

結核菌の毒性糖脂質 (cord factor) の作用機序

加 藤 允 彦

国立療養所刀根山病院

受付 昭和 47 年 2 月 14 日

MECHANISM OF ACTION OF CORD FACTOR (TREHALOSE-6, 6'-DIMYCOLATE) OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Masahiko KATO

(Received for publication February 14, 1972)

The mechanism of the delayed lethal toxicity of cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate) of *Mycobacterium tuberculosis* for mice was investigated.

Biochemical damages induced by cord factor *in vivo* were first studied with the homogenate of mouse liver. The activities of succinate-neotetrazolium reductase, reduced coenzyme Q-cytochrome *c* reductase and the phosphorylation associated with the succinate and β -hydroxybutyrate oxidation were impaired in livers of mice either intoxicated with cord factor or infected with virulent *M. tuberculosis*.

To analyse further the site of lesion in the cellular respiratory metabolism by cord factor, the structure and function of mitochondria prepared from the cord factor-intoxicated mice were studied. Cord factor disrupted both *in vivo* and *in vitro* the mitochondrial membrane into fragments deficient in the respiratory and phosphorylative activity. The site of functional damage was located in the segment between coenzyme Q-cytochrome *b* complex and cytochrome *c* (coupling site II) of the mitochondrial electron transport system. Electron microscopically, mitochondria were markedly swollen and disintegrated by cord factor either *in vivo* or *in vitro*. The inner membrane spheres were detached from the swollen inner membrane.

The above structural and functional damage in mitochondria was observed with a number of toxic cord factor-analogs, while mycolic acid, acetylated cord factor and the cord factor-inactive semisynthetic analog showed no effect on the mitochondrial structure and function.

Trehalose-6, 6'-dicorynomycolate, the cord factor of *Corynebacterium diphtheriae*, affected the mitochondrial structure and the oxidative phosphorylation as did the mycobacterial cord factor, whereas neither the crystalline exotoxin of *C. diphtheriae*, lipopolysaccharides derived from a number of gram-negative bacteria nor the endotoxic glycolipids and lipid A induced the mitochondrial swelling *in vitro*, indicating that the effect of cord factor on mitochondrial membrane structure is specific to this glycolipid-toxin.

From these results, it was assumed that the above metabolic damage in host-cell mitochondria is the biochemical basis of the toxicity of cord factor.

結核菌がマウスに対して特異な遅延性の致死毒作用をもつ毒性脂質を産生することは、H. Bloch によつて 1950

年にはじめて明らかにされた¹⁾。この脂質は有毒結核菌に特有な“紐状発育”(cord-like growth)²⁾に関与する

* From the Research Institute of Tuberculosis, Toneyama Hospital, National Sanatorium, Toyonaka, Osaka 560 Japan.

菌体表層脂質という意味で cord factor となづけられ、その生物学的性状や産生条件などが検討された^{3)~5)}。しかしながら当初 cord factor と報告された脂質画分は化学的にはきわめて不純な混合物であつて⁶⁾、この当時 cord factor の生物活性と考えられた諸性状の中には再検討を要するものが多いと考えられる。そのうち cord factor が Anderson 法⁷⁾によつて分画される結核菌体脂質画分のうち、精製ロウ画分に高濃度に含まれ、そのうちでも熱アセトン可溶のロウC画分に多量に存在することが明らかにされて⁸⁾、この物質を大量に菌体から分画・精製し、その化学構造を追求することが可能となつた。1956年に Noll ら⁹⁾はこのように精製・単離した cord factor の化学分析の成績から、この物質が結核菌に特有な分枝鎖鎖脂酸であるミコール酸と α -D-trehalose のエステル (6, 6'-dimycoloyl α -D-trehalose) であることを決定した。この化学構造は Gendre と Lederer¹⁰⁾によつて合成により確認され、結核菌が特異な毒性糖脂質を産生することに疑いをいれる余地はない。さらに最近ではミコール酸の種々の homologs の化学構造も明らかにされ¹¹⁾、cord factor の分子構造の全貌が明白にされている。

このように単一物質として精製されその化学構造が確定された菌体成分を用いて、その作用機序を解明するとともに感染における意義を追求することは、結核菌の病原性を生化学的な手法で解析するうえにきわめて有用な素材と考えられる。著者はこのような観点から cord factor の毒性の機序、およびこの物質の結核感染における役割を追求し、cord factor が宿主細胞のミトコンドリア内膜に作用して、膜構造の崩壊を来すとともに呼吸とリン酸化反応を阻害することを見出した。以下その成績について述べる。

