

Streptomycin 依存性結核菌の分析に基いた結核症の 感染と免疫に関する実験的研究

第1報 Streptomycin 依存性菌の分離、生物学的性状 および Streptomycin 投与の病原性に及ぼす影響

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

橋本 達一郎

(受付 昭和29年8月7日)

人型結核菌の Streptomycin (SM) 依存性菌は、S M治療によりかえつて病状が悪化した結核患者の痰から Spendlove 等がはじめて分離したが(1948年)¹⁾、その前年に Miller および Bohnhoff が SM 依存性菌を最初に髄膜炎菌から分離し²⁾、それが SM 投与によりかえつて著しく強毒化される成績をえたことから考えて結核症の SM 治療上に重大な示唆を与えた。しかしその後、SM 依存性菌の出現は抵抗性菌程 SM 治療上の障碍となることなく、その理由として出現の濃度や病原性の面からいくつかの知見が提供され考察されている。

その後依存性菌は結核菌以外の多くの細菌についても報告され、その生物学的性状、免疫元性、病原性が研究されている。Mycobacterium では、Myc. tuberculosis var. hominis について上記 Spendlove 等の外に、Yegian 等³⁾、Tison⁴⁾、Lenert 等⁵⁾、Owen 等⁶⁾、Vanderlinde および Yegian⁷⁾、Doane および Bogen⁸⁾、村田の報告⁹⁾があり、Myc. ranae について早くから Yegian 等³⁾、¹⁰⁾–¹²⁾ が興味ある一連の研究を展開している。又矢坂および山村¹³⁾ は Myc. avium の SM 依存性菌をえている。以上 Mycobacterium の SM 依存性菌に関する報告は少なくないが、分離方法が種々であるために分離菌の SM 要求量および依存性変異の安定性もまた様々である。Vanderlinde および Yegian⁷⁾、SM 依存性菌の病原性に関する研究成績の不一致は、その依存性変異の安定性について吟味がたりないためであるとし、長期間継代培養を行つても容易に SM 感受性菌又は SM 抵抗性菌を生じない安定な SM 依存性菌を用いるべきことを強調している。

最近、感染・免疫機序が結核症とよく似ている Brucellosis の生菌免疫に、菌力の強い菌株から分離された安定な SM 依存性菌がワクチンとして用いられ、成功を収めたが¹⁴⁾、¹⁵⁾、この研究はその実際的な意義の外に Brucellosis や結核症のような特異な感染、免疫機序をもつ疾病の研究に、SM 依存性菌のような厳格な栄養要求変異菌を用いるべきことを示唆したといえよう。

ことに集落分離が困難で、単一菌からの集落の得にく

い結核菌においては、SM 依存性変異およびその逆変異を利用して、結核症の感染と免疫の興味ある一断面がうかがえるのではあるまいか。著者は研究室保存の強毒人型結核菌 H₂ 株から、極めて安定な SM 依存性菌を分離することができたので、この菌株に関する実験を中心として、てんじくねずみにおける結核症の感染と免疫について考察した。本報告においては、まず依存性菌の分離、同定およびその病原性に及ぼす SM 投与の影響について述べようと思う。

実験材料および実験方法

1) 使用菌株は SM に曝露されたことのない予研保存の強毒人型結核菌 H₂ 株で、この glycerin-bouillon-potato 14 日培養から 10mg/ml 蒸留水浮遊菌液をつくり、依存性菌の分離に用いた。

2) 全実験を通じて同一 Lot の Merck 製 Streptomycin (calcium chrolide complex) を用い、重量は常に pure base 相当量をもつて表わした。

3) SM 含有 Kirchner 寒天平板の製法は既に発表した通りであるが¹⁶⁾、この SM 100γ/ml の平板 47 枚を用い、1 枚につき上記の菌液 0.3ml (3mg 菌量) ずつを接種し全面に流した後、37°C に培養した。

4) 分離した依存性菌は SM 100γ/ml の Kirchner 寒天に継代し、或いは凍結乾燥して保存し、時にのぞんで実験に用いた。継代菌は寒天斜面からかきとりそのまま秤量して用いるか、又は遠洗法により蒸留水で十分に洗滌した後、濾紙で脱水、秤量して実験に供した。

