

## BCG 再接種モルモットの肺の細胞顆粒分画からの 抗結核菌物質の分離とその性状

### I. 酸抽出・アルコール沈殿法による調製

金井 興美・近藤 瑩子

国立予防衛生研究所 結核部

受付 昭和 44 年 5 月 21 日

## SEPARATION AND PROPERTIES OF MYCOBACTERICIDAL COMPONENTS FROM THE LUNG GRANULAR FRACTION OF BCG-REVACCINATED GUINEA PIGS\*

### I. Preparation by Acid-Extraction and Alcohol-Precipitation

Koomi KANAI and Eiko KONDO

(Received for publication May 21, 1969)

Differential centrifugation of a sucrose homogenate of BCG-revaccinated guinea pig lungs (87.5g) was conducted to obtain sediments at 1,000, 3,900, 8,400, 15,000 and 25,000g for 20 minutes. Acid phosphatase test indicated that the sediments at 15,000g and 25,000g were rich in lysosomal granules. Each sediment was resuspended into 20 ml of 0.25 M sucrose solution and subjected to extraction with 180 ml of 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 4°C for 40 minutes. The supernatant of the mixture at 15,000g for 20 minutes were added with absolute alcohol to 20 % and left to stand at -4°C for 3 hours. The resulting precipitate was collected by centrifugation. The precipitate was dissolved in distilled water and dialysed.

The preparation mentioned above was examined for bactericidal activity against *M. tuberculosis* and *B. abortus*, incubating 1.8 ml of the diluted sample with 0.2 ml of the bacillary suspension of 1 mg per ml at pH 5.0 and 37°C. After 4 hour or 7 hour incubation respectively, serial ten-fold dilutions of the mixture were made, each of which was inoculated onto glycerol-egg slants (Ogawa type) for enumeration of viable counts.

Table 1 summarizes the yield of each preparation and the bactericidal activity. It is evident from this table that the bactericidal components were present preferentially in so-called "light-mitochondrial fraction" containing lysosomes in higher proportion.

Table 2 shows that the preparation was active only in acidic environment and at 37°C. It was inactive at neutral pH and 4°C. Besides, the activity was masked or neutralized in the presence of serum. The preparation from 25,000g sediment (FrIV) was further fractionated by gel-filtration on Sephadex G-150 column with respect to bactericidal activity. There was an indication that the activity was higher in the fraction of larger molecular weight (Fig. 1).

Organic solvents were then employed as another procedure for purification (Fig. 3 and Table 3). When FrIV was added with acetone to final 90%, the active moiety was separated as acetone-soluble material. After removal of acetone by evaporation, the resulting precipitate and supernatant were separated by centrifugation. The supernatant was highly active at acidic

\* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

pH, but quite inactive at pH 7.4. The precipitate was extracted with ether, producing an inactive residue. The ether-extracted material was active at both pH 5.0 and 7.4 unlike the starting material.

On the other hand, FrIII was extracted only with ether and the aqueous phase was subjected to gel-filtration on Sephadex G-50 column (Fig. 4 and 5). Two protein peaks were obtained, one of which having the larger molecular weight was of the higher mycobactericidal activity.

All the active preparations were stable against heating at 100°C for 5 minutes.

結核免疫（防御力）の機序は、いまだに不明な点が多いが、Macrophage を中心とする細胞性のものであるという主張が支配的である。これは、防御現象の中間過程がどうであれ、菌と対決する最終段階のみを取り上げるならば、説得力のある多くの報告によつて支持されている<sup>1)-3)</sup>。しかし、免疫動物細胞の抗菌力を説明するに足る物質的背景と、その動的過程については、実験技術上の理由から、結論を得るのが極めて困難な研究分野となっている。

免疫動物細胞から分離される物質が、in vitro で抗結核菌性を発揮するという事実のみでは、それが防御の本態と直接結びつくには不十分であるし、また逆に、これを動的に与えて防御力を賦与しなかつたとしても、この実験条件の単純さを考慮するならば、かならずしも否定的な結論を出しえない<sup>4)</sup>。

この困難さにも拘らず、著者らがあえてこの分野と取り組むに至つた理由は次のごとくである。最近の形態学、細胞化学的研究によつて、食細胞中には多種の水解酵素をもつ分化された顆粒 (lysosome) があり、食菌現象の過程と連関して、その内容が菌を取り込んだ空腔中に放出される事実がみられた<sup>4)</sup>。著者<sup>5)</sup>はこの現象を示

