、容易に溶血性を喪失するに至ることが実証されていることに鑑みても、Ag-RNA-Complex に対して行われた脱銀方式をそのまま Ag-Streptolysin S-Complex に適用し得ないことは明白といえよう。即ち私は前記清水の Ag-RNA-Complex に対するアンモニア-アルカリ性飽和食塩水溶液において H_2S を通ずる脱銀方法に基いて、その実験条件に色々と吟味考査を加えることによつて、遂に Ag-Streptolysin S-Complex から——生物学的活性(即ち溶血性)においてある程度の損減は免れなかつたといへ——完全に脱銀され、而も赤血球に対して Streptolysin S 特異の溶血性を發揮する標品を分離する方法を見出すに至つた。以下その成績を報告する。

I. 実験材料

1. 精製 Streptolysin S :

本研究では専ら溶連菌の1%酵母核酸加ブイオン30

時間培養の上清液から岡本¹⁰⁾, 正印等²⁾の方法に準じて分離精製した I-N-F-Streptolysin S-Fraction

(岡本等の I β_1 -Fraction にあたる)を使用した。この I-N-F-Streptolysin S-Fraction (以下これを単に I-N-F-Fraction 或いは精製 St-S と略記す)の性状の要点を記すれば次の如くである：

- a) 類白色無晶形粉末，水に易溶（水溶液は中性）。アルコール，エーテル不溶。鉍酸沈澱性，アルカリ可溶。Orcinol 反応 陽性。Feulgen 反応 陰性。10%水溶液では Ninhydrin 反応 微陽性¹¹⁾。
- b) 生理的食塩水をメヂウムとする試験管内溶血試験 * では 1 : 12,800,000 の高稀釈度（溶血限界濃度 = 1 : 12,800,000）まで溶血作用を発揮する。1%水溶液に対する 100°C, 10分の加熱処置でも完全に溶血力を失う（即ち易熱性）。Trypan blue 1 : 40,000~80,000 を含有する生理的食塩水をメヂウムとする溶血試験では，本精製 St-S 1 : 200 液によつても全く溶血が起らない。即ち Trypan blue によつて拮抗される⁸⁾。
- c) 本精製 St-S の銀⁺との 錯塩形成能は 1 : 1,000 I-N-F-Fraction 10cc : N/10 AgNO₃ 0.15cc の量的関係である。

2. Ag-Streptolysin S-Complex :

前記の糖製 St-S から正印²⁾の記載に従つて Ag-Streptolysin S-Complex を調製した。即ち I-N-F-Fraction 400mg を蒸留水 40cc に溶解したものに N/10 AgNO₃ 6.04cc を加える。次いでこの溶液に冷アルコール 120cc と錯酸ソーダアルコール溶液 2cc を加う。20分放置の後，沈澱物を遠心分離し，これに純アルコールをもつての洗滌 2回，エーテル洗滌 1回を施した後，減圧乾燥器内に納む。

收量 350mg, その性状：

灰白色無晶形粉末，水に易溶。鉍酸沈澱性，アルカリ可溶。アルコール，エーテルに不溶。Orcinol 反応 陽性。Feulgen 反応 陰性。10%水溶液では Ninhydrin 反応 微陽性。銀含量 13.5% (灰化法)。溶血限界濃度 = 1 : 12,800,000

この Ag-Streptolysin S-Complex の 1% 水溶液に対し 100°C, 30分の処置を施しても全然溶血力に減弱を来すことなく依然として 1 : 12,800,000 の溶血値を保持す（即ち耐熱性）。Trypan blue (1 : 40,000~80,000) 含有生理的食塩水をメヂウムとする溶血試験では，溶血限界濃度 = 1 : 80,000 の値（即ち銀⁺による溶血限界）迄低下する。

II. Ag-Streptolysin S-Complex に対する脱銀実験

清水は銀-Ribo 核酸-錯塩(Ag-RNA-Complex) に対しこれをアンモニア-アルカリ性飽和食塩水溶液として H₂S を通ずることによつて，完全脱銀の目的を達したのであるが，Ag-Streptolysin S-Complex を対象とする本研究では，単に完全に脱銀し得さえすればよいという Ag-RNA-Complex における実験と異り，完全に脱銀されており而も Streptolysin S 特有の生物学的特性（即ち溶血性）を具有している標品の把握が要請されているのである。即ち

