

# Gelatin の化学構造とそのタンニン酸処置

## 赤血球の Streptolysin S 感受性

### 復活作用との関係について

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤亮教授）

沼 田 直 吉

（受付：昭和35年5月23日）

#### 緒 言

Streptolysin S (St-S) の溶血作用に関して最近、伊藤・松田等<sup>1,2)</sup>によつて、“ある種の哺乳動物の赤血球を極めて穏和な条件下でタンニン酸 (TA) で処置すると、その St-S 溶血に対する感受性が高度に低下する”，と言う興味ある現象（所謂 TA 効果）が発見され、引続きこの TA 効果を中心として精緻な考査が進められており、すでに青木<sup>3)</sup>、岡本<sup>4)</sup>、川尻<sup>5)</sup>等によつて注目すべき新知見が報告されている。

処で、青木<sup>3)</sup>の研究は、TA 処置によつて一旦低下した血球の St-S 感受性が、蛋白質をもつての再処置によつて容易に復活することを実証したものであつて、著者はいろいろの蛋白質について検索した結果、TA 処置赤血球に対する St-S 感受性復活効力が蛋白質の種類によつて著しく異なつており、就中従来生物学的に活性の乏しい蛋白質と目されている Gelatin が Albumin や Globulin に比して遙かに強力な復活効力を発揮するものであることを確かめた。

Gelatin は動物体内では Collagen として皮膚、軟骨、腱、結合組織等の繊維構造を形成する強靱な蛋白質であつて、その分子が特異な鎖状構造をなしていることは周知の通りである。化学的には、Gelatin はアミノ酸組成において他の一般蛋白質と大いに異なつており、構成アミノ酸の約%が Glycine, Proline 及び Hydroxy-

proline によつて占められている。また Gelatin の化学的性状として特に注目されるのは、Gelatin（又は Collagen）がタンニン酸と強く結合反応する特性を有していることであつて、この性質を利用して動物皮の製革工業においては、タンニン酸が所謂 Tanning agent として古くから一般に使用されているのである。処で、TA 処置赤血球に対する Gelatin の強大な St-S 感受性復活効力（以下単に Gelatin 活性とも略称す）の発現に際しても、恐らくこの Gelatin の特異的タンニン酸結合能が重要な役割を演じていることは、けだし想像にかたくない。

近年蛋白化学の急速な進歩によつて、従来極めて困難とされていた蛋白質の複雑な分子構造探究の新しい手段が漸次確立されるに至り、之に伴つてホルモン、酵素、細菌毒素のような生物学的活性蛋白質について、その活性を分子構造論的立場から究明しようとする研究が盛んとなつて来ており、すでに一、二のホルモン、或は酵素においては輝かしい成果が挙げられている。然るに Gelatin に関しては、元来これが生物学的に甚だ活性の乏しい蛋白質であるため、この方面の研究はこれまで殆んど行われていない状況である。そこで私は、青木の研究に引続いて、Gelatin の化学構造、特に上記の化学的

性状の特異性と TA 処置赤血球に対する St-S 感受性復活々性との 関係について 検索を行つ

た。ここにその成績を報告する。

## 実験材料及び方法

### 1. 赤 血 球

心臓穿刺によつて採血したモルモット血液（ヘパリン添加）を遠心し、赤血球を0.01M磷酸緩衝液加生理的食塩水 pH7.2-7.4（以下単に食塩水と呼ぶ）で3回洗滌した後、食塩水をもつて50%浮游液とする。浮游液は氷水中に入れてよく冷しておく。

### 2. Streptolysin S.

溶連菌の1%核酸加ブイオン培養液から分離された精製 Streptolysin S 標品<sup>6)</sup>（溶血限界濃度=1:2×10<sup>7</sup>）を使用した。

### 3. 試 薬

タンニン酸は局方試薬, Gelatin 及びアミノ酸類は市販製品を用いた。

### 4. タンニン酸処置赤血球の調製

TA処置赤血球の調製は既報<sup>2)</sup>の術式に従つて行つた：

TA の 1 : 10,000 液（冷食塩水溶液）4ml に50%

赤血球浮游液 0.4ml を混和し、混合液を氷水中に10分間放置する。次いで混合液を遠心し、TA 処置赤血球を冷食塩水で3回洗滌した後、直ちに実験に使用した。

而して最後に血球を食塩水 20ml をもつて1%浮游液となし、これを溶血試験に供した。

### 5. 溶 血 試 験

溶血試験は慣用の方式<sup>7)</sup>に従つて行つた。即ち、St-S の通下稀釈液 1ml に被検1%赤血球浮游液 1ml 宛を混和し、37°Cに2時間、更に氷室に1夜静置して溶血成績を判定した。尚この際対照として正常赤血球についての溶血試験を同時に行つた。溶血成績の判定にあつては、溶血の程度を、完全溶血Ⅲ, 不完全溶血Ⅲ, ++, +, ±, 及び非溶血-として記録した。また附表の溶血試験には最終成績のみを掲示した。

