

故常葉信雄教授の業績

——放線菌菌体抽出物と CRP の反応を中心に——

新 藤 潤 一

神奈川歯科大学口腔外科学教室

(昭和56年10月20日受付)

The Works of Prof. Nobuo Tokiwa

——The Reaction between the Extract of Actinomyces israelii and C-reactive Protein——

Junichi SHINDO

Department of Oral Surgery, Kanagawa Dental College

本綜説は故常葉信雄教授の指導のもとに、広瀬達男、永瀬守、新藤潤一らが実験を分担し、口腔病学会、日本口腔科学会、日本細菌学会などに報告したものに一部未発表の資料を併せ総括し、考察を加えたものである。

同教授の霊前に捧げて、御冥福を祈りたい。

1. はじめに

1950年代はまだ重症な顎部感染症の多い時代だった。放線菌症はそのなかでも難治性の疾患で、再発をくり返す例も多く、数カ月ないし1年を越える症例も稀ではなかった。放線菌症の診断は膿汁または組織中から菌塊を証明することで確定するが、このような診断が得られる場合は膿瘍が形成されたり、病巣搔爬が行なわれてからのことであり、初期の段階で確定診断法のないことが治療方針の決定や予後推定の上で大きな支障となっていた。

このような背景のもとで、Tuberculin や Wasserman 反応のような検査法が模索されてきたが¹⁾⁻⁸⁾、その結果は放線菌症以外の炎症や悪性腫瘍などでも陽性を示すことが多く、あまり有用とはいえなかった。

常葉はヒト放線菌症から分離して、Actinomy-

ces israelii と同定された放線菌ミノワ株から多糖体抗原を抽出し、放線菌症患者の血清と沈降反応させたところ、ほぼ100%の陽性反応を得ることができた⁹⁾。しかしこの反応もまた悪性腫瘍、梅毒、リウマチ、妊婦などで陽性反応がみられ^{10) 11)}、しかもこの反応は炎症の初期、まだ抗体産生されていないと思われる時期から陽性となり、炎症の軽快とともに急速に消失していった。また家兎に対して免疫原性を示さないことなど、一般の抗原抗体反応とは趣を異にしていた。

丁度その頃C反応性タンパク (CRP) がわが国にも広く紹介され、臨床検査にも応用されるようになってきた。CRP は1930年 Tillet ら¹²⁾により発見され、炎症の急性期や悪性腫瘍末期などの患者血清中に現われるタンパク質で、本来は肺炎球菌の菌体成分であるC多糖体と結合して沈降反応を示すものであるが¹³⁾、当時すでに化学分析は進められ¹⁴⁾、結晶化も行なわれ^{15) 16)}、それで家兎を免疫して抗血清が作られ¹⁷⁾、米国各社より市販されていた。また国内でも生産、発売の準備がなされていた。

常葉はこの放線菌抽出物と患者血清との沈降反応が、C多糖体とCRPの反応に極めて類似していることに注目し、その異同を明らかにしようと考えた。

2. 菌体分解法の検討

著者は¹⁸⁾主として1 N. NaOH で80°C, 5~6時間加水分解して菌体を破壊した。永瀬¹⁹⁾は formamide を加えて 150°C, 15分間加熱分解した。どちらも TCA で除タンパクしてから acetone で抽出した。これらは細胞壁成分を破壊しており, 細胞質および細胞壁成分の混在した多糖体分画と考えられた。両者は分解法のちがいがから, 化学的構成成分などには差異が認められるが, CRP 様の反応活性は同一のものと考えられた。(これらの抽出物を以下A多糖体とする。分解法による区別を必要とするときはA多糖体(NaOH)または(fa)とする)。

一方菌体を methanol-dry ice により凍結融解を繰り返したり, 超音波あるいは cell homogenizer (Broun) により機械的に破壊しても反応活性成分は抽出された。これらは細胞壁までは破壊されず, 主に細胞質成分であるが, 同様の反応が認められた。ただし活性量は低かった。

3. 放線菌菌体抽出物と CRP 陽性血清との反応

a) 定量的沈降反応

A多糖体は放線菌症をはじめ, 各種の炎症, 悪性腫瘍などの患者血清と沈降反応を生じたが, それらはいずれも CRP 陽性血清であった(図1)。沈降タンパク量は A多糖体の濃度が 2~8 μg/ml 付近で最大となり, それ以上濃度を上げて増加しなかった。また CRP の含有量の高い血清ほど強く反応し, 多くの沈降タンパクを生じた¹⁹⁾。

b) 放線菌菌体抽出物による CRP の吸収試験

CRP 陽性血清に A多糖体を加えて吸収を行い, その上清中の CRP 量を測定したところ, 吸収率は68~98%であった¹⁹⁾。ただしこの実験は一方で A多糖体を用いながら, 上清中の CRP 測定には抗 CRP 血清を用いているので, 直ちに吸収率を比較することはできない。そこで次項の抗 ARP 血清の作成が必要となった。

4. 抗 ARP 血清の作成

CRP は肺炎球菌のC多糖体との沈降反応から

出発したが, MacLeod ら¹⁷⁾が患者血清中の反応成分(C-reactive protein)を分画, これを用いて家兎を免疫して抗 CRP 血清を作ってから, 反応が一層鋭敏になり, 現在では専らこの抗

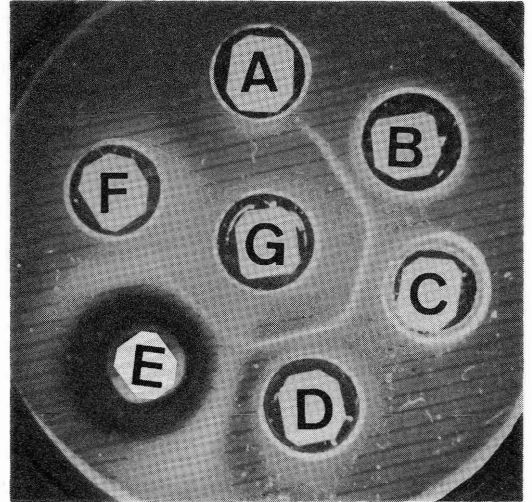


図1 中央(G) A多糖体溶液

周囲: 患者血清

- | | |
|-------------|------------|
| A: 上顎癌 | B: 上顎悪性黒色腫 |
| C: 舌癌 | D: 上顎癌 |
| E: 舌癌(屍体血清) | F: 上顎癌 |

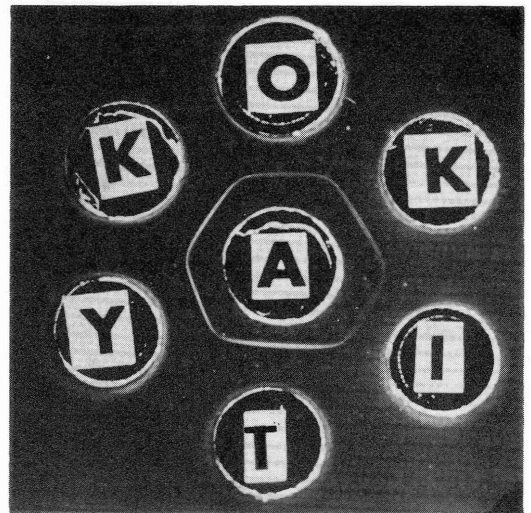


図2 中央(A): 抗 ARP 血清

周囲: 患者血清

- | | |
|------------|--------------|
| O: 急性智歯周囲炎 | K: 急性顎下リンパ節炎 |
| I: 下顎癌 | T: 急性腹膜炎 |
| Y: 再発性アフタ | K: 腹部膿瘍 |

