

核酸に因る溶連菌の溶血毒増産現象に関する研究

第 15 報

熱非働化 Streptolysin S の Streptolysin S 増産に対する効果性に就いて

金沢大学医学部薬理学教室 (主任：岡本肇教授)

杉 山 篤 弘

(受付：昭和31年8月10日)

最近当研究室に於て核酸並に精製 Streptolysin S には Ag-塩と特異的に反応して可溶性錯塩を形成する性能 (清水¹⁾) があり、而もこの場合 Streptolysin S ではその易熱性が消滅して完全なる耐熱化状態となる (正印等^{2a, b, c}) という実証が齎らされたが、^{3), 4)} この正印の研究は Streptolysin S を銀錯塩の状態 (即ち Ag-Streptolysin S-Complex) として分離する時は、温熱的影響に対し甚しく鋭敏である本毒素を目睹して分離精製の実験を行う場合と異り、活性の低下・損失を来すおそれが無い事を示すものとして甚だ重要といえよう。

然らば Ag-Streptolysin S-Complex から脱銀によつて活性の Streptolysin S を回収し得

る方途ありや否や。

私はこの問題に対し各方面から考査検討の歩を進めている内、偶々 Streptolysin S 水溶液を加熱してその溶血性を喪失せしめたものを加えたブイオンに溶連菌の移植培養を行つた実験で、その上清液が、酵母核酸を加えたブイオン培養の上清液よりも却つて溶血作用が強い事を観察し、ここに一転して“Streptolysin S の熱によつて一旦その活性を喪失せしめられたものに果して溶連菌の Streptolysin S 産出を増進せしめる性能がありや”という別の問題の攻究に移つた訳である。

以下現在迄の成果に就て報告する。

I : 熱非働化精製 Streptolysin S 加ブイオンと酵母核酸加ブイオンに於ける溶連菌の Streptolysin S 産出に就ての比較試験

先ず精製 Streptolysin S を水溶液状態に於て加熱し、その溶血力を喪失せしめたものをブイオンに加えて、之に溶連菌を接種培養すると、普通の酵母核酸を加えたブイオン培養液に

溶連菌を接種培養したものに於けるよりも Streptolysin S (以下単に St-S と略記す) の産出が高度である事に就ての実験成績から記載する。

実験方法

1) 菌 株 :

専ら教室保存の *Streptococcus hemolyticus* “S-株” を使用し、菌接種にはその普通ブイオン (pH=

7.6) 24時間培養液を以つてした。

2) 精製 Streptolysin S 及び酵母核酸 :

a) 全実験を通じ溶連菌の 1% 酵母核酸加ブイオン

* 正印の I-N-F-Streptolysin fraction は岡本等の I β -Fraction に該当する。

30時間培養液から岡本⁷⁾・正印^{2a)}等の方法に準じて精製分離した I-N-F-*Streptolysin S Fraction (類白色無晶形粉末, 溶血限界濃度=1:12,800,000; 以下之を I-N-F-Fraction 或は INF 或は精製 St-S と略記す), 又

- b) 酵母核酸としては酵母核酸ソーダ(メルク製)を使用す。

何れもその10%水溶液(ラクムス中性)を調製し, それぞれに対し100°C, 30分の処置を行う(後述の如く, 精製 St-S 水溶液ではこの場合 St-S の非偽化が起り10%液自体が溶血作用を呈しなくなる。加熱, 非加熱の如何を問はず核酸水溶液は無活性である事は勿論である)。

3) 培養液の調製:

- a) 1%熱非偽化精製 St-S 加ブイオン

前記の如く加熱非偽化の処置を行った。10%精製 St-S 水溶液0.5mlを普通ブイオン(pH=7.6) 4.5mlに加えたものに対し念のため100°C, 20分の処置を施す。

- b) 1%核酸加ブイオン⁶⁾

前記の10%核酸ソーダ水溶液0.5mlを普通ブイオン(pH=7.6) 4.5mlに加え100°C, 20分の処置を施す。

- c) 普通ブイオン(pH=7.6) 5ml

4) 培養法:

前記3種の培養液に対しそれぞれ溶連菌の普通ブイオン培養液1滴宛を滴下し, 37°Cで所要時間培養す。

5) 培養上清液における溶血力試験:

各培養液をそれぞれ遠心沈澱(3,000r.p.m., 15')に附し, 得たる上清液について溶血力の比較試験を行う。溶血試験法としては当教室慣用の上清液の生理的食塩水による倍加稀釈液1ml宛に対し1%家兎赤血球浮遊液1mlを加え37°Cの孵卵器に納め, 2時間目に一旦成績を読み, 更に22時間氷室中に静置せしめたものについて溶血の有無強弱を確め, その成績を記載す。