唆する一つの観察として、感染マウス肺より機械的に分離した結核菌の菌体表面に、宿主由来の acid phosphatase の結合している所見を報告した。

菌と食細胞との交渉を、菌と細胞顆粒との関係で検討すべき理由がここにあるが、殊に細胞内寄生細菌としてこの中に長期存在する結核菌においては、上述の関係は一層密接であろう。すなわち、一方では、菌の発育を支持する物質の供与体としての細胞顆粒を考えることもできるし<sup>6)</sup>、他方、抗菌物質の所在する場として、それを検討する必要もあろう<sup>7)</sup>。このような立場で、著者らは、BCG 再接種によつて腫大したモルモットの肺より、顆粒分画を取り出し、これより Zeya-Spitznagel<sup>8)</sup>の方法で抗結核菌物質を分離したので報告する。

#### 実験材料と方法

1) 細胞顆粒の分離：体重 400g 前後の白色雑系モルモット雄を、BCG ワクチン 5mg を用いて大腿部筋肉内に免疫接種し、更に3週後、その 1mg を静脈内に再接種した。1週後殺してその 10 匹分の肺 (87.5g) を実験に供した。正常モルモットの肺の重量が 3~4g であるから、この肺は 2~3 倍に腫大したことになる。この

Table 1. Separation of Antibacterial Components by Acid-Extraction and 20% Alcohol-Precipitation from Sequential Centrifugal Sediments of a Lung Homogenate of BCG-Revaccinated Guinea Pigs

| Centrifugal force (g)<br>to obtain sediment | Acid phosphatase<br>activity* of<br>sediment before<br>acid-extraction | Antibacterial components   |                                                                                      |                                            |                                                                         |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|                                             |                                                                        | Yield as<br>protein** (mg) | Bactericidal activity*** (Viable counts per mg<br>bacilli exposed to each component) |                                            |                                                                         |
|                                             |                                                                        |                            | Protein** concen-<br>tration used for<br>test (μg/ml)                                | <i>Brucella abortus</i><br>(4 hr exposure) | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv<br>(7 hr exposure) |
| 1,000 (Discard)                             |                                                                        |                            |                                                                                      |                                            |                                                                         |
| 3,900 (FrI)                                 | 1.58                                                                   | 9.86                       | 117                                                                                  | 4×10 <sup>6</sup>                          | 2×10 <sup>5</sup>                                                       |
| 8,400 (FrII)                                | 1.66                                                                   | 4.84                       | 80                                                                                   | 3×10 <sup>3</sup>                          | <1×10 <sup>2</sup>                                                      |
| 15,000 (FrIII)                              | 4.62                                                                   | 9.99                       | 58                                                                                   | 23×10 <sup>2</sup>                         | <1×10 <sup>2</sup>                                                      |
| 25,000 (FrIV)                               | 4.22                                                                   | 5.65                       | 22                                                                                   | 59×10 <sup>2</sup>                         | <1×10 <sup>2</sup>                                                      |
| Buffer control                              |                                                                        |                            |                                                                                      | 31×10 <sup>7</sup>                         | 13×10 <sup>5</sup>                                                      |

\* μM p-nitrophenol released from p-nitrophenyl phosphate by mg protein at pH 3.5, 40°C for 30 minutes.

\*\* Tyrosine estimation by Folin test.

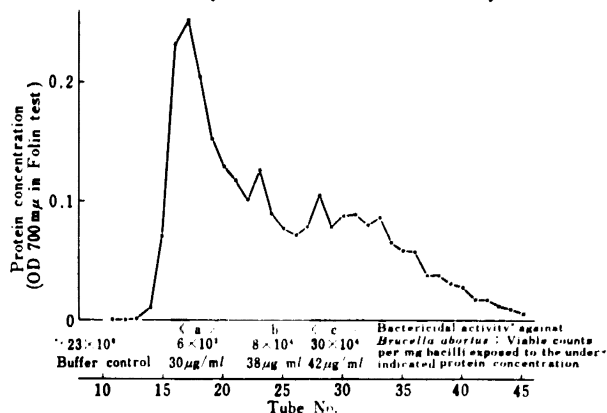
\*\*\* Bactericidal test was conducted in 0.01 M acetate buffer of pH 5.0, in which the bacilli were suspended in the density of 0.1 mg per ml and exposed to the components in the indicated protein concentration.

