

モルモット血清によるタンニン酸処置 赤血球凝集現象に関する研究

第 2 報

タンニン酸処置赤血球凝集反応に対する諸種物質の影響，
特に血清 Glycoprotein の阻止作用について

金沢大学結核研究所薬理部（主任：伊藤 亮教授）

山 崎 隆 吉

（受付：昭和38年9月30日）

緒 言

伊藤等^{1,2)}は最近、モルモット赤血球を低温でタンニン酸処置を施した後、結核感染モルモット血清と室温で混和すると、赤血球はたちまち著明な凝集を起し遂には管底に沈降するに至るという従来全く未知の赤血球凝集現象を観察報告した。しかもこのタンニン酸処置赤血球（TE）凝集現象は、56°C、30分加熱血清では全々起こらないこと、健常モルモット血清では概して顕著ではないこと、凝集反応が血清の一定の稀釈範囲のみに起こり、血清の高濃度では却って阻止される等の事実から、モルモット血清の中に熱に不安定な凝集因子（Agglutinator）と比較的耐熱性の阻止因子（Inhibitor）の2つの因子があつて、結核動物では両者の力量関係に不均衡が生じた結果、著明なTE凝集

反応が現われるようになったものであると述べた。伊藤等はまた採血時に抗凝血剤（Anti-coagulant）としてヘパリンを使用するとしば凝集反応が現われにくくなることに気がつき、ヘパリンにTE凝集反応阻止的作用のあることを報告した。

これ等の観察に基づいて著者は、一つには血清中の阻止因子の本態究明のための一助として、また他方TE凝集反応の作用機序の解明に資する目的をもって、血清蛋白並びにその他の諸種生体物質や、抗凝血剤、キレート試薬、酵素毒等を含む総計115種の物質について、結核モルモット血清によるTE凝集反応に対するそれ等物質の影響を検索した。ここにその実験成績を報告する。

実 験 方 法

赤血球、血清及び凝集反応などに関する実験方法はすべて伊藤等¹⁾の記載した方式に従った。

1. 赤 血 球.

健常モルモット（体重500-700gm）から心臓穿刺によって採った血液を直ちに1.2倍容量の Alsever 氏液³⁾に混和する。混合液を遠心し（2,500 R.P.M., 5分間）、分離した赤血球を燐酸緩衝液加生理的食塩水（0.85%

食塩水 11に M/10 燐酸緩衝液、pH7.0-7.2, 100ml を加えたもので、以下単に食塩水と称す）で4回洗滌し、最後に食塩水を加えて全量を原血液量に等しくする。

2. タンニン酸処置赤血球浮游液の調製.

下記操作はすべて低温室内（2°±2°C*）で行われた。

* 必ず4°C以下の温度で行うこと！ 4°C以上の温度では赤血球は、タンニン酸処置後の洗滌中に溶血を起して凝集性が低下し、実験に使用し得なくなる。

タンニン酸(局方; 武田製薬)の1:10,000溶液(食塩水に溶解) 40mlに前記洗滌赤血球浮游液 2.0mlを混和し, 冷室内で30分間放置する。次に赤血球を遠心分離し(3,000 R.P.M., 3分間), 食塩水で3回洗滌した後, 食塩水を加えて全量を2.0mlとする。かくして調製したタンニン酸処置赤血球浮游液は氷水中に保存し, しかも調製後できるだけ早く実験に使用することとした。

3. 血清

本研究に使用した血清は結核感染モルモット血清であった。体重400gm前後の雄モルモットに, Sauton 培地に培養した人型結核菌 H37Rv0.2—0.5mg(菌体の水分を濾紙でよく吸除して秤量)を兪蹠部皮下に接種し, 1ヶ月以上経過した後, 感染動物から心臓穿刺によって採血し, 血液を室温にて凝固せしめて血清を分離した。血清は5°C以下で保存されれば, 少なくとも半年間は活性不変である。実験に際しては, 先づ使用血清のTE凝集力を2倍稀釈法によって測定し, その力価に応じて適当に稀釈し, 余り強くないが十分認め得る程度の凝集反応を起こすような稀釈液(1:100—1:250)を使用した。