血清が用いられている。そこで著者らも放線菌の A 多糖体と反応する患者血清側の活性成分 (Actinomyces polysaccharide Reactive Protein 以下 ARP という) を用いて家兎を免疫することにした。

舌癌で死亡し、病理解剖を行なった死体から血清 50 ml を採取して、これに A 多糖体 (NaOH) を混じ、37 °C、12 時間放置したところ、湿潤量 2.5 g の沈澱が生じた。これを生理的食塩水に浮遊させ、その半量を Freund's adjuvant とともに 3 羽の家兎に筋注、10 日後同量の追加注射をしたところ、明らかな抗体産生を認めたので、18 日後に全採血した。家兎血清は混合し、健康な 5 人のヒト血清で吸収した後、抗 ARP 血清として

実験に供した。

抗 ARP 血清と各種患者血清との沈降反応は非常に鋭敏となり(図 2)、しかも抗 CRP 血清と共通の沈降帯を形成した(図 3)。また多数の症例についても陽性率が一致した¹⁸⁾(表 1)。

5. ARP の精製と分析

a) 免疫電気泳動

14 例の患者血清について cellulose acetate 膜電気泳動を行なった結果、ARP, CRP とともに陰極側 (γ -globulin の位置) に沈降帯がみられた²⁰⁾(図 4)。

一部の血清については寒天ゲル免疫電気泳動および澱粉ブロック電気泳動を行なった。寒天では β_1 -globulin, 澱粉では γ -globulin の位置に反応が認められた²⁰⁾²¹⁾。抗 CRP, 抗 ARP 血清に対する沈降帯はすべて同じ位置に出現した。

b) 硫酸アンモニウム分画

ARP 陽性血清を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で 50% 飽和して沈澱を除き、その上清をさらに 75% 飽和にした時沈澱する分画 (albumin を主とする。—— 以下 75% 飽和分画という) に ARP の活性が認められた。この分画を cellulose acetate 膜電気泳動をするとタンパク成分の大部分は陽極側先端に泳動されたが、ARP, CRP の沈降帯は陰極側に認められた²⁰⁾(図 5)。

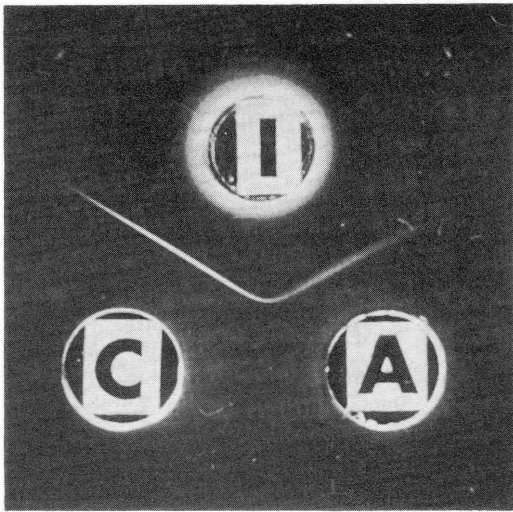


図 3 抗 ARP 血清と抗 CRP 血清の沈降帯比較

I : 患者血清 A : 抗 ARP 血清
C : 抗 CRP 血清

表 1 A 多糖体, 抗 ARP 血清, 抗 CRP 血清の臨床成績比較

	例数	A 多糖体 陽性例 (重層法)	抗 ARP 血清 陽性例 (Ouchterlony 法)	抗 CRP 血清 陽性例 (Ouchterlony 法)
急性炎症	37	19(51.4%)	33(89.4%)	34(92.0%)
慢性炎症	20	1(5.0)	5(25.0)	6(30.0)
悪性腫瘍	40	8(20.0)	29(72.5)	29(72.5)
口内炎	45	3(6.2)	21(46.7)	19(42.3)
計	142	31(21.9)	88(62.0)	88(62.0)

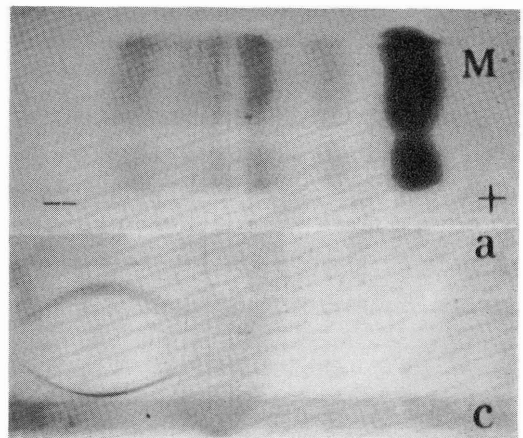


図 4 Cellulose acetate 膜電気泳動

M : 患者血清 a : 抗 ARP 血清
c : 抗 CRP 血清

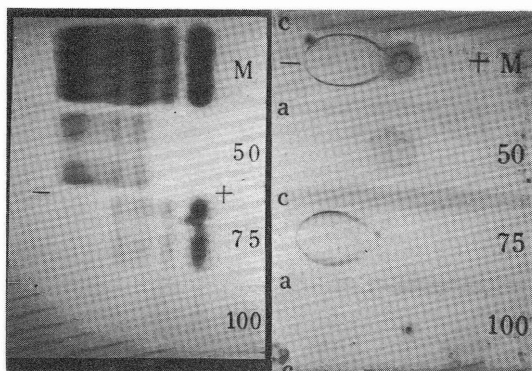


図 5 (NH₄)₂SO₄ 分画の電気泳動

M: 患者血清

50, 75, 100: (NH₄)₂SO₄ の各飽和分画

a: 抗 ARP 血清 c: 抗 CRP 血清

CRP が (NH₄)₂SO₄ 塩析法で albumin 分画に属することは古くから知られていたが¹³⁾, 電気泳動ではさまざまな泳動結果が報告されている。すなわち Tiselius 法では β -globulin¹⁶⁾, 寒天では β_1 , ないし γ ²²⁾⁻²⁴⁾, 濾紙では α_1 ²⁵⁾, polyacrylamide²⁶⁾²⁷⁾ 澱粉¹⁶⁾²⁸⁾, cellulose acetate 膜²⁹⁾ では γ などである。しかし泳動条件を一定にすれば, 再現性はよく, 筆者らの結果では ARP, CRP ともすべて同じ位置に泳動され, 沈降帯はすべて 1 本であった。

c) DEAE cellulose column chromatography

広瀬らは CRP, ARP 陽性血清を DEAE cellulose column に通し, 0.02M NaH₂PO₄ (pH 7.0) で流出させた。その結果大部分のタンパク成分は早期に流出したが, ARP, CRP とも全く反応がなかったので, NaH₂PO₄ を 0.05M とし, さらに食塩を加えて, 段階的に濃度を上げていったところ, 0.05M で反応成分が流出した (分画 IV), それ以上食塩濃度を上げて反応成分は流出しなかった²⁰⁾ (図 6, 7)。

