日本脳炎ウイルスの組織培養に関する研究

第 3 報 培養組織細胞に及ぼす日本脳炎ウイルスの作用

永 井 勝 次

京都府立医科大学微生物学教室 (主任 鈴木成美教授)

(受付: 2 月 14 日・1958 年)

緒 言

Virus はそれ自身自己増殖 (Self-multiplication) の為の酵素系を一切もっていない点で他の細菌, *Rickettsia*, および *Protozoa* の細胞内寄生とは異っている。即ち Virus は細胞内自己増殖系の自己増殖を営むものである。Virus は核酸を含んでいる自己増殖系故 Virus が細胞のなかで増殖するのは結局 Virus の核酸と蛋白が細胞のなかで合成蓄積されることを意味するものと思われる。Virus の侵入によつて細胞の核酸代謝がどのようにかきみだされるか又は Virus が細胞のどのような部位に寄生してその増殖のための核酸合成を促進するのか又は Virus は細胞の核酸を利用してどうして Virus の核酸につくりかえるのか, 又は Virus 核酸の合成と Virus 蛋白合成との関係はどうか等の疑問に対しては今迄多くの研究がある。

Virus の寄生する宿主細胞はその細胞の代謝機構が攪乱せられ形態学的には増生又は変性と云う共通的な細胞病変を生ずることになる。すなわち Virus の増殖が細胞に増殖的的刺激をおよぼし細胞が局限に増殖して腫瘍を形成するもの又は他方には破壊的に作用して細胞の変性, 壊死を起すものである。これを両極端として総べての Virus 性病変を配列し得ることは既に Rivers の説く処である。又更に大切な特性は Virus はどの細胞内でも増殖出来るものでなく一定 Virus に対しては特定の臓器組織細胞が特に強い感受性 (Susceptibility) を有しその Virus の増殖に合致した代謝機構を有する生体の細胞内でのみ増殖出来ることである。このことから宿主選択と更に宿主体内でも所謂感受性細胞内でのみ増殖出来ることである。即ちこのことは生体における臓器向性と云う性質が理解出来る。Virus が宿主細胞において増殖する場合細胞内寄生という本来の特性からしても Virus

はまず細胞表面に吸着結合し更に細胞内に侵入して原形質又は核内で増殖して始めて感染が成立するのである。その Virus は動物性, 植物性或は細菌性 Virus 何れを問わず宿主細胞の代謝機構をかりなければ増殖出来ないからその増殖は専ら宿主細胞の代謝の活性と共軌して行われるものと考えられる。

新保教授は牛痘 Virus を用いて TC を行つた結果牛痘 Virus は試験管内において吸着はかなり無選択的であり脾, 肝の如き細網内皮系の細胞はもとより辜丸, 脳, 腎の如き実質細胞でも増殖すると云う。又余の JBE-Virus の TC を実質細胞および細網内皮系の細胞を用い実験した結果無選択的に増殖した。注目すべきことは TC 実験と生体感染との間に Virus の増殖に対する Organ specificity が一致しない点があるが生体内では真の Tropism 以外の因子, 生体器官に特有な barriers の影響がある為と思われる。

又新保教授は JBE-Virus をマウス脳内に接種すると脳に起る病変は血管, 神経膠質細胞, 脳神経細胞の変化で之は同時に 3 日目に現われ発症と共に増強して間もなく死亡する。血管変化の主なものは内皮細胞の腫大と血管周囲の神経膠質細胞の集積で炎症細胞はまず認められず又形質細胞も少い, 神経細胞の変化は原形質内に空胞形成が起り Nissl 小体の変化, 消失が認められ更に細胞の崩壊乃至は脱落が見られると云っている。又狂犬病固定毒接種家兎においてもこの関係が著しい。このことに

NAGAI Katuzi: Study on the Tissue Culture of Japanese B Encephalitis Virus. Part III On the Effect of Japanese B Encephalitis Virus Upon the in Vitro Cultured Tissue Cells. Department of Microbiology, Kyoto Pref. Med. Univ. —Jap. J. of Bact., 13 (9), 763-769, 1958.