実験成績

第1表に於てA欄は I-N-F-Streptolysininfra-

ction を10%に蒸留水に溶解したものと, 酵母核酸ソーダを10%に蒸留水に溶解したものの二者に対し蒸気釜中で100°C, 30分の処置を施してから溶血力を検した成績であつて, ここに元来1:12,800,000迄溶血作用を呈する精製 St-S が10%(1:10)水溶液状態で100°C, 30分加熱せられる事によつてそれ自体(1:10液)でも全く溶血性の存在が検証されなくなつており, 無活性の点では恰も酵母核酸に於けると同様である事を見る。

而してB欄は斯くして得られた二つの溶液から, 夫々1%熱非偽化精製 St-S 加ブイオン5mlと1%核酸加ブイオン5mlとを調製し, 之に対し別に普通ブイオン5mlの1管を併置し, 之等三つの培養液に同時に溶連菌を接種し37°C下に培養する事30時間の後に夫々から分離した遠心上清液に就て溶血力を試験して得た成績を示したものである。

即ち溶連菌の普通ブイオン培養上清液では漸く1:16~32倍の稀釈度迄しか溶血が起つているに過ぎない(即ち溶血値は1:32)に対し, 1%核酸加ブイオン培養の上清液に於ては1:16,000*液迄溶血が起つており, 更に1%熱非偽化精製 St-S 加ブイオン培養の遠心上清液では1:65,000の高稀釈度迄溶血が起つているのを見る。即ちこの実験では熱非偽化精製 St-S によつて酵母核酸の4倍に相当する St-S 増産が起つたという成績である。而して多数の実験例を通じて, 精製 St-S を10%水溶液状態として100°C, 30分で熱非偽化せしめたものを以つて調製した1%熱非偽化精製 St-S 加ブイオンに溶連菌を接種培養すると, St-S の増産が起り, その程度は1%核酸加ブイオンに溶連菌を培養して St-S を産出せしめた場合に対比して4~8倍にも及ぶものがあるという結果が得られた処から, 次いでこの1%熱非偽化精製 St-S 加ブイオン培養に於ける溶連菌に因る St-S 増

*酵母核酸の Sevag 法⁷⁾によつて精製したものを以つてしてもこの溶血値には大差がない。又0.5%酵母核酸加ブイオン培養では上清液の溶血値は1%のものに過ぎない。

産状況の時間的關係、及び精製 St-S 水溶液に対して行う加熱処置の温度的並に時間的關係からの吟味考査を行った。

1) 溶連菌の1%熱非尙化精製 St-S 加ブイオン培養に於ける St-S 増産の時間的關係

先ず10%精製 St-S 水溶液に対し100°C, 30分の処置を施す。次いで溶血試験によつて此の溶液が完全に溶血性を欠く事を実証した後、既述の方式に従つて1%熱非尙化精製 St-S 加ブイオン (pH=7.6) 20mlを調製、之に対し溶連菌を接種した後、37°C の孵卵器に納む。斯くて培養18, 22, 26, 30及び34時間目と逐時的に培養液から2ml宛を取り出し、其の都度各その遠心上清液に就て溶血力試験を行う。

第2表はその成績を示したものである。即ち培養18時間の上清液の溶血値は1:3,200~6,400, 22時間のそれは1:12,800~25,600, 培養26時間目のそれは1:25,600~51,200 という具合に培養時間の経過と共に溶血力の増大を来し、30時間培養で1:51,200 となつてゐる。然し培養34時間では溶血値が1:25,600~51,200と幾分低下の傾向を示している事を見る。これによつて少くとも溶血値が最大を示す時期は大体培養30時間前後である事を知る。

2) 10%精製 St-S 水溶液に対する加熱条件を異にせしめた場合の実験

以上の実験に用いた1%熱非尙化精製 St-S 加ブイオン培養液は何れも10% I-N-F-Streptolysinfraction に対し100°C, 30分の処置を施したものを以て調製したものであるが、然らば此の10%精製 St-S 水溶液に対する温度或は加熱時間を変化せしめた場合に、之が St-S 増産実験の成績に影響する処が無いであろうか。此の間の消息を明かにすべく次の

実験を行つた。

a) 100°Cに於ける加熱時間を変化せしめた場合

10%精製 St-S 水溶液20mlを入れた試験管を蒸気釜内に置き、之より10分後、30分後、60分後、120分後及び240分後と逐次的に2.5ml宛を分取したものを用意す。次いで各分取液 (2.5ml) から0.5ml宛を取り、夫々に普通ブイオン (pH=7.6) 4.5mlを加えた5本の培養液を調製す。斯くて此の五つの培養液に溶連菌のブイオン培養液1滴宛を移殖し、37°C, 30時間培養した後、型の如く夫々の培養上清液に就て溶血試験を行う。各分取液の残部 (2.0ml) に就ては直接溶血試験を行い St-S の非尙化が完全であるかを検す。