以上の結果をもとに肺癌で死亡した死体の血清および胸水 500ml を (NH₄)₂SO₄ で分画し, DEAE cellulose column で分画したところ, 分画 IV に反応活性が認められた。これをタンパク濃度 0.3% に調整し, 超遠心分析をしたところ, S_{20W}=3.2 のピークが得られた²¹⁾ (図 8)。

永瀬は患者の血清, 胸腹水を (NH₄)₂SO₄, DEAE cellulose column で精製したあと, 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (1mM CaCl₂ 含有) に透析した液をタンパク量 300 μ g/ml に調整して, 精製 CRP 液とした。これに A 多糖体を加えて定量的沈降反応を行なったところ 8 μ g/ml で最大値に達し, 以後減少傾向を示したのに対し, C 多糖体は 4 μ g/ml でプラトーになった。沈降タンパク量は常に C 多糖体の方が多かった¹⁹⁾ (図 9)。

CRP の沈降係数は 7.5 S¹⁶⁾, 6.6 S³⁰⁾ などの報告があり, また Schultze ら²³⁾ は 3.5 S と 6.4 S

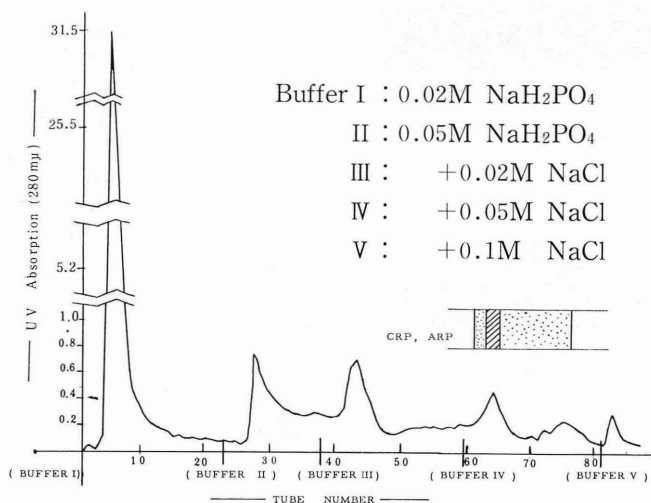


図 6 ARP, CRP 陽性血清の DEAE cellulose column chromatography

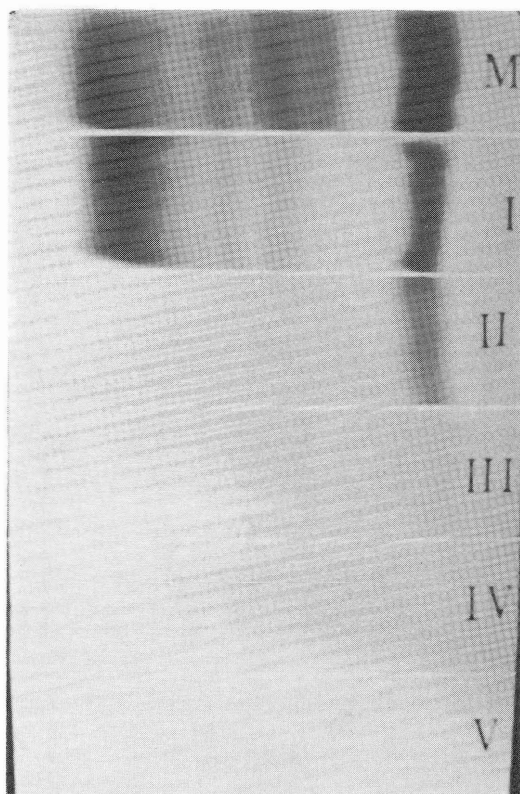


図 7 DEAE cellulose column chromatography
各分画の電気泳動
M: 患者全血清
I~V: chromatography の各分画

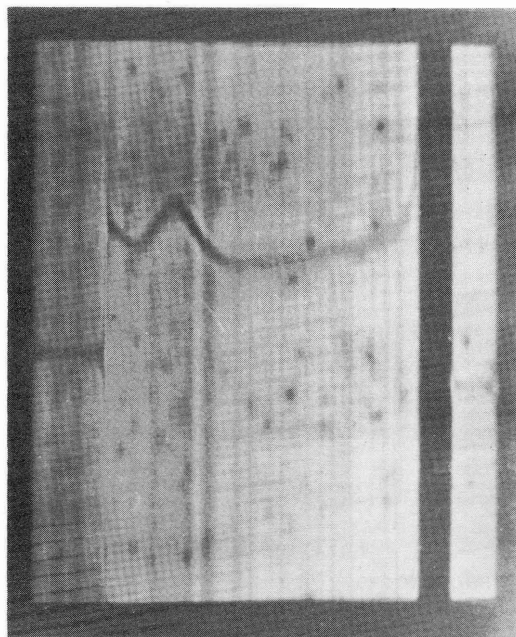


図 8 分画 IV の超遠心分析

が、6~7S という分画は得られなかった。DEAE cellulose column について Hokama ら³¹⁾ は Sodium citrate に NaCl を加えて CRP の 75% を回収しているが (永瀬もこの方法に従っている), 広瀬らは Peterson & Sober³²⁾³³⁾ の方法によったため、回収量が少なくなったことと関係しているのかもしれない。

CRP の分子構造については Gostchlich ら³⁴⁾ が分子量平均 118,000, 6 コの等しい subunit が S-S 結合していること, 8M 尿素により subunit にまで分解された CRP はもはや反応活性を示さないと報告した。その後 Kushner ら³⁰⁾ もほぼ同様の分子量を報告している。最近 Oliveria & Gostchlich³⁵⁾³⁶⁾ は CRP の 1 次構造を決定し, 187 の amino 酸から成る直鎖構造と, subunit の分子量 20,946 とを発表している。

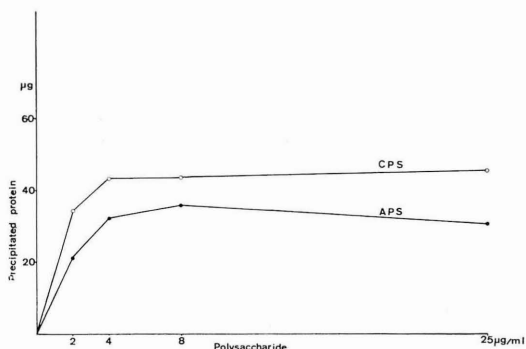


図 9 A 多糖体および C 多糖体の精製
CRP に対する沈降反応
APS: A 多糖体 CPS: C 多糖体

の 2 コのピークがあるとしている。広瀬らの値は Schultze らの小さい方のピークにほぼ一致した

6. 放線菌菌体抽出物の分析

A 多糖体 (NaOH) を CM および DEAE cellulose 膜の paper chromatography にかけると, CRP, ARP の反応活性は CM ではその先端部分にあり DEAE では原点と先端の 2 カ所に

分かれた。そしてどちらも反応と関係ない ninhydrine 陽性物質を除くことが可能となった¹⁸⁾ (図10)。そこでA多糖体溶液を CM cellulose に混じ, その上清を DEAE cellulose の column にかけてところ, 0.013 M. KH_2PO_4 で早期に流出する分画 (E) と, DEAE cellulose に吸着され, 1M, 2M NaCl で溶出する分画 (R, RR) に