4. 試薬

- (a) 蛋白質類: Bovine serum albumin (V-Fraction), Ovo-albumin, Egg-albumin, α -Lipoprotein (Bovine serum), β -Lipoprotein (III-O-Fraction, bovine serum), α -Globulin (IV-Fraction, human serum), β -Globulin (III-Fraction, bovine serum), γ -Globulin (II-Fraction, bovine serum), β -Lactoglobulin (Bovine) 及び Glycoprotein (VI-Frac-

tion, bovine serum) は Nutritional Biochemicals Corp., U. S. A. 製品; Glycoprotein (VI-I-Fraction), α_1 -Acid glycoprotein 及び α_2 -Glycoprotein は人血清からの標品であって, 何れも金沢大学理学部山科郁男教授によって精製されたものである。

- (b) その他の試薬類はすべて市販の最純品を使用した。試薬の溶解, 稀釈には食塩水を用いた。

5. TE凝集反応阻止試験

TE凝集反応には遠心沈降管(12mm×100mm)を使用した。被検物質の食塩水溶液 2.0mlに結核モルモット血清稀釈液 2.0mlを加えてよく混和し, これにタンニン酸処置赤血球浮游液 0.2mlを追加して更によく混和した後室温に25分間静置し, その間5分毎に血球凝集の有無を檢視し, 反応の程度を, 被検物質溶液の代わりに食塩水を加えた対照管における凝集反応と比較して, 被検物質による阻止効果を判定した。

TE凝集反応は透過光線によって肉眼的に容易に認められる反応であって, 通常血球混和後5—10分以内に微細な血球凝集として現われ, 凝集血球は急速に融合してその大きさを増すと共に, 漸次管底に沈降するに至る。反応はおよそ25分後には完了する。凝集反応の程度を肉眼的に次のように分類した: 卅, 赤血球の殆んど全部が凝集して管底に沈積した; 卅, 赤血球は凝集を起してはいるが管底には沈降堆積するに至らないか, または極く少量の沈積血球を認める; 卅, 卅, +, 凝集血球の管底に沈積した量に応じて区分する; -, 赤血球の凝集が全々認められない。

実験成績

I 抗凝血剤(Anticoagulants)の影響

伊藤等¹⁾はヘパリンがTE凝集反応に対して阻止的影響を呈することを観察して, 採血時血液凝固を防止するためにヘパリンを使用することは不適當であることを指摘した。そこで著者はヘパリン(武田製薬; 1,00u/ml), Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, disodium 塩を使用)及びクエン酸(Sodium citrate)の3種の抗凝血剤について, 結核血清TE凝集反応に対する影響を比較検討した。第1表はその実験成績を示したものである。

実施法: 食塩水で被検抗凝血剤の2又

は2.5倍逡下稀釈液列をつくり, その2.0ml宛を所要数の試験管にとり, これに結核血清1:100稀釈液 2.0ml宛を加えよく混和した後, 更にタンニン酸処置赤血球浮游液 0.2ml宛を追加混和して室温に静置し, 5分毎に凝集反応を檢視した。

表の成績から明らかなように, 抗凝血剤を加えなかった対照試験管では, 10分後にすでに血球凝集が現われ始め, 逐時反応は著明となり, 25分後には赤血球は殆んど完全に管底に沈降する程度にまで反応は進んだ。ところがヘパリン原液の1:100—1:500稀釈試験管では, TE凝

集反応が完全に阻止され、更に1:1,000稀釈管においても反応の程度は対照に比し明らかに微弱であった。またEDTAの実験においても、その1:100及び1:200稀釈液では凝集は全く起こらなかった。しかしEDTA 1:500濃度では阻止効果は殆んどなかった。以上のヘパリン及びEDTAと趣を異にして、クエン酸は1:100の高濃度でもTE凝集反応に対して少しも影響を与えることはなかった。

これらの実験結果から、TE凝集反応実験には専らクエン酸(Alsever氏液として使用)が抗凝血剤として用いられることになった。

II. 蛋白質及びアミノ酸類の影響.

1. 蛋白質類についての実験.

