

Tween80 加培地に対する血清の影響に関する研究

第1報 結核菌に対するモルモット血清の影響

昭和35年1月30日受付

信州大学医学部細菌学教室(指導:田崎忠勝教授)

小 野 昇

Studies on the Influence of Serum Addition on the Medium Containing Tween 80

Report 1. Influence of Guinea-Pig Serum Addition on the Culture of Tubercle Bacilli

Noboru Ono

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. T. Tazaki)

緒 言

近年 Dubos, Middlebrook ^{①②}等が Tween 80 (以下 Tw80), アルブミン Fraction V, 等を加えて結核菌の深部培養に成功, Volk and Myrvic ^③ Miller and Roessler ^④等は, Aeration 或は振盪により, 結核菌は対数的に増殖することを報告し, 本邦においても青柳, 水野^{⑤⑥}, 川村, 河合^⑦, 土屋^⑧, 草間^⑨, 呉, 勝又^⑩, 戸塚等^⑪荒井^⑫等数多くの報告がなされている。

かゝる抗酸性菌の振盪培養を行うに当り, 一般に培地に添加されるアルブミンについて, Dubos ^⑬はその合成培地において, 人, 牛血清並びにアルブミンを10%に培地に加えて, 使用しているがその理由として, Tw80の解毒, 微量接種結核菌の早期発育を可能にすると述べ, 此のアルブミンの増殖促進作用について, Dubos and Middlebrook ^⑭は, この効果はアルブミンによるものではなく, 血清内の耐熱性の因子によるもので, アルコール可溶性であるが, その本態は未だ不明であると述べている。

結核菌の増殖に対する液性因子の作用については, 今日まで解明せられない点が多く, 古く Lurie ^⑮は, 免疫動物の体内では, 正常動物に比し明らかに結核菌の増殖が阻止されると報告し, 本邦においても, 佐藤^⑯, 伊藤^⑰, 緒方^⑱, 沖中^⑲, 本間^⑳等は免疫血清の抗菌力を認めているが血中抗体との関係は, 不明の点が多い。一方正常動物血清についても, Boissevain^㉑は, 人, モルモット, 家兎, 羊, 馬血清は合成培地で結核菌の増殖を促進すると報告し, 更に Davis and Dubos ^㉒は血清アルブミン以外のアルブミン並びにグロブリンは, 結核菌の増殖には全く効果がないと述べている。本邦においても宝来^㉓, 三浦^㉔, は健康動

物血清には, 結核菌に対する増殖阻止作用の存在することを報告している。

教室の柳沢^{㉕⑥}は, さきに1% Tw80加 Sauton 培地に正常モルモット血清を添加した場合, 血清単独では, 50倍までの増殖阻止に対して1000倍稀釈まで増殖抑制作用を認めこれを Tw80 との協同作用によるものと推定し, この作用は pH の変動, 血清の非燻化, 炭酸ガス培養, Tw80 の種類等では, 影響がなく, 又此の増殖抑制作用は高分子分劃中に存在したと述べている。

私は柳沢^{㉕⑥}の報告した結核菌増殖抑制作用について更に培地の種類, 接種菌量に対する抑制作用の変化, 免疫血清の示す抑制作用等について, 実験考察を行い興味ある知見を得たので報告する。

実験材料並びに実験方法

1) 使用菌株, 教室保存の人型結核菌 H₂ 株, 牛型結核菌 Ravenel 株, 国立松本病院入院患者の喀痰中より分離した患者分離株, 中村株, 大輪株, 大田株, 大谷株, 平津株の5株を用いた。

2) 血清, Römer 反応陰性の体重500g前後の健康なモルモットから得た新鮮燻性血清を使用した。

3) 試験管, 島津 A. K. A. 光電光度計の比色用セルと同質のガラスで特別に製作したL型試験管を用い, クローム硫酸液に24時間浸した後, 流水で十分に洗滌, 更に蒸溜水で洗滌したものを使用した。

4) 使用培地, Sauton 培地, Dubos 培地(栄研製), Tw80 は Atlas Powder co. のものを使用した。

5) 振盪培養器, 孵卵器内に振盪装置を備え外部にモーターをとりつけ, 試験管の振盪は中央を中心に上, 下に5cm 1分間30往復を行うようにした。

6) 振盪培養法、水野^⑤等の法に準じ、荒井^⑫の方法によつた。即ち、使用菌株を小川培地に継代培養し、実験に當つて2週間前後培養の比較的新しい菌 5 mg を 1% Tw80 加 Sauton 又は Dubos 培地にとり 5 日間振盪均等に増殖せしめ Optical Density (以下 O. D.) 1.95~2.0 に達した後、その一定菌量を試験培地 10ml に接種した。血清は培地当り 10 倍, 100 倍, 1000 倍の稀釈になるよう無菌的に添加した。各系列に血清を添加しない対照培地をおいた事は勿論である。

