

精製ツベルクリン (PPDs) とグルクロン酸ナトリウムとの結合

第1編 結合物 (PPDs-G) の製法ならびにその性状について

武田 育子・石 館 守 三

東京生化学研究所

受付 昭和 46 年 11 月 19 日

BINDING OF PPDs WITH D-GLUCURONIC ACID*

Part I. Preparation and Properties of D-glucuronic
Acid Bound PPDs (PPDs-G)

Yasuko TAKEDA and Morizo ISHIDATE

(Received for publication November 19, 1971)

Since R. Koch reported tuberculin (OT) in 1891, many attempts have been made to purify tuberculin active principle from culture filtrate of *M. tuberculosis* or from tubercle bacilli. OT was intended for a therapeutic agent at first, it could not be used clinically because of its adverse effects on tuberculous patients.

One of the writers Ishidate noticed by chance that the aldehyde group of D-glucuronic acid could take the place of that of formaldehyde, and found that the toxicity of various toxins was reduced by incubation with glucuronic acid partially or completely without any significant modification of their antigenicity. Similarly, a preparation of OT (GLT), which was prepared by treating OT with sodium glucuronate (NaG) or glucuronolactone (GL), was reported to affect tuberculous lesions of guinea pigs more slightly by injection than OT.

Considering that active principle of tuberculin exists in its protein component, we prepare glucuronic acid bound PPDs (PPDs-G), using PPDs instead of OT, and compared its physico-chemical and biological properties with those of PPDs itself.

PPDs was prepared from culture filtrate of *M. tuberculosis* Aoyama B strain, which was cultured in Sauton medium for 8 weeks, by 5 to 7 times precipitation with half saturated ammonium sulfate, as described by F.B. Seibert et al. A mixture of PPDs and NaG (containing 3 μ c of 6- 14 CNaG) in the ratio of 1 to 2 by weight and a small amount of antiseptics was incubated at 37°C for 96 to 100 hours. The reaction mixture was then dialysed against distilled water for 30 hours. Dialysate was condensed using Sephadex G 100 and applied to a column of Sephadex G 50. Amount of PPDs in each fraction tube was measured from optical density at 280 m μ and that of NaG was estimated by 14 C radioactivity.

By chromatography of a mixture of PPDs and NaG on Sephadex G 50, both were separated almost completely from each other as seen in Fig. 1.

On the other hand, when PPDs was treated with NaG according to the method described above, elution curve of NaG was observed to be coincided with the second peak (major fraction) of PPDs. This suggests that PPDs combines with NaG. By calculation of binding ratio in each fraction tube, it was found that NaG combined with PPDs at about 1 % of the

* From the Tokyo Biochemical Research Institute, Takada 3-chome, Toshima-ku, Tokyo 177 Japan.

amount of the latter.

PPDs was then lyophilized and subjected to physicochemical analyses.

(a) As seen in Fig. 3, PPDs-G moved faster than PPDs in Veronal buffer of $\mu=0.05$, pH 8.6 in paper electrophoresis. This suggests that isoelectric point of PPDs-G is lower than that of PPDs.

(b) PPDs-G showed a little smaller value than PPDs in nitrogen content. This suggests that NaG is chemically combined with PPDs.

Biological properties of PPDs-G were as follows:

(a) By tuberculin skin test in sensitized guinea pigs, no significant difference was observed between the potencies of PPDs and PPDs-G.

(b) The infected guinea pigs were injected with either PPDs or PPDs-G. The number of dead animals in the group injected with PPDs-G seemed to be smaller than in the group injected with PPDs.

緒 言

1891年 R. Koch は結核菌を液体培地に培養し、加熱濃縮後菌体を除去して得られた濃縮濾液を結核動物に注射、その病変の軽減されることを発見した。さらに、これを治療剤として、临床上に利用できることを発表した¹⁾²⁾。しかし臨床家がこれを患者に用いたところ、多数の症例に病状の悪化を来し、これら症例の病理解剖所見はこの治療剤の使用中止を勧告させるにいたつた。Bujwid はこの濃縮濾液をツベルクリン (「ツ」と略記) と命名し³⁾、その後 R. Koch の濃縮液は旧ツベルクリン (OT) と呼ばれることになつた。von Pirquet⁴⁾ は、OT を皮内へ適用することにより結核症を臨床的に判定しうることを発表した。この現象は、von Pirquet の業績とともにアレルギーと呼ばれるにいたつた。かくて OT は結核の診断用ならびに BCG 予防接種の効果判定用として重要なものとなつた。