## 実 験 成 績

### 1. Gelatin 組成アミノ酸についての実験

上述の如く Gelatin はそのアミノ酸組成において他の蛋白質と著しく趣を異にしている。第1表は Gelatin, 人血清 Albumin 並びにγ-Globulin のアミノ酸組成<sup>8)</sup>を比較表示したものであるが、この表からも明らかなように Gelatin のアミノ酸組成について、その最大の特徴として、

a) Glycine 及び Proline の含量が非常に高い、

b) 特異なアミノ酸として Hydroxyproline 及び Hydroxylysine が含まれていて、而も前者の含有量が著しく大である、

c) Cystine, Cysteine 及び Tryptophane が含まれていない、

d) Tyrosine の含量が比較的に僅少である、事などが挙げられる。Gelatin のアミノ酸組成におけるこのような特異性にかんがみて、こ

に Gelatin 活性が特定アミノ酸の特性に基づくものではないかと言う事が当然予想されるわけである。そこで私は第1表に示したアミノ酸の個々について、一方では各アミノ酸を直接 TA 処置血球に作用せしめた場合における St-S 感受性の復活如何を検すると共に、他方では TA 処置血球に Gelatin とアミノ酸とを同時に作用せしめた場合における Gelatin 活性の変動の有無をしらべると言うようにして、直接、間接の2方法によつて Gelatin 活性発現における組成アミノ酸自体の意義について検討を行つた。

(a) TA 処置赤血球の St-S 感受性に対するアミノ酸の影響。

この実験では TA 処置赤血球を各アミノ酸で処置した場合、血球の St-S 感受性に果たして如何なる変化が起きるかについて検索を行つた。実験に供したアミノ酸は第1表の21種である。

実施法：上記の術式に従つて新調した TA 処置赤血球（50%赤血球浮游液 0.4ml に相当）を青木<sup>3)</sup>の方式に準じて被検アミノ酸の 1:200 食塩水溶液 4ml に浮遊せしめ、浮游液を 37°C に 20 分間孵置する。孵置後、浮游液を遠心し、赤血球を 3 回冷食塩水で洗滌した後、食塩水 20ml を加えて 1% 浮游液とした。尚この際対照として TA 処置赤血球を、アミノ酸溶液の代わりに 1:50,000 Gelatin 溶液、並びに食塩水を用いたものについても同様に孵置・洗滌を行つた後、1% 浮游液とした。斯くして得られた 3 種の TA 処置赤血球浮游液並びに正常赤血球浮游液について溶血試験を行つて、それぞれの St-S 感受性を相互に比較検討した。

第 2 表は Gelatin のアミノ酸構成において最も特異な存在である Glycine, Proline, Hydroxyproline 及び Hydroxylysine の 4 アミノ酸に関する溶血試験成績を抜き出して一括揭示したものである。この表では、対照列の正常血球、TA 処置血球及び Gelatin 再処置血球に対する St-S の溶血限界濃度は夫々 1:20mill, 1:1mill 及び 1:20mill の価を示して、TA 処置によつて正常赤血球の St-S 感受性が  $\frac{1}{2}$  に低下した事、而して一旦かく低下した St-S 感受性が Gelatin をもつての再処置によつて完全に回復した事がわかる。一方 TA 処置血球を上記アミノ酸の 1:200 溶液で再処置した場合には、St-S 溶血力は、Hydroxylysine 再処置血球では 1:500,000, また Glycine-, Proline- 及び Hydroxyproline- 再処置血球では何れも 1:1mill というように、対照の TA 処置血球に対すると全く同等の価を示した。即ち Gelatin のアミノ酸組成を最も特徴づけるこれ等アミノ酸も、TA 処置血球の St-S 感受性に対しては何等復活的影響を發揮し得ないものであることが確かめられたのである。更に第 2 表に示したもの以外の 17 のアミノ酸について行つた実験においても、これと全く同じ結果が得られたのであつて、かくして Gelatin 分子を構成している個々のアミノ酸自体には、TA 処置によつて低下した赤血球の St-S 感受性を復活せしめる作用の無いことが実証された。