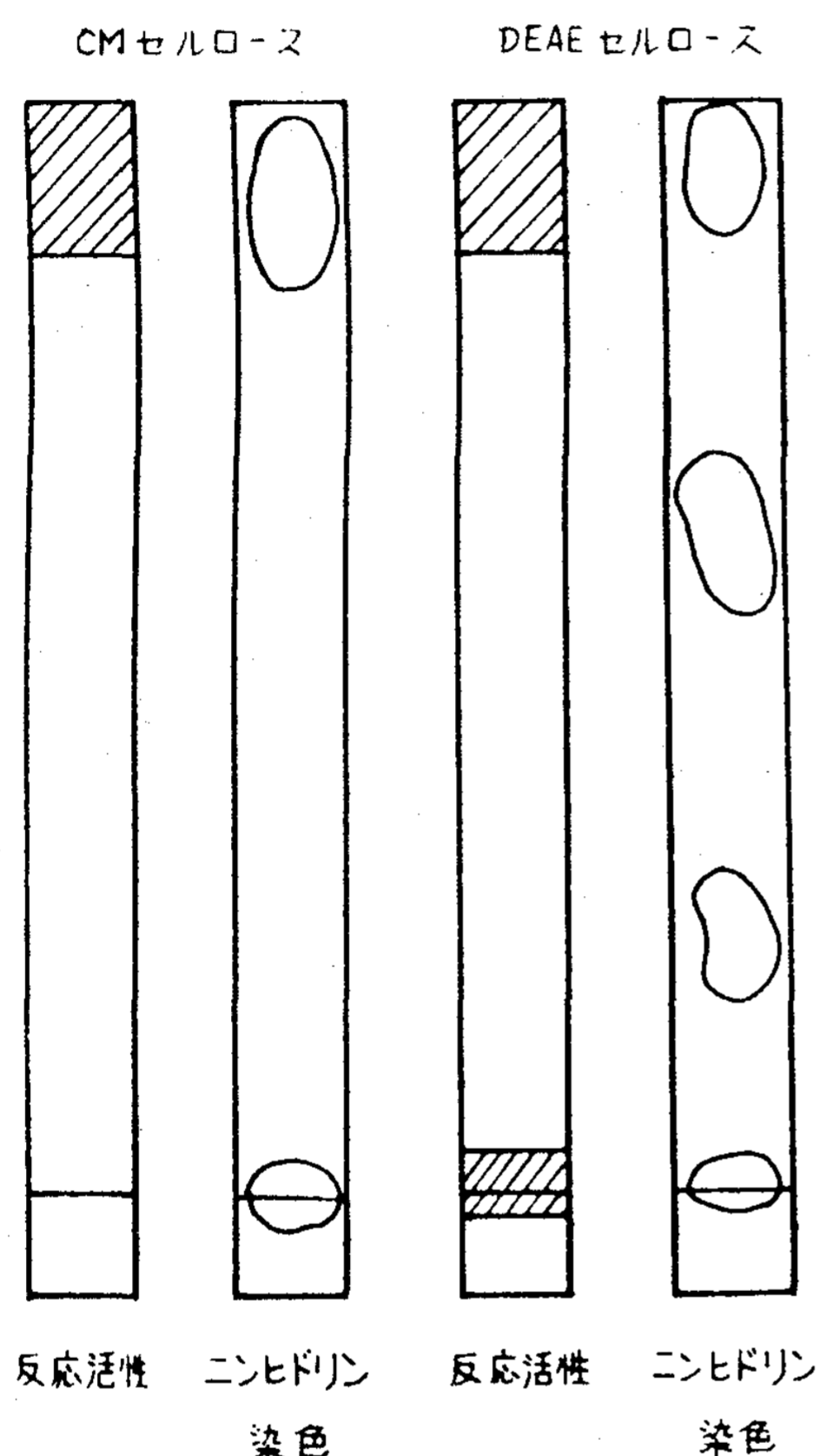


図 10 イオン交換セルロースによる A 多糖体の paper chromatography

分かれた。再分画は共通の沈降帯をつくり, その反応活性量の比はおおよそ 60:38:2 であった。両分画はタンパク質は検出されなかったが, 還元糖, アミノ糖量にはかなりの差があった。紫外吸収曲線は 250 $m\mu$ 付近に極小, 270 $m\mu$ 付近に極大値があり, 核酸の存在が推察された¹⁸⁾ (図11)。

永瀬の抽出物は Sephadex G 100 のゲル濾過で活性成分の鋭い単一ピークが得られ, これが多糖体のピークとよく一致した (図12)。この精製分画では choline が特徴的で, 他に galactose, glucose, galactosamine およびリン酸が定量され, そのモル比は 1:4:1:2:1 であった¹⁹⁾。