関して天野博士は Virus が目的臓器に侵入してしまう迄には何等適当な間質反応の起る余裕のないことを指摘している。

JBE-Virus が生体内に侵入した場合 Viraemia は初期からみられ且 Virus の分布状態は潜伏期では各臓器にかなり一様で Ectromelia および牛痘 Virus の様に細網内皮系細胞内の Virus 量は特に多量ではなく更に注目されるのは脳では感染初期から Virus が証明され而も潜伏期中ではあまり増殖が認められないで発症と同時に急激に Virus が増殖する点である。このことは潜伏期と発症期の Virus の増殖部位の差異を示唆するもので端的に云えば潜伏期は共通的に血管系を中心に存在することを意味するものではないかと考えるものである。脳は blood-brain barrier の鞏固な特殊の臓器であるので Virus は簡単には血管壁を通過出来ない、Virus は先ず血管内皮に定着してある程度増殖して血管壁を損傷することによって血管を通過し脳実質に達して著明な増殖を示すものと思われる。又 JBE-Virus はある程度の endotheliotropic の性格を有するものと予想せられる。

併し T C の際観察される CP-effect においては Virus を培養していると Virus が組織細胞に侵入増殖するにつれて寄生組織細胞が変性を来し遂に破壊することは Enders, Florman, Huang 等が馬脳炎 Virus の培養の際認めている。この Virus の細胞変性乃至破壊作用は Virus の種類により異り又全く細胞を障害しないものもある。この作用のつよいものはそれを Virus 増殖の指標とすることが出来る。例えば CP-effect の強いものは Polio Virus, 馬脳炎 Virus であり CP-effect の弱いものとしては牛痘 Virus がある。又変性作用を殆んど呈しないものに Influenza Virus がある。(但し Neurotropic strain を除く)。培養組織に培養された Virus が Cp-effect を有するならば in vitro で中和試験等を施行しうる利点がある。in vitro と in vivo とでは細胞の代謝状態が異なるが両者を同一の条件で比較推論することは無理であり且許されないが Virus の増殖と感染細胞の変性、破壊現象は Virus の性質および生体内増殖機序とその病原学的考察に示唆するところが少くない。

Enders 等は細胞浮遊培養法の実験で Virus 感染組織を観察して細胞に変性を認めた即ち感染組織を染色すると明らかに細胞質の難染色性、核濃縮等の特異的変性をみとめ又 Virus 培養組織を固着培養に移しても全く増殖しないことを認めている。これは Polio Virus が培養組織内で増殖した結果細胞の増殖能が傷害されたことを示すものであるが同様の所見は第 1 回報告でも述べたよう

に JBE-Virus の T C における培養液の pH の観察によつても得られた。旺盛な増殖組織は代謝の結果培養液中の糖分を消費分解して酸を発生するが変性に陥つた組織は酸産生が減退しているので培養液の pH の低下が対照の非接種組織に比べて少いわけである。JBE-Virus においても CP-effect の判定は困難な面がありその CP-effect については否定されておるが T C においては本 Virus は増殖可能であると共に CP-effect の面について観察を行いこれを認めたので報告する。

JBE-Virus の CP-effect

実験材料および実験方法

実験材料

T C の実施方法は第 1 報の方法に従い、培養組織は猿腎、C E, 牛胎児および人胎児組織を用いた。

実験方法

R T C および T C C ともにカバーグラスを細長く切つて培養管の中に挿入しその上にプラスマ或は組織片、細胞を培養する所謂短冊培養を行い培養後短冊即ち組織の増殖固着したカバーグラスを取り出して細胞の観察を行った。細胞の染色には Giemsa 染色, H-E 染色, Sudan black 染色, Pappenheim の Methylgreen-pyronin 染色を行った。

1) 固定

固定を行う前に培養した短冊を生理的食塩水、リンゲル液或は P B S にひたし 37°C の孵卵器内に 10 分間入れるか或いは室温で 20 分間おいて液を捨て新しく液を入れ 2 ~ 3 回くりかえしよく洗う等いろいろの固定法があるが本実験では Ringer-Formalin 液即ち中性 Formalin 1 ~ 2 液に Ringer 8 ~ 9 容混和した液中に 1 時間以上固定後流水で 1 晩水洗後蒸留水で 30 分水洗してから染色した。

2) Giemsa 染色

蒸留水 1 ml に Giemsa 1 滴を加えて 30 ~ 60 分染色するか又は蒸留水 5 ~ 10 ml に Giemsa 1 滴を加えて 4 ~ 6 時間染色した。

