核酸ニ因ル溶血性連鎖狀球菌ノ溶血毒 増産現象ニ關スル研究

第 6 報

溶連菌溶血毒素ニ對シ特異的ニ強力ナル 解毒作用ヲ發揮スル化學物質ニ就テ

伊 藤 亮

(金澤醫科大學藥物學教室〔主任 石坂教授〕)

(昭和十五年十月十六日受付)

緒 言

曩ニ余ハ溶血性連鎖狀球菌ノ1%核酸加ふいおん培養ヨリ分離精製シ得タル強力無比ノ溶連菌溶血毒素ヲ以テ行ヘル免疫試験ニ於テ該溶血毒素ノ前處置ヲ受ケタル家兎ノ血清ハ正常家兎ノ血清ヨリモ溶血毒素ニ對シ強キ抗溶血作用ヲ呈スルモノナル事ヲ實證報告セルガリ、其ノ後本溶血毒ニヨル抗溶血性免疫血清ノ成立ニ關シ更ニ詳細ナル實驗ヲ重ネタル處其ノ結果トシテ、

- 1) 溶連菌溶血毒ノ反覆注射ヲ受ケタル家兎ハ當該溶血毒素ニ對スル抵抗力ノ增強ヲ來シ、而モ
 - 2) 其ノ血清ハ溶血毒ニ對シ正常家兎血清ヨリモ強キ抗溶血作用ヲ呈スルモノナル事ハ前回報告セル所ニ一致ス、然レドモ
 - 3) 免疫操作ノ途中溶血毒注射ニ耐ヘ得ズシテ斃死セル家兎ノ徒ニ多ク、幸ニ耐ヘ得テ殘存セルモノニアリテモ、之ニヨツテ高メラレタル抗溶血力ハ正常家兎血清ノソレニ比シ5—10倍スル程度ニ過ギズ、強力ナル抗溶血性免疫血清ノ獲得ハ至難ノ事ニ屬シ、
 - 4) 溶連菌溶血毒作用ノ防除ニ關シ之ガ問題ノ解決ヲ免疫學の方面ニ攷求セントスルハ極メテ不利ナリ、
- トノ結論ニ到達セリ、

茲ニ於テ余ハ一轉シテ藥理學の方面ヨリ溶血毒ニ對スル解毒性化學物質ノ探求ニ努メタル結果遂ニ Trypanblau, Kongorot ノ如キ Benzidin-系-Bisazo-色素ノ一群(以下之ヲ Trypanblau-系色素ト略稱ス)ガ溶連菌溶血毒ニ對シ全ク特異的ニシテ而モ極メテ強力ナル解毒作用ヲ發揮スルモノナル事ヲ實證シ得タルヲ以テ茲ニ今日迄確定シ得タル成績ニ就テ報

告セント欲スルモノナリ。

1. 溶連菌溶血毒ニ對スル試験管内解毒試験

1. Trypanblau ノ溶連菌溶血毒ニ對スル抗溶血作用

a. 精製溶連菌溶血毒 (以下之ヲ Streptolysin ト稱ス) ヲ以テノ實驗

實驗方法

Streptolysin トシテハ余等ノ方法ニヨツテ溶連菌ノ1%核酸加ぶいおん24時間培養ヨリ分離セル A-I-Fraktion ノ家兎赤血球ニ對シ試験管内ニ於テ1000—2000萬倍稀釋液迄溶血作用ヲ發揮スル強力ナルモノヲ使用セリ²⁻⁵⁾。

而シテ本溶血毒素ハ常ニ之ヲ0,85%食鹽水ヲ以テ0,1—0,2%ニ溶解セシメタルモノヲ原液トシテ用意シ置ケリ。

先ヅ試験管立ニ所要數ノ試験管ヲ架列シ、下表ノ如ク Streptolysin-液ノ2又ハ2,5倍宛ノ遞下稀釋液各1ccmニ對シ、一定濃度ノ Trypanblau-液1滴宛ヲ滴下シ、充分振盪混和シタル後、之ニ直ニ1%家兎赤血球浮游液 (脱纖維血液ヲ4回食鹽水ヲ以テ洗滌セルモノ) 1ccm宛ヲ加ヘ再ビ振盪シタル後解籠中 (37°C) ニ納ム。同時ニ Streptolysin ノ2又ハ2,5倍宛ノ遞下稀釋液各1ccmニ對シテ何等 Trypanblau ヲ加フル事ナク、單ニ1%家兎赤血球浮游液1ccm宛ヲ加ヘタルモノヲ對照トシテ置ケリ。而シテ何レモ血液ヲ混和シテ解籠中ニ置ク事2時間、後更ニ22時間氷室内ニ靜置セシメタルモノニ就テ、彼此ノ溶血力ヲ比較對照シ以テ Trypanblau 存在ニヨル Streptolysin 溶血力ノ抑制程度ヲ判斷セリ。

尙 Trypanblau ノ滴下ニハ普通ノ1ccm Messpipett ヲ使用セリ、而シテ此 Pipett ノ相違スルニ從ヒ滴量ニ大小ノ差アルヲ以テ、溶血試験ニ際シテハ常ニ各使用 Pipett 毎ニ之ヨリ滴下セシメタル Trypanblau-液ノ全消費量ト其ノ滴下數トヲ明記シ置キ、此ノ兩者ノ比ヨリ各1滴ノ容量ヲ求メ、以テ溶血めぢうむ2ccm (即チ Streptolysin ノ稀釋液1ccm+1%赤血球浮游液1ccm) 内ニ於ケル Trypanblau ノ作用濃度ヲ算出提示セリ。