方 法

1) 動物：実験には一貫してマウスを用いた。Random-bred ddO stock (大阪大学実験動物センター) の4~6週齢の雄性動物を固型飼料 (オリエンタル MF) と水で飼育した。

2) cord factor：人型有毒結核菌 H₃₇Rv 株のソートン4週培養菌体から Noll と Bloch の方法¹²⁾によつて抽出、精製した。マウスに注射する場合には Bayol F (Esso-Standard Oil Co., New York) に溶解し、100°C 15分加熱して腹腔内に注射した。また水エマルジョンを作る場合には、まずエーテルに溶かし (2~3 mg/ml)、等量のエタノールと水を添加したのち、40°C 以下に加熱しながら減圧によつて有機溶媒を除去する方法¹³⁾を用いた。

ミトコンドリアの調製：マウス肝を9容の 0.25M シュ糖+0.01M トリス緩衝液 (pH 7.4) とともにホモジナイズし、Hogeboom 法¹⁴⁾によつてミトコンドリアを遠

心分画した。

呼吸およびリン酸化反応の測定：コハク酸および種々の NADH 系基質を用い、25°C で検圧法によつて酸素吸収を測定した。反応終了後に終末5%のトリクロル酢酸を加えて除蛋白し、上清中の無機リン量を Fiske-Subbarow 法¹⁵⁾によつて定量した。共駆部位 II および III の電子伝達活性とリン酸化反応は、Lee ら¹⁶⁾ および Sanadi ら¹⁷⁾の方法に準じて測定した。

成 績

(1) Cord factor の in vivo 作用

H. Bloch¹⁵⁾は cord factor を反復してマウスの腹腔内に注射することが毒性の發揮に必須の条件であるとしたが、著者ら¹⁸⁾は十分に精製した cord factor を用いる場合には、1回だけの注射によつて注射量に応じてマウスが死亡することを認めている。反復注射の場合も1回注射の場合も、マウスは徐々に体重の減少と衰弱を現わし、1~2週間に死亡するのが特有の遅延性毒性の様相である。注射量を段階的に増加して2週の死亡マウス数から50%致死量 (LD₅₀) を求めると 50 μ g という値が得られた¹⁸⁾。そこで cord factor の注射によつて宿主組織内にどのような代謝の変化が起こるかを観察するには、50~100 μ g の cord factor を腹腔内に注射したのち、数日から1週間にわたつて代謝病変を追求するのが適当であると考えられる。このような cord factor 中毒マウスの肝において、トリフェニルテトラゾリウム・クロリド (TTC) の還元¹⁹⁾およびネオテトラゾリウム (NT) の還元活性が低下する²⁰⁾ことがまず見出された。さらに cord factor 以外の脂質画分にはこのような NT 還元活性の低下を来す作用のないこと²¹⁾、肝ホモジネートの呼吸酵素系のうち還元型コエンザイム Q・チトクローム c 還元酵素だけが cord factor 注射によつて低下すること²²⁾、および同様の酵素活性の低下が有毒結核菌の感染によつても起こることが逐次明らかにされた²²⁾。結核菌感染マウスの臓器から集めた菌体 (in vivo grown bacilli) を加熱死菌としてマウスに注射しても、チトクローム c 還元の段階で呼吸酵素活性が著明に低下することから、結核感染における呼吸酵素の活性低下には菌体毒性物質が主役を演じていると考えられた²³⁾。さらに呼吸と共駆するリン酸化反応も cord factor 注射および結核菌の感染によつて低下することが明らかにされ²⁴⁾、cord factor によつてひき起こされる呼吸系機能の代謝病変が、結核感染に伴つて認められる生化学的な変化であることは確かと考えられる。

