Streptolysin O に関する実験的研究

第2報 Streptolysin O の免疫原性について

中 村 悠 哉

東京大学, 伝染病研究所, 第6細菌研究部 (指導 工藤正四郎教授)

〔受付: 9月25日・1959年〕

緒 言

著者は前報¹⁾において, A, C, G各群溶連菌により産生される Streptolysin O (STO) が血清学的に差異のないものであることを種々の方法を用いて再確認した。そこで今回はこれら STO の免疫原性について更に詳細に検討することにした。

STO が免疫原性を有することは, これの少量を数回にわたり家兎に注射することにより, その血清中に AS TO が現われるという Todd²⁾ の研究をみても明らかであり, 著者¹⁾も活性化 STO を家兎に数回静注して, AS TO の現われることを経験している。

しかし, AS TO に関するこれまでの成績は試験管内の溶血阻止を観察するにとどまり, STO のいま一つの作用である致死作用に及ぼす影響についての検討は行われていない。それ故, 著者は先ず致死量以下の STO をマウスに数回接種し, その生体内における AS TO 産生の有無を観察するとともに, これらマウスの STO に対する抵抗性を同時に検討した結果, STO の免疫原性について興味ある成績を得たのでここに報告する。

I. 各群 STO のマウスに対する致死作用

実験材料

1. 使用 STO: 前報に報告したものである。即ち A 群溶連菌 Richards 株及び T15 株, 人系 C 群溶連菌 (以下 C 群と略す) 10706 株, G 群溶連菌 D166B 株の 4 株から作られた凍結乾燥 STO であり, 各 1 アムプレ 40cu (combining unit) ずつ含まれている。

2. 使用マウス: dd 系, 生後 5W, ♂, 健康なものをを用いた。

3. 実験に用いた諸種材料: 前報¹⁾と同じ。

実験方法

上記各群 STO の 1 アムプレをそれぞれ 1 ml, 0.5ml,

0.4ml, 0.3ml の 4 段階に Cystein-Buffer にて溶解, 活性化³⁾した。即ち各アムプレのそれぞれの 0.2ml 中には, 8, 16, 20, 26.7cu が含まれたことになる。接種方法は, この各群 STO の各稀釈液 0.2ml をマウスの尾静脈内に注射した。

実験成績

表 1 に示す如く, 16cu 接種例では C 群の 1 匹を除いては各群 STO 共全部生残, 20cu 接種例では Richards STO 及び D166B STO が共に 5 匹中 3 匹死亡, T15 STO 及び 10706 STO は共に 5 匹中 4 匹死亡, 26.7cu 接種例では各群 STO 共全例が死亡した。即ち各群 STO の cu を一定にして致死力を比較したところ, 各 STO 間に致死力の相違は認められず, 100%致死量は 26.7 cu であった。

表 1 各群 STO のマウスに対する致死力比較

群	菌 株 名	マ ウ ス D/T			
		含 有 cu 量			
		8	16	20	26.7
A	Richards	0/5	0/5	3/5	5/5
	T15	0/5	0/5	4/5	5/5
C	10706	0/5	1/5	4/5	5/5
G	D166B	0/5	0/5	3/5	5/5

註. 分母は使用マウス数, 分子は死亡マウス数を示す cu……Combining unit. 以下同様

II. STO の免疫原性について

A 致死量以下の STO で 1 回前処置されたマウスに

NAKAMURA Yuya: Experimental studies on streptolysin O. II. Antigenic properties of streptolysin O. The Institute for Infectious Diseases, The University of Tokyo.—Jap. J. of Bact., 535-540. 1960.

