

原 著

## 脱脂 BCG から得られる熱水抽出物について

佐 藤 博・佐 藤 研・伊 藤 正 幸

熊 野 伸 子・本 宮 雅 吉・今 野 淳

東北大学抗酸菌病研究所内科

横 沢 厚 信

聖 隷 三 方 原 病 院 内 科

受付 昭和 55 年 7 月 21 日

## A STUDY ON A HOT-WATER EXTRACT FROM DELIPIDATED BCG

Hiroshi SATO\*, Ken SATO, Masayuki ITO, Nobuko KUMANO,  
Masakichi MOTOMIYA, Kiyoshi KONNO and Atsunobu YOKOSAWA

(Received for publication July 21, 1980)

A hot-water extract was prepared from delipidated *Mycobacterium bovis*, strain BCG. Chemical analyses revealed that this extract consisted of neutral sugars, peptides and nucleic acids which were presumably derived from the cytoplasmic fraction. When this extract was injected into guinea pigs in combination with Freund's incomplete adjuvant plus egg white albumin as antigen, an increase of antibody titer was observed and delayed hypersensitivity to egg white albumin as evidenced by positive skin and corneal reactions was induced. Thus the hot-water extract was found to be adjuvant-active. However it seems unlikely that its adjuvant activity was due to the concomitant presence of nucleic acids, since the adjuvant activity was retained even after removal of nucleic acids.

No undesirable side effects were observed in mice which had received intraperitoneal injections for 20 consecutive days of 0.25 mg of this extract.

An antitumor activity was observed when this extract was injected intraperitoneally after an intraperitoneal inoculation into mice of Sarcoma 180 cells or Ehrlich carcinoma cells. A combined effect on Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma was found when this extract was injected in combination with Mitomycin C or cyclophosphamide, respectively. Intraperitoneal injections of this extract prolonged the survival time of C3H/He mice which had received an intraperitoneal inoculation of  $5 \times 10^3$  cells of a syngeneic ascites hepatoma, MH134.

## 緒 言

Freund と McDermott<sup>1)</sup> が結核菌を鉱物油と共に water-in-oil emulsion として投与すると、同時に投与

した抗原に対して流血中の抗体の上昇とその抗原に対する遅延型過敏症を引き起こすことができると報告して以来、結核菌はアジュバントとして広く用いられるようになった。その後アジュバント活性を有する菌体成分の研

\* From the Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryochō, Sendai, Miyagi 980 Japan.

究からペプチドを含む糖脂質がこの活性を有することが明らかにされ、細胞壁およびその代謝産物と考えられる wax D がその中心であると考えられるようになった<sup>2)</sup>。1972年、1973年に有機溶媒で脱脂した *Mycobacterium* に水素添加<sup>3)</sup>、酵素処理<sup>4)</sup>、超音波処理<sup>5)</sup>後に得られる水溶性物質がアジュバント活性をもつことが相ついで報告され、このうち Hiu の報告した、水素添加後に得られる水溶性アジュバントがマウスの L1210 白血病に対して抗腫瘍性を有することが発表され、当時盛んになりつつあった抗腫瘍性による腫瘍の免疫療法という観点からも多くの注目を集めた。我々も水溶性アジュバントとして、有機溶媒で脱脂した BCG から熱水抽出によつて得られる物質を作成し、その化学的分析と生物活性および抗腫瘍性の検討を行なつてきた。その結果については昭和51年から本学会総会で報告を続け、その要旨は一部発表しているが<sup>6)~11)</sup>、今回未発表の成績もつけ加えまとめて報告したい。なお、すでに発表した文献中では熱水抽出物がアジュバント活性をもつことを強調する意味で Hot-water Soluble Adjuvant と称していたが、その後の研究によりこの物質は均一とは考えにくく、抗腫瘍性も有するので単に熱水抽出物 (Hot Water Extract) と称するのが適当と考えられる。

## 方 法

熱水抽出物(Hot Water Extract 以下 HWE と略)の作成法(図1)

