

破傷風 病因에 있어서의 破傷風 溶血素의 役割

A Possible Role of Tetanolysin in the Pathogenesis of Tetanus

서울대학교 醫科大學 微生物學敎室

<指導 奇 龍 肅 敎授>

張 友 鉉

I. 序 論

Tetanolysin 은 破傷風菌 培養液中에 나타나는 有毒成分으로서 各種動物의 赤血球에 對하여 溶血 및 壞死作用을 일으키며, 動物心臟에 對하여도 搏動停止作用이 있는 것으로 보아 사람의 破傷風 發病機轉에 關與하고 있는 것으로 推測이 되고 있다. 그러나 現在까지 破傷風의 診斷, 治療血清 및 豫方^{1,2,3)}의 基準은 破傷風의 臨床症勢인 痙攣을 일으키는 破傷風菌毒素의 一成分인 Tetanospasmin의 作用단을 目標로 하고 있다.

Tetanolysin 은 1898 年에 Ehrlich⁴⁾가 처음으로 破傷風菌 培養液內에서 證明하였다. 其後 Fleming 및 Neil^{5,6)}의 研究에 依하면 Tetanolysin 은 培地內에서 破傷風菌의 發育增殖이 旺盛할 때 多量으로 產出되며, 그 性質이 酸素 및 熱에 對하여 不安定하다고 하였다. 實驗動物에 注射하면 抗原성이 證明된다고 하였고, 赤血球로 吸收하면 培養液中에 同時에 나타나는 Tetanospasmin을 分離할 수 있다고 하였다. Hardegree⁷⁾는 Sephadex G-100 gel 濾過로 Tetanospasmin을 純粹하게 分離하였다고 한다. Ehrlich 및 Kraus⁴⁾ 등은 正常動物 血清內에 Tetanolysin의 作用을 抑制하는 物質이 있다고 指摘하였으며, Noguchi, Müller 및 Detre⁴⁾은 이와 같은 作用은 正常血清內의 lipid 成分 때문이라고 하였다.

Hynigen⁸⁾은 Tetanolysin 이 家兔나, guinea pig의 組織에 對하여 壞死作用이 있고, 心臟에 對하여 搏動停止作用이 있다고 하였으며, 이와같은 作用은 Pneumolysin, Streptolysin O 및 Cl. welchii의 theta toxin 등에서 볼 수 있다고 하였다^{8,9)}.

破傷風患者 治療에 있어서 多量의 抗毒素을 使用하여도 좋은 效果를 거두지 못하고 있는 點^{2,10)}이나 Tetanus Anatoxin에 依한 免疫으로 罹患率에 큰 變化를 일으키지 못하는 點¹¹⁾ 등은 아직도 破傷風治療와 豫防에 重要한 問題가 未解決로 남아 있음을 意味하고 있는 것

이다.

過去 여러 學者들은^{1-3,12-14)} Tetanospasmin 以外的의 破傷風菌 生産物質에 對하여서는 거의 重要視하고 있지 않은 것으로 보인다. 그러나 Tetanolysin 이 破傷風 發病機轉에 어떠한 役割을 하는 것이 아닌가 疑心이 되며, 萬一 그렇다면 破傷風 豫防製劑나 治療血清에도 이 問題가 考慮되어야 할 것으로 생각된다.

著者は Tetanolysin의 基本的인 性質을 觀察하였고, Streptolysin O와 比較하여 그 類似點을 밝히고 破傷風의 發病機轉에 있어서 Tetanolysin 이 役割을 할 可能性을 論하였다.

II. 材料 및 方法

1. Tetanolysin

1) 菌 株

國立保健研究院에서 分讓받은 Clostridium tetani; Massachusetts strain을 Tetanolysin 生産用 菌株로 使用하였다.

2) Tetanolysin 및 Tetanospasmin 混合液

Tetanolysin 生産用 培地로는 modified Müller medium¹⁵⁾을 使用하였으며, Cl. tetani를 植菌하여 37°C에 2日間 培養한 것을 4°C에서 6,000 RPM 30分間 遠沈하여 上清을 Tetanolysin 및 Tetanospasmin 混合液으로 使用하였다. 上記 培養液 100倍 稀釋液 0.2 ml을 mouse 下肢 大腿部에 注射하면 scoliosis와 下肢 및 全身에 痙攣을 일으키는 觀察할 수 있었다. 이 培養液은 6.05×10^{-2} ml이 1 Mouse MLD에 該當하며, Rammon's Flocculation法으로 Lf 20이었다.

緬羊赤血球에 對한 溶血價는 50% 溶血價가 1:512였다. 따라서 本實驗에서 Tetanolysin 이라 稱한 것은 Tetanospasmin 이 包含된 Cl. tetani의 培養液이다.

豫備試驗으로 Tetanolysin의 生産適期를 찾아 보기 위하여 培養時間에 따라 生産되는 Tetanolysin의 量을 測

定한바 第 1 圖에 表示된 바와 같이 Tetanolysin 은 24 時間 以內에 生産되기 시작하여 48 時間 後에 最高로 生産되어 力價가 1:512 에 達하였으며, 還元劑로 還元한 後가 아니면 3 日後 부터는 漸次로 그 力價가 低下되기 始作하여 20 日後에는 겨우 1:2 밖 에 남지 않았다. 그러나 還元劑로 還元하면 繼續 10 日間 最高力價를 維持하다가 漸次로 低下되기 始作하여 20 日에서도 1:64 의 力價를 보였다. 10 日 以上 培養한 것은 還元劑의 分量을 더 많이 加하더라도 그 以上의 力價를 얻지 못하였다(第 1 表 參照).

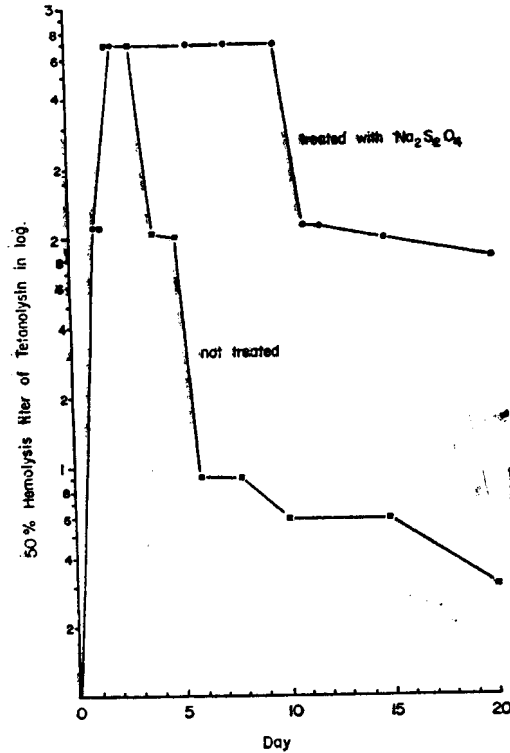


Fig. 1. Tetanolysin titers during the growth of Cl. tetani

3) 破傷風 抗毒素

International Serum Institute, Copenhagen 에서 分讓 받은 Standard Tetanus Antitoxin을 標準抗毒素로 하고 Wyeth Laboratories Inc. 製 破傷風 抗毒素(Refined and concentrated Equine Origin 3,000 units/ml)를 標準抗毒素에 依하여 定한 單位를 基準으로 適宜稀釋하여 使用하였다.

