Streptolysin O の血管透過性亢進作用に関する研究

第1報 Streptolysin O の精製とその血管透過性に及ぼす影響

赤 谷 勇

東京大学伝染病研究所 第3細菌研究部 (部長 山本郁夫教授)

〔受付: 9月5日・1960年〕

緒 言

炎症は生体における局所の傷害に対する基本的な反応と考えられ、Menkin¹⁾によると血管、リンパ管、組織細胞等の複雑な反応変化群からなつていゝると言はれる。

この炎症の機構を解明しようとした研究は非常に多いが、その方向としては武田²⁾が指摘しているごとく、主として二つの傾向が認められる。即ち一は形態学的立場から行はれる病理組織学的な研究、他は組織の生化学的、生理学的変化を追求³⁾して、形態学的変化と比較考察し、以てその成立機序を究めようとするものである。

凡そ血管透過性(以下血透性と略す)の変化は、血管の拡張および白血球の集積等と共に、比較的炎症初期にみられる現象であつて、この現象は病理学以外においても、内分泌学をはじめ多くの領域において、研究の対象としてとりあげられ、追求せられるようになってきた。

細菌感染には、必然的といつてよい程炎症を伴うものであつて、そのうち parasite 側の因子としては、細菌の菌体成分や毒素の作用がもつとも重要なものである。これに関し私⁴⁾は武田、藤枝等と共に *Pseudomonas fluorescens* およびチフス菌の菌体成分並びに蛇毒等を用いて実験し、上記各毒素の接種量と血透亢進作用の強さ、出現時間等の関係について報告した。

藤枝⁵⁻⁸⁾は先に化膿性炎症での、起炎菌の代表的なものの一つとしてブドウ球菌をとりあげ、その種々の産生物質の血透性に及ぼす影響について報告したが、レンサ球菌も亦代表的な起炎菌の一つなので、ここに溶連菌をとりあげ、その代表的産生物質である Streptolysin O (以下 SLO と略す) の精製を行い、本物質の血管透過性におよぶ影響について実験したのでその成績を報告する。

実験材料並びに方法

1. 菌株

菌株は溶血性レンサ球菌(A群)D-58株を用い、あらかじめ家兎血液寒天平板に分離培養し、最も溶血良好の colony を釣菌し、これを家兎血液寒天斜面に継代したものをを用いた。

2. 培地および培養

Todd-Hewitt 培地⁹⁾を用いた。培地の一部をとり前記斜面培地に培養した菌を接種し、37°C、20時間培養したものを種培養とし、大量培養にはこれを培地1 I につき約20ml 接種し、16時間培養後さらに1時間毎に4回、10% NaOH で pH を 8.0 に修正すると共に、50% ブドウ糖を培地1 I につき4 ml 加え feeding を行つた。

3. SLO の分離および精製法

I) 磷酸カルシウム・ゲル法による精製

ほゞ飛松等¹⁰⁾の方法に準じた。即ち培養液をシャープレス遠心器により 20,000 r.p.m. で遠心分離して菌体を除き、上清に硫酸を0.57飽和に加え、4°Cに48時間放置後、再度シャープレス遠心器で沈澱を集め、これを磷酸緩衝液に溶解し、流水で透析し、その透析液に更に0.37飽和になる様に硫酸を加え、沈澱を除いて上清を透析後更に次のごとく精製を進めた。即ち 1/10 容の M/2 磷酸緩衝液と、1/25 容の 1 M 酢酸カルシウム溶液とを透析液に加えて数時間氷室内に放置する。遠沈後、沈澱を 1/10 容の0.25 飽和硫酸溶液(pH 7.5)で3回溶出する。これを蒸留水中で透析し、翌日再び同様の磷酸カルシウム・ゲルの操作を繰返し、最後に3回溶出したものを蒸留水中で透析し、凍結乾燥した。

II) トリクロール 酢酸沈澱 および Zone electrophoresis による精製

AKATANI Isamu: Studies on the effects of Streptolysin O on the capillary permeability in the rabbits. 1. Purification of Streptolysin O and its effect on the capillary permeability. 3rd Bact. Dept., The Inst. f. Infect. Dis., Univ. of Tokyo. —Jap. J. of Bact. 16 (3), 199-204, 1961.

