

種々の培地から得た PPDs の電気泳動法による分析と精製

近藤 瑩子・浅見 望・片岡 哲朗

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 40 年 12 月 16 日

ELECTROPHORETIC ANALYSIS AND PURIFICATION
OF PPDs PREPARED FROM CULTURE FILTRATES
EMPLOYING VARIOUS MEDIA*

Eiko KONDO, Nozomu ASAMI and Tetsuro KATAOKA

(Received for publication December 16, 1965)

In order to obtain the most suitable medium for the mass production of PPDs, *M. tuberculosis* Aoyama B was cultured on 3 kinds of media such as Sauton, modified Sauton and Lind b II for 6-8 weeks and 12 lots of PPDs were prepared. The chemical, biological and electrophoretic analysis were made comparing each other on these different lots of PPDs and further, purification of them employing zone electrophoresis was carried out.

1) Yield of PPDs : The pH of heated filtrates and yields of PPDs are shown in Table 2. The yields from modified Sauton and Lind b II media were about 5 times as much as those from Sauton medium.

2) Potency of PPDs : Potency of each PPDs was compared with that of standard PPDs (Yoken No. 15) by the skin test on sensitized guinea pigs. The results revealed that the potencies were not the same each other as shown in Ratio (Table 2). Even among the PPDs which were prepared from the same media, potencies were inconstant.

3) Chemical analysis of PPDs (Table 2) : PPDs prepared from modified Sauton medium contained larger amount of nitrogen than those from the other two, but some of them were hardly soluble. Lot 21 and 26-1 from Sauton and Lot 28-a from Lind b II especially contained a lot of sugar, with low percentage of nitrogen. Lot 28-a from Lind b II was fractionated twice with 50% saturated ammonium sulfate solution, and was named Lot 28-b. However, sugar content was not eliminated and potency was not increased by this fractionation procedure.

4) Electrophoresis of Tiselius type : Electrophoretic pattern demonstrated two main peaks and a few minor peaks, the one of the main peaks was Peak II which migrated toward anode, the other one was Peak I which situated near the starting point. Correlation was observed between the potency and electrophoretic pattern showing that the higher the potency, the greater was the peak II (Fig. 1, 2).

5) Zone electrophoresis : By means of zone electrophoresis using starch cell (Veronal buffer pH 8.6, $\mu=0.05$, 300 Volt, 20 hours), PPDs was fractionated into protein and sugar fractions, which were equivalent to Peak II and Peak I of electrophoresis of Tiselius type. The results of chemical analysis of protein fraction were shown in Table 3 ; by this procedure (zone electrophoresis) nitrogen content and potency increased, and sugar content was eliminated in contrast to the starting material and their values became almost constant regardless of the difference of lots. On the other hand, the tuberculin potency could be hardly demonstrated in any sugar fractions.

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki Chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.

The Peak II of protein fraction which was fractionated by zone electrophoresis was over 70 per cent of the total amount by means of Tiselius type electrophoresis (Fig. 2, 3).

The above mentioned data show that Lind b II medium was the most suitable for mass production of PPDs, since bacterial growth was the best among the three media and the yield of protein fraction was greater than that of Sauton medium, and that the electrophoresis can be used not only for purification of PPDs but also for checking purity.

緒 言

精製ツベルクリン (PPDs) 製造用培地として、Long 培地¹⁾、Sauton 培地²⁾あるいは Dorset 培地³⁾が広く用いられている。培地の種類と収量および力価との関係を示した Lind⁴⁾の研究では、アスパラギンを2倍に加えた Sauton 変法培地から Sauton 培地の2倍強の収量で PPD を得たが、その力価はほぼ 1/2 であつたという。

Magnusson ら⁵⁾は数種の人型菌と BCG 菌とを用いて、Sauton および Lind b II 培地におけるツベルクリン蛋白質の収量を比較し、各菌株とも Lind b II 培地がよく、青山 B 株の場合も、収量および力価は Sauton 培地より優れていたという。われわれの研究室では 1955 年以降、PPDs の検討を続け、収量が多く (1 l 当り約 200 mg)、また力価も高い PPDs (予研 Lot No. 15) を得ていることから⁶⁾、以来もつぱら Sauton 培地で得た PPDs の生物学的活性の研究が進められてきた。しかし最近になつて Sauton 培地培養濾液から得られる PPDs の収量が非常に少なくなつたので、多量に PPDs を作りうる、より適当な培地を選ぶことを目的として、Sauton、Lind b II およびアスパラギン量を2倍とした Sauton 変法の諸培地を用いて、数 Lot の PPDs を作つた。これらの培地のいずれが PPDs 製造に有利であるかを調べるとともに、得られた PPDs の化学的性状および電気泳動像と力価との関係について比較検討を加え、さらに Zone electrophoresis による精製も行なつたので、その結果を報告する。

