

ヘテロザート前処置マウスの結核菌感染 に対する抵抗性について

額 田 焯・小 沢 翠

額田医学生物学研究所

受付 昭和 42 年 11 月 30 日

INCREASE IN ANTITUBERCULOUS RESISTANCE OF THE MICE PRETREATED WITH HETEROSATE*

Hikaru NUKADA and Midori OZAWA

(Received for publication November 30, 1967)

The treatment of tuberculosis with certain heterologous bacterial substances was tried for the first time about forty years ago by Susumu Nukada and his co-workers, experimentally and clinically.

They demonstrated that the course of experimental tuberculosis in rabbits and guinea pigs was favorably influenced by subcutaneous injections of very small doses of heated-killed typhoid-gonococcal vaccine at weekly intervals. Later, the antituberculous resistance of guinea pigs and mice inoculated with a mixed autolysate of the said bacteria (Heterosate) was found to be greater than that of the animals vaccinated with the bacteria themselves.

In this study, the method of administration (pretreatment) was investigated with mice, mainly with regard to the following three points: dose of the autolysate (concentration), route of inoculation (subcutaneous, intravenous, intraperitoneal), and kind of immunogen (heated vaccine, autolysate-supernatant, autolysate-sediment).

Cultures of *N. gonorrhoeae* and *S. typhi* were separately suspended in sterile distilled water, killed by heat (heated vaccine), incubated at 37°C for ten days with occasional shaking by hand. Then the suspension was centrifuged for 30 minutes at 10,000 rpm, and the supernatant (autolysate) was used for the preparation of "Heterosate", which was made by mixing 3 volumes of gonococcal and 1 volume of *S. typhi* autolysate.

In the present experiments were used this original solution, 10 time diluted, and 100 time diluted solution, the sediments of each suspension as well as the heated vaccine.

Mice of CF-1 and ddY strains at the 4th week of age were injected with each substance, three doses being given at intervals of five days. At the 10th day after the third inoculation, a given amount of *M. tuberculosis hominis* strain Kurono was injected intravenously.

Studies were made on the survival rate of the mice at the end of the 3rd week after infection and their survival time in comparison with those of the controls. The results were summarized as follows:

1. The enhancement of antituberculous resistance was most remarkable in the mice pretreated with 10 time diluted solution of the autolysate. The defensive power of the mice

* From The Nukada Institute for Medical and Biological Research, 5-Chome, Inage-Machi, Chiba-shi, Japan.

vaccinated with the original solution was less prominent than that of animals treated with 10 time diluted solution, although the vaccinated mice showed longer survival time than the untreated controls in this experiment (Table 1).

2. Concerning the route of vaccination, the intravenous injection of the autolysate seemed to give stronger resistance against tuberculous infection than subcutaneous or intraperitoneal treatment, but the differences among them were not significant (Table 2).

3. The autolysate-supernatant increased antituberculous resistance of mice more markedly than the heated vaccine of the bacteria.

As to *N. gonorrhoeae*, not only its autolysate-supernatant but also the sediments showed the said resistance enhancing action (Table 3).

マウスの結核菌感染実験についての詳細な研究が、1948年 Raleigh & Youmans¹²⁾によつて発表されて以来、盛んにマウスを結核化学療法剤のスクリーニングや感染防御実験にも用いるようになり、染谷⁹⁾も適切な系統を選ぶことにより免疫実験もまた可能であると報告している。

近年、異種細菌およびその菌体成分による結核菌感染に対する抵抗性の変動について⁴⁾⁶⁾、また BCG 免疫によるグラム陰性菌感染に対する抵抗性の変動⁶⁾⁷⁾などについての研究が多くみられ、免疫学上特異的抗体あるいは非特異的な要因についての研究も報告されているが、実験条件ないし判定方法の選択により、その解釈や結論にかなり相違がみられる。

