

Peptone 標品についての Streptolysin-S 増産効果 実験と Peptone 中に RNA の存在の可能性について*

金沢大学医学部薬理学教室（主任：岡本肇教授）

小 林 孝

（受付：昭和39年10月5日）

1939年リボ核酸の Streptolysin-S 増産効果が、発見¹⁾されて以来、イースト RNA の構成成分はもとより、その他幾多の物質についてその溶連菌の Streptolysin-S（以下 St-S とも記す）産生能に及ぼす影響が考査された。しかし彼の溶連菌を浮遊せしめた非働化血清が強い溶血性を示すようになるという事実（いわゆる Weldhemotoxin²⁾）以外には、いまだ生体物質で St-S 増産を来さしめるものが見出されなかった。³⁾⁻⁷⁾

ところが、私は約3年前たまたま溶連菌生菌体を浮遊せしめた3% Peptone 加磷酸緩衝リ

ンゲル液の 37°C 下にインキュベートしたもので、その上清液が強い溶血性を示していることを観察したところから、この事象についていろいろの角度からの考査を進めた。そして、その結果としてこの場合の溶血毒と RNA によって増産される St-S とはその生物学的性状などの諸関係において合致していることが確められるとともに、Peptone 中に微量の RNA の存在が推定されるに至った。

本論文はその成績について記載したものである。

一般実験方法

本研究での実験方法上の特徴は Peptone 以外には生体由来の物質を一切含まない磷酸緩衝リンゲル液を基礎メジウムとした静止菌法によった点にある。

- 1) 菌株：教室保存の溶連菌“Sa”株を使用。
- 2) 磷酸緩衝リンゲル液⁸⁾（以下 PBR と略記す）：
M/15 磷酸緩衝液（pH7.2）1部をリンゲル液4部に加えたもの。
- 3) Peptone 標品：市販のミクニ、嘔鈴、照内及び Witte の4種類。被検ペプトン標品の5%、10%、30%、あるいは50%水溶液を原液として用意する。
ちなみに Peptone 溶液は酸性側に傾くので10% Na₂CO₃ で中性に修正した。
- 4) 菌浮遊液の調製：溶連菌を普通ブイオン 100ml（pH7.6）に移殖、37°C 下に20時間培養したものを氷冷した後、遠心沈殿に付して上清液を除去す。

管底の生菌体に対し PBR による3回の洗浄操作を施した後、生菌体に原培養液の $\frac{1}{10}$ 量の PBR 液を加えて浮遊せしめる。すなわち本菌浮遊液の菌濃度はブイオン培養のそれに10倍していることとなる。

- 5) 静止菌法による溶血毒産出実験：（a）まず PBR 液 0.8ml に所定濃度の Peptone 原液 0.2ml を加え、これに菌浮遊液 1ml を加えた混液（すなわち Peptone 濃度は $\frac{1}{10}$ に希釈される）を37°C の水浴中に2時間静置せしめるか⁹⁾、（b）あるいは Peptone の所定濃度を含有せしめた PBR 1ml と菌浮遊液 1ml の混液を 37°C 下2時間置く。

次でこれらいずれの方式による場合でも、その混液から遠心沈殿（3,000 r. p. m., 20分）によって菌体を除去し、得たる上清液について当教室慣用の倍

* This investigation was supported, in part, by Public Health Service Research Grant No. CA-06133-02 from the National Cancer Institute, U. S. A., and by a Grant-in-Aid from Tokyo Biochemical Research Foundation.

下希釈法による溶血力試験を行った。なお、対照として Peptone を含まない〔PBR 1ml+ 菌浮遊液 1ml〕混液における実験を併置した。

- 6) 溶血力試験法：被験上清液の 0.85 % 食塩水による倍下希釈液 1ml に対し 1 % ウサギ赤血球浮遊液

(赤血球は食塩水で 4 回洗浄) 1ml 宛を加えた後、37°C のふ卵器中に 2 時間置き一旦、成績を判定し、さらに 22 時間冷所に静止せしめたものについて溶血の有無強弱いかなの再判定を行ってその成績を記載した。

実験成績

I 各種 Peptone 標品についての実験

まずミニク、啞鈴、照内及び Witte の 4 種類の市販ペプトン標品について、それぞれの 3 % 濃度含有静止菌メジウムにおける溶血毒の産出実験を行ったところ、表 1 のごとき成績が得られた。すなわち溶血毒産出効果は標品によって相違し、ミニク標品をもつての実験では上清液の 1:128 の希釈迄溶血が起っているに対し、照内と Witte の両標品では 1:32 迄、更に啞鈴では 1:16 迄溶血が起っているといった所見である。このようにミニクが最強で、次で照内、Witte、啞鈴の順であることから、以下の産出実験にはミニク標品を供用することとした。

