Triphenyl-Tetrazolium-Chloride による溶血性

連鎖球菌の白血球殺滅素の定量

早野 正巳 飛松 源治

埼玉県衛生研究所

〔受付: 9月17日1954年〕

白血球の生活能を測定する為に従来種々の方法が用いられている。白血球の運動性、細胞内顆粒の運動、エオジン染色に対する抵抗性等¹⁾の外に普通広く用いられているものとしてメチレン青に対する還元能を測定する Neisser-Wechsberg の方法がある。此の還元能は諸種白血球生活機能中、最も早期に喪失されるものとされている。併乍ら Neisser-Wechsberg の方法は其の実施上種々の難点があるので、近年生物学上の各方面に利用されている色素の Triphenyl-Tetrazolium-chloride²⁾を用いて其の改良を試みた。此の方法によれば白血球殺滅素の測定が簡易な許りでなく光電比色計を使用する事により其の定量化が可能となつた。

実験方法

白血球 モルモットの腹腔に滅菌3%澱粉加食塩水10 cc を注射し、5時間後に更に5 cc を注射して、18時間後に滅菌0.3%枸橼酸ソーダ加生理的食塩水50 cc を注射して腹腔液を採取する。此の操作を更に2回反覆して、採取全量と其の白血球濃度を計算板で測定しておく。其の後2000 r.p.m. の速度で遠心5分間、白血球を集める。採取直後の濃度と全容量より推算して、等張磷酸緩衝食塩水 pH 6.5 (食塩7.2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58 g, KH_2PO_4 3.17 g, 水1000 cc) を所要量加え、一定濃度の白血球浮游液を調製した。

白血球殺滅素 白血球殺滅素産生株としては *Streptococcus hemolyticus* Group A に属する S.8 株を使用した。此の菌株は東大、伝染病研究所より授与された後二十日鼠通過5代のものを血液寒天に保存した。此の菌株を血清フィオンに6時間培養したものを白血球殺滅素産生に供した。即ち白血球殺滅素と Streptolysin O (以下 SLO とする) が同じ物であろうと言う Todd の説に基き³⁾ Todd 及び Hewitt 氏等の用いた SLO 産生用培地を使用した。又其の濃縮には Herbert 及び Todd³⁾ 氏等が行つた如く硫酸アンモニウムにて塩析せしめ

て目的を達した。保存には試験管内に液面を滅菌ワセリンで封じて氷室に置いた。

白血球殺滅素価測定法 Neisser-Wechsberg 氏法による測定法は Gay 及び Oram 氏等⁴⁾ の行つた手技によりなされた。彼等の手技によると培養濾液中に含まれる諸種還元性物質の存存により、白血球自体以外の還元が行われて結果の判定が屢々誤られるので、我々の手技では白血球殺滅素作用が終つた後、数回洗滌遠心を繰返し白血球以外の物質を除去した。其の後に数時間煮沸し急に冷却した0.5%ブドウ糖加磷酸緩衝等張食塩水2 cc と同じく煮沸後冷却させた0.1%メチレン青水溶液1滴を各管に加えワセリンで封じ37°C に保温して脱色状態を対照管に比較して観察した。Triphenyl-Tetrazolium-Chloride を用いて測定する場合は添加する色素をメチレン青の代りに0.5%ブドウ糖加0.5% Triphenyl-Tetrazolium-Chloride を加え37°C に保存し、沈澱白血球の色調を肉眼にて観察した後光電比色計にて比色した。仍ち遠心し上清を除いた呈色せる白血球に4 cc のアセトンを加え還元せる色素を溶出せしめて波長550m μ で比色した。光電比色計は日立製作所U型を用いた。

実験結果

実験1 T.T.C. の濃度に就いて

T.T.C. はそれ自身毒性を有しているので、白血球に侵害を与えることなく且つ高濃度のものを使用する事が望ましいので次の如き実験を行つた。1%ブドウ糖加リソゲル液にて T.T.C. を1%から順次2倍階段希釈を行