(b) Gelatin 活性に対するアミノ酸の影響。  
蛋白質の生物学的活性が、分子内の特定アミノ酸に由因している場合には、そのアミノ酸を附加することによつて蛋白質活性が時として阻止的影響を受けることが知られており——例えば Hapten による免疫反応の特異的阻止現象の如し——、またこの方法を利用して逆に蛋白質の活性基を探知することも出来る。前項実験では、TA 処置血球に各アミノ酸を単独に作用せしめて血球の St-S 感受性に対するアミノ酸の直接的影響をしらべたのであるが、本項では上記の原理を応用して、Gelatin 溶液にアミノ酸を添加した場合における Gelatin 活性の影響如何を検索することによつて Gelatin 活性における組成アミノ酸の意義を間接的に窺知せんと試みた。

実施法：新調した TA 処置赤血球にアミノ酸含有 gelatin 溶液（Gelatin の 1:50,000 溶液にアミノ酸を 1:200 に添加したもの）4ml を加え、混合液を 37°C に 20 分間孵置する。次いで血球を冷食塩水で洗滌した後、食塩水をもつて 1% 浮游液とした。尚対照実験では、処置液としてアミノ酸を含有しない Gelatin 溶液並びに食塩水を用いた。最後に溶血試験を行つて各赤血球の St-S 感受性を比較測定した。

第 3 表は被検アミノ酸 21 種中 Glycine, Proline, Hydroxyproline 及び Hydroxylysine の 4 アミノ酸実験の溶血試験成績を示したものである。この表の成績では、対照の正常血球、TA 処置血球及び Gelatin 再処置血球に対する St-S の溶血限界濃度は夫々 1:20mill, 1:1mill 及び 1:20mill であり、一方 TA 処置血球を 1:200 の高濃度にアミノ酸を添加した Gelatin 溶液をもつて再処置した場合の St-S 溶血限界濃度は何れも 1:10mill の価を示しおり、これによつて Gelatin の効力がアミノ酸の附加によつて殆んど影響を受けなかつたことがわかる。またその他のアミノ酸についても第 3 表と全く同様の成績が得られた。

以上の如く、Gelatin 構成アミノ酸について行われた実験成績からは、Gelatin 活性と組成アミノ酸との関係について有意義な示唆を与え

るような知見は得られなかつたのである。

## 2. 蛋白分解酵素による Gelatin の不活性化.

前章実験によつて Gelatin の組成アミノ酸は何れも皆、それ自身単独では TA 処置血球の St-S 感受性を復活化せしめる如き作用を有していないことが明らかとなつたわけであつて、従つて Gelatin の TA 処置血球に対する特異な生物学的活性は、その分子構造自体に起源しているものと解さねばならない。そこで Gelatin の活性と分子構造との関連性を確かめるため、*B. subtilis* 産出の強力蛋白分解酵素を用いて Gelatin の消化試験を行い、蛋白消化に伴う活性の変動如何を精査した。

実施法：使用した蛋白分解酵素は *B. subtilis* var. Bioticus の培養液から分離された結晶性蛋白分解酵素（長瀬産業製品“Biopraser”；金沢大学理学部化学教室野口順蔵教授の御好意により入手）であつて、強力な Gelatin 分解作用を呈する製品である。1% Gelatin 溶液 5 ml (phosphate buffer で pH 7.2 に規正) を容れた試験管列を用意し、各管に酵素 50r 宛を加え、全管を一斉に 40°C の恒温槽に浸漬して Gelatin の消化を行わしめる。所定時間毎に恒温槽から 1 試験管を取り出し、これを直ちに沸騰水中に入れ 5 分間加熱して酵素を破壊した後、食塩水をもつて gelatin 濃度を 1:50,000 に希釈する。この希釈液を型の如く TA 処置血球に作用せしめ、最後に溶血試験を行つて Gelatin の St-S 感受性復活効力を測定した。

Biopraser 消化 Gelatin の St-S 感受性復活効力は第 4 表に示した溶血試験の成績によつて知ることが出来る。即ち Biopraser 作用前においては Gelatin は、その 1:50,000 溶液が TA 処置赤血球の St-S 感受性 (St-S 溶血価から算定して正常血球の  $\frac{1}{40}$  に低下している) を完全に回復せしめる程の強力な効果を呈したのであるが、Biopraser を 10 分間作用せしめた Gelatin ではすでにその効力は著明に減弱し、消化 Gelatin の 1:50,000 溶液によつて TA 処置血球の St-S 感受性は正常血球の  $\frac{1}{40}$  程度にまで回復したに過ぎなかつた。Biopraser の作用時間の延長と共に Gelatin 効力の減弱は愈々高度となり、こ