3) H-E 染色

材料を Haematoxylin で 10 ~ 15 分染色後流水で 15 分間(濃厚に染まつた場合は塩酸アルコールで適当に脱色し水洗)水洗後 Eosin で 1 ~ 2 秒染色した。

4) Sudan black 染色

材料を 50% アルコールで 2 ~ 3 分浸した後 Sudan black 染色液で 5 ~ 10 分間染色後 50% アルコールに 1 分間浸し水洗, Carmin で後染色を行い水洗し Glycerin で

封入し鏡検した。

5) Methyl Green-pyronin 染色

材料を無水アルコールで15~20分間固定し Methyl green-pyronin 染色液で15~30分染色して観察した。

実験成績

核酸の変化

Hydén によると細胞が Virus に感染するとその病的生産物が細胞の中に現われる。この生産物はすべて核酸と蛋白とを含む。これらの異常核蛋白は感染中に増殖した Virus そのものと考えてよい。Polio Virus が神経細胞内に侵入するとまず核仁を刺戟して細胞の蛋白と核仁の核酸含量が増加する。核仁の核酸と蛋白は増加し同時に核仁の大きさも非常に増しやがて核の中一帯に核酸と蛋白を含み正常にはみられない異物質がつまってくる、この核酸はRNAである。つぎに核仁が崩壊像を呈し始め核蛋白が減少し同時に原形質内の核酸も消失し蛋白も減少する、この時に Nissl 小体の融解が見られるようになると思われる。而してこの間でも核内の前記異物塊の核酸と蛋白含量は減少しない。このように細胞質の中の核蛋白の消失と異物塊の核蛋白の生成とは関連性がある。即ち Virus 感染がおこるとそれに刺戟されて寄生細胞の中で蛋白形成がおこりそれがある程度に達すると病的な物質が Virus の種類により DNA 或は RNA の形で現われ次第に増大する。生成された蛋白は Virus 自身の増殖に使われるがその生成は核酸の助力でおこなわれる。余が JBE-Virus の TC 実験で Methyl green-pyronin 染色で観察した結果は第1表の如くである。未だ満足すべき結果をえていないが CE, 牛胎児, 猿腎細胞等について比較検討したが Virus 接種後24時間目の組織の Pyronin 染色性は対照と変わらないが2日以後になると Pyronin 好性が増強し更に核内に赤染した塊状物が見られるにいたり又原形質内の Pyronin 好性もこれと平行して増強している。併し培養後5日になると空胞の出現等による細胞の変化により RNA が減少する成績が得られた又これは核酸が低分子化するものと思われる。

核の大きさの変化

細胞内における核は円形又は楕円形で周囲の原形質とはや光線屈折率を異にすることによつて区別される。Canti によると CE の脈絡膜を培養した際該細胞の輪廓は特に中心部で鮮明であるが突起の尖端ではやゝ幽かとなりしばしば糸状を呈する。核は明らかな線で原形質と区別され核仁が認められる。又脂肪顆粒その他大小の顆粒、帯状の色素顆粒、線維状のミトコンドリアなどの存

在が明らかに認められることを報告している。これらの顆粒はいづれも運動を営んでいる。

余はこれらの種々な機能を有する核は Virus 接種後如何に変化するかを観察した結果は第2表に示す成績を得た。用いた組織は猿腎, CE の筋組織, 牛胎児の腎で培養後5日間観察した。即ち猿腎, CE の筋, 牛胎児の腎において対照に比し Virus 接種により感染した細胞は核が日が経つにつれて次第に増大するのが見られた。このことは Virus 接種により細胞がその状態を続ける為に必要以上に新陳代謝の亢進を来したものと推察され従つて核の大きさの変化は細胞変化の指標として重要なものと思われる。

培養による細胞変化

培養組織を植替えることなく又培養液を更新せずに培養を続けるとその細胞は変性又は壊死に陥る。これは養

第1表 JBE-Virus 感染組織細胞の Methyl green-pyronin 染色性

Virus 接種後の 日数	1	2	4	4	5
可検組織					
Virus 感染組織	+	++~+++	++	++	++~+++
Control	+	+	+	+	+