Sauton 培地に4~6週間生育させた BCG 日本株を Buchner ロート上で蒸留水で洗い、アセトンで乾燥させたのち、エーテル:エタノール混液(1:1)、クロロホルムで抽出し、次にクロロホルム:メタノール混液による抽出を行なうが、メタノール含量を1:9から5:5まで順次上げ、ろ液に何も抽出されなくなるまで行なう。脱脂菌体を乾燥後、蒸留水で洗い冷水可溶画分を除き、再び蒸留水に懸濁して100℃、20分間加熱し、ろ紙を通してから残渣に蒸留水を加えて同様に加熱しろ紙を通す。集めたる液は径0.45μmのフィルターを通してから濃縮し3倍量のアセトンを加えて4℃におき、生じる沈殿を蒸留水に対して透析し、凍結乾燥を行ない HWE とした。

### 化学的分析

中性糖はフェノール硫酸法と Anthrone<sup>12)</sup>法、アミノ糖は Elson-Morgan 法の Blix の変法<sup>13)</sup>、ニンヒドリン陽性物質は Yemm-Cocking<sup>14)</sup>法、核酸は Schmidt, Thannhauser<sup>15)</sup>および Schneider<sup>16)</sup>の方法で定量した。脂質の分析は5% KOH で水解後、酸性としエーテル可溶画分をメチルエステル化し薄層クロマトグラフィーで行なつた。

ストレプトマイシン(SM)による除核酸

HWE を蒸留水にとかし1/10量の10%硫酸 SM 溶液

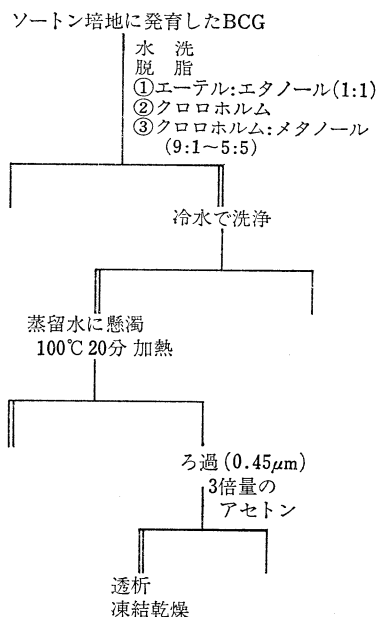


図1 脱脂 BCG 由来の熱水抽出物の作成法

を滴下し4℃で10,000×g、30分遠心し、上清を流水に対して透析してSMを除き、凍結乾燥を行なつた。定量により核酸は認められず、これをSM-HWEとした。

### 1. アジュバント活性の検討

体重250~300gのモルモットの足趾に0.1mlのフロイント不完全アジュバント(FIA)と共に2mgの卵白アルブミンと0.2mgのHWEまたはSM-HWEをwater-in-oil emulsionとして感作後21日目に皮膚反応および角膜反応<sup>17)</sup>を行ない、28日目に心臓穿刺により採取した血中の卵白アルブミンに対する抗体を定量沈降反応<sup>18)</sup>、間接赤血球凝集反応<sup>19)</sup>によつて測定した。

### 2. 内毒素に対する感受性

HWEとBCG各0.3mgをddIマウス(♂)の尾静脈に注射後14日目に *Salmonella enteritidis* から Westphal の方法<sup>20)</sup>で抽出した内毒素を尾静脈に注射して72時間以内に死亡するマウスの数を観察した。

### 3. 肝および脾重量に対する影響

健康な ddI マウスを用い、

a) 0.2mlの生理食塩水にとかした HWE 0.25 mg を連日20日間腹腔内に注射した。

b) HWE 0.25 mg および 0.5 mg を生理食塩水にとかし7日間隔で2回尾静脈から注射した。a) と b) いずれも最終注射の14日後に屠殺し肝、脾重量を測定した。

### 4. 抗腫瘍性の検討

用いたマウスは東北大学動物センターから購入した ddI と船橋実験農場から購入した ddY と  $C_3H/He$  いずれも雄であり実験開始時6週齢とした。Sarcoma 180 (S180) および Ehrlich carcinoma (EC) は ddI, ddY に、腹水肝癌 MH134<sup>21)</sup> は  $C_3H/He$  にそれぞれ腹水腫瘍として継代しておき接種直前に採取し、トリパンブルー排除試験で生細胞数を判定し生理食塩水で希釈して必要な細胞数を 0.2 ml の生理食塩水と共にすべて腹腔内に接種した。HWE および SM-HWE は 0.2 ml の生理食塩水に溶解し腹腔内に投与した。いずれの実験においても対照群には 0.2 ml の生理食塩水のみを腹腔内に注射した。有意差の判定には Student の t-test を用いた。