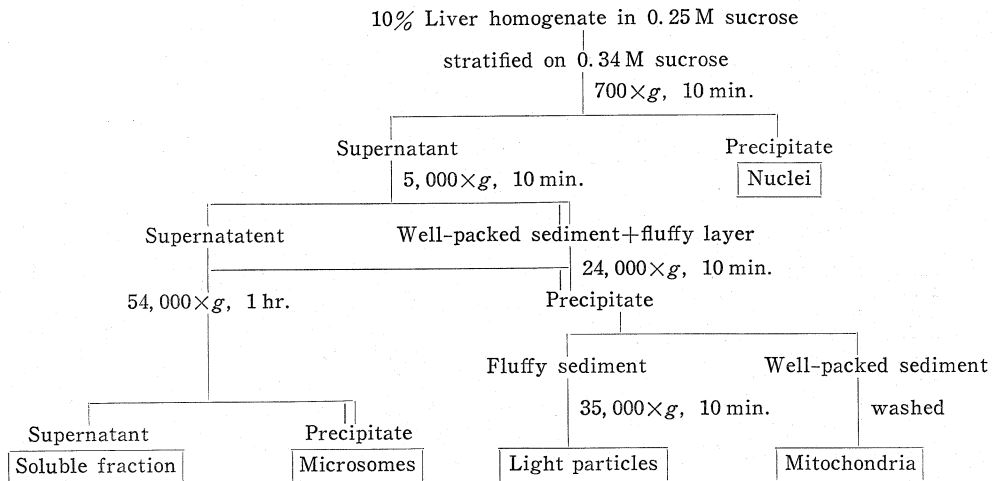
以上の肝ホモジネートを用いて観察した呼吸とリン酸化反応は、細胞内のミトコンドリアにその機能が集約されている。Cord factor が肝ホモジネートの呼吸とリン酸化反応の低下を来すということは、この物質がなん

らかの機序によつてミトコンドリア膜の構造あるいはその機能を傷害することを示唆すると考えられる。そこで cord factor 中毒マウス肝細胞のミトコンドリアの分画を行ない、その機能および構成成分にどのような変化が起こっているかを検討した²⁵⁾。

表1に示す方法¹⁴⁾に従つて肝ミトコンドリアを遠心分画すると、cord factor 中毒マウス肝においてはミトコンドリア画分の減少に伴つて、“fluffy layer”にふくまれる画分 (light particles, ミトコンドリアのフラグメントに富む) が増加する。それぞれの画分を蛋白量によつて定量するとともに、その酸化的リン酸化反応活性を測定した成績を表2に示した。この成績から明らか

なように、light particles にはリン酸化反応活性が認められず、cord factor は *in vivo* においてミトコンドリアを呼吸、リン酸化反応の作用を失つたフラグメントに崩壊させることが分かる。肝 DNA 量は cord factor 注射によつて低下しない²⁵⁾ので、肝細胞数は減少しないと考えられる。図1に示すように、ミトコンドリアの蛋白、脂質および脂質リン量の減少と、light particles 画分におけるそれらの増加は cord factor の注射量に比例する。このような cord factor 中毒マウス肝細胞の電子顕微鏡写真においては、ミトコンドリアは高度に膨化し膜構造の断裂が認められた²⁶⁾。またこのような肝から遠心分画によつて集められたミトコンドリアは、

Table 1. Fractionation of Mitochondria and Light Particles from Mouse Liver



The fractionation procedure was carried out at 0 to 2°C in a Spinco L refrigerated ultracentrifuge with the rotor head No.30.

Table 2. Effect of Cord Factor on Protein Content and Oxidative Phosphorylation Activity in Mouse Liver Mitochondria

Fraction	Injection	Time after injection	Total protein	Oxidation rate*	P/O
Mitochondria	None	hr. —	mg/g liver 39.1±1.2	220±10	1.82
	Cord factor	24	28.3±0.8**	200±20	1.65
	Cord factor	48	25.5±0.4**	190±30	1.53
	Cord factor	72	22.5±0.5**	170±20**	1.65
	Cord factor	120	21.6±0.2**	160±20**	1.44
Light particles	None	—	3.8	25	0
	Cord factor	24	5.8	24	0
	Cord factor	48	6.2	31	0
	Cord factor	72	6.0	20	0
	Cord factor	120	4.3	35	0