II [Peptone+Streptococci] 混液のインキュ

ベートで得られた溶血性上清液の溶血作用におよぼす Peptone の影響

Peptone 加 PBR 液で溶連菌生菌体を懸濁せしめてインキュベートすると、その上清液が強い溶血作用を示すに至るという上記の現象に対しては Peptone によって

- 1) 溶連菌の溶血毒産出能が高められた。
- 2) 溶連菌に既存の溶血毒の活性化が起った。という二つの可能性が考えられる。この間の消息をうかがうべく、〔Peptone (5 %) + 溶連菌生菌体〕混液を 2 時間 37°C にインキュベートして得た遠心上清液を用いて、その溶血力におよぼす Peptone の影響関係を検したところ、

表 2 で見られるように、遠心上清液の溶血作用の発現に対し Peptone の付加がかえって抑制的であるという結果が得られた。すなわち、この成績は前記 (1) の可能性 (すなわち溶血毒の増産) を肯定せしめるものといえよう。

III Peptone の溶血毒産出効果に影響する因子についての検討

1) Peptone の濃度関係

PBR 液に Peptone ミニクをそれぞれ 1 %, 2 %, 6 %, 10 % に含有せしめた PBR 各 1 ml に対し、菌浮遊液の 1 ml 宛を混和、37°C 下 2 時間インキュベートして得た上清液について溶血力を測定したところ、図 1 に示したように、溶血毒の産出量は Peptone 濃度に相関するという成績が得られた。なお、本図では Peptone が 0.5 % の場合には上清液の溶血限界濃度は 1:16 であるに対し 5 % におけるそれは 1:256~512 といった具合に Peptone 濃度の 10 倍化で溶血毒産出量が 30 倍となっている所見も注目し値するところであろうか。

2) インキュベーション時間の関係

〔Peptone 10 % 含有の PBR 10ml+ 菌浮遊液 10ml〕混液を 37°C の温浴中におき、15, 30, 60, …… 180 分目と逐時的に 2 ml 宛を分取し、そのつどの遠心上清液を氷冷下に保存して置き、最後に全上清液について溶血力試験を行った。表 3 提示のごとく溶血毒の産出が急速に起り (15 分目で M. H. C. = 1:128) 60 分目が最高値 (M. H. C. = 1:256) を示しているといった成績である。90 分目から 180 分目迄の間で上清液の溶血値が漸減しているのは、おそらく一旦産出された溶血毒が 90~180 分もインキュベートされている間に熱非動化を起したことによるものであろうか。

3) pH の関係

- a) 〔10% Peptone in PBR (pH 7.2) 1 ml + Cocci-suspension in PBR (pH 7.2) 1 ml〕
- b) 〔10% Peptone in PBR (pH 6.6) 1 ml + Cocci-suspension in PBR (pH 6.6) 1 ml〕
- c) 〔10% Peptone in PBR (pH 6.0) 1 ml

+Cocci-suspension in PBR (pH 6.0) 1 ml]

の3混液の37°C 2時間インキュベートしたもの
の遠心上清液について溶血力試験を行った。
その結果 Peptone による溶血毒産出実験では
メジウムの pH が6.0よりも7.2及び6.6の方が
(M. H. C. = 1 : 1,024) やや良好であろう
かといった成績が得られた。

- 以上 I ~ III 項の成績を小括すると
- 1) 溶連菌生菌体を懸濁せしめた PBR 液に Peptone を加えたものをインキュベートすると、短時間の内に上清液が強く溶血性を呈するに至るが、
 - 2) これは Peptone による溶連菌の溶血毒産出の増強に基く、しかしして
 - 3) この場合
 - a) 溶血毒の増産度は Peptone 濃度に相関し、
 - b) 37°C のインキュベートが60分間、メジウムの pH が7.2~6.6 範囲が好適である。

IV Peptoneの誘導溶血毒とRNA誘導Streptolysin-S との同定実験

溶連菌の産出する溶血毒素には Streptolysin-O(oxygen labile)と Streptolysin-S(Serum extractable) の二種類¹⁰⁾ があり、彼の RNA によって誘導される溶血毒素 (RNA-induced hemolysin) が Streptolysin-S に該当する溶血毒素であることはすでに Bernheimer らの実験において示された⁴⁾ ところである。

しからば Peptone の存在で増産される溶血毒 (Peptone-induced hemolysin) はいかに？

本項ではこの関係について考査して得た成績について記載する。

- 1) イースト RNA と Peptone との効果の比較実験
- まず 1% イースト RNA-PBR 液と 5% Peptone-PBR 液の両メジウムの静止菌法による溶血毒の産出実験を行ったところ、表 4 に示した

