

Tyrothricin, Gramicidin 及び Tyrocidine の 溶血作用に対する Trypan Blue 系色素の影響について

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤亮教授）

秋 山 万 里 子
南 部 利 汎
宮 本 乙 男

（受付：昭和37年10月15日）

緒 言

Trypan blue や Congo red などの Benzidine-bis-azo 色素群（以下単に TB 色素と呼ぶ）が、溶血性連鎖状球菌の溶血毒 Streptolysin S (St-S) に対して特異的に強大な阻止効果を発揮することは、さきに伊藤⁽¹⁾, Rosendal and Bernheimer⁽²⁾, 大西⁽³⁾らによって実証されたのであるが、TB 色素の抗 St-S 作用の特異性に関してこれまで検索が行われた細菌性溶血毒 (Hemolysin) は、わずかにブド

一状球菌の培養上清液を被検材料とした Staphylolysin のみであった。そこで著者らは今回 TB 色素の抗 St-S 効果の特異性に関する知見を補足拡充する目的をもって、Bacillus brevis の産出する抗菌性物質でしかも強力な溶血作用を有することで知られている Tyrothricin, Gramicidin 及び Tyrocidine の 3 物質に対する TB 色素の影響について検索を行った。ここにその成績を報告する。

実 験 方 法

1 赤血球、耳静脈からヘパリンを加えて採血したウサギ血液を遠心し、分離した赤血球を3回りん酸緩衝液加生理的食塩水（0.85% NaCl 10容量に0.1Mりん酸緩衝液 pH7.2 1容量を混和したもので、以下単に食塩水と呼ぶ）をもつて洗浄した後、血液の100倍量の食塩水に浮遊せしめた（1%赤血球浮遊液）。

2 Hemolysin

a) Streptolysin S は溶連菌のリボ核酸加ブイオン培養液から岡本ら⁽⁴⁾の方法で分離された精製 St-S 標品（溶血限界濃度 1:20,000,000）である。St-S 10mg を食塩水 10ml に溶解したものを原液とした。

b) Gramicidin, Tyrothricin 及び Tyrocidine Hydrochloride はいずれも“Nutritional Biochemicals Corporation, U.S.A.”製標品であつて、溶血限界濃度はそれぞれ 1:10,000,000, 1:5,000,000, 及び 1:1,000,000 であつた。これらは水に難溶性であるので、溶血試験用の食塩水希釈液は次のようにして調製された。各標品 10mg を80%アルコール溶液 5ml に溶かしたものを原液とし、実験に際してはこの原液 1ml を更に50%アルコール溶液 3ml に希釈し、このアルコール溶液を最後に食塩水をもつて所要濃度に希釈し、直ちに溶血試験に供した。

3 色素類. この実験に供用された TB 色素は次の4種である.

Trypan blue (Merck)

Trypan red (Meister Lucius & Brünig)

Congo red (和光純薬)

Thiazin red (Grübler)

4 溶血試験. 溶血試験並びに色素化合物をもつての溶血阻止試験はすべて既報⁽¹⁾の術式に従って行われた. すなわち, 試験管に被検 TB 色素を一定濃度に

含有した食塩水をもつて(対照試験では色素を含まない食塩水をもつて) Hemolysin の2あるいは2.5倍低下希釈液列(1mlあたり)をつくり, 次いで各試験管に1%赤血球浮遊液1mlを加え, 振盪混和した後試験管を37°Cに2時間孵置する. その間, 30分, 1及び2時間目に溶血を観察する. 孵置後, 試験管を更に氷室に1夜静置して溶血成績を判定した. そして色素を加えてない対照溶血試験の成績と比較して色素の抗溶血作用の有無強弱を認定した.

実験成績

第1表は St-S, Gramicidin, Tyrothricin 及び Tyrocidine の溶血作用に対する Trypan blue の影響を比較した実験成績である. この表から明らかなように, Trypan blue は St-S に対しては, 従来報告のように, 絶大な抗溶血効果を示した. すなわち, 1:250,000濃度の色素の存在によって St-S の溶血力は対照試験の約 1/10,000 に低下し, 更に色素は 1:4,000,000 の高希釈においてもなお St-S 溶血力を 1/100 に低下せしめる程の阻止効力を示したのである. 一方 Gramicidin, Tyrothricin 及び Tyrocidine についての実験では, これら 3 Hemolysin が, その溶血力においては St-S 標品のそれに比肩し得るにもかかわらず, Trypan blue に対する態度は St-S と全く異なっていて, Trypan blue は 1:30,000 の高濃度でもこれら 3 Hemolysin に対し何ら阻止的影響を示さなかった.

また第2表は, 第1表と同様の実験を4種の TB 色素 (Trypan blue, Trypan red, Congo red 及び Thiazin red) について行い, その成績を総括表示したものである. St-S に対するこれら 4 TB 色素の阻止効力は, さきに伊藤⁽¹⁾によって報告された成績と同様であって, Congo red は Trypan blue とほぼ同等の効力を示し, Trypan red 及び Thiazin red はそれよりやや弱くて, その 1:300,000—400,000 希釈液が St-S 溶血力を 1/100—1/200 に低下せしめ得る程度の抗溶血力を示した. しかるに Gramicidin, Tyrothricin 及び

Tyrocidine に対しては, 第1表の Trypan blue の成績と同様に, いずれの色素も, 1:30,000 の高濃度においても全く影響がないという結果が得られた.