第2表は各種血清蛋白質を主体とした13種の蛋白質のTE凝集反応に対する影響を検索した実験成績を一括提示したものである。この中で最も注目されるのは、人及び牛血清から分離された2つのGlycoprotein標品(Cohn法によるVI-I-及びVI-Fractionに相当する分画)が、他の蛋白質標品と異なって、極めて強力な阻止作用を發揮したという事実である。即ち、これら2 Glycoproteinでは、第3表の実験成績に例示したように、1:320,000或は1:640,000の高稀釈液においても尚よく阻止効果が認められたのである。その他の蛋白質では、 β -Globulin (1:5,000), Ovo- 及び Egg-albumin (1:500) 並びに α -Globulin (1:400) の4者が多小とも阻止作用——その効力はGlycoproteinに比して遙かに弱い——を呈した外は、何れも1:400—1:1,000の濃度において影響がなかった。しかし、これら陰性成績を示した蛋白質の中で特記すべきことは、第4表の実験成績にも示したように、人血清Glycoprotein分画(VI-I-Fraction)から更に分離精製された α -acid glycoprotein並びに α_2 -Glycoproteinの2主要成分蛋白質が、それらの母体分画であるGlycoproteinの強大な阻止作用とは対照的に、全く無効であったという意外な事実である。しかもこれら2

成分Glycoproteinの混合液もまた同様に阻止効果がなかったことから、原Glycoprotein分画(VI-I-Fraction)の強力な阻止活性がその後の分離精製操作中に破壊されたものか、さもなくば原分画中の未知の微量物質によるものと言わねばならない。

2. アミノ酸類についての実験.

アミノ酸24種についてTE凝集反応に対する影響を検索したが、第5表に示したように、グルタミン酸、ヒスチジン及びリジンの3アミノ酸が1:500または1:1,000の濃度で阻止作用を示したのみであって、他は皆無効であった。

III. 糖類の影響.

ヘパリンのTE凝集反応に対する阻止効果については上にも述べた如くであるが、ヘパリンは化学的にはムコ多糖体に属し、しかもChondroitin硫酸と共に硫酸基を多数に含む特異な多糖体である。ムコ多糖体を含む31種の糖類について、そのTE凝集反応に対する影響を検索した。

第6表はその結果をまとめたものであるが、この表から主要事項を摘記すれば次の如くである。

- (1) ヘパリンと相並んでムコ多糖体硫酸エステルとして重要な生体構成物質であるChondroitin硫酸が1:1,000の濃度まで阻止効果を示したが、その作用はヘパリンに比し甚だ弱かった。
- (2) ムコ多糖体の構成分子であるアミノ糖やウロン酸類の中で、ガラクトザミン、グルクロン酸及びガラクトロン酸が1:500または1:1,000の濃度で阻止作用を呈した。しかし一方グルコザミンやN-アセチルグルコザミンは無効であった。
- (3) 単純多糖体の中ではアラビヤゴムが1:2,000濃度まで阻止作用を示した。

IV. 諸他化合物の影響.

1. 没食子酸及び類似化合物.

TE凝集反応では、タンニン酸処置によって生じた赤血球細胞膜の理化学的性状の変化が、

血清中の凝集因子の作用を誘起するに至った原因であることは疑う余地のないところである。タンニン酸と赤血球との作用関係については古くから知られているにも拘らず、その際細胞膜に起った変化に関しては今日なお十分に解明されていない^{4,5,6}。

著者は、タンニン酸が没食子酸及びその誘導体の配糖体もしくはそれらとフロログルシンの結合体からなる高分子化合物であることから、没食子酸及び類似化合物12種を選んで、TE凝集反応に対するそれら化合物の影響を検索した。第7表はその実験成績を一括したものであるが、ここで特に注目されるのは、没食子酸(1:16,000), Gentisic acid (1:4,000), Protocatechuic acid (1:8,000), 及びサリチール酸(1:4,000)のようなフェノール・カルボン酸型化合物に多小なりとも阻止効果が実証されたことである。なかんずく、没食子酸の阻止効力が最強であったことは、没食子酸がタンニン酸の主要構成分子である事実にかんがみて興味深いものがある。しかし、他方 Vanillic acid, Shikimic acid, Quinic acid 及びパラアミノ安息香酸等は1:500で全く作用がなかった。一方多価フェノール型化合物では、フロログルシンは無効であったが、Protocatechol, Pyrogallol, Hydroquinone 及び Resorcinol では夫々1:1,000, 1:4,000, 1:500及び1:500の濃度で阻止作用が認められた。

2. キレート試薬 (Chelating agents).