他の Lot の硫酸0.37飽和分画をトリクロール酢酸 pH 4.0 で 1 回沈澱 (B T) させ、透析後凍結乾燥したものを Zone electrophoresis で泳動させ精製すると共に、蛋白量と溶血価および血管透過性とを比較検討した。

Zone electrophoresis は Kunkel の方法¹¹⁾ に準じて行った。即ち澱粉を支持体とし、緩衝液は硼砂・第 1 磷酸ソーダ緩衝液 (pH 8.4, $\mu=0.05$) を用い、電流はすべて 2 mA/cm^2 とし、250 ~ 300 volt で約 20 時間泳動させた。泳動終了後 1 cm の間隔で澱粉層を切り、一定量の磷酸緩衝液 (溶血価測定用) で抽出し、その抽出液について Folin 反応を行い試料の泳動図を画くと共に、各抽出液について最小溶血価および血透性をしらべ、3 者の相互関係を検討した。その後、溶血価と泳動図とから 5 つに分け、透析および凍結乾燥した。

Ⅲ) イオン交換樹脂クロマトグラフィーで分離した S L O。

これは当教室の渡辺、行方¹²⁾ が CM-cellulose を用いて pH 6.4, 0.01M 磷酸緩衝液で溶出される活性の高い分画を集めたものである。

4. 溶血価の測定

S L O の溶血価の測定には、現在まで種々な方法¹³⁻¹⁶⁾ が行はれている。代表的なものとしては Rantz¹⁴⁾ の、標準血清に対して結合単位を測定する方法があり、私も主としてこの Rantz 法に準じたが、溶血価のみを求める際には標準血清をのぞいて測定した。但し原法は家兎血球を用いているが、あらかじめ家兎血球とヒツジ血球とを比較した結果、ヒツジ赤血球の方が僅かに弱いが大差のない成績を得たので、ヒツジ赤血球を用いた。

まず被検物質を pH 6.5 の磷酸緩衝液で倍数稀釈し、それぞれの 0.1 ~ 0.35ml 迄の 6 本の系列をつくり、M/25 塩酸システインを加え、各管とも 0.5ml 宛にし、これを 10 分間室温に放置して活性化後、各管に対し標準血清または磷酸緩衝液 1 ml を加えて、37°C の恒温槽中に 15 分放置後、5% の血球液を 0.5ml 宛各管に加えてのち、時々よく振盪混和する。更に 30 分後、遠沈を行いこの各管を上清の溶血程度で判定し、完全溶血を示す最少の γ 数で示した。

その他簡単に力価を知る場合には、被検物質を緩衝液で倍数稀釈し、その 0.5ml に M/25 塩酸システイン 0.5ml を加え、室温に 10 分間放置して活性化のち、更に 5% 血球液 0.5ml を加えて、37°C、30 分後に判定した。

5. 化学的性状

S L O の精製分画について、蛋白は Folin 変法¹⁷⁾、

は Carbazole 反応¹⁸⁾、核酸は Dische の Diphenylamine 反応¹⁹⁾ を用いて測定した。N 量は Dumas 法によった。

6. 血管透過性

藤枝と同様に Menkin の家兎を用いる方法²⁰⁾ により実験した。まず血管透過性の時間推移をみるため、背中の毛を刈った家兎 (体重約 2 kg, 雄) に屠殺前 24, 12, 4, 2, 1 時間, 30 分, 10 分および直前等の各時間に被検物質 0.2ml を皮内に注射する。

そしてトリパンブルー 1% 溶液を屠殺前、1 時間に 4 ml/kg の割合で静注する。亦注射の 60 分前から温度条件を一定にする為、家兎を 37°C のフラン器中に入れておく。次に空気栓塞で家兎を致死せしめ、背皮を丁寧に剥いて上記色素の、注射局所への集積状態を内側から肉眼的に観察した。

反応の強弱は次のごとく分類した。即ち色素沈着の認めにくいもの (一)、色素沈着が針頭大のもの (±)、淡い色素沈着で周囲の健康皮膚にボカした様に移行するもの (+)、色素沈着がやや濃くて、その境界部が少しく判然とするもの (++)、更に色素沈着が濃くその境界も非常に判然としたものを (+++) とする。

実験成績

1. 磷酸カルシウム・ゲルによる精製および精製分画による血管透過性亢進の時間的推移
磷酸カルシウム・ゲルにより精製した S L O の収量と溶血価は第 1 表のごとくであり、最終段階の精製 S L O (A_1) は、培養濾液と比較して収量は約 $1/100$ であり、亦溶血価は 40 倍であつた。しかしこのものは、電気泳動的にみて未だ均一なものではない。