Table 1. Composition of Media

Composition	Sauton	Modified Sauton	Lind b II
Asparagine	g 4	8	8
Glycerol	ml 60	60	60
Citric acid	g 2	2	0.4
KH ₂ PO ₄	g 0.5	0.5	2.22
MgSO ₄	g 0.5	0.5	0.5
Ferric ammonium citrate	g 0.05	0.05	0.05
H ₂ O	ml *	*	950
pH	7.2**	7.2**	6.7

* Added distilled water to make 1,000 ml

** Adjusted to pH 7.2 with NaOH

実験材料と方法

1) 菌株：予研保存の標準 OT 製造用の人型結核菌青山 B 株。

2) 培地：Table 1 に示した処方の Sauton、Sauton 変法および Lind b II 各培地。

3) 培養方法：1% 小川培地培養菌または凍結乾燥菌 (青山 B 株) を用い、基準⁷⁾に示された方法で、大量培養を各培地につき 3 ないし 5 回行なつた。培養量は 1 回に 10 ないし 100 l ずつである。種培養 1 回につき 1 Lot とした。

4) PPDs の精製：Seibert の方法⁸⁾を基礎とした硫安沈殿法に多少の改良を加えて行なつた。培養終了後 100°C、30 分間加熱し、濾液をさらにザイツ濾過器で濾過して菌体を除き、ついで氷室内で限外濾過法⁹⁾により約 1/50 量まで濃縮し、M/45 磷酸緩衝液で 3 回洗滌後、これに等量の硫安飽和溶液 (pH 7) を加えて氷室に一夜放置した。これを遠心して沈殿を再び M/15 磷酸緩衝液に溶かし、硫安飽和液の等量を加えて精製することをさらに 2 回繰り返した。硫安の除去は始めの数 Lot については従前の方法に従い、セロファン膜透析を行なつた。しかしこの方法では、完全に脱塩するまでに 10 日ないし 2 週間を要し、蛋白変性や雑菌による汚染が懸念されるので、Lot 27 以後は、セファデックス G-50 coarse のカラムを用いて脱塩を行なつた¹⁰⁾。使用したカラムは長さ 90 cm、径 3.5 cm で、1 回にかける PPDs 沈殿量は 10 ml 容とした。脱塩後は再び濃縮し、ジャンペラン L3 で細菌濾過後、凍結乾燥して、デシケーター中塩化カルシウム上に保存した。

5) 化学分析：窒素量は Micro kjeldahl 法、糖量は Anthrone 法で測定した。

6) Tiselius 型電気泳動¹¹⁾：日立製 HTB II 型ミクロセルを用い、試料濃度 50 mg/ml または 25 mg/ml、Veronal 緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) で、10 mA、15 分間泳動した。さらに泳動像を拡大して焼付け、各 Peak の部分を切りとり、その重量からそれぞれの Peak の比率を求めた。

7) 力価試験：標準には、予研 PPDs No. 15 を用いた。この PPDs は、国際標準 PPD¹²⁾ と等力価である。

Table 2. Properties of Various PPDs

Medium	Lot No.	pH of culture filtrate	Dried bacterial mass (g/l)	PPDs			
				Yield(mg/l)	Potency (Ratio)	N%	Sugar % as glucose
Sauton	20	5.0	5.6	27.6	1.24	12.53	3.13
	21	5.2	6.6	32.6	0.82	9.70	21.41
	26-1	5.6	5.7	17.0	0.88	8.48	30.72
	27-1	5.4	7.1	2.9	0.96	8.83	1.10
Modified Sauton	22	8.7	8.1	157.0	0.92	11.03	1.47
	23*	8.6	3.9	94.8	1.08	10.75	0.92
	24	8.6	8.3	138.9	0.88	13.35	0.41
	26-2*	9.0	5.9	81.0	0.99	11.05	1.12
	27-2*	9.0	8.0	65.3	1.08	12.87	1.09
Lind b II	26-3	7.0	12.7	84.0	1.07	9.93	2.71
	27-3	7.0	14.5	159.6	1.05	9.48	4.84
	28-a	5.2	12.8	120.3	0.96	7.41	34.56
	28-b	5.2	12.8	60.1	0.92	7.03	28.74