5) 依存性菌の病原性に及ぼす SM 投与の影響は次のようにしてしらべた。SM 含有培地継代第 4 代の依存性菌(洗滌菌体)から菌液をつくり、体重 300-400g のてんじくねずみに、皮下(右下腹部)には 1mg ずつ、静脈内には 0.1mg ずつ接種し各群それぞれ SM 投与群と非投与対照群に分けた。接種依存性菌の生菌単位数は SM 100γ/ml-Kirchner 寒天で決定したが、 47.5×10^8 /ml であつた。

SM 投与は感染と同時に始め、毎日 20mg ずつ 2 回

にわけて腋窩部皮下に注射し、屠殺する迄8週間継続した。8週目に全群を100倍ツベルクリン稀釈液でアレルギーをしらべ、屠殺剖検して肉眼的にリンパ腺系および内臓の結核性病変を観察した。その際脾を乳鉢ですりつぶし1% NaOH 溶液で100mg/ml 乳剤として0.1ml ずつ培養した。培養には100% SM-Kirchner 寒天とSM を含まない小川培地の2種を用い、4週間37°Cに培養後脾10mg 中の生菌数を計算した。

同じことを同時にもとのSM感受性H₂株について行った。すなわち、Kirchner(Sy Ser) 液体培地発育菌膜の11日培養から菌液をつくり、てんじくねずみの皮下に1mg ずつ注射してSM 投与および非投与対照の2群にわけた。接種菌の生菌単位数は $26.6 \times 10^8/mg$ であった。

実験成績

実験1 依存性菌の分離

SM 100% Kirchner 寒天平板47枚に接種したH₂株の全生菌単位数は 4.4×10^9 であった。平板上の集落は培養2週では0、3週では59、4週では103と殆んど大部分が発現し、6週以後集落数の増加はなかつた。総計108の出現集落は6週から8週迄に適當の大きさのものから鈎菌しSM感受性をしらべた。その結果塗抹培養によりSM 100%の培地にもみ発育し、SM を含まぬKirchner 寒天および小川培地には発育しない菌株は、表1のH₂株Potato 14日培養に示すように1株だけであった。このSMを必須発育要素とすると考えられる依存性菌は分離平板上では培養5週目にはじめて集落がみとめられ、集落の発現が他のSM 抵抗性菌よりおそかつた。

なお表1にはH₂株およびBCGの各培養から同様な方法で依存性菌の分離を試みた成績を総括したが、SMを必須発育要素とする厳格な依存性菌は全実験を通じ1株(186株)だけで 4.4×10^9 という最大のpopulationからであった。

実験2 依存性菌(186株)の生物学的性状

依存性菌自体は Ziehl-Neel-

sen 染色ではもとのH₂株と染色性および形、大きさにおいて異なるところなく、抗酸・アルコール性をもっている。SM 100% Kirchner 寒天に塗抹培養すると、7日—10日で黄白色、乾燥性の菌苔をつくるが、菌液接種による小菌数の培養では、発生集落は3週以後にみられ、もとのH₂株のそれと発育速度、形態および色調が全く同じで、R型、黄白色、乾燥性で容易に他の抗酸性雑菌とは区別することができる。

液体培地における発育は次の如くである。SM 200% Kirchner (Sy Ser) 液体培地に依存性菌菌液を接種すると、管底に深部発育を行い、3—4週で液表に菌膜をつくる。この菌膜をとり、SM 500%のSauton培地(30ml 分注)の液表にうかせ、8週間培養すると菌膜は液面全体をおおい旺盛に発育するが、菌膜下の培養液は黄色透明である。収量は培地1本につき凍結乾燥菌体で約60mg であつた。加熱殺菌後の濾液を10倍に稀釈し、H₂株感染てんじくねずみについて皮膚アレルギーの惹起力をみた。その成績は表2に示すように100倍