ヘテロザートはリン菌とチフス菌から作られたもので、これら結核菌以外の異種細菌を用いて結核菌感染の予防ならびに治療を行なう試みは、すでに40余年前額田菅ら⁸⁾によつて始められ、17種の病原菌ワクチンで前処置したとき(主としてウサギ、モルモット)、これらと互いに異種の病原菌感染に対する抵抗性は、Zimmer⁹⁾のいう異種特異的 heterospecific な関係にあることを見出している。結核菌感染に対する抵抗性はリン菌およびチフス菌の混合ワクチンによつてとくに増強し¹⁰⁾、さらに両菌種の混合自己融解液(ヘテロザート)で前処置すると、よりいつそう抵抗性の増強することを確かめた(モルモット)¹¹⁾。その後ヘテロザートの10倍希釈液でマウスを前処置することによつて、同様に抵抗性の増強をみている¹²⁾¹³⁾。

今回はマウスを用いてヘテロザートで前処置を行なった場合の抵抗性増強作用を測定するための実験条件のうち、(1)接種量、(2)接種経路、(3)免疫原の3点につき検討を行なったので報告する。

実験方法

(1) 実験動物

すべてマウスを用いた。CF-1系は東大医科研より、

また ddY 系は船橋農場より求め、その後額研で継代繁殖飼育したもので、実験にさいしてはできるだけ幼弱マウス(生後4週齢。離乳直後のもので体重 13g±3)に前処置を開始するように心がけた。

(2) 前処置試料

(i) ヘテロザートの製法。従来より額研で行なつていた方法¹¹⁾により、まずリン菌とチフス菌のそれぞれの培養菌体を滅菌蒸留水で 1mg/ml の菌浮遊液とし、53°C 1時間恒温槽にて加熱殺菌を行なつた。その後毎日朝夕振盪しながら 10日間フラン器内に放置した後、30分間(10,000 rpm)遠心し、その上清液をリン菌融解液 3:チフス菌融解液 1の割合に混合したものをヘテロザート原液とした。

(ii) ヘテロザートに用いた菌株および培養。菌株はすべて医科研より分与され額研にて継代保存しているものである。リン菌は G 株、N 株、清島株、実方株の4株で、凍結乾燥保存しておき、必要に応じて馬血液寒天培地に 2~3代継代培養し、その後同培地に 37°C 48時間培養した菌を用いた。チフス菌は 0901、T 58、T 12、Watson の4株を Cooked Meat 培地に継代保存し、普通寒天培地に 24時間培養し、秤量した。

(3) 攻撃菌および攻撃方法

攻撃菌はいずれも人型結核菌黒野株で、Dubos 液体培地の7日間培養に相当量の同培地を加えて、0.2~0.4 ml に黒野株の 0.5 mg (正常マウスを3週間以内にすべて死亡させる菌量)を含むように調製し、この量を各マウスの尾静脈から攻撃感染した。

(4) 感染実験と観察方法

各試料を 0.1 ml ずつ5日ごとに3回注射し(対照群は生食を同様に)、最後の前処置より10日目に結核菌の一定量を尾静脈より攻撃感染した。実験1は接種量について、実験2は接種経路について、また実験3は免疫原について検討し、同一実験を少なくとも3回くり返した。動物は5日ごとに体重を測定し、菌感染3週間まで生死を観察した。各群ごとに生残率、平均生存日数(3週観

Table 1. Protective Effect of Pretreatment with Heterosate in Various Doses on Mice

Materials (Heterosate)	21-day survivors/No. challenged	% Survivors at days after challenge			Mean survival time in days* (95% confidence limits)	Change in the body weight(g)**	
		7	14	21		On the day of challenge	10 days after challenge
Original solution	0/9	100	88.9	0	14.9(13.9—15.8)	+ (8.4±1.9)	+ (5.7±3.8)
Diluted 1 : 10	5/10	100	90.0	50.0	18.7(16.6—20.8)	+ (12.3±1.4)	+ (12.3±1.3)
Diluted 1 : 100	2/9	100	88.9	22.2	16.3(14.1—18.5)	+ (11.7±1.4)	+ (9.6±1.9)
Non-vaccinated controls	0/9	100	0	0	12.0	+ (10.6±1.2)	+ (8.5±1.7)

* Survival time of survivors on the 21st day was counted as 21 days.