材料を、 $\text{CaCl}_2$  を 3.3 mM 含む 0.35 M の蔗糖溶液 110 ml を媒液とし、 $0^\circ\text{C}$  において Waring blender を用いて高速 20 分間ホモジナイズした。更に  $\text{CaCl}_2$  を 3.0 mM 含む 0.25 M 蔗糖溶液 440 ml を加え、ガーゼ濾過を行なった。濾液を 3,000 rpm, 20 分間遠沈し、沈殿をすてて上清を得た。これ以後、冷凍遠心機を使用して、3,900 g, 8,400 g, 15,000 g, 25,000 g での 20 分間の分別遠沈によって 4 種の沈渣を得た。それぞれ、 $\text{MgCl}_2$  5 mM を含む 0.25 M 蔗糖溶液 100 ml で遠沈洗滌し、洗滌沈渣は 20 ml の同液に再浮遊し、これらの酸性 phosphatase 活性を測定して、lysosome 含有量の一つの指標とした。

2) 抗菌性分画の分離：各沈渣浮遊液は、これに 0.2 N の硫酸 180 ml を加え、 $4^\circ\text{C}$  で 40 分抽出後、21,000 g 20 分間の遠沈で上清を得た。この上清に絶対アルコールを 20% に加えて  $-4^\circ\text{C}$  で 3 時間放置して沈殿発生を待った。これを 3,000 rpm 20 分間の遠沈によって集め、20 ml 前後の蒸留水にとかし、蒸留水に対して透析して製品とした。出発材料となつた 4 種の遠沈沈渣の順序にしたがつて、その製品を FrI, FrII, FrIII, FrIV と呼ぶことにする。

3) Acid phosphatase 活性の測定：酸抽出前の各遠沈沈渣の僅少部分をとり、表面活性剤 Triton X-100 を 0.1% に、 $\text{MgCl}_2$  を 5 mM に含む 0.25 M 蔗糖溶液に再浮遊し、 $4^\circ\text{C}$  に 30 分放置後、21,000 g 20 分遠沈してその上清を得た。これについて Folin 法<sup>13)</sup> によつて蛋白量を測定し(チロジン推定量)、また 0.5% p-nitrophenyl phosphate を基質とする acid phosphatase 活性を測定した。すなわち 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) を 0.8 ml, 試料 0.1 ml, 基質 0.1 ml, EDTA 100  $\mu\text{M}$  を 0.1 ml 混じて反応系とし、 $40^\circ\text{C}$  30 分間インキュベイトしたの

Fig. 1. Fractionation of FrIV (2.82 mg as Protein) by Gel-Filtration on Sephadex G-150 Column (2.5×30 cm) with Respect to Bactericidal Activity



\* Conditions of the test were the same as those described in Table 1.

ち、0.5% NaOH を 2 ml 加えて反応を止め、遊離 p-nitrophenyl を発色せしめ、これを 420 m $\mu$  で比色定量した。ゼロ時間に NaOH を加えたものをブランクとした。試料蛋白 mg 当りの遊離  $\mu\text{M}$  p-nitrophenol をもつて活性とした。

4) 抗菌力試験：原則として被検試料 1.8 ml, 1 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 を 0.1 ml, 1 mg/ml の菌液 0.2 ml を加え、 $37^\circ\text{C}$  に一定時間放置した。次に、この混合液を連続 10 倍希釈して、その各希釈液を 0.1 ml ずつ小川

Fig. 2. Time-Course Observation of Mycobactericidal Effect of FrIV in 0.01 M Acetate Buffer Environment at Two Different Protein Concentrations

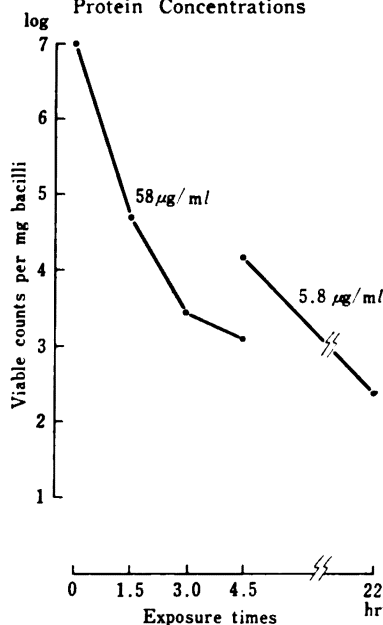


Table 2. pH- and Temperature-Dependent Bactericidal Activity of FrIV on *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv)

