

原 著

結核菌のマクロファージ内増殖に及ぼす
免疫リンパ球の影響に関する実験的研究

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所

受付 昭和 51 年 9 月 25 日

EXPERIMENTAL STUDY ON THE EFFECT OF THE IMMUNE
LYMPHOCYTES ON THE GROWTH OF TUBERCLE
BACILLI IN MACROPHAGES

Mareichi TOYOHARA*

(Received for publication September 25, 1976)

The relationship between macrophages and lymphocytes is important in the cellular immunity.

In this study the growth of tubercle bacilli in macrophages was observed under the mutual relation among macrophages, lymphocytes, culture supernatant of lymphocytes and acid-phosphatase activity of macrophages.

1. Materials and Methods

Alveolar macrophages of guinea pigs were taken and prepared in suspension of $10^5/\text{ml}$.

Lymphocytes were collected by teasing spleens or kneefold lymphnodes of normal of BCG-immunized guinea pigs. Suspension of lymphocytes was prepared in $10^6/\text{ml}$.

Lymphocytes were cultured with or without PPD in 199 liquid media without serum for 48 hours at 37°C under 5% CO_2 , and then culture supernatant was taken by centrifugation of lymphocytes culture.

$10 \mu\text{l}$ of macrophage suspension and $10 \mu\text{l}$ of bacillary suspension containing about 10^3 tubercle bacilli were put on a small slide glass. After 1 hour the slide glass was rinsed with Hank's solution to remove free tubercle bacilli. Then $10 \mu\text{l}$ of suspension of lymphocytes or $10 \mu\text{l}$ of culture supernatant was added on the adherent macrophages. The slide glass was kept in MEM with 10% calf serum at 37°C under 5% CO_2 .

The slide glass was taken off day by day and was stained by Ziehl-Neelsen method. Growth ratio was defined as percent of average number of tubercle bacilli in 100 infected macrophages at the examined day to that at the beginning of culture.

Macrophages were cultured on a small plastic dish and acid phosphatase activity of them was measured by using *p*-nitrophenylphosphate as substrate day by day.

2. Results

2-1. Effects of the immune lymphocytes and PPD on growth of tubercle bacilli in macrophages.

Growth ratio of tubercle bacilli in the immune macrophages (i.M ϕ), normal macrophages (ni.M ϕ) or normal macrophages with normal spleen cells (ni.M ϕ +ni.S.) is shown in Fig. 1.

* From the Research Institute of Tuberculosis, J. A. T. A., 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

Growth of tubercle bacilli in *i.Mφ* was slightly smaller than that in *ni.Mφ*. Addition of *ni.S.* was not significant to growth of bacilli in *ni.Mφ*.

Growth ratio of *ni.Mφ*, *ni.Mφ* with the immune spleen cells(*ni.Mφ+i.S.*), *ni.Mφ+i.S.+PPD 2 mcg*, *ni.Mφ+ the immune lymph node cells(ni.Mφ+i.L.)* or *ni.Mφ+i.L.+PPD 2 mcg* is shown in Fig.2.

When *ni.Mφ* were added *i.S.* or *i.L.*, growth of tubercle bacilli in *Mφ* was inhibited. Addition of PPD enhanced inhibition of growth of bacilli in *Mφ*. The inhibitory activity for bacilli of *i.L.* was a little stronger than that of *i.S.*

2-2. Effects of culture supernatant of the immune lymphocytes on acid phosphatase activity of macrophages.

Acid phosphatase activity (Ac.-P.) of normal macrophages (*ni.Mφ*) which were added culture supernatant of the normal or the immune spleen cells cultured with or without PPD is shown in Table 1.

Ac.-P. of *ni.Mφ* increased day by day. Among Ac.-P. of *ni.Mφ* at each day under each condition, Ac.-P. of *ni.Mφ* increased by adding culture supernatant of the immune spleen cells, but not by culture supernatant of the normal spleen cells. Effect of addition of PPD into culture was not significant.