- a) Ag-Streptolysin S-Complex は耐熱性²⁾であるが，Streptolysin S は水溶液状態では極めて熱に対して不安定であり，常温においてすら容易に非働化されるのであるから，総ての操作を氷冷下において行うこと，及び
- b) Streptolysin S は又酸，アルカリ等に対しても不安定⁶⁾であることから可及的緩やかな実験条件を選ぶ

こと，

の 2 点に留意して種々考査した訳である。次に第 Ia 表提示の実験例について脱銀操作における要点を述べることとする。即ち

- 1) 1% Ag-Streptolysin S-Complex 水溶液 ** 100cc を氷冷し，これに先ず 5%アンモニア溶液 2.5cc を加えてから飽和食塩水 20cc を追加する（アンモニア水と飽和食塩水を加える順序を逆にすると，次の H₂S 処理による反応が不完全であり，又アンモニア-アルカリ性としないと脱銀は完全に行われぬ）。
- 2) かくして得た Ag-Streptolysin S-Complex のアンモニア-アルカリ性飽和食塩水溶液に対し，氷冷下で H₂S-Gas を 10~20分間通ず（H₂S-Gas は既述の実験条件下では少なくとも 10分を通ずる必要がある）。黒褐色の沈澱を多量に生起する。
- 3) 遠心沈澱によつて得た帯黄色透明なる上清液に対

* 溶血試験は当教室慣用の方法に準じた^{10), 12)}。

** 1% I-N-F-Streptolysin S-Fraction 100cc に対し N/10 AgNO₃ を 15cc の割に加えると直に Ag-Streptolysin S-Complex が化成されるのであつて，この溶液に対し直接以下のような脱銀操作を施しても同様の結果が得られる。

し、 H_2S 臭の無くなるまで空気を通じた後、セロファン囊 (No. 300) に納めて氷室中において20時間蒸溜水 (1回の蒸溜水 600cc 宛とし3, 4回取換える) を以て透析す。

- 4) 透析内液を一旦 Seitz-E. K. -Filter を通した後、濾液に氷冷した3倍量の98%アルコールと少量の錯酸ソーダーアルコール溶液を加える。直に白色絮状の沈澱が大量に生起する。15分間静置した後、遠心沈澱に附す。
- 5) 遠心によつて分離した沈澱に対しアルコールによる洗滌2回、次いでエーテルによる洗滌1回を施した後、減圧乾燥器内に納む。
- 6) 灰白色無晶形標品 0.6g を收得す。本標品の理・化学的性状についての考査結果は次の通りである：
 - a) 水に易溶 (水溶液は中性)。アルコール、エーテルに不溶。鉍酸沈澱性、アルカリ可溶。Orcinol 反応 陽性、Feulgen 反応 陰性、10%水溶液では Ninhydrin 反応 微陽性。
 - b) 溶血限界濃度 = 1 : 1,600,000 即ち本標品の溶血力は、第Ib表に示した如く、原料 Streptolysin S 並びに Ag-Streptolysin S-Complex (何れも溶血限界濃度 = 1 : 12,800,000) の $\frac{1}{8}$ である。その溶血作用は Trypan blue によつて拮抗され、本標品の 1 : 200 液でも赤血球の溶解が起らなくなる。水溶液状態で加熱すると完全に溶血性を喪失する。
 - c) 本標品の銀 $+$ との錯塩形成能試験は、その 1 : 100 水溶液 10cc に対し N/10 $AgNO_3$ 0.162cc の値を

示した。即ち本標品は原料 St S と同等の銀-錯塩形成能を有する。

d) 灰化法による脱銀確認試験

本標品 20.0mg を磁性坩堝に入れ型の如く灼熱灰化した後、20% HNO_3 0.5cc を加え、蒸溜水を追加して総量 6.0cc の溶液とする。この溶液の 1.0cc に N/100 $NaCl$ 2.0cc を加え、5% K_2CrO_4 2滴を滴下した後、N/100 $AgNO_3$ で滴定したところ N/100 $AgNO_3$ 消費量は丁度 2.0cc であつた。即ち本標品には銀の存在は検出されなかつた。なお、 $AgNO_3$ は試験管内溶血試験でその重量基準で 1 : 320,000 稀釈度迄溶血作用を呈するのであるが、本標品の 1 : 200 液を $100^\circ C$ 、30分間加熱非働化したものについて溶血試験を行なつたところ、1 : 200 自体でも溶血が起らなかつた。即ち本標品には化学的にも生物学的にも銀の存在が絶無であるという結果が得られた訳である。