N: Kjehldahl's method

Sugar: Anthrone method

* Slightly soluble

** Comparative Ratio with Yoken PPDs No. 15

各試料を磷酸緩衝液で 2 µg/ml の濃度に希釈し、片岡の方法¹³⁾で選別した感作動物の皮内に 0.1 ml ずつ注射して、24 時間後の硬結の大きさを測定した。各試料とも3匹または6匹の動物の反応の平均値を求め、標準品による反応の大きさに対する比 (Ratio) を算出した。

8) Zone electrophoresis による精製: 細井¹⁴⁾、片岡¹⁵⁾、根本¹⁶⁾の報告に基づいて行なつた。Tiselius型電気泳動の場合と同一緩衝液を用い、澱粉を支持体として深さ 1 cm, 幅 10 cm, 長さ 50 cm のセルを用い、300 Volt, 18 時間ないし 20 時間泳動した。PPDs 使用量は 150 mg とした。泳動終了後のセルの上に 2 cm 幅の濾紙 Strip をあて、この濾紙についてブロム・フェノール・ブルーによる蛋白の定性を行なつた。蛋白の Peak を中心に澱粉を 1 cm 幅に切りとり、N/100 NaOH 20 ml で抽出し、その抽出液について蛋白および糖を測定して2つの Peak を分離し、これら抽出液を限外濾過法で濃縮し、セロファン膜透析で塩類を除き、凍結乾燥した。

実験成績

I. 各培地から得た PPDs の諸性状

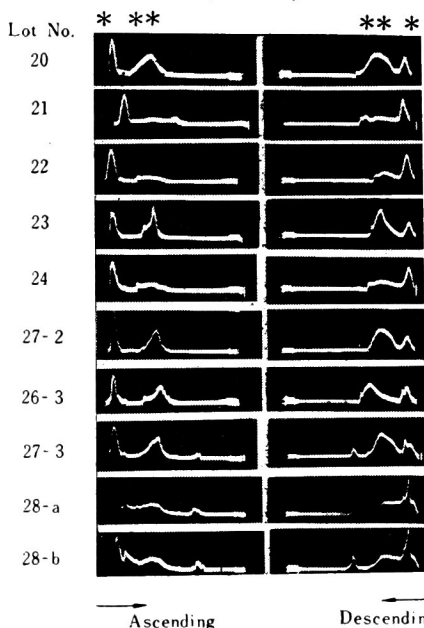
1) 培養濾液の pH と菌の発育の状態: 殺菌後の培養濾液の pH は、Sauton 培地 5.0~5.6, Sauton 変法培地 8.6~9.0, Lind b II 培地 5.2~7.0 であつた。菌収量は Sauton および Lind b II では各 Lot とも一定していたが、Sauton 変法培地では発育の状態がまちまちであり、Lind b II 培地の発育が最も良好であつた。(Table 2)

2) PPDs の収量: 培地 1 l 当りの PPDs 収量は、それぞれ Sauton 培地約 3~33 mg, Sauton 変法培地

約 65~157 mg, Lind b II 培地約 84~160 mg で、Sauton 培地の PPDs 収量は常に少なかつた。Sauton 変法および Lind b II 培地の PPDs 収量は、Sauton 培地の約 5 倍であつた。

3) PPDs の力価: 各 PPDs の力価は、標準 PPDs による反応値を 1 とした場合の Ratio 値で示すと、そ

Fig. 1. Electrophoretic Patterns of Various PPDs (Tiselius)



Condition of electrophoresis: Veronal buffer pH 8.6, $\mu=0.05$ 10 mA, 15 min., concentration of sample 50 mg/ml

