抗酸菌ファージの感受性試験法に関する研究

第2報 結核菌などに対する方法

徳 永 徹・室 橋 豊 穂

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

〔受付：5月10日 1961年〕

緒 言

前報告¹⁾においては、非病原性抗酸菌のファージ感受性試験法について検討を行った。これら一群の抗酸菌は比較的短い培養日数で発育可能であり、グリセリン加寒天培地あるいは小川培地上で、2～4日間で充分な発育を遂げるものが多い。このような菌に対しては、腸内細菌やブドウ球菌などで行われているファージ感受性試験法を略々そのまま適用することができる。

しかし抗酸菌中病原性を有する多数の菌株は、一般に発育に2～4週あるいは更に長い日数を必要とすることは周知の如くである。このように培養日数の極めて長い抗酸菌の場合には、菌の生理的条件と播種菌量、スポットするファージの濃度とスポットの時期などの諸条件が成績に大きな影響をおよぼし易く、条件次第では極めて不安定な溶菌成績を示すことは、非病原性抗酸菌や一般細菌の比ではない。

すでに著者らは BCG についてこれらの諸条件と溶菌との関係について予報的に報告²⁾したが、本報告では更にその詳細を述べると共に、とくにファージ液の critical dilution をスポットに用い得るか否かの検討を中心として、培養日数の長い抗酸菌のファージ感受性試験の実用法につき検討したので、その成績を報告する。

材料と方法

使用ファージは、著者らが分離した Y7, Y10, Y13³⁾, 武谷らの A6, B1, C3⁴⁾, 道家の L1⁵⁾, Fromanらの D4, D29, D30⁶⁾, Penso の PP⁷⁾, および Hau-duroy の HC⁸⁾, 計12株である。これらは血清学的性状などの生物学的諸性状において相互に異なるファージであることがすでに著者ら⁹⁾によつて確認されている。

使用菌株は、H37Rv, H37Ra, Ravel, および BCG の4株である、なおこれらの菌株に対して検討された感受性試験法が実用に供し得るか否かを確かめるために、計225株の人型、牛型、鳥型菌あるいは非定型抗酸菌に対してこの試験法を応用した。

感受性試験に当つては、あらかじめ Sauton 培地、小川培地あるいは Dubos 培地に培養した菌体を型の如く一定濃度の菌液とし、小川平板上に流した。すなわち、径8cmのシャーレに約30mlの1%小川培地を流して作った平板上に、0.5mlの菌液を3mlの半流動寒天と共に流して重層平板を作った。この平板を一定時間 37°C に培養後、とり出してスポットを行った。

スポットの方法は、1標準白金耳によるスポット（以下、1白金耳スポット法と呼ぶ。約0.004～0.005mlに相当する）、または 1/4 針で1滴スポット（以下、1/4 針スポット法と呼ぶ。約0.015～0.020mlに相当）、または 1/8 針の先端を略々直角に曲げたもので1滴スポット（以下、1/8 針スポット法と呼ぶ。約0.009～0.010ml）の3法のいずれかを用いた。

スポット後 37°C に培養を継続し、日を追つて溶菌の状態を観察した。溶菌程度のあらわし方は次の如くである。

- 0: 全く溶菌を示さないもの
- 1: 数カ所の独立した溶菌斑を認めるもの
- 2: 10数カ所あるいはそれ以上の独立した溶菌を認めるもの

TOKUNAGA Tohru and MUROHASHI Toyoko: Studies on the Methods of Phage Sensitivity Test of Mycobacteria. (II) Test Method on Myc. Tuberculosis. Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Tokyo—Jap. J. of Bact., 16(11), 960-966, 1961.