註: Pyronin 好染性の強いもの……………+++

Pyronin 好染性の中等度のもの……………++

Pyronin 染色性が対照と等しいもの……………+

第2表 JBE-Virus 感染細胞の核の大きさの変化

(単位: μ)

種 別	培養日 数	1	2	3	4	5
Virus 接種	猿, 腎	12.8	15.0	18.2	18.5	18.6
	鶏, 筋	11.3	12.2	13.6	14.5	15.7
	牛, 腎	12.5	13.3	13.6	15.7	16.4
Control	猿, 腎	8.7	12.7	14.2	16.7	17.0
	鶏, 筋	8.2	9.0	9.3	9.6	9.9
	牛, 腎	9.2	10.7	12.1	13.5	14.0

分の減少のほかに有毒な新陳代謝産物の堆積, pH の変化等が原因であるがこれら諸変化の現われる時間は培養条件の他培地の組成, 容器の大小, 細胞の種類等に関係する。細胞変性としては原形質内に光線屈折力の強い顆粒が先ず現われる。本顆粒は次第に数と大きさを増すとともに空胞を生じ著しい場合には原形質は網眼のように見える。更に時が経つと細胞は突起を失つて円くなる。この傾向は核質にもおよんで行くが変性の弱い時に

組織の植替又は栄養液の更新を行えば細胞変化から救うことが出来るが核質に変性がおよんだ後には多くはその効果がなく細胞は壊死に陥ってしまう。又培養細胞の変性と共に脂肪顆粒の現われることはよく知られているところである。併し余が行った実験において新しく栄養液を替えて細胞を刺戟しない状態で培養したものとこれに JBE-Virus を培養したものとを比較した結果対照においても核の周辺部に脂肪顆粒の存在を認めるが本 Virus を接種したものは対照に比し脂肪顆粒が多く認められると共に日が経つにつれて原形質全体に脂肪顆粒が増加し原形質の崩壊した部分にも顆粒が認められ更に進んでくると核内にも脂肪顆粒の存在が認められる様になった。脇元、前田は CE の心臓、脾、線維芽細胞および家鶏粘液肉腫の培養時における細胞内の脂肪物質について研究を行い培養組織細胞内の顆粒は培養時期によってその性状を異にし、初期には中性脂肪の反応を呈しなかつた顆粒が次第にその性質を備えるようになり末期には狭義の類脂肪およびコレステリンエステル反応を呈してくることを報告している。脂肪顆粒と同様培養の日数の経過と共に空胞形成も多くなり原形質は網眼の如くなるが対照に比し Virus を接種した細胞は多く又大きな空胞形成を有する様になり日数の経過と共に著明となり対照と容易に区別がつくようになる。又原形質においても同様 Virus を接種した細胞には原形質崩壊も認められる。特に興味のあるのは Virus を接種した細胞の H-E 染色を行った場合 Eosin 好性顆粒が認められた。これは細胞の原形質の変性による代謝異常産物か或は Virus による所謂封入体と推測されるがこれは今後更に追究すべき問題と思われる。

総括並びに考按

TC を応用して TCID (Tissue culture infective dose 組織培養感染価) 或は TCD (Tissue culture dose 組織培養価) により Virus の毒力を測定出来ることは各 Virus により又 Virus 学において絶大な期待であり要望されている。これらの事は接種 Virus の濃度により現われるまでの時間に差があり 24~48 時間以内に細胞の破壊が現われるのは濃厚なものであるが非常に少量の場合には 5~7 日後に時としては 2 週間も経ってから破壊変性が見られることもある。Polio Virus において Weller, Robbins が感染価を TC により始めて測定し Le-dinko, Scherer 等を感染価の測定を行っている。TC におけるところの Cp-effect について一番重要なものは細胞の破壊でこの様式については各 Virus により異つ

ている。Rowe, Hilleman の記載する APC-Virus においては初期において細胞の円形化および融合、後期における変性細胞の凝集および剥脱が曲型的であり又 Polio Virus においては細胞の円形化が著明である。又 Enders 等が行っている Measles Virus においても同様である。TC における CP-effect については前に述べた如く数種の Virus において認められている。しかし JBE-Virus においては CP-effect の存在が否定的であるが先ず最初に細胞の変形等の型でなく CP-effect の定説として“培養組織の変性壊死”をもつてなされているが而しながら TC を行つた正常細胞が Virus の感染によつて Macro 或は Micro-scopic に何等かの変化を示した場合これも広義の意味において CP-effect の中に含ませるならば JBE-Virus も又或程度の CP-effect を持つものと云うことが出来る。

