土壤菌酵素のジフテリア毒素に対する作用

黒 須 正 夫

傳染病研究所第一研究部 (部長 細谷省吾教授)

[受付: 12 月 5 日, 1951 年]

I. 緒 言

近年抗生物質の進歩により微生物を原因とする疾病の治療法は革命的に進歩したがジフテリア及び破傷風の如き特異的菌体外毒素を原因とする疾病は所謂血清療法即ち抗毒素療法以外の治療の途はない。然るに Dubos¹⁾ は一種の土壤菌の生産する酵素により肺炎双球菌による実験的肺炎の治療に成功した。是に鑑み細谷研究室に於てはジフテリアの酵素療法を目標とした予備実験として細谷, 添田, 今村等^{2,3)} の研究業績が既に発表されているが著者は野々部^{4,5)} の業績を継承して下記の知見を得た。

II. 実 験

A) ジフテリア毒素を分解する土壤菌に関する実験

実験 1. 土壤菌に依るジフテリア毒素の分解

東京都内 20 箇所より土壤を採取し之を滅菌食塩水に混和し其の稀釈液を寒天平板培地に 37°C 24 時間培養し分離せるコロニーの中からグラム染色陽性にして芽胞を形成し馬血清平板を溶解して陥凹を作るもの 30 菌株を目的菌として寒天斜面培地に保存した。之等の 30 菌株を各々 240 Lf のジフテリア毒素液 (以下ジ毒と略記) 培地に 37°C 48 時間培養した。この際培地の表面積液容量比を一定 (0.8 cm²/cc) にした。培養培地の遠心沈澱上清につきフロキュレーションを測定した結果は第 1 表の通り供試菌に依り培養培地の Lf に著しい差異が認められた。ジ毒培地の製法はジフテリア粗毒素 (Young⁶⁾ 変法培地) を細谷法⁷⁾ に依り濃縮し 100~200 Lf の濃縮液を作り加圧透析せずに之を-1°C に冷却して析出せる Na₂HPO₄ の結晶を除去する。次に醋酸にて pH 7.0 に修正して Seitz, E. K. 濾過をなし滅菌小試験管に 3 cc 宛分注保存した。ジ毒培地に於ける肉眼的培養所見は多くのものは菌膜を形成し中間層は比較的透明で少量の沈澱を生ずる。培地の pH は 7.4~8.2 のアルカリ性に変ずる。以下の実験に供したジ毒は前記細谷法に依る濃縮ジ毒でありその分解作用の判定はフロキュレーションの測定値に依つた。

実験 2. ジ毒培地に於ける継代培養

土壤菌 No. 5, 6, 18, 24, 38, 43 (第 1 表参照) の 6 株を各々 240 Lf のジ毒培地に 37°C 48 時間培養し菌膜を更にジ毒培地に継代して 10 代以上継代培養を行いジ毒分解作用の変化を驗した。即ち同一菌の継代株と非継代株をジ毒培地に培地表面積液容量比を一定にして 37°C 48 時間培養した各培養培地の遠心沈澱上清のフロキュレーションの値を比較した。但し No. 18 菌の場合は継代株並びに非継代株の孰れも培養 48 時間後に Lf=0 となるので其等の培養培地の遠心沈澱上清 (Seitz, E. K. 濾過) に各々倍量の 240 Lf のジ毒を加え 36°C 24 時間後 (マーズニン添加) フロキュレーションを測定した。No. 5, 18, 43 の 3 菌株に於ては継代株の場合にジ毒が強く分解され No. 5 菌では 180 Lf と 60 Lf, No. 18 菌では 40 Lf と 20 Lf, No. 43 菌では 80 Lf 20 Lf との差異が継代株と非継代株の間に認められた。反之 No. 6, 24, 38 菌の場合には継代株と非継代株の差異を認めなかつた。何れの場合も肉眼的培養所見並びに培地の終末 pH は継代により変化を認めない。