の実験例では酵素 90 分間作用後において消化 Gelatin の 1:50,000 液は、TA 処置血球の St-S 感受性に対し全く無効果であつた。

以上の実験成績によつて、Gelatin 活性が蛋白分子構成の崩壊と共に極めてすみやかに消失することが実証されたのである。

## 3. Gelatin 活性に対する蛋白試薬の影響.

生物学的に活性な蛋白質に特定のアミノ酸のみに選択的に反応する試薬を作用せしめて、その際における蛋白質活性の変動をしらべることによつて蛋白質分子内の活性アミノ酸残基の存否や更にその種類をも検知することが出来る。種々の酵素、ホルモン等について行われた従来の研究では、蛋白分子の活性アミノ酸残基として -SH, -NH<sub>2</sub> 及び Tyrosine 基が最もよく知られている。

さて、TA 処置血球の St-S 感受性に対する Gelatin 活性が、Gelatin 分子を構成している個々のアミノ酸自体の特性によるものではなくして、むしろ Gelatin の分子構成に由来していることが実証された結果、ここに当然 Gelatin の分子内に効果発現と密接な関係を有する活性アミノ酸残基の存在如何が問題となつてくる。そこで私は蛋白試薬による反応を適用して、活性アミノ酸残基の探索を行つた。而して第 1 表のアミノ酸組成表に明らかなように、Gelatin は Cystine 及び Cysteine を欠除して、而も Tyrosine 含量が極めて僅少であることから、この際活性基としてその態度が注目されるのは、Lysine, Arginine 等に由来する遊離 -NH<sub>2</sub> 基と Hydroxyproline, Hydroxylysine, Serine 等の -OH 基の 2 つであろう。そこで Gelatin 分子の分解を可及的に起こすことなしに、-NH<sub>2</sub> 或は -OH 基に選択的に反応する試薬として、HNO<sub>2</sub>, Formalin 及び H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (スルホン化) の 3 つを選んで、各試薬の Gelatin 活性に対する影響を検討した。

### (a) Formalin

Formaldehyde は Gelatin に作用して、その -NH<sub>2</sub> 基と強力に結合し、その結果 Gelatin

の硬化をきたすことは周知の如くである。

1% Gelatin 溶液 (pH 7.2) 5 ml に Formalin (局方試薬) 1 ml を加え、室温に 20 時間放置した後、Gelatin 溶液を食塩水で稀釈し、この稀釈溶液について TA 処置血球の St-S 感受性に対する復活効果をしらべた。溶血試験の結果は、Formalin 処置 Gelatin はもとの Gelatin とその復活効果において少しも変わる処がないと言う成績であつた。

#### (b) HNO<sub>2</sub>.

低温、酸性で蛋白質に HNO<sub>2</sub> を作用させると、アミノ基は脱アミノ化されて水酸基となるが、この際 Arginine 残基からも徐々に窒素を放出する。

Gelatin 活性に対する HNO<sub>2</sub> の影響について次の如く実験を行つた。1% Gelatin 溶液 (Acetate buffer, pH 4) に NaNO<sub>2</sub> を 0.1M に加え、混合液を氷室に 24 時間放置する。作用後、Gelatin 溶液を食塩水で稀釈して、この稀釈溶液の Gelatin 活性をもとの Gelatin のそれと溶血試験によつて比較検査をした。その結果、TA 処置血球の St-S 感受性に対する Gelatin の効力は、HNO<sub>2</sub> 作用によつて少しもそこなわれていないことが確められた。

#### (c) スルホン化。

Gelatin には Hydroxyproline, Hydroxylysine, Serine 及び Threonine に由来する脂肪属水酸基 (-OH) が比較的多量に存在し、而も前 2 者は Gelatin (Collagen) のような特殊蛋白質のみに含有されているアミノ酸であるという事情もあつて、Gelatin 効果発現における -OH 基の意義如何の問題には格別の関心もたれるわけである。Gelatin の -OH 基に対する反応としては Reitz 等<sup>9)</sup>の濃硫酸による低温処理法が最もよいとされており、この際すべての脂肪属水酸基はスルホン化されて硫酸エステルとなる。