C 多糖体成分の分析は古く Goebel ら³⁷⁾ によ

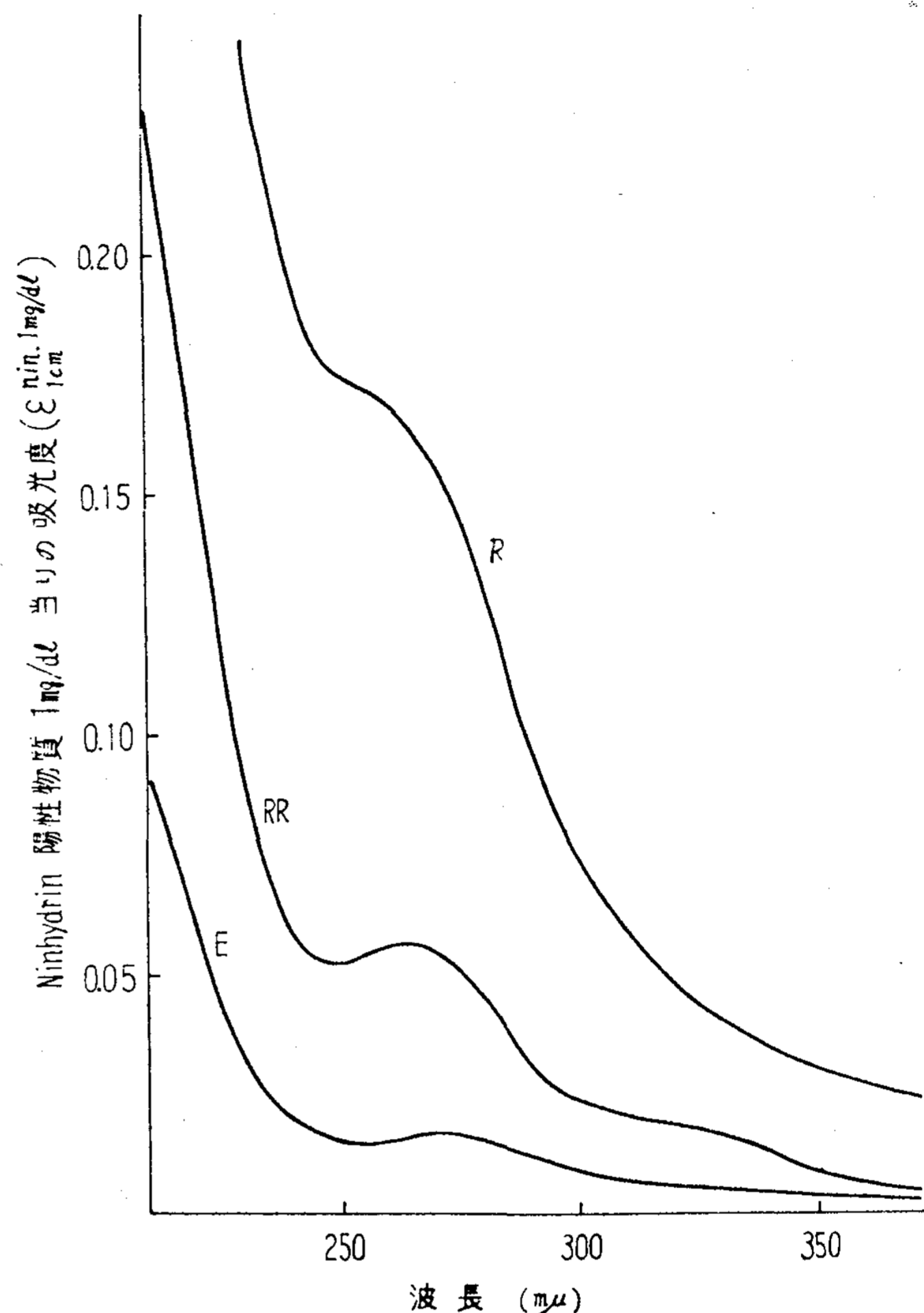


図 11 精製 A 多糖体 (NaOH) の紫外吸収曲線

り還元糖, hexosamine が定量された。これは粗な多糖体であったが, 紫外吸収で 252.5 $m\mu$ に吸収極小, 267.5 $m\mu$ に極大があり, この曲線は Hornung ら³⁸⁾ も全く同様で, 筆者の曲線とよく似ており, 核酸成分が主要なかわりをもつことを示唆していた。Liu & Gotschlich は N-acetyl galactosamin-6-phosphate が粗な C 多糖体の 34.8% を占め³⁹⁾, これを TCA 処理と Sephadex 濾過により精製した活性成分では N-acetyl galactosamine-phosphate polymer が 95% 以上を占め, 混在していた他の抗原成分は除去されたとしている⁴⁰⁾。この結果や Hornung ら³⁸⁾の結果からみると, lysine, alanine, muramic acid, glucosamine などは全く反応に関与しないことになる。一方 Brundish ら⁴¹⁾は C 多糖体にはリン酸濃度が高度であり, これが phosphoryl choline や ribitol phosphate の形をとって CRP との反応にあずかっているのではないかとしている。この説は反応阻止試験の結果な

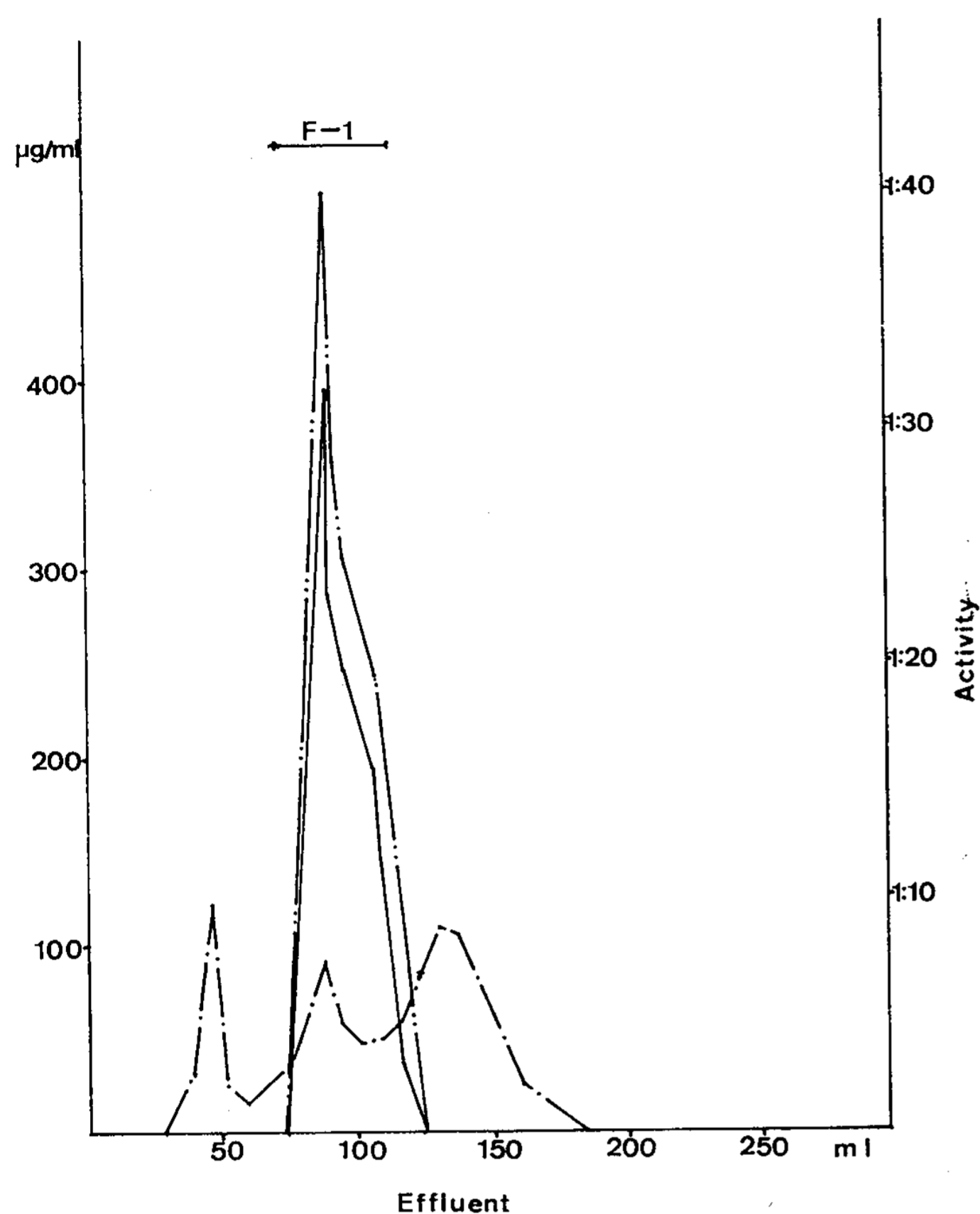


図 12 A多糖体 (fa) の Sephadex G100 column chromatography

—— 一般多糖体
 - - - タンパク
 - · - · CRP に対する活性度

どから支持する意見が強い、永瀬も A 多糖体から choline を定量しているが、galactosamine は検出していない。

7. 放線菌菌体抽出物と ARP の反応条件

a) Ca^{++} の影響

A 多糖体 (fa) と ARP との反応系に EDTA を加えたところ、反応は全くみられず、これに過剰の Ca^{++} を加えると反応が復活した。 Mg^{++} では反応はおこらなかった¹⁹⁾。

