Streptolysin O の血管透過性亢進作用に関する研究

第2報 数種薬剤の Streptolysin O の血管透過性 亢進作用に及ぼす影響

赤 谷 勇

東京大学伝染病研究所 第3細菌研究部 (部長 山本都夫教授)

[受付: 9月5日・1960年]

緒 言

細菌感染による炎症の基礎的研究の一環として、重要な化膿菌の一つである溶連菌をとりあげ、前報¹⁾において Streptolysin O (以下 SLO と略す) の分離、精製をこころみ、主としてその部分的精製分画²⁾を用いて血管透過性に及ぼす影響を検討し、SLO が強い血管透過性亢進作用を有することを報告した。

そこでこの血管透過性亢進 (以下血透亢と略す) の機序について何らかの示唆を得る目的でコレステロール (以下 ch と略す)、抗ヒスタミン剤 (以下抗ヒ剤と略す)、ACTH、コルチゾンおよび強力ネオミノファーゲン C (以下 SNMC と略す) 等が SLO による血透亢に対して如何なる抑制作用を示すかを更に実験した。

この点については既に藤枝³⁾が、ブドウ球菌 α -toxin による血透亢に対して種々の薬剤の抑制効果を報告しているので、私も同様にコレステロールを始めとする各種薬剤の血透亢抑制の比較検討をおこない、SLO による血透亢及び更に一般の炎症の際の血透亢の機序について考察してみた。

実験材料

1. Streptolysin O

これは既に前報において述べたように、磷酸カルシウム・ゲル⁴⁾で精製した SLO (A₁) を用いた。

2. コレステロール

東京化成工業株式会社製である。

3. 抗ヒスタミン剤

興服産業株式会社の分与による β -dimethylaminoethyl-benzhydryl-ether の塩酸塩を用いた。

4. ACTH

米国アーマー研究所製の Acthar で 1 mg は 1 I.U. を

含む。

5. コルチゾン

米国メルク社製の cortison acetate suspension で、1 瓶 20 ml 中に 500 mg を含有し、かつ benzyl alcohol 0.9% を含有する。

6. 強力ネオミノファーゲン C (SNMC)

ミノファーゲン製薬本舗の製品で、グリチルリチン 0.2%、システイン 0.1%、グリシン 2.0% を主成分とする製品である。

7. trypan blue

東京化成工業製のものを使用した。

実験方法

1. 試験管内溶血阻止

コレステロールの SLO 抑制効果を溶血価の面から知るために、Hewitt 及び Todd⁵⁾ の方法に従い in vitro であらかじめ ch を SLO に作用させ、その溶血阻止を観察した。即ち A₁ を pH 6.5 の磷酸緩衝液に 200 γ /0.5 ml 濃度に溶解し、更に倍数希釈し、SLO の希釈系列を 8 本作る。

各々の 0.5 ml に $\frac{M}{25}$ 塩酸システイン溶液 0.5 ml を加え、室温に 10 分放置し活性化後、コレステロールの 5 万~320 万倍まで 7 段階の倍数希釈液を SLO の希釈系列に 0.5 ml ずつ加える。

SLO の一つの系列には緩衝液 0.5 ml を加え対照とした。

これらを 37°C に 15 分放置し、次に 5% ヒツジ赤血球液

AKATANI Isamu: Studies on the effects of Streptolysin O on the capillary permeability in the rabbits. 2. Effects of several antagonizing agents upon the permeability promoting action of Streptolysin O. 3rd Bact. Dept., The Inst. f. Infect. Dis., Univ. of Tokyo.-Jap. J. of Bact., 16(4), 281-285, 1961.

0.5 ml を加え、更に30分放置し、遠心後その溶血を観察した。その他の薬剤はSLOの稀釈系列に1,000 γ/0.5 ml ずつ加え、上記と同様に観察した。

2. 血透亢阻止実験

1) 予備実験

まず一定量のコレステロールが、種々の濃度のSLOの血透亢作用に対して如何なる阻止を示すかを観察した。即ちSLOの100 γ, 20 γ, 2 γ及び0.2 γが0.1 ml 中に含まれるように稀釈し、それぞれに10万倍コレステロールを等量加え、15分室温に放置後その0.2 ml を家兎の背部に皮内注射し、2時間後の血透亢抑制を観察した。判定方法は前報¹⁾と同様である。

2) 本実験

次にSLOの血透亢をおこす最小量は、前報でも述べたごとく大体0.2 γであるが、ここでは更に確実に判然たる血透亢を示す2 γを用いた。使用薬剤の濃度はコレステロールでは10⁴, 10⁵及び10⁶倍稀釈を用い、ACTH, コーチゾン及び抗ヒスタミン剤では1000 γ, 100 γ, 10 γを、ミノファーゲンは原液、10倍及び100倍稀釈を用いた。

