

原 著

結核菌培養濾液中よりの
Mycobacterial Lipase Inhibitorの分離ならびに性状

清谷克寛・田坂博信・築山文昭・松尾吉恭

広島大学医学部細菌学教室

受付 昭和58年6月11日

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MYCOBACTERIAL LIPASE INHIBITOR
FROM CULTURE FILTRATE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37Rv

Katsuhiko KIYOTANI*, Hiromichi TASAKA, Fumiaki TSUKIYAMA
and Yoshiyasu MATSUO

(Received for publication June 11, 1983)

Production of mycobacterial lipase inhibitor (MLI) in the unheated culture filtrate of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its purification and characterization were studied.

The activity of MLI against lipase prepared from guinea pig peritoneal macrophages was measured fluorimetrically. Production of MLI reached the maximum level six weeks after incubation at 37°C on a modified Sauton liquid medium. Purification of MLI was performed by successive procedures with ammonium sulfate saturation, ion-exchange chromatography and gel filtrations. Four MLIs (MLI-1,2,3 and 4) were finally isolated. The molecular weights were estimated to be 150,000, 62,000, 29,000 and 600,000, respectively, by gel filtration on a Sephacryl S-300 column. All the MLIs were resistant to heating at 100°C for 20 min in boiling water, to treatment with butanol or Streptomycin, whereas they were sensitive to proteolytic enzymes such as trypsin, pronase and protease. The results obtained from gel filtration on a Sephadex G-200 column and preliminary SDS-polyacrylamide gel disc electrophoresis strongly support the idea that some of these MLIs would be aggregates composed of similar polypeptides.

The activity of MLIs against lipase from guinea pig peritoneal macrophages was more pronounced when 4-methylumbelliferyl (4-MU)-oleate was used as a substrate than 4-MU-palmitate or 4-MU-elaidate as a substrate. MLIs acted little against lipase preparations from human peripheral blood leukocytes, guinea pig polymorphonuclear leukocytes and mouse peritoneal macrophages, and none of other lysosomal acid hydrolases such as acid phosphatase, β -glucuronidase, N-Ac- β -glucosaminidase and N-Ac- β -galactosaminidase prepared from guinea pig peritoneal macrophages.

Keywords: Mycobacterial lipase inhibitor, Lysosomal enzymes, Guinea pig peritoneal macrophages

キーワード: リパーゼ活性阻害物質, リソソーム酵素, モルモット腹腔マクロファージ

* From the Department of Bacteriology, Hiroshima University School of Medicine, Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima 734 Japan.

緒 言

結核菌に対する *in vitro* の殺菌には、その表面活性作用を介しての遊離長鎖脂肪酸の関与が古くから知られている¹⁾が、近年 Kondo ら²⁾および Kanai ら³⁾によって、*in vivo* における結核菌の殺菌にも宿主食細胞の膜構成脂質より遊離した抗菌性長鎖脂肪酸が、体液中のタンパク質による中和作用を免れて作用しうる可能性のあることが指摘され、その抗菌性長鎖脂肪酸の遊離過程における脂質分解酵素の果たす役割の重要性が示唆された。

私達は、宿主食細胞に貪食された結核菌がリソソームに含まれる種々の殺菌性物質や加水分解酵素群にさらされるにもかかわらず、食胞内で生残し、増殖する機作には結核菌と宿主食細胞のリソソーム酵素との間で、酵素作用を修飾する何らかの菌側の因子が介在するのではないかと考え、これを明らかにすることを目指してきた。

その結果、これまでにヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株の培養濾液中より、モルモット由来の β -glucuronidase 活性を non-competitive に強く阻害する β -glucuronidase inhibitor(β GI)を分離し⁶⁾精製した⁷⁾。 β GI は、モルモット腹腔マクロファージ(GP-PM ϕ s)の *Candida parapsilosis* に対する細胞内殺菌作用に抑制的に作用した⁸⁾ので、リソソーム酵素阻害物質が感染の場において菌の増殖に有利に作用しうる可能性のあることが示唆された。