ように 5% の Peptone 濃度で産出される溶血毒素量 (上清液の溶血限界濃度 = 1 : 1,024) は 1% RNA の混液で産出される St-S 量 (上清液の溶血限界濃度 = 1 : 4,096) の 1/4 程度であるという成績が得られた。

- 2) 各種細菌における実験
- RNA の溶連菌に対する St-S 増産効果は β -溶連菌においてのみ見られる特異現象^{1) 11)} であって、*Str. nonhemolyticus*, *Str. viridans*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus* をはじめとして諸他のグラム陽・陰性菌を対象としたのでは成績は陰性で *Str. nonhemolyticus* が溶血毒を産出するようになったり、また *Pneumococcus* よりの溶血毒産生が増強するようなことはないのであるが、しからば Peptone-induced hemolysin の場合はいかに？
- まず静止菌法によって Peptone の各種細菌に対する効果関係を—— RNA の効果との対比において——検討した。

A) 供試菌 : 溶連菌 2 株の他に 8 菌種を用いた。

菌 種	原 培 地
1) <i>Streptococcus hemolyticus</i> "S"*	普通ブイオン
2) <i>Streptococcus hemolyticus</i> "X"	
3) <i>Streptococcus viridans</i>	
4) <i>Staphylococcus aureus</i> "209-P"*	
5) <i>Staphylococcus aureus</i> "Terashima"	
6) <i>Staphylococcus albus</i>	10% 血液寒天
7) <i>Pneumococcus type I</i>	
8) <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	
9) <i>Clostridium welchii</i>	肝片加肝臓ブイオン
10) <i>E. coli</i>	普通ブイオン

B) 菌浮遊液の調製 : 原培地培養の菌はそれぞれ普通ブイオン (pH 7.6) 50ml 宛に移殖し、(ただしウエルシ菌だけは肝片を加えない肝臓ブイオン) 37°C 下 20 時間培養した後、遠心沈殿に付す。得られた沈渣 (生菌体) に PBR 50ml 宛をもってする洗浄操作を 3 回行ってから PBR 5ml に均等に浮遊せしめる。

- C) 静止菌法の術式 : 各菌浮遊液 については次の三つの静止菌混液を調製
 - i) [10% Peptone-PBR (pH 7.2) 1.0ml + 菌液 1.0ml]
 - ii) [2% RNA-PBR (pH 7.2) 1.0ml + 菌

*印以外の菌種はすべて本学細菌学教室より分与されたもので、西田教授に心から感謝の意を表する、

液 1.0ml]

iii) [PBR (pH 7.2) 1.0ml + 菌液 1.0ml] (対照)

型のごとく 37°C 下 2 時間インキュベートした後、遠心沈殿に付す。得たる三つの上清液について溶血力の比較試験を行う。

表 5 は各種菌での成績を一括表示したものであって、ここでは

1) Peptone (5%) 含有の静止菌メジウムで溶血毒のいちぢるしい増産が起っているのは溶連菌 (2 株共) だけであり、緑色連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、白色ブドウ球菌、肺炎球菌、ジフテリア菌、ウエルシ菌、大腸菌等の種類にあっては高々かすかな溶血毒産出の兆がみられるに過ぎず、しかも

2) これとまったく同様な関係の成績が RNA (1%) 含有の静止菌メジウムにおける St-S 産出実験でも得られている。

ことに注目すべきである。

3) Trypan blue をもっての抗溶血試験

Trypan blue が St-S 溶血に対する特異的拮抗物質であって本色素による拮抗関係を利用することで St-S と諸他の溶血性物質 (Streptolysin-O をも含めて) とを容易に識別し得るという事実¹²⁻¹⁵⁾ に基いて Peptone-induced hemolysin の溶血作用に及ぼす Trypan blue の影響を——RNA-induced St-S との対比において——検した。

i) 0.1% Trypan blue 溶液: Trypan blue (Merck) 20mg を食塩水 20ml に溶解した。

ii) 赤血球浮遊液: 1% ウサギ赤血球浮遊液 200ml を調製し、その

a) 100ml に 0.1% Trypan blue 溶液 2.5ml を加えたもの [R+T] (すなわち Trypan blue の濃度 $\approx 1:80,000$ の赤血球浮遊液) と、

b) 100ml に食塩水 2.5ml を加えたもの [R] を用意する。

iii) 溶血毒産生実験

a) [10% Peptone-PBR 溶液 (pH 7.2) 2.0ml + 溶連菌浮遊液 (pH 7.2) 2.0ml]

b) [2% RNA-PBR 溶液 (pH 7.2) 2.0ml + 溶連菌浮遊液 (pH 7.2) 2.0ml]