表1 BCGおよびH₂株の各培養から100% SM 寒天平板によるSM-依存性結核菌の選択的分離

菌株	培 養	SM 100% Kirchner 寒天平板における			
		接種全生菌数	分離集落数(培養8週)		
			SM-抵抗株	SM-発育増強株	SM-依存株
BCG	Sauton 14日培養	1.5×10^7	4	1	0
	Sauton 10日培養	1.1×10^8	0	0	0
	Sauton 7日培養	3.2×10^8	5	0	0
H ₂	Sauton 14日培養	5.3×10^7	0	0	0
	Sauton 14日培養	1.8×10^8	1	0	0
	Potato* 13日培養	1.5×10^9	0	3	0
	Potato 15日培養	2.5×10^9	47	6	0
	Potato 14日培養	4.4×10^9	82	25	1

* Potato 培地は glycerim-bouillon-potato 培地

表2 感作および非感作てんじくねずみにおけるSM-依存性菌(186株)の産生する「ツベルクリン様物質」の標準ツベルクリン(青山B株)およびH₃₇Ra 株ツベルクリンとの力価比較

対象動物	各菌株の100倍稀釈ツベルクリン	各動物におけるツベルクリン反応の平均値(mm)									
		動物NO:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
結核感染動物	青山B 18 b	16	24	20	20	22	17	19	19	17	17
	H ₃₇ Ra	13	10	12	13	11	13	12	11	11	10
		17	13	19	19	17	17	15	17	18	17
健康動物	青山B 18 b	6	5	0	5	4	0	3	7	3	4
		6	6	0	3	3	0	0	6	4	4

註：ツベルクリン反応は0.1ml 皮内に注射後24時間目に発赤を伴つた硬結の縦横径をはかり、その平均値であらわした
18 b ツベルクリンは濃縮していないので、10倍稀釈液が標準ツベルクリンの100倍稀釈に相当するとした

表3 SM含有培地に継代第24代のSM依存性菌(18b株)が示すKirchner寒天培地上におけるSM依存性

Kirchner寒天のSM濃度 γ/ml	SM依存性菌各菌量からの発生集落数 (培養4週)					
	10 ⁻¹ mg	10 ⁻² mg	10 ⁻³ mg	10 ⁻⁴ mg	10 ⁻⁵ mg	10 ⁻⁶ mg
0	1*	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
50	∞	∞	∞	φ	φ	44
100	∞	∞	∞	φ	φ	35
200	∞	∞	∞	φ	φ	51
500	∞	∞	∞	φ	φ	71
1000	∞	∞	∞	φ	φ	52

註. ∞ : 集落培地全面をおおい計算不能
 φ : 集落培地半面以下をおおい計算不能
 * : SM依存性菌の逆変異菌(SM 100γ/ml培地に発育せずSM 0γ/ml培地に発育)

稀釈の旧ツベルクリンおよび無毒結核菌 H37Ra ツベルクリンにくらべ力価は弱いが、アレルギー性はあると思われる。

実験3 SM依存性変異の安定性

依存性菌のSM感受性を培地継代中の任意の時期に、

表4 てんじくねずみに対するSM依存性菌の病原性およびこれに及ぼすSM投与(20mg/日, 8週間)の影響

SM感受性菌皮下1mg接種	分離培地 SM濃度	各動物の脾10mg中の生菌単位数							
		100γ/ml: 0	0	0	0	0	0	0	0
SM投与	100γ/ml: 0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0γ/ml: 2	0	0	0	0	0	0	0	0
対照	100γ/ml: 0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0γ/ml: 52	∞	∞	27	31	∞	∞	160	
SM依存性菌皮下1mg接種		SM投与							
SM投与	100γ/ml: 0	2	4	2	3	0	0	2	
	0γ/ml: 0	0	0	0	0	0	0	0	
対照	100γ/ml: 0	0	0	0	0	0	0	0	
	0γ/ml: 0	0	0	0	0	0	0	0	
SM依存性菌静脈内0.1mg接種		SM投与							
SM投与	100γ/ml: 7	1	11	3	10	8	2	40	
	0γ/ml: 0	0	0	0	0	0	0	0	
対照	100γ/ml: 0	70	22	0	19	14	23	76	
	0γ/ml: 0	0	0	0	0	0	0	0	

記号説明: 肺の結節わずか(+)

接種部位所属
リンパ腺の腫脹



肺に結節10個前後(十)
脾に結節極めて多数(卅)
肝に結節かなり多数(卅)
脾重量(g)