そこで更に、抗菌性長鎖脂肪酸の膜構成脂質よりの遊離の過程で重要な役割を演ずると考えられる脂質分解酵素の阻害物質を検索したところ、同じく結核菌培養濾液中に、GP-PM ϕ s 由来のリパーゼに対する強い阻害作用が認められた。これは、前出の β GIとは異なる因子であるので、Mycobacterial lipase inhibitor (MLI)と名付けた⁹⁾。

今回の報告は、MLIの産生、分離および性状に関するものである。

実験材料および方法

1. 供試菌株

国立予防衛生研究所金井興美博士より分与を受けたヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株。

2. 培養濾液の調製

M. tuberculosis H37Rv 株を変法 Sauton 培地¹⁰⁾に、37°C 6週間浮上培養後、グラスフィルター(GF/B: Whatman)、必要に応じて更にメンブランフィルター(TM 4: 東洋濾紙)で濾過した。

3. 酵素活性の測定

リパーゼ活性は、4-methylumbelliferyl(4-MU)-oleate, 4-MU-palmitate および 4-MU-elaidate(いずれも Koch Light Laboratories)を基質とし、蛍光比

色改良法¹¹⁾で測定した。

また、他のリソソーム酸性加水分解酵素活性は、4-MU-phosphate, 4-MU- β -D-glucuronide, 4-MU-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside および 4-MU-2-acetamide-2-deoxy- β -D-galactopyranoside(いずれも Koch Light Laboratories)を基質とし、Mead らの方法¹²⁾に準じ、既報の方法⁹⁾で測定した。

4. 酵素阻害活性の測定

リパーゼに対する阻害作用⁹⁾および他のリソソーム酸性加水分解酵素に対する阻害作用⁶⁾の測定は、いずれも既報の方法に従った。

5. MLI の分離

培養濾液の70%硫酸飽和(SAS)画分を、0.02M Tris-HCl buffer (pH8.0)に対して透析溶解し、その100,000×g 120分超遠心上清に除核酸処理¹⁴⁾を施した。即ち、10mlの蒸留水に溶解した1バイアルの硫酸ストレプトマイシン(1g 力価: 明治製薬)を、上清液の1/10量添加、攪拌し、その遠心上清を上記 buffer で透析してストレプトマイシンを除去した。透析内液のタンパク量を約10mg/mlに調整したのち、希硫酸を加えてpH5.5とした(pH5.5処理)。これの遠心沈渣は上記 buffer で透析溶解し、上清は0.02M Acetate buffer(pH5.5)に対して透析した。それぞれのタンパク量を1~2 mg/mlに調整したのち、前者はpH8.0、後者はpH5.5のもとで、10%きざみの硫酸飽和度で更に細かく硫酸塩析を行なった。得られた各硫酸画分について、GP-PM ϕ sのリパーゼに対する活性阻害作用を測定し、阻害活性画分よりMLIの精製を試みた。

6. MLI の精製

pH5.5処理—上清の20~50% SAS画分をAcetate buffer で透析脱塩後、あらかじめ同 buffer で充分平衡化しておいたDEAE-Sephrose CL-6 B(2.5×35cm: Pharmacia Fine Chemicals)によるイオン交換クロマトグラフィーを行なった。即ち、0.1M NaCl加Acetate buffer(400~500ml)で溶出したのち、0.1~0.5M NaCl gradient(総量600ml)で溶出を行ない、5mlずつ分画した。リパーゼ阻害活性画分をプールし、Acetate buffer で透析脱塩後、Diaflo membrane PM-10(Amicon)を用い、窒素ガス圧3~4kg/cm²下で加圧限外濃縮した。これを0.5M NaCl加Acetate buffer で平衡化しておいたSephadex G-200(2.5×95cm: Pharmacia Fine Chemicals)でゲル濾過して3mlずつ分画し、阻害活性画分を同様に限外濃縮後、Sephacryl S-300(1.5×95cm: Pharmacia Fine Chemicals)で再度クロマトグラフィーを行ない、1.5mlずつ分画した。