今本項記載の Ag-Streptolysin S-Complex に対する脱銀操作によつて得た標品と前項記載の原料精製 St-S、及び Ag-Streptolysin S-Complex との性状を対比すると第III表の如くであり、ここに脱銀標品にあつてはその溶血力が原料 Streptolysin S のそれに比して $\frac{1}{8}$ であるという点が異つているだけで、それ以外の諸性質において一致しているということが取られるのであるが、反復して行つたその他の脱銀実験でも総て成績は同様であつた。

III. Ag-Streptolysin S-Complex に対する脱銀実験に伴う Streptolysin S 活性低下の原因についての考査

上述の如く Ag-Streptolysin S-Complex に対する脱銀実験によつて收得される脱銀標品ではその溶血力が原料 Streptolysin S (或いは Ag-Streptolysin S-Complex) に対比して $\frac{1}{8}$ 程度であるということが一体如何なる原因に基くものであろうか。その可能性としては、

- a) 脱銀反応に直接関係したものか、
- b) 実験過程における温度的影響或いはアンモニア-アルカリ性のためであろうか、
- c) 硫化水素又は硫化アンモンの影響によるものか等が考えられよう。兎に角この間の消息を明かにすべく、前記 Ag-Streptolysin S-Complex に対する脱銀実験における諸条件即ち $AgNO_3$ 、アンモニア、飽

和食塩水及び H_2S が、夫々 Streptolysin S 自体の活性に対して如何に影響するかについての分析の実験を行つた。即ち第II表は精製 Streptolysin S (I-N-F-Fraction, 溶血限界濃度 = 1 : 12,800,000) の 0.8% 水溶液 62.5cc を対象として行なつて得た成績を示したものである。

即ち〔E〕欄の 0.8%精製 St-S 溶液 12.5cc に対し、単に蒸溜水 3.77cc を加えて氷室に保存したもの、及び〔D〕欄の 0.8%精製 St-S 溶液 12.5cc に対し蒸溜水 1.52cc、5%アンモニア水 0.25cc、及び飽和食塩水 2.0cc (計 3.77cc) を加えて同じく氷室に保存したもの、及び〔C〕欄の 0.8% St-S 水溶液 12.5cc に蒸溜水 3.77cc を加えたものに H_2S を10分間通じた

後、氷室に保存したものの三者が何れも溶血限界濃度 $=1:12,800,000$ を示していることから、少なくともアンモニア或いは硫化水素は夫々単独では St-S に対し特に有害に作用する所がないことが知られよう。ところが〔A〕欄の 0.8% St-S 溶液 12.5cc に対し N/10 AgNO_3 1.52cc, 5%アンモニア水 0.25cc, 飽和食塩水 2.0cc (計 3.77cc) を加えたものに H_2S を 10 分間通じた溶液から前項記載の如く分離した脱銀標品が溶血限界濃度 $=1:1,600,000$ であり、同様な結果が又〔A〕欄の実験における AgNO_3 の代りに蒸留水を加えた〔B〕欄の実験〔即ち 0.8% St-S 水溶液 1.25cc, 蒸留水 1.52cc, 5%アンモニア水 0.25cc, 飽和食塩水 2.0cc (計 3.77cc) を加えたものに H_2S を 10 分間通じたものから分離〕の標品も亦溶血限界濃度 $=1:1,600,000$ であつて、何れも〔E〕、〔D〕並びに〔C〕欄の溶血力に対し $\frac{1}{8}$ に低下していることから、硫化アンモン自体が St-S に対し有害に影響していることが察知されよう。

なお第 IVa 表は St-S の活性に及ぼす硫化アンモンの影響の時間的關係を追究した実験成績であるが、これによつて少なくとも H_2S の通気が 10 分以上に亘つても大した影響が無いことが知られよう、又第 IVb 表はアンモニア濃度の影響關係を追究した実験成績であつて、これによつて少なくとも St-S の硫化アンモンによる活性の低下はアンモニア濃度によつても大した影響を受けないことが知られよう。