7) 増殖度の測定、測定は島津 A. K. A. 光電光度計に L 型試験管をそのまま差し込み Filter 500m μ を用い、O. D. を測定した。測定は 7~10 日間行い必要により 2 週間行つた。

8) 生菌数の測定、適当に稀釈して 3% 小川培地に還元培養し、生じたコロニーから求めた。

9) 抗結核菌免疫血清の作製、細菌学実習提要^⑬に従い H₂ 株を用いて行い。抗体価の測定は熊谷^⑭の方法によつた。

10) 血清の超遠心法分割、Campbell et al, ^⑮金箱^⑯の方法にしたがいモルモット血清を 3000 RPM, 10 分間遠心後の上清をそのまま日立製 40 P 型超遠心器で 40000 RPM, 5 時間遠心。上, 中, 下の三層に分け、夫々の蛋白濃度を測定した後使用した。全操作を無菌的に行つた事は勿論である。

実験成績

I) H₂ 株, Ravenel 株, 患者分離株を用いての増殖抑制作用

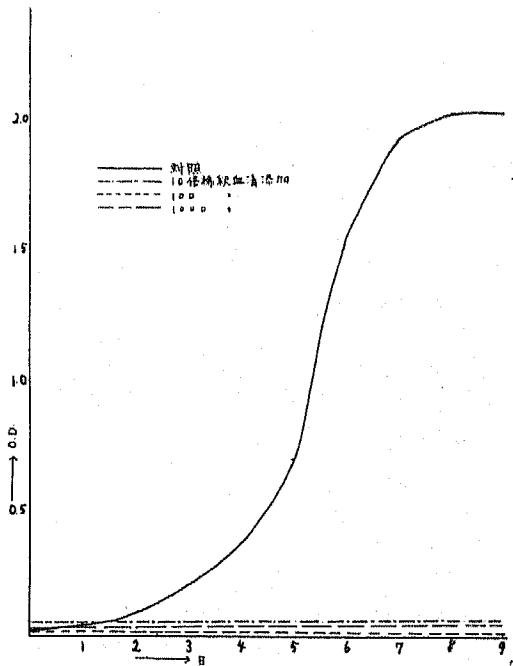
教室の柳沢^⑰の報告によれば振盪培養法により正常モルモット血清を 1% Tw80 加 Sauton 無蛋白培地に添加した場合、100 倍並びに 1000 倍稀釈まで O. D. の増加が認められず完全に結核菌の増殖を抑制したと報告しているが、私は更に人型結核菌 H₂ 株, 牛型結核菌 Ravenel 株, 患者分離株中村, 大田, 大谷, 大輪, 平津株を用いて柳沢同様の実験を行つた。接種菌量は 1% Tw80 加 Sauton 培地 5 日培養の菌液 10⁻¹ 稀釈 1 ml (接種後の推定生菌数 6 × 10⁵/1ml) を用いたが 7 菌株とも対照は 2~3 日で対数増殖に入り 7~9 日後に定常期に移行している。これに反して血清稀釈添加した試験培地では 10, 100, 1000 倍稀釈ともに O. D. の増加は認められず増殖を抑制し、柳沢^⑰と一致する成績を得た。

II) 1% Tw80 加 Dubos 培地を使用した場合の増殖抑制作用

私は実験 I) に於て柳沢^⑰と同様 1% Tw80 加

Sauton 培地で正常モルモット血清が増殖抑制作用を示すことを確認したが、此の抑制作用と培地成分との関係を追求するため Dubos 培地を用いて同様の実験を行つた。実験成績は図 I に示すように H₂ 株は Sauton 培地におけると同様 10, 100, 1000 倍稀釈で O. D. の増加は認められず Sauton 培地, Dubos 培地の間では増殖抑制作用に差異はなかつた。Ravenel 株の場合も全く同様であつた。