他方、pH5.5処理—沈澱については0~20% SAS画分をTris buffer で透析脱塩後、pH8.0のもとで同様にMLIの精製を行なった。ただし、Sephadex G-200にかえてSephrose 6 B(2.5×95cm: Pharmacia

Fine Chemicals)によりゲル濾過した。

7. 分子量の測定

各 MLI の分子量は, Sephacryl S-300(1.5×95cm)によるゲル濾過法にて測定した。

標準タンパクとしては, 分子量測定用標準タンパクキット低分子量用および高分子量用(いずれも Pharmacia Fine Chemicals)を用い, チログロブリン(MW: 669,000), フェリチン(MW: 440,000), アルドラーゼ(MW: 158,000), アルブミン(MW: 67,000), オブアルブミン(MW: 43,000), キモトリプシノーゲン A(MW: 25,000)およびリボヌクレアーゼ A(MW: 13,700)の溶出パターンと比較した。

8. MLI の純度の検定

部分精製された各 MLI について, Tamura らの方法¹⁵⁾に準じて pH10.0-7%ゲルを用いて, ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法(PAGE)により純度の検定を行なった。

9. MLI の物理化学的性状

(1)加熱の影響

タンパク量を 1 mg/ml に調整した各 MLI を, 100°C の沸とう水中にて加熱処理後急冷し, それぞれの阻害活性を測定した。

(2)タンパク分解酵素処理の影響

トリプシン(Type III, Sigma), プロナーゼ E(科研化学)およびプロテアーゼ(Type VIII, Sigma)を 0.04M Tris-HCl buffer (pH8.0)に 2 mg/ml になるように溶解し, その 1 容に蒸留水に対して透析後タンパク量を 1 mg/ml に調整した各 MLI を等量加えて 37°C60分間処理した。その後, 100°C10分間加熱処理して残存する酵素活性を止めて阻害活性を測定した。

実験成績

1. MLI 産生の時間的経過

変法 Sauton 培地で 37°C 浮上培養した結核菌の培養濾液を 2 週目ごとに取り出し, 総タンパク量と MLI 産生の時間的経過を検討した。Fig. 1 に示すように, 培養濾液中の総タンパク量は, 4 週まで直線的に増加し, 以後ほぼ plateau に達したのに対して, MLI の産生はやや遅れ 4 週から急増し, 6 週目に最高に達したのち急速に低下した。比活性も, 培養 6 週目に 50% 阻害量で 0.56 μg と最も強い値を示した。

2. MLI の分離と精製(Table 1)

培養濾液中の総阻害活性の大部分は 70% SAS 画分に回収された。この画分をストレプトマイシンで除核酸処

Table 1. Purification of MLI

	Total activity (unit*×10 ³)	50% ID** (μg)	Yield (%)	
Culture filtrate	11,889	0.56	100	
70% SAS-Ppt	11,956	0.52	101	100
pH 5.5-Sup	6,302	0.48	53	100
0-20% SAS	597	0.45	10	
20-50% SAS	6,162	0.35	98	100
50-70% SAS	883	0.40	14	
DEAE-fraction	2,391	0.27	40	100
G-200 Fr. 1	48	0.85	2	
Fr. 2	335	0.44	14 (MLI-1)	
Fr. 3	909	0.21	38 (MLI-2)	
Fr. 4	287	0.28	12 (MLI-3)	
pH 5.5-Ppt	5,695	0.37	48	100
0-20% SAS	4,296	0.40	75	100
20-70% SAS	706	0.50	12	
DEAE-fraction	2,093	0.26	68	100
Sepharose-fraction	2,816	0.21	97 (MLI-4)	
70% SAS-Sup	552	1.10	5	

* One arbitrary unit denotes the dose of sample exhibiting 50% inhibition against 100 pmole/min/ml of lipase activity from GP-PMφs.