総括並びに結論

本論文では Ag-Streptolysin S-Complex に対し脱銀操作を施して Streptolysin S を活性状態において收得し得る方法について記載した。

ここに本研究における成果の要点を略起すれば次の如くである。

- 1) 脱銀は
 - a) Ag-Streptolysin S-Complex のアンモニア飽和食塩水溶液に対し H_2S を 10~15 分間通ずる。
 - b) 遠心分離によつて得た上清液に対し通気による H_2S の放逐, Seitz-E. K. -Filter による濾過を行なつてから、アルコールによる沈澱を生起せしめる。という過程によるものであるがその要領は
- i) 1% Ag-Streptolysin S-Complex 100cc に対し 5%アンモニア溶液 2.5cc, 飽和食塩水 20cc の割合に加えること、

即ち以上の諸吟味実験の成績から Ag-Streptolysin S-Complex に対しアンモニア-アルカリ性飽和食塩水溶液下で H_2S を通じて脱銀するという実験で溶血力において低下した St-S 標品が收得されることに対して、その原因が直接脱銀反応に関係したのではなく Ag-Streptolysin S-Complex から銀が奪取され、ここに遊離した St-S が二次的に硫化アンモンによる溶血性減弱の影響を蒙ることにあると解し得よう。かく観て来ると Ag-Streptolysin S-Complex の脱銀実験において少なくとも硫化アンモンの化成するような条件下では溶血性における或る程度の損減は免れ得ないものと考えねばならず、ここに当然 Ag-Streptolysin S-Complex \rightarrow Streptolysin S において Streptolysin S の活性に些の損減をも随伴しない脱銀方法ありや否やが問題になつて来る訳である。しかしこのことに関し当研究室において現在まで行われた Cysteine, Thio-glicolic acid, Vitamin C 等諸他の還元性物質を以つてする脱銀試験は何れも未だ完全にその目的を達するには至つていないという現状である。兎に角たとえ溶血力において低下はあるにせよ Streptolysin S の特異溶血性を具備した標品を Ag-Streptolysin S-Complex から收得し得ることが立証された以上、Ag-Streptolysin S-Complex $\xrightarrow{\text{脱銀}}$ Streptolysin S における Streptolysin S 活性の完全保持の問題は最早技術的のものに過ぎないといえようか。

- ii) このアンモニア溶液と飽和食塩水とを加える順序を逆にしないこと、
 - iii) 総ての実験操作を氷冷下で行うこと、
- の三点にある。
- 2) かくして收得される標品には銀の存在は全く証明されない (Ag-Streptolysin S-Complex の銀含量 13.5%)。而して本標品の溶血力はその母体たる精製 Streptolysin S (並びに Ag-Streptolysin S-Complex) に対比して $\frac{1}{8}$ 程度 (溶血限界濃度 $=1:1,600,000$) であるが、
 - a) その生物学的性状 (加熱による溶血性の喪失、並びに Trypan blue による被拮抗性) においても、
 - b) その理・化学的性状においても精製 Streptolysin S のそれに一致する。
 - 3) 精製 Streptolysin S 水溶液に対し単に硫化アン

モンを作用させただけでも溶血力において $\frac{1}{2}$ 程度の低下が起る。即ちこのことは Ag-Streptolysin S-Complex からの脱銀標品がその溶血力において低下を来す原因が銀の脱離という直接的のものでなく、脱銀によつて遊離した Streptolysin S に対す

る硫化アンモンの傷害的影響によるものであろうことを示すものである。

4) 要するに本研究によつて Streptolysin S \rightarrow Ag-Streptolysin S-Complex \rightarrow Streptolysin S という具合に転化する方途が拓けて来た訳である。

文

- 1) 清水隆作 : 薬理学雑誌, 76, 158, 1956.
 2) Shoin, S. : Japan. J. Exp. Med., 24, 13, 1954. 3) 山本泰 : 十全医学会雑誌, 57, 2200, 1955. 4) 有沢和夫 : 十全医学会雑誌, 58, 54, 1956. 5) 岡本肇 : 核酸効果とこれに基づく Streptolysin S 研究の展開, 細胞化学シンポジウム, 3, 145, 1954. 細菌毒素シンポジウム, 1, 94, 1955. 6) 岡本肇 : 細菌学の新領域, 106, 1953. 7) 清水隆

献

- 作 : 原著は近く発表. 8) 伊藤亮 : 日本薬理学雑誌, 28, 41, 1940. 9) 伊藤佐 : 十全医学会雑誌, 57, 1782, 1955. 10) Okamoto, H. : Japan. J. Med. Sci., IV, Pharmacol., 14, 99, 1941. 11) 岡本・有沢・榊崎・越村・清水 : 金大結研年報, 14(上), 131, 1956. 12) Okamoto, H. : Japan. J. Med. Sci., IV, Pharmacol., 12, 167, 1940.