#### 1) 同種腫瘍に対する効果

##### a) 投与時期の検討

S180 細胞  $3 \times 10^5$  個を接種すべき ddI マウスの I 群に HWE 0.25 mg を S180 接種7日前から1日前まで連日7日間、II群には5日前から1日前までと S180 接種後1日目から5日目まで、III群には S180 接種後1日目から7日目まで連日投与を行なった。EC 細胞  $1 \times 10^5$  個を接種した ddI マウスに対しても同様の実験を行なった。

##### b) 投与期間の検討

S180 細胞  $4 \times 10^5$  個を接種した ddI マウスの I 群には HWE 0.25 mg を S180 接種後1日目から7日間、II群には14日間、III群には21日間それぞれ連日投与した。

##### c) 投与量の検討

S180 細胞  $3 \times 10^5$  個を接種した ddI マウスに HWE 0.005 mg, 0.01 mg, 0.1 mg および 0.25 mg を S180 接種後1日目から20日間投与した。次に S180 細胞  $4 \times 10^5$  個を接種したマウスに HWE 0.25 mg, 0.5 mg および 1.0 mg を同様に投与した。

##### d) SM-HWE の抗腫瘍性

S180 細胞  $3 \times 10^5$  個を ddI マウスに接種後1日目から HWE および SM-HWE 各 0.25 mg を 20日間投与した。同様の実験を S180 接種後7日目から行なった。

#### e) Mytomycin C(MMC) および cyclophosphamide (CY) と HWE の併用効果

S180 細胞  $3 \times 10^6$  個を ddY マウスに接種し I 群には MMC 0.02 mg を S180 接種後 1, 3, 5 および 7 日目に腹腔内に投与し、II群には HWE 0.25 mg を S180 接種後1日目から7日間連日投与した。III群には MMC と HWE を I, II群に投与したと同じ方法で投与した。

EC 細胞  $2 \times 10^6$  個を ddI マウスに接種後2日目に I 群には CY 2 mg を、II群には 4 mg を腹腔内に注射した。III群とIV群は CY 2 mg および 4 mg を投与した他に HWE 0.25 mg を EC 接種2日後から連日7日間投与した。

#### 2) 化学発癌に対する HWE の効果

メチルコラントレン (MCA) 0.5 mg をオクタノインにとかして背部に筋注すべき ddY マウス90匹を3群に分け、I群には MCA 注7日前から1日前まで HWE 0.25 mg を連日7日間投与しておき II群には MCA 注1日後から7日間投与を行なった。III群を対照群とした。

#### 3) 同系腫瘍に対する効果

$C_3H/He$  マウスに同系腫瘍である MH134 を接種後1日目から HWE の投与量、投与期間を変えて効果を検討した。

## 結 果

HWE は淡黄色の粉末として得られ、収量は脱脂乾燥菌体の3%であつた。中性糖は50~60%であり、ペーパークロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーによりグルコースとマンノースが主であると考えられた。アミノ糖は1~2%であり、水解条件を変えてもこの値を超えなかつた。このうち80%がグルコサミンであり、ムラミン酸は10%以下であつた。ニンヒドリン陽性物質は10~15%で、核酸は10~15%であつた。エーテル可溶画分は約10%でありミコール酸は検出されなかつた。

### 1. アジュバント活性

表1に HWE と SM-HWE のアジュバント活性をま

表1 HWE および SM-HWE のアジュバント活性

| モルモット数 | 感作に用いた物質 <sup>1)</sup> | 血清中の $\mu\text{gN/ml}$ 平均±標準偏差 <sup>2)</sup> | 間接赤血球凝集反応 平均±標準偏差 <sup>3)</sup> | 皮膚反応 陽 性 <sup>4)</sup> | 角膜反応 陽 性 <sup>5)</sup> |
|--------|------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| 5      | 生 食 水                  | 28±17                                        | 4±0                             | 0/5                    | 0/5                    |
| 5      | FIA                    | 283±157                                      | 282±140                         | 0/5                    | 0/5                    |
| 10     | FIA+HWE                | 722±208                                      | 1,024±591                       | 9/10                   | 4/10                   |
| 10     | FIA+SM-HWE             | 560±158                                      | 652±260                         | 8/10                   | 4/10                   |