** 50% inhibition dose: μg of protein.

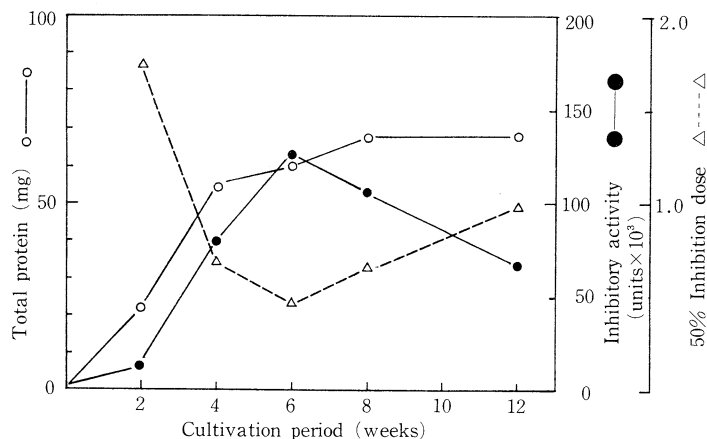


Fig. 1. Time course of production of mycobacterial lipase inhibitor (MLI) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

The culture supernatant fluid of *M. tuberculosis* strain H37Rv, cultivated on a modified Sauton medium (200ml/flask), was collected at two weeks intervals. Total protein (—○—), total activity (—●—) and 50% inhibition dose (—△—) of each culture were expressed as the value per flask.

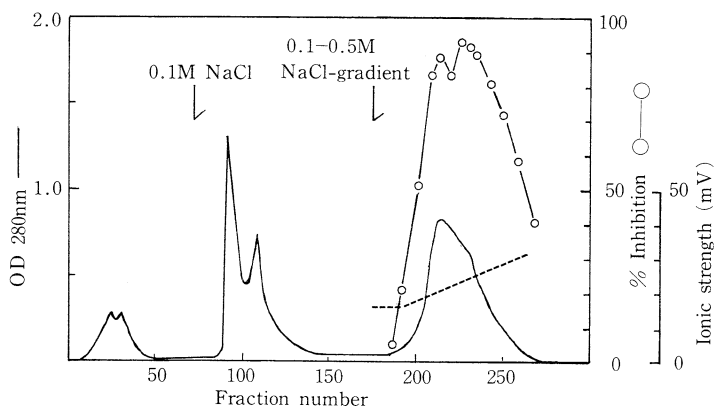


Fig. 2. Elution profile of MLI on a DEAE-Sepharose CL-6B column.

Precipitates of SAS-fractionation (20 to 50% saturation) of the supernatant of pH5.5-treatment were dialyzed against 0.02M acetate buffer (pH5.5) and applied on a DEAE-Sepharose CL-6B column (2.0×35cm). After stepwise elution was performed with the acetate buffer containing 0.1M sodium chloride, a linear gradient of 0.1 to 0.5M sodium chloride in the buffer (600ml in total) was started. Effluent fractions (5ml) were collected.

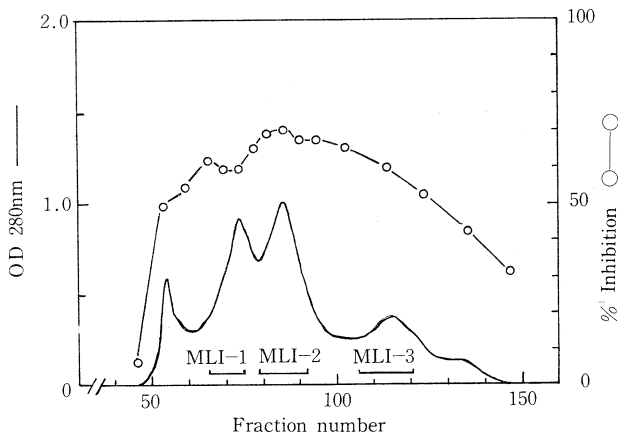


Fig. 3. Gel filtration pattern of MLI-1, 2, and 3 on a Sephadex G-200 column.