第3表はその成績を示したものである。即ち各上清液は1:51,200迄溶血作用を示し、その間に殆ど差違が無いという結果である。

b) 加熱温度を変化せしめた場合

10%精製 St-S 水溶液3ml宛を入れた試験管3本を用意し、第1管には80°C, 30分; 第2管には100°C, 30分; 第3管には120°C, 30分の処置を施す。次いで各管から0.5mlを取り、夫々を4.5mlの普通ブイオン (pH=7.6) に加え、之等3本の培養液に対し各1滴宛の溶連菌培養液を接種した後、37°C の孵卵器に納め、培養30時間後、各其の遠心上清液に就て一斉に溶血試験を行う。

第4表提示の如く10%精製 St-S 水溶液に対する加熱非尙化温度が80°C, 100°C, 120°Cと異つても St-S 増産実験の方には全然影響 (増産度の低下・高上) する処が無いという成績であつた。

II : 精製 St-S に対し〔熱非働化→St-S 増産能試験→St-S の分離精製〕の操作を反復した場合の実験

上記第 I 項の実験で精製 St-S を水溶液状態に於て加熱非働化したものを加えたブイオンでは酵母核酸を加えたブイオンよりも、溶連菌に因る St-S の増産が寧ろ高度に現れるという事が証明された訳であるが、然し之だけの実験成果では直ちに以つて非働化 St-S 自身に溶連菌に対する St-S 増産作用があると断ずる事は早計である。何となれば I-N-F-Streptolysin fraction は化学的に純粹であるとは云い難く、之には St-S の外に尚酵母核酸が夾雑しているという可能性があり^{2a)}、従つて此の精製 St-S 標品の熱非働化したもので溶連菌に因る St-S の増産が起つたとて、之が熱非働化 St-S によつて惹起されたのではなくて酵母核酸の混在があつた為めではないかとも考えられる節があるからである。勿論此の問題は化学的に純粹な St-S を以つてすれば一挙に解決せられる訳であるが、St-S 分離に関する研究が現在到達している状態^{3), 4), 8), 9)}では取得された St-S 標品に酵母核酸の混在が全く無いという事は保証し難いものがあるのであるから、本実験の様な場合には、たとえ少量であつたとしても、I-N-F-Streptolysin fraction に酵母核酸の混在があるとして考査を進めた方が無難といえよう。私は若し熱非働化精製 St-S では溶連菌の St-S 産出に対する催進作用が無いものならば、一定量の精製 St-S を秤取し、之に対し〔熱非働化→St-S 増産能試験→St-S の分離精製〕なる一連の操作実験を順次繰返して行くならば、たとえ酵母核酸の混在はあつたとしても、之は其の都度消耗・減少の一途を辿り、此の事が培養試験に於て St-S 増産の低下として反映するであろう、との想定の下に考査を進めたのである。

実験方法

先づ加熱消毒した10%酵母核酸ソーダ水溶液150ml に1,500mlの普通ブイオンを加えて1%核酸加ブイオ

ンを調製、これに溶連菌の接種を行つて、37°Cに30時間培養する。この培養液の遠心上清液(溶血値=1:12,800)に対し岡本・正印等の分離精製法を適用して I-N-F-Streptolysin fraction [即ち INF-(1)] 3,750mg を取得し、これを原料として次の如く〔熱非働化→St-S 増産能試験→St-S の分離精製〕の操作を順次3回行つた。即ち

I Exp: 原料 INF-(1) の10%水溶液35ml を100°C, 30分加熱非働化せしめたものを普通ブイオン350ml に加えて調製した1%熱非働化 INF-(1) 加ブイオン385 ml に対し、型の如く溶連菌を接種した後37°C, 30時間培養す。この培養上清液(溶血値=1:51,200) から前記と同様の方式に従つて INF-(2) の1,400mg を得。

II Exp: INF-(2) の10%水溶液12ml を100°C, 30分加熱非働化せしめたものを普通ブイオン120ml に加えて1%熱非働化 INF-(2) 加ブイオンを調製、これに溶連菌を接種、37°C, 30時間培養す。この培養上清液(溶血値=1:51,200) に対し、前回と同様に岡本・正印等の方式に従つて INF-(3) 580mg を得。

III Exp: INF-(3) の10%水溶液4 ml に100°C, 30分の非働化操作を施した後、これに普通ブイオン40ml を加えて1%熱非働化 INF-(3) 加ブイオンを調製す。次いでこの培養液に型の如く溶連菌を接種した後37°C, 30時間培養す。斯くて得た培養上清液(溶血値=1:102,400) に対し前記同様の方式に従つて INF-(4) 120mg を取得す。