2. Streptolysin O

1) 菌 株

國立醫院院 細菌科에서 分讓받은 group A β-hemolytic Streptococcus S 84 를 Streptolysin O 生産用 菌株로 使用하였다.

2) Streptolysin O

Streptolysin O 生産用 培地¹⁶⁾에 16 時間 培養한 培養液을 4°C 에서 6,000 RPM 으로 遠沈하여 얻은 上清을 Streptolysin O 로 使用하였으며, 이 上清은 還元되지 않았을 때는 全然 溶血作用이 없었다.

Streptolysin O 의 力價: 生産된 Streptolysin O 0.03125ml 은 Antistreptolysin O 0.01 unit 로 完全히 中和시킬 수 있었다.

3) 標準 Antistreptolysin O 의 由來

本實驗에 使用한 標準 Antistreptolysin O 는 International Serum Institute, Copenhagen 에서 分讓받은 것이다.

3. 赤血球 浮遊液

本實驗에 使用된 赤血球은 人 O 型, 緬羊, 家兔 및 guinea pig 赤血球等이며, 採血 當日 使用하였거나, 或은 Alserver's solution 에 同量의 血液을 加하여 4°C 冷藏庫에 保管하였으며, 採血日로 부터 2 週以內에 使用하였다. 赤血球浮遊液은 pH 7.0 磷酸緩衝食鹽水로 3 回 洗滌後 2% 浮遊液을 만들어 使用하였다. 豫備試驗에 依하여 Tetanolysin 을 測定할 때는 磷酸緩衝食鹽水 pH 8.3(NaH₂PO₄·H₂O 0.233gm, Na₂HPO₄·12H₂O 23.3 gm, NaCl 2.96 gm, 蒸溜水 1,000 ml)을 稀釋用으로 使用하였고, Streptolysin O 를 測定할 때는 磷酸緩衝食鹽水 pH 6.5(NaH₂PO₄·H₂O 6.44gm, Na₂HPO₄·12H₂O 7.17 gm, NaCl 4.3 gm, 蒸溜水 1,000 ml)를 使用하였다. 本實驗에서는 主로 緬羊 赤血球를 使用하였다.

4. 溶血作用 試驗方法

Tetanolysin 0.5 ml 을 pH 8.3 磷酸緩衝食鹽水로 倍數稀釋을 한 後 2% 緬羊赤血球浮遊液 0.5 ml 을 加하고 混合하여 37°C 恒溫水槽에 30 分間 加溫하고 3 分間 遠沈하여 溶血價를 判讀하였다.

溶血된 程度의 標示를 便宜上 다음과 같이 數字로 標示하였다.

100%	溶血	4
75%	溶血	3
50%	溶血	2
25%	溶血	1
25% 以下	溶血 ± 溶血안됨.	—

本實驗에 는 本溶血作用이 特殊型임을 考慮하여 溶血價를 50% 溶血稀釋倍數로서 表示하였다.

5. 溶血抑制作用 檢査方法

Tetanolysin 의 溶血作用을 抑制하는 物質인 chole-

terol, 正常動物血清, 破傷風 抗毒素 및 Antistreptolysin O 等の 作用을 測定할 때는 稀釋된 Tetanolysin 에 cholesterol emulsion 或은 其他 上記 物質을 稀釋하여 一定量을 加하고, 15 分間 37°C 恒溫水槽에 두었다가 赤血球 浮遊液을 加한後 다시 30 分間 37°C 恒溫水槽에 加溫, 遠沈하여 溶血 抑制與否를 對照와 比較하여 判讀하였다. Streptolysin O 에 對한 溶血抑制作用을 檢査할 때는 稀釋用 磷酸緩衝食鹽水 (PH6.5)를 使用한 外에는 同一한 手技를 使用하였다.

6. 還元劑의 使用量 決定

Tetanolysin 과 Streptolysin O 를 活性化시키는데 要하

는 還元劑의 分量을 決定하기 爲하여 2日, 6日, 10日 및 20日 培養한 Tetanolysin 과 16時間 培養한 Streptolysin O 를 分量을 달리한 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 로 處理한後 溶血作用을 檢査하여 第1 및 2表와 같은 成績을 얻었다. 即 2日 및 6日間 培養한 Tetanolysin 은 10 mg/ml 의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 에 依하여 還元되었을 때 溶血作用이 恢復되었고, 10日 및 20日間 培養한 Tetanolysin 은 15 mg/ml 의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 로 還元했을 때 溶血價가 完全히 恢復되었다. Streptolysin O 는 1.5~2.0 mg/ml 의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 로 還元했을 때 溶血價가 完全히 恢復되었다. 本實驗에서는 Tetanolysin 은 10 mg/ml 의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 를, Streptolysin O 는 1.5 mg/ml 의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 를 還元の 目的으로 使用하였다.

Table 1. Optimal amount of reducing substance (sodium hydrosulfite) for the reactivation of Tetanolysin

Amounts of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ for the treatment (mg/ml)		Dilution of Tetanolysin									
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
2 days, 6 days old culture	5	4*	4	4	4	4	3	2	—	—	—
	10	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
	15	4	4	4	4	4	4	3	2	—	—
	20	?	?	?	4	4	4	2	—	—	—
	25	?	?	?	4	4	4	2	—	—	—
	30	?	?	?	?	?	4	2	1	—	—
0	4	3	2	—	—	—	—	—	—	—	
10 days old culture	10	4	4	4	4	4	4	3	2	—	—
	15	4	4	4	4	4	4	3	2	±	—
	20	4	4	4	4	4	4	3	1	—	—
	0	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—
20 days old culture	10	4	4	4	4	2	1	1	—	—	—
	15	4	4	4	4	3	2	1	—	—	—
	20	4	4	4	4	2	1	—	—	—	—
	25	?	?	?	?	?	±	—	—	—	—
	0	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—