| pH  | Temperature             | Viable counts per mg bacilli*                  |                  |
|-----|-------------------------|------------------------------------------------|------------------|
|     |                         | Sample (FrIV)<br>(58 $\mu\text{g}$ protein/ml) | Control (Buffer) |
| 4.1 | $37^\circ\text{C}$      | $<1 \times 10^3$                               | $23 \times 10^6$ |
| 5.0 | $37^\circ\text{C}$      | $26 \times 10^2$                               | $41 \times 10^6$ |
|     | $37^\circ\text{C}^{**}$ | $11 \times 10^6$                               |                  |
|     | $4^\circ\text{C}$       | $43 \times 10^5$                               |                  |
| 5.6 | $37^\circ\text{C}$      | $65 \times 10^2$                               | $43 \times 10^6$ |
| 6.5 | $37^\circ\text{C}$      | $67 \times 10^5$                               | $9 \times 10^6$  |
| 7.4 | $37^\circ\text{C}$      | $5 \times 10^6$                                | $11 \times 10^6$ |

\* The bacilli were suspended in the buffer in the density of 0.1 mg bacilli per ml and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 3 hours, with or without the sample.

\*\* In the presence of a 1:10 diluted bovine serum.

鶏卵培地に接種し、3~4 週後の集落発生数を対照緩衝液での場合と比較して、生菌数の減少をみた。生菌数は 1mg 当りの数で表現した。被検菌株として、一般にソートン合成培地上 2~3 週発育の H<sub>37</sub>Rv 株、H<sub>37</sub>Ra 株を使用し、その蒸留水菌液を実験に供したが、時にトリプトソイ寒天培地(栄研)発育の *Brucella abortus* を用いて予備的観察を試みた。

5) ゲル濾過、あるいは有機溶媒による抗菌因子の分離：成績の項で述べる。

### 成 績

1) 各遠沈分画から得た酸抽出、アルコール沈殿サンプルの抗菌性：Table 1 に示したように、acid phosphatase 活性からみると、FrIII, FrIV が FrI, FrII よりも3倍前後高く、ここに lysosome の含有率の高いことが分かる。また抗菌力は FrII, FrIII および FrIV が極めて強い殺菌力をもつのに比べると、FrI ははるかに弱く、抗菌物質の分離精製のためには、少なくとも 3,900 g の分画は対象として不適当であることが示唆された。殺菌力試験に用いたサンプルの量(蛋白量として)がそろわず、また多すぎたため、FrII, III, IV の間での殺菌力の差が表現できなかつたが、一定操作で得られる細胞顆粒分画から、このような強い殺菌力をもつ物質の分離されることは注目値する。なお殺菌力試験に当たっては、試料は 100°C 5 分加熱滅菌して使用しているので、ここでは耐熱性の因

子を扱っていることになる。

2) Sephadex G-150 のカラムを用いたゲル濾過による FrIV の分画：FrIV の一部(2.80 mg 蛋白量)を 2.5×30 cm の Sephadex G-150 のカラムにかけ、蒸留水によつて溶出し、溶出液は 5 ml ずつ採取した。それらについて蛋白量を測定し、Fig. 1 に示した曲線を得たが、図のように分子量の高い方から a, b, c の3画分にわけ、それぞれの混合液の殺菌力を *Brucella abortus*