図 I Dubos 培地での H₂ 株に対する増殖抑制作用

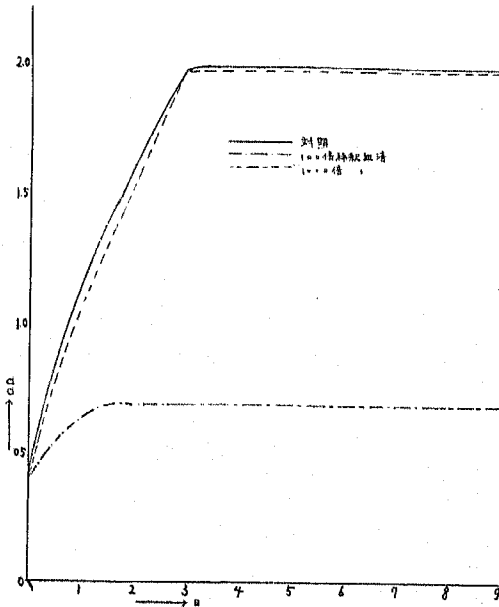


III) 接種菌量による O. D. と生菌数の変化、接種菌量について Miller and Roessler^⑱は、培地 40ml に Tween-Albumin 培地 7~10 日培養の 0.6~0.8 ml, 土屋^⑲は培地 9ml に Dubos 7 日培養の 10⁻¹ 稀釈菌液 1ml 並びに原液 1ml を加えた場合ほぼ同様の O. D. 増加を認め、10⁻² 稀釈 1ml では O. D. の増加が認められなかつたと報告し、青柳, 水野^⑲は Tw 80 加 Sauton 培地で 0.3 mg/10ml とかなり大量を接種している。私は 1% Tw80 加 Sauton 培地 5 日培養の 1, 5, 25, 125, 625 倍, 稀釈菌液各 1ml を 1% Tw80 加 Sauton 培地 10ml に接種し O. D. の増加及び生菌数の消長を追求した。実験成績では 1 倍稀釈では直ちに対数増殖に入り 5 倍, 25 倍稀釈では菌量に応じて調整期が延長し 125 倍以上では O. D. の増加を認めなかつた。生菌数の増加も表 I に示されるよう

表 I 接種菌量による生菌数の消長

培養日数		0日	3日	5日	7日
菌液 希釈 倍数	1倍	68×10^5	18×10^7	33×10^7	26×10^7
	5倍	130×10^4	26×10^6	20×10^7	3×10^8
	25倍	21×10^4	31×10^5	12×10^7	32×10^7
	125倍	32×10^3	40×10^3	2×10^4	8×10^3
	625倍	72×10^2	81×10^2	120×10^2	6×10^2