実験 3. 菌体外酵素の產生

上記土壤菌に依るジ毒の分解は生菌自体に依るものか培養培地に產生せられた酵素に依るものであるかを驗する爲、土壤菌 No. 5, 12, 18 の 3 菌株をジ毒培地に 37°C 72 時間培養し培養培地の Seitz, E. K. 濾液と菌体を 2 回食塩水にて洗滌し培養培地と等量の食塩水に浮遊せしめた菌浮遊液を作り両者のジ毒分解作用を比較した。即ち Seitz, E. K. 濾液並びに菌浮遊液に各等量の 220 Lf のジ毒を加え pH 8.2 に於て混和後 37°C に 3 時間保ち其等混和液の Lf を測定した。その結果は 3 菌株共に菌浮遊液にはジ毒分解作用を欠除し 110 Lf の値を得たが培養培地の Seitz, E. K. 濾液の場合は No. 5 及び No. 12 菌では 80 Lf に No. 18 菌では 60 Lf にジ毒が分解されることを認めた。尙お菌浮遊液を pH 8.2 に於て 37°C

KUROSU, Masao: Studies on the decomposition of diphtheria toxin by soil bacteria.
Institute for Infectious Diseases, Tokyo University.
— Jap. J. of Bact., 7(4): 323-328, 1952.

第1表 土壤菌によるジフテリア毒素分解作用

ジフテリア毒素培地(240 Lf)に 37°C 48 時間培養

菌 株	培養終 末 pH	菌膜 形成	培養培地の Flocculation	
No. 4	7.8	+	20 Lf	Kf=30'
No. 5	8.2	+	180 Lf	Kf=10'
No. 6	8.2	+	160 Lf	Kf=10'
No. 12	7.8	+	20 Lf	Kf=50'
No. 16	8.0	+	30 Lf	Kf=40'
No. 18	8.2	+	Lf=0	
No. 19	7.4	—	60 Lf	Kf=15'
No. 20	8.0	—	90 Lf	Kf=10'
No. 23	7.2	—	100 Lf	Kf=10'
No. 24	7.4	+	220 Lf	Kf=10'
No. 25	7.4	—	160 Lf	Kf=12'
No. 27	8.2	—	180 Lf	Kf=15'
No. 29	8.2	+	Lf=0	
No. 31	7.4	—	180 Kf	Lf=10'
No. 32	7.6	—	120 Lf	Kf=10'
No. 34	8.0	+	100 Lf	Kf=20'
No. 35	6.6	+	90 Lf	Kf=40'
No. 36	8.0	+	Lf=0	
No. 37	7.4	—	110 Lf	Kf=10'
No. 38	8.0	—	90 Lf	Kf=30'
No. 39	6.8	—	80 Lf	Kf=20'
No. 41	7.8	+	60 Lf	Kf=20'
No. 42	7.6	—	100 Lf	Kf=10'
No. 43	7.8	—	60 Lf	Kf=30'
No. 44	7.6	+	80 Lf	Kf=20'
No. 45	7.8	—	20 Lf	Kf=80'
No. 46	8.2	—	20 Lf	Kf=80'
No. 47	7.8	+	20 Lf	Kf=40'
No. 48	7.8	+	20 Lf	Kf=50'
No. 50	7.8	+	Lf=0	
Control	7.2		240 Lf	Kf=10'

に 48 時間保ち自家融解を起させたものにも菌浮遊液と同様ジ毒分解作用が認められなかった。

実験 4. ジ毒分解作用と培養培地の関係

土壤菌 No. 4, 12, 16, 18, 29 の 5 菌株をブイオン並びにジ毒培地に同一条件(培地表面積容量比を一定にし 37°C 72 時間)で培養し各培養培地の遠心沈澱上清に之と等容量の 160 Lf ジ毒 (pH=8.0) を混和し 37°C 10 時間後 (pH 7.8, マーゼン添加) Lf を測定した。No. 29 菌を除く 4 菌株では同一菌に就ては両培地共に同じ程度のジ毒分解作用を示し培地に依る差異を認めなかった。然るに No. 29 菌ではジ毒培地の培養液は 20 Lf に

ジ毒を分解したがブイオン並びに 100°C の 30' 加熱ジ毒培地の培養液はジ毒分解作用が弱く共に 70 Lf (毒素対照 80 Lf) の値を得ジ毒分解作用の培地に依る差異が認められた。即ち No. 29 菌をジ毒培地に培養した場合にその培養液のジ毒分解作用が最も強力であることを認めた。No. 18 菌をブイオン, 1%可溶性澱粉加ブイオン, Wachsmann⁸⁾ の Synthetic Solution (無機塩類と Saccharose より成る) の 3 種の培地に培地表面積容量比並びに pH (7.2) を一定にして 37°C 72 時間培養し各培養液のジ毒分解作用を比較した。ブイオンの場合が最も強力にジ毒を分解し 1%可溶性澱粉加ブイオンでは若干之に劣り Synthetic Solution では極めて軽微にジ毒が分解された。