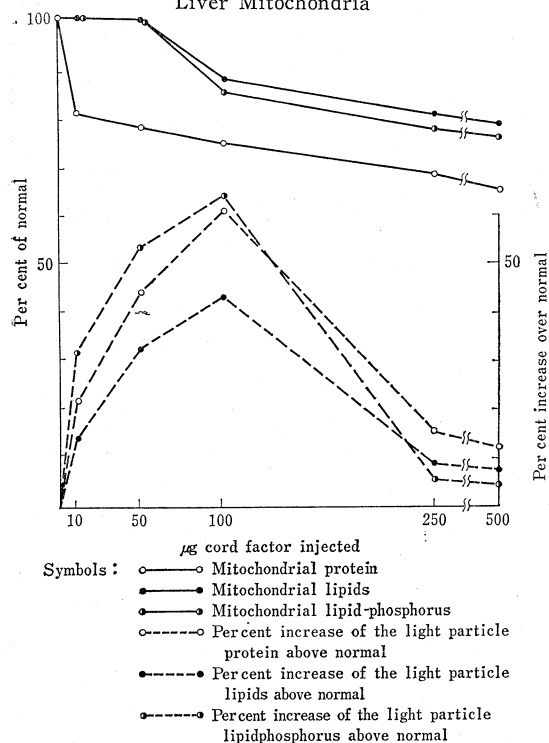
Figures for mitochondria are mean±standard deviation of 8 mice in each group. Light particles from the livers of 4 mice were collected together and subjected to the determination of protein content and the assay of oxidative phosphorylation with succinate as substrate. The figures are mean of two tests. Dose of cord factor: 100 µg/0.1 ml Bayol F, ip.

* natoms oxygen/min/mg protein.

** Variance ratio exceeds 1% level of significance.

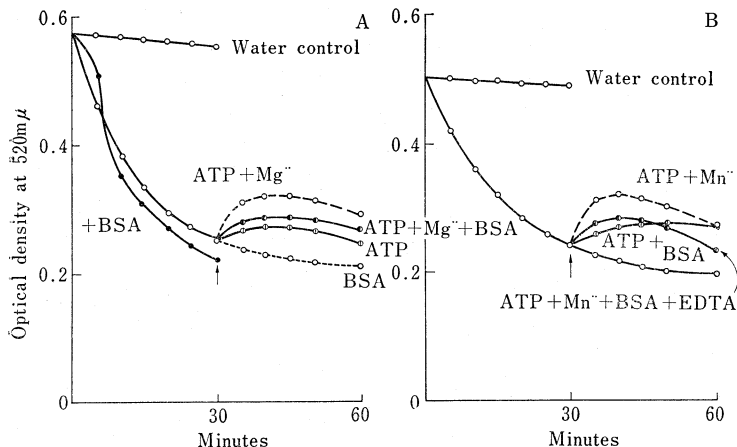
膜構造やクリスタの高度の膨化と崩壊像を示し、一方 light particles 画分には多数の破壊されたミトコンドリアの破片がふくまれている²⁶⁾。このような形態学的な観

Fig. 1. Effect of Various Doses of Cord Factor on the Structural Elements of Mouse Liver Mitochondria



The analyses of the components were carried out 24 hours after the intraperitoneal injection of cord factor in 0.1 ml of Bayol F. Average values from 4 mouse livers are plotted.

Fig. 2. Requirements for Protection and Reversal of Mitochondrial Swelling Induced by Cord factor *in vitro*



The concentrations of various reagents were as follows. BSA (bovine serum albumin)=2 mg/ml. ATP=5 mM. $MgCl_2$ and $MnCl_2$ =3 mM. EDTA=1 mM.

The change of optical density at 520nm was read every 5 minutes for 30 minutes and then various reagents were added in the system for reverse the cord factor-induced mitochondrial swelling.

察の成績からも, cord factor が *in vivo* で細胞内のミトコンドリアに作用し, その膜構造の崩壊を来すとともに膜に依存する呼吸とリン酸化反応の機能低下をひき起こすことが証明された。この機能障害の部位はこれまでの成績によつて site II (チトクローム *b*, コエンザイム Q complex とチトクローム *c* の間) にあると考えられた^{22)24)~26)} が, この点をさらに詳細に検討するために cord factor の水エマルジョンを用いてその *in vitro* 作用を追求した。

(2) cord factor の *in vitro* 作用²⁷⁾²⁸⁾

Cord factor が *in vivo* で肝細胞内ミトコンドリアの膨化を来すことから, cord factor とミトコンドリアを *in vitro* で接触させ吸光度を測定すると, 表3に示す

Table 3. Effect of Cord Factor on Optical Density Changes of Mitochondrial and Light Particle Suspension

Suspending medium	Change in Optical Density at 520 nm from 0 to 10 min			
	Mitochondria		Light particles	
	Control	Cord factor	Control	Cord factor
Sucrose-Tris	0.000	-0.074	+0.010	+0.015
KCl-Tris	-0.024	-0.128	0.000	+0.005

The test system contained in a final volume of 3.0 ml: 0.25 M sucrose+0.02 M Tris-HCl (pH 7.4) or 0.154 M KCl+0.02 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 ml of water (control) and 100 µg cord factor in 0.1 ml of water (cord factor). The change of optical density at 520 nm was read at 20°C for 10 min.