• Degree of hemolysis : 4Complete hemolysis 375% hemolysis 250% hemolysis
 1 25% hemolysis ±Trace of hemolysis —No hemolysis

Table 2. Optimal amount of reducing substance (sodium hydrosulfite) for the reactivation of Streptolysin O

Amounts of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ for the treatment (mg/ml)		Dilution of Streptolysin O									
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
1.0	4	4	4	3	1	—	—	—	—	—	—
1.5	4	4	4	4	4	3	2	—	—	—	—
2.0	4	4	4	4	4	3	2	—	—	—	—
2.5	4	4	4	4	4	3	1	—	—	—	—
3.0	4	4	4	4	4	3	1	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Ⅲ. 實驗 結果

價가 低下되는 것을 볼 수 있었다. 이 原因이 Tetanolysin의 酸化에 依한 非酶化인지 或은 이것이 破壞됨으로 因한 因지의 與否를 알기 爲하여 2日 培養液을 通氣하거나, 4°C 冷藏庫에 10日間 靜置한 後 溶血作用을 測定하여 보면 第3表와 같이 溶血價가 1:512에서 各各

1. Tetanolysin의 酸化 및 還元으로 因한 影響

Cl. tetani를 液體培地에 培養하면 初期에는 培養液의 溶血作用이 强하게 나타내지만 漸次 그 溶血作用의 力

Table 3. Influence of hemolytic activity of Tetanolysin by oxidation and reduction

Treated with	Various samples of tetanolysins	Dilution of Tetanolysin									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Na ₂ S ₂ O ₄ for reduction	2 days old culture fluid	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
	Original 2 days old culture fluid (Control)	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
	6 days old culture fluid	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
	Original 6 days old culture fluid (Control)	4	3	2	—	—	—	—	—	—	—
	2 days old culture	Dilution of Tetanolysin									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:30	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1034
Aeration	4 hours in room Temperature	4	3	2	1	—	—	—	—	—	—
	Stored in refrigerator for 10 days	4	4	3	2	—	—	—	—	—	—
	None(Control)	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
Na ₂ S ₂ O ₅ for oxidation after reduction	Amounts used (mg/ml)										
	20.0	4	3	±	±	±	—	—	—	—	—
	10.0	4	4	4	3	2	±	—	—	—	—
	2.5	4	4	4	4	2	1	±	—	—	—
	None (control)	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
5% H ₂ O ₂	5 minutes after adding same amount of oxidizing agent	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	None (Control)	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—

Table 4. Influence of hemolytic activity of Streptolysin O by oxidation and reduction

Various samples of Streptolysin O treated with	Dilution of Streptolysin O									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Na ₂ S ₂ O ₄ (for reduction)	4	4	4	4	4	3	2	—	—	—
none (control)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Na ₂ S ₂ O ₅ for oxidation after reduction	Amounts used (mg/ml)									
	2.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1.0	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.5	2	±	—	—	—	—	—	—	—
	None (control)	4	4	4	4	4	3	2	—	—
5% H ₂ O ₂	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	None (control)	4	4	4	4	4	3	2	—	—

1:8, 1:6으로 低下되는 것을 볼 수 있었다. 이것을還元劑인 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 를 加하여還元시킨 後에 다시測定하여 보면 本來의 溶血價인 1:512로 恢復되었음을 볼 수 있었다.還元後에 1:512의 溶血價를 가지고 있는 Tetanolysin을 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 와 H_2O_2 로 各各酸化하면 溶血價는 顯著히 低下됨을 볼 수 있었다

Streptococcus의 16時間 培養液에서도 Streptolysin O의 溶血價는 1:2 以下였으나, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 로 處理한 後에는 第4表에서 보는 바와 같이 1:128의 溶血價를 나타내었다. 一旦還元되어 溶血作用이 恢復된 Streptolysin O라 하더라도 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 或은 H_2O_2 로 酸化시키면 溶血作用이 다시 低下되는 것을 볼 수 있었다.

2. Tetanolysin의 各種動物 赤血球에 對한 溶血作用

Tetanolysin 및 Streptolysin O의 溶血作用을 사람, 家兔, 緬羊 및 guinea pig의 赤血球를 使用하여 各各

比較하였던 바 第5表 및 第6表에 表示된 바와 같이 Tetanolysin의 溶血價는 人赤血球에 對해 1:1,024, guinea pig 및 緬羊赤血球에 對해 1:512, 家兔赤血球에 對해서는 1:256이 있으며, Streptolysin O의 溶血價는 人赤血球에 對해서는 1:256, 緬羊 및 家兔赤血球에 對하여서는 1:128이었다. 人赤血球는 Tetanolysin 및 Streptolysin O 兩者에 對하여 各各 溶血의 感度가 높았다.

3. Tetanolysin 및 Streptolysin O의 溶血作用에 對한 最適 水素이온 濃度

pH 5.2, 5.7, 6.2, 6.7, 7.2, 7.7, 8.3, 8.8, 9.2의 磷酸緩衝食鹽水로 pH 變化에 따르는 Tetanolysin 및 Streptolysin O의 溶血價를 比較하여 第7表 및 第8表에서 보는 바와 같은 結果를 얻었다. 即 Tetanolysin은 pH 8.3에서 溶血價가 가장 높았고 反應液의 pH가

Table 5. Hemolytic activities of Tetanolysin against erythrocytes from various animals

Sources of erythrocytes	Dilution of Tetanolysin									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Human	4	4	4	4	4	4	4	3	3	2
Sheep	4	4	4	4	4	4	4	3	2	1
Rabbit	4	4	4	4	4	4	3	2	—	—
Guinea pig	4	4	4	4	4	4	4	3	2	1

Table 6. Hemolytic activities of Streptolysin O against erythrocytes from various animals

Sources of erythrocytes	Dilution of Streptolysin O									
	1:2	1:8	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Human	4	4	4	4	3	2	2	2	—	—
Sheep	4	4	4	4	2	2	2	—	—	—
Rabbit	4	4	4	3	2	2	2	—	—	—
Guinea pig	4	4	4	4	3	2	2	2	—	—

Table 7. Optimal pH for the activity of Tetanolysin

pH	Dilution of Tetanolysin									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
5.2	4	4	4	4	3	2	—	—	—	—
5.7	4	4	4	4	4	3	3	2	—	—
6.2	4	4	4	4	4	4	3	2	1	—
6.7	4	4	4	4	4	4	3	2	1	—
7.2	4	4	4	4	4	4	3	3	1	—
7.7	4	4	4	4	4	4	3	3	2	1
8.3	4	4	4	4	4	4	4	3	3	2
8.8	4	4	4	4	4	4	3	2	1	—
9.2	4	4	4	4	4	3	2	—	—	—