図Ⅱの①
1倍希釈菌液 1ml 接種した場合の抑制作用

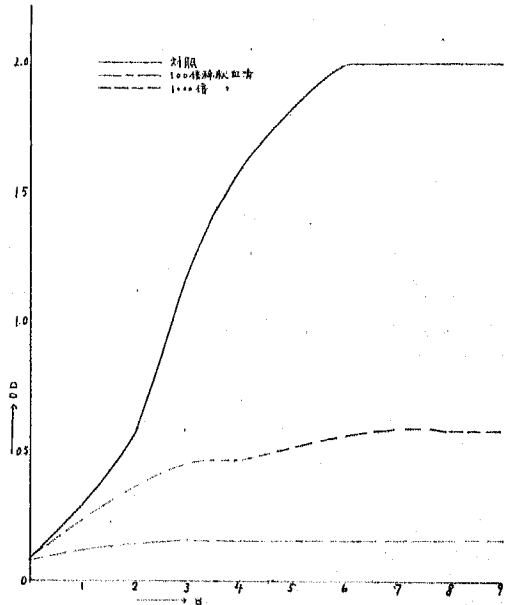


に O.D. 増加とほぼ一致した。此の成績から結核菌の振盪培養にはかなり大量の菌を使用しなければならないものと考えられる。

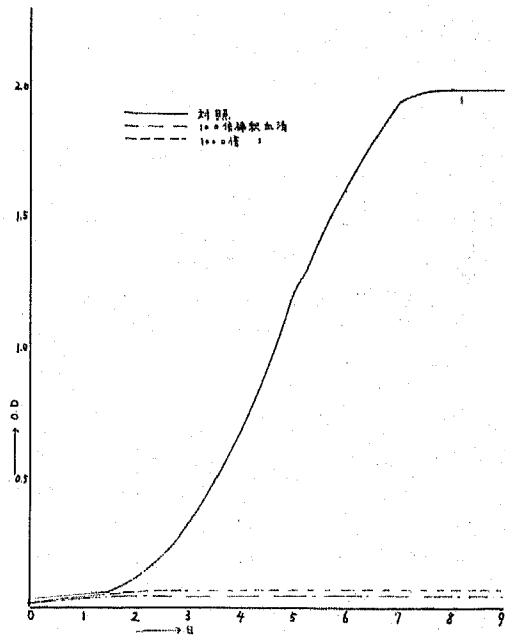
Ⅳ) 接種菌量と抑制作用の変化

実験Ⅱ)の成績から1, 5, 25倍希釈菌液各1mlの接種量に対して1% Tw80加 Sauton 培地に100, 1000倍希釈モルモット血清を添加した試験培地を使用して実験を行った。実験成績は図Ⅱ(①②③)に示されるように1倍希釈菌液1mlの接種では血清1000倍希釈のO.D.の変化は対照と大差なく、血清100倍希釈では2日目まで算術級数的にO.D.増加が認められたがそれ以降はO.D.増加を示さず増殖は抑制された。5倍希釈菌液1mlの接種の場合は血清100倍希釈ではO.D.増加は認められなかったが、1000倍希釈では7日目まで算術級数的にO.D.増加し7日目以降はO.D.の増加を見なかつた。25倍希釈菌液1mlの接種では血清100, 1000倍希釈ともにO.D.の増加は認

図Ⅱの②
5倍希釈菌液 1ml 接種した場合の抑制作用



図Ⅱの③
25倍希釈菌液 1ml 接種した場合の抑制作用



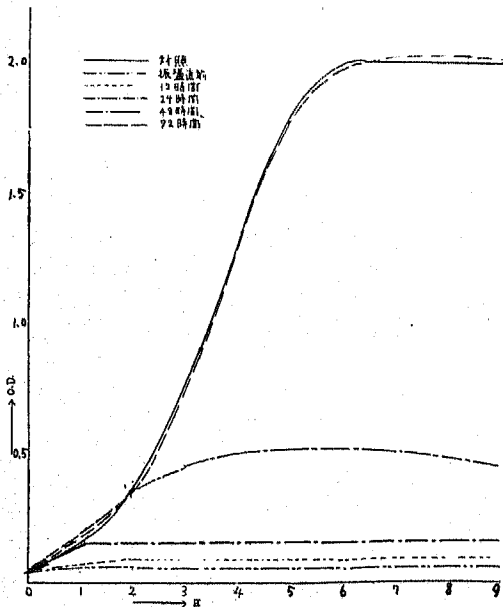
められず、完全に増殖は抑制されている。この成績からモルモット血清の結核菌に対して示す増殖抑制作用は接種菌量に応じてその抑制程度を異にし、1倍希釈1ml(接種後の推定生菌数 $7 \times 10^6/1ml$)では、血清

1000倍稀釈添加の場合にはもはや抑制作用は認められないことを確かめ得た。

V) 血清添加の時間による抑制作用の変化

1% Tw80 加 Sauton 培地に振盪直前, 12時間, 24時間, 48時間, 72時間後に夫々血清 100 倍稀釈添加し O.D. の変化を追求した。実験成績は図 III に示すように 12 時間では振盪直前と同様, 24 時間では血清添加とともに O.D. 増加は停滞した。48 時間ではその後 6 日目まで若干の O.D. 増加を認め 7 日目以降は増加がえられなかつた。72 時間では対照と同様抑制作用は全く認められなかつた。この実験を実験 IV) と比較して対数増殖期の菌は抑制しがたいことがわかる。

図 III 血清添加の時間による抑制作用の変化



VI) Tw80 加 Sauton 培地に血清添加し 37°C に保存した場合の O.D. の変化

Dubos ①は培地に添加された Tw80 の毒性について Tw80 の水溶液は室温数週で結核菌の増殖に阻害作用を示すようになる, と述べその原因については未だ不明である。私は 1% Tw80 加 Sauton 培地に血清 100, 1000 倍稀釈添加して孵卵器内で 37°C 3 日並びに 7 日保存し, 夫々に 3 倍, 10 倍稀釈菌液 1ml を接種して O.D. を測定し, 抑制作用との関係を追求めた。別に対照として非保存のものについて同じく振盪培養を行った。実験成績は図 IV (①, ②, ③) に示されるように, 接種菌量が 10^{-1} 稀釈菌液 1ml 接種のときは 3 日, 7 日保存と非保存のものに差はなく, 3 倍稀