「ツ」活性物質の分離および精製については今日まで数多くの方法が試みられてきた。Long, Seibert らは長年にわたり「ツ」の研究を重ね、培養濾液中の蛋白質、多糖体、核酸等を分画することによりその活性部分は蛋白質であることを明らかにした^{5)~8)}。すなわち、彼らは当時使用されていたグリセリンブイヨン培地を Sauton⁹⁾, Dorset¹⁰⁾, Long¹¹⁾ らによつて考案された合成培地にかえ、培養濾液を 100°C 加熱滅菌後限外濾過により濃縮し、トリクロル酢酸沈殿法で PPD を製造した^{12)~14)}。この PPD は「ツ」力価の高いものではあつたが、力価において再現性に乏しく、また「ツ」活性のない多糖体、核酸等を多く含んでいた。次いで、彼らは硫酸アンモン半飽和沈殿法により PPD の欠陥をほぼ除いた PPDs を製造した¹⁵⁾。しかしながら PPDs は電気泳動上均一ではないことを認め¹⁶⁾、製造過程での「ツ」蛋白質の熱変性を考慮

し¹⁷⁾¹⁸⁾、非加熱性培養濾液から A, B, C 蛋白ならびに多糖体 I, II を電気泳動上ほぼ均一なものとしてそれぞれ得ることに成功し、これらの物理化学的性状ならびに「ツ」力価の検討を行なつた^{7)19)~22)}。

彼らの報告とほぼ同時期に、培養濾液から種々の沈殿剤を用いて「ツ」活性物質の精製が試みられた。すなわち、燐タングステン酸²³⁾、サリチル酸²⁴⁾、メチルアルコール²⁵⁾、タンニン²⁶⁾、酢酸と加熱処理²⁷⁾、緩衝液による pH 分画²⁸⁾を行なう方法等々であり、また Seibert らの方法とはほぼ同様な精製法では Jensen の PT²⁹⁾、Prigge の GT³⁰⁾ 等である。わが国においても貝原らは OT をエーテル次いでクロロホルムで処理した後トリクロル酢酸沈殿を行ない π を得³¹⁾、岡本は OT に *o*-アミノフェノールアゾ化合物を作用させて OAT を製造し³²⁾³³⁾、武谷は π S, π A^{34)~36)} を、武田は TA₂³⁷⁾、伊藤らは T₄₆₀³⁸⁾、倉金は KPT³⁹⁾ をそれぞれ「ツ」活性物質として発表した。最近では培養濾液からのみならず、山村らの TAP⁴⁰⁾⁴¹⁾ のように結核菌体または菌の細胞膜等⁴²⁾⁴³⁾ から「ツ」活性物質を精製する試みがなされてきた。以上のように「ツ」活性物質の精製法によりそれぞれその性状も異なるが、現在、混在する多糖体、核酸等が少なく「ツ」力価の高い Seibert らの PPDs¹⁵⁾ が WHO において国際標準ツベルクリンとして採用されるにいたつている⁴⁴⁾。

たまたま著者の一人石館は、グルクロン酸のアルデヒド基はフォルムアルデヒドのアルデヒド基に代用され、さらに前者が生体の正常成分であり比較的無毒であることに着目し、Ramon の方法によりある種の菌体外毒素たとえばジフテリア^{45)~47)}、破傷風毒素⁴⁸⁾ 等をグルクロン酸ナトリウム (NaG) またはグルクロノラクトン (GL) で処理すると、抗原性は保持され無毒化されることを発見した。またインフルエンザ、灰白髄炎^{49)~51)} 等のウイルスも NaG と処理することによりその不活化がみられ

た。OT を NaG と処理した場合についても、処理物 (GLT) を用いて結核動物を脱感作し OT による脱感作群と比較した場合、OT による脱感作群に比して結核病変が軽度であることおよび病巣からの定量培養成績から結核菌の集落が減少することが見出された^{52)~54)}。これよりさき、動物実験において岩崎は SM と OT 併用療法が SM 単独より有効なことを発見していた⁵⁵⁾⁵⁶⁾。そこで木野は結核患者に結核第一次薬 SM・PAS・INH 3者使用と GLT の併用療法を行なつた結果、“乾酪物質の排除がとくに望まれる症例には一応試してもよいと思う”と述べている⁵⁷⁾。

