ブルセラ属の色素耐性検査法に関する研究

Studies on a New Method of Dye-Test in the Classification of the Species of *Brucella*熱田 俊之助*
Syunnosuke ATSUTA

緒 言

Brucella は、1887年 Bruce⁴⁾ によつて分離発見されて以来、その性状の明らかになるにつれて、名称もいろいろとかわつてきた。その最初の命名はほとんどの菌がそうであるように、その形態と由来宿主から *Micrococcus melitensis* と命名され、それが後に Bang⁵⁾ によつて *Bacillus* と記載されるにいたつた。以来 Evans⁶⁾ が、形態学的に *Br. abortus* と *Br. melitensis* を区別し、そして Meye and Shaw⁷⁾ が、さらに多数の菌株を使用して追試してこれを確かめたのち、この菌属を *Brucella* と命名した。

Huddleson⁸⁾ は、この *melitensis* と *abortus* の差をアニリン系の色素中での発育の良、不良で区別する方法を発見し、また McAlpine 等⁹⁾ はブドウ糖及び窒素の代謝の面での差を指摘し、Zobell 等¹⁰⁾ は硝酸塩及び亜硝酸塩の還元能の差をあきらかにし、Huston 等¹¹⁾ 及び Pennell 等¹²⁾ は化学的組成における差をあきらかにした。

さらに Huddleson¹³⁾ は *Br. abortus* のみが一定の炭酸ガス分圧下によく発育することを発見した。

このように各種の方法によつて *Br. melitensis*, *Br. abortus* 及び *Br. suis* の性状の差があきらかになつてきたが、そのうち現在一般にこの菌属の同定に利用されているのは、Feusier and Meyer¹⁴⁾ 以下多数の人々が記載した凝集素吸収試験、あるいは、Huddleson¹⁵⁾ 等の報告による H_2S 産生能、アニリン系色素に対する耐性、前述の糖代謝、硝酸塩及び亜硝酸塩の還元能の検査等で、これらを組合せて検査することによつて、この3種の菌の分類がされているようである。

このうち色素に対する耐性試験については、Huddleson³⁾ によれば、チオニン及び塩基性フクシンが *Brucella* の発育を抑えるのは Bacteriostatic action によるものと考えられるが、*Brucella* の3種の菌のうち、塩

基性フクシンには *Br. abortus* のみが、またチオニンには、*Br. suis* のみがよく発育し、*Br. melitensis* はその双方の色素中で発育はするが、その発育は旺盛ではないことが知られている。

しかしこの試験においても、その結果は必ずしも一様ではなく、各菌株の間に多少の差、あるいは少数株では例外的な差を生ずることもあるようである。また、従来行われてきた、この色素耐性試験は、その使用する培地が液体培地の場合も、固型培地の場合も、混入色素は一定の希釈度を最終的に示すことになるので、供試菌株の色素耐性度は、たゞひとつの希釈点、あるいは数種の希釈点でのみしか観察することができなかつた。

以上の点を考えて *Brucella* の色素耐性度を連続的希釈点において観察しようと試みたのが本実験である。

供試菌株について

1. 菌株の由来

菌株は東京都衛生研究所細菌部辺野喜博士より分与されたものを使用した。この株はウシ肝臓半流動寒天(LA)に穿刺培養して維持されていたものである。

◎ウシ肝臓半流動寒天の製法

ウシ肝臓浸出液	1l
Polypeptone	10g
NaCl	5g
Agar	5g
pH 7.0	

2. 保存培養

Br. melitensis 9株、*Br. abortus* 23株及び *Br. suis* 4株は実験期間中はウシ肝臓半流動寒天に穿刺培養して保存し、使用する3日前に2~1寒天斜面¹⁶⁾(後出)に移し増菌したものをを使用した。

3. 各菌株の性状について

Br. melitensis, *Br. abortus* 及び *Br. suis* の各株総数36株の性状は表1、表2及び表3に示すごとく、過去に発表された *Brucella* の各種の性状と大体一致しているが、*Br. melitensis* 9株のうち、m-2, m-4, 及び m-6が辺野喜¹⁵⁾の報告と比較して異つているが、また

* 東京歯科大学微生物学教室
千葉県血清研究所血液部
1960年9月19日受付

表1 供試菌株の性状(その1)

[illegible]

表2 供試菌株の性状(その2)