Inhibitory active fractions eluted from DEAE-Sephacryl column were gelfiltrated on Sephadex G-200 column. Elution was performed with 0.02M Tris-HCl buffer (pH8.0) containing 0.5M sodium chloride, and effluent fractions (3ml) were collected. Bars showed the pooled fractions.

理後、pH5.5処理を行なうと阻害活性は上清に53%、沈澱に48%とほぼ2分されて回収されることがわかった。そこで、その各々について更に細かく硫酸分画を試みたところ、pH5.5処理—上清画分では、0~20%飽和まではタンパク量、阻害活性とも殆んど沈澱してこないが、50%飽和ではほぼ100%が回収されるのに対して、pH5.5処理—沈澱画分のそれは、20%飽和という比較的低い硫酸飽和度でタンパク量、阻害活性の大部分が回収されることがわかった。そこで、pH5.5処理—上清では20-50% SAS画分を、同一沈澱では0-20% SAS画分をとることによって各々98%および75%の阻害活性を得ることができた。

次いで、その各々についてカラムクロマトグラフィーによる精製を試みた。pH5.5処理—上清の20-50% SAS画分のイオン交換クロマトグラフィーの結果、阻害活性はNaCl濃度およそ0.2Mにより溶出してくるOD_{280nm}の吸収ピークにはほぼ一致した2峰性のピークとして溶出された(Fig. 2)。この画分をまとめて濃縮後、Sephadex G-200でゲル濾過を行なうと、大きく4つに分けられる吸収ピーク全体にわたって阻害活性が連続して溶出された(Fig.3)ので、各ピークごとに Sephacryl S-300で rechromatographyを行なったところ、Fraction 1を除く3つのピークに阻害活性 (MLI-1, 2および3) が認められた。

一方、pH5.5処理—沈澱の0-20% SAS画分についてはイオン交換クロマトグラフィーで、およそ0.25M NaCl濃度によって溶出するピークにはほぼ一致して阻害活性

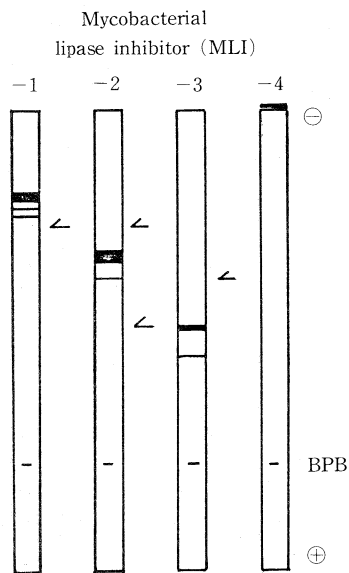


Fig. 4. Polyacrylamide gel disc electrophoresis pattern of each MLI sample on a pH10.0-7% gels.

Arrows show the elution position of common band, stained extremely faint.

の溶出が認められた。阻害活性画分を濃縮して Sepharose 6 Bによるゲル濾過を行なった結果、単一ピークとそれに一致する阻害活性が認められたので、この画

Table 2. Physicochemical Properties of MLI

	MLI-1	MLI-2	MLI-3	MLI-4
100°C 20min	R**	R	R	R
n-Butanol		R		
Streptomycin (10mg/ml)	R	R	R	R
Proteolytic enzymes				
Trypsin (1mg/ml, 37°C 60min)	S	S	S	S
Pronase E (")		S		
Protease (")		S		
Neutral sugar content*	ND	ND	ND	ND

* Determined by the phenol-H₂SO₄ method.