** Changes compared with the weight at the start of pretreatment (95% confidence limits).

Table 2. Protective Effect of Heterosate Given through Various Routes

Routes	21-day survivors/No. challenged	% Survivors at days after challenge			Mean survival time in days* (95% confidence limits)	Change in the body weight(g)**	
		7	14	21		On the day of challenge	10 days after challenge
Subcutaneous	6/10	100	90.0	60.0	18.5(16.0—21.0)	+ (9.0±3.2)	+ (10.4±2.1)
Intravenous	6/9	100	88.9	66.6	19.1(16.7—21.5)	+ (6.9±2.5)	+ (8.0±2.8)
Intraperitoneal	4/10	100	70.0	40.0	16.9(14.2—19.6)	+ (9.3±2.4)	+ (9.5±1.8)
Non-vaccinated controls	0/10	100	40.0	0	13.5(13.0—14.0)	+ (3.2±2.5)	+ (4.8±2.7)

* Survival time of survivors on the 21st day was counted as 21 days.

** Changes compared with the weight at the start of pretreatment (95% confidence limits).

察で生残したマウスの生存日数は21日として計算した)を求め、さらに前処置群と対照群との差をX²試験にて検定を行なった。生残マウスは剖検し、結核菌感染を確かめた。剖検は、岩崎ら¹⁴⁾に従い軽くエーテルで麻酔し、四肢を固定して、腋窩動脈を切断し出血致死せしめ、肺、肝、脾の肉眼的所見を観察し、ATSの基準¹⁵⁾に従って病変度を判定した。とくに実験3は torsion balance を用いて臓器重量 (mg 単位) を測定した。

実験結果

実験1: 接種量について。マウス (ddY 系, ♂・♀, 使用総数 219 匹) を4群に分け、第1群はヘテロザート原液で、第2群はヘテロザート 10 倍希釈液で、第3群は 100 倍希釈液、そして第4群は対照として生食液のそれぞれで上述のように 0.1 ml ずつ3回前処置をした。菌感染3週間までの体重の推移、平均生存日数、生残率を Table 1 に示した。表に示すごとく原液群はすべて死亡しているが、10 倍希釈液群では生残率 50% の防御力を与えており、また 100 倍希釈液でも生体に作用し、10 倍希釈群よりはるかに低いが 22.2% の生残率を示している。10 倍希釈群と対照群の生残率は 5% 以下の危険率で有意差であつた。また原液群は生残率では対照群と同じく全て死亡し 0 であつたが、平均生存日数はやや延長している。

体重の推移は第2群の 10 倍希釈群がいちばん増加の傾向を示したが、原液群は対照群よりむしろ減少の傾向を示した。

生残マウスの臓器、とくに肺の肉眼的所見はいずれも

かなりの肺病変度 (NTA +4) を示したが、各群の間には明らかな差異はなかつた。

実験2 接種経路について。ヘテロザートの 10 倍希釈液を皮下、静脈内、腹腔内の3経路で接種し、1群は対照とした。すなわちマウスを4群に分け (CF-1 系, ♂・♀, 使用総数 295 匹)、その各経路による前処置を3回行ない、菌感染3週間まで観察し、その経過を Table 2 に示した。

体重の推移は必ずしも生残率と平行しないが、処置群と対照群の間にはかなりはつきりとした差を認めた。

生残率については静脈内接種が 66.6%、皮下が 60%、ついで腹腔内 40% の防御力を与えることを認め、また平均生存日数はそれぞれ静脈内が 17.2 日、皮下群 18.9 日、腹腔内 16.9 日であり、3 者間の有意差は認められなかつた。