の両混液を調製、37°C 2 時間インキュベートした後、遠心沈殿に付し上清液を分取す、

iv) 溶血力試験: 各上清液について型のごとく食塩水による倍下希釈列 (各管 1ml 宛) の二列を調製、その一列には Trypan blue 含有赤血球浮遊液 [R+T] の 1ml 宛を加え、他列には 1% 血球浮遊液 [R] の 1ml 宛を加え、2 時間 37°C において両列における溶血成績の比較試験を行なった。

表 6 に示したように Peptone-induced hemolysin の実験ではその溶血作用が RNA-induced St-S の実験におけると同様 Trypan blue の存在下で完全に阻止されているのを見る

4) 易熱性試験

RNA-induced St-S がきわめて熱に不安定 (もっとも St-S だけでなく Streptolysin-O でも同様であるが) であることは岡本¹⁾、伊藤¹⁹⁾、Bernheimer²⁰⁾ らによって確かめられたところである¹¹⁾。とにかくそれぞれ Peptone-induced hemolysin の上清液 1ml 宛をみたした小試験管の一系列を用意し、これをそれぞれ 0°C、10°C ~ 100°C の水浴中に 30 分間おいたものについて溶血試験を行った。図 2 に示したように、本溶血毒素も熱に対しては不安定で 56°C、30 分の処置ですでに無力化される。

5) Peptone-induced hemolysin に対する通気並びに SH 物質の影響

Streptolysin-O は酸素に鋭敏で通気によっても容易に失活し Cysteine, Thioglycolate 等の還元剤で再活性化されるという事実¹⁶⁾⁻¹⁸⁾ に基き、この関係を Peptone-induced hemolysin について考査した。すなわち表 7 にみるように Peptone-induced hemolysin の上清液ではこれに対し

a) 通気 60 分におよんでも、また

b) Cysteine (5 mg/ml) を付加しても

溶血力に何ら著しい増減をきたさない、すなわち Peptone-induced hemolysin は Streptolysin-O ではないという成績が得られた。

6) 透析実験

[10% Peptone-PBR (pH 7.2) 10ml + 菌浮遊液 10ml] 混液の 37°C 2 時間インキュベートしたものの遠心上清液を調製、このうち 2ml を対照用として 4°C に保存、10ml をセロファン

バックに入れ4°Cの食塩水100ml中に24時間4°C下に透析せしめた後、膜内、膜外並びに非透析の対照上清液の三者について溶血力試験を行った。

表8に示すように透析内液は対照に比してはわずかに溶血力が低下しているだけである。すなわち Peptone-induced hemolysin は非透析性であらうとしてまず間違いないといった成績が得られた。なお RNA-induced St-S の非透析性であることはすでに先人によって証明済みである。¹⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾

表9はIV項の(2)~(6)における各成績を一括表示したものであるが、ここでまず Peptone における成績と RNA における成績とがまったく相符合して、その間に何らの矛盾もないことが看取されよう。いま、この間の成績についていささか論考すれば、

1) 易熱性と非透析性とは Streptolysin-S ばかりでなく、Streptolysin-O の性状でもあるので、この両成績は Peptone-induced hemolysin が St-S であっても、St-O でないことの証明とはなり得ない。しかし

2) 通気で不活性化されず、また Cysteine で活性化されないという成績は Peptone-induced hemolysin が少なくとも Streptolysin-O ではなく Streptolysin-S であらうことを教示するものである。

そして最後に

3) Peptone による溶血毒の増産が RNA による St-S 増産と同様 β -hemolytic streptococci についてのみ起る特異現象であること、と Peptone-induced hemolysin による溶血作用が RNA-induced St-S の溶血作用に対する特異的拮抗物質である Trypan blue によって拮抗されるという両成績に注目するならば、

a) Peptone-induced hemolysin は本質的

には RNA-induced St-S と同一であると断じてまず間違いないだろうこと、

b) Peptone* 標品には元来微量の RNA が存在していて、この RNA が St-S 増産の遺伝をなしていると推定し得るところである。

なお、IV項(1)の Peptone 濃度が5%の場合の溶血毒(St-S)産出量が、RNA 1%による St-S 産出量の $\frac{1}{4}$ 程度に該当するという成績からは Peptone における RNA の含量は0.05%程度であると計算されることも注記に値するところであろうか。

以上のごとく“Peptone 標品中に微量 RNA が存在すべし”は Peptone-induced hemolysin についての生物学的方面からの考查成績から推定されたものであるが、まもなく当教室の武藤²³⁾は Peptone** からイースト RNA よりもはるかに強力な St-S 増産効果を呈する Polyribonucleotide を分離(ペプトンのアルコール分画 \rightarrow DEAE セルロースクロマト分画 \rightarrow 過塩素酸沈殿)することに成功し、ここに問題の最終的解決をみるに至った訳である。