ついでの実験

実験1. 致死量のSTO攻撃に対する抵抗性

実験材料及び方法

使用STOは前報¹⁾に報告した凍結乾燥A群 Richards 株STOであり、使用前に活性化した。(以後の実験はすべて活性化したSTOを用いた。)

前処置は攻撃の6時間及び24時間前に、STOの8cuを0.2ml溶液としてマウスに静注した。

攻撃は両者同時に行い、STOの致死量26.7cuを0.2ml溶液として静注した。対照として無処置の正常マウスにこれを同様に攻撃した。

使用マウスはdd系、生後5W、♂、健康なもので、各実験毎10匹ずつを用いた。

実験成績

表2に示す如く、前処置群、対照群共に全例が死亡した。しかし、死亡時間を観察してみると、対照群の全例が10分以内に死亡したのに対し、6時間前処置群では70%が、24時間前処置群では80%が10分以後に死亡した。又前処置群の間には時間的に相違は認められず、それぞれ対照と比較して死亡時間の延長が認められた。

表2 致死量以下のSTOを6時間及び24時間前に投与されたマウスに対するSTOの致死作用

STO前処置		STO攻撃 (26.7cu)				
量	時間	マウス D/T	死亡時間			
			<10'	<30'	<1h	1h<
8cu	6h前	10/10	3	2	4	1
	24h前	10/10	2	2	5	1
対 照		10/10	10			

実験2. 血清のASTO測定試験

実験材料及び方法

実験1と同様、予め6時間及び24時間前に Richards STOの8cuを静注したマウスを心臓穿刺により採血して、血清を分離し、同STOをもつて、飛松等²⁾の方法により、ASTOの有無をしらべた。なお、対照としては、無処置の正常マウスを同様に検査した。

検査した血清は、6時間及び24時間前に前処置したものそれぞれ10例、対照8例である。なお、判定は前報¹⁾の如く、次のように表現した。卅 完全溶血、++ 中等度溶血、+ 軽度溶血、+ 遠心により上清に軽度の赤味を有するもの、- 非溶血。

実験成績

表3に示す如く、被検血清中にはASTOの存在を

認めることは出来なかった。前処置群では僅かに溶血の弱いものがあつたが、対照に比べて差がある成績とは云えない。

表3 致死量以下のSTOを6時間及び24時間前に投与せるマウスにおけるSTO価測定試験

	マウス 番 号	ASTO 価 u				
		2	4	8	16	32
S T O 投 与 群	6 時 間 前	1	+	+	++	++
		2	+	++	++	++
		3	++	++	++	++
		4	++	++	++	++
		5	++	++	++	++
		6	++	++	++	++
		7	++	++	++	++
		8	++	++	++	++
		9	++	++	++	++
		10	++	++	++	++
	24 時 間 前	11	++	++	++	++
		12	++	++	++	++
		13	++	++	++	++
		14	++	++	++	++
		15	++	++	++	++
		16	++	++	++	++
		17	++	++	++	++
		18	++	++	++	++
		19	++	++	++	++
		20	++	++	++	++
対 照 群		21	++	++	++	++
		22	++	++	++	++
		23	++	++	++	++
		24	++	++	++	++
		25	++	++	++	++
		26	++	++	++	++
		27	++	++	++	++
		28	++	++	++	++

註. 卅は完全溶血、+は非溶血を示す。以下同様。

実験3. 血球のSTOに対する抵抗性試験

実験材料

使用血球液: 6時間及び24時間前に致死量以下のSTOを静注したマウスを心臓穿刺により採血し、それぞれの血球を集め、2.5%洗滌血球浮游液を作った。

STO: A群溶連菌 Richards 株より作られた液状濃縮STOを用いた。

実験方法

STOをその溶血力を測る場合と全く同様の方法で倍数稀釈し、血球液を一定にして (STO稀釈液1:血球液1), 血球のSTOに対する抵抗性を検査した。

対照として、無処置の正常マウスの血球を集め、同様に検査した。

実験成績

表4に示す如く、6時間及び24時間前に前処置したものは、対照と比較して、STOに対して全く同じ結合力を示し、血球の抵抗性には変化が認められなかった。

表4 致死量以下のSTOを6時間及び24時間前に投与されたマウスのSTOに対する血球抵抗性試験

前処置	STO 稀 釈									
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
6h前	++	++	++	++	++	++	++	+	+	—
24h前	++	++	++	++	++	++	++	+	+	—
対 照	++	++	++	++	++	++	++	+	+	—