* Peak-I ** Peak-II

それぞれ Sauton 培地 0.82~1.24, Sauton 変法培地 0.88~1.08, Lind bII 培地 0.96~1.07 であつた。このように同種培地から得た PPDs でさえも, Lot が異なるとその力価は一定していなかつた。(Table 2)

4) PPDs の窒素量と糖量: 窒素量は, Sauton 培地では 8.48~12.53%, Sauton 変法培地 10.75~13.35%, Lind bII 培地 7.41~9.93% で, Sauton 変法培地 PPDs が比較的高かつた。また糖量はグルコースとして換算し, Sauton 培地 1.10~30.72%, Sauton 変法培地 0.41~1.47%, Lind bII 培地 2.71~34.56% で, Sauton 培地の 2Lot と, Lind bII 培地の 1Lot は, とくに糖量が高かつた。(Table 2)

5) PPDs の溶解性: 緩衝液に対する溶解性は, Lind bII および Sauton 培地 PPDs は易溶であつたが,

Sauton 変法培地 PPDs のなかには溶解に時間を要する Lot があつた。

6) Tiselius 型電気泳動像: Fig. 1 に示すごとく, 各 PPDs とも共通して陽極へほぼ同じ距離に移動する主成分 Peak II と, 原点付近にとどまる Peak I とを含み, 他に2ないし4コの小さな Peak をもつていた。Peak II の量が全体の 50% 以上を示すものは, Lot 20, 23, 27-2, 26-3, 27-3 で, いずれも Ratio 値 (力価) が 1.00 以上であつた。これに対し Peak II の量が 40% 以下で, 移動距離の異なる Peak の混在の多い Lot 21, 22, 24, 28-a は, 力価が低かつた。(Fig. 1, 2)

7) 硫酸による再沈殿: 糖量が 30% 以上あつた Lot 28-a を用いて硫酸沈殿をさらに2回繰り返して行なつて, 糖成分の除去を試み Lot 28-b を得た。しかし収量が 1/2 に減り, 糖量が 6% 減じたのみで, 窒素量および力価にはほとんど差が認められず, また電気泳動像においてもほとんど差がなかつた。(Table 2, Fig. 1)

Fig. 2. Correlation between Potency and Peak-II in Electrophoretic Pattern

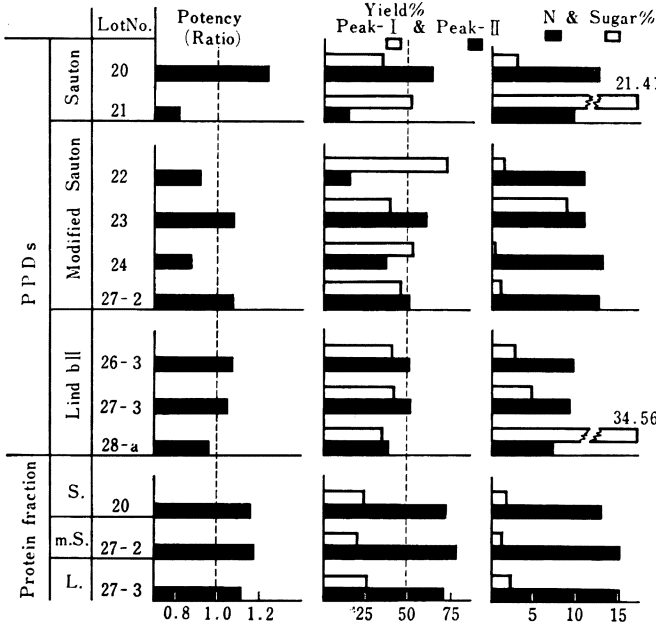


Table 3. Properties of Protein & Carbohydrate Fraction

Lot No.	Protein fraction					Carbohydrate fraction		
	Yield %	Total Yield mg/l	Potency (Ratio)	N%	Sugar %	Potency (Ratio)	N%	Sugar %
20	44.7	12.3	1.16	13.16	1.80	1.03	4.94	14.38
21	9.7	3.2	1.14	12.50	3.50	0.83	1.85	46.31
22	14.8	23.2	0.95	12.58	3.27	0.56	1.94	5.00
23	52.9	50.1	1.16	13.98	1.50	0.93	2.53	8.13
24	15.5	21.5	0.99	13.57	1.94	0.74	—	4.06
27-2	52.1	34.0	1.18	15.38	1.21	0.93	7.84	16.88
26-3	47.7	40.1	1.14	13.57	2.15	1.00	—	23.75
27-3	41.8	66.7	1.12	15.29	2.42	0.93	5.10	63.13
23-a	16.3	20.2	1.05	12.34	6.92	0.74	2.30	87.50