第1表 BCG に対する Y 10 および B 1 ファージの1滴スポット法による溶菌成績

菌培養 日数	スの ポ ッ ト 期	ファージ 菌量 mg	Y 10				B 1			
			10 ⁹	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
			× 6.5/ml				× 3.1/ml			
10	3 日 目	5	5	3	1	0	4	3	1	0
		1	5	3	1	0	4	3	1	0
		0.1	3	2	0	0	—	—	—	—
		0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
14		5	5	4	1	0	4	3	1	0
		1	5	4	1	0	5	3	1	0
		0.1	5	5	3	0	5	2	1	0
		0.01	5	5	3	0	5	2	0	0
21		5	5	4	1	0	4	2	1	0
		1	5	5	3	0	5	4	1	0
		0.1	5	5	4	0	5	2	1	0
		0.01	5	5	3	0	5	2	0	0
28		5	5	3	1	0	3	2	1	0
		1	5	5	3	0	5	4	2	0
		0.1	5	5	4	1	5	4	1	0
		0.01	5	5	3	0	5	3	0	0
10	7 日 目	5	3	0	0	0	0	0	0	0
		1	3	0	0	0	0	0	0	0
		0.1	—	—	—	—	—	—	—	—
		0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
14		5	2	0	0	0	0	0	0	0
		1	4	0	0	0	2	0	0	0
		0.1	5	3	0	0	4	0	0	0
		0.01	5	3	0	0	5	2	0	0
21		5	2	0	0	0	0	0	0	0
		1	3	0	0	0	0	0	0	0
		0.1	5	3	0	0	4	0	0	0
		0.01	5	3	0	0	5	3	0	0
28		5	3	0	0	0	0	0	0	0
		1	3	0	0	0	0	0	0	0
		0.1	5	4	0	0	5	1	0	0
		0.01	5	4	2	0	5	5	0	0
21	11 日 目	5	2	0	0	0	0	0	0	0
		1	2	0	0	0	0	0	0	0
		0.1	2	0	0	0	0	0	0	0
		0.01	3	0	0	0	2	0	0	0
28		5	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	1	0	0	0	0	0	0	0
		0.1	3	1	0	0	1	0	0	0
		0.01	4	0	0	0	3	1	0	0

(註) — : 菌の発育不充分のため判定不能

3: 溶菌斑が相互にくっつき合つて、いわゆる semi-confluent lysis になっているもの

4: 完全溶菌に近いもの、耐性菌の2次集落がわずかにあるものを含む、

5: 完全溶菌

なお、溶菌部位全体に diffuse に菌の弱い発育を認めるものは、数字を () の中に入れて表現した。

菌の発育がおそいために培養中に培地乾燥のおそれがある場合には、平板をビニールの袋の中に入れるか、あるいはビニールテープでシャーレを密封して乾燥を防いだ。

その他の実験法については、成績中で述べることにする。

実験成績

(I) 予備実験

播種菌量、ファージ濃度、スポットの時期および溶菌状態の間の関連性を明らかにする目的で次の実験を行つた。Sauton 継代培養9日目の BCG 菌膜より型の如く菌液を調製し、小川平板当り 5 mg, 1 mg, 0.1 mg, 0.01 mg になるように流して半流動寒天で固めた。これを 37°C に培養、3日目、7日目、10日目にとり出して、ファージ液を $1/4$ 針で1滴スポットした。ファージとしては Y10 (6.5×10^9 /ml) と B1 (3.1×10^9 /ml) とを用い、あらかじめ 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} に希釈した。菌培養後10日目、14日目、21日目、28日目の溶菌の状態は第1表の如くである。溶菌の程度が5ないし4であれば判定が極めて容易なので、表中のこの範囲を点線で区切つた。

スポットの時期: 2の表から明らかな如く菌播種後スポットまでの時期は短かい方がよく、7日目あるいは11日目にスポットした場合にはスポット部位の菌の発育のために判定が困難となる。この実験に用いた菌は発育が極めて旺盛な BCG であるから、菌の生理的条件や菌株の如何によつては若干の違いを考慮する必要があるが、判定に迅速を要する場合にはなるべくスポットの時期も早い方が望ましいので、より早い時期にもスポットし得るか否かを更に検討することとした。

菌量と判定時期: 耐性菌の2次集落が生じる前の溶菌の最も著明な状態をもつて判定時期とすると、この表で3日目にスポットした場合には、菌量 5 mg で略々2週目、1 mg で3週目、0.1ないし 0.01 mg では4週目を大凡の判定時期とすることができよう。被検菌量が少い場合、または判定を急ぐ必要のない場合には、平板当り 1 mg 程度の菌量が適当であるが、迅速に結果を知る必