又 TC 実験で JBE-Virus を接種培養した細胞は対照に比し 5~6 日頃になると早く剥脱が認められることは確実でありこれらの細胞に Pylonin 好性の物質の増加することは 2~4 日頃が多く対照に比較して多く認められる。又細胞の核の大きさは細胞の機能の充進を意味しておるが一般に Virus 接種細胞は対照に比し核が大きい。又これらの細胞を染色して観察すると脂肪の増加が対照に比し多く空胞化が増してきており変化の強いものでは原形質崩壊も認められた。

Hydén の研究によると Molluscum Contagiosum や鳥痘 Virus は DNA をふくむ Virus であるが、これが皮膚に寄生すると、皮膚の細胞質の PNA の濃度が高まり、核仁も膨大し細胞全体に蛋白合成の活性が高まり細胞質は非常に大きくなり、次第に細胞質に DNA を含んだ塊状物が出現しはじめ、さらに増大して遂には細胞全体に広がるため核は萎縮して片すみにおしやられ、最後に細胞は崩壊する。これに反し DNA を含む狂犬病や Verruca vulgaris Virus の寄生の場合は神経細胞および皮膚細胞の核仁のまわりにある異質染色質の部分から DNA が増加しはじめ、最後に核全体に広がる。このときにも核仁の増大傾向が主で細胞質の蛋白合成は大して認められない。又主として PNA を含む Polio Virus の寄生の際は神経細胞の核仁が特に刺戟せられて肥大化し、その後核のなかに PNA を含んだ異常な塊状物が出現するのが認められる。

以上の例を通覧するに細胞は Virus の寄生に際してそれ自身 PNA を合成して蛋白合成機能が一時的に充進されるが、この合成された蛋白質は主として Virus 合成に使われるもののようである。すなわち Virus の寄

1. H-E 染色, 対照 3 日間培養

2. H-E 染色, 空胞変性の認められるもの。
10⁻² Virus 稀釈液接種, 2 日間培養

3. H-E 染色, 空胞変性の強いもの。10⁻²
Virus 稀釈液接種, 2 日間培養

4. H-E 染色, 変性の比較的強いもの。
10⁻² Virus 稀釈液接種, 3 日間培養

5. H-E 染色, 変化が強く一部に原形質崩壊が
起つているもの。10⁻² Virus 稀釈液接種,
4 日間培養

6. H-E 染色, Eosin 好性顆粒の出現を示す,
10⁻² Virus 稀釈液接種. 4 日間培養

7. Sudan black 染色, 対照

8. Sudan black 染色, 比較的变化の弱いもの,
 10^{-2} Virus 稀釈液接種, 2日間培養

9. Sudan black 染色, 比較的变化の強いもの,
 10^{-2} Virus 稀釈液接種, 3日間培養

10. Sudan black 染色, 比較的变化の弱いもの,
 10^{-2} Virus 稀釈液接種, 4日間培養

11. Sudan black 染色, 比較的变化の強いもので核内にも脂肪が生
じ原形質崩壊を認める。 10^{-2} Virus 稀釈液接種, 4日間培養

生の際には細胞を構成する核蛋白から Virus が合成されるのではなく先ず細胞の蛋白合成活性が亢進されそれが Virus 蛋白合成の経路にきりかえられるものと考えられる。Molluscum contagiosum では細胞質の蛋白合成のところで切りかえがおこり、狂犬病, Verruca では核のなかで切りかえがおこり、PNAを含む単純な Polio や Looping ill Virus では細胞の蛋白合成の中枢ともいうべき核仁や異質染色質の部分でこの切りかえが起るものと推定せられる。そしてこのようにして切りかえの起つた場所を中心として Virus 核蛋白が蓄積することになる。このように細胞のなかで増殖する動物性 Virus の殆んど凡ては細胞の核蛋白ないし蛋白合成装置に寄生して増殖し、その場合細胞の PNA が Virus 蛋白合成に利用されるわけであるが、Virus 自体の核酸 (DNA または PNA) が Virus 増殖と如何なる関連性をもつかはまだ不明であると述べている。