図 IV の① 非保存培地での抑制作用

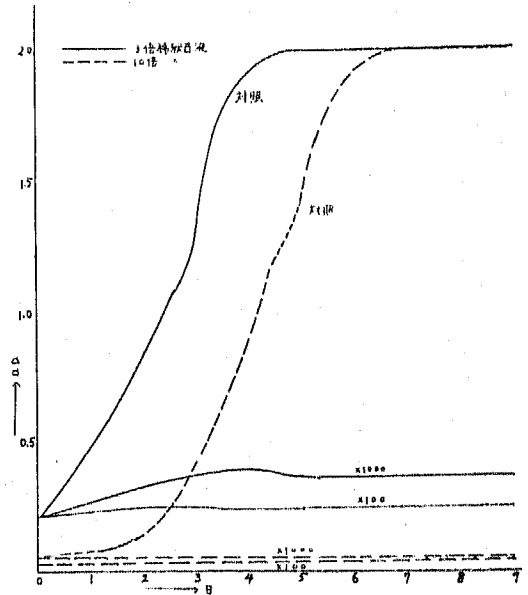
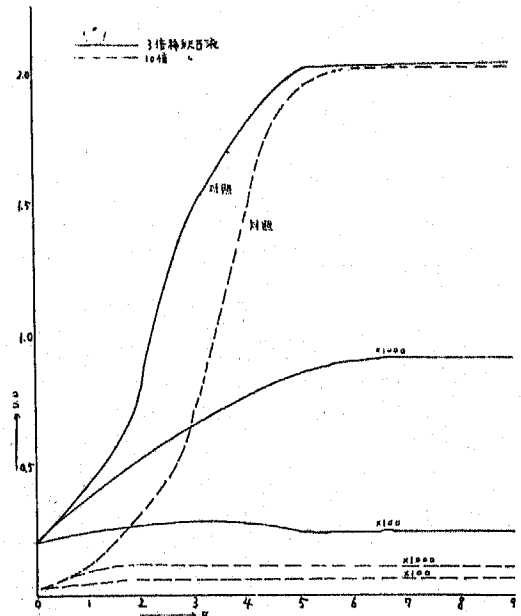


図 IV の② 37°C, 7 日保存した培地での抑制作用



釈菌液 1ml 接種のときは血清 100 倍稀釈では差がなく血清 1000 倍稀釈では保存培地は非保存培地より若干 O.D. 増加を示した。

VII) モルモット血清の超遠心法分割が示す抑制作用

教室の柳沢 ②はさきにモルモット血清の超遠心法分

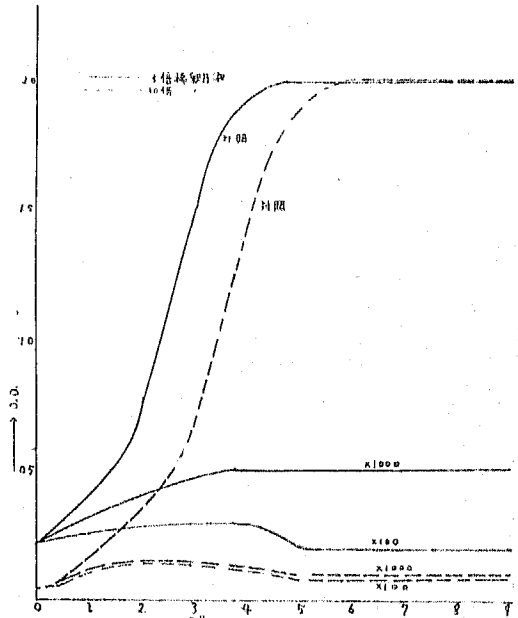
割について、結核菌増殖抑制作用は中、下層に存在し、上層には抑制作用が認められなかつたと報告しているが、この実験で柳沢は血清の稀釈を容積比によって行っている。私は更に血清の蛋白量との関係を詳しく追求するために上、中、下層の総蛋白量を測定し、(上、1.2g/dl, 中、5.1g/dl, 下、9.0g/dl, 遠心前 6.0g/dl) 遠心後の各層と比較すると夫々遠心前の1/6, ほぼ同量, 1.5倍となつていたので、これを遠心前の蛋白量に換算し、100, 1000倍稀釈になるようにして添加し実験を行つた。

実験成績からは上、中、下層ともに O.D. 増加は認められず完全に結核菌の増殖を抑制していた。

Ⅲ) 抗結核菌免疫血清の抑制作用

結核免疫における液性因子の役割については、今日では否定的な見方が強いが佐藤⁽²⁾, 伊藤⁽²⁾, 緒方⁽²⁾, 沖中⁽²⁾, 本間⁽²⁾等免疫血清の抗菌力を認める者も多い。然しながら血中抗体価との関係は未だ解明されていない。私は1% Tw80 加 Sauton 培地での振盪培養によつて、モルモット及び家兎免疫血清の示す結核菌増殖抑制作用を免疫前血清のそれと比較実験を行つた。実験成績は表Ⅱに示されるように赤血球凝集反応は上昇したが免疫血清と免疫前血清との間に有意な差