ところで、これら生物学的並びに化学的方面の研究成果の意義に関してであるが、これは従来 Peptone 標品については、これが RNA を含有していることを明示した記載は見当らず²⁴⁾、またこれまで溶連菌の肉汁・ペプトン・ブイヨン培養での St-S の産生にはおそらく筋肉あるいはペプトン原料由来の RNA の効果関与しているであろうと想像³⁾²⁵⁾されながらも、これに対しまったく検討されていなかったことに想到するならば自明のところといえよう。すなわち Peptone が微量の RNA を含有することが静止菌法による Streptolysin-S 産出実験を介してここに始めて明示されてきた訳である。

ちなみに、表10は Peptone-induced hemolysin に対

* 正印²²⁾は Peptone から RNA の St-S 増産効果発現に必要な Cofactor (透析性)を分離したが、これは Polypeptide 性であって、それ自体では St-S 増産効果は無い。おそらくこの物質は Peptone 中の RNA による St-S 増産には Cofactor として役立っていることであろう。

** Peptone 標品の水溶液では紫外線吸収測定法によっても、多量に存するペプチドの妨害のために RNA は検証されない。

するアルコール分画の実験成績であるが、この場合には高々1:6,400の希釈液迄溶血作用を呈する画分が得られただけで、彼の溶連菌の R Nase-core 加ブイ

結

- 1) 溶連菌生菌体を懸濁せしめた3~5% Peptone 加 PBR 液を37°C にインキュベートすると、短時間内にその上清液は強く溶血作用を呈するに至る。
- 2) この事象は Peptone-PBR 液中で溶連菌溶血毒素の増産が起る (Induction of hemolysin formation) たためであって、この場合溶血毒の産出量は Peptone 濃度に相関する
- 3) この事象は、RNA におけると同様に、 β -溶連菌についてのみ見られる特異現象である。
- 4) Peptone-induced hemolysin は、i) その溶血作用は Trypan blue によって拮抗される、ii) 酸素に安定である、iii) Cysteine で活性化されない、iv) 易熱性で、また v) 非

文

- 1) Okamoto, H. : Jap. J. Med. Sci., IV, Pharmacol., 12, 167, 1940.
- 2) Weld, J. T. : J. Exptl. Med., 59, 83, 1934 ; 61, 473, 1935.
- 3) Okamoto, H. : Ann. Rep. Res. Inst. Tuberc., Kanazawa University, 19, (3), 165, 1962.
- 4) Bernheimer, A. W., Rodbart, M. : J. Exptl. Med., 88, 149, 1948.
- 5) Ito, R. : Jap. J. Med. Sci., IV Pharmacol., 13, 85,* 1940.
- 6) Heppel, L. A., Hilmoe, R. J. : Federation Proc., 11, 229, 1952.
- 7) Younathan, E. S., Barkulis, S. S. : J. Bact., 74, 151, 1957.
- 8) Ito, R., Okami, T., Yoshimura, M. : Jap. Med. J., 1, 253, 1948.
- 9) 藤邑昭 : 金大結研年報, 21, (2), 209, & 227, 1963.
- 10) Todd, E. W. : J. Path. Bact., 47, 423, 1938.
- 11) Bernheimer, A. W. : Bact. Revs., 12, 195, 1948.
- 12) Ito, R. : 日本薬物学雑誌, 30, 124, 1940.

ヨン培養の上清液あるいは R Nase-core 加メジウムでの静止菌法による上清液からのように超強力な St-S 標品は3), 9), 18), 20) 得られなかった。

語

透析性である、といった具合に、その性状において RNA-induced streptolysin-S のそれに合致している。

5) かくて、Peptone-induced hemolysin は本質的には RNA-induced streptolysin-S と同一であり、従って Peptone 標品中には元来微量の RNA (ペプトン調製の際に獣肉などの原材料の RNA が混入したもの) が存在しており、この RNA が Peptone 標品における streptolysin-S 増産の遺伝子をなしている、と結論された。