なお、蛋白質と NaG との相互作用に関しわれわれの共同研究者谷村は、卵白アルブミンをモデル蛋白質として生理的条件下に NaG を作用させたところ、NaG は卵白アルブミンとかなり安定な結合物を形成し、pH 滴定、アミノ酸分析法等によつて NaG は卵白アルブミンのリシンと結合しているであろうと推定した⁵⁸⁾。

著者らは以上の事実より、PPDs は果たして NaG と結合するか否か、また結合物 (PPDs-G) の物理化学的性状ならびに結核動物に対する生物学的反応と PPDs 自体のそれらとの間に差異があるかどうかを検討することを企てた。

PPDs-G の製造は谷村の方法⁵⁸⁾に準拠した。その結果 (1) PPDs と NaG とは化学的に結合し、PPDs-G は濾紙電気泳動、窒素分析値において PPDs とは異なつた性状を有すること、(2) PPDs ならびに PPDs-G を用いて死菌感作モルモットに対する「ツ」力価をみると両者の「ツ」力価には差が認められないこと、(3) 生菌結核菌感作モルモットに対し PPDs ならびに PPDs-G を注射した場合 PPDs-G 投与群の死亡率は減少の傾向を示すこと⁵⁹⁾等の事実が判明した。

実験材料ならびに方法

1) PPDs: 人型結核菌青山 B 株を Sauton 培地に 8 週間培養し加熱滅菌した培養濾液を限外濾過した後、硫酸アンモン半飽和沈殿法を 5~7 回繰り返して得られた沈殿を蒸留水に対して透析後凍結乾燥する。

2) PPDs-G の調製: PPDs: NaG=1:2 の割合で少量の 0.2M 磷酸緩衝液 pH 7.2 に溶解、防腐剤チメロサルを少量添加し、37°C 96 時間密栓し遮光下に放置する。反応液を蒸留水に対して透析後凍結乾燥する。

3) PPDs と NaG との結合比の決定: 後述するように、PPDs-G 中の NaG 量を化学的に定量することはできないので、微量の NaG 量を検出するため NaG の一部に 6 位 ¹⁴C 標識 NaG を用いた。すなわち、上記の調製法に従い反応後反応液を蒸留水に対して透析して未反応の NaG および 6-¹⁴C NaG を除去し、透析内液をセファデックス G 100 を用いて濃縮後セファデックス

G 50 を用いるカラムクロマトグラフィーを行ない溶出液の PPDs 量を 280m μ における吸光度の測定により、また結合 NaG 量を 2 π ガスフローカウンタまたは液体シンチレーションカウンタによつて計測された放射能の強さから算出した。PPDs に結合した NaG 量は PPDs 当りまたは PPDs 中の総窒素量当りの重量%で表示した。

4) 化学分析

(a) 窒素分析: デュマ法⁶⁰⁾により PPDs および PPDs-G のそれぞれ凍結乾燥物の窒素含有量%を測定した。

(b) 総糖量: アンスロン法⁶¹⁾⁶²⁾によりグルコース量に換算して測定した。

(c) 核酸量 (DNA 量): ジフェニルアミン法⁶³⁾により 2-デオキシリボース量に換算して測定した。

(d) グルクロン酸量: 後述のように PPDs と結合した NaG は化学的定量法では測定できないので、ナフトレゾルシンピクレート法⁶⁴⁾により PPDs と結合しない NaG 量を測定した。

5) 濾紙電気泳動: 東洋濾紙 No. 51 を使用、20°C、ペロナール緩衝液 $\mu=0.05$, pH 8.6 により、300 ボルト約 5 時間泳動した後ブロムフェノールブルー染色を行なつた。

6) カラムクロマトグラフィー: あらかじめ蒸留水で十分に膨潤させ 1/45 M 磷酸緩衝液 pH 7.2 に調整したセファデックス G 50 をカラムに充填する。PPDs 50 mg または PPDs と NaG との反応液を透析後濃縮したものを 2.0 $\times$ 27 cm カラムに添加後 10~15 ml/時の溶出速度で溶出し 5 ml ずつ分取した。