実験成績

第5表 a は実験過程並に各実験に於ける培養上清液の溶血値、及び夫々の上清液から取得された I-N-F-Fractions [(1), (2), (3)及び(4)] の溶血力試験等を総括的に展示したものである(培養上清液の溶血値は夫々の実験時に検査して得た成績であるが、之等から取得された I-N-F-Fractions [(1), (2), (3)及び(4)] の溶血試験は、第5表 b に示した様に、各 Fraction を以つて同時に行つたものである)。

こゝに四つの培養上清液の溶血試験の成績の対比に於て、溶血値が減少するどころか、12,8

00×, 51,200×, 51,200×, 102,400×という具合に実験毎に却つて上昇の傾向を辿っており、而も同様の関係が其等からの INF 分離試験の成績にも反映 (溶血限界濃度は INF-(1)=1:12,800,000; INF-(2)=1:25,600,000; INF-(3)=1:25,600,000; INF-(4)=1:51,200,000) しているという所見は、正に加熱によつて非偽

化された St-S 自身に溶連菌の St-S 産出を促進せしめる性質がある。即ち換言すれば「精製 Streptolysin S 標品の熱非偽化したものの存在下で起る溶連菌に因る Streptolysin S の増産現象は非偽化状態にある Streptolysin S 自体の性能の顕現に外ならない」、事を教示しているものといえよう。

III : 熱非偽化精製 St-S 水溶液に就ての透析実験

今迄しばしば述べて来た様に、熱非偽化精製 St-S では酵母核酸よりも溶連菌の溶血毒産出を促進せしめる作用が強力であるという事実に当面したのであるが、然らば St-S が水溶液状態で熱非偽化された場合に如何なる状態にあるものであろうか。

これより、伊藤^{3),10)}は酵母核酸に対するアルカリ或は酸分解の実験に於て、酵母核酸の Polynucleotide 構成とその St-S 増産に対する効果 (即ち核酸効果) の発現性とは不離不測の関係に立ち、核酸分子の分解 (Mononucleotides, Nucleosides, Purine-及び Pyrimidine-塩基, Ribose, 燐酸等への解重合或は解裂) は直ちに以つて核酸効果発現性の消滅と反映する事を実証報告したが、此の事に対し既述の成績を相照合せしめて考察するならば、St-S が水溶液状態で加熱非偽化される場合、其の分子構造に於ける活性基に異変があつても、小分子化合物に破壊分裂される様な事がなく、基本的には依然高分子構成状態を保持しているであろう事が推想に難くない処である。免に角此の間の消息に関し何等か手懸りを得るべく、ここに熱非偽化精製 St-S 水溶液に就て透析実験を行つた訳である。

即ち第6表aは I-N-F-Streptolysinfrac-tion (溶血限界濃度=1:12,800,000) 2,050mgを秤取し、その中、

1) 50mgに就ては、既述の如く、10%水溶液とし100°C, 30分で非偽化した後、St-S 増産能を試験し、

2) 2,000mgを100mlの蒸留水に溶解し、ここに得た2%の水溶液に対し100°C, 30分で熱非偽化の処置を行つた後、之から45ml宛を分取し、

a) 一方の45mlに対しては之に直接アルコール・エーテルによる沈澱操作を施して、白色粉状の物質670mg(A-Sample)を得、

b) 他方の45mlはセロファン嚢に収めて蒸留水中で24時間透析した後、その膜内液に対し、上記a)と同様のアルコール・エーテルによる沈澱操作を施して白色粉状の物質(D-A-Sample) 700mgを得、

C) 此のA-及びD-A-Sampleの夫々に就て同一条件のもとに、

i) 一方に於ては10%水溶液状態で100°C, 30分熱非偽化した後、St-S 増産能を試験すると共に、

ii) 他方では各Sampleを直接生理的食塩水に溶解したものに就て溶血力を試験する、

という一連の並行実験を遂行して得た成績を展示したものである。

ここにA-及びD-A-Sampleに就てそれ自体の溶血力を試験した所以は、嚢に岡本等⁸⁾によつて熱非偽化精製 St-S 水溶液に対し、沈澱乾燥の操作を施すと一部溶血性の復帰、即ち再活性化、が起る事が報告されている事に鑑みて、此の非偽化精製 St-S 水溶液からアルコール・エーテル沈澱という純理学的操作によつて招致される St-S の再活性化が、溶連菌の培養