図Ⅳの③ 37°C, 3日保存した培地での抑制作用



を認めなかつた。

表Ⅱ 家兎並びにモルモットの免疫前血清と免疫血清が示す増殖抑制作用の比較

供試動物	家 兎 1		家 兎 2		モルモット 1		モルモット 2	
	免疫前	免疫後	免疫前	免疫後	免疫前	免疫後	免疫前	免疫後
血清採取期								
赤血球凝集反応	× 7	× 224	× 7	× 112	0	× 56	0	× 112
血清稀釈倍数	× 10	× 100	× 10	× 100	× 1000	× 10000	× 1000	× 10000
抑制度	+	±	+	+	+	-	+	-

註：+; 抑制強度 ±; 抑制軽度 -; 抑制せず

総括並びに考察

Dubos, Middlebrook⁽¹⁾⁽²⁾等が Tw80, アルブミン Fraction V を用いて抗酸性菌の深部培養に成功し, Volk and Myrvic⁽³⁾, Miller and Roessler⁽⁴⁾等はこのを応用して結核菌の振盪培養に成功したが、本邦においても青柳, 水野⁽⁵⁾⁽⁶⁾, 川村, 河合⁽⁷⁾, 土屋⁽⁸⁾, 呉, 勝又⁽⁹⁾, 戸塚等⁽¹⁰⁾, 荒井⁽¹¹⁾等数多くが振盪培養の発育促進効果を報告している。

しかしながら Schaefer⁽¹²⁾等及び Kull⁽¹³⁾等の反対成績もあり、土屋⁽⁸⁾は彼等の使用した Tw80 の量が

0.02~0.05% で少なかつたのではないかと述べている。しかし、Miller⁽⁴⁾は0.05%の培地で振盪培養に成功しており、振盪培養には Tw80 の量のみでなく、接種菌量, 振盪回数, 使用培地等, 種々の因子が関係するものと考えられる。接種菌量については Miller⁽⁴⁾等は、培地 40 ml に Tween-Albumin 培地, 7~10日培養の 0.6~0.8 ml, 土屋⁽⁸⁾は 10⁻¹稀釈 1 ml, 荒井⁽¹¹⁾は原液 1 ml, 柳沢は 5mg/ml と何れもかなり大量に使用している。私は 1% Tw80 加 Sauton 培地 5日培養の 10⁻¹稀釈 1ml を接種菌量として用い良

好な増殖を得ることが出来た。又1% Tw80 加 Sauton 培地 5日培養の 25倍稀釈(接種後の推定生菌数 2×10^5 /1ml)までは結核菌の増殖を認めたが、125倍稀釈以上では O.D. の増加を認めず生菌数も減少していた、川村^⑦も培地 10ml に 0.5mg 以下の菌を接種した場合には十分な発育が認められず Vitality の高い十分な菌量の接種を必要とすることを認めている。一般に抗酸性菌の振盪培養を行うに当り、培地に添加される血清並びにアルブミンについては Tw80 の解毒としての作用の外、Dubos^②はアルブミンのみが、合成培地に接種された少量結核菌の早期発育を可能にすると報告、更に結核菌の成長促進因子は、非透析性であるが、セロハン袋にアルブミン溶液を入れてメジウムの中へ吊すと、菌の成長を促進し、このことはメジウム中の透析性の成分との相互作用によりその効果を示すのであろうと述べている。その後、Dubos and Middlebrook^④は牛の血清アルブミン Fraction V は純粋な結晶アルブミンでは示さない促進作用を現すがこの作用は、アルブミン蛋白によるものではなく、アルコール可溶性の血清中の耐熱性因子によるものであるが、未だ詳細は明らかにされないことを報告している。かゝる血清並びにアルブミンの示す結核菌増殖促進作用は、Schaefer 等^③ Sattler and Youmans^⑤ Darzins^⑥等によつて認められている。一方宝来^⑧、三浦^⑨は正常モルモット血清の結核菌増殖阻止作用について、報告を行つており、教室の柳沢^{⑩⑪}の Sauton 無蛋白培地における実験でも、正常モルモット血清単独添加の場合、血清50倍稀釈まで結核菌の増殖を阻止し、しかも1% Tw80 加 Sauton 培地では、血清1000倍稀釈まで完全に結核菌の増殖を抑制し、血清100倍稀釈では殺菌的であり、1000倍稀釈では静菌的で、この増殖抑制作用は、モルモット血清と Tw80 の協同作用であると報告している。私の人型結核菌 H₂ 株、牛型結核菌 Ravenel 株、患者分離株 5 株を用いた、1% Tw80 加 Sauton 培地における実験も、接種菌量、 10^{-1} 稀釈菌液 1ml (接種後の推定生菌数 6×10^5 /1ml) の時には、血清1000倍稀釈まで、O.D. の増加は認めず、柳沢^{⑩⑪}と全く一致する成績を得た。又、培地と抑制作用の関係についても、Sauton 培地と Dubos 培地とでは、この抑制作用に差を認めることは出来なかつた。しかるに、接種菌量を増すと、5倍稀釈菌液 1ml (接種後の推定生菌数 1×10^6 /1ml) 接種のときは、血清100倍稀釈では、O.D. の増加はないが、血清1000倍稀釈では、若干 O.D. 増加が認められ、原液 1ml (接種後の推定生菌数 7×10^6 /1ml) 接種のときは、血清100倍稀釈で O.D. が若干