ように cord factor を加えた場合に著明な吸光度の減少すなわちミトコンドリアの膨化の起こることが分かる。

この膨化の程度は添加する cord factor の量に比例する。ミコール酸やアセチル化 cord factor にはこのような作用が認められない。また cord factor のミトコンドリア膨化作用は, 心筋および骨格筋以外の臓器から分離したミトコンドリアに対して一様に認められた。さらに cord factor によるミトコンドリアの膨化は, 図2に示すように牛血清アルブミンによつて防御されず, ATP や Mg^{++} , Mn^{++} , EDTA および血清アルブミンのいずれの組合せによつても完全に回復されないの で, 可逆的な膜の膨化というより不可逆的な膜の膨化・崩壊であると考えられる²⁷⁾。

このように cord factor と *in vitro* で接触したミトコンドリアの酸化的リン酸化反応活性は, 表4に示すように

Table 4. Effect of Cord Factor on Respiration and Phosphorylation in Mouse Liver Mitochondria

Cord factor concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)*	Substrate			
	Succinate+rotenone		Pyruvate+malate	
	Oxidation rate**	P/O	Oxidation rate**	P/O
0	216	1.89	74	2.95
25	196	1.59	62	2.44
50	181	1.32	40	1.98
100	175	1.19	35	1.82

* Mitochondria were preincubated with or without cord factor 15 min. at 20°C.

** natoms oxygen/min/mg protein.

cord factor 量に比例して低下する²⁸⁾。この場合 NADH 系基質の酸化がコハク酸の酸化より著明に cord factor によつて阻害されるが、リン酸化反応活性の低下はいずれの場合にも“1 phosphorylation unit”である(表5)。このことからコハク酸経路および NADH 経路に共通する共転リン酸化反応部位ⅡおよびⅢ(Coupling sites Ⅱ and Ⅲ, 図3)のうちのいずれかが、cord factor の作用によつて機能を消失するのであろうと推定された。表6に示す成績は、この機能低下の部位が siteⅡであつて、siteⅢの機能は全く cord factor によつて障害されないことを示している。この場合に cord factor がミトコンドリア膜の特定の部位(たとえば siteⅡ)に結合することによつて阻害作用を発揮するの否かを検討するために、¹⁴C で標識した cord factor をミトコンドリア画分に加えた。表7の成績から明かなように、cord factor がミトコンドリア膜に結合するという可能性はないと考えられる。

以上のように, cord factor はミトコンドリアの電子

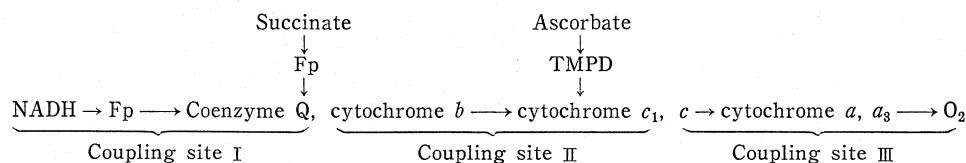
Table 5. Inhibition of Respiration and Phosphorylation with Various Substrates by Cord Factor

Substrate	Cord factor concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)*	Oxidation rate (atoms oxygen/min/ mg protein)	P/O
Succinate+ rotenone	0	224	1.96
	25	218	1.51
	50	205	1.24
	100	192	1.12
Pyruvate+ malate	0	77	2.80
	25	45	2.18
	50	30	1.84
	100	18	1.58
Glutamate	0	105	2.88
	12.5	99	2.50
	25	83	2.00
	50	50	1.96
α -Oxo- glutarate+ malonate	0	53	3.91
	12.5	45	3.30
	25	39	2.76
	50	21	2.52
β -Hydroxy- butyrate	0	44	2.94
	25	42	2.58
	50	40	2.32
	100	32	2.15

* Mitochondria were preincubated with or without cord factor 15 min at 20°C before addition to the assay medium. Substrate concentration : 10 mM. Rotenone, 100 nM.