実験 5. 土壤菌に依り分解されたジ毒の生物学的性状

No. 12, 18 の両菌を 240 Lf のジ毒培地に 37°C 72 時間培養し各培養液の遠心沈澱上清につき Lf を測定するに直接法並びに間接法に依り Lf=0 なることを認めた。之等の Lf=0 の遠心沈澱上清の Seitz, E. K. 濾液について毒性, 抗毒素結合價並びに Moloney 反応を驗した処孰れも陰性の成績を得た。即ち毒性試験として上記 Seitz, E. K. 濾液をブイオンにて 10 倍並びに 100 倍に稀釈してシック反應陽性の体重 250 g 前後のモルモットの皮内に 0.1 cc 宛注射し注射後 10 日間に亘り観察するに注射局所並びに全身状態に何等異常を認めず, 更に該 Seitz, E. K. 濾液について Li⁹⁾ 法に依り抗毒素結合價を測定せる結果抗毒素結合價を証明し得なかつた。次に上記 Seitz 濾液の食塩水 100 倍稀釈液を 100°C 30 分加熱せるものにつき Moloney 反應陽性 2 名を被験者として Moloney 反應を驗した処孰れも陰性であつた。然るに本実験に供した 240 Lf のジ毒を対照として 37°C に 72 時間放置し Seitz 濾過をなしたものにつき毒性試験, Li 法試験並びに Moloney 反應を驗するに孰れも陽性の成績を得た。

実験 6. 土壤菌の分類

上記土壤菌は孰れも実験 1 に記した通り芽胞を形成しグラム染色陽性にして Family Bacillaceae Fisher¹⁰⁾ に属すると考えられるが特にジ毒を強力に分解する No. 12, 18 菌, 馬血清平板を溶解して陥凹を形成するにも拘らず殆んどジ毒を分解しない No. 24 菌(第 1 表), ジ毒培地に継代してジ毒分解作用が強化される No. 5 菌(実験 2) 及びジ毒培地に培養した場合にのみ他の培地に於けるよりも強力にジ毒を分解する酵素を産生する No. 29 菌(実験 4) の 5 菌株につき Bergey's Manual¹²⁾ に従い菌種の検索をなした。其の結果は Ramon¹¹⁾ 等の

第2表 土壤菌(Family Bacillaceae Fisher)の分類学的性状

供 試 菌	No. 5	No. 12	No. 18	No. 24	No. 29
芽胞の形態	0.8~0.9 μ 橢圓形	1.3~1.6 μ 圓筒形	1.5~1.8 μ 圓筒形	1~1.2 μ 圓筒形	2~2.5 μ 橢圓形
芽胞の位置	中心性	中心性	中心性	中心性	端在性
菌體の長さ	2~2.6 μ	3.6~4 μ	4.5~5.3 μ	2~2.4 μ	2.7~4 μ
固有運動	+	—	—	+	+
セラチン液化	+	+	+	+	+
インドール形成	—	—	—	—	—
亞硝酸形成	—	+	+	—	+
澱粉分解	—	+	+	+	+
加糖高層寒天ガス發生					
葡萄糖	—	—	—	—	—
乳糖	—	—	—	—	—
馬鈴薯培地發育					
コロニーの色	褐色	淡褐色	淡褐色	クリーム色	クリーム色
培地の色	褐色	淡褐色	淡褐色	著色せず	著色せず
ブイヨン菌膜形成	+	+	+	+	+
ブイヨン中間層	弱濁	透明	透明	透明後に濁	透明
糖 分 解					
Arabinose	+	+	+	+	—
Dextrin	—	+	+	+	—
Dextrose	—	+	+	+	+
Inulin	—	+	+	—	—
Maltose	+	+	+	+	—
Sucrose	+	+	+	+	—
Xylose	—	—	+	+	—
Dulcitol	—	—	—	—	—
Galactose	—	—	+	+	—
Lactose	—	+	+	+	—
Mannitol	+	+	+	+	—
Rhamnose	—	+	+	—	—
屬する Group	B. brevis G.	B. adhaerens	B. adhaerens G.	B. subtilis G.	B. circulans G.
菌 種(近 縁 種)	B. brevis	B. fulminans	B. fulminans	B. rugulosus	B. granularis