溶血抑制試験術式。

試験管番號	1	2	3	4	5	6	7	8
0,85%食鹽水	1,0)	1,0)	1,5)	1,0)	1,0)	1,5)	1,0)	1,0)
Streptolysin (原液1:50)	1,0→	1,0→	1,0→ ↓ 0,5	1,0	1,0	1,0→ ↓ 0,5	1,0	1,0 ↓ 1,0
Streptolysin / 稀釋倍數 *	1:100	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000	1:20000
Trypanblau 原液 (1:10,000)	1滴 (0,05)	1滴 (0,05)	1滴 (0,05)	1滴 (0,05)	1滴 (0,05)	1滴 (0,05)	1滴 (0,05)	1滴 (0,05)
1%赤血球浮游液	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Trypanblau / 作用濃度	1:40萬	1:40萬	1:40萬	1:40萬	1:40萬	1:40萬	1:40萬	1:40萬
判 定	37°C 2時間, 氷室 22時間後.							

注意: * 溶血めぢうむハ2ccmナルヲ以テ溶血毒ノ實際ニ作用スル濃度ハ表中ニ稀釋倍數トシテ提示セルモノ、1/2ナルモ、茲ニハ前回報告ニ於ケル如ク遞下稀釋液調製時ノ濃度ヲ以テ示シタリ。

實 驗 成 績

第1表ノ各實驗列ハ Streptolysin ニ對スル Trypanblau 1: 540 000—46 500 000 液ノ影響ヲ比較セル成績ナルガ、以テ Trypanblau ノ抗溶血性ノ如何ニ強力ナルモノナルカヲ識リ得ベシ。

即チ對照實驗列ニ於テハ Streptolysin ニヨリ 1: 20 000 000 ノ稀釋液迄 (即チ溶血限界濃度 1: 2 000 萬ナリ。) 溶血作用ヲ認メ得ルモ、Trypanblau ガ 1: 46 500 000 ノ濃度ニ存在スル實驗列4ニアリテハ溶血限界濃度ハ 1: 2 000 000 ニシテ溶血力ハ對照ニ比シ已ニ 1/10 ニ減弱セルヲ見ル。

而シテ Trypanblau ノ作用濃度ノ大トナルニ從ヒ抗溶血作用モ亦強大ニ現ハレ Trypanblau ノ作用濃度=1: 5 560 000 ノ實驗列2ニアリテハ溶血力ハ 1/100 ニ減弱シ、更ニ濃度 1: 540 000 ノ實驗列1ニ於テハ 1/2000 ニ迄減弱セルヲ見ル。

第1表. 溶連菌溶血毒ニ對スル Trypanblau ノ抗溶血作用.

1. Streptolysin 原液: 精製溶血毒素 A-I-Fraktion (家兎赤血球ニ對シ 2000 萬倍稀釋液迄溶血作用ヲ呈ス。) ノ 0,1 % 液.
2. Trypanblau 原液: Trypanblau (Grüber-製) ノ 1:1 萬, 1:10 萬, 1:50 萬 及 ビ 1:100 萬液.
3. 溶血試験: 各實驗列ニ於テ Streptolysin ノ表記遞下稀釋液各 1 ccm ニ對シ當該 Trypanblau 原液ノ 1 滴宛ヲ滴下シ、充分振盪混和シタル後、之ニ 1 % 家兎赤血球浮游液 1 ccm 宛ヲ加フ。對照試験ニ於テハ Trypanblau-液ヲ加ヘズ、Streptolysin ノ遞下稀釋液各 1 ccm ニ對シ單ニ 1 % 家兎赤血球浮游液 1 ccm 宛ヲ加ヘタルノミ。
成績ハ血液ヲ加ヘタル後 2 時間孵卵器 (37°C) 内ニ納メ、更ニ 22 時間水室内ニ靜置セシメタル後ニ判讀ス。
表中 Trypanblau ノ作用濃度トアルハ溶血めぢうむ 2 ccm (Streptolysin-液 1 ccm + 赤血球浮游液 1 ccm) 内ニ於ケル Trypanblau ノ濃度ヲ示ス。

實 驗 列	滴下セル Trypanblau 原液 ノ 濃 度 (1 滴ノ容量 ccm)	Trypanblau ノ 作用濃度	Streptolysin ノ 稀釋倍數												溶血力ノ 比 較 値 (對 照 ヲ 1 ト ス)	
			1: 1: 2 000	1: 1: 5 000	1: 1: 10 000	1: 1: 20 000	1: 1: 50 000	1: 1: 100 000	1: 1: 200 000	1: 1: 500 000	1: 1: 1 000 000	1: 1: 2 000 000	1: 1: 5 000 000	1: 1: 10 000 000		1: 1: 20 000 000
1	1: 10 000 (0,037)	1: 540 000	+++	+++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1/2000
2	1: 100 000 (0,036)	1: 5 560 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	1/100
3	1: 500 000 (0,038)	1: 26 320 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	—	1/20
4	1:1 000 000 (0,043)	1:46 500 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	1/10
5	對	照	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	1

備 考: +++=完全溶血, ++=殆ど完全溶血, +=大部分溶血セルモ尙不溶血球ヲ殘存スルモノ,
+=少部分溶血セルモノ, ±=僅微ニ溶血セルモノ, —=非溶血.