この A_1 を用いて、血管透過性亢進作用 (以下血透亢と略す) を量的および時間的に追究した。その成績は第 2 表に示したが、その最小血透亢値は 0.2 γ であり、注射後 1 時間で血透亢がみとめられ、2 時間でほぼ最高になり、4 時間以後は血透亢は認められなくなってくる。

以上の成績から S L O は血透亢作用がつよく、またその時間的推移は、注射量の多少にかかわらずほぼ一定であることが判つた。

2. Zone electrophoresis による精製および溶血価と血透亢の関係

磷酸カルシウム・ゲルで精製したものが、電気泳動的にみて均一でなかつたため、あらたに培養した Lot B の硫酸 0.37 飽和分画を、トリクロール酢酸で分画した B T を用い Zone electrophoresis により泳動後、各 1

第1表 SLO の磷酸カルシウム・ゲルによる精製

精製法 (Lot A)

註, () 内溶血価

cm のブロックを 3 ml の生理的食塩水で溶出し, その溶出液について蛋白の分布状態をしらべ, さらに溶血価および血管透過性を検査して相関関係をみた。

その結果は第1図に示すごとく, BT は主として3つの峰から成っており, 一は原点より陰極側に, 他の二つ

第1図 SLO (BT) の Zone electrophoresis

は陽極側にくる。更に蛋白の分布と溶血域およびその強さを比較すると, 陽極側に移動した二つの山にはほとんど溶血性が認められず, その最もつよい所は陰極側の山にくるが完全には一致せず, それよりも陽極側の, 蛋白のむしろ少ない所にも溶血域が存在している。

亦これらの溶血を示したブロックの抽出液について, Folin 値を一定にして溶血価をしらべたところ, 各プロ

ック共ほとんど同一の値を示した。次にブロックの抽出液につき, Folin 値を基準にして 2 γ の量で血透孔を調べてみると, 大体溶血価と血透孔の分布とは同じ位置に来ており, SLO が透過性に関与していることを示すものである。

第2表 血管透過性亢進の時間的推移

(A₄)

注射量	家兎 番号	体重 (kg)	時間 的 推 移							
			分 1	10	30	時間 1	2	4	24	48
5 γ	14	2.4	—	—	—	+	+	+	—	—
	16	2.3	—	—	±	+	+	+	—	—
	18	2.5	—	—	—	+	+	+	—	—
2 γ	10	2.5	—	—	—	+	+	—	—	—
	15	2.3	—	—	±	+	+	+	—	—
	17	2.7	—	—	—	+	+	+	—	—
0.2 γ	10	2.5	—	—	—	+	+	—	—	—
	15	2.3	—	—	—	+	+	—	—	—
	17	2.7	—	—	—	+	+	—	—	—
0.02 γ	10	2.5	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	2.3	—	—	—	—	—	—	—	—
	17	2.7	—	—	—	—	—	—	—	—
0.002 γ	14	2.4	—	—	—	—	—	—	—	—
	16	2.3	—	—	—	—	—	—	—	—
	18	2.5	—	—	—	—	—	—	—	—

次に溶血域と蛋白の分布状態から第1図に示したごとくに分け, No. 2 および No. 3 の大部分はトリクロール酢酸で沈澱させ, スピンコ 15,000 r.p.m. 30分遠心し, 沈澱を泳動用緩衝液に対して透析し再泳動に用いた。その他および No. 2 と No. 3 の一部は透析し, 凍結乾燥し収量, 化学的性状, 溶血価および血透孔値を測定した。

その成績は第3表の如く, 溶血価は BT₂ および BT₃ が 15γであり, もとの BT よりやや強くなっているにすぎず, 収量よりみて相当多量の不活性蛋白を除去したにかかわらず, 溶血価は大して強くなっていない。これは電気泳動, 透析および凍結乾燥の過程で溶血力が著しく減少するためである。特に留水に対する透析が最も力価を低下させる原因である。血透孔値では溶血価とほぼ平行して強くなっている。

また化学分析では No. 2 および No. 3 は N 量低く, 多糖体が相当量混入している。これは BT 中には多糖体が残存しており, このものは泳動により陰極側に移動し活

第3表 Zone 分画及び A₄ の化学的性状
溶血価及び血透充進

分直		収量 mg	Folin 量 %	N %	糖 %	DNA %	最小溶血価 mγl	血透充進 γ/2ml
B T			66.5	11.3	20.7	< 1.0	20	0.2 (＋)
ゾ ーン 分 画	BT ₁	9		5.8			500	2 (±)
	BT ₂	33	38.5	5.57	18.8	< 1.0	15	0.1 (＋)
	BT ₃	18	24.5	4.62	28.4	< 1.0	15	0.1 (＋)
	BT ₄	36	62.0	10.61	2.3	< 1.0	100	2 (＋)
	BT ₅	39	72.0	12.3	1.0	1.6	> 550	2 (－)
BT ₂ の TCA 沈澱			77.5	13.34	5.7	1.0	10	0.1 (＋)
A ₄			90.0	15.37	2.1	< 1.0	10	< 0.2 (＋)