Tyrothricin は1939年 Dubos⁽⁵⁾によって土壌菌 *Bacillus brevis* から得られた Polypeptide 性の強力な抗菌性物質であって, その後このものは Gramicidin 及び Tyrocidine の2物質の混合したものであることがわかり, いずれも結晶状に純化されたのである. 今日の抗生物質黄金時代の先駆者ともいべき Tyrothricin (または Gramicidin, Tyrocidine) は, しかしながら人体に対する激しい毒性のためついに細菌感染治療に実用化されるに至らなかった. 毒性の中でも溶血作用は特に顕著^(6,7)であって, もちろん St-S の溶血力に及ぶべくもないが, 従来溶血試薬としてよく知られている Saponin や諸種表面活性物質 (たとえば, Tween 80, Cetyltrimethylammonium Bromide など) に比してはるかに強い溶血力を示すことが薬理学上興味ある特性とされている.

Gramicidin などの溶血機作については現在なお明らかでないが, その溶血作用の特徴として, Cholesterol によって拮抗されないことが知られている⁽⁶⁾. ここで注目されることは St-S 溶血もまた Cholesterol によって拮抗されないということである^(8,9). St-S の化学的

性状に関しては、その純化が未成功であるため、今なお核酸説と（核）蛋白説とがあつて決定されるに至っていない⁽¹⁰⁾のであるが、

(1) 今までに分離された精製 St-S 標品中には微量ではあるがアミノ酸が毎常検出されること、

(2) 一方アミノ酸で組成された Gramicidin や Tyrocidine が強力な溶血作用を示し、

(3) しかもこれら 2 種類の Hemolysin はいずれも Cholesterol によって阻止されない、などの事実を合わせ考える時、この 2 つの細菌性 Hemolysin の間には何か一脈相通ずるものが感ぜられる。この意味において Gramicidin

や Tyrocidine に対して TB 色素が抗溶血作用を示すか否かは、St-S の本態究明の問題とも関連してはなはだ興味深いものがあるのであつて、著者らがことさらに本研究においてこの細菌性 Hemolysin を取り上げて TB 色素の影響を検索したゆえんもまたここにあつたのである。しかしながら上述の実験によって明らかな様に、TB 色素が Gramicidin などの強力な溶血作用に対しては全く無効であつたという事は St-S 溶血と Gramicidin 溶血との間の本質的差異を指示したものであつて、このことはまた当然両 Hemolysin の化学的性状の相違を反映しているものと言えよう。

結

Tyrothricin, Gramicidin 及び Tyrocidine に対する Trypan blue 系色素 (Trypan blue, Trypan red, Congo red, 及び Thiazin red) の影響を検索して、いずれの色素もこれら 3 抗

論

生物質の溶血作用に対して全く無影響性であることが実証された。

本研究の遂行には文部省科学研究費の補助を受けた。

文

- 1) 伊藤 亮：日本薬物学雑誌，30,124,1941.
- 2) Rosendal, K., and Bernheimer, A.W.: J. Immunol., 68,53,1952.
- 3) 大西 淳：金大結研年報，10(下)，37,1952.
- 4) Okamoto, H. et al.: Japan. J. Med. Sci., IV, Pharmacology, 14,99,1941.
- 5) Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 70,1; 11, 1939.
- 6) Heilman, D. and Herrell, W.E.: Proc.

献

- Soc. Exp. Biol. Med., 46,182,1941.
- 7) Rammelkamp, C.H. and Weinstein, L.: Ibid., 48,211,1941.
- 8) 伊藤 亮：日本薬物学雑誌，28,41,1940.
- 9) Bernheimer, A.W. and Rodbart, M.: J. Exp. Med., 88,149,1948.
- 10) Okamoto, H.: 金大結研年報，19(中)，165, 1962.

Table 1
Comparison of the effects of trypan blue
on various hemolysins

Hemolysin	Concentration of trypan blue	Dilutions of hemolysins														
		1 : 2,000	1 : 5,000	1 : 10,000	1 : 20,000	1 : 50,000	1 : 100,000	1 : 200,000	1 : 500,000	1 : 1mill.	1 : 2mill.	1 : 5mill.	1 : 10mill.	1 : 20mill.	1 : 50mill.	
Streptolysin S	Without trypan blue	•	•	•	•	•	###	###	###	###	###	###	##	+	-	
	1 : 250,000	###	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	•	•	
	1 : 4 mill.	###	###	###	###	###	###	###	-	-	-	•	•	•	•	
Gramicidin	Without trypan blue	•	•	•	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	-
	1 : 30,000	•	•	•	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	-
Tyrothricin	Without trypan blue	•	•	•	###	###	###	###	###	##	++	+	±	-	-	-
	1 : 30,000	•	•	•	###	###	###	###	###	##	++	+	±	-	-	-
Tyrocidine	Without trypan blue	•	•	•	###	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	-
	1 : 30,000	•	•	•	###	###	###	###	##	++	+	-	-	-	-	-

Table 2
Summary of the effects of the dyestuffs of trypan blue series
upon gramicidin, tyrothricin, tyrocidine,
and streptolysin S

Dyes	Effect on gramicidin, tyrothricin and tyrocidine at a dilution of 1 : 30,000	Inhibitory effect on streptolysin S	
		Concentration of dyes	Relative activity of st-S
Trypan blue	no effect	1 : 250,000	1/10,000
Trypan red	no effect	1 : 350,000	1/100
Congo red	no effect	1 : 330,000	1/20,000
Thiazin red	no effect	1 : 370,000	1/200