Fig. 3. Further Fractionation of Fr IV by Acetone and Ethyl Ether

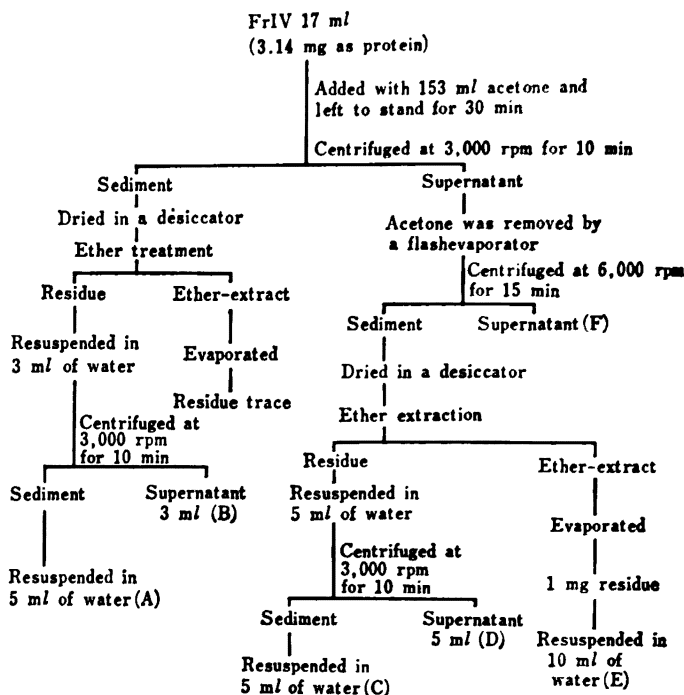


Table 3. Mycobactericidal Activity of Various Subfractions of FrIV (Fig. 3)

| Sample (Designated alphabetically in Fig. 3) |                                                                                                                                     | Mycobactericidal activity at two different pH |              |                                            |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------|
|                                              |                                                                                                                                     | Folin value (OD 700 mμ)                       | pH           | Vaible counts per mg bacilli*              |
| 90% Acetone-insoluble                        | Water-insoluble (A)                                                                                                                 | 0.18**                                        | 5.0          | 6×10 <sup>6</sup>                          |
|                                              | Water-soluble (B)                                                                                                                   | { 0.15<br>0.15                                | { 5.0<br>7.4 | { 14×10 <sup>6</sup><br>28×10 <sup>6</sup> |
| 90% Acetone-soluble                          | Acetone evaporation {<br>Sediment {<br>Ether-insoluble {<br>Water-insoluble (C)<br>Water-soluble (D)<br>Ether-soluble (1 mg/ml) (E) | 0.446                                         | 5.0          | 16×10 <sup>6</sup>                         |
|                                              |                                                                                                                                     | 0.146                                         | 5.0          | 17×10 <sup>6</sup>                         |
|                                              |                                                                                                                                     | { 0.04<br>0.04                                | { 5.0<br>7.4 | { <1×10 <sup>3</sup><br>28×10 <sup>6</sup> |
|                                              |                                                                                                                                     | { 0.142<br>0.142                              | { 5.0<br>7.4 | { 5×10 <sup>6</sup><br>28×10 <sup>6</sup>  |
|                                              | Supernatant (F)                                                                                                                     |                                               |              |                                            |
| 0.01 M acetate buffer of pH 5.0              |                                                                                                                                     | 0                                             | 5.0          | 14×10 <sup>6</sup>                         |
| 0.01 M phosphate buffer of pH 7.4            |                                                                                                                                     | 0                                             | 7.4          | 21×10 <sup>6</sup>                         |

\* H<sub>37</sub>Rv suspension of 0.1 mg bacilli per ml was exposed to each sample of indicated Folin value at 37°C for 4 hours.

\*\* 40 μg protein per ml by tyrosine estimation.

Fig. 4. Further Fractionation of FrIII by Ethyl Ether Treatment and Gel-Filtration on Sephadex G-50 column

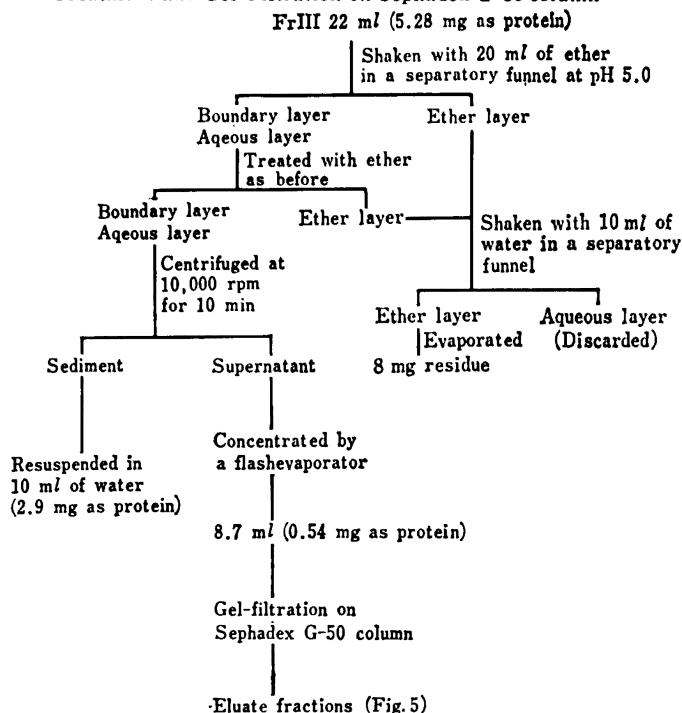
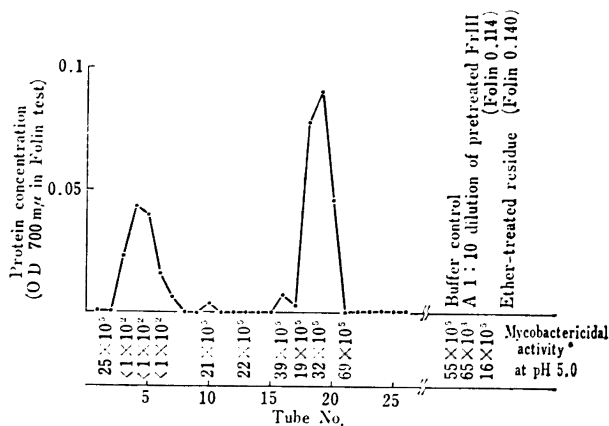