実験方法は予備実験と同様である。

実験成績

1. 試験管内溶血阻止

コレステロールの溶血阻止の成績は第1表の如くである。コレステロールの溶血阻止力は強力で、その320万倍溶液でもSLOの溶血作用を阻止しており、20万倍溶液では完全溶血を示すSLOの4倍量(100 γ)を抑制している。

2. 血透亢阻止実験

a. 予備実験

SLOの各稀釈に対して一定量のchを用いてその阻止を観察した。即ち第2表の如く、10万倍のchを使用した場合SLOの100 γ及び20 γでは、対照と較べると

いくらかその血透亢作用が低下しているが、完全には阻止し得ず、SLO 2 γ以下の場合には完全に阻止がみとめられた。溶血阻止と比較すると、chの作用が顕著ではないが、血透亢が非常に鋭敏なためであろう。

b. 本実験

この場合はSLOを一定(2 γ)にしてchや他の種々薬剤の血透亢阻止を観察した。

第2表 10万倍コレステロール溶液のSLO
血透亢抑制効果

	家 兎		SLO の 量			
	番号	体重 kg	100 γ	20 γ	2 γ	0.2 γ
SLO + コレステ ロール溶液	20	2.4	++	+	-	-
	21	2.9	+++	++	±	-
対 照 SLO	20	2.4	+++	+++	+++	+
	21	2.9	+++	+++	+++	++

1) コレステロール

chの場合は第3表に示した。即ち10⁶倍稀釈でもSLO 2 γの示す血透亢作用を明らかに阻止している。

2) 抗ヒ剤

第1報で述べたごとくヒスタミンは強力な血透亢因子¹⁾とされ、抗ヒ剤によつて抑制されるが、キシロールによる血透亢²⁾の様に抗ヒ剤の抑制効果がみとめられない事もある。

そこで先ずこのヒスタミンのみによる血透亢を観察した所、注射後30分で最高の血透亢を示し、その最小血透亢値は0.2 γであつた。依つてさらに前述の方法に準じて、主として30分値についてヒスタミン2 γが、抗ヒ剤により如何に抑制せられるかを実験した。この結果抗ヒ剤は、10 γでもヒスタミンの血透亢を抑制し、その100 γではさらに明瞭に抑制効果がみとめられた。

第1表 コレステロールのSLOに対する管内抑制効果

コレステロール SLO(γ)	(倍)	5×10 ⁴	10×10 ⁴	20×10 ⁴	40×10 ⁴	80×10 ⁴	160×10 ⁴	320×10 ⁴	A ₄
A ₄	200 γ	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	100 γ	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
	50 γ	-	-	-	-	+	+++	+++	+++
	25 γ	-	-	-	-	-	-	+	+++
	12.5 γ	-	-	-	-	-	-	-	++
	6.25 γ	-	-	-	-	-	-	-	+
	3.125 γ	-	-	-	-	-	-	-	-

第3表 コレステロールの SLO 血透亢抑制効果

添 加 コレステロール量	家 兎		SLO 2γ
	番号	体重 kg	
10 ⁴ 倍溶液	23	2.4	—
	24	2.8	—
	26	2.5	—
10 ⁵	23	2.4	—
	24	2.8	—
	26	2.5	±
10 ⁶	23	2.4	—
	24	2.8	—
	26	2.5	+
対 照 SLO	23	2.4	卅
	24	2.8	卅
	26	2.5	卅

なお対照として用いた抗ヒ剤のみ(30分値)による血透亢は 100γでも認められなかった。

次に SLO の 2γ が, 抗ヒ剤により如何に抑制されるかを実験した。この結果は第4表のごとく, 抗ヒ剤は単独に対照として用いた場合, 1時間値で, 1000γで血透亢を示すことがあり, 100γでは反応がみられなかった

第4表 抗ヒ剤の SLO 血透亢抑制効果

	家 兎		抗ヒ剤の量			対 照	
	番号	体重 kg	1000γ	100γ	10γ	SLO 2γ	抗ヒ剤 1000γ
抗ヒ剤 + SLO 2γ	31	2.5	+	+	卅	卅	+
	32	2.2	+	+	卅	卅	—
	33	2.5	+	+	卅	卅	+
	34	2.2	+	+	+	+	—