塗抹法でしらべると、培養2週間ではSM 100γ/ml培地に発育がみられるが、SMを含まない培地には発育がみられなかつた。しかし塗抹菌量が非常に大量で培養期

間が少なくとも3週間以上になるとSMを含まない培地にも僅かに集落が発生する。これらの集落はSM 100γ/ml培地には発育せず、第2報にのべるように依存性菌からの逆変異菌と思われる。

表3には継代第24代目のSM 200 γ/ml Kirchner 寒天 10日培養の依存性菌(洗滌菌体)を、各濃度のSM含有Kirchner寒天に各菌量接種し、37°C、4週間培養した成績を示す。これによるとSM 10γ/ml以下では集落をつくらず、50~1000γ/mlの培地ではほぼ同様な旺盛な発育がみられた。この際、SMを含まない培地に、10⁻¹mg接種した菌群から1個の集落が出現したが、この菌はSM 100γ/mlの培地には発育せず、逆変異菌が選択されたものと思う。なお同代の菌を用いて菌体を洗滌せずに同様な実験を行った場合もやはりSM 10γ/ml以下では発生集落を認めなかつたが、SM 5000 γ/mlではかえつて発育の抑制を認めた。

実験4 SM投与と依存性菌の病原性との関連

SM依存性菌を接種されたてんじくねずみは、皮下には少なくとも10⁶以上、静脈内には10⁵以上の生菌が入つて8週間を経過したにも拘らず、表4の対照群に示すようにいずれも肉眼的にはリンパ腺系および内臓に殆ど結核性病変をつくらず、依存性菌の病原性はないといつてもよいであろう。一方もとのSM感受性H₂株は同様な条件で極めて強毒であり、これに対し1日20mgのSM投与は著しい治療効果をあらわしている。しかし依存性菌接種群にSMを投与した場合は感染経路を問わず肉眼的病変は極めて軽く、非投与対照群と同じである。肺に認められた数個の結節も粟粒大で乾酪化を伴つていなかった。なおツベルクリン・アレルギーは、感染経路、SM投与の有無を問わず、依存性菌接種群全部に発現していた。次に剖検時の脾の培養成績をみると、もとのH₂株接

種群では病変に相応して多数の SM 感受性菌集落をえたが、これにくらべて依存性菌接種群の脾から培養された集落数は少なかった。しかもこれらの集落はいずれも SM 依存性で、SM を含まない培地では分離できなかつた。このことは、動物体内でも SM 依存性は長く安定であることを示唆している。

この場合、SM 投与の影響をみるに、まず皮下接種群では、対照群は脾に菌が陽性の動物は 1 匹もないのに対して、SM 投与群では $\frac{5}{6}$ に菌が陽性であつた。静脈内接種群では、投与群および対照群において菌の証明される率はそれぞれ $\frac{5}{6}$ 、 $\frac{4}{6}$ で前者がやや高いが、その菌数をみると対照群でも相当に高いので、SM 投与の影響は皮下接種群程著しくないといえる。

考 察

結核患者¹⁶⁾⁸⁾の痰および切除肺の病巣¹⁷⁾から SM 依存性菌を分離した報告はあるが、Spendlove 等の症例¹⁾をのぞいては、SM 投与により病状が悪化進行した原因が直接 SM 菌依存性菌の出現に帰された例はない。むしろ SM 抵抗性菌の出現およびその菌力(Virulence)が問題となつたのである。

この理由の 1 つとして SM 依存性菌の出現が抵抗性菌にくらべて少ないということも考えられる。著者の行つた試験管内の分離実験では、8 回の実験を通じて最大の population から依存性菌 1 株を分離することができたにすぎない。しかし SM により発育を増強される菌は、抵抗性菌にくらべれば少ないが依存性菌より分離濃度が大きい。ところがこの菌の本態は、Yegian 等の考えるように不安定な依存性菌であるのか、Hurwitz の指摘するように¹⁸⁾¹⁹⁾抵抗性菌が培養環境(特に pH)により SM の発育刺激作用をうけるものかは決め難い。ここでは依存性菌という名称は安定な依存性変異菌だけに限定することにしたい。

又依存性菌分離の方法は著者の行つた SM 高濃度含有培地による一度の選択で単一集落として分離する方法が実験材料をうるには最も望ましいと思われる。臨床材料から又は液体培地継代による分離菌は不安定な混合依存性菌をうる可能性が大きいからである。