As shown in Table 2, culture supernatant of the immune lymph node cells also increased Ac.-P. of macrophages, but the effect of adding PPD into culture was not significant as well as in the case of spleen cells.

3. Summary

Growth of tubercle bacilli in normal macrophages was inhibited by adding the immune lymphocytes or the culture supernatant *in vitro*. The inhibition was increased by adding PPD into culture.

Culture supernatant of the immune lymphocytes increased acid-phosphatase activity of normal macrophages, but the effect of adding PPD into culture was not significant to acid-phosphatase activity of macrophages.

1. 緒 言

著者は結核菌の吸入感染実験において肺胞内に定着した結核菌がマクロファージ(*Mφ*)に貪食され非免疫動物では *Mφ* 内でよく増菌するが BCG 免疫動物では *Mφ* 内における菌の増殖が著しく阻止されることを動物実験で組織学的に観察し既に報告した¹⁾。

結核免疫の機序を *Mφ* に求めた研究は既に古くからあるが²⁾⁻⁶⁾, *in vitro* では免疫 *Mφ* 内結核菌の増殖抑制がそれほど明らかでなく⁷⁾⁸⁾, 免疫動物 *in vivo* *Mφ* 内では何故結核菌の増殖が抑制されるかという機序については今なお、明確な解答は得られていない。しかし最近、*Mφ* とリンパ球の相互関係を中心とした研究がすすめられ細胞性免疫の機序の解明に曙光が当てられるに至りようやくそのヴェールが除かれつつあるといつてよいであろう⁹⁾⁻¹¹⁾。

結核菌以外に *Listeria* も細胞性免疫を成立させることは知られているが *in vivo*¹²⁾ のみならず *in vitro* でも

結核菌と *Listeria* の間に交差抵抗性が存在することは *Mφ* 内の菌とリンパ球が深くかかわり合い更にリンパ球に媒介される *Mφ* 内菌増殖抑制が非特異的な一面を持つことをうかがわせている¹³⁾⁻¹⁵⁾。

しかし *in vitro* の系での *Mφ* 内結核菌の増殖抑制とリンパ球との関係についての研究はなお十分でなく、この解明こそ抗菌免疫の本態に迫るものであろう。

近年、免疫リンパ球と対応抗原によつて生産される M.I.F.¹⁶⁾⁻¹⁹⁾, cytotoxic factor²⁰⁾²¹⁾, chemotactic factor²²⁾ など lymphokine の研究の進歩により免疫リンパ球培養上清に含まれる何らかの因子を推定し、これが *Mφ* を活性化し *Mφ* 内結核菌の増殖を抑制するという報告もある⁸⁾²⁷⁾。また BCG 感染マウスの腹腔 *Mφ* は lysosomal acid hydrolase を上昇させるという報告もみられる²³⁾。

本研究では *Mφ* 内結核菌の動態を *in vitro* で *Mφ*, リンパ球, リンパ球培養上清および代表的 lysosomal enzyme の1つである acid phosphatase 活性と関連させながら観察し知見を得たので報告する。

2. 材料ならびに方法

2-1. 材料

a) Mφ

ツ反陰性健康 Hartley 系モルモットより Myrvik の方法²⁴⁾を用いて肺胞 Mφ を採取し Hanks 液で $10^5/ml$ に調整する。これを非免疫正常 Mφ とする。また BCG 0.1 mg を皮下接種し 5 週後に採取した肺胞 Mφ を免疫 Mφ とする。

b) リンパ球

正常または BCG 0.1 mg を皮下に接種し 5 週後の免疫モルモットの脾または膝膕リンパ節をとりメッシュ上でチーズし Hanks 液に浮遊させ、その浮遊液を 1,500 rpm 20 分遠沈し上清をすて Hanks 液で $10^6/ml$ の細胞浮遊液とした。