C 多糖体と CRP の反応に Ca^{++} が必要なことは Abernathy らの報告¹³⁾にもみられる重要な特徴で、McCarty¹⁵⁾、Wood¹⁶⁾らもこの性質を利用して、CRP の結晶化に成功している。この作用は触媒作用と考えられている⁴²⁾。

b) リン酸エステルによる反応抑制試験

A 多糖体 (fa) と ARP の反応系に種々のリン

酸エステル化合物を加えて、反応抑制度を比較した。その結果、反応を 50% 抑制するに要するモル濃度でみると、phosphoryl choline が最も少量でよく、次いで cytidine-5-monophosphate, DL- α -glycerophosphate, uridine-5-monophosphate, D-galactose-6-phosphate などであるが、前者の 30~50 倍のモル濃度を要した。そして C 多糖体 - CRP の反応系の抑制に比べると、いずれも 8~17 倍の多糖体を要した¹⁹⁾。

C 多糖体の活性基について初めて具体的な成分を指摘したのは Hornung ら³⁸⁾で、uridine-diphosphate = muramic acid-peptide (分子量 8,000, 3S) ということであった。そして CRP を uridine monophosphate で吸収すると、C 多糖体との反応が抑制されることを示した。ところが Gotschlich ら⁴²⁾は δ -glycerophosphate, AMP, CMP などより低分子のリン酸エステルで同様な反応抑制のおこることを報告した。Valanakis ら⁴³⁾は定量的沈降反応で CRP-C 多糖体の反応を 50% 抑制するに必要なモル比を比較したところ、choline phosphate が圧倒的に少量ですみ、uridine phosphate など他のリン酸塩の 1/20~1/100 量ですむことを発見した。

永瀬の結果もこれとよく一致しており、A 多糖体の反応基が C 多糖体のそれと一致していることを示している。

8. 反応活性成分の単一性について

以上の実験結果から ARP と CRP は同一のものという結論が得られたと考えられる。しかし一連の比較実験においてわれわれを悩ませたものは細菌成分側、患者血清側双方にみられた活性成分の単一性に対する疑問であった。寒天ゲル内沈降反応や電気泳動で CRP に複数の沈降帯が現われることは多くの指摘があり²²⁾⁴⁴⁾⁻⁴⁷⁾、より具体的な資料としては Schultz ら²³⁾の超遠心による 6.4 S と 3.5 S の 2 コのピーク、Hokama ら²⁶⁾²⁷⁾が Wood ら¹⁶⁾の結晶 CRP の他に μ コ多糖体と結合した CRP の存在を報告していることなどがある。筆者の経験では Ouchterlony 法で 2~3 本の沈降帯の現われることがあり、一部が CRP と ARP

で一致しない場合があった¹⁸⁾(図13)。同じように

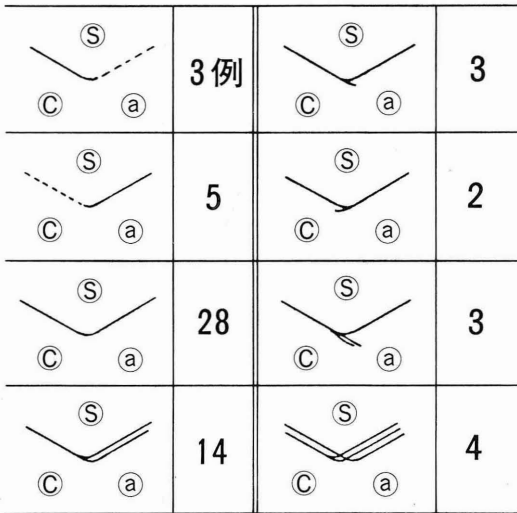


図 13 抗 ARP 血清, 抗 CRP 血清の沈降帯比較

- Ⓢ: 患者血清
- ⓐ: 抗 ARP 血清
- ⓒ: 抗 CRP 血清

C多糖体と CRP の反応でも複数の沈降帯の見られる場合があった。DEAE cellulose chromatography で A多糖体の活性成分が両極端に分離したり¹⁸⁾, C多糖体の活性成分が Sephadex G 75 の column で 2 分画されたりしている⁴⁰⁾。また C多糖体で CRP をいくら吸収しても抗 CRP 血清と反応する成分が残ることを指摘した報告⁴⁸⁾もある。

今回の実験で CRP と ARP の同一性に多少の疑問を投げかける実験結果は, 同一の CRP と反応する際に C多糖体と A多糖体 (fa) では沈降タンパク量に差があったことと, A多糖体 (fa) で CRP を吸収した後も C多糖体との反応が残ったことである。しかし比較の対象とした C多糖体の本体が極めて曖昧なもので, ある実験では複合性が強調され, 別の実験では単一な結果しかでないことなどからこの程度の誤差はむしろ当然かもしれない。そして全く同じような曖昧さを A多糖体も具えていることは興味深いことである。

9. Actinomyces 属の他の菌種と CRP との反応性

以上の実験に用いた菌株は ATCC 10048 株およびミノワ株で, いずれも *Actinomyces israelii* である。Bergey's manual⁴⁹⁾には Genus *Actinomyces* を 4 種に分類しているの、永瀬は各種の株を formamide で分解して多糖体分画を抽出した。使用菌株は *A. bovis* ATCC 19012, *A. odontolyticus* ATCC 17982, *A. naeslundii* ATCC 12104, *A. viscosus* ATCC 19246 である。沈降反応の結果は図14, 15の通りで, *A. odontolyticus* は *A. israelii* とほぼ同様の反応を

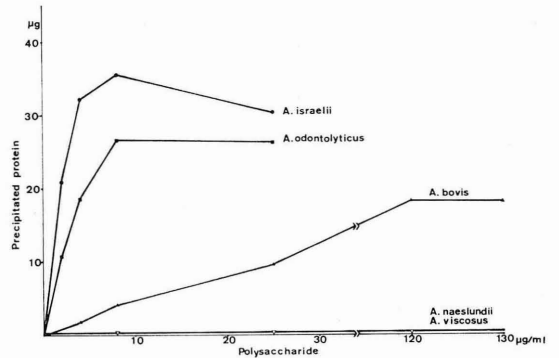


図 14 各種の放線菌より抽出した多糖体と CRP との反応

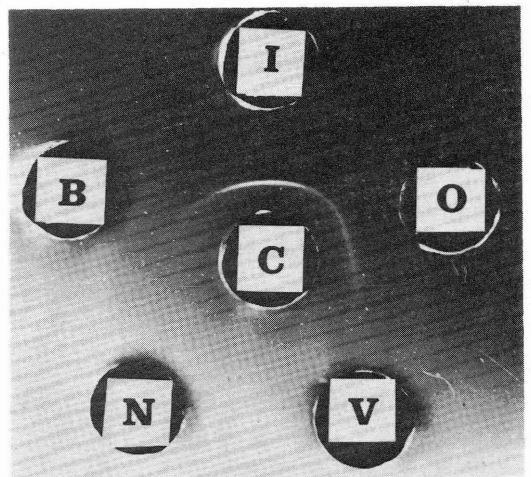


図 15 各種放線菌より抽出した多糖体と CRP との反応

- I: *A. israelii*
- B: *A. bovis*
- O: *A. odontolyticus*
- C: 精製 CRP
- V: *A. viscosus*
- N: *A. naeslundii*