Table 8. Optimal pH for the activity of Streptolysin O

pH	Dilution of streptolysin O									
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
5.2	4	4	4	4	2	—	—	—	—	—
5.7	4	4	4	4	4	3	1	—	—	—
6.3	4	4	4	4	4	3	2	—	—	—
6.7	4	4	4	4	4	3	2	—	—	—
7.2	4	4	4	4	4	3	1	—	—	—
7.7	4	4	4	3	2	—	—	—	—	—
8.0	4	4	4	3	—	—	—	—	—	—
8.4	4	4	3	—	—	—	—	—	—	—
8.8	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—
9.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

8.3을 中心으로 酸性 或은 鹽基性 方向으로 變하면 溶血價가 漸次 低下하는 것을 볼 수 있었다. Streptolysin O는 反應液의 pH가 6.3 乃至 6.7에서 가장 溶血價가 높았으며, pH 6.3 乃至 6.7을 中心으로 pH의 變化에 따라 溶血價가 漸次 低下하며, pH 9.2에서는 全然 溶血되지 않았다. 이것은 反應液의 pH를 選定할 必要가 있음을 指摘하는 事實이라고 볼 수 있다.

4. Tetanolysin 및 Streptolysin O의 加熱에 依한 影響

Tetanolysin 과 Streptolysin O를 各各 37°C, 45°C,

56°C 恒溫水槽에서 1分, 5分, 10分, 15分, 30分, 45分, 60分, 90分, 120分, 150分 및 280分間 加溫하여 그 溶血作用을 比較하였던바 第2 및 3圖에서 보는 바와 같은 結果를 나타내었다. 即 Tetanolysin은 56°C에서 5分後부터 溶血作用이 消失되기 始作하여 45分後에는 全然 溶血이 일어나지 않았으며, 45°C에서는 150分까지 溶血價의 變動이 없었다가 서서히 溶血作用의 低下가 始作되었으나, 280分後에도 溶血價는 1 : 256을 維持하고 있었다(第2圖 參照). Streptolysin O는 56°C에서 1分만에 2倍稀釋液에서 25%의 溶血을 보였고, 2分後에는 全然 溶血되지 않았으며, 45°C에서

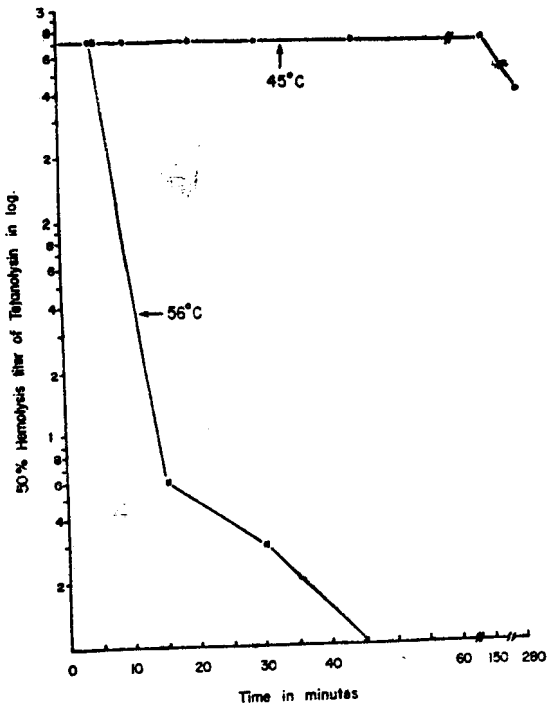


Fig. 2. Destruction of Tetanolysin by heat

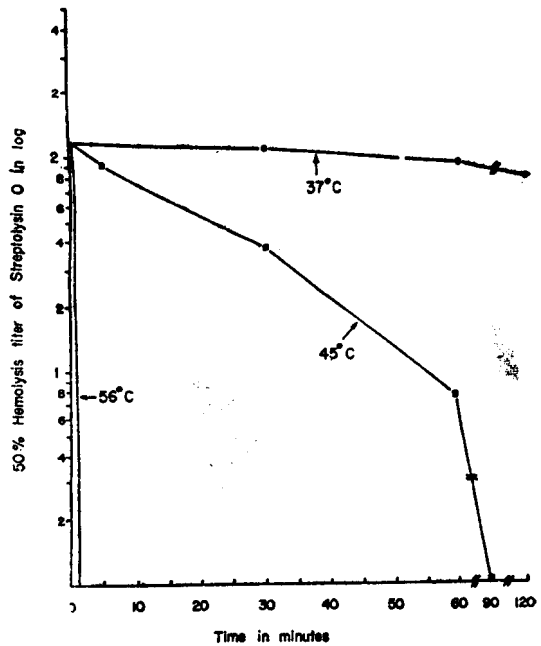


Fig. 3. Destruction of Streptolysin O by heat

는 5分後에 溶血價가 1:96으로 下降되고, 90分後에 是 全然 溶血되지 않았다. 37°C에서도 30分까지는 溶血價의 變動이 없었으나 그後부터 漸次 溶血作用이 低下되어 120分後에는 1:128에서 1:64로 低下되었다 (第3圖 參照).

5. Tetanolsin 및 Streptolsin O의 各種 鹽類에 依한 影響

KCl, MnSO₄, CaCl₂, MgSO₄, MgCl₂, K₂SO₄의 含量을 5mg%, 10mg%, 25mg%, 50mg% 및 100mg%가 되도록 等張食鹽水에 溶解시킨 것을 反應液으로 使用하여 이와 같은 中性鹽類가 Tetanolsin 과 Streptolsin O의 溶血作用에 미치는 影響을 觀察하여 第9 및 10表와 같은 結果를 얻었다. 即 MnSO₄는 Tetanolsin 이나 Streptolsin O에 對해서 顯著한 溶血抑制作用을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 그러나 KCl, MgSO₄, CaCl₂, MgCl₂ 및 K₂SO₄ 등은 Tetanolsin 및 Streptolsin O의 溶血作用에 特記할만한 影響을 주지 않는 것으로 보이나 CaCl₂에 있어서는 10mg%에서 Streptolsin O의 溶血作用이 若干 亢進된 것을 볼 수 있었다.

6. Tetanolsin 및 Streptolsin O의 溶血作用에 對한 Cholesterol의 影響

Cholesterol 1mg%, 0.1mg%, 0.01mg%, 0.001mg%에 該當하는 Emulsion을 反應液에 加하여 Tetanolsin 과 Streptolsin O의 溶血作用을 比較하여 第11表 및 第12表와 같은 結果를 얻었다. 即 反應液에 1mg%가 包含된 境遇에는 Tetanolsin 및 Streptolsin O 모두 溶血作用을 完全히 消失하였으나, 漸次 cholesterol의 含量이 減少됨에 따라 溶血價가 上昇되어 0.001mg%에서는 兩者가 모두 對照群과 同一한 溶血價를 나타내는 것을 볼 수 있었다.