性のある蛋白と分離しなかったためである。No. 2 のトリクロール酢酸沈澱で得た分画のN量は13.34 %で、大部分の多糖体がのぞかれており溶血も血透充値も強くなっている。

No. 2 および No. 3 の再泳動図は、第2図および第3図に示した。両者とも第1図からみて完全に分離した所を分画したものではないため、均一なものではなく、No. 2 では2つの山、No. 3 では3つの山からなっており、溶血域は No. 2 では相当ひろがって活性の部分が2つのように見えるが、No. 3 では中央の所に来ており、SLOはこの部分に来ると考えられ、第1図および第2図でもつとも陰極側に分布する山の活性はSLOが他の成分に引ばられて来たものか、または complex を形成しているのではないかと考えられる。

3. イオン交換樹脂クロマイグラフィーで分離精製したSLOの溶血価と血透性

第2図 BT₂ の再泳動図

この場合には溶出した液体のままを用い、Folin 量を原材料と一致させて、溶血価および血透充値を測定したのであるが、その成績は第4表に示すごとく溶血価で2

第3図 BT₃ の再泳動図

第4表 イオン交換樹脂クロマトグラフィーによる
分画の血透充進

	溶 血 価 7/ml (Folin 量)	血 透 充 値			
		2	0.2	0.1	0.05
イオン 分 画	19	卅 卅	卅 卅	卅 卅	卅 卅
B ₂	20	卅 卅	+	+	+

倍強く、また透過性でも明らかに増強していた。

総括及び考按

今迄に報告せられた血透性に関する研究の概略を述べると、その実験方法には種々な方法²⁰⁻²⁶⁾が挙げられるがこの中代表的なものとして Menkin²⁰⁾ や Rigdon²⁶⁾等によつて、家兎に Azo- 色素液を注入して局所の青染を時間的に追求する方法が行はれた。

即ち家兎を用いると、比較的多数の部位に毒素を注射することが出来、また病理組織の検索その他種々な検査が併用できる点から、現在最も有力な検索方法と考えら

れている。この場合血透亢因子としては, Lewis²⁷⁾ によるヒスタミン様物質とする説, Menkin²⁸⁾ の leucotaxine や exudin によるとするもの並びに, Rowley 等²⁹⁾ の 5-hydroxy tryptamine 説等があり, 議論を生じている。

即ち Menkin³⁰⁾ は glycopeptide である leucotaxine を, 唯一の血透亢因子として指摘し, 0.55mg のヒスタミン溶液を家兎の皮内に注射しても, 組織の青染が起らないと言う点を主な理由として, ヒスタミン説に反して居り, 一方 Duthie & Chaine³¹⁾ は, leucotaxine 即ち glycopeptide とはいえないであろうとの意見で, その血透亢因子を否定している。

亦 Otto & Planet³²⁾ も, シュワルツマン反応時の血透亢因子の検索から, leucotaxine 説をむしろ否定した。田坂等は組織に何か傷害が加えられると, 直ちに組織細胞内のヒスタミン様物質が遊離される点から, ヒスタミンが炎症初期の血管反応に関与することは確実であるとし, 更に犬の滲出液から抽出した leucotaxine にも血透亢作用を認めるが, このヒスタミンと leucotaxine の間には夫々異つた生物学的作用があるのではないかと報じ Mayer³³⁾ や Williams³⁴⁾ 等もこれとほぼ同様の見解を述べている。

次に細菌の毒素亦是菌体成分を用いて, 血透亢を追求する実験は, Menkin^{1, 20, 28, 30)}, Rigdon²⁶⁾, 林²⁴⁾, 宮入³⁵⁾, 安平²⁵⁾, 田坂^{3, 36)}, 荒木³⁶⁾, 武田^{4, 5)}並びに藤枝⁴⁻⁶⁾ 等による多数の報告がある。この場合に使用する毒素は化学的にみて, 成る可く純粋に近い状態の物質を用いるのが理想的であるが, これは非常に困難である。就中溶連菌の産生物質の種類は今迄多数挙げられており, 始め Todd 等³⁷⁾ により hemolysin O および S, erythrogenic toxin, hyaluronidase 並びに leucocidin 等が指摘されたが, その後更に研究が進むにつれて, 上記の他 α -hemolysin, streptokinase, streptodornase, ribonuclease, hyaluronic acid 並びに proteinase 等の各物質³⁸⁾ が溶連菌から産生されることが明らかになった。