実験3: 免疫原について。マウス (ddY 系, ♂・♀, 使用総数 229 匹) を7群に分け、それぞれ異なつた免疫原で前処置を行なった。リン菌は NG₂₀ 株、チフス菌は 0901 株を用い、ヘテロザート製造の場合の加熱操作まですませた各ワクチンと、さらにそのそれぞれを 10 日間自己融解した液の上清と沈渣、すなわち計 6 種類の免疫原を 6 群の動物にそれぞれ用い、他の 1 群は対照として生食液で前処置した。ただし自己融解液沈渣は自己融解液を遠心して上清を分離し、さらに滅菌蒸留水で 3 回同様に遠沈洗滌し、原量の生食液に浮遊したものである。いずれの場合も滅菌生食液で 10 倍希釈し、マウスの背部皮下に注射した。各群の菌感染3週間までの体重の推移、平均生存日数、3 週目の生残率および生残マウ

Table 3. Protective Effect of Pretreatment Preparation from *N. gonorrhoeae* and *S. typhi* on Mice

Materials	21-day survivors /No. challenged	% survivors at days after challenge			Mean survival time in days* (95% confidence limits)	Change in the body weight(g)**		Organ weight (mg)			Specific organ weight***		
		7	14	21		On the day of challenge	10 days after challenge	Lung	Liver	Spleen	Lung	Liver	Spleen
<i>N. gonorrhoeae</i>													
1) Heated-vaccine	0/10	100	90.0	0	15.7 (13.4—17.0)	+(11.3 ±0.7)	+ (9.4 ±0.7)	—	—	—	—	—	—
2) Autolysate-supernatants	6/10	100	100	60.0	19.8 (18.2—21.4)	+(14.8 ±1.2)	+ (13.4 ±1.4)	559	1791	480	3.03	8.95	2.69
3) Autolysate-sediments	2/9	100	100	22.2	16.0 (13.8—18.2)	+(6.6 ±1.3)	+ (4.1 ±2.1)	614	2464	694	2.61	10.5	3.65
<i>S. typhi</i>													
4) Heated-vaccine	2/9	100	100	22.2	16.4 (14.1—18.7)	+(9.5 ±1.9)	+ (7.5 ±2.6)	567	1955	522	2.84	9.75	2.6
5) Autolysate-supernatants	5/10	100	90.0	50.0	19.1 (17.9—21.7)	+(14.5 ±1.6)	+ (12.5 ±1.9)	618	2189	518	2.72	9.5	2.22
6) Autolysate-sediments	0/8	100	50.0	0	14.3 (12.1—16.5)	+(12.3 ±3.1)	+ (9.6 ±1.6)	—	—	—	—	—	—
Non-vaccinated controls	0/9	100	0	0	12.0	+(10.6 ±0.8)	+ (8.5 ±1.9)	—	—	—	—	—	—

* Survival time of survivors on the 21st day was counted as 21 days.

** Changes compared with the weight at the start of preparation (95% confidence limits).

*** Specific organ weight=organ weight (g)/body weight (g)×100

スの臓器重量, およびその体重に対する比係数を Table 3 にまとめた。

体重は菌感染後 10 日目より減少しはじめ, 生残率の高い群ほど体重の減少の割合は少なかった。

次に生残率をみると第 2 群は 60%, 第 5 群 50% の防御力を与えており, 自己融解上清群のほうが加熱ワクチン群より明らかに抵抗性増強作用の強いことを示している。またリン菌融解液の沈渣群は 22.2% で, その上清液群に比し効果は弱いが見らな防衛力が認められた。しかしチフス菌の沈渣群には, このような作用は認められなかった。

また平均生存日数は生残率の傾向と一致している。肺の病変度はすべて NTA の +4 に相当し, 各群の間の臓器所見, 重量, 比係数などには一定の傾向は認められなかった。