試験に於ける St-S の増産度に対比せしめて如何なる程度のものであるかを窺知せんとした為めのものに外ならぬのである。

即ち本表に於て特に注目すべき事項は：

1) 先ず 2% I-N-F-Streptolysinfraction 水溶液の 100°C, 30分加熱非偽化したものを対象として考査を進めた実験では、

a) 本水溶液の 45ml に対し直接アルコール・エーテル沈澱法を施すことによつて得た A-Sample の収量が 670mg であり、他方本水溶液 45ml に対し一旦透析操作を施した後にアルコール・エーテル沈澱法を施して得た D-A-Sample の収量が 700mg であつて、透析の方が却つて幾分収量が多い点、

b) 此の A-及び D-A-の両 Sample に対し、夫々 10% 水溶液状態で熱非偽化したものに就て行つた溶連菌の St-S 増産能試験では、培養上清液の溶血値が何れも 1:51,200 である点、

c) A-及び D-A-Sample 自体の溶血力試験では両者共に溶血限界濃度 = 1:8,000 である点、

2) 他方また、熱非偽化 10% I-N-F-Streptolysinfraction 水溶液を用いて行つた溶連菌の St-S 増産能試験でも培養上清液の溶血値 = 1:51,200 の成績が得られている事に注目すべきであろう。

即ち之等の成績を相互対比考察する事によつて、少くとも St-S 水溶液に対し 100°C, 30分

の処置を施しても活性基の破損以外に St-S 分子の高度破壊が起らず、依然高分子状態* が保持されていて、之が溶連菌の St-S 産生を増進せしめるものであろう事が知られるのである。

尚、本実験に於ける副所見に就て述べれば、

1) A-Sample が重量基準で溶血限界濃度 = 1:8,000** を示している事に関して：

此の事が 100°C, 30分加熱した INF 水溶液中に微量の活性状態の St-S が残存している為めのものでなく、アルコール・エーテル処置によつて非偽化 St-S に再活性化が起つた事によるものである事は、加熱した 2% (1:50) I-N-F-Streptolysin S 水溶液自体にさえも溶血作用が証明されないに拘らず、此の溶液 45ml から取得された A-Sample 670mg の 1/10 量即ち 67mg を取り、之を同じく原溶液の 1/10 量即ち 4.5ml に溶解して溶血試験を行つて陽性成績が得られている事から明白である。

勿論此の関係は D-A-Sample に於ても同様である。

2) A-或は D-A-Sample の熱非偽化 10% (1:10) 水溶液に就て行つた溶連菌の St-S 産生に対する増産試験で、培養上清液がその 51,200 倍の稀釈度迄溶血作用をしている事は、A-或は D-A Sample の重量基準に換算すると溶血限界濃度 = 1:5,120,000*** (51,200 × 100) となるのであつて、以つて溶連菌に因る St-S 形成が如何に効率的なものであるかが窺知されよう。

* 「溶連菌の特異性能によつて Ribo- 核酸が直接 St-S に転化する」という岡本,^{3) 8)} 細谷¹¹⁾ 等の所説に従えば、熱非偽化 St-S は酵母核酸よりも St-S に転化し易い Polynucleotide 構成体である事となる訳である。処で岡本等によつて Ribo- 核酸による溶連菌の Streptolysin S 増産現象を核酸効果と略称されているのであるが、本論文では酵母核酸を以つての対照実験が行われており、この記載との混乱を避けるために、熱非偽化 Streptolysin S による Streptolysin S 増産現象に対しては核酸効果なる表現は用いなかつた。

** A- 或は D-A-Sample (溶血限界濃度 = 1:8,000) は I-N-F-Streptolysinfraction (溶血限界濃度 = 1:12,800,000) に対比して 1/1,600 の力価であるから、I-N-F-Fraction の熱非偽化されたものの、1/1,600 量が再活性化されたという計算になる訳である。

*** この計算値は I-N-F-Streptolysinfraction の大体 1/2 力価に該当する。

因みに念の爲め、酵母核酸に就て行つた実験の成績をここに併置せば第6表bの如くであ

結

- 1) 精製 Streptolysin S 標品を水溶液状態に於て加熱非活化したものを原液として調製した1%熱非活化精製 Streptolysin S 加ブイオンに対し、溶連菌を移植培養すると Streptolysin S の著しい増産が起るといふ現象に当面した。
- 2) そこで此の現象に対し
 - a) 熱非活化精製 Streptolysin S と酵母核酸とに就ての溶連菌の Streptolysin S 産出に対する効果性の比較実験、
 - b) 熱非活化精製 Streptolysin S の溶連菌に対する Streptolysin S 増産効果が〔熱非活化→Streptolysin S 増産能試験→Streptolysin S の分離精製〕という操作の反

文

- 1) 清水隆作：薬学雑誌, 76, 158, 1956.
- 2a) Shoin, S. : Japan. J. Exp. Med., 24, 13, 1954. b) 山本 泰：十全医学会雑誌, 57, 2200, 1955. c) 有沢和夫：同誌, 58, 54, 1956.
- 3) 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.
- 4) 岡本 肇：核酸による溶連菌の溶血毒増産現象に基づく研究その後の成果, 細菌毒素シンポジウム, 1, 93, 1955.
- 5) Okamoto, H., Kyoda, S. und Ito, R. : Japan.