この中 S L O に関しては, Todd 等により其の性状が詳しく研究されたが, 彼³⁷⁾ は Denys & Van de Velde (1895) により命名せられた leucocidine と, S L O とがほぼ同一の物質であり, 一種の酵素的なものであらうと考えた。更に Cantoni 等³⁹⁾ により此の S L O 中には, 溶血毒の他に何か別の酵素が存在するという見解が述べられ, その後 Carlson⁴⁰⁻⁴¹⁾ 等は, S L O の分画から DPNase (streptococcal diphosphopyridine nucleotidase) を分離精製するに至つた。我が国においても Carlson 等の報告と同じ頃に早野, 飛松等^{10, 42-44)} は, 先ず S L O 産生菌

の Cytochrome 系呼吸酵素と, S L O との関係を追求して D B S (DPN-binding substance) なる物質を得ることに成功し, 就中飛松等は DPNase とこの D B S とを同一視しているが, 両物質共既述の leucocidine に相当するものである事が今日明らかとされたのは意義深い。

私は先ず S L O の血透亢に関与していることを明らかにする為, 飛松等の方法に従い, D-58株から磷酸カルシウム・ゲルで S L O の分離精製を試みたが, このものは電気泳動的にみて均一なものではなく, 溶血を示さない蛋白を含んでいる。

先に述べたごとく溶連菌産生物質には種々なものがあるため, 培養濾液や部分精製の S L O 中には, S L O 以外にもなお多くの活性物質が含まれている事は当然であり, このことからみて, 透過性に関与している因子が S L O であるとする事は危険である。従つてまず S L O の精製を種々検討したのであるが, 物理化学的に均一な物質を得ることは出来なかつた。また精製かすむにつれて容易に活性を失う傾向があるため, Zone electrophoresis により S L O の泳動の pattern を検討し, 溶血域と血管透過性亢進との相関関係をしらべた。

その結果, 溶血域と透過性亢進域とはほぼ一致する成績が得られ, このことから S L O が血透亢の主要因子となつていであろう事は先ず間違いがないと考えられる。

このことはイオン交換樹脂クロマトグラフィーによつても確認された。たゞ Carlson⁴⁰⁻⁴¹⁾ 等は paper electrophoresis で S L O から DPNase を分離しており, この DPNase は S L O と比較的近似の移動度を示し, S L O より陰極側に分布することを報告している。

私の行つた Zone electrophoresis で溶血域よりも血透亢域がとくに陰極側に広いことを考えると, 陰極側の血透亢は DPNase が関係しているかも知れぬが, これに関しては今後の検討にまたねばならない。

この実験で得られた種々の S L O の製品中, その最も強いものは最小血透亢値は 0.05~0.02 γ であり, また血透亢発現上の maximum は 2 時間である。この発現の maximum が 2 時間であることは, 先に藤枝⁵⁻⁶⁾ が報告したブドウ球菌 α -toxin の成績とほぼ一致する。そしてこの事は既に私共が報告した蛇毒やキシロール等による血透亢とは可なり相異しており, 恐らく上記各物質との生物学的活性の差によるものと考えられる。

亦藤枝⁶⁻⁷⁾ が実験上, 使用液の pH や濃度関係等の諸条件が変わると, 生体局所は微妙に反応を示すことから, 血透亢の判定に際しては極力, 非特異的な要因の働くの

を避ける可きであると主張している事は、併せて重視される。

従つて今後共なおこれ等の諸点に充分注意を払い、更に他の適当な方法でもつと純粋なSLOが得られれば、更に明確な結果が得られると思う。

結 論

溶連菌産生物質中の代表的な物質であるSLOの血管透過性におよぼす影響を検討する目的で、燐酸カルシウム・ゲル法、Zone electrophoresisによる分離およびイオン交換樹脂、クロマトグラフィーを用い、SLOの分離精製を行い、各分画について溶血価と血管透過性亢進との相関関係を観察し、次の結論を得た。