Bacillus Subtilis Group(ジ毒分解菌) 以外に第2表の通り Bacillaceae 科の種々なる Group に分類された。

B) 土壤菌(Bacillus fulminans)の產生する酵素に関する実験

実験7. 土壤菌酵素の濃縮液

ジ毒を強力に分解する No. 18 菌(B. fulminans)は菌体外酵素を產生し且つブイヨン培地に於てもジ毒を分解する酵素を產生する。(実験3及び4)

従つて該菌をブイヨン(NaCl 0.5%, 鰹エキス0.5% カルノベプトン1%, pH 7.0) に37°C 4日間培養し培養濾液を細谷法⁷⁾¹²⁾に依り濃縮した。即ち培養濾液に $1/100$ 容量の50 g/dl のZnCl₂を加え生ぜる沈澱を食塩水にて2回洗滌して之に20% Na₂HPO₄を原培養濾液の $1/10$ 容量加え37°C に加温振盪すると濃褐色の上清と白

色沈澱に分離する。この上清を-1°C に冷却して析出せるNa₂HPO₄の結晶を除去し醋酸にてpH 7.2に修正してトルオール重層のもとに氷室に保存する。斯くして作られた濃縮酵素液(上記上清)は約2ヵ月間安定でジ毒分解作用は著しく増強され10~50倍容量のジ毒(100 Lf 前後)に至適條件(後記)のもとに作用せしめると3時間以内に之を分解してLf=0にすることが出来る。No. 12 菌を No. 18 菌と同一培養條件のもとに即ち培地容量表面積比を一定にし37°C 4日間培養し 各々同一濃縮率($1/2$)の濃縮酵素液を作りジ毒並びにカゼイン溶液に作用せしめてその分解作用を比較した。濃縮酵素液0.05 cc を4 cc の100 Lf ジ毒並びに4 cc のカゼイン液(蛋白N 0.69 mg/cc)に混和し1万分の1の割合にマーゾニンを添加孰れも pH 8.0 に於て36°C 20時間後にフロキュレーション

第1圖 土壤菌酵素の精製法

≡ン並びに蛋白Nの定量を行つた。No. 12 菌の場合にはジ毒は 20 Lf に No. 18 菌の場合にはジ毒は 2 Lf に分解されたがカゼインを基質とした時には No. 12 菌の場合には 57.2% が分解され 0.29 mg/cc となり No. 18 菌の場合には 50% が分解され 0.34 mg/cc の値を得た。即ち分類上互に類似した No. 12, 18 の両菌の濃縮酵素液は共に Maschmann¹³⁾ の細菌性蛋白分解酵素を含有すると考えられるが No. 18 菌の濃縮酵素液は No. 12 菌の濃縮酵素液に比較してカゼインよりもジ毒をより強く分解する

と云う知見を得た。濃縮酵素液自身の蛋白Nは 2 mg/cc 以下で上記測定値に影響しない。上記 No. 18 菌の濃縮酵素液のジ毒分解作用に於ける至適条件としては至適 pH は pH 8.6 で至適反応温度は 42°C の値を得た。pH>8.6 の場合は Lf 測定 of Kf が長くなるので pH 8.2~8.4 に一定し且つ反応温度はジ毒の耐熱性を考え 38°C に一定して以下の実験を行つた。濃縮酵素液の耐熱性は 50°C 10 分間の加熱により若干酵素作用が減弱し 80°C 10 分間の加熱により酵素作用が完全に破壊される。

実験 8. 阻害剤又は賦活剤並びに吸着剤の作用 阻害剤又は賦活剤の影響を実験する爲反応組成として下記 4 組

- 濃縮酵素液 (=0.5 cc) + ジ毒 (=4.5 cc, 160 Lf/cc) + 水 (=0.5 cc) (阻害剤又は賦活剤と等容)
- 濃縮酵素液 + ジ毒 + 阻害剤又は賦活剤と等容
- 水 (濃縮酵素液と等容) + ジ毒 + 阻害剤又は賦活剤
- 水 (濃縮酵素液 + 阻害剤又は賦活剤と等容) + ジ毒を各阻害剤又は賦活剤毎に調製し pH 8.2 に於て 38°C 3 時間後フロキュレーションを測定した結果 KCN $\frac{1}{15.3}$ mol