示したが、*A. bovis*の反応は弱く、*A. naeslundii*, *A. viscosus*には全く反応がみられなかった¹⁹⁾。

著者らが *A. israelii* の1菌株について CRP 様の反応活性を認めたとき、これはすべての細菌についての共通構成成分ではないかと考察した。その後 C 多糖体の反応基が比較的単純な構造であることがわかって、さらにその考えを強くした。ところが同じ *Actinomyces* 属のなかに全く反応の認められないものがあり、特に *A. israelii* とは細胞壁構造が近似し、共通抗原もある *A. naeslundii* に反応活性が認められないことは意外であった。

10. おわりに

CRP が急性炎症生体内でどんな役割を果しているのか長い間不明だった。近年この方面の研究も進み、CRP には食作用⁵⁰⁾⁵¹⁾、リンパ球の活性化⁵²⁾と悪性黒色腫細胞の増殖阻止⁵³⁾、血小板機能の抑制⁵⁴⁾⁵⁵⁾、補体との結合⁵⁶⁾などの作用が知られている。また CRP の産生機序についても諸説があり²⁴⁾⁵⁷⁾⁻⁶⁰⁾、Osmand ら⁶¹⁾は免疫 globulin と同一の origin を想定しているが、むしろ C1t, P component, female protein などが pentameric な構造や機能面から CRP との類似性が論議されている⁶²⁾⁻⁶⁶⁾。

しかし C 多糖体が CRP と結合するのは反応基の偶然の一致なのか、両者に何らかの因果関係があるのか不明のままであり、CRP と反応する物質が他の細菌から抽出されたという報告もない。常葉教授の先駆的研究はこれにひとつの示唆を与えるものであり、一時の流行が去った最近の CRP 研究は地道な成果をあげているので、これらの問題が解決され、常葉教授の再評価される日も遠くないと思われる。

文 献

- 1) 小池百蔵：放線状菌病知見補遺。日外会誌，**22**：663-701, 1921.
- 2) 東風睦之：放線状菌症の血清学的反応に関する研究。補体結合反応及び絮状反応 (Aus-

flockungsreaktion) に就て (第1報)。口病誌，**11**：385-402, 1937.

- 3) Neuber, E.: Spezifische Diagnostik und Therapie der Aktinomykose. Klin. Wschr., **19**：736-741, 1940.
- 4) 岡本 繁：放線状菌症の皮膚反応に就て。日本医事新報，**922**：1713-1714, 1940.
- 5) 板倉文弥：嫌気性放線状菌の含水炭素分劃と其沈降反応抗原としての血清診断的意義。第1回報告。其分離方法と化学的性質に就て。実験医誌，**26**：799-819, 1942.
- 6) 板倉文弥：嫌気性放線状菌の含水炭素分劃と其沈降反応抗原としての血清診断的意義。第2回報告。沈降反応抗原としての血清診断的意義。実験医誌，**27**：632-647, 1943.
- 7) Holm, P. and Kwapinski, J. B.: Studies on detection of actinomyces antibodies in human sera by using pure antigenic fraction of actinomyces israelii. Acta Pathol. Microbiol. Scand., **45**：107-112, 1959.
- 8) Georg, L. K., Coleman, R. M. and Brown, J. M.: Evaluation of an agar gel precipitin test for the serodiagnosis of actinomycosis. J. immunol., **100**：1288-1292, 1968.
- 9) 中村平蔵，常葉信雄，那須英司：顎部放線菌症の診断法に関する研究。口科誌，**8**：324, 1959.
- 10) 那須英司：顎部放線菌症の診断法に関する研究。特に血清学的診断法について。口病誌，**26**：425-431, 1959.
- 11) 竹川 桂：放線菌々体成分による悪性腫瘍の血清学的研究について。口病誌，**27**：411-422, 1960.
- 12) Tillet, W. and Francis, T.: Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. J. Exp. Med., **52**：561-571, 1930.
- 13) Abernethy, T. J. and Avery, O. T.: The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation with C-polysaccharide of pneumococcus. J. Exp. Med., **73**：137-

- 182, 1941.
- 14) MacLeod, C. M. and Avery, O. T.: The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. II. Isolation and properties of the reactive protein. *J. Exp. Med.*, **73**: 183-190, 1947.
- 15) McCarty, M.: The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. IV. Crystallization of the C-reactive protein. *J. Exp. Med.*, **85**: 491-498, 1947.
- 16) Wood, H. F., McCarty, M. and Slater, R. J.: The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. V. Physical-chemical properties of the C-reactive protein crystallized by a modified technique. *J. Exp. Med.*, **100**: 71-79, 1954.
- 17) MacLeod, C. M. and Avery, O. T.: The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. III. Immunological properties of the C-reactive protein and its differentiation from normal blood proteins. *J. Exp. Med.*, **73**: 191-200, 1941.
- 18) 新藤潤一: 放線菌々体抽出物の血清学的研究. 特にC反応性蛋白と類似の反応について. *口病誌*, **30**: 280-291, 1963.
- 19) 永瀬 守: Actinomyces 菌体抽出多糖と C-Reactive Protein の反応に関する研究. *日細菌誌*, **35**: 549-558, 1980.
- 20) 常葉信雄, 新藤潤一, 広瀬達男, 日比五郎: 放線菌々体抽出物の血清学的研究 (第4報). *口科誌*, **14**: 272, 1965.
- 21) 常葉信雄, 新藤潤一, 広瀬達男: 放線菌々体抽出物と反応する CRP 様物質について. *生化学*, **37**: 526, 1965.
- 22) Nishimura, K.: Gel diffusion and immunoelectrophoretic studies of C-reactive protein with particular reference to its presence in hemoglobin SS disease. *J. Kyoto Pref. Med. Univ.*, **65**: 1193-1246, 1959.
- 23) Schultze, H. E., Schwick, G., Sonnet, J., Hereman, J. und Michaux, J. L.: Gamma-x-globuline, eine immunoelektrophoretisch nachweisbare γ -globulinekomponente mit beziehung zum C-reactiven Protein. *Klin. Wschr.*, **38**: 62-66, 1960.
- 24) Hurliman, J., Thorbecke, G. J. and Hochwald, G. M.: The liver as the site of C-reactive protein formation. *J. Exp. Med.*, **123**: 365-377, 1966.
- 25) Hornung, M. and Morris, T. M.: Electrophoretic determination of C-reactive protein which appears following surgery. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**: 25-30, 1962.
- 26) Hokama, Y., Coleman, M. K. and Riley, R. F.: The nature of C-reactive protein in acute phase serum: Evidence for an equilibrium from containing a mucopolysaccharide of serum. *J. immunol.*, **98**: 521-528, 1967.
- 27) Hokama, Y., Coleman, M. K. and Riley, R. F.: The immunologic properties and identity of mucopolysaccharides associated with C-reactive protein in acute phase human serum. *J. immunol.*, **98**: 529-535, 1967.
- 28) Hedlund, P. and Brattsten, I.: Electrophoretic analysis of human acute phase protein. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **7**: 99, 1955.
- 29) 松橋 直, 白井美津子: Cellulose acetate 膜, millipore 膜, cellogel を用いる免疫電気泳動法. *日本臨床*, **22**: 2624-2639, 1964.
- 30) Kushner, I. and Somerville, J. A.: Estimation of molecular size of C-reactive protein and Cx-reactive protein in serum. *Biochim. Biophys. Acta*, **207**: 105-114, 1970.
- 31) Hokama, Y. and Riley, R. F.: Purification of C-reactive protein, an acute phase protein of human serum. *Biochim. Biophys. Acta*, **74**: 305-308, 1963.
- 32) Peterson, E. A. and Sober, H. A.: Chromatography of proteins. I. Cellulose ion exchange adsorbents. *J. Am. Chem. Soc.*,