		Brucella melitensis								
菌 株 名		m-2	m-4	m-5	m-6	m-7	m-9	m-10	m-13	m-予
H ₂ S 産生		+++	++	++	+	+	+	+	+++	+
熱凝集 100°C 30 分		—	—	—	—	—	—	—	—	—
アクリフラビンによる凝集		—	±	+	—	+	+	++	+++	+
胆汁の作用	溶 菌	—	—	+	—	±	+	+	±	++
	透 明 化	—	—	—	—	—	—	+	—	++
チ オ ニ ン	10,000×	—	—	—	—	++	++	+++	+++	+++
	30,000×	—?	+	+	+	++	++	+++	+++	+++
	50,000×	+++	+++	++	+	++	++	+++	+++	+++
メ チ ル 紫	10,000×	—	—	—	(—)	—	—	—	—	—
	50,000×	—	+	+	+	—	—	+	+	+
	100,000×	+++	++	++	+++	+	+	+++	+++	+++
ピ ロ ニ ン	50,000×	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	200,000×	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	500,000×	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
フ ク シ ン	10,000×	—	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
	25,000×	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	50,000×	—	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

表3 供試菌株の性状

		Brucella suis			
菌 株 名		S-1	S-2	S-14	S-美能
H ₂ S 産生		+++	+++	+	+++
熱凝集 100°C 30 分		—	—	—	—
アクリフラビンによる凝集		+++	—	—	+++
胆汁の作用	溶 菌	—	—	—	—
	透 明 化	—	—	—	—
チ オ ニ ン	10,000×	—	—	—	—
	30,000×	+	+	++	++
	50,000×	+++	+++	+++	+++
メ チ ル 紫	10,000×	—	—	—	—
	50,000×	—	—	—	—
	100,000×	—	—	—	—
ピ ロ ニ ン	50,000×	+++	+++	+++	+++
	200,000×	+++	+++	+++	+++
	500,000×	+++	+++	+++	+++
フ ク シ ン	10,000×	—	—	—	—
	25,000×	—	—	—	—
	50,000×	—	—	—	—

Br. abortus の23株中 a-18, a-47 及び a-48 がやゝ他の菌株に比較して異つた性状をもっている。Br. suis 4株中 s-14 が H₂S 産生が少ない点で他の株と異つていようである。

実験方法

1. 使用培地について

Elberg 等¹⁶⁾ によつて処方された2~1寒天培地に、色素を後で述べる如く種々の濃度に含有したものと、色素を含まない2~1寒天をあらかじめ作成しておき、これを Szybalski¹⁷⁾ が細菌の抗菌性物質に対する耐性に関する実験に使用した方法にしたがつて、筆者は重層寒天平板(modified Szybalski's Gradient Plate)を作成して使用した。

◎2-1 Agar の製法

Bacto Beef Extract	0.5%
Bacto Peptone	1%
NaCl	0.5%
Glycerol	2%
Glucose	1%
Agar	2~3%
pH 7.0	

注 本培地中 Agar を抜いたものは 2-1 Borth

図 1 重層寒天平板 (直径 9cm シャーレ)

すなわち図 1 に示すように、ベトリシャーレに傾斜を適当にあたえておいて、これに約 10cc の色素を含めぬ 2-1 寒天をながして斜面とし、ついでシャーレを水平に置き色素を含有する 2-1 寒天を約 10cc 重層して平板とする。さらにこれを 24 時間氷室においたのち使用した。菌株を植えるにあたっては、標準白金耳を使用し、あらかじめ 2-1 寒天斜面に 3 日間培養した菌株の 1mg を生理食塩液 1cc に浮遊せしめて、各菌株の浮遊液を作り、これを直径 2mm の白金耳をもちいて、重層平板の色素の濃度の高い部分から、その濃度の低い部分にむかつて直線的に線を引いて植えた。

判定は 37°C 3 日間培養後にその菌の發育した集落群の長さを測定して行つた。なお 1 枚のシャーレについて 5-6 株の菌を試験することができた。

2. 供試菌の發育について

供試菌株は培養 2 日目から、菌の集落群を認めることができるようになり、3 日目には殆んどの菌株について判定を行うことが出来た。図 2 にその 1 例として、使用菌株中 *Br. abortus* 高梨株の Trypticase soy broth (BSB の TSB) 中における發育曲線を示す。この觀察のために 2-1 broth を使用しなかつた理由は、吉岡及び遠藤¹⁸⁾が述べているように液体培地では Trypticase soy broth の方が發育が良いと思われるからである。