増し、血清1000倍稀釈では、抑制作用は全く認められなかつた。更に実験 V) により、 10^{-1} 稀釈菌液 1ml 接種、振盪 72 時間後、対数増殖に入つたものに(推定生菌数 5×10^6 /1ml) 血清100倍稀釈添加しても、増殖阻止作用は認められず、柳沢^{⑩⑪}の報告した結核菌増殖抑制作用も菌量の増加とともに、減弱し、この変化は対数増殖期の菌に対しては、更に顯著となるのを認めた。

Dubos^①は、その原因は不明であるが、培地に添加された Tw80 は血清の存在により、室温数週で結核菌に阻害作用を示すと報告しているが、私の行つた実験 VI) の結果では、1% Tw80 加 Sauton 培地に血清を添加して 37°C 7 日保存したものは、非保存のものと比較して、接種菌量 10^{-1} 稀釈菌液 1ml のときには、差はなく、3倍稀釈菌液 1ml のときには、血清100倍稀釈では差がなく、血清1000倍稀釈では、保存培地は、非保存培地より若干 O.D. 増加し、Dubos^①の言う Tw80 の毒性増加はなく、反対に血清1000倍稀釈の示す抑制作用は若干減弱するように思われた。

血清の超速心法分調と、増殖抑制作用との関係については、私の実験によると、上、中、下層とも完全に増殖を抑制し、差を認めなかつた、尚 3 層の内容に関しては不明であるため、この抑制作用と蛋白の種類については、結論出来なかつた。

結核免疫における液性因子の役割について、近年は赤血球凝集反応によつて、血中に抗体が存在することが知られている。ところがこれ等の抗体が防禦体として、免疫に関与しているか否かについては、否定的な見方が強い。その実験的根拠は、免疫血清に in Vitro で、結核菌の増殖を阻止する力のないこと、又血清による防禦力の受身感作の成功しないことにあるとされてきた。しかし、血中抗体の防禦力を認めた報告もあり、古く Lurie^⑫は、コロジオンを塗つた絹袋を、動物の腹腔内へ入れ、細胞の関与しないメジウムで、結核菌の生体内培養を行い、免疫動物の体内では、正常動物に比し明らかに、菌の増殖が阻止されることを認めている。

本邦においても、佐藤^⑬、伊藤^⑭、緒方^⑮、冲中^⑯、本間^⑰等は、免疫血清の抗菌力を認め、冲中^⑯は結核患者血清の γ グロブリン中には、結核菌によつて、特異的に吸収される部分のあることを、電気泳動法で観察している。辻等^{⑱⑲}によると、結核菌の増殖阻止作用には体液の高分子、及び低分子因子が重要な意義を有し、非病原性菌には、高分子因子(恐らくは蛋白)が毒力菌には、低分子因子が、発育阻止的に作用すると述べているが、血清又は体液中の抗体との関係は、

未だ明らかにされていない。

私は、1% Tw80 加 Sauton 培地の振盪培養法によつて、家兎並びにモルモットの免疫血清、免疫前血清の示す結核菌増殖抑制作用を比較検討したが、その間に有意の差を認めなかつた。尚免疫前家兎血清の100倍稀釈の増殖抑制作用が使用家兎2匹の間で、差がみられたが、個体差によるものと思われる。

結 論

① Tw80 加 Sauton 無蛋白培地をもつて、荒井の方法に準じて、振盪培養を行い、柳沢の報告した Tw80 と血清の協同作用による増殖抑制作用は、人型結核菌 H₂ 株、牛型結核菌 Ravenel 株、患者分離株においても同様に、認めることが出来た。