7) 「ツ」皮内反応: 国際標準 PPDs と等力価⁶⁵⁾の予研 No. 15-25 を標準とし、PPDs および PPDs-G を磷酸緩衝液 pH 7.4 に溶解し、1.0 μ g/ml 濃度に調整する。片岡の方法によつて選別した死菌感作モルモットの背部皮内に 0.1 ml ずつ注射し、注射後 24, 48 時間の発赤の大きさを標準 PPDs のそれと比較した。

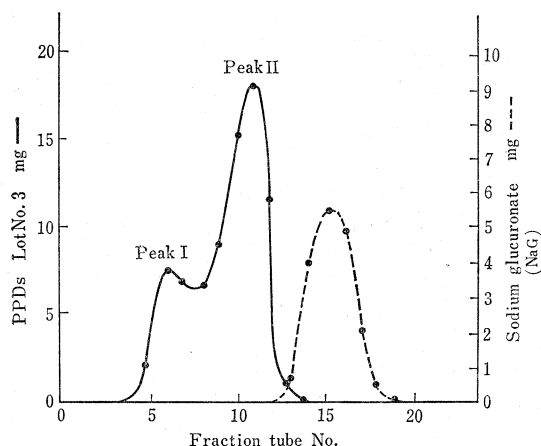
8) 結核動物に対する致死作用: モルモットを人型結核菌クロノ株 0.1 mg で皮下感染し、感染後 6~11 週にいたり PPDs 0.5 mg/ml 濃度に、PPDs-G は対応する PPDs の窒素量と同一になるように換算した濃度にそれぞれ生理食塩水で希釈調整し、結核モルモットの皮下に 0.2 ml/100 g 体重注射後 24, 48 時間の死亡動物数を観察した。

実験結果

1) PPDs と NaG との結合

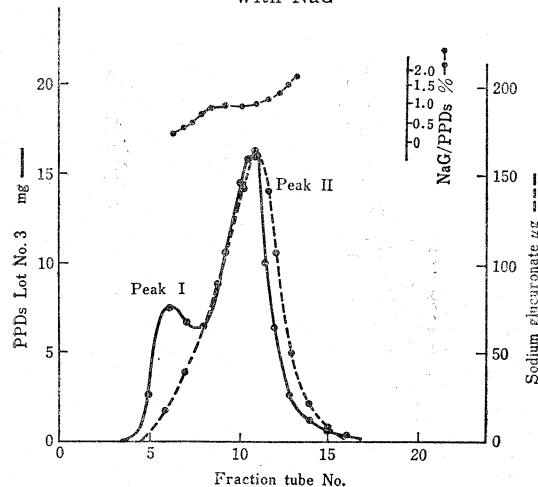
図 1 は PPDs Lot. No. 3 (N: 13.74%, 糖 2.2%) と NaG の混合液につき、セファデックス G 50 を用いるカラムクロマトグラフィーを行なつたときの溶出曲線を示

Fig.1. Chromatography of a Mixture of PPDs and NaG



A mixture of 50 mg of PPDs and 20 mg of NaG was applied to a Sephadex G 50 column (2.0×27 cm). Elution was carried out with 1/45 M phosphate buffer of pH 7.2. The flow rate was about 15 ml per hour and effluent fractions of 4.7 ml were collected. Amount of PPDs in each fraction tube was measured from optical density at 280 mμ and that of NaG was estimated by naphthoresorcin picrate reaction.

Fig.2. Chromatography of PPDs Treated with NaG



A mixture of 50 mg of PPDs Lot. No. 3 and 100 mg of (NaG+6-¹⁴C NaG) in 0.2 M phosphate buffer of pH 7.2 was incubated at 37°C for 96 hours. The reaction mixture was then dialysed against dist. water and the dialysate was condensed using Sephadex G 100, and was applied to a Sephadex G 50 column (2.0×27 cm). Elution conditions were the same as indicated in Fig. 1. Amount of NaG in each fraction tube was estimated by ¹⁴C radioactivity.