伝達とリン酸化反応の機能を、きわめて特異的に site II において阻害することが分かった。なぜ site II だけが cord factor によって阻害されるのかという点を明らかにするために、*in vitro* で cord factor と接触したミト

Fig.3. Coupling Sites of Phosphorylation to Mitochondrial Electron Transport Chain



Fp : Flavoprotein. TMPD : N, N, N', N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

Table 6. Effect of Cord Factor on Phosphorylation at Coupling Sites II and III

Cord factor concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)*	Coupling site					
	II + III		II		III	
	Oxidation rate**	P/O	Reduction of ferricyanide†	$\text{P}/2\text{e}^-$	Oxidation rate	P/O
0	200	1.84	352	0.87	213	0.89
25	198	1.50	342	0.64	218	0.90
50	185	1.22	312	0.23	215	0.92
100	178	1.03	284	0	214	0.86

* See footnote to Tables 4 and 5.

** natoms oxygen/min/mg protein.

† nmoles ferricyanide reduced/min/mg protein.

Table 7. Examination of Binding of Cord Factor to Mitochondria
40 mg mitochondria + 1 mg ^{14}C -cord factor*

Incubate 15 min. at 20°C	
Total radioactivity = 37,000 cpm	
24,000 × g, 10 min.	
Supernatant (26,200 cpm)	Precipitate (9,200 cpm)
Second wash**	
Supernatant (7,500 cpm)	Precipitate (1,200 cpm)
Third wash**	
Supernatant (1,200 cpm)	Precipitate (100 cpm)

* Specific activity = 36,300 cpm/mg

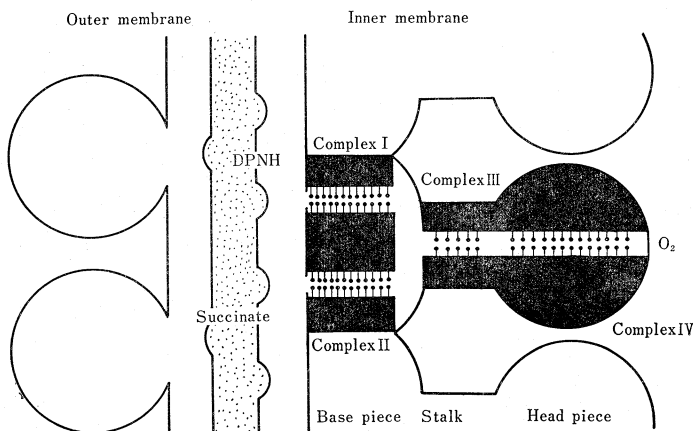
** The mitochondrial pellet was resuspended in 3.0 ml of sucrose-Tris medium and centrifuged at 24,000 × g for 10 min. An aliquot of the supernatant and the resuspended mitochondrial fraction was taken for the measurement of radioactivity by liquid scintillation counting with the Bray's reagent.

コンドリア膜の変化を電子顕微鏡で観察した²⁹⁾。この場合も *in vivo* における観察成績²⁶⁾と同様に、ミトコンドリア膜は cord factor によつて膨化し崩壊するが、最も著明な変化は内膜の“inner membrane sphere”，あるいは基本粒子 (elementary particle) の stalk の断裂と head piece (図4参照)の脱離であつた。この形態的な変化が ATPase の促進²⁸⁾や site II (図4の complex III)の機能低下につながる膜構造の特異病変であろうと推定される。

(3) Cord factor の分子構造と毒性との関係

Cord factor の分子構造 (図5)のどの部分がこの物質の毒性中心であるのかということは、生物学的に活性をもつ物質の構造と機能の関係をさぐるうえに興味ある

Fig. 4. Schematic Representation of the Membrane Structure of Mitochondria



(D. E. Green, 1964)

テーマであると考えられる。Cord factor の化学構造を決定する途上で合成された種々の構造類似体を用いた成績から、この物質の毒性に関与する構造として次のような点があげられている^{30)~32)}。