Table I a
 Procedure for Removing the Silver from Ag-Streptolysin S-Complex,
 Using Ammoniacal Hydrogen Sulfide as Desilvering Agent

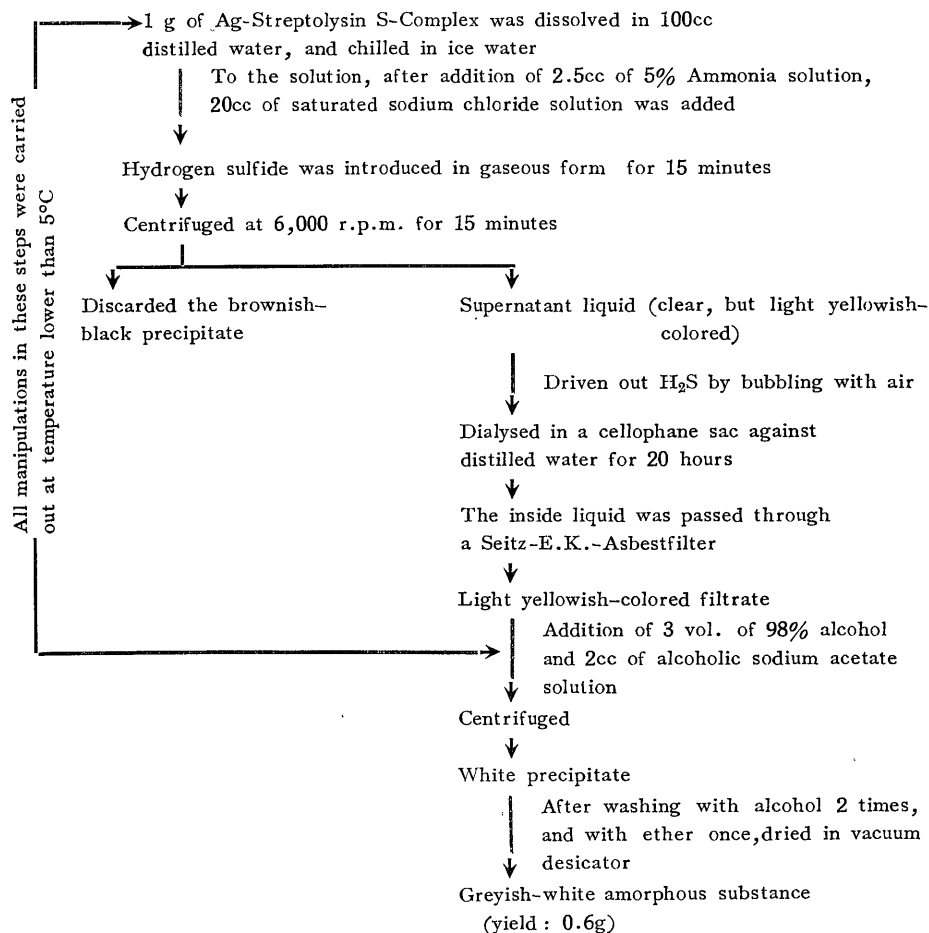


Table I b
 Hemolytic Activity Tests on the Sample obtained from the Ag-Streptolysin S-Complex by Desilvering with Ammoniacal H₂S, in Comparison with the Hemolytic Activity of the Mother Ag-Streptolysin S-Complex Sample and that of the Original Purified Streptolysin S

Dilution		50,000	100,000	200,000	400,000	800,000	1,600,000	3,200,000	6,400,000	12,800,000	25,600,000	51,200,000	102,400,000	Control (Without Sample)
Reading after taken		1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	
Sample tested		1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	
Original purified streptolysin S	2 hrs	###	###	###	###	###	##	++	+	±	-	-	-	-
	24 hrs	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-
Ag-Streptolysin S - Complex	2 hrs	###	###	###	###	###	##	++	+	±	-	-	-	-
	24 hrs	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-
Desilvered Sample *	2 hrs	###	###	##	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	24 hrs	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	-	-	-

Remarks : ### indicates complete hemolysis;
 ##, ++, +, ±, indicate partial hemolysis;
 - indicates no hemolysis.
 * Sample obtained from Ag-Streptolysin S-Complex by desilvering procedure.