御指導を賜った正印達助教授に深甚の謝意を表します。

献

- 13) Rosendal, K., Bernheimer, A. W. : J. Immunol., 68, 53, 1952.
- 14) 宮地知男 : 金大結研年報, 11, (3), 237, 1953.
- 15) 機動嘉見 : 金大十全医学会雑誌, 60, 898, 1958.
- 16) Smythe, C. V., Harris T. N. : J. Immunol., 38, 283, 1940.
- 17) Dubos, R. J. : Bacterial and Mycotic Infections of Man, P. 258, 3rd. Ed., 1958.
- 18) Bernheimer, A. W. : In Streptococcal Infections, McCarty, M., ed., Columbia University Press, New York, 1954, p. 19.
- 19) 伊藤亮 : 日本薬物学雑誌, 28, 41, 1940.
- 20) Bernheimer, A. W. : J. Exptl. Med., 90, 373, 1949.
- 21) Egami, F., Shimomura, M., Yagi, Y., Hayashi, T., Mase, T. : Jap. J. Exp. Med., 20, 527, 1950.
- 22) 正印達, 西川順子, 小林孝 : 金大結研年報, 20(2), 81, 1962.
- 23) Taketo, Y. : Jap. J. Exptl. Med., 33, 33, 1963.
- 24) 水野伝一 : 薬局, 10, 921, 1959.
- 25) 岡本肇 : 生化学, 32, 1, 1960.

Table 1.

Effect of different commercial preparations of peptone
on hemolysin production by resting cell of hemolytic streptococci

Test-tube No.			1	2	3	4	5
Mixture of resting cell system	pH7.2 Washed streptococci suspension (ml)		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	pH 7.2 P B R (ml)		1.0	0.8	0.8	0.8	0.8
	30% solution of peptone preparation of	"Mikuni" (ml)		0.2			
		"Arei" (ml)			0.2		
		"Teruuchi" (ml)				0.2	
"Witte" (ml)						0.2	
Further treatment of mixture			After placing in a 37°C-bath for 2 hrs., the content of each tube was chilled and centrifuged <div>↓ Clear supernatant ↓ Titrated for hemolytic activity *</div>				

Results of hemolysis test

Dilution of supernatant	1 : 2	-	###	###	###	###
	1 : 4	-	###	##	###	###
	1 : 8	-	###	++	##	##
	1 : 16	-	###	+	++	++
	1 : 32	-	##	-	+	+
	1 : 64	-	++	-	-	-
	1 : 128	-	+	-	-	-
	1 : 256	-	-	-	-	-
M. H. C. **		1 : 2	1:128	1:16	1:32	1:32

*1ml of 1 % washed rabbit erythrocyte suspension was added to 1 ml of each diluted supernatant.
All tubes were incubated at 37°C for 2hrs. Reading was taken after standing over night in the cold.
indicates complete hemolysis; ##, ++, +, ±, indicate partial hemolysis;
- indicates no hemolysis.

**M. H. C.: Minimum hemolytic concentration on a supernatant basis.

Table 2.

Influence of peptone on hemolytic activity of supernatant
from incubated peptone-cocci mixture

Dilution	A hemolytic supernatant from incubated 5 % peptone-streptococci mixture was diluted serially with		
	0.85% NaCl	0.85 % NaCl containing	
		2 % Peptone	10% Peptone
1 : 2	###	###	###
1 : 4	###	###	##
1 : 8	###	##	++
1 : 16	##	##	+
1 : 32	##	+	-
1 : 64	++	-	-
1 :128	±	-	-
1 :256	-	-	-

Table 3.

Effect of incubation time on rate of hemolysin production
in resting cell medium containing 5 % peptone

After placing a mixture of 10 ml of streptococcal suspension in PBR (pH7.2) and 10 ml of 10 % peptone solution in PBR (pH 7.2) in a 37°C-bath, 2 ml aliquots were removed and chilled at 15, 30, 60, 90, 150 and 180 minutes.

The aliquots were centrifuged in the cold, and the clear supernatants were measured for hemolytic activity.

Time of incubation (minutes)	Minimum hemolytic concentration of supernatant
15	1 : 128
30	1 : 128
60	1 : 256
90	1 : 128
150	1 : 64
180	1 : 64

Fig. 1.

Relation between concentration of peptone "Mikuni" and
degree of hemolysin production