Fig. 5. Fractionation of Aqueous Phase (0.54 mg as Protein) of Ether-Treated FrIII by Gel-Filtration on Sephadex G-50 column (1.5×27 cm) with Respect to Mycobactericidal Activity



\* Mycobactericidal test was conducted by incubating H<sub>37</sub>Ra strain with selected eluates in the density of 0.1 mg bacilli per ml at 37°C for 4 hours, and was expressed as viable counts per mg treated bacilli.

を用いて検討した。分子量の高い分画の方が効果はより強い傾向があるが、殺菌力はいずれの部分にもみられ、この方法は殺菌因子の精製には不適当とみられた。

3) 抗菌力の活性条件について: FrIV と結核菌とを用いて、殺菌力の発現条件を検討した。Table 2 は pH, 温度, ならびに牛血清蛋白共存の影響をみたものである

が、殺菌力は酸性環境においてのみ認められ、また 4°C での暴露では効果は全くなかった。10 倍希釈牛血清の環境においては、pH 5.0 においても効果は全くなかった。Fig. 2 は 58 μg/ml と 5.8 μg/ml に暴露された菌液の生菌数減少を経時的にみたものであるが、濃度が低い場合にも接触時間が長くなれば効果は顕著であつて、5.8 μg/ml で 22 時間後、生菌数は 1/10,000 以下におちた。

4) アセトンならびにエチルエーテルによる FrIV の分画: FrIV 17 ml (蛋白量として 3.14 mg) に 9 倍量のアセトン 153 ml を加え、30 分後 3,000 rpm で 10 分遠沈して沈渣と上清を得る。上清を減圧濃縮してアセトンを除き、6,000 rpm 15 分の遠沈によつて、更に沈渣と上清とを得る。沈渣は乾燥後エーテル抽出を行ない、抽出液はエーテルをとばすと 1 mg の物質を得た。これは 10 ml の蒸留水に懸濁した。エーテル抽出残渣は 5 ml の水に再浮遊させ、3,000 rpm 10 分の遠沈によつて上清と沈渣に分けた。この時の沈渣は 5 ml の水に再浮遊させた。他方、初めのアセトン抽出残渣は、乾燥後エーテル抽出を行なつたが、抽出されるものは僅少であつた。エーテル抽出残渣は 3 ml の水に再浮遊して 3,000 rpm 10 分遠沈し、上清と沈渣とに分け、沈渣は 5 ml の蒸留水に懸濁した。以上は Fig. 3 に総括した。各分画について殺菌力を検討した成績は Table 3 に示した。出発材料のもつ性質、すなわち酸性においてのみ有効な物質は、90% アセトンに可溶性部分のうち、アセトンをとばしたのちも沈殿しない分画にみられた。蛋白量として 25 μg/ml の濃度で作用せしめた。この際、沈殿した部分からとつたエーテル可溶成分は、1 mg/ml の高濃度 (蛋白量としては 8 μg/ml) において、酸性のみならず、中性においても強い殺菌力を示し、前者とは性質の異なるものに考えられた。