實驗 列	Trypanblau 作用濃度	Seitz-E. K.-濾液ノ稀釋倍數												溶血力 比較值 (對照 = 1)		
		1: 0	1: 2	1: 5	1: 10	1: 20	1: 50	1: 100	1: 200	1: 500	1: 1 000	1: 2 000	1: 5 000		1: 10 000	1: 20 000
1	1: 100 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	•	•	•	•	•
2	1: 400 000	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1/2000
3	1: 4 000 000	•	•	≡	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	—	—	—	1/ 100
4	對 照	•	•	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	+	+	1

而シテ第3表ハ普通ぶいおん培養ノ上清液 (溶血限界濃度ハ僅ニ1:20ノミ.)ニ於ケル實驗成績ナルガ、此ノ場合ニ於テモ Trypanblau 1:44 萬液ニヨリテハ本培養液ノ溶血力ハ完全ニ消失セルヲ見ル。

第3表. 溶連菌ノ普通ぶいおん培養ニ於ケル實驗.

溶血毒液: 溶連菌 „S“株ノ普通ぶいおん (pH=7.6) 24時間培養ノ遠心上清液.
 Trypanblau 原液: 1:1 萬; 1:10 萬; 1:100 萬及ビ 1:200 萬液.
 溶血試験: 各實驗列ニ於テ被檢遠心上清液ノ表記遞下稀釋液各 1 ccm = 對シ當該 Trypanblau 原液ノ 1 滴宛ヲ滴下シ、混和後 1 % 家兔赤血球浮游液 1 ccm 宛ヲ加フ。
 對照列ハ Trypanblau ヲ加ヘズ、遠心上清液ノ稀釋液各 1 ccm = 對シ 1 % 赤血球浮游液 1 ccm 宛ヲ加フルノミ。

實驗列	Trypanblau / 作用濃度	遠心上清液ノ稀釋倍數							溶血力ノ比較値 (對照=1)
		1:0	1:2	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	
1	1: 440 000	—	—	—	—	—	—	—	•
2	1: 5 700 000	+	±	—	—	—	—	—	1/10
3	1: 54 000 000	++	++	+	±	—	—	—	1/2
4	1: 120 000 000	+++	++	++	+	±	—	—	1
5	對 照	+++	++	++	+	±	—	—	1

尙第1表及ビ第3表ノ實驗成績ヨリシテ試験管内ニ於テ Trypanblau ガ Streptolysin ニ對シ抗溶血作用*ヲ發揮シ得ル最少濃度ハ大體 5 000 萬~1 億倍稀釋ノ間ニアルモノナル事ヲ推知シ得ベシ。

2. 各種 Trypanblau-系色素ノ Streptolysin ニ對スル作用ニ就テノ實驗

以上ノ實驗ニヨツテ吾人ハ Trypanblau ガ Streptolysin ニ對シ極メテ強大ナル抗溶血作用ヲ發揮シ、之ガ效力ハ 5 000 萬倍ノ稀薄濃度ニ於テモ尙認メ得ルモノナル事ヲ知り得タルヲ以テ、余ハ更ニ Trypanrot, Kongorot, Dianilblau, Benzoblau, Benzopurpurin ノ 5 Trypanblau-系色素ニ就テ⁹⁾、其等ノ Streptolysin ニ對スル抗溶血性ノ有無強弱ヲ檢索セルニ第4表ニ示スガ如キ結果ヲ得タリ。

* Trypanblau ノ Streptolysin ニ對スル抗溶血作用ガ 1) Trypanblau ト Streptolysin トノ直接反應ニヨル解毒ニ基クモノナルカ、或ハ又 2) Trypanblau ガ赤血球ニ結合シ Streptolysin ノ侵襲部位ヲ封鎖スル爲メ Streptolysin ガ最早侵襲ノ餘地ナキニ至ルニ由ルモノナルカノ問題ニ就テハ目下研究中ナリ。

被檢物質： 1. Trypanrot,
2. Kongorot,
3. Dianilblau R,
4. Benzoblau BB,
5. Benzopurpurin.

物質	化學構造	Azo-色素 / 作用濃度	Streptolysin / 稀釋倍數								
			1: 2000 萬	1: 5000 萬	1: 1萬 2萬	1: 5萬	1: 10萬	1: 20萬	1: 50萬	1: 100萬	1: 200萬
Trypanrot	 <chem>[Na+].[O-]S(=O)(=O)c1ccc(cc1)/N=N/c2c(N)cc(S([O-])([O-])[Na])cc2.[Na+]</chem> [II]	1 : 57 萬									
		1 : 570 萬	.	.	.						-
		1 : 2 380 萬	.	.	.	.					+ -
		1 : 6 450 萬	.	.	.	.					+ + ±
Kongorot	 <chem>Nc1cccc2cc(S([O-])([O-])[Na])ccc2n1.N#N/C=C/c3ccccc3</chem> [III]	1 : 47 萬	+	-	-	-	-	-	. . .		
		1 : 556 萬	.	.	.	.				-	
		1 : 2 330 萬	.	.	.	.					-
		1 : 5 260 萬	.	.	.	.					+ -
Diamtblau	 <chem>Oc1c(O)c(C=S([O-])([O-])[Na])cc(/N=N/c2ccccc2)n1Cc3cc(S([O-])([O-])[Na])ccc3.Oc4c(O)c(C=S([O-])([O-])[Na])cc(/N=N/c5ccccc5)n4</chem> [IV]	1 : 67 萬	±	-	-	-	-	-	. . .		
		1 : 556 萬	.	.	.	.			-		
		1 : 2 000 萬	.	.	.	.				-	
		1 : 6 900 萬	.	.	.	.				+	-