1) 卵白アルブミン 2 mg を含む water-in-oil emulsion 0.1 ml を モルモットの右足蹠に感作した。

2) 定量沈降反応により測定。

3) 陽性を示す最大希釈倍数の逆数で示す。

4) 10 mm 以上の硬結を陽性とした。

5) 軽度混濁以上を陽性とした。

とめた。HWE も SM-HWE も明らかな活性を示しているが両者の間に有意の差は認められない。核酸を除いてもアジュバント活性は失われないことがわかった。

2. 内毒素に対する感受性

BCG を静脈内に投与されたマウスは細菌内毒素に対して感受性が亢進していることが知られているが<sup>22)23)</sup>、今回の実験でも ECG 0.3 mg を静注しておいたマウスは内毒素 0.015 mg により50%が死亡した。HWE を静注しておいた群では内毒素 0.2 mg 投与によつても死亡例はなく、無処置対照群の LD<sub>50</sub> が 0.3 mg だったので HWE は内毒素に対して感受性を増さないと判定した。

3. 肝および脾重量に対する影響

HWE を腹腔内に20日間投与しても2回静注しても肝、脾腫大は認められなかった。体重減少、下痢も認められず、死亡例は1例もなかった。

4. 抗腫瘍性の検討

1) 同種腫瘍に対する効果

a) 投与時期の検討

I 群では効果が認められず、前投与の効果はないと判定された。III群に延命効果が認められ HWE は S180 に対しても EC に対しても腫瘍細胞接種後に投与するのがよいと判定した。

b) 投与期間の検討

生理食塩水のみを投与したマウスは23日目までにすべて死亡したが40日目の生存マウス数はI群で25%、II群で40%、III群で50%であり、各群で注射の副作用によつて死亡する例が認められなかったので21日間連続投与がよいと判定された。

c) 投与量の検討

S180 接種後40日目の生存マウスは 0.005 mg 投与群で15%、0.01 mg 群30%、0.1 mg 群40%、0.25 mg 群は50%であつた。2回目の実験では 0.25 mg 投与群と 0.5 mg 投与群で40%、1.0 mg 群で30%であつた。1.0 mg 投与群のマウスの中には毛ば立ち体重減少を認め、腹水貯留なしに死亡する例が認められた。以上の実験から1回投与量は 0.25 mg が適当と考えられた。

d) SM-HWE の抗腫瘍性

S180 接種後1日目から投与した場合は40日目の生存数は HWE 投与群、SM-HWE 投与群とも45%であり、7日目から投与した場合は HWE 投与群で30%、SM-HWE 群で35%であつた。結核菌由来の核酸に抗腫瘍性ありとする報告<sup>24)25)</sup>があるが HWE の抗腫瘍性は核酸によるものではないと考えられた。

e) MMC および CY と HWE の併用効果

S180 接種マウスに対して MMC を用いた実験では40日目の生存数はI群で60%、II群で20%、III群で90%であつた。EC 接種マウスに対して CY を用いた実験ではI群の生存日数は 22.4±3.1日、II群 23.4±5.1日、III群 25.9±4.2日、IV群 27.3±5.2日であり、I群とII群、II群とIV群の間に有意差ありと判定された。

2) 化学発癌に対する HWE の効果

MCA 注射後すべてのマウスに90日目までに腫瘍が発現し、150日目までにはすべて死亡した。腫瘍発現までの日数は3つの群の間に差は認められなかった。生存日数はI群で123.5±7.1日であり、II群135.3±4.4日、III群で121.6±6.7日であつた。