考 案

近年均一系マウスの普及に伴い, 結核菌感染に対し感受性が高く, またきわめて均一な生存期間を示す系統が明らかにされ, 染谷ら⁹⁾は CF-1, dd 系, C57 BL/6 など十分に結核感染実験に用いようと主張している。

今回のわれわれの一連の実験では, CF-1 および ddY マウスを主として用い, ddD および C57 BL/6 (医科研より分与) も一部使用した。CF-1 および ddY マウスは, 前述のごとく額研にて継代飼育繁殖し, 離乳直後 (生後 4 週齢) のもので, 生後日数, 性, 体重をできるだけ揃えて使用するようにつとめた。

すでに額研の宇津宮ら¹²⁾は, マウスを用いてヘテロザートが結核菌感染に対する抵抗性増強作用を有することを報告している。すなわちヘテロザートの 10 倍希釈液 0.1 ml を隔日に皮下接種 (計 3 回) し, 最後の注射より 10 日目に強毒の H₃₇Rv (あらかじめマウスを 4 回通過した菌) を用い, 正常マウスの大部分が感染後 21 日以内に死亡する量を静脈内に攻撃感染し, その生存日数と肺の所見を比較観察するのが適当であるとしている。また前処置より菌感染までの期間については, 前処置後 5 日目の感染群より 10 日目に感染した群のほうが肺病変度の軽いことを報告している。マウスの実験結核症に対する抵抗性の測定指標として生残率, 攻撃後の生存日数, 臓器内の生菌数, 肺病変度などが用いられるが, これらは前処置に用いる試料などによつてもかなり左右されるので, これらの方法の選択如何によつて感染防御効果に関して, 多くの異なる意見が出ていていることに留意しなければならない。結核免疫実験によく用いられている Youmans ら¹⁶⁾の方法では, 一定の方法で前処置 (腹腔内) し, 4 週目に感染し, その後 30 日以上生存したマウスの百分率を対照群と比較して判定を行なつている。

今回報告するわれわれの判定は, 菌感染 3 週後の生残率と平均生存日数を主な指標とした。マウスの結核症の実験終了の時期を何時にするかは, その実験の目的によつて異なるが, われわれは宇津宮の方法に従い菌感染 3 週後とした。それは短時日にヘテロザートの効力を判定する必要があり, また菌感染 3 週後では感染結核菌の免疫の影響が少なく, 前処置に用いたヘテロザートの作用

の観察に好都合であると判断したからである。

上記の点を考慮して、3週間以内ですべての正常マウスを感染死させる感染菌株および菌量を定めるため、くり返し実験を行なった。攻撃感染が強いと、前処置マウスも含めて短時日ですべて死亡する結果となり、定量的な免疫実験の判定が難しくなることを幾度となく経験した。われわれは黒野株を用い、はじめ CF-1 マウスで平均生存日数 19.2 ± 2 日であつたが、Table 2 でみるようにマウス通過により平均生存日数が 13.5 ± 1 日となる菌を得ることができたので、これを使用した。CF-1 マウスは感染後の生存日数が非常に均一であり、同日中にあるいは 2~3 日以内のばらつきで死亡することを観察した。またわれわれが使用した ddY も、Table 1 および 3 でみるように短時日で死亡し、しかも生存期間が均一であることをくり返し経験した。

以上のような条件のもとに感染防御実験を行なったのであるが、その成績から次のようなことが考えられる。

接種量についてヘテロザート 10 倍希釈液により抵抗性が最も増強し、かなり希薄な 100 倍希釈液でも明らかに抵抗性増強作用を有することを観察したが、かえつて原液には増強作用はほとんどみられなかつた。すなわちこのような試料による抵抗性増強作用には、至適投与量があるように考えられる。ヘテロザートの成分¹⁷⁾は原液 1 ml 中蛋白質は $32.28 \mu\text{g}$ 、炭糖は $2.37 \mu\text{g}$ 、総窒素量は $4.89 \mu\text{g}$ (各試料の平均値) であり、実際抵抗性増強作用の最も強くみられた 10 倍希釈液 0.1 ml 中の菌体成分含有量はかなり微量なものとなる。この程度の少量で活性を示す点が興味深い。