物 質	化 學 構 造	Azo-色素 / 作用濃度	Streptolysin / 稀釋倍數														
			1: 1: 2 000	1: 1: 5 000	1: 1: 1 萬	1: 1: 2 萬	1: 1: 5 萬	1: 1: 10 萬	1: 1: 20 萬	1: 1: 50 萬	1: 1: 100 萬	1: 1: 200 萬	1: 1: 500 萬	1: 1: 1 000 萬	1: 1: 2 000 萬		
Benzoblau BB	[V]	1: 56 萬				+	—	—	—	—	—	—	—	•	•	•	
		1: 588 萬	•	•	•	•					—	—	—	—	—	—	
		1: 2 632 萬	•	•	•	•						+	—	—	—	—	
		1: 5 260 萬	•	•	•	•							+	+	—	—	
Benzopurpurin	[VI]	1: 40 萬						—	—	—	—	—	—	•	•	•	
		1: 465 萬	•	•	•	•						+	—	—	—	—	
		1: 2 632 萬	•	•	•	•							+	—	—	—	
		1: 5 700 萬	•	•	•	•							+	+	—	—	
對 照														+	+	+	

即チ本表實驗成績ニヨリ知り得ル處ヲ要約スレバ次ノ如シ:

a) Trypanblauニ類似ノ化學構造ヲ有スル Trypanrot, Kongorot, Dianilblau, Benzoblau BB, Benzopurpurinノ各 Benzidin-系-Bisazo-色素ハ何レモ Streptolysinニ對シ顯著ナル抗溶血作用ヲ發揮ス。而シテ

b) 此等各物質ノ抗溶血力ヲ比較スレバ——第4表ノ實驗ニ於テハ各物質ノ作用濃度ニ幾分ノ不同アルヲ以テ、本表ノ成績ノミニヨリ直チニ各物質ノ抗溶血力ノ強サヲ正確ニ比較スル事ハ困難ナルモ尙諸他ノ實驗成績ヲモ參照考慮シテ判ズル時ハ——Dianilblau, Trypanblau 最も強く、Kongorot 及ビ Benzoblau ハ之ニ亞ギ、Trypanrot, Benzopurpurin ハ稍々劣ル。

3. 諸他ノ化學物質、特ニ色素類ヲ以テノ實驗

Trypanblau-系-Azo-色素ハ何レモ Streptolysinニ對シ強大ナル抗溶血作用ヲ呈スルモノナル事上述ノ如クニシテ、次デ當然問題トナルハ此ノ作用ハ果シテ Trypanblau-系色素ノミ

ノ特有タルベキヤ否ヤノ點ナリトス。余ハ此ノ問題ヲ解決セント欲シ、Chrysoidin, Scharlach R, Prontosil soluble, Thiazinrot, Janusgrün, Bismarkbraun, Anthracengelb 等ノ如キ Azo-色素ヲ始メトシ、其ノ他 Fuchsin, Eosin, Trypaflavin, Safranin, Thionin, Indigotine, Anilingelb 等ノ色素類、並ニ Tolidin, β -Naphtoldisulfonsäure, Benzidin, Chinin 等約 40 種ノ化學物質ヲ以テ其等ノ Streptolysin ニ對スル作用關係ヲ吟味檢討セルニ大體第 5 表ニ示スガ如キ結果ヲ得タリ。

第 5 表

物 質	抗溶血作用	物 質	抗溶血作用
Anilingelb	(—)	Fluorescein	(—)
Naphtolgelb S	(—)	Eosin	(—)
Chrysoidin	(—)	Trypaflavin	(—)
Scharlach R	(+)	Rivanol	(—)
Bordeaux R	(—)	Anilinviolett	(+)
Echtgelb	(—)	Safranin	(—)
Methylorange	(—)	Thionin	(—)
Tropäolin 000 Nr. 1	(—)	Methylenblau	(—)
Tropäolin 000 Nr. 2	(—)	Indigotine	(—)
Methylrot	(—)	Prontosil soluble	(—)
Thiazinrot	(卅)	Sulfanilamid	(—)
Janusgrün	(卅)	Germanin	(—)
Resorcinbraun	(+)	Anilin	(—)
Bismarkbraun	(+)	p-Amidophenol	(—)
Anthracengelb C	(+)	p-Anisidin	(—)
Echtrot	(—)	p-Phenylendiamin	(—)
Kongorot	(卅)	Dimethylanilin	(—)
Benzoblau BB	(卅)	Benzidin	(—)
Dianilblau R	(卅)	o-Tolidin	(—)
Trypanrot	(卅)	α -Naphtol	(—)
Benzopurpurin	(卅)	β -Naphtalinsulfonsaures Natrium	(—)
Trypanblau	(卅)	β -Naphtoldisulfonsäure (R-Säure)	(—)
Sudan III	(+)	Chinin	(—)
Malachitgrün	(—)	Harnstoff	(—)
Brillantgrün	(—)	Guanin	(—)
Fuchsin	(—)	l-Histidinhydrochlorid	(—)
Gentiana-Violett	(±)		

備 考：(卅) = Trypanblau 程度ノ抗溶血力ヲ有スルモノ、
 (卅), (卅), (卅) = (卅)ト(十)ノ中間ノモノ、
 (十) = 1:3—10 萬液ノ作用ニテ抗溶血作用ヲ認メ得ルモノ、
 (—) = 1:3—10 萬ノ作用濃度ニ於テ抗溶血作用ナキモノ。

今本實驗ニヨツテ知り得タル重要事項ヲ摘記スレバ次ノ如シ。

a) Thiazinrot [VII] ハ Streptolysin ニ對シ Trypanrot 程度ノ抗溶血作用ヲ呈ス (第 6

表参照).