c) リンパ球培養上清

上記のようにして得たリンパ球を $10^6/ml$ の割合に血清非含有 199 培地に浮遊し、そのまままたは PPD を $50\mu g/ml$ に添加し 5% CO_2 下に 37°C で 48 時間培養した後、培養液を 3,000 rpm 20 分遠沈し上清を凍結乾燥し保存する。用いるのぞみ蛋白量を $100\mu g/ml$ になるよう滅菌蒸留水で調整し濾過滅菌する。

d) 結核菌浮遊液

人型菌 H₃₇Rv のソートン培地 2 週培養菌より摩砕コルベンで 1 mg/ml の菌液をつくり 1,500 rpm 10 分遠沈し上清を菌浮遊液として実験に用いた。

2-2. 方法

a) Mφ 内結核菌の動態観察

通常のスライドガラスよりつくつた滅菌小短冊形スライドガラス (2 cm × 0.5 cm) 上に $10\mu l$ の上記 Mφ 浮遊液をエッペンドルフ・ピペットで滴下し、更に結核菌浮遊液を $10\mu l$ 滴下し 5% CO_2 下 37°C 1 時間孵置した後スライドガラスを十分洗い遊離の結核菌を除く。次いでこのスライドガラスに $10\mu l$ の上記リンパ球浮遊液および PPD 2 μg 含有溶液、またはリンパ球培養上清 $10\mu l$ を滴下し 10% 仔ウシ血清加 MEM 培地 3 ml を含む TD 15 管中にこのスライドガラスを投入し 5% CO_2 下 37°C で培養する。経時的にスライドガラスを取り出しチール・ネルゼン法で染色し、感染 Mφ 100 内の結核菌数の平均値を算定し培養開始時の感染 Mφ 内結核菌数との比をもつて増殖比とした。

b) Mφ の acid phosphatase 活性 (Ac.-P.) 測定

2-1-a) に記した Mφ 浮遊液 1 ml を滅菌小プラスチックシャーレにいれ 5% CO_2 下 37°C に孵置し Mφ をシャーレ底面に付着させる。1 時間後に上清をすて 1 回 Hanks 液で洗い 10% 仔ウシ血清加 MEM 培地 2 ml を加え 5% CO_2 下 37°C におき 5 時間、1, 3, 5 日に 1 コずつ培養シャーレをとり上清をすて 1 回 Hanks 液

で洗った後 1 ml の Hanks 液を加えラバー・クリーナーで底面から細胞層をはぎとり細胞浮遊液を調整する。この浮遊液 0.1 ml に蒸留水 0.2 ml, pH 5.0, 0.1 M acetate buffer 0.5 ml, 1% Triton-X 100 0.1 ml, 0.02 M *p*-nitrophenyl phosphate 0.1 ml を加え 60 分 37°C においた後 1% NaOH 3 ml を加え *p*-nitrophenyl phosphate を基質として生ずる *p*-nitrophenol を o-time blank をおき日立 124 型ダブルビーム分光光度計により波長 420 mμ で測定する。酵素活性は μmole/minute/mg of protein であらわす²⁶⁾。

なお Mφ の蛋白量の測定は Folin 法²⁵⁾によつた。すなわち Lowry 試薬として 0.1 N NaOH 中に 2% Na_2CO_3 を溶解したもの 50 に対し 0.5% Sodium citrate 中に 1% に $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ を加えた溶液を 1 の割合に、用いるのぞみ調整する。Ac.-P. 測定に用いる Mφ 浮遊液 0.6 ml に Lowry 試薬 3 ml を加え 10 分後に phenol 試薬 0.3 ml を加え室温におき 30 分後に吸光度を波長 700 mμ で測定し別に作製した標準曲線より蛋白量を算出する。