HAYANO, Shomi & TOBIMATU, Genzi: Quantitative estimation of streptococcal leucocidine with triphenyl-tetrazolium-chloride. The Saitama Prefectural Institute of public Health. — Jap. J. of Bact., 10(2), 185-188, 1955.
此の報告は昭和29年6月18日日本細菌学会関東支部会に於て発表。

い所定量の沈澱白血球に加え各管の全量を2ccとし37°Cの恒温槽に入れて時間を追つて呈色度を観察した。白血球濃度は3820 per mm³と6850 per mm³の二種を用いた。其の結果は第1表の如くで、T.T.C.の濃度は0.5%が至適であると思われた。

第1表 T.T.C. 濃度と白血球呈色の関係

白血球数	T.T.C. 作用時間	T.T.C. 濃度						加白熱血死球
		1%	0.5%	0.25%	0.125%	0.0625%	0.0312%	
3820/mm ³	1	—	+	—	—			—
	2	—	++	+	—			—
	3	+	+++	+++	+			—
	4	+	+++	+++	++			—
	18	+	+++	+++	+++			—
6850/mm ³	1	++	++	++	+	+	—	—
	1	++	++	++	++	+	+	—
	3	++	++	++	++	++	+	—
	4	++	+++	+++	+++	++	++	—
	18	+++	+++	+++	+++	++	++	—

実験2 ブドウ糖の濃度と呈色との関係

0.5%T.T.C. ガリソゲル氏液にてブドウ糖を2%より階段希釈し所定濃度になるが如く白血球に加え全量2ccにして37°Cに置き時間を追つて呈色度を観察した。白血球濃度は3150 per mm³とし5130 mm³とした。其の結果は第2表の如くブドウ糖による呈色度の差異は著明ではなかつたが0.5%の所が良いようであつた。

第2表 ブドウ糖濃度と白血球呈色度の関係

白血球数	ブドウ糖 作用時間	ブドウ糖 濃度						加白熱血死球
		2%	1%	0.5%	0.25%	0.125%		
5130/mm ³	1	+	+	+	+	+	—	—
	2	+	+	++	++	+	—	—
	3	++	++	+++	++	+	—	—
	4	++	++	+++	++	++	—	—
	18	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
3150/mm ³	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	+	+	+	+	+	—	—
	3	+	+	+	+	+	—	—
	4	+	+	+	+	+	—	—
	18	++	++	++	++	++	—	—

実験3 白血球採取後の経過時間と呈色度との関係
白血球は採取後37°Cの恒温槽に入れ各時間毎に取出

して0.5%T.T.C., 0.5%ブドウ糖加里ソゲル氏液に浸し37°C.3時間置いてその呈色度を観察した。此の結果第3表の如く6時間以後著しく還元能が減退し、一昼夜で殆んど呈色しなくなつた。

第3表 白血球採取後経過時間と呈色程度との関係

雌雄	体重/ 白血球数	時間 1	2	4	6	8	18	24	30
♂	475g/9633	++	++	++	++	+	+	+	—
♀	506g/11633	++	++	++	++	+	—	—	—
♀	530g/3900	++	++	++	++	+	—	—	—
♂	582g/6390	++	++	++	++	+	—	—	—
♀	570g/6825	++	++	++	++	+	+	+	—

実験4 白血球濃度と呈色度との関係

各種濃度の白血球に就いて前実験と同条件で呈色度の差異を時間を追つて観察した。白血球は採取後30分のものと3時間30分37°Cにて経過したものを使用した。

結果は第4表の如く白血球濃度は呈色度に著しく影響する。即ち数が少いと全然呈色しない事が判明した。2回の実験より少くとも3000 per. mm³以上の白血球が必要であると思われる。

第4表 白血球濃度と呈色度との関係

採取後経過時間	白血球数	時間						
		30分	1	2	3	4	18	
30分	6463		++	++	++	++	++	
	3231		—	+	+	++	++	
	1615		—	—	—	—	—	
	807		—	—	—	—	—	
3時間30分	13650		+	+	++	+++	+++	
	6825		—	+	+	++	++	
	3412		—	—	+	+	++	
	1706		—	—	—	—	—	