第6表. Thiazinrot / 抗溶血作用 = 就テノ實驗.

物 質	化 學 構 造	Thiazinrot / 作用濃度	Streptolysin / 稀釋倍數											
			1: 1萬	1: 2萬	1: 5萬	1: 10萬	1: 20萬	1: 50萬	1: 100萬	1: 200萬	1: 500萬	1: 1 000萬	1: 2 000萬	
Thiazinrot		1: 57 萬 1: 570 萬 1: 3 125 萬 1: 5 700 萬	+++	++							•	•	•	
	對 照		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	

b) Janusgrün [VIII] モ亦相當強キ抗溶血作用ヲ呈スルモ Trypanblau ニ比ス レバ遙ニ劣ル (第7表).

c) Scharlach R [XXI], Resorcinbraun [X], Bismarkbraun, Anthracengelb C [IX], Sudan III, Anilin-violett [XI], (Gentian Violet) 等ハ何レモ微弱ナル抗溶血性ヲ有ス (第7表).

第 7 表

物 質	化學構造參照	作用濃度	Streptolysin / 稀釋倍數								抗溶血作用	
			1: 5萬	1: 10萬	1: 20萬	1: 50萬	1: 100萬	1: 200萬	1: 500萬	1: 1 000萬		1: 2 000萬
Janusgrün	VIII]	1: 37 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(++)
		1: 360 000	≡	≡	≡	≡	±	—	—	—	—	
		1: 5 560 000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	—	
Anthracengelb	[IX]	1: 37 000	≡	≡	+	—	—	—	—	—	—	(+)
Resorcinbraun	[X]	1: 40 000	≡	≡	≡	+	—	—	—	—	—	(+)
Anilinviolett	[XI]	1: 95 000	≡	≡	≡	≡	—	—	—	—	—	(+)
Chrysoidin	[XII]	1: 50 000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	—	(—)
Trypaflavin	[XIII]	1: 60 000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	—	(—)
Germanin	略	1: 45 000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	—	(—)
Prontosil solubile	[XIV]	1: 38 000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	—	(—)
Anilin	略	1: 6 600	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	—	(—)

物 質	化學構造參照	作用濃度	Streptolysin / 稀釋倍數								抗溶血作用		
			1: 5萬	1: 10萬	1: 20萬	1: 50萬	1: 100萬	1: 200萬	1: 500萬	1: 1 000萬		1: 2 000萬	
Benzidin	[XV]	1: 45 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	(一)	
o-Tolidin	[XVI]	1: 57 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	(一)
Malachitgrün	[XIX]	1: 52 600	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	(一)
Methylenblau	[XVIII]	1: 100 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	(一)
β-Naphtoldisulfonsäure	[XVII]	1: 47 600	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	(一)
Chinin	略	1: 60 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	(一)
ρ-Phenylendiamin	”	1: 19 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	(一)
Guanin	”	1: 45 000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	(一)
對 照	•	•	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	•

d) 爾他ノ物質、即チ Anilingelb [XXII], Naphtolgelb S, Chrysoidin [XII], Bordeaux R, Echtgelb, Methyloange, Tropäolin, Methylrot, Echtrot, Malachitgrün [XIX], Brillantgrün, Fuchsin, Fluorescein, Eosin, Trypaflavin [XIII], Rivanol, Safranin, Thionin, Methylenblau [XVIII], Indigotine [XX], Prontosil soluble [XIV], Sulfanilamid, Germanin, Anilin, p-Amidophenol, p-Anisidin, p-Phenylendiamin, Dimethylanilin, Benzidin [XV], o-Tolidin [XVI], α -Naphtol, β -Naphtalinsulfonsaures Natrium, β -Naphtoldisulfonsäure (R-Säure) [XVII], Chinin, Harnstoff, Guanin, l-Histidinhydrochlorid ハ何レモ 1:3 萬—10 萬ノ作用濃度ニ於テ Streptolysin ニ因ル溶血ニ對シ何等ノ抑制的效果ヲモ呈セズ。

斯ノ如ク Benzidin-系-Azo-色素ノ一群ハ何レモ抗溶血作用ノ強大ナルコト其比ヲ見スト雖モ、而モ之ト化學構造ノ著シク相違スル諸他物質モ亦夫々強弱異ル程度ニ於テ抗溶血性ヲ示スノ事實ヨリ見ル時ハ此作用ハ必ズシモ Benzidin-系-Azo-色素ニ特有ナラザルコトハ明カナリ。然レドモ Streptolysin ニ對スル抗溶血性ノ有無強弱ガ化學構造上如何ナル特徴ニ基クモノナリヤノ問題ニ至ツテハ材料不充分ニシテ未ダ之ヲ闡明シ得ザル處ナリ（化學構造式参照）。

Resorcinbraun [X]

Anilinviolett [XI]

Chrysoidin [XII]

Trypaflavin [XIII]

Prontosil soluble [XIV]

Benzidin [XV]

o-Tolidin [XVI]

β-Naphtoldisulfonsäure [XVII]
(R-Säure)

Methylenblau [XVIII]

Malachitgrün [XIX]

Indigotine [XX]

Scharlach R [XXI]

Anilingelb [XXII]

第8表 C. 膽汁酸ニ於ケル實驗.
Natrium taurocholicum (Merck) ヲ使用ス.