このように Virus 感染細胞の組織化学的研究は Virus 感染における Host-parasite relationship を知る上に極めて重要であるので今後 JBE-Virus 感染細胞の組織化学についても今後更に詳細な研究が要望せられる次第である。

JBE-Virus の培養組織細胞に対する所謂 CP-effect は Polio Virus, Coxsackie Virus の場合のものと比し極めて軽微であつて定型的な崩壊も見られず、これを応用して TC 法による JBE-Virus の感染価の測定、免疫血清の中和抗体価測定等を行うことは現段階においてまだ期待出来ないようである併し本 Virus も TC によりある程度培養細胞に対する変性現象を来すことは明らかである。

第 4 章 結 論

1) 日脳 Virus を接種培養した組織細胞は軽微ではあるが一程度の CP-effect を示す。

2) すなわち感染細胞は対照に比し早くより剥脱を始め、Pyronin 好染物質が原形質内に著しく増加し培養日数の進むにつれ細胞核の膨大化、細胞の脂肪変性並に空胞変性が著明となり時に原形質崩壊も認められた。

3) しかしながら組織培養法による日脳 Virus の感染価測定、免疫血清の中和抗体価の測定にはなお今後の検討を要する。

拙筆に臨み終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師 鈴木教授に満腔の謝意を表し併せて御援助を戴いた予研

北岡部長、本大学病理学教室陳講師に感謝する。

(本論文の要旨は昭和 32 年 8 月第 5 回日本ウイルス学会において報告した)

参 考 文 献

- 1) Melnick, J. Exp. Med., 104, 3, 289~304, 1956.
- 2) Harold S. Ginsberg: J. Exp. Med. 105, 3, 175~219, 1957.
- 3) Huang, C. H.: J. Exp. Med. 78, 111, 1943.
- 4) Canti, A.: Arch. Exper. Zoolforschg 8, 133, 1929.
- 5) Enders, J. F. Weller, T. H. & Robbins, F. C.: Feder. Proc. 11, 467, 1952.
- 6) Weller, T. H. Enders, J. F. Robbins, F. C. & Stoddard, M. B.: J. Immunol. 69, 645, 1952.
- 7) 福見秀雄他: 第 4 回日本ウイルス学会総会, 1956.
- 8) 前田松茂: 日薬誌, 22, 80, 1936.
- 9) 脇元秀義, 前田松茂: 日微病誌, 24, 17, 1930.
- 10) 木村廉: 組織培養, 1955.
- 11) 勝田甫: 組織培養法, 1955.
- 12) 松本稔: 一般ウイルス学, 1955.
- 13) 高津忠夫: ポリオ, 1956.
- 14) William, F. Scherer, M. D. & Jerome T. Syverton: Am. J. Path. 30, 1057~1067, 1954.
- 15) Tyrrell: J. Immunol. 4, 74, 1955.
- 16) 陳震東: 京都医学会雑誌, 5, 5, 1954.
- 17) Scherer, W. F. Syverton, T. T.: J. Exper. Med. 97, 695~710, 1953.
- 18) 西沢, 荒木, 能登, 陳: 日病会誌, 42, 475, 1953.
- 19) 天野: 日病会誌, 38, 15, 1949.
- 20) 新保幸太郎他: 日病会誌, 39, 47, 1950.
- 21) 荒木他: 日病会誌, 43, 1954.
- 22) 新保他: 日病会誌, 38, 147, 1949.
- 23) 池田英夫: Virus 5, 4, 1955.
- 24) 新保幸太郎: 日病会誌, 45, 3, 1956.
- 25) 新保幸太郎: 日病会誌, 43, 1954.
- 26) 宮田正二郎, 新保幸太郎: 日病会誌 43, 1954.
- 27) Robert W. McCollum, John F. Foley: Exp. Biol. Med. 94, 3, 1957.
- 28) Baumeister, Miller: J. infect Disease. 70, 1, 1956.
- 29) Melnick: Advance in Virus Reserch, 1.
- 30) 吉岡勇雄: Virus 7, 1, 1957.
- 31) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem. 161, 293~303, 1945.
- 32) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem. 161, 83~89, 1945.
- 33) 緒方知三郎: 病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき, 1955.
- 34) L. リゾン: 組織化学及び細胞化学.