Reitz 等の方法に従つて調製されたスルホン化 Gelatin (当研究所化学部越村三郎教授によつて合成されたものであつて、同教授の御好意に対し衷心感謝の意を表す) について、TA

処置血球の St-S 感受性に対する復活効力をしらべた結果、上記 Formalin 及び HNO<sub>2</sub> の場合と趣を異にして、Gelatin 活性がスルホン化によつて著しい障害をこうむるという興味ある成績が得られた。

第 5 表はスルホン化 Gelatin の 1:500—1:50,000 溶液で再処置した TA 処置血球についての St-S 溶血試験成績を示したものである。この表に見る如く、対照の非スルホン化 Gelatin では、その 1:50,000 溶液が、正常血球に比し  $\frac{1}{40}$  に低下した TA 処置血球の St-S 感受性を完全に復活したのに対し、スルホン化 Gelatin では、その 1:10,000—1:50,000 溶液が TA 処置血球の St-S 感受性を僅かに正常血球の  $\frac{1}{10}$  程度に復活したに過ぎなかつた。而してスルホン化 Gelatin の 1:500 溶液によつて初めて St-S 感受性の完全復活がなしとげられたのであつて、この成績からスルホン化 Gelatin の活性度はもとのものの実に  $\frac{1}{100}$  に低下していることがわかる。

以上の蛋白試薬を用いての実験によつて、Gelatin 分子内の -OH 残基が Gelatin 活性の発現に重要な意義を有することが立証されたのであるが、既述の如く Gelatin には -OH 基をもつアミノ酸として Hydroxyproline, Hydroxylysine, Serine 及び Threonine があつて、而もそれ等アミノ酸の各 -OH 基を識別判定する方法がない現状では、スルホン化による Gelatin の不活性化が果たしてこのうちの何れのアミノ酸に基づくものであるかは全く不明と言う外はない。しかし、この問題に関しては、

- a) 本研究における Gelatin 活性がタンニン酸処置を施した赤血球を対象としたものである事、
- b) Gelatin がタンニン酸に対し強力な結合能を有する事、
- c) Gelatin の Hydroxyproline の -OH 基がタンニン酸結合反応に重要な意義を有する事<sup>10)</sup>、

等を綜合する時, “スルフォン化による Gelatin の不活性化の原因は Hydroxyproline の -OH

基のエステル化にあり”, との公算が大いに有力視されるのである。

## 結 論

タンニン酸処置赤血球 (モルモット) に対する Gelatin の Streptolysin S 感受性復活活性と Gelatin の化学構造との関係について探究し, 次の諸事項を確かめた。

1) Gelatin を構成している個々のアミノ酸は何れも皆, タンニン酸処置赤血球の Streptolysin S 感受性に対して何ら復活的効力を呈し

ない。

2) Gelatin は *B. subtilis* 産出の結晶性蛋白分解酵素によつて容易にその活性を失う。

3) Gelatin に亜硝酸または Formalin を作用せしめても, その活性に影響がない。

4) スルフォン化によつて Gelatin 活性は著しく減弱する。

## 文 献

- 1) Ito, R. et al. : Jap. J. Pharmacol. (in press).
- 2) 松田雅夫 : 金大結研年報, 16 (下), 499, 1958.
- 3) 青木康三 : 同上, 17 (下), 493, 1959.
- 4) 岡本雅夫 : 同上, 17 (下), 481, 1959.
- 5) 川尻清 : 同上 (印刷中)。
- 6) Okamoto, H. et al. : Jap. J. Med. Sci.,

IV. Pharmacol., 14, 99, 1941.

7) 伊藤亮 : 日本薬物学雑誌, 28, 41, 1940.

8) 水島三一郎, 赤堀四郎 : 蛋白化学, 3, 1954.

9) Reitz, R. E. et al. : J. Am. Chem. Soc., 68, 1024, 1946.

10) Smith, R. H. : Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, 8, 217, 1957.