なお同様な実験を C57 BL/6 を用いて行なった成績では、10 倍希釈液よりむしろさらに希薄な 100 倍希釈液のほうがより強い作用を示した。このことは金井¹⁸⁾の指摘している、マウスの系統による被免疫性にも関連したことと考えられる。

接種経路について経路別による効果は、生残率でみると静脈内>皮下>腹腔内の順であつたが、その差は有意ではなかつた。このような処置経路による差異は、BCG-S. enteritidis の系で、前処置に用いる試料や、マウスの系統などによつても変わるという報告がみられる¹⁹⁾。本実験では皮下接種によつても生残率 50% の防御力を与えるので、抵抗性の測定に十分用いる。

免疫原について額田らの初期の動物実験では、免疫原として加熱ワクチンを用いていたが、その後できるだけ菌の生物学的性状を損なわず、しかも有効成分をそのまま抽出しようと試みるうちに、Haehn²⁰⁾の方法による自己融解上清液が、加熱ワクチンよりいつそう有効であることが見出された¹¹⁾。これらの試料を比較検討するための動物実験には、主としてモルモットが用いられたが、マウスを使用したわれわれの実験(3)でも同様な結果を

得ており、自己融解上清液のほうがより強い抵抗性増強作用を示すことを観察した。また小沢ら¹⁷⁾は菌体成分を緩和な条件下に抽出する別の方法として、音波による菌体破壊を試み、その音波処理によつて得たリン菌およびチフス菌の上清液 (Sonicate) とヘテロザート 10 倍希釈液を用いて、マウスにおける感染防御実験を行なったが、その条件でもやはり自己融解によるヘテロザートのほうがより強い防御力を示すことを認めた。

ヘテロザートは菌体を自己融解させたもので、endotoxin のみでなく当然他の菌体成分を含んでいると考えられ、またすでに額田ら²¹⁾も述べているように、10 日間の自己融解の期間中により有効な物質に変化することも想像される。当然予想されるように、ヘテロザート中には RNA, DNA が含まれ、また hexosamine も多量に含まれることが分かっている (畑下ら²²⁾) が、有効成分がなんであるかは不明で将来の興味深い問題である。

また従来は自己融解上清部分に重きをおいていたが、リン菌の 10,000 rpm 4 回遠沈洗滌した沈渣部分にも抵抗性増強作用がみられた。ただし、この沈渣部分が菌体構造のどの部分に相当するかは確かめていないが、増強作用のあることは注目すべき点と思われる。チフス菌の沈渣部分には増強作用がみられなかつたが、これは沈渣の主要成分と考えられる細胞壁の成分の差によるものか、あるいは含有量の相違によるかは、なお検討の余地がある²³⁾。

以上異種細菌 (ヘテロザート) による前処置方法 (接種量、経路、免疫原) と抵抗性の変動について検討したが、そのほか攻撃感染菌量、感染経路、前処置から攻撃感染までの期間などによつて結果が左右される²⁴⁾。Dubos ら^{4) 6) 25)} は前処置後感染までの期間の長短によつて、抵抗性が増強あるいは減弱することを報告しており、また最近 Ribi ら⁷⁾ も前処置と感染の間隔の如何によつて、抵抗性は非特異的あるいは特異的要因により支配されるといい、また攻撃菌の接種経路 (経気道か否か) も問題としている^{7) 26)}。

このように抵抗性の変動に影響する因子ははなはだ多く、これらの因子の組合せによつて結果が左右され、これが抵抗性増強の機序の解析が複雑困難な理由の一つとなつているものと思われる。