が, SLO に対しては 1000, 100, 10γ 共に抑制効果がみられなかった。

以上の成績から, 抗ヒ剤はヒスタミンによる血透亢はよく抑制できるが, SLO の血透亢は 1000γ までの大量をもつてしてもなお抑制し得ない事がわかった。

3) ACTH 及び コーチゾン

炎症時の血透亢因子として Menkin⁹⁻¹⁰⁾ が leucotaxine や exudin 等を重視し, ACTH¹¹⁾ や コーチゾン¹²⁾ を用い, その血透亢抑制実験を行つている。また藤枝³⁾ もすでに α-toxine について同様の抑制効果を報じているので, ここに SLO に対して ACTH や コーチゾン 等が如何なる抑制を示すかを実験した。

その成績は第5表及び第6表のごとくで, 先ず ACTH

第5表 ACTH の SLO 血透亢抑制効果

	家 兎		ACTH			対 照	
	番号	体重 kg	1000γ	100γ	10γ	SLO 2γ	ACTH 1000γ
ACTH + SLO 2γ	35	2.8	—	±	+	+	—
	36	2.5	—	—	+	+	—
	37	3.0	±	±	+	+	—
	38	2.5	—	±	+	+	—

第6表 コーチゾンの SLO 血透亢抑制効果

	家 兎		コーチゾン			対 照	
	番号	体重 kg	1000γ	100γ	10γ	SLO 2γ	コーチ ゾン 1000γ
コーチ ゾン + SLO 2γ	41	2.5	+	+	+	+	±
	43	2.0	+	+	+	+	—
	44	2.2	+	+	+	+	—
	45	3.0	+	+	+	+	—

の 1000γ 及び 100γ は, SLO の血透亢を抑制したが, 10γ ではほとんど抑制できなかった。

次にコーチゾンの場合は, 1000γ, 100γ および 10γ 共に SLO の血透亢に対する抑制効果が認められず, 対照として注射したコーチゾンのみ 1000γ で, 時に血透亢を示す場合もあったが, 100γ では血透亢を示さなかった。

4) 強力ネオミノファーゲン C (SNMC)

SNMC は柴田等¹³⁾ も述べているごとく, 臨床上の抗アレルギー剤として, 抗 シュワルツマン現象作用, 抗 Arthus 作用等を示す製剤であるから, 既に用いた各薬剤との比較検討の意味で, SLO 血透亢の如何なる抑制効果を示すかを観察した。

結果は第7表のごとく SNMC の原液は, SLO の血透亢を明らかに抑制するが, 10, 100 倍稀釈液では明瞭

第7表 SNMC の SLO 血透亢抑制効果

	家 兎		SNMC			対 照	
	番号	体重 kg	1×	10×	100×	SLO 2γ	SNMC 1×
SNMC + SLO 2γ	48	2.9	±	+	+	+	—
	50	2.5	—	+	+	+	—
	51	2.5	—	±	+	+	—
	52	2.8	—	—	+	+	—

な抑制効果を認める事ができなかった。

考 按

SLO の作用を抑制する物質の存在については, 種々

の報告^{5,10-12)}があるが、Rower 及び Bernheimer¹⁴⁾等は致死量以下の SLO を作用させた mouse の血清中に、lipoprotein 様の非特異的阻止物質が生ずることを述べている。また Hewitt および Todd 等は、コレステロールが SLO の毒性を阻止する実験成績を報じている。

そこですでに述べた如くコレステロールが、in vitro 及び in vivo で、SLO に対し如何なる抑制効果を示すかを実験した結果、適当量の溶血作用ならびに血透亢作用は、夫々20万倍程度のコレステロール溶液で抑制できる事がわかった。此のことは逆に本実験で血透亢作用を有する物質が、SLO である事を裏書きするものである。然し乍らこのコレステロールが、如何なる機序で SLO の血透亢を抑制するかは明らかでなく、今後の研究にまねばならない。

次にヒスタミンは、既に述べたように強力な血透亢因子の一とされているが、炎症時の血透亢因子として決定的な物質^{8,15)} 可否かに就いては、未だ一致した見解がえられていない。

本実験においても、SLO の血透亢が抗ヒ剤の1000 γ を用いてもなお抑制できなかった成績から、その血透亢はヒスタミンのみを介して起つたものとは考え難く、恐らく何かヒスタミン以外の因子が介在していると思われる。

又 leucotaxine は Menkin により抽出され、これも実験的に血透亢因子として指摘され、副腎皮質エキス¹⁶⁾ による抑制効果が報ぜられている。また酸性滲出液から得た exudin に就いても、その血透亢作用が ACTH によって抑制され、コーチゾン¹⁰⁾ では抑制されない点から、exudin 血透亢は leucotaxine やヒスタミンによる血透亢とは別なものではないかと言われている。