3. 成 績

3-1. Mφ 内結核菌の増殖に及ぼす免疫リンパ球および PPD の影響

次の 7 条件下で Mφ 内結核菌が培養 6 日までにどのように増殖していくかをみた。

1) 免疫 Mφ (i.Mφ), 2) 正常 Mφ (ni.Mφ), 3) 正常 Mφ に免疫脾細胞添加 (ni.Mφ+i.S.), 4) 正常 Mφ に免疫脾細胞と PPD 添加 (ni.Mφ+i.S.+PPD), 5) 正常 Mφ に免疫リンパ節細胞添加 (ni.Mφ+i.L.), 6) 正常 Mφ に免疫リンパ節細胞と PPD 添加 (ni.Mφ+i.L.+PPD), 7) 正常 Mφ に正常脾細胞添加 (ni.Mφ+ni.S.)。結果を Fig. 1, 2 に示す。

Fig. 1 は i.Mφ, ni.Mφ, ni.Mφ+ni.S. の増殖比の変動である。図でみるように ni.Mφ では 2 日目に 3.3, 4 日目に 8, 6 日目には 10.2 となつた。これに対し i.Mφ 内では増殖比は 2 日目に 2, 4 日目に 6.7, 6 日目には 9.8 となつた。増殖の仕方は ni.Mφ と i.Mφ とほぼ同じであるが i.Mφ の方が増菌がやや少なかつた。また正常 Mφ に正常脾細胞を加えたときは正常 Mφ のみの場合とほぼ同じように菌は増殖した。

Fig. 2 は ni.Mφ, ni.Mφ+i.S., ni.Mφ+i.S.+PPD, ni.Mφ+i.L., ni.Mφ+i.L.+PPD における増殖比の変動を示す。正常 Mφ に免疫脾細胞を加えると 3 日目で 4.2, 6 日目で 6 で正常 Mφ のみの 1/2 近くに菌の増殖がおさえられた。これに PPD を加えると 4 日目で 3, 6 日目で 4 となり菌増殖は更に抑制された。正常 Mφ に免疫リンパ節細胞を加えた場合は 4 日に 2, 6 日に 3 となり免疫脾細胞を加えた場合より増殖阻止が強い。更に

Fig.1. Growth of Tubercle Bacilli in Macrophages

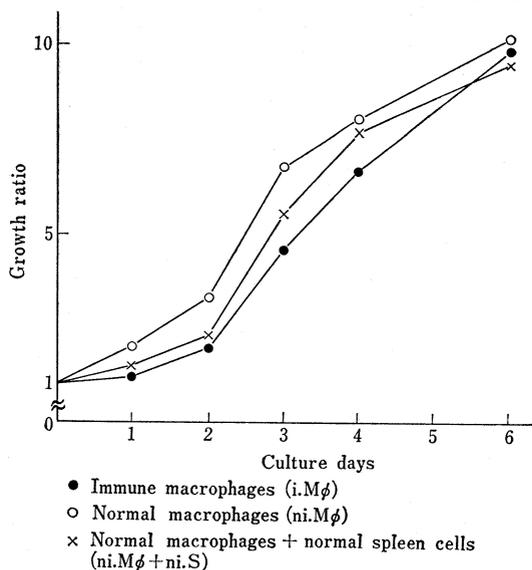
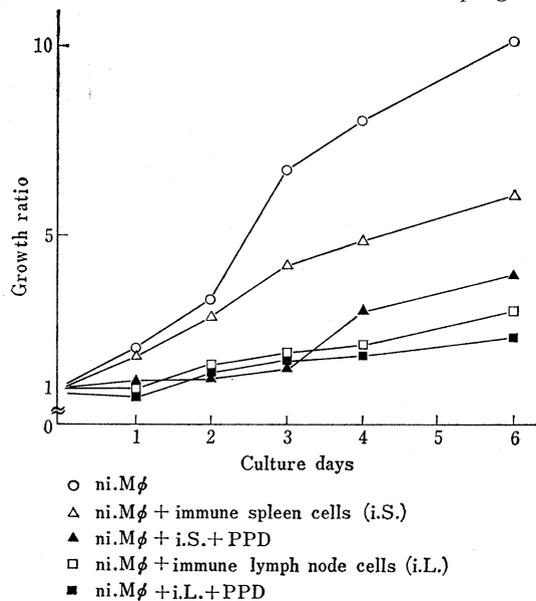