図 2 によると、この菌株は 2 日目から 3 日目にかけて著明に増殖し、それ以後は比較的増殖が著明でなくなる。

3. 使用した色素について

使用した色素は 4 種類で、すべて蒸留水に溶解希釈してそれぞれの濃度に培地中に混入した。すなわち、Thio-

nin (Grübler), Methylviolet (Grübler), Pyronin (Grübler), Basic Fuchsin (Merk) でこれらは最終濃度 1,000 倍及び 2,000 倍として使用した。

実験結果

1. Thionin に対する耐性について

(1) *Br. melitensis* の Thionin に対する耐性

表 4 に m-4 及び m-2, 表 6 に m-5, m-6, m-7, m-9, m-10, m-13 及び m-予の 9 株の結果が示されるが、表 4 と表 5 の集落群の長さに差が見られるのは、培地そのものの影響と考えられる。この結果から見ると培地が一定しているときは比較的類似した長さの集落群を得ることが出来るようで、その色素の最終濃度は、培地の状態により多少加減する必要があろう。表 2 で Thionin 2,000 倍の重層平板では、集落群の長さは平均 19mm である。表 4 の m-4 は、Thionin に対して高度の耐性をもっているように見えるが、表 2 の結果と対照すると、逆の結果となり一致しない。これが何に起因するかは不明である。また表 4 の m-6 は 2,000 倍でも發育を示さず、他の株と著明に異つていように見える。

(2) *Br. abortus* の Thionin に対する耐性

この結果は表 4 及び表 5 に示される通り、a-99, a-97, a-20, a-23, a-25, a-28, a-35, a-46, a-47, a-52, a-53, a-54, a-55, a-56, a-125, a-129, a-高梨及び a-長島の 18 株について、その結果がかゝげられてあるが、そのうち表 1 及び表 2 と対照して、a-20, a-23, a-25, a-53, 及び a-129 が一致しない結果を示している。たゞし、これらの他の菌株の結果は、前述した *Br. melitensis* の場合と比較すると、わずかながら明らかに差が認められる。これは Thionin の最終濃度をもつと適当な濃度にするこゝによつて、その差が著明になつてゆくであろう。

(3) *Br. suis* の Thionin に対する耐性

この結果は表 4 及び表 6 に、s-1, s-2, s-14, 及び s-美能について示される。これらの菌株の集落群の長さは、4 株とも殆んど同様で、表 3 の結果とも一致し、また *Br. melitensis* についての結果と比較しても、かえつて長い数値を示している。このことについては後に考察が加えられるであろう。

2. Methylviolet に対する耐性について

(1) *Br. melitensis* の Methylviolet に対する耐性

表 4 及び表 6 の第 2 欄に示されるように、m-2, m-9 及び m-13 を除いて、ほぼ同様な長さの集落群を認めることが出来る。しかしながら、これを表 2 の結果と比

表4 各株の色素耐性度(mm)

色素 濃度 菌株	チオニン		メチル紫		ピロニン		フクシン	
	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×
a-99	0	0	68	72	72	76	70	69
a-47	0	0	0	0	0	0	0	0
S-美能	35	57	0	2	0	3	0	0
m-4	70	70	35	72	71	76	78	75
m-2	30	50	0	5	0	3	0	15

表5 各株の色素耐性度(mm)

色素 濃度 菌株	チオニン		メチル紫		ピロニン		フクシン	
	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×
a-20	0	15	25	22	45	73	40	47
a-23	0	15	24	25	32	39	43	47
a-25	0	10	25	23	25	27	43	50
a-28	0	2	20	18	55	75	41	50
a-35	0	3	23	20	57	75	41	45
a-46	0	3	30	28	30	48	55	55
a-47	0	0	0	0	0	0	0	0
a-99	0	2	14	17	45	65	30	35
a-52	0	5	20	20	52	75	45	55
a-53	0	10	18	20	52	75	33	43
a-54	0	3	25	22	75	75	35	50
a-55	0	4	17	22	20	20	30	35
a-56	0	5	15	22	25	35	26	30
a-125	0	0	20	20	35	45	20	40
a-129	13	17	0	0	0	7	0	0
a-高梨	0	0	20	25	38	50	30	40
a-長島	0	0	22	25	40	50	30	45

表6 各株の色素耐性度(mm)