7. 各種 正常血清에 依한 Tetanolsin 및 Streptolsin O의 溶血作用에 對한 影響

正常動物血清이 Tetanolsin 과 Streptolsin O에 주는 影響을 보기 위하여 56°C에 30分間 非働化한 人血清 (group AB 血液 血清), 馬血清 및 家兔血清의 各種量을 反應液에 加하여 Tetanolsin과 Streptolsin의 溶血

Table 9. Activity of Tetanolsin influenced by various salt

Contents (mg %)	Salts					
	KCl	MnSO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	MgCl ₂	K ₂ SO ₄
100	512 ²⁾	24			512	384
50	512	48	512	512	512	384
25	512	48	512	512	512	512
10	512	64	512	526	512	512
5	1,024	96	256	256	512	512
NaCl	512	512	512	512	512	512
P.B.S ¹⁾	512	512	512	512	512	512

1) pH 8.3 phosphate buffer saline
2) Numericals shows 50% hemolysis titer

Table 10. Activity of Streptolsin O influenced by various salts

Contents (mg%)	Salts					
	KCL	MnSO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	MgCl	K ₂ Cl ₂
100	128 ²⁾	16			96	96
50	128	16	128	128	96	96
25	128	16	128	128	96	96
10	128	32	242	128	128	96
5	128	32	96	242	128	96
NaCl	128	128	128	128	128	128
P.B.S ¹⁾	128	128	128	128	128	128

1) pH 6.5 Phosphate buffer saline
2) Numericals shows 50% hemolysis titer

Table 11. Inhibition of Tetanolsin activity by cholesterol

Amounts of cholesterol in each diluent (mg %)	Dilution of Tetanolsin									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—
0.01	4	4	4	4	4	4	3	1	—	—
0.001	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
Control	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—

Table 12. Inhibition of Streptolysin O activity by cholesterol

Amounts of cholesterol in each diluent (mg %)	Dilution of Streptolysin O									
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1	3	2	1	—	—	—	—	—	—	—
0.01	4	4	4	3	1	—	—	—	—	—
0.001	4	4	4	4	4	2	1	—	—	—
Control	4	4	4	4	4	2	1	—	—	—

Table 13. Inhibitory activity of normal sera on Tetanolytin

Sources of normal sera	Dilution of Sera	Dilution of Tetanolytin									
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1,024
Human sera * pooled	2	4	4	4	2	1	—	—	—	—	—
	4	4	4	4	4	2	—	—	—	—	
	8	4	4	4	4	3	2	1	—	—	
	32	4	4	4	4	3	3	2	1	±	
	128	4	4	4	4	4	3	2	1	±	
	512	4	4	4	4	4	3	2	1	1	
	1,024	4	4	4	4	4	3	3	2	1	
	Control	4	4	4	4	4	3	3	2	1	
Horse sera pooled	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	4	±	—	—	—	—	—	—	—	—	
	16	1	—	—	—	—	—	—	—	—	
	64	3	2	1	±	—	—	—	—	—	
	256	4	4	2	1	±	—	—	—	—	
	1,024	4	4	4	3	2	2	1	—	—	
	2,048	4	4	4	4	4	4	3	2	1	
	Control	4	4	4	4	4	4	3	2	1	
Rabbit sera pooled	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	16	2	1	1	±	—	—	—	—	—	
	64	4	3	3	2	1	—	—	—	—	
	128	4	4	3	2	1	—	—	—	—	
	512	4	4	4	3	2	—	—	—	—	
	1,024	4	4	4	3	3	2	1	—	—	
	2,048	4	4	4	4	3	3	2	—	—	
	4,096	4	4	4	4	4	3	3	2	1	
	Control	4	4	4	4	4	4	3	2	1	

* Group A.B sera was absorbed with packed sheep erythrocytes

작용의 변화율 比較하였다. 第 13 및 15 表와 같이 人血
清 1 : 2 倍 稀釋液에 依하여 Tetanolytin의 溶血價는 1 :
16 으로 低下되었고, 1 : 1,024 倍 稀釋液에서는 全然溶
血抑制作用이 없었다. Streptolysin O 에 對해서는 1 : 8 倍
稀釋液에서 溶血作用이 完全히 抑制되었고, 1 : 1,024
倍 稀釋液에서는 全然溶血抑制作用을 나타내지 못하였

다. 馬血清 1:2倍 稀釋液에서는 Tetanolytin 의 溶血作用
이 完全히 抑制되었고, 1 : 2,048 倍 稀釋液에서는 抑制
作用이 없었다. Streptolysin O 에 對해서는 馬血清 1:4倍
稀釋液에 있어서 完全히 溶血作用이 抑制되었고 1:512
倍 稀釋液에서는 抑制作用이 없었다. 家兔血清 1 : 4 倍
稀釋液에서는 Tetanolytin 의 溶血作用이 完全히 抑制되

Table 14. Inhibitory Activity of normal sera on Streptolysin O

Sources of normal sera	Dilution of serum	Dilution of Streptolysin O									
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1,028
Human sera * pooled	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	32	4	2	—	—	—	—	—	—	—	
	128	4	4	4	—	—	—	—	—	—	
	512	4	4	4	4	4	1	—	—	—	
	1,024	4	4	4	4	4	3	2	—	—	
	Control	4	4	4	4	4	3	2	—	—	
Hores sera pooled	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	8	4	2	—	—	—	—	—	—	—	
	32	4	4	4	2	—	—	—	—	—	
	128	4	4	4	4	2	1	—	—	—	
	512	4	4	4	4	4	3	2	—	—	
	Control	4	4	4	4	4	3	2	—	—	
Rabbit sera pooled	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	32	2	—	—	—	—	—	—	—	—	
	128	4	2	—	—	—	—	—	—	—	
	512	4	4	4	3	—	—	—	—	—	
	1,024	4	4	4	4	4	2	—	—	—	
	2,048	4	4	4	4	4	3	2	—	—	
	Control	4	4	4	4	4	3	2	—	—	

* Group A.B sera was absorbed with packed sheep erythrocytes

었고, 1 : 4,096 배 稀釋液에서는 溶血抑制作用을 나타내지 못하였다. Streptolysin O에 對해서는 1 : 16 배 稀釋液에 있어서 溶血作用이 完全히 抑制되었으며, 1 : 2,048 배에서는 全然 溶血作用이 抑制되지 않았다.