** Symbols—R: Resistant, S: Sensitive, ND: Not detected.

Table 3. Relative Activity of MLI

Enzymes	Sources*	Substrates	50% Inhibition dose (μg)			
			MLI-1	MLI-2	MLI-3	MLI-4
Lipase	GP-PMφs	4-MU-oleate	0.44	0.21	0.28	0.21
		-palmitate	4.2	4.1	5.5	48.0
		-elaidate	9.0	6.0	9.5	22.0
	Human PBL	10.0	10.0	26.0	56.0	
	GP-PMNs	4-MU-oleate	6.2	12.5	>50.0	3.8
	Mouse PMφs	1.1	0.8	16.0	1.9	
Acid phosphatase						
β-Glucuronidase	GP-PMφs	4-MU-substrates	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
N-Ac-β-glucosaminidase						
N-Ac-β-galactosaminidase						

* Abbreviations—GP-PMφs: Guinea pig peritoneal macrophages, GP-PMNs: Guinea pig polymorphonuclear leukocytes, PBL: Peripheral blood leukocytes.

分を更に Sephacryl S-300 で rechromatography を行ない MLI-4 とした。

各精製過程の MLI の阻害活性を Table 1 にまとめて示した。pH5.5 処理—上清では、MLI-2 が、また同一沈澱では MLI-4 がそれぞれ main な阻害活性物質と考えられるが、そのいずれも 50% 阻害量は 0.21 μg で、出発材料に比して比活性でわずか 2.7 倍の上昇にすぎなかった。

各 MLI の分子量は、MLI-1 が 150,000、MLI-2 が 62,000、MLI-3 が 29,000、MLI-4 が 600,000 と計算された。

3. MLI の純度

pH10.0-7% ゲルを用いる PAGE での各 inhibitor の泳動像を Fig. 4 に示した。MLI-1~3 にはそれぞれに major なバンドの他に、1~2 本の minor なバンドが認められており、またごくかすかにではあるが特定の inhibitor 相互間には共通のバンドの存在も認められた。

しかし、MLI-1~3 全てに共通なバンドは認められなかった。

一方、MLI-4 は分子量が大きいためか、ゲル内に入りきれず、濃縮用ゲル内にとどまる部分が認められた (Fig. 4)。ゲル濃度をうすくすると broad なバンドとしてゲル内に入るものの、3.5% ゲルを使用してもなお濃縮用ゲル内にとどまる部分があり、しかもこの部分には阻害活性が認められないことから、MLI-4 についてもなお複数のバンドの存在が疑われた。

4. MLI の物理化学的性状

MLI-1~4 はいずれも 100°C 20 分間の加熱、n-ブタノールによる抽出、ストレプトマイシンによる除核酸処理に安定であったが、タンパク分解酵素処理によっては完全に失活した。中性糖は検出されなかった (Table 2)。

5. 各種リソソーム加水分解酵素に対する MLI の阻害作用

リソソーム由来各種酵素に対する MLI の阻害活性は Table 3 に示した。

GP-PM ϕ s 由来のリパーゼに対しては、MLI-1~4 のいずれも基質として 4-MU-oleate を用いた場合に阻害作用は最も強く、また、GP-PM ϕ s 由来のリパーゼに対する阻害作用に比較して、ヒト末梢白血球、モルモット好中球およびマウス腹腔マクロファージ由来の酵素に対しては明らかにその阻害作用は弱かった。なお、GP-PM ϕ s 由来の他のリソソーム加水分解酵素に対しては全く阻害効果は認められなかった。

考 察

先に、私達は *M. tuberculosis* H37Rv 株の非加熱培養濾液中に GP-PM ϕ s のリパーゼに対する強い阻害作用が存在し、これが以前私達が同種濾液より分離・精製した β GI⁽⁷⁾ とは明らかに異なるものであること、およびこの因子 (MLI) には分子量あるいは分子量と等電点の双方に差のある複数のものが存在する可能性を報告した⁹⁾。

MLI は、結核菌培養濾液中に産生されるタンパク性因子で、培養 4 週目頃から産生量が急激に増加して 6 週目に最高に達し、以後すみやかに低下する傾向を示した (Fig. 1)。培養 4 週目以降、培養濾液中の総タンパク量の増加は殆んど認められないことから、この阻害活性の低下は培養濾液中に存在する種々の protease による MLI の失活と考えられる。