A. ミコール酸と糖 (trehalose, glucose あるいは glucosamine) の6位のエステル結合は毒性に重要であつて、糖の1または2位のエステルには毒性がない。

B. 脂肪酸はミコール酸より短鎖長 (C_{32} あるいは C_{44}) のものであつても毒性は保持されている。

C. ミコール酸の3位の水酸基は毒性に関与しないが、完全にアセチル化された cord factor は毒性を欠くので、糖の水酸基は毒性に必須である。

著者は以上の点をマウスに対する致死毒活性だけでなく、肝ミトコンドリアに対する作用を指標として追求した³³⁾。その結果、ミコール酸やアセチル化 cord factor にはミトコンドリアを *in vivo*³³⁾ および *in vitro*²⁸⁾ で障害する作用のないことを認めた。また Cord factor と同様の毒性をもつ Methy 6-(3', x-sulphitomycoloyl)- α -D-glucoside と 6-(3'-acetoxy, x-methoxymycoloyl)-N-acetyl-D-glucosamine は、ミトコンドリアの構造や機能を cord factor と同じように傷害するけれども、毒性を欠く 6, x-di-(3'-acetoxy, x-methoxymycoloyl)-N-acetyl-D-glucosamine にはそのような作用が認められない。これらの成績から cord factor の毒性とミトコンドリアに対する作用との間には密接な関係が認められた。

さらに最近では 6,6'-dimycoloyl sucrose と Methyl 6-mycoloyl- α -D-glucopyranoside の毒性を cord factor のそれと比較した³⁴⁾。Cord factor のモノマーと考えられる Methyl 6-mycoloyl- α -D-glucoside の毒性は、cord factor のその 1/3~1/4 に低下している。そしてこのものに fructofuranoside を結合させた 6,6'-dimycoloyl sucrose では、cord factor のレベルまでの毒性の回復が認められないことから、cord factor 分子中の trehalose core は毒性に非常に重要な構造と考えられる。糖の水酸基の毒性における役割に関して、種々の水酸基の立体配位のものについて検討を続けている。

(4) Cord factor 毒性の特異性

結核菌の cord factor のほか、ジフテリア菌体内の毒性糖脂質がコリノミコール酸 (2-tetradecyl 3-hydroxystearic acid) と α -D-trehalose のエステルであること、およびエステル結合の位置が結核菌の cord factor と同様に α -D-trehalose の6,6'位であることが Senn ら³⁵⁾によつて明らかにされた。著者はこの物質のマウスに対する

病変を見出した。このミトコンドリアにおける生化学的変化は、*in vivo* および *in vitro* の両面から、その内膜構造の特徴的な崩壊に伴う電子伝達と共転リン酸化反応の site II における機能障害であることが証明された。このような生化学的病変の感染における意義を明らかにするために、抗 cord factor 抗体の結核感染に対する効果を追求中であつて、この道程の全段階が一貫して解明されたとき、cord factor の作用機序が完全に明らかにされるとともに、この研究成果がなんらかの形で臨床的なレベルに帰帰されることが考えられる。

結 論

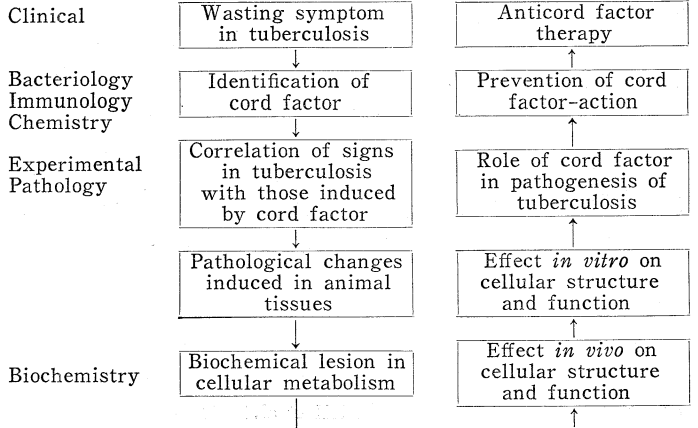
結核菌の毒性糖脂質 cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) は、マウス肝ミトコンドリアの膜構造を *in vivo* および *in vitro* において膨化・崩壊させるとともに、膜構造に依存する電子伝達機能と共転リン酸化反応を共転部位 II で特異的に阻害する。この生化学的病変が cord factor の遅延性毒性の機序であると考えられる。