B. A, C, G 各群STOで免疫せるマウスについての実験

実験1. A群STOに対する抵抗性

実験材料及び方法

使用STO: 前報¹⁾で報告した、A群溶連菌 Richards株STO (AR-STO), C群溶連菌 10706株STO (C-STO) 及びG群溶連菌 D166B株STO (G-STO) の凍結乾燥したものを用いた。

免疫方法: 各群STOは活性化したものを0.2ml溶液として静注した。免疫回数は計8回行い、免疫間隔は2~3日おき、免疫期間は4週間であつた。なお、免疫に使用したSTOの総量は60cuである。

攻撃: 最終免疫の7日後にAR-STOの26.7cu/0.2mlを静注した。対照として、無処置の正常マウスを同様に攻撃した。

なお、マウスはdd系、生後5W, ♂, 健康なものを毎実験例10匹ずつ使用した。

実験成績

表5に示す如く、対照群全例が死亡したのに対し、AR-STO及びG-STOで免疫したものの20%, C-STOで免疫したものの80%が死亡した。しかも対照群の全例が15分以内に死亡したのに反し、前処置群中の死亡例はすべて15分以後に認められた。又各群STOで免疫したマウスは、AR-STO攻撃に対して、全く同じ抵抗性を示

した。又生残したマウスは更に2日間観察したが、死亡したものはなかった。

表5 各群STOで免疫せるマウスに対するRichards-STOの致死作用

前 処 置 群	免 疫 STO 群 株	STO 攻撃 (26.7cu)				
		マウス 死亡率		死 亡 時 間		
		D/T	%	<15'	1h<	2h<
A	Richards	2/10	20		2	
C	10706	3/10	30		2	1
G	D166B	2/10	20		2	
対 照 群		10/10	100	10		

実験2. 血清のASTO測定試験

実験材料及び方法

実験1と同様、各群STOで計8回免疫したマウスを用いた。最終免疫の8日後に心臓穿刺により採血して、血清を分離し、免疫に使用したSTOをもつて、飛松等²⁾の方法により、血清中のそれぞれのSTOに対するASTOの存在の有無をしらべた。対照として、無処置の正常マウスを、AR-STOをもつて同様に検査した。

被検血清は毎実験例5例ずつである。

実験成績

表6に示す如く、対照群のすべてにASTOが認められなかったのに反し、免疫したものはすべて特異的にASTOの存在が認められた。即ちAR-STOで免疫したものは最高64u, 最低4uであり、C-STOで免疫したものは最高32u, 最低8u, G-STOで免疫したものは最高32u, 最低8uのASTO価を示した。

III. STOとPneumolysinとの関係

実験材料

1. Pneumolysin: 1アムプレ1070単位を含む凍結乾燥Pneumolysin (埼玉衛研飛松博士より分与) を使用した。これのマウス(dd系, 生後5W, ♂, 健康なもの)に対する100%致死量は $\frac{1}{2}$ アムプレ, 即ち214単位であつた (この量を1L.D.と略す)。

2. STO: C群溶連菌10706株より作成した液状濃縮STOを用いた。溶血力は倍数稀釈法により測定し、完全溶血価は512hu (hemolytic unit), 50%溶血価は光電比色計にて2020huであつた。マウスに対する100%致死量は、この液状STO2倍稀釈液の0.1mlである (この量を1L.D.と略す)。