Fig.2. Effect of Immune Lymphocytes on Growth of Tubercle Bacilli in Normal Macrophages



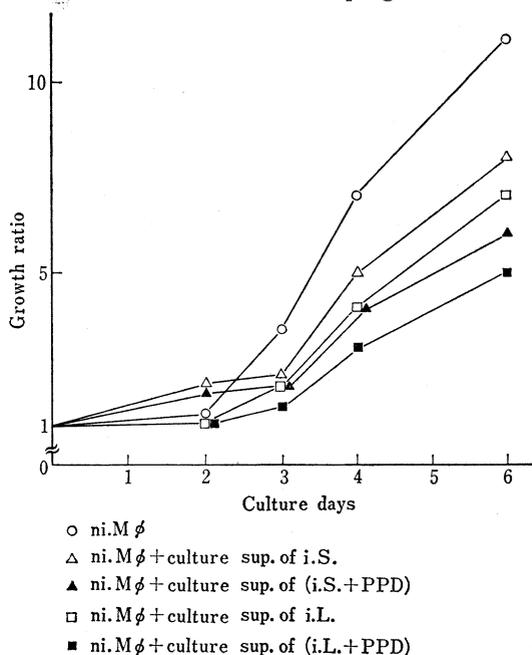
これに PPD を加えると 6 日でも増殖比は 2.3 であった。

3-2. Mφ 内結核菌の増殖に及ぼす免疫リンパ球培養上清の影響

2-1-c) の材料の項で述べた免疫リンパ節細胞培養上清または免疫脾細胞およびリンパ節細胞に PPD を添加し培養した上清を感染正常 Mφ に添加し Mφ 内菌の増殖を培養後 6 日まで観察した。

結果を Fig. 3 に示す。培養 2 日目までは各条件下の Mφ 内菌増殖の差はあまりないが 3 日目になると増殖比が ni.Mφ で 3.4、免疫リンパ節細胞培養上清を加えると

Fig.3. Effect of Culture Supernatant of Immune Lymphocytes on Growth of Tubercle Bacilli in Normal Macrophages



2、リンパ節細胞に PPD を加えて培養した上清を添加すると 1.5、免疫脾細胞培養上清添加 2.2、免疫脾細胞に PPD を加えて培養した上清を添加すると 2 となった。6 日目では以上の順序に増殖比が 11、7、5、8、6 となり、免疫リンパ球あるいはこれに PPD を加えて培養した上清を加えて培養した Mφ には菌増殖抑制作用が認められた。しかしリンパ球そのものを直接加えた場合に比べると抑制効果は弱かった。

3-3. Mφ の acid phosphatase 活性 (Ac.-P.) に及ぼす免疫リンパ球培養上清の影響

2-1-c) で述べたように BCG 免疫脾細胞またはリンパ節細胞およびこれらに PPD 50 μg/ml を加えた細胞培養上清を蛋白量 100 μg/ml に調整し、その 0.1 ml を正常 Mφ を付着させた MEM 2 ml を含むプラスチックシャーレに添加する。添加当日、および 1、2、4 日に Mφ の Ac.-P. を測定した。

表 1 に正常および免疫脾細胞およびそのそれぞれに PPD を加えた培養上清を正常 Mφ に加えたときの Ac.-P. を示す。表にみるごとく正常 Mφ (ni.Mφ) のみでも、その Ac.-P. は経時的に増加するが免疫脾細胞培養上清を加えると Ac.-P. は Mφ のみの場合より増加する。また免疫脾細胞に PPD を添加して培養した培養上清も Ac.-P. を増加させるが、PPD を添加しない培養上清の方がむしろ Ac.-P. の増加の割合は高い。また正常脾細胞培養上清を加えたときも PPD 添加の有無にかかわらず経時的に Ac.-P. は上昇するが ni.Mφ のみ