- 78: 751-755, 1956.
- 33) Sober, H. A., Gutter, F. J., Wyckoff, M. M. and Peterson, E. A.: Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum protein on anion-exchange cellulose. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**: 756-763, 1956.
- 34) Gotschlich, E. C. and Edelman, G. M.: C-reactive protein: molecule composed of subunits. *Proc. N. A. S.*, **54**: 558-566, 1965.
- 35) Oliveiria, E. B., Gotschlich, E. C. and Liu, T. Y.: Primary structure of human C-reactive protein. *Proc. N. A. S.*, **74**: 3148-3151, 1977.
- 36) Oliveria, E. B., Gotschlich, E. C. and Liu, T. Y.: Primary structure of human C-reactive protein. *J. Biol. Chem.*, **254**: 489-502, 1979.
- 37) Goebel, W. F., Shedlovsky, T., Lavin, G. I. and Adams, M. H.: The heterophile antigen of pneumococcus. *J. Biol. Chem.*, **148**: 1-15, 1943.
- 38) Hornung, M. O. and Berrnson, G. S.: Some biological and serologic properties of the pneumococcal C-polysaccharide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**: 31-37, 1963.
- 39) Liu, T. Y. and Gotschlich, E. C.: The chemical composition of pneumococcal C-polysaccharide. *J. Biol. Chem.*, **238**: 1928-1934, 1963.
- 40) Gotschlich, E. C. and Liu, T. Y.: Structural and immunological studies on the pneumococcal C-polysaccharide. *J. Biol. Chem.*, **242**: 463-470, 1967.
- 41) Brundish, D. E. and Baddiley, J.: Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem. J.*, **110**: 573-582, 1968.
- 42) Gotschlich, M. O. and Edelman, G. M.: Binding properties and specificity of C-reactive protein. *Proc. N. A. S.*, **57**: 706-712, 1967.
- 43) Volanakis, J. E. and Kaplan, M. H.: Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**: 612-614, 1971.
- 44) Libretti, A., Kaplan, M. A. and Goldin, M.: Precipitine analysis of C-reactive protein by gel diffusion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**: 481-485, 1955.
- 45) Fishel, C. W., Vedros, N. A. and Rothlauf, M. W.: Serologic and fractionation studies of C-reactive protein. *J. Infect. Dis.*, **106**: 174-182, 1960.
- 46) Anzai, T., Sato, K., Fukuda, M. and Carpenter, C. M.: Immunoelectrophoretic patterns of C-reactive protein in serum and in ascitic fluid from patients with cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **120**: 94-98, 1965.
- 47) Croxatto, H. D., Nishimura, T., Yamada, K. and Hokama, Y.: Isolation of Cx-reactive protein by gel filtration and characterization by electrophoresis and immunodiffusion. *J. Immunol.*, **100**: 563-568, 1968.
- 48) Hedlund, P.: Absorption experiments with acute phase protein in human serum. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **45**: 267-274, 1959.
- 49) Slack, J. M.: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., ed. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., P. 660-667, Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1974.
- 50) Hokama, Y., Coleman, M. K. and Riley, R. F.: In vitro effects of C-reactive protein on phagocytosis. *J. Bacteriol.*, **83**: 1017-1024, 1962.
- 51) Kindmark, C. O.: Stimulating effect of C-reactive protein on phagocytosis of various species of pathogenic bacteria. *Clin. Exp. Immunol.*, **8**: 941-948, 1971.
- 52) Hornung, M. and Fritchi, S.: Isolation of C-reactive protein and its effect on human lymphocytes in vitro. *Nature new biol.*, **230**: 84-85, 1971.
- 53) Hornung, M. O.: Growth inhibition of human melanoma cells by C-reactive protein

- (CRP) activated lymphocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **139**: 1166-1169, 1972.
- 54) Fiedel, B. A. and Gewurz, H.: Effects of C-reactive protein on platelet function. I. Inhibition of platelet aggregation and release reactions. J. Immunol., **116**: 1289-1294, 1976.
- 55) Fiedel, B. A. and Gewurz, H.: Effects of C-reactive protein on platelet function. II. Inhibition by CRP of platelet reactivities stimulated by poly-L-lysine, ADP, epinephrine and collagen. J. Immunol., **117**: 1073-1078, 1976.
- 56) Kaplan, M. H. and Volanakis, J. E.: Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. J. Immunol., **112**: 2135-2147, 1974.
- 57) Gottlieb, A. A.: Kinetics of formation of C-reactive protein. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **110**: 568-571, 1962.
- 58) Kushner, I. and Kaplan, M. H.: Studies of acute phase protein. I. An immunohistochemical method for the localization of C-reactive protein in rabbits association with necrosis in local inflammatory lesions. J. Exp. Med., **114**: 961-979, 1961.
- 59) Kushner, I. and Kaplan, M. H.: Studies of acute phase protein. II. Localization of C-reactive protein in heart in induced myocardial infection in rabbits. J. Clin. Inv., **42**: 286-292, 1963.
- 60) Kushner, I. and Volanakis, J. S.: Studies of synovial and serum C-reactive protein in experimental arthritis in rabbits. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **142**: 112-114, 1973.
- 61) Osmand, A. P., Gewurz, H. and Friedenson, B.: Partial amino-acid sequences of human and rabbit C-reactive proteins: homology with immunoglobulins and histocompatibility antigens. Proc. N. A. S., **74**: 1214-1218, 1977.
- 62) Osmand, A. P., Friedenson, B., Gewurz, H., Painter, R. H., Fomann, T. and Shelton, E.: Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry. Proc. N. A. S., **74**: 739-743, 1977.
- 63) Levo, Y., Frangione, B. and Franklin, E. C.: Amino acid sequence similarities between amyloid P component, C1t and CRP. Nature, **268**: 56-57, 1977.
- 64) Pepys, M. B., Dash, A. C., Markham, R. E., Thomas, H. S., Williams, B. C. and Petrie, A.: Comparative clinical study of protein SAP (amyloid P component) and C-reactive protein in serum. Clin. Exp. Immunol., **32**: 119-124, 1978.
- 65) Pepys, M. B., Baltz, M., Gomer, K., Davis, A. J. S. and Doenhoff, M.: Serum amyloid P-component is an acute-phase reactant in the mouse. Nature, **278**: 259-261, 1979.
- 66) Coe, J. E., Margossian, S. S., Slayter, H. S. and Sogn, J. A.: Hamster female protein. A new pentraxin structurally and functionally similar to C-reactive protein and amyloid P component. J. Exp. Med., **153**: 977-991, 1981.