考 察

著者は本研究において、結核モルモット血清のTE凝集反応に対する諸種化合物——特に各種生体物質に重点を指向して——の影響性を検索したのであるが、その結果多数の被検物質中唯一血清 Glycoprotein が極めて強力な阻止作用を有することが実証された。

血清 Glycoprotein は近年とみに医学・生物学の各分野で研究者の注目を惹くようになり、特にその量的増減の病態生理学的意義に関しては多数の報告がある^{7,8}。更にもまた Glyco-

抗凝血剤の中でEDTAがTE凝集反応阻止性であること、しかしクエン酸には阻止作用が認められないことについては既に述べた。これら薬剤は何れもいわゆる金属キレート試薬として知られているものである。そこで、その他のキレート試薬類について同様にTE凝集反応に対する阻止作用を検索した。その結果は第8表に示したように、8-Hydroxyquinoline, 及び Pyridoxal phosphate が夫々1:1,000及び1:2,000の濃度で阻止作用を呈したが、他方 α, α' -Dipyridyl (1:500), o-Aminophenol (1:400) 及び蓚酸(1:300)等は阻止作用がないという具合に、個々のキレート試薬によってTE凝集反応に対する作用も区々であった。

3. そ の 他.

第9表は核酸類、酵素毒、抗結核剤など19物質の影響を検べた成績である。この表から明らかのように、下記諸物質に多小ともTE凝集反応阻止効果が認められた。()内は最小有効濃度を示す。

(a) 核酸類:酵母リボ核酸(1:1,000), 2つのデオキシリボ核酸(1:20,000; 1:5,000), グアニール酸(1:4,000)及びATP(1:4,000)。

(b) 酵素毒:モノヨード酢酸(1:2,000), マロン酸(1:10,000)及び2,4-Dinitrophenol(1:5,000)。

(c) 抗結核剤: PAS(1:500)及びKanamycin(1:1,000)。

proteinはヴィールスの赤血球凝集反応に対する阻止物質としてヴィールス免疫学上その意義が現在大いに問題視されている⁹。伊藤等¹⁾²⁾は前回報告でモルモット血清中にTE凝集現象に関与する2つの因子即ち凝集因子と阻止因子の存在を推定し、疾病罹患によって両因子の力量関係に不均衡が生じ、その結果、健康状態では不顕性であったTE凝集反応が顕現するに至る、と論述したのであるが、本研究によって血清 Glycoprotein 分画に強力なTE凝集阻止作

用が実証されたことは、まさに阻止因子の实在性を裏付ける有力な証拠を提示したものと云えよう。

ところで阻止作用が実証された血清 Glycoprotein 標品は化学的には単一性ではなくていわゆる Cohn 法 VI-I-Fraction に相当するものであるが、この分画を更に精製して得られた α_1 -Acid glycoprotein 及び α_2 -Glycoprotein の両者には阻止作用が全く無かったことは、上にも述べたように、若し分離操作による阻止活性の破壊ということを除くすれば、VI-I-Fraction 中にはこれら α_1 - 及び α_2 -Glycoprotein 以外になお未分画の存在する可能性も考えられるのであって、血清蛋白化学上極めて重要な成分を含むものである。

その他の供試物質の中には多小とも TE 凝集反応に対し阻止効果を示したものも少なくなか

結

蛋白質、アミノ酸、糖類、核酸及びヌクレオチド類、抗凝血剤、キレート試薬、酵素毒、抗結核剤等を含む総計 115 種類の物質について、結核モルモット血清によるタンニン酸処置赤血球凝集反応に対するそれら諸物質の影響を検索して、

(1) 人及び牛血清 Glycoprotein (Cohn 法 VI-I-Fraction) が強力な阻止作用を發揮する物質であること、またこれと比べては微力ではあるが、

(2) 抗凝血剤ではヘパリン及び EDTA が阻

ったが、Glycoprotein の強大な阻止作用に比べていずれも甚だ微力であった。ただ TE 凝集反応における金属イオンの参与性の問題と関連して、キレート試薬の影響性が注目されたのであるが、実験成績から明らかなように、EDTA、8-Hydroxyquinoline や Pyridoxal phosphate 等の如く阻止作用を示したものもあったが、一方ではクエン酸、蔞酸、 α, α' -Dipyridyl、o-Aminophenol 等の如く阻止作用のないものもあって、この成績からは金属イオンの意義について決定的な結論を得ることはできなかった。

最後に、ヨード酢酸、マロン酸及び 2, 4-Dinitrophenol のような酵素毒に弱いながらも阻止の効果が認められた事は、TE 凝集反応の作用機序の観点から考えてはなほ興味深いものがある。