培養濾液中の MLI の大部分は、70% 飽和硫酸塩析で回収されるが、これを除硫酸後 0.02M Tris-HCl buffer (pH8.0) に対して透析してイオン交換クロマトグラフィーを行なうと、阻害活性が失活する傾向が認められる (未発表データ)。この失活は混在する protease の作用であることが予想されたので、protease の至適 pH をはずす目的で pH5.5 の Acetate buffer に対して透析したところ、析出物が生じた。この析出物および上清の双方に、同程度の阻害活性が認められたことから上清は、0.02M Acetate buffer (pH5.5) に対して、また析出物は 0.02M Tris-HCl buffer (pH8.0) に対して透析後、更に細かく硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過を行なった。その結果、分子量が 150,000, 62,000, 29,000 および 600,000 の MLI-1, 2, 3 および 4 の 4 種類の inhibitor が分離された。これらの inhibitor はいずれも耐熱性のタンパク性因子で、且つ類似の阻害活性を示すことから、その分子構成にある程度の規則性が考えられたが、pH10.0-7% ゲルを用いる PAGE ではこれを裏づける成績は得られなかった。しかし、予備的に行なった SDS-PAGE によれば、MLI-1, 2 および 3 の泳動像はいずれも 2-mercaptoethanol (2-ME) の影響を殆んどうけないこと、MLI-1 と 2 の泳動像は極めて類似していること、更には MLI-4 は 2-ME 非添加時においては通常の PAGE におけると同様ゲル内に入らないが、2-ME 添加時には MLI-

1 および 2 と極めて類似の泳動像を示すことがわかっている (未発表データ)。したがって、少なくとも MLI-1 および 2 の 2 種類は類似のポリペプチドが疎水結合を介して aggregate しており、MLI-4 はこれらの内のいずれかを subunit とする重合体であることが強く示唆される。

Kondo ら²⁾⁴⁾⁵⁾ および Kanai ら³⁾ は、*in vitro* でリソソームや食細胞の膜分画と結核菌とを混合インキュベーター系にホスホリパーゼ A₂ を添加することによって、結核菌が殺される現象をみ、この系にコレステロールエステラーゼを加えると、一層強い抗菌力の発現する現象をとらえた。更に、exogeneous なホスホリパーゼおよびコレステロールエステラーゼがなくても、培養時間を延長あるいは、菌との接触に先立って細胞分画を pre-incubate することにより、膜内在性のこれらの脂質分解酵素の作用で菌が殺されることを明らかにし、*in vivo* における食細胞の抗菌力の発現に、膜由来の脂肪酸の動態が極めて重要な役割を果していることを示した。

GP-PM ϕ s のリパーゼには、中性リパーゼと酸性リパーゼの少なくとも 2 種類があり¹³⁾、MLI の GP-PM ϕ s 由来のリパーゼに対する阻害作用は、pH4.5 以下の酸性 pH 域において著明である¹³⁾ ことから、MLI はおそらくリソソーム由来の酸性リパーゼに対してはたらいっていると思われる。私達が、4-MU-oleate を基質として測定した GP-PM ϕ s 由来のリパーゼ活性はコレステロールエステラーゼと考えられる。食細胞の抗菌力発現の重要な factor の一つである脂質分解酵素に対する強い阻害活性物質を結核菌が産生するという事実は、結核菌の細胞内増殖性を考える上での一つの方向性を示すものであろう。

結 語

ヒト型結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株の培養濾液中より、モルモット腹腔マクロファージのリパーゼ活性を強く阻害する 4 種類の耐熱性のタンパク性物質 (Mycobacterial lipase inhibitor: MLI) を分離した。