したものである。PPDs量は280mμにおける吸光度の測定により、またNaG量はナフトレゾルシンピクラート法によりそれぞれ算出した。その結果両者は完全に分離しそれぞれの回収率はほぼ100%であつた。

次に同じ PPDs Lot. No. 3 と NaG を PPDs-G の調製の項に準じて処理し、反応生成物のセファデックス G

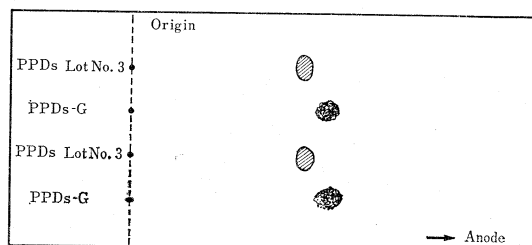
50 によるカラムクロマトグラフィーを行なつた結果を図2に示した。反応液にはNaGの一部にあらかじめ6-¹⁴C NaG 3 μc を添加し、反応生成物のクロマトグラフィーにおける溶出画分中のNaG量は6-¹⁴C NaG による放射能の測定値から算出した。その結果NaGはPPDsの主溶出画分(第2ピーク)に一致して溶出していることが分かつた。すなわち、図2では図1とは異なりNaGはPPDsと結合していると推察された。また結合NaGとPPDs量とを各溶出フラクションについて測定しその重量比を求めると、NaGはPPDs量のほぼ1%、PPDs窒素含有量の7~8%結合し、第2ピークでは各フラクションともほぼ一定の結合比を示した。結合比のやや高いフラクションが第2ピーク後半部にみられるが、これはPPDsと結合していないNaGが混入したためと思われる。なおPPDsとNaGとの結合について同様な結果がPPDs Lot. No. 1 (N: 12.71%, 糖 1.5%), および Lot. No. 2 (N: 13.80%, 糖 3.2%) の場合にも認められ、再現性が確認された。

反応条件に関しては、反応時間を2週間にした場合、反応生成物の溶出曲線は図2と同様であつたが、PPDsと結合したNaG量はPPDsの1.5%、PPDs窒素含有量の10~11%となり、溶出各フラクションにおける結合比のばらつきもみられなかつた。したがつて反応時間を2週間に延長した場合には反応はほぼ完結したと推察される。このように反応時間2週間では、結合比もやや高く各フラクション間の結合比も一定となるので PPDs-G の調製法としてはより好ましいようにみえるが、長時間の反応時間では反応液の着色⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾および溶液における「ツ」活性の失活の危険性が考えられる。そこで、PPDs-G の調製は上記 PPDs-G の調製の項に従つて行ない、ここに得られた PPDs-G につき以下の物理化学的ならびに生物学的検討を行なつた。

2) PPDs-G の物理化学的性状

さきに述べたように、NaGが卵白アルブミンの塩基性アミノ酸リシンと結合するならば、PPDsの場合においても PPDs-G の等電点は PPDs よりも酸性側にあると推察される。図3は PPDs Lot. No. 3 とこれより調製

Fig.3. Paper Electrophoresis of PPDs and PPDs-G



Electrophoretic conditions:

Toyo Roshi No. 51 Veronal buffer of pH 8.6, μ: 0.05
20°C, 300 volts, 5 hours, Bromphenolblue staining

した PPDs-G の濾紙電気泳動における両者の移動度を比較したものである。ペロナル緩衝液 $\mu=0.05$, pH 8.6 を用いて泳動すると, PPDs-G の移動度が PPDs のそれよりも大きい。したがって NaG は PPDs とは単に吸着あるいは塩として結合しているのではなく化学的に結合していると推察される。また PPDs-G の等電点は PPDs より酸性側にあると推察された。

次に PPDs と PPDs-G の窒素分析を行なった。すなわち PPDs Lot. No. 1 (N: 12.71%) および Lot. No. 3 (N: 13.74%) について, 対応する PPDs-G の窒素分析値はそれぞれ 11.93%, 12.86% であり, はば 0.8% の減少がみられた。この事実は NaG は PPDs と化学的に結合したことを示唆している。しかしながら実験的な窒素含有量の減少値と, NaG と PPDs との結合による理論的減少値とは必ずしも一致しなかつた。これは PPDs-G 凍結乾燥物につき窒素量の測定を行なったことおよび窒素分析法の誤差 (0.3%) のためと推察される。

PPDs-G の NaG 量を化学的に定量するためナフトレゾルシンピクラート法を用いたが, NaG は測定できなかった。すなわち PPDs と NaG の混合物についてはこの方法で NaG を測定できるが, 蛋白質と結合した NaG はこの定量条件下では測定できないと推察される。この結果は, 谷村による NaG と卵白アルブミンとの結合物に関する報告⁵⁹⁾とも一致している。以上の事実から NaG は PPDs と化学的にかなり安定な結合を保持していると推察された。