Table 1. Effect of Culture Supernatant of Spleen Cells on Acid-Phosphatase Activity of Macrophages

Culture days	0 d	1 d	2 d	4 d
ni. Mφ	60 ^a (100)	106 (177)	123 (205)	137 (228)
ni. Mφ+C.S. of i.S. (PPD-)		120 (200)	157 (262)	177 (295)
ni. Mφ+C.S. of i.S. (PPD+)		120 (200)	132 (220)	158 (263)
ni. Mφ+C.S. of ni.S.		90 (150)	110 (183)	135 (225)
ni. Mφ+C.S. of (ni.S. +PPD)		80 (133)	108 (180)	132 (220)

C.S. : Culture supernatant i.s. : Immune spleen cells
ni.Mφ : Non-immune alveolar macrophages ni.S. : Non-immune spleen cells a : Ac.-p. activity expressed as μmole *p*-nitrophenol produced/minute/mg of protein. Figures in parenthesis indicate ratio of Ac.-p. activity at indicated time to that on day 0.

Table 2. Effect of Culture Supernatant of Lymph Node Cells on Acid-Phosphatase Activity of Macrophages

Culture days	0 d	1 d	2 d	4 d
ni. Mφ	70 (100)	117 (167)	123 (176)	150 (214)
ni. Mφ+C.S. of i.L. (PPD-)		131 (187)	190 (271)	260 (371)
ni. Mφ+C.S. of i.L. (PPD+)		124 (177)	162 (231)	240 (343)

i.L. : Immune lymph node cells. See legend for Table 1.

の場合ほとんど変わらなかつた。

表2に PPD 非添加あるいは添加免疫リンパ節培養上清を加えたときの Mφ の Ac.-P. を示す。表にみるように免疫リンパ節培養上清は PPD 添加の有無にかかわらず Mφ の Ac.-P. を増加させ、かつ PPD を添加しない方がむしろ Ac.-P. の増加の割合は高く、この点、脾細胞培養上清の場合と同じ傾向であつた。

4. 考 察

本実験では *in vitro* でモルモット肺胞 Mφ に感染した結核菌はよく増殖するが、これにモルモット免疫リンパ球を加えると菌の増殖が抑制され PPD を加えるとその作用が更に強くなることを示した。また免疫リンパ球あるいはこれに PPD を加えた培養上清にもリンパ球そのものを加えたときよりは弱い Mφ 内結核菌の増殖阻止作用があることを知つた。

結核感染防御機構は細胞性免疫によることは現在、既によく知られているが、これを細胞レベルでみるなら Mφ に貪食された結核菌の増殖が抑制されるということであろう。

Mφ 内結核菌の増殖抑制の機作については緒言で述べ

たように感作リンパ球に対応抗原が特異的に作用し一種の lymphokine が放出され、これが Mφ を活性化しその結果 acid phosphatase などの lysosomal enzyme が増量し phagosome 内の菌に対し殺菌性に働くという仮説は受け入れやすい考え方であるが、本実験はこれをそのまま裏づけるような成績を示さなかつた。