各リパーゼ活性阻害物質 (MLI-1, 2, 3 および 4) の分子量は、それぞれ 150,000, 62,000, 29,000 および 600,000 と計算されたが、いずれも類似の阻害活性ならびに物理化学的性状を有すること、更には予備的に行なった SDS-ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動の結果から、これら 4 種類の inhibitor のうちのあるものは、類似のポリペプチドの aggregate あるいはその重合体であることがうかがわれた。

一方、既に MLI のモルモット腹腔マクロファージ由来のリパーゼに対する阻害機構は non-competitive であり、その阻害作用は、pH4.5 以下の酸性 pH 域においてのみ強く認められ、しかもリソソーム由来と思われ

る酸性リパーゼに対して特に強いことが明らかになっており、これらのことと合わせて、更にこの物質の性状を明らかにすることは、結核菌の細胞内増殖性機構解明に向けての興味あるアプローチであると考えられる。

稿を終わるに臨み、リソソーム酵素活性の測定に当たって便宜をおはかり頂いた本学医学部法医学教室の小嶋亨教授ならびに同教室員各位に深謝いたします。

引用文献

- 1) Nieman, C. : Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms, *Bacteriol Rev*, 18 : 147, 1954.
- 2) Kondo, E. and Kanai, K. : Antimycobacterial activity of lecithin-cholesterol liposomes in the presence of phospholipase A2, *Japan J Med Sci Biol*, 31 : 249, 1978.
- 3) Kanai, K. and Kondo, E. : Phospholipase A2-induced antimycobacterial activity in the membrane fraction from peritoneal exudate cells of guinea pigs, *Japan J Med Sci Biol*, 33 : 87, 1980.
- 4) 近藤瑩子・金井興美 : 結核感染における宿主脂質 III. 長鎖脂肪酸と結核菌, *結核*, 56 : 109, 1981.
- 5) 近藤瑩子・金井興美 : 食細胞の脂質分解酵素と結核菌, *結核*, 57 : 1, 1982.
- 6) 清谷克寛 : 結核菌培養濾液中よりの β -glucuronidase inhibitor の分離ならびに性状について, *広大医誌*, 29 : 861, 1981.
- 7) Kiyotani, K., Tasaka, H. and Matsuo, Y. : Purification and characterization of β -glucuronidase inhibitor from *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiol Immunol*, 27 (8), 695, 1983.
- 8) Tasaka, H., Kiyotani, K. and Matsuo, Y. : Effect of β -glucuronidase inhibitor from *Mycobacterium tuberculosis* against microbicidal activity in phagocytes of guinea pigs, *Hiroshima J Med Sci*, 31 : 137, 1982.
- 9) 清谷克寛・田坂博信 : 結核菌培養濾液中よりのリパーゼ活性阻害物質の分離, *医学と生物学*, 106 : 147, 1983.
- 10) 根本久他 : ツベルクリン製造法の検討 II. Sauton 培地の再検討, *家衛試研究報告*, 53 : 14, 1966.
- 11) Kiyotani, K., Tasaka, H. and Matsuo, Y. : Measurement of lipase activity of guinea pig peritoneal macrophages with 4-methylumbelliferyl-oleate, *Hiroshima J Med Sci*, 32 : 15, 1983.
- 12) Mead, J. R., Smith, J. N. and Williams, R. T. : Studies in detoxication, 67. The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of β -glucuronidase, *Biochem J*, 61 : 569, 1955.
- 13) Kiyotani, K. et al. : Lipase activity of guinea pig peritoneal macrophages and mycobacterial lipase inhibitor, *Hiroshima J Med Sci*, 32 (3), 267, 1983.
- 14) 佐藤博他 : 脱脂 BCG から得られる熱水抽出物について, *結核*, 56 : 11, 1981.
- 15) Tamura, H. and Ui, N. : A new buffer system for disc electrophoresis suitable for slightly basic protein, *J Biochem*, 71 : 543, 1972.
- 16) Ohkuma, S. and Poole, B. : Fluorescence probe measurement of the intra lysosomal pH in living cells and perturbation of pH by various agents, *Proc Natl Acad Sci*, 75 : 3327, 1978.