表 2 HWE の C<sub>3</sub>H/He マウスにおける MH134 に対する効果

| 実 験 | マウス数 | 接 種 細 胞 数         | 1 回投与量(mg) | 回 数 | 平均生存日数±標準偏差  |
|-----|------|-------------------|------------|-----|--------------|
| 1   | 20   | 5×10 <sup>4</sup> | 生 食 水      | 20  | 20.47±3.02   |
|     | 20   |                   | 0.25       | 20  | 25.33±11.07* |
| 2   | 10   | 8×10 <sup>4</sup> | 生 食 水      | 14  | 19.22±3.20   |
|     | 10   |                   | 0.5        | 7   | 18.20±2.10   |
|     | 10   |                   | 0.5        | 14  | 18.66±2.30   |
| 3   | 10   | 5×10 <sup>3</sup> | 生 食 水      | 17  | 20.80±0.92   |
|     | 10   |                   | 0.05       | 17  | 23.44±4.77   |
|     | 10   |                   | 0.1        | 17  | 22.90±3.57   |
|     | 10   |                   | 0.2        | 15  | 21.10±1.79   |
|     | 10   |                   | 0.4        | 10  | 24.00±2.05*  |
| 4   | 20   | 5×10 <sup>3</sup> | 生 食 水      | 18  | 24.00±4.38   |
|     | 20   |                   | 0.2        | 18  | 30.90±7.58*  |
| 5   | 10   | 4×10 <sup>3</sup> | 生 食 水      | 17  | 20.30±2.28   |
|     | 10   |                   | 0.3        | 17  | 23.00±1.18*  |

C<sub>3</sub>H/He 各 マウスの腹腔内に MH134 細胞を接種し、24時間後から HWE を連日腹腔内に投与した。

\* p<0.05 の場合であり significant と判定された。

## 3) 同系腫瘍に対する効果

C<sub>3</sub>H/He マウスに MH134 を接種した場合の HWE 投与に関する 5 回の実験結果を表 2 にまとめた。接種細胞数が、 $8 \times 10^4$  個の場合は延命効果が認められなかったが、 $4 \sim 5 \times 10^3$  個の場合は HWE を 1 回量として 0.2 mg 以上を投与すると延命効果を認める場合があった。

## 考 察

結核菌はアジュバントとして広く用いられており、活性部位の検討、基本構造の解明について多くの研究がなされてきた。局在部位の検討からこの活性が細胞壁にあることがわかり、Lederer<sup>26)</sup> 一門による広範な脂質分析の結果からアジュバント活性はペプチドを含む糖脂質にあると考えられるようになった。この物質はミコール酸を含み、水にはとけない物質である。しかし 1972、1973 年に有機溶媒で脱脂した抗菌菌体(または細胞壁)を種々の方法で処理した後に得られる水溶性物質<sup>33-37)</sup> がアジュバント活性を有することが報告され、後に Stewart-Tull<sup>27)</sup> は人型結核菌の培養液から、熊沢<sup>28)</sup> は Hiu の方法を用いて人型結核菌からそれぞれ水溶性物質を得、アジュバント活性を認めている。以上の水溶性アジュバントのうちより詳しく研究されているのは Adam ら<sup>43)</sup> が作成した、酵素処理後に得られる物質で種々の生物活性も報告されている<sup>29)</sup>。また以上の水溶性アジュバントは細胞壁由来の物質であると考えられ、その後の研究によりアジュバント活性に必要な基本構造の最小単位は Muramyl-di-peptide (MDP) すなわち N-acetylmuramyl-l-alanyl-d-iso-glutamine であることが確認されている<sup>30)-33)</sup>。しかし我々の得た熱水抽出物は細胞壁由来というよりも細胞質由来と考えられる。すなわち従来報告されている水溶性アジュバントの化学組成と比較すると中性糖の構成成分がアラビノースとガラクトースではなくグルコースとマンノースであること、細胞壁に特有とされるジアミノピメルン酸含量が非常に低いこと、アミノ糖含量も低く、核酸が認められることなどである。結核菌と類縁のノカルディアから得られる水溶性物質のうち、細胞壁由来のペプチドグリカンを除く画分にもアジュバント活性のあることが報告されており<sup>34)</sup>、更に東<sup>35)</sup> は前述の MDP のムラミン酸部分を種々の糖で置換した物質のアジュバント活性を検討した結果、グルコースで置換しても活性を発揮すると報告している。結核菌から得られる核酸にアジュバント活性が認められるという報告<sup>36)</sup> があるが HWE をストレプトマイシン処理により除核酸をしても活性が認められたので HWE のアジュバント活性は MDP を主とする細胞壁成分によるものではないと考えられる。