II. Zone electrophoresis による精製
各 PPDs の諸性状を検討した結果, 必ずしも一定の分析値, 電気泳動像および力価を示さなかつたので, さらに澱粉を支持体とした Zone electrophoresis による精製を行なつた (ただし, Lot 26-1, 27-1, 26-2 は試料不足のため行なわなかつた)。なお泳動終了後の濾紙 Strip 上のプロム・フェノール・ブルー, Folin および Anthrone の測定値に従つて, 陽極側へ 3~7 cm 移動した分画を蛋白分画と名づけ, 原点から陰極へ 2 cm までの分画を糖分画と名づけた。

1) 収量: 糖分画は各試料とも凍結乾燥のさい, 飛散によつて収量の比較は困難であつた。蛋白分画の収量が 40% 以上のものは, Lot 20, 23, 27-2, 26-3, 27-3 であつて, いずれも Tiselius 型電気泳動像の成績とよ

く一致した。その他の 4 Lot は約 10~16% であつた。(Table 3, Fig. 2)

2) 両分画の分析値：糖分画における糖量は約 4~88% であつた。そのうち Sauton 培地と Lind b II 培地のものでは糖量が多かつた。窒素量はいずれも少なく 8% 以下であつた。蛋白分画は泳動前に比し糖量が減少し、約 1~7% を示し、これに反し窒素量は増加し約 12~15% となつた。(Table 3, Fig. 2)

3) 両分画の力価：糖分画では Lot 20 および 26-3 以外はいずれも蛋白分画に比して力価が低かつた。蛋白分画ではいずれも泳動前に比し力価は高くなつた。ことに分画前の Ratio が 0.82~0.92 以下であつた Lot 21, 22, 24 では、その値が 0.95 から 1.14 まで上昇した。また各 Lot の Ratio 値が近似していた。(Table 3)

4) 蛋白分画の Tiselius 型電気泳動像：力価の一定になつた 3 Lot (20, 27-2, 27-3) の蛋白分画について Tiselius 型電気泳動像を比較した。泳動前よりいずれも糖分画 Peak I が小さくなり、混在していた移動距離の異なる Peak は消失していた。蛋白分画 Peak II は少なくとも 3 コの Peak から成つていることが認められた。また Peak II はいずれも 70% 以上の大きさであつた。(Fig. 2, 3)

考 察

人型結核菌青山 B 株を Sauton, Sauton 変法および Lind b II 培地を用いて、6 ないし 8 週培養して PPDs を得た。Sauton 培地では常に pH は酸性で PPDs 収量が低く、Sauton 変法では pH がアルカリ性、また Lind b II 培地では中性もしくは酸性であつて、両者とも PPDs 収量は Sauton 培地の数倍であつた。この点は Lind⁴⁾, Magnusson ら⁵⁾ の成績と一致する。浅見ら¹⁷⁾ によれば同一 Sauton 培地の終末 pH 6.0 と 8.0 の 2 種の O T から得た PPD の収量は、1:17 であつたという。これらの結果から培養終末 pH が中性またはアルカリ性となるものは、酸性のものに比して収量が多いといえよう。同一 Lot の培養濾液から TA₂, AzoT, PPDs, π の 4 種の精

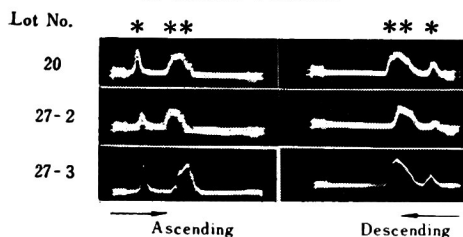
製ツベルクリンを製造したツベルクリン製法協議会の実験¹⁸⁾では、PPDs が比較的均一な成績を与えた。しかし PPDs のみについて検討した本実験成績では、いずれの培地を用いても Lot を異にすれば一定力価の PPDs を得ることができず、予研標準 PPDs に対する Ratio 値で 0.82 から 1.24 という値のひらきを示した。この値を相対力価に換算すると標準に対し 0.4~3.5 倍の強さのひらきをもつことになる。これは培養の都度濾液中に含まれる物質の成分比が異なつているためであろう。