要のある場合には可及的菌量を増すことが望ましく、この点についての検討が必要となる。

スポット用ファージ液の濃度: 一般になるべく希釈されたものを用いることが望ましい旨、前報告¹⁾中で論じた。但し結核菌の場合には判定技術上の困難性を考慮して、 10^8 /ml 程度の比較的高濃度のファージ液を用いるのが実用的であろうと述べた²⁾が、条件さえ適当であれば、第1表に示したように 10^{-2} あるいは 10^{-4} 希釈でさえも感受性を認め得るので、非病原性抗酸菌で行つたと同様な RTD 法を用い得る可能性があると思われる。

(II) スポット時期の検討

前述の如くスポットの時期はなるべく早く行ふのが実用的である。そこで菌播種の翌日、重層寒天表面が充分乾燥したところで直ちにスポットを行う方法の可否を検討した。この実験では小川斜面培養16日目の比較的死令の菌を用い、型の如く小川に寒天と共に重層し、37°C に1夜培養したのちに取り出して、Y10 ファージ (2.5×10^9 /ml) および D29 ファージ (3.1×10^9 /ml) の各 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} 希釈液を $1/4$ 針で1滴ずつ滴下し、更に培養を継続して、3日目にスポットした場合の成績と比較した。第2表はその14日目、21日目の成績である。

第2表 H37Ra に対する Y10 および D29 ファージの培養1日目および3日目・1滴スポットによる溶菌

ス ポ ッ ト 期	培 養 日 数	播 種 菌 量 (mg)	ファージ					
			Y 10			D 29		
			10^0	10^{-2}	10^{-4}	10^0	10^{-2}	10^{-4}
1 日 目	14日	5	5	4	3	5	5	4
		1	5	5-4	3	5	5	5-4
		0.1	5	4	3	5	5	4
	21日	5	5	4	3	5	5	4
		1	5	5	4	5	5	4
		0.1	5	5	4	5	5	4
3 日 目	14日	5	5	4	2	5	5-4	4
		1	5	5	3	5	5	4
		0.1	5	5	3	5	5	4
	21日	5	5	4	2	5	5-4	4-3
		1	5	5	3	5	5	4
		0.1	5	5	3	5	5	4

(註) ファージ原液の濃度
Y10: 2.5×10^9 /ml
D29: 3.1×10^9 /ml

第3表 H37Ra の種々なる菌量に対する3種ファージの1日目・1滴スポットによる溶菌

培養日数	播 種 菌 量 (mg)	フ ア ー ジ											
		Y 10				B 1				D 29			
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
7 日	50	5	5-4	4	4	5	5	5	5	5	5	5-4	4-3
	25	5	5-4	4	4	5	5	5	5	5	5	5-4	4-3
	10	+	+	+	+	5	5	+	+	5	+	+	+
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 日	50	5-4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5-4	4-3
	25	5-4	5-4	4	4	5	5	5	5	5	5	5-4	4-3
	10	5	5	5-4	5-4	5	5	5	5-4	5	5	5	5
	5	5	5	5-4	5-4	5	5	5	5	5	5	5	5-4

(註) - : 菌の発育不充分のため溶菌を認めがたい

+ : 溶菌を認め得るが、その程度を判定できない

尚ファージ原液濃度は Y10 : 2.5×10^9 /ml B1 : 2.6×10^9 /ml D29 : 3.1×10^9 /ml

菌の濃度が5~0.1mg 程度では、表の如く1日目スポット法との成績の間には大きな開きはなかつたので、以後凡ての実験は培養後1日目スポット法によることとした。

(Ⅲ) 播種菌量の検討

前述の如く菌が少量しか得られぬ場合、あるいは結果の判定を急ぐ必要がない場合には、平板当り1mg 程度の菌量が適当であるが、判定を急ぐ場合には更に菌量を増す必要がある。第3表はY10, B1, D29の3種のファージを用いて、H37Ra (小川斜面14日培養) の種々なる菌量に対する1日目・1/10。針スポット法の成績である。平板当り50~25mg の場合には、培養5日目にすでにB1とD29による溶菌が認められ、7日目には各ファージとも10mg 以上のものに対して溶菌を認め得たが、なおその程度を判定することはむづかしかった。10日目に至れば5mg の平板でも明瞭に溶菌程度を判定し得るか、50~25mg の平板では溶菌部位に菌の薄い二次発育を認めるようになった。また溶菌面積の大きさは、菌量が濃い平板ほど小さくなる傾向があり、一方3種のファージの中では、Y10が他の2者に比べて溶菌部は小さく且つ不鮮明であつた。