抗菌菌体あるいはその菌体成分を用いての抗腫瘍性

の検討については近年数多くの報告がなされている。Mycobacterium に限ってみても BCG 生菌、死菌の他に、コードファクター<sup>37)</sup>、メタノール抽出残渣 (MER)<sup>38)39)</sup>、細胞壁画分または細胞壁骨格 (CWS)<sup>40)</sup> など実験腫瘍の成績をもとに MER、CWS についてはすでに臨床的応用もなされている<sup>41)-44)</sup>。しかし投与方法、副作用についてなお解決すべき問題が残されている。水溶性アジュバント投与により活性化されたマクロファージが *in vitro* で抗腫瘍性を発揮することは報告されているが<sup>45)</sup>、*in vivo* での効果についてはおおむね否定的である<sup>46)47)</sup>。これは水溶性物質を大量に作成して実験に用いることが困難なうえに、生菌や細胞壁画分と比べて抗腫瘍性が極めて弱いからであろう。したがって BCG 生菌、細胞壁と並行して水溶性物質を 1～2 回投与しただけの場合は無処置対照群との間に有意差なしとされてしまうようである。HWE と非常によく似た化学的組成を示す、Corynebacterium 由来のフェノール：水抽出物の水層の抗腫瘍性<sup>48)</sup> についても同様であり統計学的には有意差なしと判定されるものの投与方法、回数を変えることにより効果が認められるかも知れない成績を示している。更に免疫療法一般についても言われているように<sup>49)</sup>、接種細胞数が多い場合には免疫療法剤単独では無効のことが多く、HWE の場合も同種腫瘍の場合は  $10^7$  個以上、同系腫瘍の場合は  $10^5$  個以上接種すると効果は認められなかった。したがって水溶性物質の抗腫瘍性の検討にあたってはマウスの腹水腫瘍に対して細菌内毒素由来の水溶性部分の効果を認めた Butler と Nowotny<sup>50)</sup> の報告のように、接種細胞数を少なくする必要がある。

細胞質由来と考えられる物質の抗腫瘍性に関しては、Corynebacterium の細胞質由来の物質が弱いながら活性を有することが認められており<sup>51)</sup>、したがって細胞質由来と考えられる物質も抗腫瘍性を有すると考えてもよい。

HWE の抗腫瘍性の作用機序については S180 細胞、MH134 細胞を生理食塩水中で、種々の濃度にかした HWE と共に 37℃ で 60 分 incubate しても生細胞数の減少はなく、マウスの腹腔内に接種しても HWE 処理をしない場合と比べて生存日数に変化は認められないので、HWE は腫瘍細胞に直接的な障害を与えるものではなく生体の機能を介して抗腫瘍性を発揮するものと考えられる。

以上 BCG 由来の熱水抽出物は細胞質由来の成分が主であると考えられ、アジュバント活性をもち、マウスの腹水腫瘍に対しては同種腫瘍だけでなく同系腫瘍に対しても弱いながら抗腫瘍性を有することが認められたが、今後の問題として、分画による活性成分の検出の他、抗腫瘍性に対しては腫瘍細胞接種部位と HWE 投与経路の検討、同系腫瘍に対して化学療法剤との併用効果の有無、