Sauton 変法培地 PPDs は、いずれも糖含量が少なく、窒素量が 11 ないし 13% で他の培地からのものに比して均一のようであつたが、それらの力価にはひらきがあつた。Sauton および Lind b II 培地からは、Sauton 変法培地より一般に糖含量の多い PPDs を得た。ことに Lot 21, 26-1 (Sauton) および 28-a (Lind b II) は糖含量が高く、したがつて窒素量は 7.5 ないし 10% の値しか示さなかつた。この糖量の多い PPDs について硫酸半飽和沈殿法を繰り返したが、糖含量はさほど減ずることなく、また力価を高くすることもできなかつた。(Lot 28-b)

上述のように本実験で得た PPDs は、その力価および化学分析値において均一ではなかつたので、それらの Tiselius 型電気泳動像と力価との関係について検討を行なつた。各 PPDs とも極陽方向へ近似の移動距離をもつ Peak II と原点付近に残る Peak I とを含み、そのほかに 2 ないし 4 コの小さな Peak がみられた。力価の強い PPDs ほど Peak II の量が多く、また力価の弱い PPDs では移動距離の異なる Peak の数が多く、原点付近の Peak I の量が多かつた。これは Peak II がツベルクリン活性に関与する主な成分であることを示している。したがつて Tiselius 型電気泳動像の検討は、PPDs の純度の検定に利用しうるかもしれない。

以上のごとく PPDs が電気泳動的に異なるいくつかの成分を含んでいたので、Zone electrophoresis による精製を試みた。泳動終了後、濾紙 Strip 上のブロム・フェノール・ブルーによる発色および N/100 NaOH 抽出液の Folin と Anthrone 試薬を用いた測定値から、Tiselius 型電気泳動像で原点付近の Peak I は糖分画であり、Peak II は蛋白分画であることが確かめられた。これらの Peak を蛋白および糖分画として分離した。各 Lot から得た糖分画はいずれも糖含量が多く、ツベルクリン活性は 2 Lot を除いてきわめて低かつた。例外の 2 Lot は蛋白分画の量が多く、Peak が重なつた結果、力価が 1.0 近くになつたのであろう。蛋白分画は泳動前に比べて窒素量はもちろん増加し、糖量は減少していた。力価はどの培地から得られた蛋白分画も、それぞれ一定の値に近づき、標準に対して平均 1.8 倍の強さであつた。蛋白分画の収量は Tiselius 型電気泳動像に示さ

Fig. 3. Electrophoretic Patterns of Protein Fraction



Condition of electrophoresis: Veronal buffer pH 8.6, $\mu = 0.05$ 10 mA, 15 min., concentration of sample 25 mg/ml
* Peak-I ** Peak-II

れた傾向と同様の比率で得られた。この収量の測定値は濃縮過程中的濾過膜への付着や凍結乾燥のさいの飛散によつて、実際の PPDs 中の蛋白分画量より小さい値を示していると思われる。試料を多量にあつかうときには、より好収量で得ることができるだろう。さらに蛋白分画の電気泳動像について検討した結果、少なくとも3種の蛋白より成つていることが認められた。これはいわゆる Seibert¹⁹⁾ 神中²⁰⁾らの A, B および C 蛋白に相当するものと思われる。また PPDs 中に混在していた糖分画 Peak 量の比率は、ずつと少なくなつていた。ゆえに泳動条件を変えることで糖分画の除去も可能であろう。溶解性の悪い PPDs (Lot 23, 26-2, 27-2) の蛋白分画は、この操作によりいずれも緩衝液に易溶となつた。これらの結果からみると、加熱濾液から得た PPDs が Zone electrophoresis によりさらに精製されたといえよう。

Affronti²¹⁾らは Polyacrylamide gel を用いた disc electrophoresis でツベルクリン蛋白の分離を行ない、Micro-scale で成功している。われわれは、今回澱粉を支持体として電気泳動を行なつたが、適当な支持体および装置を使用した電気泳動法を PPDs の精製に利用すれば現在より容易で、しかも純度の高いツベルクリンを得ることができるだろう。