8. 破傷風 抗毒素의 Tetanolysin 과 Streptolysin O에 對한 反應

Tetanolysin 과 Streptolysin O가 其抗體間에 交叉反應을 일으키는지를 알기 爲하여 Tetanolysin 과 Antistreptolysin O, Streptolysin O와 破傷風 抗毒素과의 中和作用을 觀察하였다. 即 2列의 破傷風 抗毒素 0.75, 0.375, 0.187, 0.075, 0.037, 0.0187, 0.0093 I.U.에 各各 Tetanolysin 과 Streptolysin O를 加하여 37°C에서 15分間 作用시킨 後 溶血作用을 比較하였고 다시 2列의 Antistreptolysin O 0.5, 0.1, 0.05 0.025, 0.0125, 0.0062 I.U.에 對해서 Tetanolysin 과 Streptolysin O의 溶血中和作用을 試驗하여 第 15, 16, 17表 및 第 18表와 같은 結果를 얻었다. 即 破傷風 抗毒素은 0.75 I.U.에서 Tetanolysin 및 Streptolysin O의 溶血作用을 모두 抑制할 수 있었으며 0.0093 I.U.로는 本實驗에 使用된 Tetanolysin의 溶血作用을 抑制하지 못하였다. 破傷風 抗毒素 0.018

I.U.로는 Streptolysin O의 溶血作用을 抑制시킬 수 없었다. 한 便 Antistreptolysin O는 0.5 I.U.로 1 : 4 배 稀釋의 Streptolysin O와 1 : 32배 稀釋의 Tetanolysin의 溶血作用을 完全히 抑制시킬 수 있었으며, 0.0062 I.U.로는 streptolysin O를, 0.0125 I.U.로는 Tetanolysin의 溶血作用을 抑制시킬 수 없었다. 이 實驗結果로 Tetanolysin 과 Antistreptolysin O 및 Streptolysin O와 破傷風 抗毒素間에 免疫學的 交叉中和反應이 있는 것을 알 수 있었다.

9. 各種 血清中에 包含된 Cholesterol의 測定

上記 實驗 7 및 8에서 보는 바와 같이 各種 血清이 Tetanolysin 이나, Streptolysin O의 溶血作用을 抑制하는 것이 血清中에 包含된 cholesterol로 因함인지를 알기 爲하여 사람, 馬 및 家兎血清과 破傷風 抗毒素 및 Antistreptolysin O 中에 包含된 total cholesterol 및 free cholesterol을 測定¹⁷⁾하였다. 即 人血清에서는 total cholesterol 139mg%, free cholesterol 37.53mg%, 馬血清에서는 total cholesterol 160mg%, free cholesterol 28.4 mg%, 家兎血清에서는 total cholesterol 46 mg%, free

Table 15. Inhibitory action of tetanus antitoxin against Tetanolysin

Tetanus antitoxin in each diluent (unit)	Dilution of Tetanolysin									
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1,024
0.75	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.375	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.187	4	2	2	—	—	—	—	—	—	—
0.075	4	4	3	2	—	—	—	—	—	—
0.037	4	4	4	4	3	2	—	—	—	—
0.0187	4	4	4	4	4	3	2	1	—	—
0.0093	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
Control	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—

Table 16. Inhibitory action of tetanus antitoxin against Streptolysin O

Tetanus antitoxin in each diluent (unit)	Dilution of Streptolysin O									
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1,024
0.75	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.375	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.187	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—
0.075	4	4	4	3	—	—	—	—	—	—
0.037	4	4	4	4	2	2	—	—	—	—
0.018	4	4	4	4	4	3	2	—	—	—
Control	4	4	4	4	4	4	2	—	—	—

Table 17. Inhibitory action of Anti-streptolysin O against Streptolysin O

Anti-streptolysin O in each diluent (unit)	Dilution of Streptolysin O									
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1,024
0.5	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1	4	4	2	—	—	—	—	—	—	—
0.05	4	4	4	3	—	—	—	—	—	—
0.025	4	4	4	3	2	—	—	—	—	—
0.0125	4	4	4	4	4	2	—	—	—	—
0.0062	4	4	4	4	4	3	2	—	—	—
Control	4	4	4	4	4	4	2	—	—	—

Table 18. Inhibitory action of Anti-streptolysin O against Tetanolysin

Anti-streptolysin O in each diluent (unit)	Dilution of Tetanolysin									
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1,024
0.5	4	4	3	1	—	—	—	—	—	—
0.1	4	4	4	3	2	—	—	—	—	—
0.05	4	4	4	4	4	2	—	—	—	—
0.025	4	4	4	4	4	4	3	2	—	—
0.0125	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—
Control	4	4	4	4	4	4	4	3	2	—

cholesterol 13.8 mg%가 포함되어 있었으며, 破傷風 抗毒素 및 Antistreptolysin O에서는 全然 檢出되지 않았다. 이와 같은 事實로 보아 破傷風 抗毒素 및 Antistreptolysin O의 Tetanolysin 및 Streptolysin O에 對한 中和反應에는 Cholesterol의 作用이 介入되지 않은 것으로 認定된다. 그러나 家兔 正常血清中에 包含된 cholesterol의 量은 人血清이나, 馬血清의 含量보다 적은데도 不拘하고 溶血抑制作用이 강한 것은 그 原因을 cholesterol에만 돌리기에는 어려운 點으로 보인다.

IV. 考察 및 總括

Tetanolysin^{5,6)} 및 Streptolysin O^{18,19)}는 酸素에 不安定한 一種의 溶血毒素로서 通氣나 酸化等으로 非活化되는 것이고 이것을 還元시킴으로써 다시 活性化 된다고 하였다. 이와같은 現象은 Pneumolysin²⁰⁾, Cl. Welchii의 theta toxin⁸⁾에서도 觀察할 수 있는 것이었다. Neil⁵⁾ 및 Fleming⁶⁾은 Tetanolysin을 長期間 通氣시킴으로써 漸次로 還元劑에 依하여 溶血作用이 恢復되지 않는 非可逆性 非活性化 Tetanolysin으로 變한다고 指摘하였다. 本實驗에서도 Tetanolysin은 Cl. tetani의 發育初期에 生産된 溶血素가 最初에는 溶血價가 높았던 것이 漸次로 下降된 것으로 생각된다. 그 證據로는 活性인 Tetanolysin에 通氣시킴으로써 溶血作用이 低下 或은 消失된 事實(第3表)과 一旦 通氣시킴으로써 溶血作用이 低下 或은 消失되었던 것도 還元劑의 處理로 다시 溶血作用이 恢復되었고(第1表), 또 活性化된 Tetanolysin을 酸化劑로 處理함으로써 溶血作用이 減少 或은 消失되는 事實(第3表) 등이 있는 것으로 보아 酸化는 Tetanolysin의 作用을 低下케 하고 還元은 溶血作用을 恢復케 하는 것임을 알 수 있었으며, 이것은 上記 諸學者의 見解와 一致되는 것이라고 할 수 있다. 또 培養期間이 길어짐에 따라서 最高溶血作用을 나타내는 때는 漸次로 還元劑의 量이 많아야 溶血價가 完全히 恢復되는 事實을 實驗에 依하여 알게 되었다. 그러나 一定한 期間이 지난 後에는 多量의 還元劑에 依해서도 溶血作用이 完全히 恢復되지 못한다는 事家은 Neil⁵⁾의 主張과 같이 酸化에 依하여 漸次로 非可逆的인 非活性化 Tetanolysin으로 變化된다고 指摘한 事實과 一致되는 듯하다.