被検菌の生理的条件や菌株によって菌の発育にかなりの差があり得るので、菌培養後連日注意して溶菌状態を観察する必要がある。その場合には接種菌量を10~50mg にまで増すことが可能であり、且つ判定までに要する日数を著しく短縮し得ることが知られた。

(Ⅳ) スポットするファージ量の検討

前述の如くスポット用ファージ液の濃度は、理論的には1RTD であることが望ましいが、発育の早い非病原性抗酸菌を指示菌として決めたRTDが、そのまま発育のはるかにおそい結核菌に対して使用できるか否かが問題である。そこでY10, Y13, B1, C3, D29の5株のファージをえらび、まず前報¹⁾で述べた方法に従つてそれぞれの宿主菌によってRTDを決定し、それを用いて結核菌に対する感受性をしらべた。すなわち、H37Rv, H37Ra, Ravenel, BCGの4株結核菌を小川平板当り略々10mg に流し半流動寒天で固めたのち、培養1日後に各ファージ液の1RTDを1白金耳宛スポットした。菌培養10日目における溶菌成績を第4表に示した。この結果1白金耳1RTD スポット法によつて結核菌が充分感受性を示すことが、わかつたが、この方法では溶菌部位が実際には極めて小さく、菌が平板上に均等に発育していない場合には判定が非常にむづかしい。従つて結核菌

第4表 結核菌に対する1日目・1RTD・1白金耳法による溶菌

結核菌	フ ア ー ジ				
	Y10	Y13	B1	C3	D29
H37Rv	(4)	0	5	4	4
H37Ra	4	0	5	(5)	5
Ravenel	4	0	5-4	5	5
BCG	3	0	1	5	3
宿主菌	獣調	獣調	獣調	120	607

に対しては1白金耳法でなく注射針スポット法によるべきであろうと考えられた。

そこで各宿主菌を重層した寒天平板と、H37Raを重層した小川平板とを並べておき、4種のファージ液の10倍希釈系列の各1滴(1/5針)を滴下し、その溶菌状態を比較した(第5表)。宿主菌の溶菌から1RTDは、Y10では原液の 10^{-2} 、Y13とB1では 10^{-3} 、D29では 10^{-4} の希釈度であつたが、この1RTD1滴スポットは被検結核菌に対してそれぞれ5、0、5、4と判定される極めて見易い溶菌を示したので、この方法が充分実用的であると認められた。

第5表 宿主菌および結核菌(H37Ra)に対する1日目・1滴スポットによる溶菌

菌	ファージ	稀 釈 度				
		10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
宿主菌	Y10	5	5	5*	4	4
	Y13	5	5	5	5*	5-4
	B1	5	5	5	5*	4
	D29	5	5	5	5	5*
結核菌	Y10	5	5	5	4	4-3
	Y13	3-2	2	0	0	0
	B1	5	5	5	5	5
	D29	5	5	5	5	4

(註) *: 完全溶菌を示す最高稀釈度、即ち1RTDを示す。

尚ファージ原液の濃度は Y10: 1.0×10^9 /ml,
Y13: 2.1×10^9 /ml, B1: 8.0×10^9 /ml,
D29: 2.0×10^9 /ml

(V) 1日目・1RTD・1滴スポット法の応用

以上の成績から著者らは、菌培養1日目に1RTDのファージを1滴(1/5針)スポットする方法が最も実用的であると考えたので、このことを更に確かめるために225株におよぶ各型結核菌あるいは非定型抗酸菌について感受性試験を行つた。その成績ならびに各々の溶菌パターンの特徴については別に報告するが、その成績の一部を第

6表に示した。この成績は某療養所の患者喀痰より分離した結核菌83株に対する試験結果で、溶菌程度3以上の株数を%であらわしてある。この表から明らかなように原液スポット法ではY13、A6、D4、HC、L1の5種が活性を示す株がかなりの率に存在したが、1RTDを用いた場合にはこれらは殆んど感受性を示さず、各ファージは人型菌に対して溶菌するか溶菌しないか二者択一の態度をとるものと考えられた。このようにファージ原液を用いると溶菌あるいは溶菌類似の発育阻止斑が認められるが、1RTDを用いると認められなくなるという傾向は、とくに鳥型菌と非定型抗酸菌の一部に著明に認められた。この点についても別に報告したい。いずれにせよ、発育日数の長い抗酸菌に対する感受性試験法として上述の方法は秀れた実用法であることが確認された。