結 語

マウスにヘテロザートを前処置することにより、結核菌感染に対する防御実験を行なった。今回はとくに抵抗性測定のための実験条件のうち前処置方法の (1) 接種量、(2) 接種経路、(3) 免疫原の 3 点について検討し、次の結論を得た。

(1) 接種量についてはその希釈濃度により異なつた防御力を与え、10 倍希釈液群が最も強い抵抗性を示し、

むしろ原液群のほうが弱かった。

(2) 接種経路として静脈内、皮下、腹腔内の3経路について検討したが、本実験では有意な差は認められなかった。

(3) 免疫原については加熱ワクチンより自己融解上清液のほうが抵抗性増強作用が強く、またリン菌の沈渣部分にも活性を認めた。

本文の要旨は、第42回日本結核病学会総会で報告した。

稿を終わるにあたり、東大(医科研)渡辺貞助教授のご懇篤なるご援助、ご校閲を感謝いたし、また種々指導を賜わった結核予防会結核研究所青木正和博士に心よりお礼申し上げます。なお本研究に労をわずらわした当研究所の金田秀子、平田多美枝技師に深く謝意を表します。

文 献

- 1) Raleigh, G. W. & Youmans, G. P. : J. Inf. Dis., 82 : 197, 1948.
- 2) Raleigh, G. W. & Youmans, G. P. : J. Inf. Dis., 92 : 205, 1948.
- 3) 染谷 : 第35回日本結核病学会総会, 昭35.
- 4) Dubos, R. J. & Schaedler, R. W. : J. Exp. Med., 104 : 53, 1956.
- 5) Youmans, G. P. & Youmans, A. S. : J. Bacteriol., 90 : 1675, 1965.
- 6) Schaedler, R. W. & Dubos, R. J. : J. Exp. Med., 106 : 703, 1957.
- 7) Ribí, E., Brehmer, W. & Milner, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 142 : 408, 1967.
- 8) Nukada, S. & Arifuku, S. : Jap. Med. World., 8 : 1, 1928.
- 9) Zimmer, A. Handbuch der experimentellen Therapie, Serum und Chemotherapie von A. Wolff Eisner. 2. Aufl., S. 123, 126. J. F. Lehmann, 1926 (München).
- 10) Nukada, S. & Ryu, C. : Ztschr. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., 88 : 496, 1936.
- 11) Nukada, S. & Ryu, C. : Ztschr. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., 98 : 272, 1940.
- 12) Nukada, S. & Utsunomiya, S. : Ztschr. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., 113 : 375, 1956.
- 13) Kayaba, K. : Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. -c, 10 : 1, 1960.
- 14) 岩崎 他 : 結核, 40 : 361, 昭35.
- 15) American Trudeau Society : Am. Rev. Tuberc., 61 : 286, 1950.
- 16) Youmans, G. P. & Youmans, A. S. : J. Immunol., 78 : 318, 1957.
- 17) Ozawa, M., Nukada, E. & Watanabe, T. : Jap. J. Tuberc., 13 : 96, 1966.
- 18) 金井 : 医学と生物学, 59 : 74, 昭36.
- 19) 氏家 他 : 日本細菌学雑誌, 21 : 675, 昭41.
- 20) Haehn, H. : Ergebn. d. Enzymforschung von Nord u. Weidenhagen, V. Bd., S. 151, 1936 (Leipzig).
- 21) 額田 他 : 肺結核の特殊転調療法, 額田医学生物学研究所, 昭34.
- 22) 畑下 他 : 医学と生物学, 67 : 1, 昭38.
- 23) 土谷 他 : 日本細菌学雑誌, 20 : 1, 昭40.
- 24) 青木 他 : 胸部疾患, 6 : 1002, 昭37.
- 25) Schaedler, R. W. & Dubos, R. J. : J. Exp. Med., 106 : 719, 1957.
- 26) Ribí, E., Larson, C., Wicht, W., List, L. & Goode, G. : J. Bacteriol., 91 : 973, 1966.