作用機序の解明などが重要と考えられ、現在引き続いて実験中である。

## 文 献

- 1) Freund, J. and McDermott, K.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49 : 548, 1942.
- 2) Raffel, S. and Cal, S.: Experientia, 6 : 410, 1950.
- 3) Hiu, I. J.: Nature New Biol., 238 : 241, 1972.
- 4) Adam, A. et al.: Proc. Nat. Acad. Sci., 69 : 851, 1972.
- 5) Adam, A. et al.: Infect. Immun., 7 : 855, 1973.
- 6) Migliore-Samour, D. and Jollès, P.: FEBS Lett., 25 : 301, 1972.
- 7) Migliore-Samour, D. and Jollès, P.: FEBS Lett., 35 : 317, 1973.
- 8) Sato, H. et al.: Tohoku J. Exp. Med., 120 : 75, 1976.
- 9) Sato, H. et al.: Tohoku J. Exp. Med., 125 : 247, 1978.
- 10) Yokosawa, A.: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. C 25 : 65, 1978.
- 11) Sato, H. et al.: Tohoku J. Exp. Med., 129 : 285, 1979.
- 12) Roe, J. H.: J. Biol. Chem., 212 : 335, 1955.
- 13) Blix, G.: Acta Chem. Scand., 2 : 467, 1948.
- 14) Yemm, E. W. and Cocking, E. C.: Analyst, 80 : 209, 1955.
- 15) Schmidt, G. and Thannhauser, S. J.: J. Biol. Chem., 161 : 83, 1945.
- 16) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem., 164 : 747, 1946.
- 17) Stewart-Tull, D. E. S. and White, R. G.: Immunology, 12 : 349, 1967.
- 18) Kabat, E. A. and Mayer, M. M.: Experimental Immunochimistry, Springfield, p. 22, 1961.
- 19) Middlebrook, G. and Dubos, R.: J. Exp. Med., 88 : 521, 1948.
- 20) Westphal, V. O. et al.: Z. Naturforsch., 7b : 536, 1952.
- 21) Sato, H. et al.: J. Natl. Cancer Inst., 17 : 1, 1956.
- 22) Suter, E. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99 : 167, 1958.
- 23) Halpern, B. N. et al.: C. R. Soc. Biol., 152 : 899, 1958.
- 24) Millman, I. et al.: Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 147 : 765, 1974.
- 25) Millman, I. et al.: Infect. Immun., 14 : 929, 1976.
- 26) Lederer, E.: Pure Appl. Chem., 25 : 135, 1971.
- 27) Stewart-Tull, D. E. S. et al.: Immunology, 29 : 1, 1975.
- 28) Kumazawa, Y. et al.: Japan J. Microbiol., 20 : 183, 1976.
- 29) Chedid, L. et al.: Proc. Nat. Acad. Sci., 69 : 855, 1972.
- 30) Ellouz, F. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 59 : 1317, 1974.
- 31) Kotani, S. et al.: Z. Immunitätsforsch., 149 : 302, 1975.
- 32) Adam, A. et al.: Z. Immunitätsforsch., 149s : 341, 1975.
- 33) Azuma, I. et al.: Infect. Immun., 14 : 18, 1976.
- 34) Ciorbaru, R. et al.: Infect. Immun., 11 : 257, 1975.
- 35) 東 市郎 他: 第44回実験結核研究会総会, 1980.
- 36) Casavant, C. H. and Youmans, G. P.: J. Immunol., 114 : 1014, 1975.
- 37) Bekierkunst, A.: J. Natl. Cancer Inst., 57 : 963, 1976.
- 38) Weiss, D. W. and Wells, A. Q.: Amer. Rev. Resp. Dis., 82 : 339, 1960.
- 39) Wainberg, M. A. et al.: Brit. J. Cancer, 34 : 500, 1976.
- 40) Meyer, T. J. et al.: J. Natl. Cancer Inst., 52 : 103, 1974.
- 41) Krown, S. E. et al.: Cancer, 42 : 2648, 1978.
- 42) Blumenschein, G. R.: Cancer, 45 : 742, 1980.
- 43) Yamamura, Y. et al.: Cancer, 43 : 1314, 1979.
- 44) Yasumoto, K. et al.: Cancer Res., 39 : 3262, 1979.
- 45) Juy, D. et al.: C. R. Acad. Sci., 278 : 2859, 1974.
- 46) Mathé, G. et al.: Cancer Res., 33 : 1987, 1973.
- 47) Mathé, G. et al.: Europ. J. Cancer, 11 : 801, 1975.
- 48) Cantrell, J. L. et al.: Cancer Res., 39 : 3554, 1979.
- 49) Bast, R. C. et al.: New Engl. J. Med., 290 : 1413, 1974.
- 50) Butler, R. C. and Nowotny, A.: Cancer Immunol. Immunother., 6 : 255, 1979.
- 51) Millman, I. et al.: Cancer Res., 37 : 4150, 1977.