結核菌の感染防御機構に Mφ と免疫リンパ球が深く関与していることは疑いないところであり^{5)8)27)~29)}、免疫リンパ球は Mφ を活性化する物質を産生し、この因子は M. I. F. rich の分画に存在するという報告³⁰⁾³¹⁾もある。また免疫リンパ球は H₃₇Ra のような弱毒生菌や PPD などの抗原で刺激されるとミコプラズマ発育阻止因子を生産し、この因子は M. I. F. とは異なっており³²⁾、Listeria などによつても非特異的に生産されるという報告もある³³⁾。このような因子が Mφ の lysosomal enzyme を増加させるか否かという点については現段階では一致した成績が得られているとはいえない。本実験でも免疫リンパ球の培養上清は Mφ の Ac.-P. を上昇させるが PPD 添加の必要はなく、また Mφ のみでも経日的に Ac.-P. は上昇した。この結果は Saito and Mitsuma の BCG 免疫マウスの脾リンパ球培養上清を加えて培養した正常マウス腹腔マクロファージについての結果とよく一致している³⁴⁾。逆に活性化因子を含むと思われるリンパ球培養上清を加えても Mφ の β-galactosidase 活性は上昇しないという報告³⁵⁾もある。*In vivo*³⁶⁾³⁷⁾では、いずれも免疫生体内の Mφ の酸性水解酵素をはじめとする lysosomal enzymes の増加を示しており *in vivo* と *in vitro* の成績が必ずしも一致しないのは lysosomal enzymes の増加が *in vivo* では、より複雑な機構の下で起こるのではないかと考えられ今後の検討に待たねばならない。

更に Mφ の抗菌性と Ac.-P. との関係を見ると本実験では抗菌力は免疫リンパ球に PPD を加えた場合、あるいはその上清を加えた場合が免疫リンパ球のみあるいはその上清を加えたときより勝っているが、Ac.-P. の上昇は免疫リンパ球に PPD を加えない方がむしろ強く認められ抗菌性と一致しない。また Mφ のみを培養しても Ac.-P. は経日的にある程度上昇するにもかかわらずその間に Mφ 内で菌は増殖する。このような *in vitro* の所見から考えると免疫リンパ球に対応抗原が作用し chemical mediator が生産され、それが Mφ の lysosomal enzymes を増加させ phagosome 内の菌に殺菌性に働くという模式にはにわかには賛成しがたいものがある。

In vivo では免疫モルモットの肺胞 Mφ に食菌された結核菌の増殖が著しく阻止されるのに本実験や他の報告⁷⁾⁸⁾²⁷⁾にみられるように *in vitro* での免疫 Mφ 内結核菌発育阻止が僅かであるのは *in vivo* では免疫リンパ球や抗原物質が Mφ 周辺に豊富であるからであろう。

抗菌免疫の本態がなんらかの形で活性 $M\phi$ の中に存在していることは十分考えられ、BCG 免疫動物の $M\phi$ の lysosomal enzymes が増加しているという報告²³⁾³⁸⁾ や lysosome 分画中に抗結核菌物質が存在するという報告³⁹⁾ などから、抗菌免疫と lysosomal enzymes はなんらかの関係をもつてはいるであろうが他にいくつかの要因も考える必要があると思われる。

5. ま と め

モルモット肺胞 $M\phi$ 内結核菌増殖と免疫リンパ球との関係を *in vitro* で観察し次の知見を得た。

(1) 正常 $M\phi$ に BCG 免疫モルモットから採取したリンパ球を加えると $M\phi$ 内結核菌の増殖は阻止され PPD の添加は阻止作用を強めた。

(2) 免疫リンパ球培養上清は正常 $M\phi$ 内結核菌の増殖を阻止したが、その効果は (1) の場合に比し弱かつた。この場合、PPD を添加した培養上清の方が阻止作用がやや強かつた。