5) エチルエーテル処理, ゲル濾過を用いた FrIII の分画: Fig. 4 に示したように、FrIII 22 ml (蛋白量として 5.28 mg) をエーテル 20 ml とふり、エーテル層、中間層、水相とに分けた。水相と中間層は再度エーテル処理し、そのエーテル層は前回のものと合してから水 10 ml で洗滌し、洗液は捨てた。エーテル層は乾燥して 8 mg の物質を得た。水相・中間層は 10,000 rpm 10 分遠沈すると、中間層は沈渣となり、上

清を分離した。これを濃縮後 Sephadex G-50 のカラム (1.5×27 cm) にかけて、0.01 M の酢酸緩衝液 pH 5.0 を用いて1時間 15 ml の速度でゲル濾過し、溶出液を 3 ml ずつ分取した。これらについて、蛋白量と H<sub>37</sub>Ra 株に対する殺菌力を検査した。成績は Fig. 5 に示した。得られた2つの蛋白ピークのうち、高分子の方の溶出液に極めて顕著な殺菌力を検出し、pH 5.0 において4時間接触後に生菌数を 1/10,000 以下におとした。このときの蛋白量は 8 µg/ml に相当する。

### 考 察

本研究で用いた酸抽出・アルコール沈殿法は、かつて Zeya・Spitznagel<sup>9)</sup> が、家兎の多形核白血球の lysosome 分画から、抗菌性因子を塩基性蛋白として分離するのに用いた方法である。この手段は少なくとも、ここで報告したように、BCG 再接種によつて肉芽腫を多発したモルモットの肺に適用して成功したといえよう。しかし、私共の得た物質が、蛋白量を指標として分離されたものの、かなりの量の脂質を含むことが明白で、これについては現在別途研究中である。こうした意味では、本物質はむしろ Youmans<sup>9)10)</sup> が、BCG 接種モルモットの全肺ホモジネイトから得た物質 (Mycosuppressin) と似ており、このものも 50~90% のアセトンに可溶、エーテル・水に可溶、熱に安定であつた。殺菌効果を発揮するに当たつて、脂質部分、蛋白部分がどのような役割をもっているかは今後の課題であらう。また酸抽出・アルコール沈殿法が常に成功するわけではなく、著者らがこの方法で感染マウス脾より分離したものは、抗菌力のなかつたことを、ここで追加する必要がある<sup>11)</sup>。更にまた、この方法による標品は、acid phosphatase および Cathepsin の活性をもたない点で、次に報告するような表面活性剤を用いての抽出物と異なつており、注目に値する。

著者らの物質が、結核菌のみならず *Brucella abortus* に有効であることは、この物質が BCG 接種動物から分離されたという事実にも拘らず、免疫学的特異性をもた

ないことを意味している。しかし、このものが正常動物からも分離できるか、あるいは存在するとすれば最終的な差異があるかという点については、現在実験計画中である。

ここで報告した実験条件においては、細胞顆粒の由来する細胞の種類を推定することはできないが、lysosome を含有する細胞分画から、酸性環境においてのみ殺菌力をもつ物質の得られたことに注目して今後の研究を進展させ、また Hirsch<sup>12)</sup> が多形核白血球の細胞顆粒から分離した抗菌物質との関係についても検討したい。

本研究実施に当たつては、日米医学協力計画結核専門部会からの研究費に負うところが大きい。記して謝意を表す。また本論文の要旨は第 44 回日本結核病学会で発表した。

### 文 献

- 1) Mackaness, B. B.: *Am. Rev. Resp. Disease*, 97: 337, 1968.
- 2) Dannenberg, A. M.: *Bacteriol. Rev.*, 32: 85, 1968.
- 3) Kanai, K.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 20: 21, 1967.
- 4) Hirsch, J. G.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 19: 339, 1965.
- 5) Kanai, K.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 20: 73, 1965.
- 6) Brown, C. A., Draper, P. and Hart, P. D.: *Nature*, 221: 658, 1969.
- 7) Zeya, H. I. and Spitznagel, J. K.: *J. Exptl. Med.*, 127: 927, 1968.
- 8) Zeya, H. I. and Spitznagel, J. K.: *J. Bacteriol.*, 91: 755, 1966.
- 9) Youmans, G. P. and Youmans, A. S.: *J. Bacteriol.*, 84: 701, 1962.
- 10) Youmans, A. S. and Youmans, G. P.: *J. Bacteriol.*, 84: 708, 1962.
- 11) 金井興美・近藤瑩子: 未発表.
- 12) Hirsch, J. G.: *J. Exptl. Med.*, 103: 613, 1956.
- 13) Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.