3) PPDs と PPDs-G の生物学的比較検討

緒言にも述べたように, われわれは NaG と卵白アルブミンとの結合物を調製したが, さらにこれを用いて家兎を免疫し, 得られた抗血清について卵白アルブミンに

よる抗血清と免疫化学的に抗原性を比較検討した結果, 両者の抗原性には差異が認められなかつた⁶⁹⁾。したがって PPDs と PPDs-G との抗原性にもほとんど差異は認められないと推察される。

PPDs Lot. No. 3 およびこれより調製した PPDs-G について, 予研 PPDs 15~25 を標準 PPDs とし死菌感作モルモットに対する「ツ」力価を比較した結果, PPDs と PPDs-G との間には力価に有意の差がみられなかつた。

次に結核菌生菌感作モルモットに PPDs および PPDs-G をそれぞれ皮下注射した後, 24, 48 時間後の死亡動物数を観察した⁵⁹⁾。その結果は表にみられるように, 感染後の期間, 個体差により, ばらつきはみられるが, PPDs-G 投与群は PPDs 投与群に比して死亡率の減少の傾向がみられた。健康モルモットについては, 投与量を2倍量にしたにもかかわらず死亡した動物はなかつた。

考 察

著者らは青山 B 株を Sauton 培地に培養し, Seibert らの方法を用いて精製した PPDs と NaG を磷酸緩衝液中 37°C, 96 時間処理することによって PPDs-G を生成することを述べた。今回われわれが精製した PPDs Lot. No. 1~No. 3 については, いずれも窒素含有量, 糖含有量においてほぼ近似した値を示し, さらにこれらより調製した PPDs-G のセファデックス G 50 を用いるカラムクロマトグラフィーの溶出曲線においても同様な溶出パターンを示し, PPDs-G はその PPDs と NaG の結合比にも再現性が認められた。

しかし Sauton 培地で培養して得られる PPDs について Seibert らは電気泳動的にみて単一な蛋白質から構成されていないことを示しており¹⁶⁾, また青山 B 株を用

Table. Death of Tuberculous Animals by PPDs and PPDs-G

Experiment No.	I			II			III			IV			Control		
Average body weight	540 g			540 g			450 g			580 g			640 g		
Weeks after infection	5			7			9			11			—		
Group	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A'	B'	C'
Number of dead animals : 0~24 hrs.	7/10	9/10	8/10	13/15	15/15	11/15	6/12	3/11	1/12	7/7	3/7	1/7	0/10	0/10	0/10
Number of dead animals : 24~48 hrs.	2/10	1/10	0/10	1/15	0/15	1/15	0/12	2/11	0/12	0/7	0/7	0/7	0/10	0/10	0/10
Death rate % 0~48hrs.	90	100	80	93	100	80	50	45	8	100	43	14	0	0	0

Guinea pigs were inoculated 0.1 mg each of *M. tuberculosis* KURONO strain subcutaneously. Various weeks after infection, the infected animals were injected with PPDs or PPDs-G subcutaneously. 24 or 48 hours after injection, number of dead animals was calculated.

Group : A : PPDs Lot. No. 3 (N: 13.74%) Dose : 0.1 mg/100 g of b.w.

B : PPDs treated without NaG (N: 13.53%), 0.1 mg/100 g of b.w.

C : PPDs-G (N: 12.86%), 0.106 mg/100 g of b.w.

Control : healthy guinea pigs

A' : PPDs Lot. No. 3 (N: 13.74%) Dose : 0.2 mg/100 g of b.w.

B' : PPDs treated without NaG (N: 13.53%), 0.2 mg/100 g of b.w.

C' : PPDs-G (N: 12.86%), 0.2 mg/100 g of b.w.