Table II
Experiments to Demonstrate the Poisoning of Streptolysin S
by the Action of Ammonia and Hydrogen Sulfide
500mg of purified streptolysin S (1-N-F-Fraction, M. H. C. = 1 : 12,800,000)
was dissolved in 62.5cc of distilled water.

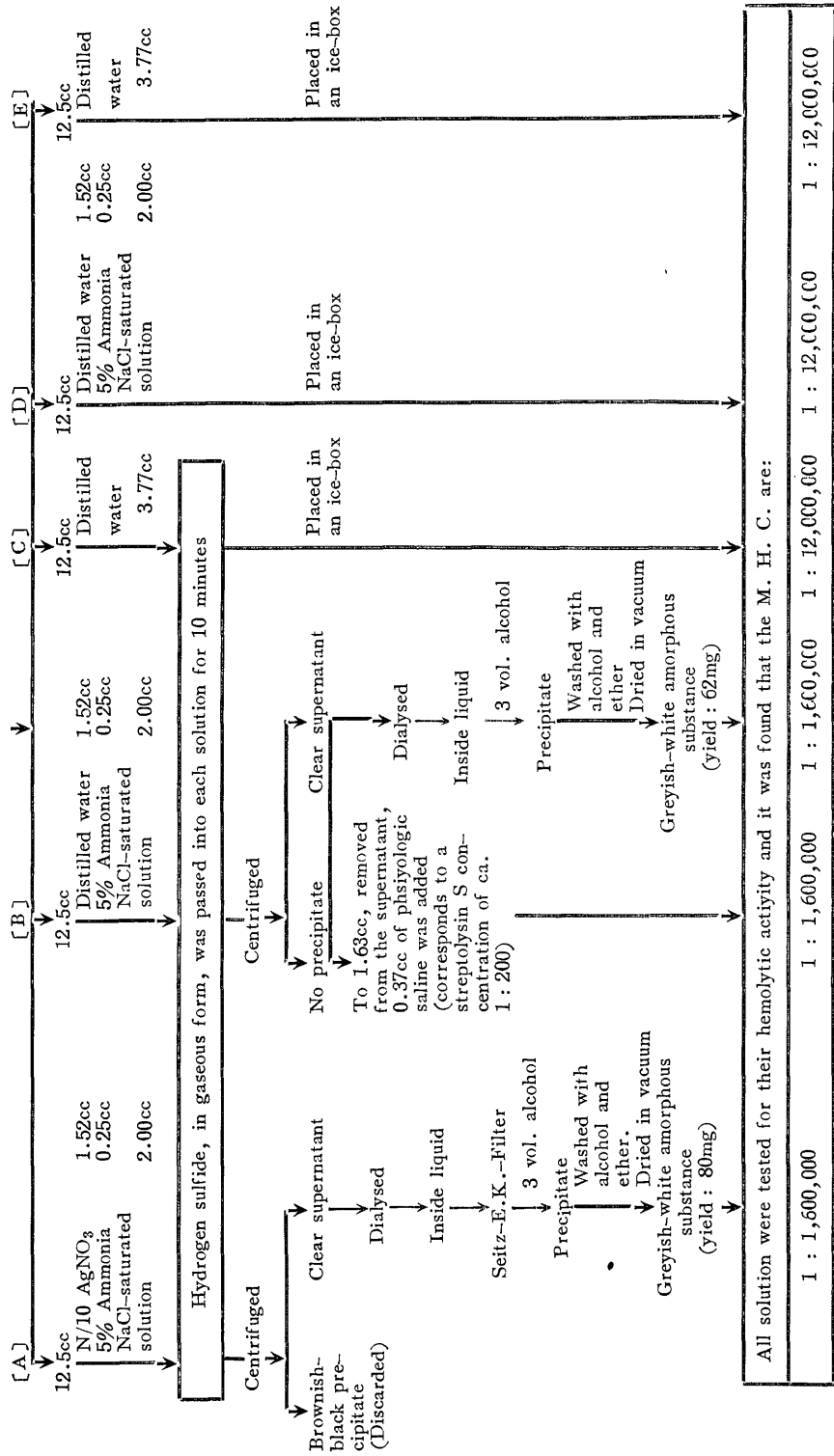


Table III
Comparative Illustration of Properties of Original Streptolysin S,
Ag-Streptolysin S-Complex and Desilvered Sample