物 質	Azo-色素 作用濃度	Natrium taurocholicum ノ 稀釋倍數								
		1:1百	1:2百	1:5百	1:1千	1:2千	1:5千	1:1萬	1:2萬	1:5萬
Trypanblau	1:36 萬	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	—
Kongorot	1:41 萬	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	—	—
對 照	•	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	—

即チ Trypanblau-系色素ノ抗溶血作用ハ極メテ特異的ニシテ其ノ效果ハ溶連菌溶血毒ニヨル溶血現象ノ場合ニミ發現シ, Streptolysin ト Trypanblau-系色素トノ間ニハ恰モ免疫反應ニ於ケル毒素—抗毒素トノ關係ニ於ケルガ如キ觀アルヲ知ル.

5. 正常血清ト Trypanblau トノ抗溶血作用ノ比較

正常家兎血清自體ガ溶連菌溶血毒ニ對シ相當強力ナル抗溶血作用ヲ呈スルモノナル事ニ就テハ余ハ已ニ溶連菌ノ1%核酸加ぶいおん培養ニ於テ實證報告セル處ナルガ⁵⁾, 余ハ茲ニ正常血清ト Trypanblau トノ兩抗溶血性物質間ニ果シテ如何程ノ效差アルヤニ就テ檢討ヲ加ヘタリ.

第9表ハ代表的實驗例ヲ示スモノナリ.

即チ第1實驗列ノ正常家兎血清1滴ヲ加ヘタルモノ即チ血清ガ1:50ノ稀釋濃度ニ存在スルモノニアリテハ溶血效力ハ對照ノ1/20ニ減弱シ, 又正常血清ガ1:444ノ濃度ニ存在スルモノニアリテハ1/4ニ低下シ, 正常血清自體相當強力ナル抗溶血作用ヲ呈スルモノアルヲ見ル, 然レドモ血清ノ抗溶血力ハ之ヲ Trypanblau ノソレニ比スレバ殆ンド問題ニナラザル程微弱ニシテ Trypanblau ハ已ニ1:5 700 000ノ稀薄濃度(即チ1:100 000液1滴ヲ附加)ヲ以テ溶血力ヲ1/100ニ減弱セシムルニ足ル. 今假ニ正常血清1:50濃度*トTrypanblau 1:5 700 000液トガ其ノ抗溶血效力ニ於テ相匹敵スルモノト見ル時ハ Trypanblau ハ其ノ抗溶血力ニ於テ血清ニ對シ優ニ100 000倍スル處アリト言フヲ得ベシ.

尙 Trypanblau ト血清トヲ同時ニ作用セシメタル第3實驗列ノ成績ニ徴スルモ Trypanblau ノ抗溶血力ハ血清ノ存在ニヨツテ殆ド何等ノ影響(催進, 抑制)ヲモ蒙ルモノニ非ザル事ヲ知り得ベシ.

* 正常血清ノ抗溶血性因子ノ化學的本態ニ至ツテハ現今全ク不明ナルヲ以テ此ノ際血清ソノマ、ノ狀態ヲ基準トシテ其ノ稀釋濃度ヲ示スヨリ外ニ途ナシ.

第9表. Trypanblau ト血清トノ抗溶血作用ノ比較實驗.

血清: 健常家兎血清 (何等稀釋セザル Voll ノモノ及ビ食鹽水ヲ以テ 10 及ビ 100 倍 = 稀釋セルモノ 1 滴ヲ加フ).
 Trypanblau: 10 萬倍稀釋液 1 滴ヲ加フ.
 溶血試驗: 溶血毒ノ遞下稀釋液各 1 ccm = 對シ被檢血清又ハ Trypanblau 液ヲ 1 滴宛 滴下, 混和後 1 % 家兎赤血球浮游液 1 ccm 宛ヲ加ヘ, 2 時間 37°C, 22 時間氷室ニ置キタル後判定ス.

實驗 列	滴 下 液 質 量	血清又ハ Trypanblau ノ 作用濃度	Streptolysin ノ 稀釋倍數									溶 血 力 ノ 比 較 値 (對照=1)
			1: 5萬	1: 10萬	1: 20萬	1: 50萬	1: 100萬	1: 200萬	1: 500萬	1: 1,000萬	1: 2,000萬	
1	血 清	Voll 1 滴	1: 50	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	1/20
		1:10 液 1 滴	1: 444	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	1/4
		1:100 液 1 滴	1: 4 444	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	1
2	Trypanblau	1:10 萬液 1 滴	1:5 700 000	卅	卅	卅	—	—	—	—	—	1/100
3	血 清 + Trypanblau	Voll 1 滴 +	1:50	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	1/40
		1:10 萬液 1 滴	1:5 000 000	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	
4	對 照	•	•	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	1

II. Trypanblau ノ Streptolysin ニ對スル生體內解毒試驗

以上ノ試驗管内實驗ニヨツテ吾人ハ Trypanblau-系色素ガ Streptolysin ニ對シ特異的ニ而モ極メテ強大ナル抗溶血作用ヲ呈シ, 其ノ效果ハ Trypanblau 1:50 000 000 ノ稀薄濃度ニ於テモ尙認メ得ルモノナル事ヲ知り得タルガ, 余ハ更ニ Maus ヲ以テノ動物實驗ニ於テ Trypanblau ハ蓄ニ試驗管内ニ於テノミナラズ實ニ亦生體內ニ於テモ Streptolysin ニ對シ強大ナル抗溶血力ヲ發揮シ, 之ヲ以テ動物ヲシテヨク Streptolysin ニヨル崩血症ヨリマスカレシメ得ルモノナル事ヲ實證シ得タリ.