の添加では殆ど影響なくモノ沃度醋酸 $\frac{1}{15.5}$ mol の添加に依つては毒素自身が若干分解されるので阻害作用は不明で塩酸チスチンの $\frac{1}{15.5}$ mol 添加では酵素作用が明かに促進された。反応因子として濃縮酵素液 0.5 cc と 160 Lf ジ毒 4.5 cc を取り之に対して前記反応条件のもとに阻害剤として健康馬血清 0.5 cc (9.1% 容量) を添加した場合即ち組 (b) の値は Lf=40 で之に対し組 (a) は Lf=0, 組 (c) 及び組 (d) は共に Lf=130 の値を得た。結局健康馬血清 9.1% 容量の添加に依り酵素作用は

若干阻害されるが依然其の作用を保持することを認めた。吸着剤の実験として pH 5.0~9.0 の間で pH を種々変化せしめて精製カオリン並びにオルト水酸化アルミニウム C-r の吸着実験を試みたが酵素及び褐色色素は吸着されなかつた。然るに酸性白土 1g を濃縮酵素液 (pH 7.0) 5cc に混和し約 1 時間室温に放置せしめると褐色色素並びに酵素が共に吸着され上清部は無色透明となり、且つ酵素作用を失う。次に精製酵素液 (実験 9) 5cc に炭末 0.5g を混和し pH 8.6 に於て室温 (18°C) に 1 時間放置すると褐色色素並びに酵素は吸着され 0.2 mol 醋酸ナトリウムに依り pH 8.2 (NaOH) に於て再び褐色色素並びに酵素が抽出されることを認めた。即ち上記 4 種の吸着剤に依つては褐色色素と酵素を分離出来ないで更に酵素産生と色素産生の関係を追求した。ジ毒培地並びにブイヨンは共に培地自身褐色を呈し褐色色素の産生を認め難いのでブイヨンを pH 5.8 に於て炭末にて脱色して色素の産生を実験した。其の結果菌を培養した培養濾液に酵素作用を認めると同時に褐色色素の産生を認めた。尙お培地自身無色の Wachsmann の Synthetic solution (実験 4) に No. 18 菌を培養した場合菌膜の発育も不良で酵素の産生も微弱であるが対照の菌を培養せぬものと比較して培養培地が明かに淡褐色を呈し、色素の産生を認めた。

実験 9. 土壤菌酵素の精製

前記細谷法に依る No. 18 菌の濃縮酵素液を硫酸分別沈澱法により精製濃縮すると酵素物質は $\frac{2}{3}$ 飽和沈澱分劃に含有される。この沈澱を原濃縮酵素液の $\frac{1}{10}$ 容量の蒸留水に溶解せしめ 48 時間加圧透析を行い内液を Piller¹⁴⁾ のメタノール分別沈澱法に従い精製した。加圧透析を行った暗褐色の内液を -2°C に冷却し同じく冷却した醋酸緩衝液 (0.2 mol 醋酸 + 等量の 0.4 mol 醋酸ナトリウム) を加え pH 5.2 に一定する。次に予め -9°C に冷却したメタノール (98.2%) を徐々に 50% (容量比) 迄加え -7°C 以下に 2~3 時間放置すると大なる褐色沈澱と淡黄色透明な上清に分離する。冷却遠心沈澱に依り速かに上清を除去して沈澱を 0.4 mol 醋酸ナトリウムに溶解せしめる。以下同様にメタノール沈澱 (メタノール容量 44.7%) を更に 3 回反復施行して精製を行った。この際酵素濃度の減少を防ぐ目的で沈澱を溶解すべき醋酸ナトリウム液を毎回減量した。(第 1 図参照) 加圧透析を行った精製酵素液の性状は暗褐色を呈し輕微に濁濁し Molish (α -Naphtol) 反應は陽性であるが Bial (Orcin 塩酸) 反應並びに Dische (Diphenyl 硫酸) 反應は陰性である。