第5表 溶媒 pH と白血球呈色度との関係

時間	pH									
	3.2	...	5.0	5.5	5.8	6.1	6.4	7.0	7.7	
30分	—	—	—	+	+	++	++	+	+	
1時間	—	—	—	+	+	++	++	++	+	
2	—	—	—	+	+	++	++	++	++	
3	—	—	—	+	+	++	++	++	++	
5	—	—	—	+	+	++	++	++	++	
18	—	—	—	++	++	+++	+++	++	++	

第6表 白血球殺滅素の作用時間に関する実験

作用時間	白血球殺滅素(50%溶血素価)										対照
	286	144	72	36	18	9	4.5	2.25	1.25	0.56	50%
30分	0	0	0	0	0.006	0.043	0.055	0.062	0.064	0.072	0.032
1時間	0	0	0	0.002	0.005	0.058	0.068	0.078			0.077
2	0	0	0	0.017	0.017	0.043	0.060	0.080	0.075		0.057
3	0	0	0	0.010	0.025	0.062	0.074	0.078	0.133		0.086
4	0	0	0	0.013	0.22	0.042	0.055	0.065	0.095		0.062

数値は吸光度を示す

第7表 Neisser-Wechsberg 氏法との比較

	還元作用色時間	白血球殺滅素(50%溶血素価)										対照
		286	144	72	36	18	9	4.5	2.25	1.25	0.56	
T.T.C. 法	3	0	0	0	0.01	0.02	0.055	0.080	0.140	0.150	0.160	0.185
N-W 法	1	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	++
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	++
T.T.C. 法	3	0	0	0	0.017	0.017	0.043	0.065	0.080	0.075		0.103
N-W 氏法	1.5	—	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3	—	—	—	—	+	++	++	++	++	++	++

実験5 溶媒の pH と白血球呈色度との関係。

pH の呈色に及ぼす影響を観察する為各種の緩衝液を作り、即ち pH 3.2 より 6.1 迄は醋酸緩衝液を、6.4 より 7.7 迄は磷酸緩衝液を調製して、それに 0.5% のブドウ糖及び T.T.C. を入れ 3820 per mm³ の濃度となる如く白血球を加えて時間を追つて呈色を観察した。此の結果 pH. 6.1 より 7.0 の間が至適であることが判つた。

実験6 溶連菌白血球殺滅素に関する実験

以上の実験によつて得た基礎的データに基づいて溶連菌の白血球殺滅素の測定を試みた。Todd⁵⁾ 等によつて溶連菌の白血球殺滅素はチスチン、次亜硫酸ソーダ等によつて活性化されないと無効であると言う事が知られているので著者等は Herbert 及び Todd⁶⁾ 等の記載に従つて 1/5 M のチスチンで活性化し実験を行つた。活性化の必要な事は著者等の方法に於ても同一であつた。

実験7 白血球殺滅素の白血球に対する作用時間の影響

Nakayama⁷⁾ は Neisser-Wechsberg 氏法に依つて白血球殺滅素が白血球を破壊するに要する時間に就いて述べ 1 1/2~3 時間で完全に作用すると報告している。本実験に使用した白血球殺滅素は 50% 溶血価 431 倍のものである。白血球数 7000 per mm³ の濃度にて上記溶血素

を 30 分より 4 時間に亘つて作用させ各時間毎に白血球の T.T.C. の還元能を観察した。T.T.C. の作用時間は 3 時間とし結果の判定は比色計の吸光度の読みによつた。

その結果は第6表の如く30分より1時間の間で白血球殺滅素の作用が完成する事が判つた。

実験8 Neisser-Wechsberg 氏法との比較、著者等の方法と Neisser-Wechsberg 氏法との比較

著者等の方法と Neisser-Wechsberg 氏法との比較を試みたその結果第7表の如くで敏感度の点では略々同様な成績であつた。実験条件は前者と同様であるが Neisser-Wechsberg 氏法は大量の白血球を要し、且つ其の結果が時間の推移に伴い変動するので観察にかなりの煩雑を感じる。本実験に使用した白血球殺滅素は既述実験に使用せるものと同じである。