論

止効果を示した、しかしクエン酸は影響がなかった、

(3) 酵素毒では、モノヨード酢酸、マロン酸及び 2, 4-Dinitrophenol が阻止作用を示した、

等の重要事項を実証した。

本研究を遂行するに当って貴重な Glycoprotein 標品を分与していただいた金沢大学理学部山科郁男教授の御好意に対し衷心感謝の意を表します。

尚本研究の遂行には文部省科学研究費の補助を受けた。

文

- 1) Ito, R. and Akiyama, M.: Jap. J. Tuberc., 10, 102, 1962.
- 2) Ito, R. and Akiyama, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 88, 553, 1963.
- 3) Boyden, S. V.: J. Exp. Med., 93, 107, 1951.
- 4) Reiner, L. and Fischer, O.: Z. Immun.-forsch., 61, 317, 1929.
- 5) Hunter, F. R.: J. Cell. Comp. Physiol., 55,

献

- 175, 1960.
- 6) Gustavson, K. H.: The Chemistry of Tanning Processes, Academic Press Inc., N. Y., 1960.
- 7) Winzler, R. J.: Plasma Proteins, I, 309, 1960.
- 8) 泉邦彦: 蛋白質・核酸・酵素, 7, 295, 1962.
- 9) Kathan, R. H. et al.: J. Exp. Med., 113, 37, 1961.

Table 1
Effect of anticoagulants on the tanned erythrocyte agglutination
of tuberculous guinea-pig serum

Anticoagulant	Time of reading	Dilution of agent					Control
		1: 100	1: 200	1: 500	1: 1,000	1: 2,000	
Heparin (1,000U/ml)	5 min	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	±	±
	15	-	-	-	+	++	++
	20	-	-	-	++	+++	+++
	25	-	-	±	+++	+++	+++
Sodium citrate	5	-	-	-	-	-	/
	10	±	±	±	±	±	
	15	++	++	++	++	++	
	20	+++	+++	+++	+++	+++	
	25	+++	+++	+++	+++	+++	
EDTA	5	-	-	-	-	-	
	10	-	-	-	±	±	
	15	-	-	++	++	++	
	20	-	-	+++	+++	+++	
	25	-	-	+++	+++	+++	

Each tube contained 2 ml of a 1:100 dilution of tuberculous serum, 2 ml of a serial dilution of anticoagulant and 0.2 ml of tanned erythrocyte suspension. In a control tube, anticoagulant was replaced with saline.

Grades of hemagglutination: ###, almost complete settlings of the red cells; ±, clumpings with little or no settlings; ++, +, intermediate grades of settlings; -, no agglutination.

Table 2
Effect of various proteins on the tanned erythrocyte agglutination
of tuberculous guinea-pig serum

Protein	Concentration	Inhibiting effect
Bovine serum albumin (V-Fraction)	1: 400	-
Ovo-albumin	1: 500	+
Egg-albumin	1: 500	+
α-Lipoprotein (bovine serum)	1: 1,000	-
β-Lipoprotein (III-O-Fraction, bovine serum)	1: 1,000	-
α-Globulin (IV-Fraction, human serum)	1: 400	+
β-Globulin (III-Fraction, bovine serum)	1: 5,000	+
γ-Globulin (II-Fraction, bovine serum)	1: 500	-
β-Lactoglobulin (bovine)	1: 400	-
Glycoprotein (VI-I-Fraction, human serum)	1: 640,000	+
Glycoprotein (VI-Fraction, bovine serum)	1: 640,000	+
α ₁ -Acid glycoprotein (human serum)	1: 5,000	-
α ₂ -Glycoprotein (human serum)	1: 5,000	-

Table 5
Effect of amino acids on the tanned erythrocyte agglutination
of tuberculous guinea-pig serum

Amino acid	Concen- tration	Inhibiting effect	Amino acid	Concen- tration	Inhibiting effect
DL-Alanine	1: 400	-	Lysine	1: 500	+
Glycine	1: 400	-	Hydroxylysine	1: 500	-
DL-Serine	1: 400	-	DL-Isoleucine	1: 500	-
DL-Threonine	1: 400	-	L-Leucine	1: 500	-
L-Tryptophane	1: 400	-	L-Methionine	1: 500	-
Glutamic acid	1: 500	+	L-Proline	1: 500	-
L-Asparagine	1: 500	-	L-Hydroxyproline	1: 500	-
Aspartic acid	1: 500	-	DL-Phenylalanine	1: 500	-
Arginine	1: 500	-	L-Tyrosine	1: 2,000	-
Histidine	1: 1,000	+	DL-Valine	1: 500	-
DL-Citrulline	1: 500	-	L-Glutamine	1: 500	-
DL-Ornithine	1: 500	-	<i>r</i> -Aminobutyric acid	1: 500	-