(3) *In vitro* では免疫 $M\phi$ の $M\phi$ 内結核菌の増殖阻止は僅かであつた。この点 *in vivo* での所見と異なつた。

(4) 免疫リンパ球培養上清は正常 $M\phi$ の acid phosphatase 活性を上昇させたが PPD 添加の影響は明らかでなかつた。

謝 辞

本研究は日米医学協力研究会よりの研究費によつて行なわれ、実験遂行にあたり望月テル技師、川口八映子薬学修士の労に負う所が多かつた。記して謝意を表する。

また、その要旨は第 49 回結核病学会総会で発表した。

文 献

- 1) 下出久雄・豊原希一：結核，43：209，1968.
- 2) Lurie, M. B.: J. Exp. Med., 75：247，1942.
- 3) Suter, E.: J. Exp. Med., 97：235，1953.
- 4) Mackaness, G. B.: Am. Rev. Tuberc., 69：495，1954.
- 5) Lurie, M. B.: Resistance to Tuberculosis, Harvard University Press, 1964.
- 6) Dannerberg, A. M., Ando, M. and Shima, K.: J. Immunol., 109：1109，1972.
- 7) Patterson, R. J. and Youmans, G. P.: Infect. Immunity, 1：34，1970.
- 8) 村岡静子：福岡医学雑誌，66：414，1975.
- 9) Mackaness, G. B.: Ann. Inst. Pasteur (Paris), 120：428，1971.
- 10) Mackaness, G. B.: J. Exp. Med., 129：973，1969.
- 11) Laurence, H. S. and Landy, M. (Ed.): Mediators of Cellular Immunity, Academic Press, 1969.
- 12) Blanden, R. V., Lefford, M. J. and Mackaness, G. B.: J. Exp. Med., 129：1079，1969.
- 13) Klun, C. L. and Youmans, G. P.: J. Reticuloendothel. Soc., 13：275，1973.
- 14) Jones, J. and Youmans, G. P.: Infect. Immunity, 9：472，1974.
- 15) Middlebrook, G. H., Salmon, B. J. and Kreisberg, J. I.: Cell. Immunol., 14：270，1974.
- 16) David, J. R.: J. Exp. Med., 122：1125，1965.
- 17) Bloom, B. B. and Bennett, B.: Science, 153：80，1966.
- 18) Neiburger, R. G. and Youmans, G. P.: Infect. Immunity, 7：190，1973.
- 19) Younger, J. S. and Salvin, S. B.: J. Immunol., 111：1914，1973.
- 20) 荻原芳樹：日細菌誌，28：357，1973.
- 21) Amino N. and De Groat, L. J.: Cell. Immunol., 11：188，1974.
- 22) Cohen, S., Ward, P. A., Yoshida, T. et al.: Cell. Immunol., 9：363，1973.
- 23) Saito, K. and Suter, E.: J. Exp. Med., 121：727，1965.
- 24) Myrvik, N., Leake, E. S. and Fariss, B.: J. Immunol., 86：128，1961.
- 25) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Fari, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193：265，1951.
- 26) Dingle, J. T.: Lysosomes, a laboratory handbook, North-Holland, Amsterdam, p.112, 1972.
- 27) Muraoka, S., Takeya, K. and Nomoto, K.: Jap. J. Microb., 20：115，1976.
- 28) Turk, J. L.: Delayed Hypersensitivity, North Holland Publishing, Amsterdam, 1967.
- 29) Patterson, R. J. and Youmans, G. P.: Infect. Immunity, 1：600，1970.
- 30) Nathan, C. F., Karnovsky, M. L. and David, J. R.: J. Exp. Med., 133：1356，1971.
- 31) Nathan, C. F., Remold, H. G. and David, J. R.: J. Exp. Med., 137：275，1973.
- 32) Klun, C. L., Neiburger, R. G. and Youmans, G. P.: J. Reticuloendothelial Soc., 13：310，1973.
- 33) Klun, C. L. and Youmans, G. P.: J. Reticuloendothelial Soc., 13：263，1973.
- 34) Saito, K. and Mitsuma, T.: Proc. 1st International Cong. IAMS, 4：1，1975.
- 35) 安藤正幸・菅守隆・志摩清・津田富康：結核，50：54，1975(第 50 回結核病学会総会)。
- 36) 金井興美・近藤瑩子：結核，45：171，1970.
- 37) 安藤正幸・志摩清・徳臣晴比古：結核，50：153，1975.
- 38) Heise, E. R., Myrvik, Q. N. and Leake, E. S.: J. Immunol., 95：125，1965.
- 39) Kanai, K. and Kondo, K.: Jap. J. Med. Sci. Biol., 22：309，1969.