本研究に着手した当初から終始研究の道標をお示しいただいた大阪大学医学部山村雄一教授に心からの謝意を表する。また共同研究者として研究の推進に多大の助力を賜わった九州大学胸部疾患研究所田中渥博士、青森県立中央病院福土主計博士および Dr. Jean Asselineau, Université Paul Sabatier, Toulouse に深謝する。Dr. Edgar Lederer, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette と昭和大学薬学部河西信彦博士にはそれぞれジフテリア菌の cord factor と lipid A の標品をいただいた。記して厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) Bloch, H.: J. Exp. Med., 91 : 197, 1950.
- 2) Middlebrook, G., Dubos, R. J. and Pierce, C. H.: J. Exp. Med., 86 : 175, 1947.
- 3) Bloch, H.: J. Exp. Med., 92 : 507, 1950.
- 4) Bloch, H. and Noll, H.: J. Exp. Med., 97 : 1, 1953.
- 5) Bloch, H. and Noll, H.: Brit. J. Exp. Path., 36 : 8, 1955.
- 6) Bloch, H., Sorkin, E. and Frlenmeyer, H.: Amer. Rev. Tuberc., 67 : 629, 1953.
- 7) Anderson, R. J.: Fortsch. Chem. Organ. Naturst., 3 : 145, 1939.
- 8) Noll, H. and Bloch, H.: Amer. Rev. Tuberc., 67 : 828, 1953.
- 9) Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J. and Lederer, E.: Biochim. Biophys. Acta, 20 : 299, 1956.

Table 8. Diagram of the Study of Cord Factor Action



- 10) Gendre, T. and Lederer, E.: Bull. Soc. Chim. France : 1478, 1956.
- 11) Etemadi, H.: Bull. Soc. Chim. Biol., 49 : 695, 1967.
- 12) Noll, H. and Bloch, H.: J. Biol. Chem., 214 : 251, 1955.
- 13) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 96 : 553, 1967.
- 14) Hogeboom, G. H.: Methods in Enzymology, 1 : 16, 1955.
- 15) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: J. Biol. Chem., 66 : 375, 1925.
- 16) Lee, C. P., Sottocasa, G. L. and Ernster, L.: Methods in Enzymology, 10 : 33, 1967.
- 17) Sanadi, D. R. and Jacobs, E. E.: Methods in Enzymology, 10 : 38, 1967.
- 18) Kato, M. and Tanaka, A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 96 : 460, 1967.
- 19) Kato, M., Miki, K., Matsunaga, K. and Yamamura, Y.: Amer. Rev. Tuberc., 80 : 535, 1959.
- 20) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93 : 411, 1966.
- 21) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93 : 421, 1966.
- 22) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 94 : 388, 1966.
- 23) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 94 : 395, 1966.
- 24) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 96 : 998, 1967.
- 25) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98 : 260, 1968.
- 26) Kato, M. and Fukushi, K.: Amer. Rev. Resp. Dis., 100 : 42, 1969.
- 27) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 100 : 47, 1969.
- 28) Kato, M.: Arch. Biochem. Biophys., 140 : 379, 1970.
- 29) Fukushi, K. and Kato, M.: Joint Tuberculosis Research Conference, U.S.-Japan Cooperative

- Medical Science Program, San Francisco, 1971.
- 30) Noll, H.: Adv. Tuberc. Res., 7: 149, 1956.
- 31) Lederer, E.: Festschrift Arthur Stoll, Birkhäuser AG, Basel, p.384, 1957.
- 32) Asselineau, J.: The Bacterial Lipids, E. Lederer ed., Hermann, Paris, 1966.
- 33) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98: 668, 1968.
- 34) Kato, M. and Asselineau, J.: European J. Biochem., 22: 364, 1971.
- 35) Senn, M., Ioned, T., Pudles, J. and Lederer, E.: European J. Biochem., 1: 353, 1967.
- 36) Kato, M.: J. Bacteriol., 101: 709, 1970.
- 37) Kato, M.: J. Bacteriol., 107: 746, 1971.
- 38) Kato, M.: Jap. J. Exp. Biol. Med., in press.
- 39) Kato, M.: In manuscript.
- 40) Kato, M.: Infec. Immun., in press.
- 41) Kato, M.: Jap. J. Exp. Biol. Med., in press.