色素 濃度 菌株	チオニン		メチル紫		ピロニン		フクシン	
	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×	1,000×	2,000×
m-5	0	10	15	13	28	28	20	20
m-6	0	0	17	13	35	65	25	35
m-7	5	30	17	20	30	42	35	38
m-9	0	18	3	5	2	5	20	23
m-10	10	30	15	13	25	40	35	38
m-13	0	12	0	3	20	33	30	24
m-予	13	23	7	12	15	23	26	32
S-1	0	25	10	0	0	10	0	0
S-2	0	25	7	1	0	0	0	0
S-14	0	35	12	0	7	14	0	0
S-美能	0	23	6	0	0	8	0	0

較すると、この色素の濃度による差が表6ではないように見える。このことについても後に考察が加えられるであろう。

(2) *Br. abortus* の Methylviolet に対する耐性

これらの結果は表4及び表5に示されるが、その18株中、a-47及びa-129を除いて、比較的平均した長さの集落群を形成している。そしてこれらの結果を表1及び表2の結果と比較してみても、ある程度一致するようであるが、前述の *Br. melitensis* の場合と同様に、表4及び表5の結果中、色素濃度の差による集落群の長さの差がないようにみえる。

(3) *Br. suis* の Methylviolet に対する耐性

この実験結果については表4及び表6にかゝってある。これによると、*Br. suis* は Methylviolet に対しては感受性であつて、その集落群はみじかい。しかしこの場合も、色素濃度の高いはずの培地に長い集落群がみられるのは、重層平板作成の際の技術的誤差によるものであろう。またこのことは、表3の結果と較べてみてもあきらかなようである。

3. Pyronin に対する耐性について

(1) *Br. melitensis* の Pyronin に対する耐性

この結果は表4及び表6に示される通りである。m-2及びm-9を除いては良好な発育を示すようで、実験に用いられた濃度に関するかぎりは、濃度による差も明瞭であるようにみえるが、表1と比較すると、その差が、あきらかすぎるほどでもある。これは後述する *Br. abortus* の場合にも同様であるが、Pyronin そのものゝ化学的不安定性によるものであろう。

(2) *Br. abortus* の Pyronin に対する耐性

この結果は表4及び表5に示されるのであるが、a-47及びa-129をのぞいて、すべて長い集落群を作つてゐるが、これを表1及び表2の結果と比較すると成績が合致しない。これは前にも述べた通り Pyronin の変性によるものと思われる。

(3) *Br. suis* の Pyronin に対する耐性

この結果を表4及び表6でみると、Pyronin に対してこれらの菌株は感受性であるように思われる。しかし表3の結果では、これと逆の結果が得られている。これらの原因については前述した通りであると考えられる。

4. Basic Fuchsin に対する耐性について

(1) *Br. melitensis* の Basic Fuchsin に対する耐性

この実験の結果は表4及び表6に示される。m-2を除いて、これらの菌株は長い集落群を示し、色素の濃度

の差による集落群の長さの差も明瞭にあらわれている。すなわち表6によると、その長さの平均値は、色素1,000倍の時26mmで、2,000倍の時30mmである。たゞし、*Br. melitensis* については、Fuchsin の濃度を、より高くすることによつて、その差を一層明瞭にすることができるものと思われる。

(2) *Br. abortus* の Basic Fuchsin に対する耐性

この結果は表4及び表5に示す通りである。これらの数値によると、a-47及びa-129の2株を除いて、長い集落群を生じ、かつその色素濃度の差による長さの差もあきらかである。このことは表1及び表2の結果と比較しても同様で、その結果の判定が、より容易であると思われる。

(3) *Br. suis* の Basic Fuchsin に対する耐性

この結果は表4及び表6に示されている。供試した4菌株は、Basic Fuchsin の存在下では発育しない。すなわち、2,000倍及び1,000倍のFuchsinの含まれている重層寒天平板では発育がみられないのである。これは表3に示される結果とも対応するようにみえるが、重層寒天平板の場合は、この色素の濃度を低くし得る可能性もあるようである。