考 按

白血球の生活能の表現として各種の性質があげられているが本実験に用いた還元能はかなり急激に低下することが判つた。他方白血球の生活機能の表現として挙げられている他の性質即ち喰菌作用、運動性、酸素消費能等は数日間保持されると報告されているが、T.T.C. 還元能が白血球の生理状態に如何なる意味を有しているかは

将来の研究に俟つところが多い。白血球殺滅素が其の検定方法によつて相違することは既にブドー球菌の白血球殺滅素に就いて Proom⁸⁾ 及び Valentine⁹⁾ 等によつて指摘されている所である。著者等もサポニンに就いての同様な実験で連鎖球菌殺滅素と同じ結果を得た。併し両者の影響を受けた白血球を顕微鏡下で比較観察すると連鎖球菌毒素の作用下のものは著しく膨脹と崩壊が見られるがサポニンの作用のものは形状の著しい変化は見られなかつた。

白血球の還元能喪失が如何なる原因によるかに就いて2つの見方がある。1つは毒素が直接に還元酵素に対する酵素毒である場合と他の1つは毒素が細胞膜に作用してその透過性を高め還元系の物質を細胞外に溶出せしめ還元能を喪失する場合である。著者等の実験では、白血球殺滅素で処理した白血球に白血球を凍結融解後遠心して得た上清を加えると還元能を恢復する事が判つた。従つて此の場合、連鎖球菌白血球殺滅素の作用は還元系物質を細胞膜外に溶出せしめる為と思われる。

著者等が白血球殺滅素を白血球に作用させた後白血球を洗う事により、良結果を得たのは又以上の理由によるものと思われる。

本実験中に示したが如く白血球数の少い時呈色が悪いが又は起らないが、白血球が薄いフィルム状になつた場合も同様である。然し少数の白血球でも遠心して密集せしめると呈色する。同数の白血球を取り、浮遊せしめ自然沈下せしめた場合と遠心により密集させた場合とで T.T.C. の還元度を光電比色計で測定しても密集した場合がやはり強く呈色している事が確められた。即ち白血球の集合状態により呈色に差異を生ずる。此の呈色白血

球を顕微鏡で観察すると細胞表面に多数の赤色針状結晶が析出しているのが見える。従つて T.T.C. の還元は白血球表面の或る種の物質による還元状態が必要で白血球が或る程度以上に密集している事が必要のようである。

本方法と Neisser-Wechsberg 氏法の比較では敏感度に就いてはさして優劣は無いよいであるが Neisser-Wechsberg 氏方法が其の実施にかなりの熟練を要し目定量ができない点に比すれば、本法は優れていると言える。又本法にては同法に比し遙かに少量の白血球にて実験が可能であり且 T.T.C. の還元が不可逆なため、結果の判定が安定で且定量的である。

総 括

白血球殺滅素の測定に Triphenyl-tetrazolium-chloride を用いて、感度高く正確に溶血性連鎖球菌の白血球殺滅素を定量し得た。

緒 言

- 1) Valentine, W. N.: Blood, 4, 845 (1951).
- 2) Kuhn, R. & D. Jerchel, D.: Ber. deutsch, chem. Ges., 74B, 949, (1941).
- 3) Todd, E. W.: Brit. J. Exptl. Path., 23, 136, (1942).
- 4) Gay, F. P. & Oram, F.: J. Immunol., 25, 501, (1933).
- 5) Todd, E. W.: J. Exptl. Med., 55, 267, (1932).
- 6) Herbert, D. & Todd, E. W.: Biochem. J., 35, 1124, (1941).
- 7) Nakayama, Y.: J. Infect. Dis., 27, 86, (1920).
- 8) Proom, H.: J. Path. Bact., 44, 425, (1937).
- 9) Valentin, F. C. O.: Lancet i 526, (1936).