る。

語

- 復で如何に影響されるかの追究、及び
- c) 熱非活化精製 Streptolysin S に対する透析実験並に再活性化実験、
- 等、各方面からの吟味検討を加えた。
- そしてその結果として
- 「Streptolysin S の熱非活化されたものには溶連菌の Streptolysin S 産生を催進・増強せしめる性能がある、
という結論に到達した。
- 尚、Streptolysin S の水溶液状態に於ける熱非活化では毒素分子に於ける活性基の破損があつても、其の基本構造（恐らく Polynucleotide 構成）には異変が起らないだらう事も推定された。

献

- J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 14, 99, 1941.
- 6) Okamoto, H. : ibid, 12, 167, 1940.
- 7) Sevag, M. G., Lackman, D. B. and Smolens, J. : J. B. C., 124, 425, 1938.
- 8) 岡本, 松田, 京田：日本薬物学雑誌, 33, 370, 1941.
- 9) Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 90, 373, 1949.
- 10) Ito, R. : Japan., J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 13, 85, 1940.
- 11) 細谷, 林, 本間, 江上, 八木, 鈴木：基礎と臨床, 1, 211, 1943.

Taale 1.

Heat-inactivation experiments of I-N-F-streptolysin S fraction in aqueous solution, and test for streptolysin S formation promoting activity of heat-inactivated streptolysin S sample thus obtained

250 mg of I-N-F-streptolysin S fraction (Minimum Hemolytic Concentration=1:12,800,000) was dissolved in 2.5 ml of distilled water.

After heating, in a steam sterilizer, at 100° C for 30 minutes, the streptolysin solution (10%) was tested for its hemolytic activity on the one hand, and tested for its streptolysin formation producing activity on the other.

1) Hemolysis test:

1 ml of 1% rabbit's red cell suspension was added to 1 ml of each serially diluted streptolysin solution to be tested — a parallel series with heated solution of sodium yeast nucleate (10%) being run in this experiment.

All tubes were incubated for 2 hours at 37° C, and reading was taken after standing overnight in an ice-box.

2) Test for streptolysin formation producing activity:

To 0.5 ml of the heated solution of I-N-F-streptolysinfracrion, 4.5 ml of ordinary meat-infusion broth(pH=7.6) was added. The medium thus prepared, after inoculating with one drop of broth-culture of hemolytic streptococcus, was placed in an incubator at 37° C. After 30 hours, the culture fluid was centrifuged at high speed, and the clear supernatant obtained was tested for hemolytic activity.

Two parallel experiments, i. e., production of streptolysin in 1% sodium yeast nucleate broth and that in ordinary broth, were set up in this experiment.

A	Dilution of test solution																					
	Comparative hemolysis test on		10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240	20,480	40,960	81,920	163,840	327,680	655,360	1,310,720	Control	
	Heated solution of I-N-F-streptolysinfracrion		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	-
	Heated solution of sodium yeast nucleate		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	•	•	•	•	•	•	-
B	Dilution of supernatant																					
	Comparative hemolysis experiment with supernatant of culture of hemolytic streptococcus grown on		1 (1:100)	2 (1:200)	4 (1:400)	8 (1:800)	16 (1:1,600)	32 (1:3,200)	64 (1:6,400)	128 (1:12,800)	256 (1:25,600)	512 (1:51,200)	1,024 (1:102,400)	2,048 (1:204,800)	4,096 (1:409,600)	8,192 (1:819,200)	16,384 (1:1,638,400)	32,768 (1:3,276,800)	65,536 (1:6,553,600)	131,072 (1:13,107,200)	Control without supernatant	
	Broth containing 1% heat-inactivated I-N-F-streptolysinfracrion		###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	-
	Broth containing 1% heated sodium yeast nucleate		###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	##	+	-	-	-	-
	Broth		###	###	##	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Remarks: a) ### indicates complete hemolysis ;
 ##, ++ and + indicate partial hemolysis ;
 - indicates no hemolysis.

b) The figure in parenthesis () represents concentration on a weight basis, of I-N-F-streptolysinfracrion or sodium yeast nucleate.

Table 2.
Production of Streptolysin S by *Streptococcus hemolyticus* in broth containing 1% heat-inactivated I-N-F-streptolysinfracation in relation to age of culture

Age of culture in hours	Dilution of supernatant												Control (without supernatant)	
	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1,600	1: 3,200	1: 6,400	1: 12,800	1: 25,600	1: 51,200	1: 102,400	1: 204,800		
18	###	###	###	###	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-
22	###	###	###	###	###	###	++	+	±	-	-	-	-	-
26	###	###	###	###	###	###	###	++	+	±	-	-	-	-
30	###	###	###	###	###	###	###	###	++	+	-	-	-	-
34	###	###	###	###	###	###	###	++	+	±	-	-	-	-

Table 3.
Streptolysin formation experiments with I-N-F-streptolysinfracation solution heated at 100° C for various lengths of time

2.0 gm of I-N-F-streptolysinfracation (M. H. C.=1:12,800,000) was dissolved in 20 ml of distilled water. This streptolysin solution (1:10) was placed in a boiling water-bath, and then 1 ml of the solution was removed at various intervals of time, i. e., 10, 30, 60, 120 and 240 minutes.