いて得られた PPDs の窒素含有量, 糖, 核酸含有量には培養 Lot. によりかなりばらつきが認められたという報告もある⁷⁰⁾⁷¹⁾。そこで, これらの問題点, とくに PPDs の均一性について検討を加えるとともに, PPDs と NaG の結合比の高い再現性のある PPDs-G の製造法を開発するため両者の反応条件をさらに詳細に検討することが必要と思われる。

結 論

1) 人型結核菌青山 B 株を Sauton 培地で培養して得られた培養濾液から PPDs を精製し NaG と生理的条件下に作用させてその結合物 PPDs-G を得た。

2) PPDs-G の性状を $6\text{-}^{14}\text{C}$ NaG を用いる放射能測定, 濾紙電気泳動法, 窒素分析等によつて検討した結果, PPDs と NaG は化学的に結合していることが示唆された。

3) PPDs と PPDs-G は「ツ」皮内反応において力価に有意の差が認められなかつた。また生菌感作モルモットに対する両者による死亡率を比較した結果, 感染後の期間, 個体差によつてばらつきはあるが, PPDs-G 投与群の死亡率に減少の傾向が認められた。

稿を終わるに臨み, 本研究に対し終始ご指導ならびにご校閲を賜りました東京大学医学部名誉教授秋葉朝一郎博士, 東京生化学研究所長岡田正志博士に感謝の意を表します。また PPDs および PPDs-G の「ツ」力価の測定にご援助を賜りました国立予防衛生研究所浅見望, 片岡哲朗両博士, 結核動物に対する両者の生物学的検討にご協力をいただきました結核予防会結核研究所羽鳥弘, 湯沢健児両博士に深謝いたします。

本研究の要旨は第 42 回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Koch, R.: Deut. Med. Wochschr., 17 : 1189, 1891.
- 2) Koch, R.: Gesammelte Werke von R. Koch, 1: 661, 1912.
- 3) Bujwid: Gazeta lekarska 1891, No. 4 zitiert von Zentral blatt für Bakt. u. Parasiten Kunde, 9 : 579, 1891.
- 4) Pirquet, C. von: Münch. Med. Wochschr., 53 : 1457, 1906.
- 5) Long, E. R. and Seibert, F. B.: Am. Rev. Tuberc., 13 : 448, 1926.
- 6) Seibert, F. B.: Adv. Tuberc. Res., 3 : 1, 1950.
- 7) Seibert, F. B.: Chem. Rev., 34 : 107, 1944.
- 8) Seibert, F. B.: J. Immunol., 65 : 297, 1950.
- 9) Sauton, B.: C. R. Acad. des Sciences, 155 : 1860, 1912.
- 10) Dorset, M.: J. Am. Vet. Med. Assoc., 84 :

439, 1934.

- 11) Long, E. R. and Seibert, F. B.: Am. Rev. Tuberc., 13 : 393, 1926.
- 12) Seibert, F. B.: Am. Rev. Tuberc., 30 : 713, 1934.
- 13) Long, E. R., Aronson, J. D. and Seibert, F. B.: Am. Rev. Tuberc., 30 : 733, 1934.
- 14) Long, E. R.: Am. Rev. Tuberc., 30 : 757, 1934.
- 15) Seibert, F. B. and Glenn, J. T.: Am. Rev. Tuberc., 44 : 9, 1941.
- 16) Seibert, F. B. and Du Four, E. H.: Am. Rev. Tuberc., 58 : 363, 1948.
- 17) Seibert, F. B., Pedersen, K. O. and Tiselius, A.: J. Exper. Med., 68 : 413, 1938.
- 18) Seibert, F. B., Pedersen, K. O. and Tiselius, A.: Am. Rev. Tuberc., 38 : 399, 1938.
- 19) Seibert, F. B., Soto-Figueroa, E. and Du Four, E. H.: Am. Rev. Tuberc., 71 : 704, 1955.
- 20) Seibert, F. B.: Am. Rev. Tuberc., 59 : 86, 1949.
- 21) Seibert, F. B.: Discussion Faraday Soc., 13 : 251, 1953.
- 22) Seibert, F. B., Stacey, M. and Kent, P. W.: Biochim. Biophys. Acta, 3 : 632, 1949.
- 23) Boquet, A. and Sandor, G.: Compt. rend. Soc. de biol., 121 : 99, 1936.
- 24) Bretey, J. and Lamensans, A.: Compt. rend. Acad. d. Sci., 232 : 1889, 1951.
- 25) Van Deinse, F.: Compt. rend. Soc. de biol., 122 : 1019, 1936.
- 26) Daddi, G. and Cattaneo, C.: Ist. Carlo Forlanini, 1 : 11, 1937.
- 27) Schubert, H.: Ztschr. physiol. Chem., 266 : 255, 1940.
- 28) Haman, E. B. and Ericks, W. P.: Am. Rev. Tuberc., 36 : 244, 1937.
- 29) Jensen, K. A., Bindslev, G. and Lind, P.: Tuberc., 19 : 385, 1938.
- 30) Priggi, R.: Schweiz. Med. Wochschr., 3 : 63, 1945.
- 31) 貝原守一: 福岡医学雑誌, 36 : 597, 昭 18.
- 32) Ito, R. and Koshimura, S.: Jap. Med. J., 1: 427, 1948.
- 33) Okamoto, H.: Jap. Med. J., 3 : 31, 1950.
- 34) 武谷健二: 医学と生物学, 20 : 89, 200, 昭 26.
- 35) Takeya, K. and Mifuchi, I.: Enzymologia, 16 : 366, 1954.
- 36) Takeya, K. and Zinnaka, Y.: Enzymologia, 17 : 378, 1956.
- 37) 武田徳晴・河西信彦・青木良雄: 日本細菌誌, 6: 43, 369, 昭 26.
- 38) 伊藤政一: 結核研究委員会細菌科会報告, 昭 27.
- 39) 倉金立一: 十全医学会誌, 55 : 1170, 昭 28.
- 40) Yamamura, Y.: Biochim. Biophys. Acta, 38 : 252, 1960.
- 41) Okada, Y. and Yamamura, Y.: J. Biochem.,