表6 各群 STO で免疫せるマウスの
ASTO 価測定試験

	STO	マウス	ASTO 価 u							
	群 株	番号	2	4	8	16	32	64	128	
処	A 群 Richards	1	—	—	—	—	—	—	+	
		2	—	—	—	—	—	+	++	
		3	—	—	—	—	+	++	++	
		4	—	—	—	—	+	++	++	
		5	—	—	++	++	++	++	++	
置	C 群 10706	6	—	—	—	—	—	+	++	
		7	—	—	—	—	—	++	++	
		8	—	—	—	—	+	++	++	
		9	—	—	—	—	+	++	++	
		10	—	—	—	+	++	++	++	
群	G 群 D166B	11	—	—	—	—	—	+	++	
		12	—	—	—	—	+	++	++	
		13	—	—	—	+	++	++	++	
		14	—	—	—	+	++	++	++	
		15	—	—	—	+	++	++	++	
対 照 群	16	++	++	++	++	++	++	++		
	17	++	++	++	++	++	++	++		
	18	++	++	++	++	++	++	++		
	19	++	++	++	++	++	++	++		
	20	++	++	++	++	++	++	++		

両毒素は共に活性化して用いた。

3. マウス: dd 系, 生後 5 W, ♂, 健康なものを用いた。

実験1. Pneumolysin 及び STO で免疫せるマウスの両毒素に対する抵抗性

実験材料及び方法

Pneumolysin の免疫: 免疫回数は計 5 回行い, 免疫間隔は 2~3 日 おき, 免疫に使用した Pneumolysin の総量は約 230 単位であり, 接種は 0.2ml 溶液として静注した。

STO の免疫: 免疫は 2~3 日おきに計 5 回 Pneumolysin と同時に行った。免疫に使用した STO の総量は $1\frac{1}{2}$ L.D. であった。

攻撃: STO 及び Pneumolysin 共, 最終免疫の 7 日後に各々その 1 L.D. を 0.2ml 溶液として, 夫々両免疫マウスに静注した。対照として無処置の正常マウスと同時に静注した。

使用マウスは各実験例 5 匹ずつである。

実験成績 (表 7)

表7 Pneumolysin 及び STO で免疫せる
マウスに対するそれぞれの毒素の致死作用

免 疫 毒 素	攻 撃 毒 素	攻 撃							
		マウス D/T	死亡率 %	死 亡 時 間					
PnL STO 対 照	PnL	2/5	40	41'	翌				
		5/5	100	4	7	7	7.5	9	
PnL STO 対 照	STO	5/5	100	3	3	3	3	5	
		5/5	100	8	10	11	11	12	
PnL STO 対 照	STO	1/5	20	20					
		5/5	100	7	10	11	10	12	

註, PnL……Pneumolysin の略, 以下同様。

死亡時間中の数字は分を表わす。翌は翌日死亡。

1) Pneumolysin 攻撃の場合: STO で免疫したものは対照群と同様全例が死亡し, 対照と比べて死亡時間が僅かに延長した程度であつた。しかし, Pneumolysin で免疫したものは 5 匹中 3 匹が生存し, 死亡した 2 匹は対照及び STO で免疫したものより遙かに死亡時間が延長した。

2) STO 攻撃の場合: Pneumolysin で免疫したものは対照群と同様全例が死亡し, 死亡時間も対照と比べて殆んど同じであつた。しかし, STO で免疫したものは 5 匹中 4 匹は生存し, 死亡した 1 匹も対照と比べて死亡時間が延長した。

なお, 生存したマウスは更に 2 日間観察したが, 死亡したものはなかった。

実験2. Pneumolysin 及び STO で免疫せるマウスの抗体測定試験

(i) ASTO 測定試験

実験材料及び方法

実験 1 と同様, STO 及び Pneumolysin で計 5 回免疫したマウスを用いた。最終免疫の 8 日後に心臓穿刺により採血して, 血清を分離し, C-STO をもって, 飛松等³⁾の方法で, 血清中の ASTO の有無をしらべた。対照として無処置の正常マウスを同時に検査した。被検血清は各実験例 5 例ずつである。

実験成績

表 8 に示す如く, STO で免疫したマウスにのみ ASTO が特異的に認められた。Pneumolysin で免疫したものの中には極めて弱い溶血阻止が認められたが, 対照と殆んど差がなく, ASTO の存在を認めることは出来なかった。