To each 0.5 ml of the solution removed, 4.5 ml of ordinary broth was added, and 5 culture fluids thus prepared were inoculated with hemolytic streptococcus. After incubating at 37° C for 30 hours, each culture fluid was centrifuged, and the clear supernatants thus obtained were titrated for hemolytic activity.

Culture media of hemolytic streptococcus	Dilution of supernatant												Control (without supernatant)	
	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1,600	1: 3,200	1: 6,400	1: 12,800	1: 25,600	1: 51,200	1: 102,400	1: 204,800		
9 vol. of broth + 1 vol. of 10% I-N-F-streptolysinfracation solution heated at 100° C for	10 minutes	###	###	###	###	###	###	###	++	+	+	-	-	-
	30 minutes	###	###	###	###	###	###	###	###	++	+	-	-	-
	60 minutes	###	###	###	###	###	###	###	###	++	+	-	-	-
	120 minutes	###	###	###	###	###	###	###	###	++	+	-	-	-
	240 minutes	###	###	###	###	###	###	###	###	++	+	-	-	-

Note: Even after heating for 10 minutes, 10% I-N-F-streptolysinfracation solution in itself was found to be non-hemolytic.

Table 4.
Streptolysin formation experiments with I-N-F-streptolysin fraction solutions heated for 30 minutes at different degree of temperature

Culture media of hemolytic streptococcus	Hemolysis test	Dilution of supernatant											Control without supernatant		
		1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1,600	1: 3,200	1: 6,400	1: 12,800	1: 25,600	1: 51,200	1: 102,400		1: 204,800	
9 vol. of broth + 1 vol. of 10% I-N-F-streptolysin fraction solution heated for 30 minutes at	80° C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
	100° C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
	120° C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

Note: Even after heating at 80° C for 30 minutes, 10% I-N-F-streptolysin fraction solution in itself was found to be non-hemolytic.

Table 5 a.

Showing the summarized data of a series of experiments concerning streptolysin S formation promoting activity of heat-inactivated streptolysin S samples

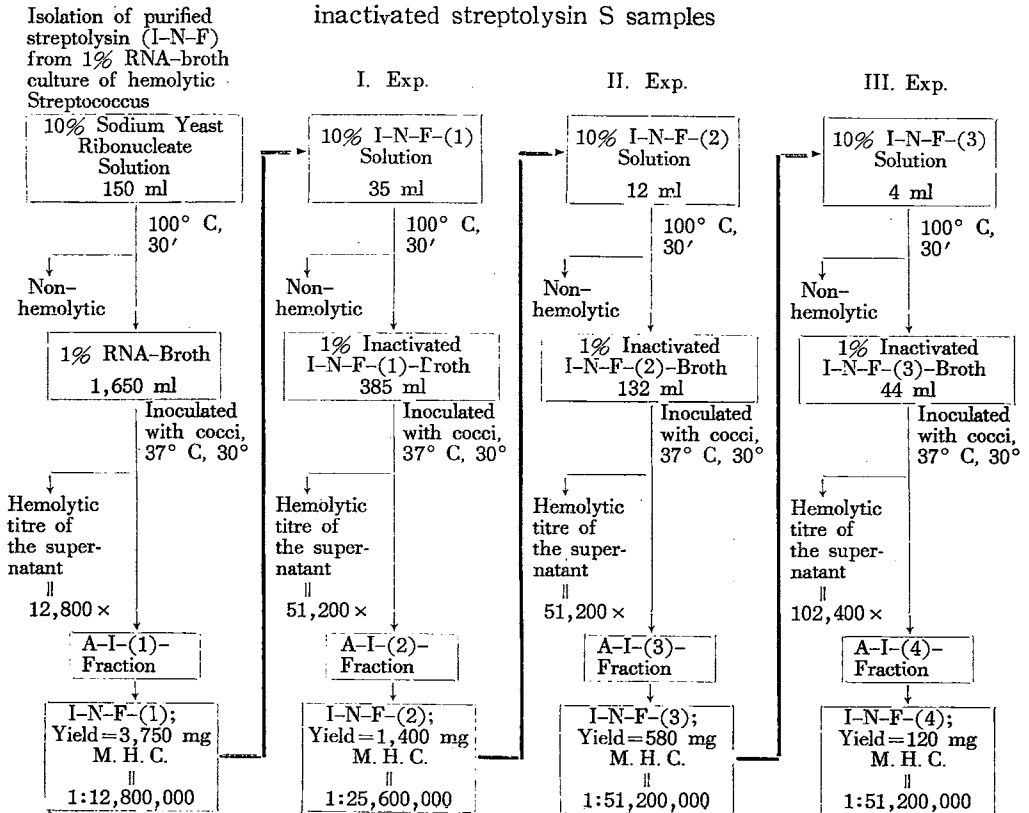


Table 5 b.
Comparative hemolysis test with four streptolysin S samples,
I-N-F-(1), I-N-F-(2), I-N-F-(3) and I-N-F-(4)