- 54: 484, 1963.
- 42) Yamamura, Y.: Jap. J. Microbiol., 13: 220, 1969.
- 43) Wong, K. H. and Pickett, M. J.: Am. Rev. Resp. Dis., 102: 641, 1970.
- 44) World Health Organization Technical Report, Series No. 56; Expert Committee on Biological Standardization, Fifth Report, 6, 1952.
- 45) 浅利行男: 日本小児科誌, 67: 379, 389, 昭 38.
- 46) 山県汎: 日本小児科誌, 62: 2060, 昭 34.
- 47) 赤塚謙一: 日本薬学雑誌, 81: 908, 911, 昭 36.
- 48) 今井早苗: お茶の水医誌, 8: 401, 昭 35.
- 49) McCrea, J.F. and Regnals, F.D.: Science, 118: 93, 1953.
- 50) 後藤正勝: 日本細菌誌, 16: 756, 昭 36.
- 51) 後藤正勝: 日本細菌誌, 17: 48, 昭 37.
- 52) 湯沢健児: 第 30 回生化学会総会, 昭 32.
- 53) 湯沢健児: 第 41, 45, 47 回結核病学会 関東地方会.
- 54) 羽鳥弘: 結核, 34: 411, 733, 昭 34.
- 55) 岩崎竜郎・橋本芳郎・村瀬貞男・工藤祐是・高井鏡二・石崎政司: 日本臨床結核, 12: 413, 昭 32.
- 56) Ballon, H. C. and Guernon, A.: J. Thorac. Surger., 23: 176, 1952.
- 57) 木野智慧光: 第 42 回結核病学会総会シンポジウム, 昭 42.
- 58) Tanimura, T. and Ishidate, M.: J. Biochem., 58: 494, 1965.
- 59) 羽鳥弘・湯沢健児: 未発表.
- 60) 穂積啓一郎: 化学の領域増刊, 19: 101, 昭 40.
- 61) Morris, D.L.: Science, 107: 254, 1948.
- 62) Hodge, J.E. and Hofreiter, B.T.: Method in Carbohydrate Chemistry, 1: 380, 1962.
- 63) Dische, Z. and Schwarz, K.: Mikrochim. Acta, 2: 13, 1937.
- 64) 田村善蔵・中島暉躬: 分析化学, 11: 1279, 昭 37.
- 65) 前田道明・浅見望・室橋豊穂: 結核, 35: 563, 昭 35.
- 66) 片岡哲朗: 結核, 40: 271, 昭 40.
- 67) Ellis, G. P.: Adv. Carbohydrate Chem., 14: 63, 1959.
- 68) Hodge, J. E. and Fisher, B. E.: Method in Carbohydrate Chemistry, 2: 99, 1963.
- 69) Takeda, Y. and Ishidate, M.: J. Biochem., 58: 501, 1965.
- 70) 小杉信之: 結核, 35: 356, 昭 35.
- 71) 近藤瑩子・浅見望・片岡哲朗: 結核, 41: 151, 昭 41.