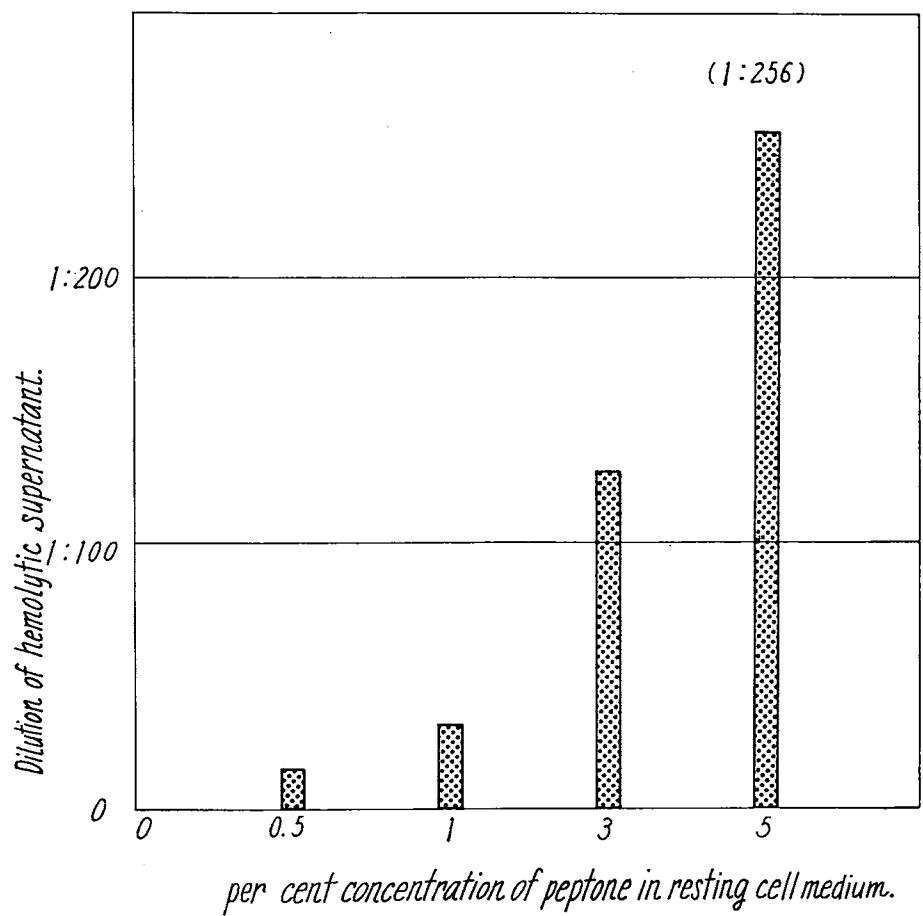


Table 4.

Comparison of hemolysin formation inducing effect of peptone and streptolysin-S formation inducing effect of yeast ribonucleic acid

Test-tube No.		1	2	3
Mixture	Streptococci suspension (ml)	1.0	1.0	1.0
	2 % Yeast RNA solution (ml)	1.0		
	10 % Peptone solution (ml)		1.0	
	P B R (ml)			1.0
Further treatment of mixture		As in Table 1.		

Results of hemolysis test

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	+	-	-
	1: 8,192	-	-	-
	1:16,384	-	-	-

Table 6.

Influence of trypan blue on hemolytic activity of peptone-induced hemolysin
and that of RNA-induced streptolysin-S

1) Peptone-induced hemolysin : Clear supernatant prepared from an incubated mixture
[2 ml streptococci-suspension and 2 ml 10 % peptone] (pH 7.2)

2) RNA-induced streptolysin : Clear supernatant prepared from an incubated mixture
[2 ml streptococci-suspension and 2 ml 2 % RNA] (pH 7.2)

Each of these samples was measured for its hemolytic activity in the absence [R]
or in the presence [R+T] of trypan blue.

Dilution of samples	Peptone-induced hemolysin		RNA-induced streptolysin-S	
	R	R + T	R	R + T
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	-	-	+	-
1 : 8,192	-	-	-	-

Fig. 2.

Experiment on thermo-lability of peptone-induced hemolysin

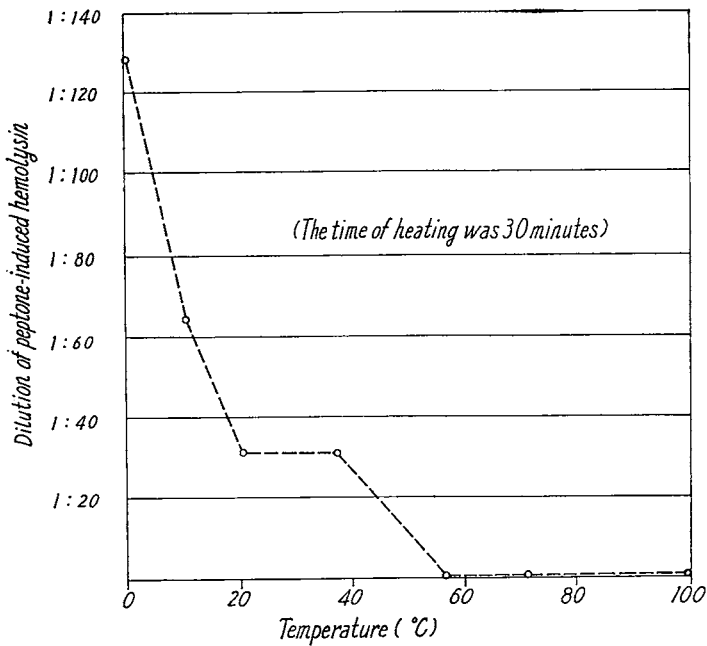


Table 7.