表8 STO 及び Pneumolysin で免疫せる
マウスの STO に対する抗体測定試験

	免 疫 毒 素	マウス 番 号	ASTO 価 u					
			2	4	8	16	32	64
処 置 群	STO	1	—	—	—	—	—	+
		2	—	—	—	+	++	+++
		3	—	—	+	++	+++	+++
		4	—	—	+	++	+++	+++
		5	—	—	+	++	+++	+++
	PnL	6	+	++	++	+++	+++	+++
		7	+	++	++	+++	+++	+++
		8	++	++	++	+++	+++	+++
		9	++	++	++	+++	+++	+++
		10	++	++	++	+++	+++	+++
対 照 群		11	++	++	++	+++	+++	+++
		12	++	++	++	+++	+++	+++
		13	++	++	++	+++	+++	+++
		14	++	++	++	+++	+++	+++
		15	++	++	++	+++	+++	+++

(ii) Pneumolysin 抗体測定試験

実験材料及び方法

実験1と同様、Pneumolysin 及びSTOで計5回免疫したマウスを用いた。

まず予備実験として、Pneumolysin の1アムブレをCystein Buffer 4 ml で溶解し、これを原液として倍数稀釈法にてPneumolysin の溶血力を測定した。

次に、Pneumolysin 及びSTOで免疫したマウスを心臓穿刺により採血して、血清を分離し、集めた各血清の2倍稀釈液を作り、予備実験における等張Bufferの代りにこれらの2倍稀釈血清を用いて、Pneumolysin に対する抗体の有無をしらべた。対照として無処置の正常マウスを同時に検査した。

表9 STO 及び Pneumolysin で免疫せるマウス
の Pneumolysin に対する抗体測定試験

A. 予実 備験	PnL 稀 釈									
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
B. 処置 群	++	++	++	++	++	++	++	+	—	—
PnL				±	—	—	—	—		
STO				++	+	+	+	±		
C. 対照群				++	++	+	+	±		

実験成績

表9に示す如く、Pneumolysin で免疫したマウスの血清は、STOで免疫したマウス及び対照マウスの血清と比べて、幾分弱いながら、Pneumolysin に対する溶血阻止力が認められた。しかし、STO免疫群は対照と比べて殆んど同じ溶血状態を示した。

考 按

Bernheimer & Cantoni 等⁴⁾ はマウスに致死量以下のSTOを予め1回注射した後、致死量のSTOで攻撃した場合、その毒作用に対する抵抗性が起つて来ることを報告し、この抵抗性は初回注射の3~6時間後に始まり約30時間続き後消失したと云っている。

著者はこれを再検討するために、致死量以下のSTOを予め6時間及び24時間前にマウスに静注して、STOに対する抵抗性をしらべたが、彼等の云うようには致死を防ぐことは出来なかつたけれども、死亡時間が延長する成績を得た。

著者は、その原因がマウスの血液にありはしまいか、もしありとすれば、それはマウスの血清側にあるのか或は血球側にあるのかを検討するために、血清中のASTO価の測定と血球の抵抗性試験とを合せて検査した。その結果、前処置マウスの血球の抵抗性は正常マウスのそれと全く同じであつた。又前処置マウスの血清も正常マウスのそれと同様、溶血を阻止するものは1例もなく、たゞ正常血清と比べて溶血の弱いものが前処置マウスの血清中に認められたが、特記すべき程の違いはなかつた。

しかし、本実験における血球の抵抗性には全く変化がないことと、極めて僅かながら溶血阻止に差のあつたことを考え合せて、死亡時間の延長の原因を追求する時は一応血清側のことも考慮する必要がある。

又STOを家兎に何回も接種すると、STOに対する特異的の抗体が出来ることは既に知られており、しかも、上記の様な1回前処置では不十分と思ひ、マウスの場合も同様にSTOを数回注射してその成績を観察することにした。