Table 1 Amino acid contents of gelatin, albumin, and gamma-globulin

amino acids	gelatin	human serum albumin	human serum $\gamma$ -globulin
<u>glycine</u>	30.5	1.6	4.2
alanine	9.2	—	—
valine	2.7	7.7	9.7
leucine	3.2	11.0	9.3
iso-leucine	1.5	1.7	2.7
<u>proline</u>	16.3	5.1	8.1
<u>hydroxyproline</u>	12.5	0	0
phenylalanine	2.1	7.8	4.6
tyrosine	0.69	4.7	6.8
tryptophane	0	0.2	2.9
serine	2.9	3.7	11.4
threonine	2.2	5.0	8.4
cystine	0	5.6	2.4
cysteine	0	0.7	0.7
methionine	0.8	1.3	1.1
arginine	8.8	6.2	4.8
histidine	0.67	3.5	2.5
lysine	5.1	12.3	8.1
<u>hydroxylysine</u>	1.3	0	0
aspartic acid	6.3	10.4	8.8
glutamic acid	11.7	17.4	11.8

The figures are gm residues of amino acids per 100gm protein.

Table 2 Influence of glycine, proline, hydroxyproline, and hydroxylysine on the streptolysin-S susceptibility of tanned erythrocytes

hemolysis test red cells		dilution of streptolysin S								
		1 : 100,000	1 : 200,000	1 : 500,000	1 : 1,000,000	1 : 2,000,000	1 : 5,000,000	1 : 10,000,000	1 : 20,000,000	1 : 50,000,000
TA-treated	no further treatment	###	###	++	+	-	-	-	-	-
	treated with amino acids (1 : 200)									
	glycine	###	###	++	+	-	-	-	-	-
	proline	###	###	++	+	-	-	-	-	-
	hydroxyproline	###	###	++	+	-	-	-	-	-
	hydroxylysine	###	+	±	-	-	-	-	-	-
	treated with gelatin (1 : 50,000)	###	###	###	###	###	++	+	±	-
normal red cells		###	###	###	###	###	++	+	±	-

Table 3 Influence of glycine, proline, hydroxyproline, and hydroxylysine on the restoration activity of gelatin upon the streptolysin-S susceptibility of tanned erythrocytes

hemolysis test red cells		dilution of streptolysin S								
		1 : 100,000	1 : 200,000	1 : 500,000	1 : 1,000,000	1 : 2,000,000	1 : 5,000,000	1 : 10,000,000	1 : 20,000,000	1 : 50,000,000
TA-treated	no further treatment	###	###	++	+	-	-	-	-	-
	treated with gelatin (1 : 50,000) containing amino acids (1 : 200)									
	glycine	###	###	###	##	++	+	±	-	-
	proline	###	###	###	##	++	+	±	-	-
	hydroxyproline	###	###	###	##	++	+	±	-	-
	hydroxylysine	###	###	###	##	++	+	±	-	-
	treated with gelatin (1 : 50,000)	###	###	###	###	##	++	+	±	-
normal red cells		###	###	###	###	##	++	+	±	-

Table 4      Effect of crystalline proteinase of *B. subtilis* upon the  
                 restoration activity of gelatin on the streptolysin-S  
                 susceptibility of tanned erythrocytes

hemolysis test  red cells			dilution of streptolysin S								
			1 : 100,000	1 : 200,000	1 : 500,000	1 : 1,000,000	1 : 2,000,000	1 : 5,000,000	1 : 10,000,000	1 : 20,000,000	1 : 50,000,000
normal red cells			###	###	###	###	###	++	+	±	-
TA-treated	no further treatment		###	##	+	-	-	-	-	-	-
	treated with gelatin (1 : 50,000)	non-digested	###	###	###	###	###	++	+	±	-
		10	###	###	###	##	++	-	-	-	-
		30	###	###	##	+	-	-	-	-	-
		60	###	###	##	+	-	-	-	-	-
		90	###	###	++	-	-	-	-	-	-

Table 5      Restoraion activity of sulfonated gelatin on the streptolysin-S  
                 susceptibility of tanned erythrocytes

hemolysis test  red cells			dilution of streptolysin S								
			1 : 100,000	1 : 200,000	1 : 500,000	1 : 1,000,000	1 : 2,000,000	1 : 5,000,000	1 : 10,000,000	1 : 20,000,000	1 : 50,000,000
normal red cells			###	###	###	###	###	##	++	+	-
TA-treated	no further treatment		###	##	+	-	-	-	-	-	-
	treated with gelatin (1 : 50,000)		###	###	###	###	##	++	+	±	-
	treated with sulfonated gelatin of	1 : 500	###	###	###	###	###	##	++	+	-
		1 : 2,000	###	###	###	###	##	+	±	-	-
		1 : 10,000	###	###	##	++	+	-	-	-	-
		1 : 20,000	###	###	##	++	+	-	-	-	-
		1 : 50,000	###	###	##	++	±	-	-	-	-