考 察

以上の結果に対して考察を加えると、1931年Huddleson²⁾によつて提唱されたブルセラ属の色素耐性試験は、その後ほとんどあらゆるブルセラ研究に従事する人々にとり入れられ、実施にうつされてきた。そうして、この方法が *Brucella* の検索に従事する人たちに与えた便利さははかりしれないものがある。しかしながら、他面その方法は希釈法による検査法に共通して存在するところの、培地を数多く作らねばならないと言う煩雑さを避けることができなかった。実験室あるいは検査室でこの菌属の多数の菌株をあつかひ、あるいは同定を行う人にとつて、これらの煩雑さを除きうる方法があるとすれば、それはその人たちのみならず、その分野全部に対しても有益であり、この方法の改良に対する実験も存在価値があるはずである。

前述の重層寒天平板を使用する方法から得られた結果の妥当性、あるいはその可能性については、例えばThioninに対する各種の *Brucella* の耐性は、過去に報告されたところから判断すると、*Br. melitensis* と *Br. suis* の集落群は、より長くあらわれ、*Br. abortus* はそのまゝ、あるいはそれに近い値が得られる方が好都合であるように考えられる。しかしこのことは表6の培地

の場合のみに限つて言うと、その色素の最終濃度をわずかに変えること、すなわち、その濃度を1,500倍あるいは2,500倍に変えることによつて、より微少な差を明らかにすることが出来ると思われる。

また Methylviolet に対する態度は、Br. melitensis 及び Br. abortus が長い集落群を作り、Br. suis が発育を示さないか、あるいはみじかい集落群を作るべきであると考えられる。そして表4、表5及び表6についてみると、実際にその通りの結果が得られているのである。ただし、Br. melitensis 及び Br. abortus の場合、この色素の含有濃度の差に対応する発育の差があきらかでない。このことは、恐らく Methylviolet に対する、これらの2種の菌株の耐性域が、他の色素に対するものと較べて広いことを示すものであろう。

つぎに Pyronin に対する耐性については、表4、表5及び表6にあらわれた結果では、筆者の予想と全く相反した結果を得たに過ぎない。これは前にも述べたように Pyronin 自体の変性し易い性質に起因するものゝようで、Pyronin が一般に色素耐性検査を行うための実用に適するか否かの問題を生ずることとなる。

最後に Basic Fuchsin に対する耐性の問題であるが、表4、表5及び表6にあらわれた結果についてみると、これは一般に予想され得る結果で Br. melitensis 及び Br. abortus はよく増殖して長い集落群をつくり、Br. suis は全く発育しない。また、この色素の濃度の差による発育の差もある程度あらわれているようである。しかし Fuchsin の濃度をもう少し低くすることによつて、さらに差がはつきりしてくるのではないかと考えられる。

このようにして、本実験に使用した菌株については、以上のような結果が得られ、そして、この実験に使用した方法が有用性と便利さをもつていられるのであるが、わが国では新鮮分離株を数多く入手することが比較的困難で、そのような菌株についての実験は将来にまつより他にない。

結 語

Brucella の3種菌株、総数36株について、従来行われてきた色素耐性検査を、筆者の重層寒天平板を使用して、より精密にかつ簡便に行う方法を試みた。また、その得られた結果についてはこの方法の将来のあり方ならびに Brucella 色素耐性度の性質の一部について考察を加えた。

稿を終るに当り、御指導をいただいた米沢和一教

授並に越後貫 博所長に深謝すると共に、種々御教示、御援助下された、血液部長遠藤武博士に感謝します。なお、平素御鞭撻をいただいている村瀬正雄教授に対し深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed., Williams Wilkins Co. (1957).
- 2) United States Department of Agriculture, National Research Council: Brucellosis, A Symposium under the Joint Auspices of National Institute of Health etc., The American Association for the Advancement of Science (1950).
- 3) Huddleson, I. F.: Brucellosis in Man and Animals, The Commonwealth Fund, New York (1939).
- 4) Bruce, D.: Notes on the Discovery of a Microorganism in Malta Fever, Practitioner, 39: 161, (1887).
- 5) Bang, B.: The Etiology of Contagious Abortion, Zeitschrift für Tiermedizin, 1: 241, (1897).
- 6) Evans, A. C.: Further Studies on Bacterium abortus and Related Bacteria, II, A Comparison of Bacterium abortus with Bacterium bronchisepticus and with the Organism which causes Malta Fever, Journal of Infectious Diseases, 22: 580, (1918).
- 7) Meyer, K. F., and E. B., Shaw: A Comparison of the Morphologic, Cultural and Biochemical Characteristics of Br. abortus and Br. melitensis (Studies on the Genus Brucella), Journal of Infectious Diseases, 27: 173, (1920).
- 8) Huddleson, I. F.: The Differentiation of the Species of the Genus Brucella, Symposium on Undulant Fever, American Public Health Association, Chicago, Illinois, (1928).
- 9) McAlpine, J. G., and C. A. Slanetz.: Studies on the Metabolism of the Abortus-Melitensis Group, II, Further Observations on Nitrogen Metabolism, III Glucose Utilization, Journal of Infectious Diseases, 42: 66, 73, (1928).
- 10) Zobell, C. E., and K. F. Meyer: Metabolism Studies on the Brucella Group, VI, Nitrate and Nitrite Reduction, Journal of Infectious Diseases,