Streptolysin O는 16時間 培養液에서도 溶血作用이 全然 活性을 띠고 있지 못한 것으로 보아 Tetanolysin의 그것보다 酸化에 對한 影響이 더 銳敏한 것 같고, 溶血作用이 活性化되는데 要하는 還元劑의 量도 Tetanolysin에 比하면 約 10分之 1의 分量으로 足한 것으로 보아 恢復도 더 銳敏한 것으로 보인다.

本實驗에서 取扱한 사람, 緬羊, 家兔 및 guinea pig 赤血球에 對한 溶血作用의 差異를 보면 Tetanolysin은 人赤血球에 가장 溶血作用이 強하고 緬羊, guinea pig, 家兔의 順序로 되며, Streptolysin O의 溶血作用은 사람, 및 guinea pig 赤血球에 對하여 가장 強하고 緬羊, 家兔에 對하여 弱하다. 그러나 이와 같은 各種動物의 赤血球에 對한 溶血價의 差가 적은 것으로 보아 上記 赤血球間의 感受性의 差는 大同 小異한 것으로 보인다.

Neil⁵⁾에 依하면 磷酸緩衝食鹽水 pH 7.0이 Tetanolysin의 溶血作用을 나타내는데 反應液으로 適合하다 하였으며, 反應液의 pH가 鹽基性으로 되거나, 或은 酸性으로 됨에 따라 最高 溶血價의 低下가 온다고 하였고, Ranz 및 Rendall²¹⁾ 등에 依하면 Streptolysin O의 溶血作用이 最高로 나타나는 反應의 pH는 磷酸緩衝食鹽水 pH 6.5가 가장 適合하다 하였다. 本實驗에서는 Tetanolysin의 溶血作用을 最高로 나타내는데 가장 適當한 pH는 磷酸緩衝食鹽水 pH 8.3이었으며, pH 8.3을 中心으로 鹽基性으로 되거나 酸性으로 됨에 따라 漸次로 溶血作用이 低下되는 것을 볼 수 있었다. Streptolysin O에 對하여서는 pH 6.3乃至 6.7이 가장 適當한 pH였으며, pH 9.2에서는 溶血作用이 全然 消失되는 것을 觀察할 수 있었다. 即 溶血價測定에 있어서 反應液의 pH가 重大한 影響을 준다는 것을 알 수 있었다.

Fleming⁶⁾은 Tetanolysin을 55°C에서 10分間 加溫하면 破壞되기 始作하여 60°C 10分間 加溫에 있어서는 完全히 溶血作用이 破壞되어 非可逆物質로 變化한다고 하였다. 本實驗에 依하면 45°C에서는 150分間 加溫後부터 溶血作用이 破壞되기 始作하였으며, 56°C에서는 5分間 加溫後부터 破壞되기 始作하여 45分後에는 完全히 溶血作用을 喪失하는 것을 觀察할 수 있었다. Streptolysin O는 37°C에서도 30分間 加溫後부터 서서히 溶血作用이 破壞되고 45°C에서는 더욱 速히 破壞되기 始作하여 90分間 加溫後에는 完全히 破壞되었고, 56°C 加溫에서는 不過 2分後에 完全히 溶血作用이 消失되는 것을 볼 수 있었다. 이와 같은 一連의 實驗으로 Streptolysin O는 Tetanolysin에 比하여 耐熱성이 弱하며 Streptolysin O의 溶血價를 測定할 때는 37°C에서 30分間 以上 加溫하는 것은 不利한 操作이라고 할 수 있다.

KCl, CaCl₂, K₂SO₄, MgCl₂ 및 MgSO₄ 등 各種 無機中性 鹽類는 Tetanolysin이나, Streptolysin O의 溶血作用에 別 影響을 주지 않았으나, MnSO₄는 微量으로도 溶血作用을 抑制하는 듯 하였다. 그러나 이 實驗만으로는 MnSO₄가 兩者를 一時的으로 非活性化하는 것인지 或은 溶血作用을 完全히 破壞하는 것인지를 區別하기는

어려웠다.

Madsen, Kraus, 및 Neisser⁴⁾ 등은 正常人血清이 Tetanolysin의 溶血作用을 抑制한다 하였고, Noguchi, Müller, Detre 및 Madsen⁵⁾ 등은 正常血清内の 脂質成分이 Tetanolysin의 作用을 抑制한다 하였다. Todd²²⁾는 cholesterol이 Streptolysin O의 作用을 抑制한다고 하였고 이와같은 作用은 Pneumolysin, Cl. welchii의 theta toxin 및 Cl. historyticum의 溶血毒素等에 대해서도 同一하다고 하였다.

Todd¹⁸⁾ 및 Hyningen³⁾ 등은 Tetanolysin, Streptolysin O Pneumolysin 및 Cl. welchii의 theta toxin 등 같이 酸素에 不安정한 溶血毒素에 있어서는 相互間에 어느 溶血毒素에 對한 抗溶血素로도 他種 溶血毒素의 溶血反應을 中和시킬 수 있다 하였다. 本實驗에서도 anti-streptolysin O로 Tetanolysin의 溶血作用을 中和시킬 수 있었으며, 破傷風 抗毒素로 Tetanolysin은 勿論이고 Streptolysin O의 溶血作用도 中和시킬 수 있었다. 이것으로 보아 破傷風 抗毒素內에는 Anti-tetanospasmin 外에 Anti-tetanolysin이 包含되어 있는 것으로 推測된다.