實 驗 方 法

試驗動物トシテ獨逸種白色 Maus ノ體重 11—13 g ノモノヲ使用セリ. Streptolysin トシテハ專ラ A-I-Fraktion (試驗管内ニ於ケル溶血限界濃度 1:2 000 萬ノモノヲ) 使用セリ. 而シテ本溶血毒ハ腹腔内ニ注射セリ. * (0,85 %ノ滅菌食鹽水ヲ以テ 1—5 %ニ溶解セルモノ 0,2—0,6 ccm 宛). Trypanblau ハ之ヲ滅菌食鹽水ヲ以テ 5 %ニ溶解セルモノヲ原液トナシ, 之ヲ念ノ爲メ 30 分間蒸汽釜ニテ加熱消毒セリ. 而シテ本色素液ハ之ヲ腹腔内又ハ皮下ニ投與セリ.

實 驗 成 績

先ヅ豫備實驗トシテ Streptolysin-液ト Trypanblau-液トヲ試驗管内ニ於テ混合セルモノヲ Maus ノ腹腔内ニ注射セルニ第 10 表ニ示スガ如キ成績ヲ得タリ.

* Streptolysin ニ對スル抗溶血性物質ニヨル生體內解毒實驗ハ動物ヲ崩血症ノモトニ斃死セシムルニ足ル強力溶血毒素ヲ得テ初メテ可能ナル事ナリトス.

第10表. 混合法ニヨル生体内抗溶血試験.

處 置 *	Maus 番號體重	實 驗 結 果				
		No. 1 12 g	No. 2 12 g	No. 3 12 g	No. 4 12 g	No. 5 11 g
1 % Streptolysin-液 0,2 ccm (= 2 mg) ト 0,01 % Trypanblau-液 0,1 ccm (= 0,01 mg) トヲ試験管内ニ於テ混和, 直ニ Maus ノ腹腔内ヘ注射ス.		生 存 (尿ニ異 常ナシ)	生 存 (尿ニ異 常ナシ)	生 存 (尿ニ異 常ナシ)	生 存 (尿ニ異 常ナシ)	生 存 (一時血 色素尿ヲ排泄 セリ)
對照 (1 % Streptolysin-液 0,2 ccm ト 食鹽水 0,1 ccm トノ混合ヲ腹腔内ニ 注射ス.)		著明ノ血 色素尿ヲ排泄 シ24時間内 ニ斃死ス.	血色素尿症 ノモトニ5 時間内ニ斃 死ス.	生 存 (注射後暫 時無力状態 ヲ呈セルノ ミ. 尿ニ異 常ナシ.)	24時間内ニ 斃死ス. 膀 胱内ニ血尿 ヲ認ム.	著明ノ血 色素尿症ノ モトニ24時 間内ニ斃死 ス.

* 第3報ニ於テ Streptolysin ノ Maus 體重 17—18 g ニ對スル最少致死量ハ大體 5mg 程度
ナリト記載セルモ, 本表ニヨツテモ明ナル如ク體重 11—13 g ノ Maus ニ對スル最少致
死量ハ 1—2 mg ナリ.

即チ Streptolysin 2 mg ノミヲ注射セル對照列ニアリテハ試獸 5 匹中 4 匹迄ガ何レモ血
色素尿症ヲ惹起シテ 24 時間以内ニ斃死セルニ不拘, Streptolysin 2 mg ニ Trypanblau 0,01
mg ヲ混和併用セル實驗列ニアリテハ試獸 5 匹共生存シ(内 1 匹ハ一過性ニ血色素尿ヲ排泄
シタルモ間モナク健狀ニ復シ, 爾他ノ 4 匹ハ全ク何等ノ病症ヲモ呈セズ), Trypanblau ノ微
量ガヨク Streptolysin ノ毒作用ヲ抑壓スルニ足ルヲ知ル.

而シテ又第 11 表ハ Streptolysin ノ大量 (10—20 mg) ヲ使用セル場合ノ實驗成績ナル
ガ, 以テ Trypanblau ノ解毒效力ノ如何ニ強大ナルカヲ窺知シ得ベシ.

第11表. 生 體 試 驗.

Maus 體重=12—13 g.

實 驗 列	試 獸 數	處 置		結 果
		Trypanblau	Streptolysin	
1	2	2,5 % Trypanblau-液 0,2 ccm (= 5 mg) ヲ腹腔内ニ 注射ス.	24 時間後 5 % Streptoly- sin-液 0,2 ccm (= 10 mg) ヲ腹腔内ニ注射ス.	2 匹共健在
2	2	2,5 % Trypanblau-液 0,2 ccm (= 5 mg) ヲ腹腔内ニ 注射ス.	24 時間後 5 % Streptoly- sin-液 0,4 ccm (= 20 mg) ヲ腹腔内ニ注射ス.	2 匹共健在

備 考: Trypanblau 10—20 mg ノ腹腔内注射ヲ行ヘル對照 Maus ハ 10—20 分内ニ斃死セリ.