1. SLOの血透亢の時間的推移はほぼ一定しており最高は2時間である。
2. 得られたSLOの製品中、最も強い血透亢値は0.05γであり、その強さはほぼ溶血価と平行する。
3. Zone electrophoresisで分析した結果、溶血域と血透亢域とはほぼ同じ所に分布して居り、亦CM-celluloseのクロマトグラフィーで分離したSLOについても同様の結果が得られ、SLOは血管透過性亢進の主要因子と考えられる。

擧筆するにあたり、御指導を賜つた恩師武田徳晴教授並びに、山本郁夫教授の御校閲に深謝すると共に、実験上種々の便宜と御助言とを下さつた渡辺貞、青木良雄両博士並びに、研究室の諸先生に感謝いたします。

なお本研究は、文部省科学研究費（炎症の発生機構研究班）の援助をうけたのでここに感謝を表します。

文 献

- 1) Menkin, V.: Newer Concepts of Inflammation. 1950, Charles Thomas 刊.
- 2) 武田：医学のあゆみ、別集I、新しい内分泌学、I; 135, 昭29.
- 3) 田坂・荒木：最新医学、13, 137, 昭33.
- 4) 武田・藤枝・赤谷：東京医事新誌、73, 285, 昭31.
- 5) 武田・藤枝：最新医学、13, 120, 昭33.
- 6) 藤枝：日本細菌学雑誌、13, 488, 昭33.
- 7) 藤枝：日本細菌学雑誌、13, 721, 昭33.
- 8) 藤枝：日本細菌学雑誌、13, 1042, 昭33.
- 9) Todd, E. & Hewitt, L.: J. Path. & Bact., 35, 973, 1932.
- 10) 早野・飛松他：日本細菌学雑誌、11, 1021, 昭31
- 11) Kunkel, H.: Methods of Biochemical Analysis., 1, 141, 1954.
- 12) 渡辺・行方：未発表
- 13) Harbert, D. & Todd, E.: Bioch. J., 35, 1124 1941.
- 14) Rantz, L. & Randall, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 59, 22, 1945.
- 15) 草間・他：日本細菌学会31回総会演説要旨, p. 42 (No. 27), 昭33.
- 16) Hodge, B. & Swift, H.: J. Exp. Med., 58, 277, 1933.
- 17) Lowry, O. H. et al.: J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
- 18) Seibert, F.: J. Biol. Chem., 133, 593, 1940.
- 19) Dische, Z.: J. Biol. Chem., 167, 189, 1947.
- 20) Menkin, V.: J. Exp. Med., 64, 485, 1936.
- 21) 西丸・浅井：日本医事新報, No. 576, 昭11.
- 22) 木内：成医会誌, 55, 569, 昭11.
- 23) 天野：血液学討議会報告, 永井書店, 昭26.
- 24) 林・他：Mie Med. Journ. 4, 111, 1955.
- 25) 安平・他：血液討議会報告, 3, 160, 1950.
- 26) Rigdon, R.: Arch. Surg., 44, 129, 1944.
- 27) Lewis, T.: Heart., 11, 2091, 1924.
- 28) Menkin, V.: J. Exp. Med., 67, 129, 1938.
- 29) Rowley, D. & Benditt, E.: J. Exp. Med., 102, 389, 1956.
- 30) Menkin, V.: Dynamics of Inflamm., p.27-33 N. Y. Macmillan, 1940.
- 31) Duthie & Chain: Brit. J. Exp. Path., 20, 417, 1939.
- 32) Otto, B. & Planet, N.: Compt. rend. Soc. de Biol., 129, 68, 1938.
- 33) Mayer, R. & Kull, F.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 66, 392, 1947.
- 34) Williams, H.: Proc. of Staff Meeting of Mayo Clinic., 24, 516, 1949.
- 35) 宮入：日本外科学誌, 51, 685, 昭26.
- 36) 田坂・荒木：日本臨床, 15, 昭32.
- 37) Todd, E.: Brit. J. Exp. Path., 23, 136, 1942
- 38) Dubos, R.: Bacterial and Mycotic Infections of Man. p. 237, 1952.
- 39) Cantoni, G. & Bernheimer, A.: J. Exp. Med., 86, 193, 1947.
- 40) Carlson, A., Kellner, A. & Bernheimer, A.: J. Exp. Med., 104, 577, 1956.
- 41) Carlson, A. & Freeman, E. et al.: J. Exp. Med., 106, 15, 1957.
- 42) 飛松：日本細菌学雑誌, 12, 57, 昭32.
- 43) 飛松：日本細菌学雑誌, 12, 64, 昭32.
- 44) 飛松：日本細菌学雑誌, 12, 693, 昭32.