以上、いずれの培地からの PPDs も、lot ごとに異なる分析値をもつており、これは PPDs 中の蛋白分画量に左右されていることが分かつた。Zone electrophoresis の使用により、PPDs から一定の分析値に近づいた蛋白分画を得た。PPDs 製造用培地には、この蛋白分画総量の多い Lind b II 培地が適していると思う。

結 言

精製ツベルクリンの製造用培地を検討するため Sauton, Sauton 変法および Lind b II の3種の培地を用いて 12 Lot の PPDs を作つた。その収量、力価、窒素および糖量の分析、Tiselius 電気泳動像について検討した。さらに澱粉を支持体とした Zone electrophoresis で、これら PPDs の精製を行なつた。

1) PPDs の収量が多く、力価の比較的高かつたのは、Lind b II 培地であつた。Sauton 変法培地では PPDs の収量は多いが、Lot によつて力価に著しい変動がみられ、Sauton 培地では収量は常に少なく、その力価もまちまちであつた。

2) Tiselius 電気泳動像によると、PPDs はいずれも陽極に向かつて近似の移動距離をもつ蛋白の Peak と、原点付近にとどまる糖の Peak とをもつていた。この蛋白 Peak 量の多い PPDs は力価が高く、少ないものは力価が低いという電気泳動像と力価との間に相関関係が

みられた。

3) Zone electrophoresis で、主成分の蛋白分画から糖およびその他の混在物質を分離した。かくして精製された蛋白分画は、いずれの培地から得られたものについても、すべて窒素量が多く、力価は高く、糖量が減じて、それぞれの値は比較的均一であつた。

以上の成績から PPDs 製造用培地としては菌の発育が最もよく、蛋白分画総量の多い Lind b II 培地が PPDs 製造用の培地として適当と思われる。また電気泳動法は PPDs の精製ばかりでなく、純度の検討にも利用することができよう。

終りにご校閲いただいた室橋部長ならびに電気泳動についてご助言をいただいた一般検定部上野技官に感謝いたします。

文 献

- 1) Long, E. R. & Seibert, F. B.: Am. Rev. Tbc., 13: 393, 1926.
- 2) Sauton, B.: C. R. Acad. des Sciences, 155: 1860, 1912.
- 3) Dorset, M.: J. Am. Vet. Med. Assoc., 84: 439, 1934.
- 4) Lind, P.: Acta Tuberc. Scandinav., 21: 111, 1947; 22: 287, 1948.
- 5) Magnusson, M., Kim, H. K. & Bentzon, M. W.: Acta Pathol. et Microbiol. Scandinav., 58: 357, 1963.
- 6) 細井正春・浅見望: 結核, 32: 4; 32: 175, 1956.
- 7) 厚生省: 生物学的製剤基準 (ツベルクリン), 昭和38年5月20日厚生省告示第254号改正.
- 8) Seibert, F. B. & Glenn, J. T.: Am. Rev. Tbc., 44: 9, 1941.
- 9) 細井正春: 化学, 増刊6号: 319, 1960.
- 10) 片岡哲朗・近藤瑩子・室橋豊穂: 第18回日本細菌学会関東支部会発表, 1965.
- 11) Seibert, F. B., Pedersen, K. O. & Tiselius, A. J.: Exper. Med., 68: 413, 1938.
- 12) 前田道明・浅見望・室橋豊穂: 結核, 35: 563, 1960.
- 13) 片岡哲朗: 結核, 40: 271, 1965.
- 14) 細井正春: 最新医学, 14: 3364, 1959; 15: 684, 1960.
- 15) 片岡哲朗: 日細誌, 18: 71; 18: 109, 1963.
- 16) 根本久: 日細誌, 16: 497, 1961.
- 17) 浅見望・細井正春 他: 胸部疾患, 3: 990, 1959.
- 18) ツベルクリン製法協議会: 胸部疾患, 3: 10, 1958.
- 19) Seibert, F. B.: Am. Rev. Tbc., 59: 86, 1949.
- 20) 神中寛: 日細誌, 13: 757; 13: 803, 1958.
- 21) Affronti, L. F., Parlett, R. C. & Cornesky, R. A.: Am. Rev. Resp. Dis., 91: 1, 1965.