この点については田坂等¹⁵⁾ も同様の見解を示しており、炎症時血透亢の最重要な因子は leucotaxine のみに限らないとし、この物質の化学的単一性を否定し、また leucotaxine が histamine-liberator であるかも疑わしいと論じている。

本実験においても Menkin の抑制実験の方法¹⁰⁻¹²⁾ に従つて、SLO 血透亢に対して ACTH 及びコーチゾンが、如何なる抑制効果を示すかを観察したが、結果は藤枝の α -toxin の場合と同様に、1000 γ の ACTH で抑制され、コーチゾンには抑制されなかった。なおこの成績はまた Menkin の exudin 抑制効果と類似している。以上の実験成績から、SLO には上記の α -toxin や exudin 等と共通な、何らかの血透亢因子が介在するか否か甚だ興味をそそられる問題である。

但し上記の家兎を用いて行う実験の場合は、実験方法や条件によつて実験結果にかなりの変動がみられること等から、決定的なことは今後の問題であると考ええる。

次に Otto 等¹⁷⁾ はチフス菌の濾液を用い、Menkin-法⁶⁾ に従つて局所の血透亢を検索し、シユワルツマン現象と血透性との関係を強調している。

Menkin¹⁸⁾ も同様に家兎について、卵白アルブミンで Arthus 現象を起させた時に、局所にリンパ管閉塞を生じて、被検物質が固着してくる事を実験的に観察している。そこで斯かるシユワルツマン現象やアナフィラキシー等に対しても、抑制的に作用する S NMC を使用して血透亢の抑制実験を行つた。

この S NMC に就いてはすでに藤枝⁹⁾、栗栖^{13,19)} 等によつて詳しく検討せられているが、本実験においても SLO 血透亢を、S NMC 原溶液で抑制する事ができた。しかし S NMC の作用機序は未だ明らかではないので、この SLO 血透亢の抑制機序も如何なるものか判明していない。

結 論

SLO の血透亢の機序を考察する目的で Menkin の家兎を用いる実験方法によつて、コレステロール、抗ヒ剤、ACTH、コーチゾン及び S NMC 等の抑制作用を観察した。

その結果 SLO の血透亢は、コレステロール、ACTH、及び S NMC 等により抑制できるが、抗ヒ剤やコーチゾンでは抑制できなかった。これらの実験成績に基いて SLO の血透亢の機序について 2, 3 の考察を加えた。

拙筆するにあたり、御指導を賜つた恩師武田徳晴教授並びに、山本郁夫教授の御校閲に深謝すると共に、実験上種々の便宜と御助言を下さつた渡辺貞、青木良雄両博士並びに、研究室の諸先生に感謝致します。

本研究は、文部省科学研究費(炎症の発生機構研究班)の援助を受けたので、ここに感謝を表します。

文 献

- 1) 赤谷：日本細菌学雑誌投稿中。
- 2) 早野・飛松・内ヶ崎・多比良：日本細菌学雑誌，11，1021，昭31。
- 3) 藤枝：日本細菌学雑誌，13，1042，昭33。
- 4) Herbert, D. & Todd, E.: Bioch. J., 35, 1124, 1941.
- 5) Hewitt, L. & Todd, E.: J. Path. and Bact., 49, 45, 1939.
- 6) Menkin, V.: J. Exp. Med., 64, 485, 1936.
- 7) Lewis, T.: Heart., 11, 2091, 1924.

- 8) Rigdon, H. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 71, 637, 1949.
- 9) Menkin, V. : Newer Concepts of Inflamm., Charles Thomas 刊, 1950.
- 10) Menkin, V. : Am. J. of Phys., 166, 509, 1951.
- 11) Menkin, V. : Am. J. of Phys., 166, 518, 1951.
- 12) Menkin, V. : Am. J. of Phys., 164, 294, 1951.
- 13) 柴田・栗栖 : アレルギー, 3(3), 197, 昭 29.
- 14) Rower, R. & Bernheimer, A. : J. Immunol., 77, 72, 1956.
- 15) 田坂・荒木 : 最新医学, 13, 137, 昭 33.
- 16) Menkin, V. : Am. J. of Phys., 129, 691, 1940.
- 17) Otto, B. & Planet, N. : Compt. rend. Soc. de Biology., 129, 68, 1938.
- 18) Menkin, V. : J. Exp. Med., 63, 171, 1931.
- 19) 栗栖等 : アレルギー, 6, 250, 昭 32.