まず、著者は溶連菌のA、C、G各群の致死量以下のSTOで免疫したマウスのSTOに対する抵抗性を検査したところ、それらのマウスは同一のA群STOの致死量を注射しても、その殆んどが死亡しないことが分り、明らかに抵抗性があることを証明出来た。なお、各群STOで免疫されたマウスの間にもA群STOに対する抵抗性の相違は認められなかつた。

しかも、各群STOで免疫したマウスの血清中に、そ

それぞれのSTOに対する抗体が存在したことも認められた。

以上のことから考えて、本実験におけるマウスのSTOに対する抵抗性は、抵抗性と抗体の存在とがほぼ平行していることからみて、血清中のASTOに原因するところが多いように思われる。

次に、STOとPneumolysinとの関係を検討してみた。PneumolysinがSTOと同様に細菌溶血素であることは知られており、Gholesterolにより溶血作用が阻止される⁵⁾ことから考えて、STOと類似の作用機転をもつものであると云われている。

著者は、STOとPneumolysin、ASTOとPneumolysin抗体との問題をマウスを用いて交叉的に検討し、動物実験と試験管内試験とを平行して、両溶血素がそれぞれ特異的に作用することを確めた。

著者はまず致死量以下のPneumolysinとSTOをもつてそれぞれマウスを免疫し、致死量のPneumolysin及びSTOで交叉的に攻撃してみた。その結果、両マウスの抵抗性は特異的であり、Pneumolysinで免疫されたマウスはPneumolysinに対してのみ、又STOで免疫されたマウスはSTOに対してのみ抵抗性であることが分つた。

又両溶血素でそれぞれ免疫されたマウスの血清について、STO及びPneumolysinに対する抗体の有無を検討した。その結果、STOで免疫されたマウスはSTOに対してのみ、Pneumolysinで免疫されたマウスはPneumolysinに対してのみ抗体の存在が認められた。

これらのことから、Pneumolysinの場合も、STOと同じく、マウスのPneumolysinに対する抵抗性と抗体の存在とが平行しているように思われる。

以上の成績からみて、STOをマウスに注射すると、体内でこれに対する抗体が産生され、この抗体はSTOの作用を強く抑制することが分つた。しかも、この抑制作用は、STOとPneumolysinとの比較実験により、かなり特異的なものであることも証明された。STOは特異的な免疫原性をもつものと云うことが出来る。

なお、これと同時に、STOの溶血作用と致死作用はほぼ平行するようと思わせる成績をも得ることが出来た。

結 論

マウスを用いてSTOの免疫原性を検討したところ、マウスのSTOに対する抵抗性とASTOの存在とがほぼ平行していることが分つた。更に、STOとPneumolysin、ASTOとPneumolysin抗体との関係を交叉的に検討して、致死及び溶血の面から両溶血素がそれぞれ特異的なものであることが証明された。

終りに、御指導御校閲を賜った恩師工藤正四郎教授に厚く感謝致します。なお、材料を御分与下された埼玉衛研飛松博士並びに種々御助言を頂いた当研究部の各位に感謝致します。

文 献

- 1) 中村悠哉：Streptolysin O に関する実験的研究，第一報，A群，人系C群及びG群溶血連鎖球菌の産生するStreptolysin Oの血清学的関係について，日本細菌学雑誌，15巻，5号，463，1960。
- 2) Todd, E. W.: The streptolysins of various groups and types of haemolytic streptococci, J. Hyg., 39, 1, 1939.
- 3) 飛松源治，多比良公子，曾根政隆：微量血液(0.05~0.1ml)中のStreptolysin "O" 抗体測定法及び母子(臍帯血)抗体の比較，日本細菌学雑誌，12(9)，727，1957。
- 4) Bernheimer, A. W. and Cantoni, G. L.: The toxic action of preparations containing the oxygen-labile hemolysin of streptococcus pyogenes, III, J. Exp. Med., 86, 193, 1947.
- 5) Cohen, B., Shwachman, H. and Perkins, M. E.: Inactivation of pneumococcal hemolysin by certain sterols, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 35, 586, 1937.