第 12 表ニ示スガ如ク最後ニ余ハ Maus ノ皮下ニ 0,5 % Trypanblau-液 0,2 ccm (= 1 mg)
ニ注射シ, 次デ 2 時間ヲ經テ 1 % Streptolysin-液 0,2 ccm (= 2 mg) ヲ腹腔内ニ注射シ, Try-
panblau ノ豫防の效果如何ヲ檢シタルニ Trypanblau 1 mg ノ前處置ガヨク Streptolysin 2 mg
ノ注射ニ對シ抑壓の效果ヲ發揮スルモノナルヲ知レリ. 而シテ本實驗ニ於テ特ニ注目スベ
キハ皮下ニ注射セル Trypanblau ガヨク Streptolysin ノ腹腔内注射ニ對シテ良效ヲ呈スルノ

事實ニシテ、此ノ事實ハ實ニ Trypanblau ハ Streptolysin ノ毒作用ニ對シ全身療法的ニ血流ヲ介シテ拮抗シ得ル解毒物質ナル事ヲ明示スルモノナリトス。

第12表. 生體試驗.

Maus 體重—12 g.

實驗 列	試 獸 數	處 置		結 果
		Trypanblau	Streptolysin	
1	4	0.5 % Trypanblau-液 0.2 ccm (=1 mg) ヲ皮下ニ注射ス。	2時間後 1 % Streptolysin-液 0.2 ccm (=2 mg) ヲ腹腔内ニ注射ス。	Streptolysin 注射直後輕度ノ脱力狀態ヲ呈セルノミニテ何等血色素尿ヲ排泄スル事ナク試獸 4 匹共生存セリ。*
2 (對照)	4		1 % Streptolysin-液 0.2 ccm (=2 mg) ト食鹽水 0.2 ccm トノ混液ヲ腹腔内ニ注射ス。	注射後 10分—3 時間半ニシテ 4 匹共斃死セリ。

* Trypanblau ノ注射ニヨリ Maus ハ青染シ、尿モ亦青色ヲ呈セリ。

由來溶血性連鎖狀球菌ハ少クモ Hämolysin, Leukocidin, Fibrinolysin 及ビ Erythrogenic toxin (Dicktoxin) ノ 4 毒素ヲ產生スルモノナリトハ諸家ノ記載ニ徴シテ明ナル處ナリ。

然レドモ從來ノ研究ニヨツテ證明セラレタル此等ノ毒素ハ何レモ毒力甚ダ微弱ニシテ、彼ノ溶連菌感染、就中敗血症ニ於テ見ル重篤急劇ナル中毒症狀ガ果シテ如何ナル毒素ノ作用ニ基クモノナリヤノ問題ニ至ツテハ未ダ全ク不明ト云フノ外ナキ現状ナリ⁶⁻⁸⁾。即チ溶連菌毒素問題ノ解決ニハ強力ナル毒素——毒素ノ種類ガ溶血毒タルト、白血球毒タルト將又纖維素溶解毒或ハちつく毒素タルトヲ問ハズ——ノ分離證明ヲ以テ先決問題トスルモノナルガ、今ヤ溶血毒ニ關スル研究ハ核酸ニ因ル溶連菌ノ溶血毒増産現象ノ發見²⁾ニ端ヲ發シテ正ニ飛躍的ノ進展ヲ遂ゲ、曩ニハ溶連菌ノ 1 %核酸加ふいおん培養ヨリ強力無比ノ精製溶血毒素ガ分離セラレ⁴⁾、次デ又今回報告ノ如ク本溶血毒ニ對シ特異的ニ作用スル強力ナル解毒性化學物質ノ發見ヲ見ルニ至レリ。

然ラバ Trypanblau, Dianilblau ノ如キ解毒性物質ハ之ヲ溶連菌ニ因ル諸種ノ疾患、就中敗血症ニ於ケル中毒狀態ニ對シテ應用スル時果シテ幾許ノ效果ヲ呈スルモノナリヤ。本問題ノ解答ハ溶血毒ノ病因的意義ノ闡明ト共ニ今後ノ研究ニ俟ツベキモノナリトス。而シテ余ハ尙本研究ガ《構造分明ノ化學物質中ニハ細菌性毒素ニ對シ恰モ免疫性抗毒血清ノ如ク特異的ニ作用シ之ヲ無毒化セシムル物質ノ存在シ得ルモノナル事》ヲ實證セルモノトシテ、其ノ免疫化學上ニ於ケル意義ノ渺ナカラザルモノアルヲ信ジテ疑ハザルモノナリ。

本研究ノ遂行ニハ文部省科學研究費ノ補助ヲ受ケタル事ヲ特記ス。

引用書目

- 1) 伊藤 亮: 日本藥物學雜誌 **29**, 第 14 回日本藥理學會記事 67 (昭和 15 年).
- 2) *H. Okamoto*: Japan. Journ. of Med. Science IV. Pharmacol. **12**, 167—208 (1940).
- 3) 伊藤 亮: 日本藥物學雜誌 **29**, 第 14 回日本藥理學會記事 66 (昭和 15 年).
- 4) *H. Okamoto, K. Miura, R. Itô und S. Kyôda*: Japan. Journ. of Med. Science IV. Pharmacol. **13**, 23—34 (1940).
- 5) 伊藤 亮: 日本藥物學雜誌 **28**, 41—56 (昭和 15 年).
- 6) *W. Lehmann*: Ergebnisse d. Hygiene **11**, 220 (1930).
- 7) *Kolle-Hetsch*: Bakteriologie 8. Auflage, 245.
- 8) *W. v. Lingelsheim*: Streptokokkeninfektion. Handb. d. pathogen. Mikroorganismen **4**, II, 813 (1928).
- 9) *Gustav Schultz*: Farbstofftabellen **1**, 7. Aufl.