- 51: 99, (1932).
- 11) Huston, R.C., I.F. Huddleson, and A.D. Hershey: The Chemical Separation of Some Cellular Constituents of the Brucella Group of Microorganisms, Technical Bulletin, No. 137, Michigan Agricultural Experiment Station (1934).
 - 12) Pennel, R.B., and I.F. Huddleson: Chemical Constitution and Biological Properties of the Endo-Antigen of the Brucella Group of Microorganisms, Technical Bulletin, No. 156, Michigan Agricultural Experiment Station (1937).
 - 13) Huddleson, I.F.: The Importance of an Increased CO₂ Tension in Growing Bact. abortus (Bang), Scientific Proceedings of the Society of American Bacteriologists, 22nd Annual Meeting. Abstracts of Bacteriology, 5: 16, (1920).
 - 14) Feusier, M.L., and K.F. Meyer: Principles in Serologic Grouping of Br. abortus and Br. melitensis, Correlation between Absorption and Agglutination Test (Studies on the Genus Brucella), Journal of Infectious Diseases, 27: 185, (1920).
 - 15) 辺野喜正夫: 胆汁を以てする Br. melitensis に対する余の新特異鑑別法に就て, 日本細菌学雑誌, 1: 160, (1944).
 - 16) Elberg, S., M., Herzberg, P., Schneider, S.J. Silverman, and K.F.: Meyer. Studies on the Immunization of Guinea Pigs and Mice to Brucella Infection by means of the Native Antigen. Journal of Immunology, 67: 1, (1951).
 - 17) Szybalski, W. and V.: Bryson, Genetic Studies on Microbial Crossresistance to Toxic Agents, Journal of Bacteriology 64: 489, (1952).
 - 18) 吉岡守正, 遠藤武: ブルセラのための培地の検討, 日本細菌学雑誌, 11: 725, (1956).
 - 19) Huddleson, I.F., and E. Abell: A Biochemical Method of Differentiating Brucella abortus from Brucella melitensis and paramelitensis, Journal of Bacteriology, 13: 13, (1927).
 - 20) 村田昌芳, 伊佐山康郎, 田中正三, 柴田重孝: ブルセラ分離用培地に関する研究, 特に Brucella abortus type II に関連して, 日本細菌学雑誌, 14: 810, (1959).
 - 21) 遠藤 武: 感染のシンポジウム, 1: 123, 南江堂, (1959).
 - 22) 厚生省編: 衛生検査指針 (I), 細菌血清学的検査指針 (II), 協同医書出版社, (1952).
 - 23) 谷 友次: 医学微生物学, 第6版, 南山堂, (1960).
 - 24) Szybalski, W.: Gradient Plates for the Study of Microbial Resistance to Antibiotics, Bacteriological Proceedings, 36, (1952).
 - 25) Bryson, V. and W.: Szybalski, Microbial Selection, Part I: Gradient Plate Technique for Study of Bacterial Resistance, Science, 116: 45, (1952).

Summary

Many methods have been used to classify the three species of Brucella. For instances, to measure the metabolism in nitrogen and dextrose, to recognize the reduction of nitrate and nitrit, to observe the production of H₂S, or to test the resistance of the organisms against several dyes, these methods were most commonly practised in many laboratories.

Among the several methods, the dye-test which reported by Huddleson was one of the most useful method in classifying Brucella, and the author eliminated some inconveniences in this method by the application of the modified Szybalski's agar-gradient plate.

In the author's method, it was able to observe the resistance of the organisms at the more diluted point of concentration, consuming fewer culture media.

Microbiological Dept. of Tokyo Dental College (Director: Prof. Waichi Yonezawa)
The Serum Institute of Chiba Prefecture (Director: Dr. Hiroshi Ogonuki)