Sample Properties		Original Streptolysin S	Ag-Streptolysin S-Complex	Desilvered Sample
Appearance		light greyish-white amorphous powder	light greyish-white amorphous powder	light greyish-white amorphous powder
Solubility (Precipitability)	Water	soluble	soluble	soluble
	Ether	insoluble	insoluble	insoluble
	Alcohol	insoluble	insoluble	insoluble
	HCl	insoluble	insoluble	insoluble
	H ₂ SO ₄	insoluble	insoluble	insoluble
	Alkali	soluble	soluble	soluble
Content of Ag		0	13.5%	0
Ninhydrin test (in 10% solution)		±	±	±
Orcinol test		###	###	###
Feulgen test		—	—	—
Minimum Hemolytic Concentration		1 : 12,000,000	1 : 12,000,000	1 : 1,600,000
Antagonized by Trypan blue		+	+	+
Thermolability		labile	stable	labile

Table IV a

Experiment on the Effect of Exposure of Streptolysin S, in Ammoniacal NaCl-Solution, to Hydrogen Sulfide for Various Length of Time

Original purified streptolysin S solution	60 mg of a purified streptolysin S sample (I-N-F-Fraction) was dissolved in cc of distilled water (i. e., 6 cc aqueous solution of a concentration of 1 : 100 I-N-F-Fraction), and chilled in ice water.					
Further treatment of the Original streptolysin S solution	1cc was placed in an ice-box.	To 5cc were added 0.15cc of 5% Ammonia solution and NaCl-saturated solution, and chilled. After initiating the passing of hydrogen sulfide gas into the mixture, 1cc aliquots were removed and chilled at 10, 15, 30, 45 and 60 minutes. The aliquots were tested for hemolytic activity.				
Length of time of exposure to H ₂ S (in minutes)	0	10	15	30	45	60
	Dilution (on a weight basis of I-N-F-Fraction)					
1 :	40,000	###	###	###	###	###

1 :	80,000	###	###	###	###	###	###
1 :	160,000	###	###	###	###	###	###
1 :	320,000	###	##	##	##	##	##
1 :	640,000	###	++	++	++	++	++
1 :	1,280,000	##	+	+	+	+	+
1 :	2,560,000	+	-	-	-	-	-
1 :	5,120,000	+	-	-	-	-	-
1 :	10,240,000	±	-	-	-	-	-
1 :	20,480,000	-	-	-	-	-	-
Control (without streptolysin S)		-	-	-	-	-	-

Table IV b

Experiment on the Effect of Exposure of streptolysin S to Hydrogen Sulfide in Solution of Various Concentrations of Ammonia

Original purified streptolysin S solution		15cc of 1-N-F-Streptolysin S Fraction 0.5% aqueous solution						
Preparation of streptolysin S solution containing different quantities of Ammonia	Distribution	2cc	2cc	2cc	2cc	2cc	2cc	2cc
	Volume, in cc, of 5% Ammonia solution added	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
	Volume, in cc, of distilled water added	2.0	1.9	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
After introducing hydrogen sulfide, ingaseous form, for 10 minntes, each solution was tested for hemolytic activity								
Dilution of purified streptolysin S		Results of hemolysis experiment after incubation at 37°C for 2 hours						
1 :	100,000	###	###	###	###	###	###	###
1 :	200,000	###	###	###	###	###	###	###
1 :	400,000	###	##	##	##	##	##	##
1 :	800,000	###	++	++	++	++	++	++
1 :	1,600,000	###	+	+	+	+	+	+
1 :	3,200,000	##	-	-	-	-	-	-
1 :	6,400,000	+	-	-	-	-	-	-
1 :	12,800,000	+	-	-	-	-	-	-
1 :	25,600,000	-	-	-	-	-	-	-
1 :	51,200,000	-	-	-	-	-	-	-
Control (without streptolysin S)		-	-	-	-	-	-	-