Fiske & Subbarow¹⁵⁾ 法に依り燐の定量を行った結果は蛋白成分 2 mg/cc の場合無機燐を検出せず有機燐の微量 (5 γ /cc) を検出した。ジ毒分解作用は 10 倍容量の 110 Lf ジ毒を pH 8.2 に於て 38°C 3 時間後に Lf=0 に迄分解する。蛋白 N 0.475 mg/cc, アミノ N 0.07 mg/cc 精製カゼイン水溶液にマーゼニンを 1 万分の 1 の割に加えその $\frac{1}{10}$ 容量の精製酵素液を混和して pH 8.2 に於て 36°C 20 時間後に定量すると蛋白 N は 0.04 mg/cc に減少しアミノ N は 0.3 mg/cc に増加する。精製酵素液を -2°C に冷却して醋酸にて pH 3.6 にすると褐色沈澱と殆んど無色の上清に分離し上清に酵素作用を欠除し褐色沈澱に酵素作用を認めた。濃縮酵素液には輕微なる澱粉分解酵素を有するが精製酵素液には之を認めない。精製酵素液 (pH 8.6) を Pauli の装置に入れ電気透析を行うと室温 (18°C) に於て約 1 時間後に内液は pH 7.8 となり 2 時間後には pH 5.8 の酸性に变じ 3 時間後には依然 pH 5.8 にて変動なく電流計の示度も 2 mA 以下となり内液は褐色沈澱と無色透明の上清に分離し沈澱は陽極に附着し一部管底に沈降する。該沈澱は水に難溶であるが 0.4 mol 醋酸ナトリウムに溶解して褐色溶液を作り之にジ毒分解作用を認めたが無色透明になつた内液にはジ毒分解作用を認めなかつた。上記の條件で電気透析を行った場合には酵素作用は増強されず寧ろ減弱した。

III. 考察並びに総括

(1) Family Bacillaceae Fisher に属し蛋白分解酵素を有する土壤菌 30 株を土壤より分離し Seitz, E. K. を濾過せるジフテリア濃縮毒素液に之等土壤菌を培養してジフテリア毒素の分解をフロキュレーションにより測定した。其の結果毒素の分解の程度は各供試菌により異なることを認めた。

(2) ジフテリア毒素培地に継代培養することに依り該毒素の分解作用が強化される菌株並びにジフテリア毒素培地に培養した場合に他の培地に培養した場合よりも強力に該毒素を分解する酵素を産生する菌株の存在を認めた。

(3) 土壤菌 (No. 12, 18 菌) に依り分解されたジフテリア毒素は毒性並びに抗毒素結合價を消失し Moloney 反應物質も土壤菌により破壊されることを認めた。

(4) 土壤菌のジフテリア毒素分解作用は菌体外に産生された酵素の作用であり該酵素は細谷法に依り濃縮が可能である。No. 18 菌の濃縮酵素液のジフテリア毒素分解に於ける至適反應條件は温度 42°C pH 8.6 である。

(5) No. 18 菌の細谷法濃縮液、硫酸沈澱法に依る濃縮液並びにメタノール沈澱法に依る精製酵素液は何れも褐

色を呈すること及び精製酵素液の pH 3.6 に於ける沈澱並びに電気透析に依る沈澱は共に褐色を呈し酵素作用を認めること更に吸着剤による色素と酵素の分離が困難であり酵素の産生と同時に色素が産生されることから考えて酵素と褐色色素の間には密接なる関係があるのではないかと推定される。茲に謹みて御指導を賜りたる細谷教授に心から感謝の意を表す。

文 献

- 1) Avery, O. T. & Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 54, 73 (1931)
- 2) 細谷省吾, 添田百枝, 今村晋: ペニシリン, I, 157 360 (1947)
- 3) 細谷省吾, 添田百枝, 今村晋: ペニシリン, I, 440 (1948)
- 4) 野々部恒: 基礎と臨床, II, 18 (1948) 及び III, 29 (1949)
- 5) Nonobe, K.: Japan. J. Exp. Med., 21, 33 (1951)
- 6) Young, C. C.: Chinese Med. J., supplement

- I, 143 (1936)
- 7) 細谷省吾, 利部光四郎, 出口朗: 実験医学雑誌, 28, 420 (1944)
- 8) Wachsmann, S. A.: Soil Science, VIII, 216 (1919)
- 9) 田中哲之助: 実験医学雑誌, 19, 109 (1935)
- 10) Bergey, D. H., Breed, S. R., Murray, E. G. D. & Hictkens, A. P.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, V Edition. 640 (1939)
- 11) Ramon, G., Kicheu, R. & Ramon, P.: Rev. Immunol., 9, 161 (1945)
- 12) 細谷省吾, 三橋進, 野村達次, 添田百枝: ペニシリン, I, 1 (1948)
- 13) Maschman, E.: Biochem. Z., 294, 1 (1937)
- 14) Pillmer, L., Willer, R. G., Burrell, J. I. & Grossberg, D. B.: J. Exp. Med., 88, 205 (1948)
- 15) Umbreit, W. W., Burns, R. H. & Stanffer, J. F.: Manometric Techniques & Tissue Metabolism, 190 (1951)