考 察

最初に結核菌を溶菌するファージを分離し、各型結核菌に対する溶菌パターンをしらべたのは Froman ら(1954)⁹⁾であるが、彼らは感受性試験に次のような方法を用いた。すなわち5mlのTween-albumin培地に21~42日間培養菌をBordet-Gengou寒天平板上に0.8%半流動寒天と共に流して固めたのち、極めて微細な毛細管ピペットで約 10^7 /mlのファージ液を1滴落し、1週毎に溶菌の状態を観察した。その後彼ら(1956)¹⁰⁾は若干方法を変えて、 10^8 /mlのファージを用い、その1白金耳を菌培養5日目にスポットした。Hnatoko(1953)¹¹⁾も多数の結核菌に対して感受性試験を行つたが、彼はスポットにファージ原液を用いたこと以外には、詳細な方法の記載を行わず、且つ彼の使用ファージの中には結核菌に活性を有するものはなかつたと述べている。武谷ら¹²⁾は、2~3週間Dubos培地に培養した結核菌を半流動寒天と共に小川平板に重層し、37°Cで数日間培養後、菌の発育がやつと肉眼で認め得る時期に1定の白金耳で 10^8 /mlのファージをスポットする方法を用いた。檜川¹³⁾は、小川培養斜面に菌液を流し1~2日後にファージ液を凝水部に注加し、直立培養して液面からの発育

第6表 患者喀痰より分離した人型結核菌83株に対するファージ原液および1RTDによる1日目・1滴スポットの溶菌率(%)

ス ポ ッ ト 量	フ											
-----------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

人型結核菌 H37Ra に対するファージ感受性試験
(1 日目・ $\frac{1}{4}$ 針 1 滴スポット法)

A : Y10 ファージ

B : B 1 ファージ

数字は希釈ファージ液の指数をあらわす

阻止帯によつて判定する方法を用いた。道家¹⁰はSauton寒天培地斜面に結核菌を混和した0.8%寒天を重層し、乾燥後直ちに $10^6 \sim 10^7$ /mlのファージ液を滴下する方法を用いた。

発育に長時日を要する抗酸菌に対して感受性試験を行った上述の諸報告の他に、方法に関して特別な検討を行った文献は見られないが、これらのうち檜川の直立法を除いては著者らの方法を含めて、スポットの原理は全て同じである。直立法に関しては今回は検討を行なわなかったが、檜川¹³が平板スポット法について述べた如く「雑菌の混入率が高く、操作も煩雑で、判定もみにくい等の欠点は全く無いといつてよく、一方阻止帯の高さをもつてそのまま感受性の強さとみなし得るか否かにも疑問があるので、著者らは平板スポット法を行うべきものと考えている。

培地の種類に関しては今回は解れなかつたが、鶏卵培地でもあるいは結核菌用寒天培地でも容易に行うことができる。前者は菌の発育が早く従つて判定に要する期間も比較的短かく、且つホルマリン処理により極めて美麗な青緑の溶菌像を観察し得る。一方後者は光透過性であるため溶菌の認定が容易である。これら培地についてはなお検討が必要であるが、著者らは日本で結核菌培地として広く常用されている1%小川培地が充分に優秀な感受性試験用培地であると考えている。

スポットの時期については、Fromanら¹⁰および武谷¹⁵は、菌播種後数日目を適当としているが、その必要はなく、菌重層平板表面が乾燥後直ちに（著者らの場合 37°C 1夜培養後）スポットすることができる。而して菌量が多く、あるいは培地に馴れた発育旺盛な菌の場合には、とくにこの時期がおくれてはならない。

播種菌量については、少なくとも平板当り50mgまで可能であるが、実際問題としては1~10mg程度が適当であり、その意味ではtween-albumin培地に充分発育した均等菌液を用いるのも良い方法である。Tween 80は抗酸菌ファージの吸着を妨げることが知られている¹⁶が菌液を寒天と共に重層した場合には、少なくともTween