② 上記の Tw80 と血清の協同作用による増殖抑制作用は、菌量の増加に伴い、減弱し、この事は対数増殖期の菌に対しては更に顕著となる。

③ Tw80 加 Sauton 培地は血清添加後 37°C 7日間保存しても Tw80 との協同作用による増殖抑制作用には、あまり影響を与えなかつた。

④ 増殖抑制作用とモルモット血清超遠心法分劃との関係については、上、中、下、3層の何れにも抑制作用の存在することを確めた。但しこの場合、分離はヤム不十分であつた。

⑤ 家兎及びモルモットの免疫血清、並びに免疫前血清について、増殖抑制作用を検討し、両者の間に差を認めなかつた。

稿を終るに当り、終始、御指導と御校閲を賜つた、恩師田崎忠勝教授に深甚なる謝意を表すると共に、種々御協力を載いた細菌学教室の各位及び、戸塚内科勝又博士に衷心より感謝の意を表します。

文 献

① Dubos, R. J. and Davis, B. D., : J. Exp. Med., 83 ; 409, 1946 ② Dubos, R. J. and Middlebrook, G. M., : Am. Rev. Tuberc., 56 ; 334, 1947 ③

Volk, W. A. and Myrvik, Q. N., : J. Bact., 66 ; 386, 1953 ④ Miller, I. L. and Roessler, W. G., : Am. Rev. Tuberc., 73 ; 716, 1956 ⑤ 青柳高明, 水野伝一, : 日本細菌学会第 29 回演説抄録, p. 46, 昭 31 ⑥ 青柳高明, 水野伝一 : 日細菌誌, 12 ; 819, 昭 32 ⑦ 川村達, 河合道, : 日細菌誌, 12 ; 561, 昭 32 ⑧ 土屋皖司, : 日細菌誌, 14 ; 24, 昭 33 ⑨ 草間久子, : 結核, 33 ; 185, 昭 33 ⑩ 呉真一, 勝又昭司, : 日内会誌, 46 ; 771, 昭 32 ⑪ 戸塚忠政, 他, : 日本医事新報, 1740, 42, 昭 32 ⑫ 荒井聖二, : 信州医誌, 8 ; 1212, 昭 34 ⑬ Dubos, R. J., : Am. Rev. Tuberc., 63 ; 119, 1951 ⑭ Schaefer, W. B., Marshak, A. and Burkhart, B., : J. Bact., 58 ; 549, 1949 ⑮ 柳沢雄次, : 信州医誌, 8 ; 2354, 昭 34 ⑯ 柳沢雄次, : 信州医誌, 発表予定 ⑰ 細菌学実習提要 : 伝染病研究所編, 昭 33 ⑱ 熊谷直秀, : 日新医学, 38 ; 481, 昭 26 ⑲ Campbell, D. H., Sturgeon, P. and Vinograd, J. R., : Science, 122 ; 1091, 1955 ⑳ 金箱房枝, 他, : 犯罪学雑誌, 24 ; 58, 昭 34 ㉑ 佐藤理太郎, : 実験医学雑誌 10 ; 871, 大 15 ㉒ 伊藤次郎, : 結核, 8 ; 291, 昭 5 ㉓ 緒方準一, 結核, 10 ; 117, 昭 7 ㉔ 沖中重雄, : 結核, 27, 554, 昭 27 ㉕ 本間日臣, : 結核, 26 ; 617, 昭 26 ㉖ Kull, F. C. and Grim, M. R., : J. Bact., 64 ; 431, 1952 ㉗ Dubos, R. J., : Proc. Exp. Biol. Med., 58 ; 361, 1945 ㉘ 宝来善次, : 結核, 17 ; 621, 昭 14 ㉙ 三浦博, : 大阪医誌, 7 ; 31, 昭 31 ㉚ Lurie, M. B., : J. Exp. Med., 69 ; 555, 1939 ㉛ 辻周介, 他, : 結核研究の進歩, 8 ; 215, 昭 29 ㉜ 辻周介, 他, 最新医学, 11 ; 1236, 昭 31 ㉝ Boissevain, C. H., : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44 ; 110, 1940 ㉞ Davis, B. D. and Dubos, R. J., : Arch. Bioch. Biophys., 11, 201, 1946 ㉟ Sattler, T. H. and Youmans, G. P., : J. Bact., 56 ; 235, 1948 ㊱ Darzins, E., : The Bacteriology of Tuberculosis, 1955