Table 6
Effect of carbohydrates on the tanned erythrocyte agglutination
of tuberculous guinea-pig serum

Carbohydrate	Concen- tration	Inhibiting effect	Carbohydrate	Concen- tration	Inhibiting effect
Heparin (1,000 U/ml)	1: 1,000	+	D-Xylose	1: 250	-
Chondroitin sulfate	1: 1,000	+	Inosit	1: 250	-
D-Glucosamine	1: 500	-	D-Mannit	1: 250	-
Galactosamine	1: 500	+	Sorbit	1: 250	-
N-Acetylglucosamine	1: 500	-	Glucuronic acid	1: 500	+
Glucose	1: 200	-	Glucuronolactone	1: 500	-
Galactose	1: 200	-	D- α -Galacturonic acid	1: 1,000	+
Lactose	1: 250	-	α -Glucose-1-phosphate	1: 1,000	-
Saccharose	1: 250	-	Potassium hyaluronate	1: 500	-
Maltose	1: 250	-	Dextrin	1: 200	-
Fructose	1: 250	-	Arabic gum	1: 2,000	+
Sodium alginate	1: 1,000	-	Mannose	1: 250	-
L-Arabinose	1: 250	-	Inulin	1: 500	-
D-Raffinose	1: 250	-	Glycogen	1: 500	-
L-Rhamnose	1: 250	-	Dextran	1: 500	-
Trehalose	1: 250	-			

Table 7

Effect of various substances on the tanned erythrocyte agglutination
of tuberculous guinea-pig serum (I)

Substance	Concentration	Inhibiting effect
Gallic acid	1 : 16,000	+
Gentisic acid	1 : 4,000	+
Protocatechuic acid	1 : 8,000	+
Salicylic acid	1 : 4,000	+
Vanillic acid	1 : 500	-
Shikimic acid	1 : 500	-
Quinic acid	1 : 500	-
p-Hydroxybenzoic acid	1 : 500	-
Phloroglucin	1 : 500	-
Protocatechol	1 : 1,000	+
Pyrogallol	1 : 4,000	+
Hydroquinone	1 : 500	+
Resorcinol	1 : 500	+

Table 8

Effect of various substances on the tanned erythrocyte agglutination
of tuberculous guinea-pig serum (II)

Substance	Concentration	Inhibiting effect
Citric acid	1 : 100	-
EDTA	1 : 500	+
8-Hydroxyquinoline	1 : 1,000	+
α, α' -Dipyridyl	1 : 500	-
o-Aminophenol	1 : 400	-
Pyridoxal phosphate	1 : 2,000	+
Oxalic acid	1 : 300	-
Succinic acid	1 : 250	-
Fumaric acid	1 : 250	-
Tartaric acid	1 : 200	+
Anthranilic acid	1 : 2,000	+
p-Aminobenzoic acid	1 : 500	+
Glutaric acid	1 : 500	+
Pyruvic acid	1 : 500	-
Malic acid	1 : 500	+

Table 9
Effect of various substances on the tanned erythrocyte agglutination
of tuberculous guinea-pig serum (III)

Substance	Concentration	Inhibiting effect
Yeast ribonucleic acid	1 : 1,000	+
Desoxyribonucleic acid from calf thymus	1 : 20,000	+
Desoxyribonucleic acid from sperm	1 : 5,000	+
Guanylic acid	1 : 4,000	+
Guanosine	1 : 1,000	-
Adenylic acid	1 : 1,000	-
Adenosine triphosphate (ATP)	1 : 4,000	+
Adenosine	1 : 1,000	-
Cytidylic acid	1 : 1,000	-
Cytidine sulfate	1 : 1,000	-
Uracil	1 : 1,000	-
Sodium fluoride	1 : 1,000	-
Monoiodoacetate	1 : 2,000	+
Malonate	1 : 10,000	+
2,4-Dinitrophenol	1 : 5,000	+
Dihydrostreptomycin sulfate	1 : 500	-
Isoniazid	1 : 500	-
p-Aminosalicylate (PAS)	1 : 500	+
Kanamycin	1 : 1,000	+