による吸着阻害作用は見られない。但しこの場合均等菌液を得るためには連日培地を振盪する必要があるが、小川斜面発育菌塊を滅菌ガラスホモジナイザーで磨砕し、硫酸バリウム液の独度と比較する方法¹⁷を用いるならば一層簡便である。

菌株、菌量、および菌の生理的条件などによつて菌の発育にはかなり遅速があるので、スポット後には頻回にとり出して観察の必要がある。少なくとも培養1週以後は隔日に観察記録して、溶菌の最も進んだ状態をもつて被検菌の感受性をあらわすべきである。

次にスポットすべきファージの濃度につき考察する。著者らの経験によれば、例えばY13やC3などは、その原液をスポットした場合、真性鳥型菌と考えられる菌株のあるものに対して弱い発育阻止を示すが、RTDを用いた場合にはかような現象を示さない。このような現象が、abortive infectionのようなファージのhost killing作用によるものか、一種のbacteriocinのような物質の存在によるものか、あるいは少数のファージミュータントによるものか、その理由の解明は今後の検討に待たねばならないが、いずれにせよRTDを用いることによりこのような現象を除き得るということは重要である。

Froman⁹や道家¹⁰の如く $10^6 \sim 10^7$ の希釈ファージ液を使うことはかなり都合的であるが、RTD法はより合理的である。

なお、真の溶菌か否かの判別には液体培地を用いてファージ増殖の有無の定量が必要であり、瀬川ら¹⁸は若干の検討を行つているが、その点については別に報告することとしたい。

1滴スポットのために注射針の先端を曲げたのは、針の角度を平板に対し垂直にして滴下量を1定にし得るためである。白金耳スポットよりも1滴スポットの方が判定が容易であることを前述したが、 $\frac{1}{4}$ 針滴下の場合には平板当り1~10mgの菌量に対し、一般に4~9カ所程のスポットを行うことができるので好都合である。

結 論

発育日数の長い抗酸菌，すなわち結核菌，鳥型菌，非定型抗酸菌に対するファージ感受性試験の方法について検討した。

1%小川平板培地上に平板当り1~10mgの被検菌液を半流動寒天と共に重層し，1夜37°Cに培養後，あらかじめ宿主菌に対して決められた1RTDのファージ液を1/5針で1滴滴下し，培養を継続しながら適時溶菌の状態を観察し，溶菌がもつとも進んだ時期の溶菌程度を以つて，その菌の当該ファージに対する感受性と判定するのが正確且つ実用的な試験法である。

終りに臨み，技術的援助を与えられた，丸山米夫，岡本茂広，関又蔵の各技官に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) 徳永 徹・ほか：日本細菌学雑誌，16：1961，掲載予定。
- 2) 徳永 徹・ほか：医学と生物学，54：172，1960。
- 3) 室橋豊穂・ほか：医学と生物学，53：242，1959。

- 4) Takeya, K. et al. : Am. Rev. Resp. Dis. 80 : 543, 1959.
- 5) 道家 直：医学と生物学，53：253，1959。
- 6) 関 又蔵・ほか：医学と生物学，57：192，1960。
- 7) Penso, G. : Les bacilles paratuberculeux., Masson et cie, 99, 1950.
- 8) 徳永 徹・ほか：医学と生物学，57：67，1960。
- 9) Froman, S. et al. : Am. J. Publ. Hlth. 44 : 1326, 1954.
- 10) Will, D. W. et al. : Am. Rev. Tbc. 76 : 435, 1957.
- 11) Hnatoko, S. I. : Canad. J. Med. Sci., 31 : 462 1953.
- 12) 吉村哲也：医学研究，28：104，1958。
- 13) 檜川義親：結核，34：467，1959。
- 14) 道家 直：熊本医学会雑誌，34：1360，1960。
- 15) 武谷健二：日結，18：147，1959。
- 16) White, A. et al. : Am. Rev. Tbc. 77 : 134, 1958.
- 17) 厚生省編：衛生検査指針 I, 結核菌検査指針，p 21 1958.
- 18) 瀬川二郎・ほか：第36回日本結核病学会講演，1961。