The hemolytic activity of four samples were titrated at a time

Streptolysin samples tested	Dilution of sample on a weight basis											Control (without streptolysin)	
	1:10,000	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	1:102,400,000		1:204,800,000
I-N-F-(1)	###	###	###	###	###	###	##	+	-	-	-	-	-
I-N-F-(2)	###	###	###	###	###	###	###	##	+	-	-	-	-
I-N-F-(3)	###	###	###	###	###	###	###	###	##	+	-	-	-
I-N-F-(4)	###	###	###	###	###	###	###	###	##	+	-	-	-

Table 6 a.
Heat-inactivation, dialysis, reactivation experiments and streptolysin formation test with heat-inactivated streptolysin samples

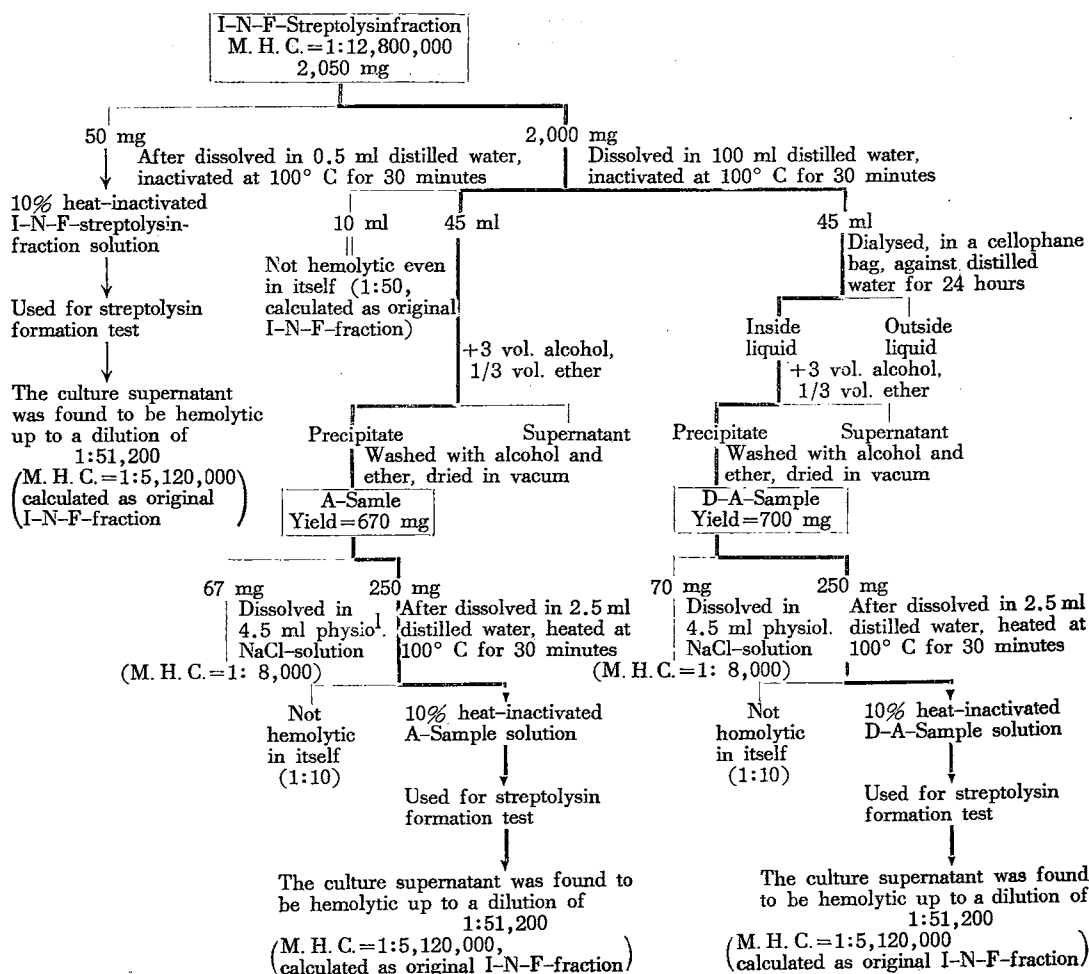


Table 6 b.
Control experiments with sodium yeast ribonucleate sample