本實驗 結果에 依하면 Tetanolysin이 生體內에서 最大限度의 溶血作用을 일으키는 데는

1. 反應液의 pH가 8.3 같이 比較的 強한 鹽基性인 狀態
2. 酸化性인 物質이 存在하지 않을 것.
3. Cholesterol 같은 物質이 接觸되지 않을 것.
4. 交叉反應을 일으키는 抗原에 依한 抗溶血素가 存在하지 않을 것 등이 要求된다.

그러나 患者體內組織에서는 上記 各種條件은 全部 成立되지 않는 것이 分明하다. 그뿐 아니라 臨床報告에 있어서도 溶血反應에 依하여 血液에 異常을 일으킨 例가 없는 것으로 보아도 本實驗結果와 一致되는 것으로 보인다.

V. 結 論

1. Tetanolysin의 最適溶血作用의 條件을 檢討하여 가) 還元物質이 存在할 必要性 나) pH 8.3의 反應環境 라) Mn 이온이 없을 것. 리) Cholesterol 같은 物質이 없을 것. 마) 交叉反應을 일으키는 抗體가 存在하지 않을 것 등을 決定할 수 있었다.
2. Streptolysin O와 比較하여 그 類似性을 立證하였다.
3. 人體內에서는 Tetanolysin이 病因作用을 發揮하기 어려운 것을 論證하였다.

(本 論文을 맺음에 있어 指導와 校閱을 하여 주신 奇龍齋教授께 感謝를 드리며 아울러 微生物學教室 여러분의 協力에 感謝를 드린다.)

ABSTRACT

A Possible Role of Tetanolysin in the Pathogenesis of Tetanus

Woo Hyun Chang, M.D.

Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

(Director : Prof. Rong Sook. Kiee, M.D.)

The main clinical signs of tetanus remain within the limit of neurological manifestations such as difficulties in swallowing, trismus and/or opisthotonus, probably being induced by tetanospasmin which seems to be released from the organisms grown in tissue. Regarding the toxigenicity of Cl. tetani, the tetanolysin is also known as one of the toxic substances, detectable in vitro during the growth of the organisms. It hemolyzes erythrocytes of human and various animals, necrotizes the tissues and also produces cardiotoxic effects to rabbits and guinea-pigs.

It may be assumed that the tetanolysin might take a part as a pathogenetic factor, in association with tetanospasmin during the course of tetanus. No significant work on tetanolysin, however, has been reported in relation to pathogenesis of tetanus.

The author designed an experiment to observe the conditions in vitro as to the hemolytic activities of the culture fluid of Cl. tetani which may be regarded as a mixture of tetanolysin, tetanospasmin and so on.

According to the observations, the optimal conditions for the hemolytic activities of the culture fluid likely to be induced by tetanolysin were found as follows.

- a) The optimal pH was 8.3.
- b) The oxidation of the hemolytic agents in culture fluid reduced its activity instantly.
- c) The cholesterol and the like inhibited the hemolytic activity.
- d) The hemolytic activity of the culture fluid was neutralized by antistreptolysin O, and vice versa

Considering the result obtained, the hemolytic activity of the culture fluid of Cl. tetani are limited by the conditions which may not possibly be provided by the living environment of tissues; thus, an assumption that the hemolytic activities of the metabolic products from Cl. tetani including tetanolysin may play a role in the course of the disease can hardly be made.

REFERENCES

- 1) *Review of Medical Microbiology 7th ed.*, Ed. Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 1966.
- 2) Brown, A. et al.: *Value of a Large dose of Antitoxin in Clinical tetanus Lancet* II, 227, 1960.
- 3) Max, S., Heyningen, W.E.: *Bacterial and Mycotic infection of Man 4th ed.*, Ed. by Dubos and Hirsch. 1956.
- 4) *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity 5th ed.*, Ed. Wilson & Miles 1964
- 5) Neil, J. M.: *Studies on the Oxidation and Reduction of Immunological Substances III tetanolysin J. Exp. Med.*, 44, 227, 1926.
- 6) Fleming, W. L.: *Studies on the Oxidation and Reduction of Immunological Substance J. Exp. Med.*, 46, 279, 1927.
- 7) Hardegree, M. C.: *Separation of Neurotoxin and Hemolysin of Cl. tetani Proc. of Soci. for Exp. Biolog. & Med.*, 119, 405, 1965.
- 8) Neil, J. M.: *Studies on the Oxidation and Reduction of Immunological substance II. The hemotoxin of the Cl. Welchii. J. Exp. Med.*, 44, 215, 1926.
- 9) Neil, J. M., Mallory, T. B., *Studies on the Oxidation and Reduction of Immunological substance IV Streptolysin J. Exp. Med.*, 44, 241, 1926.
- 10) Patel, J. C. et al.: *Role of Serumtherapy in Tetanus, Lancet* I, 740, 1967.
- 11) Axnick, N. W., Alexander, E. R.: *Tetanus in the United States Am. J. Pub. Helth.*, 47, 1493, 1957.
- 12) Van Heyningen, W. E., and Miller, P. A.: *The fixation of tetanus toxin by gangliosides, J. Gen. Microbiol.*, 24, 107, 1960.
- 13) Brooks, V. B., Curtis, D. R., and Eccles, J. C.: *The action of tetanus toxin on the inhibition of motoneurons. J. physiol.*, 135, 655, 1957.
- 14) Wright, G. P.: *The neurotoxins of Clostridium botulinum and Clostridium tetani, pharmacol. Rev.*, 7, 413, 1955.
- 15) Latham, W., Bent, D. and Lenine, L.: *Tetanus toxin Production in the Absence of Protein. Appl. Microb.*, 10, 146, 1962.
- 16) 朴承威: *The distribution of Anti-streptolysin O titer among Healthy Korean, 中央醫學*, 4, 83, 1963.
- 17) Eak, B., Dickenman, R. C., Volute, E.G., Burnette, H. and Cherney, P. J.: *Rapid estimation of free and total cholesterol. Am. J. Clin. Path.*, 24, 1307, 1954.
- 18) Todd, E. W.: *Antigenic streptococcal hemolysin J. Exp. Med.*, 55, 287, 1932.
- 19) Schwab, J. H.: *An intracellular hemolysin of group A streptococci J. Bact.*, 71, 94, 1956.
- 20) Neil, J. M.: *Studies on the Oxidation and Reduction of Immunological Substance J. Exp. Med.*, 44, 199, 1926.
- 21) Rantz, L.A., Rendall, E.: *Modification of the technique for determination of the antistreptolysin O titer Proc. of Exp. Biol. and. Med* 59, 22, 1945.
- 22) *Zinsser Microbiology 13rd ed.*, Ed. by Amith, Conant, Overman Appleton Centry Croft, 1964.