Influence of oxygen and SH-compound on hemolytic activity of peptone-induced hemolysin

Treatment		15 ml of peptone-induced hemolysin		
		5.0 ml ↓ Bubbled with air for 60 minutes at 4°C	5.0 ml ↓ Addition of cysteine-HCl at 5 mg/ml	5.0 ml ↓ Stored at 4°C for 60 minutes
Dilution	1 : 2	+++	+++	+++
	1 : 4	+++	+++	+++
	1 : 8	+++	+++	+++
	1 : 16	+++	+++	+++
	1 : 32	+++	+++	+++
	1 : 64	+++	+	++
	1 : 128	++	±	+
	1 : 256	+	-	±
	1 : 512	-	-	-

Table 8.

Dialysis experiment with peptone-induced hemolysin

Treatment		12 ml of peptone-induced hemolysin		
		10 (ml)		2 (ml)
		Dialysed, in a cellophane-bag, against 100 ml of 0.85 % NaCl at 4°C for 24 hrs.		Stored at 4°C for 24 hrs.
		Inside fluid	Outside fluid	Original peptone-induced hemolysin
Dilution	1 : 2	###	—	###
	1 : 4	###	—	###
	1 : 8	###	—	###
	1 : 16	###	—	###
	1 : 32	+	—	##
	1 : 64	±	—	+
	1 : 128	—	—	±
	1 : 256	—	—	—
	1 : 512	—	—	—

Table 9.

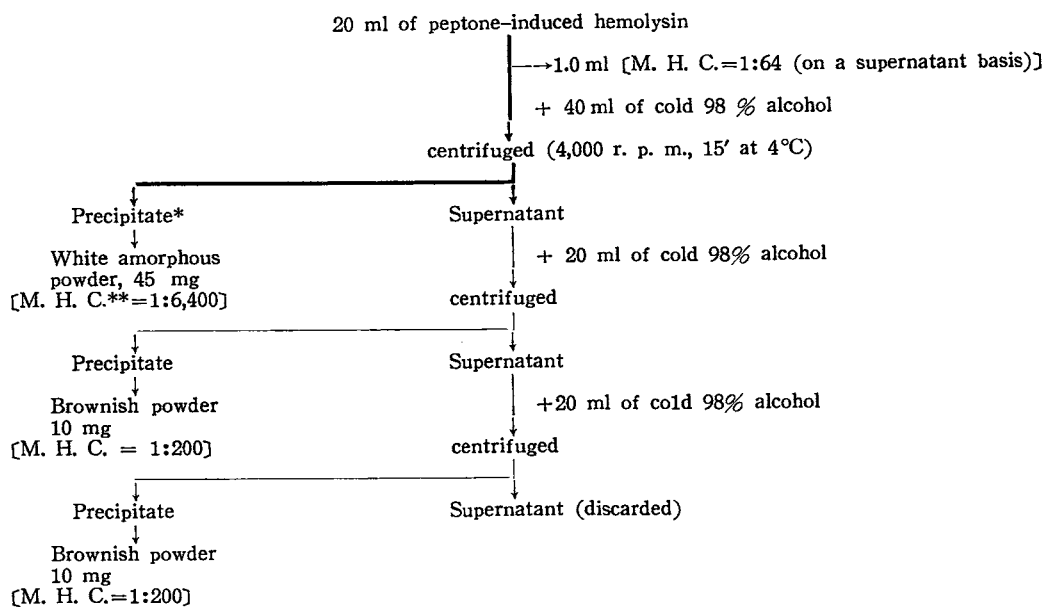
Showing the possible identity of peptone-induced hemolysin with RNA-induced streptolysin-S

Agent added to resting cell system medium		Peptone	Yeast sodium ribonucleate (RNA)
Hemolysin formation inducing phenomenon (2)		Specific for β -hemolytic streptococci	Specific for β -hemolytic streptococci
Properties of hemolysin produced	Hemolytic activity (3)	Antagonized by trypan blue	Antagonized by trypan blue
	Heat (4)	Labile	Labile
	Effect of atmospheric oxygen (5)	Not inactivated	Not inactivated*
	Effect of cysteine (5)	No change in hemolytic activity	No change in hemolytic activity*
	Dialysability (6)	Non-dialysable	Non-dialysable*

* Not tested in the present work

Table 10.

Alcohol fractionation of peptone-induced hemolysin



* The precipitate, after being washed two times with 98% alcohol and once with ether, was placed in a desiccator.

** Minimum hemolytic concentration on a weight basis.