化学療法剤による変異結核菌として報告される菌株の中には、その性状から考えて混入雑菌の分離と考えられるものもあるので、分離した依存性菌が、もとの *Myc. tuberculosis* に属するものであるという同定が必要であろう。

著者は、(1)特定培地上の集落の色、形および発育速度が結核菌と同じであり、(2)抗酸性菌であり、(3)ツベルクリン様物質を産生し、(4)てんじくねずみに静脈内注射をすれば臓器に顕微鏡的結核結節をつくり、同時にツベルクリンアレルギー及び抗結核免疫を与え、(5)

SM を必要としない逆変異菌として依存性菌から分離される単一集落はすべて結核菌の性質をそなえているという 5 つの点を依存性菌(18b 株)が全部をもっていることから、H₂ 株の変異菌であると考えて誤らないと思う((4)、(5)については後報でのべる)。

SM 依存性菌の SM 要求量は 1Y/ml から 100Y/ml まで分離菌によつて一定でない。著者の 18b 株の SM 要求量の限界は 10Y/ml と 50Y/ml の間にあると思われるが、一方もとの H₂ 株は SM 1Y/ml で完全に発育を阻止される。Paine および Finland²⁰⁾ は感受性菌と依存性菌の発育阻止濃度が一致することから、両者の間に密接な連関があり相互に容易に移行しようと考えたが、この現象は 18b 株では認められない。しかも表 3 は SM 含有培地に 24 代、長期間継代した菌の成績であるから、この菌の SM 依存性は極めて安定しているといえると思う。

SM 依存性菌の SM 要求量が、上述のように高く安定したものであるならば、SM の存在しない生体内ではこの菌は増殖できず、従つて結核菌の菌力の本質から考えてこれを無毒結核菌とみなしてもよいことになるであろう。事実 SM 依存性菌の病原性に関しては結核菌のみならず一般細菌についても、殆んど大部分の報告がその喪失を認めている。この菌力の喪失がもし菌力を支配する数多くの因子の中の SM 依存性変異のみによつていのであれば、SM 投与によつてその菌力は恢復され強毒菌として行動する筈である。Miller 等は髄膜炎²¹⁾で、Tison は結核菌⁴⁾で、牛場等は腸炎菌²¹⁾で、平塚は赤痢菌において²²⁾、ともに SM の投与により依存性菌が強毒化されることを報告している。

しかし結核症においては、上記 Tison の報告をのぞいてはいずれも感染 SM 依存性菌が殆んど投与の影響をうけないことを指摘している。著者の成績でも SM 依存性菌の病原性は SM 投与によつても、もとの感受性菌程に恢復されなかつたことは明らかである。又感染形式において結核症と類似点をもつ Brucellosis では、Olitzki 等²³⁾ および Herzberg 等¹⁴⁾ はいずれも SM 依存性ブルセラ菌が SM 投与により病原性を恢復しなかつたことをのべている。このように結核症や Brucellosis のような、ある時期には細胞内寄生状態ともいふべき感染形式をとる感染症に SM 投与の影響を否定する成績が多く、他の細菌類による感染症では SM 投与が依存性菌の増殖に強い影響を及ぼしていることは、Suter²⁴⁾ や Mackness 等²⁵⁾ の結核菌を貪食した組織培養の単核細胞内には SM が透過しにくいという実験成績から考えると意義があるように思われる。

従つて SM 依存性結核菌の病原性が SM 投与により殆んど影響をうけない理由としては、第 1 に生体内の結核菌の発育環境における SM 濃度が、果して必要な水準に

到達維持されうるかということが考えられ、依存性菌の SM 要求量が高い程、この可能性は大きい。村田⁹⁾はこの点を特に強調しているが、一方 Doan 等⁸⁾は、毎日 SM 10mg の大量をてんじくねずみに2カ月間投与しても殆んど病原性を恢復しなかつた成績をえており、Vanderlinde 等⁷⁾は SM 5γ/ml という低い要求量をもつ依存性菌も 100γ/ml の依存性菌と同じく、SM 投与により病原性の恢復がみられなかつたとのべている。故に SM 依存性菌感染に対する SM 投与の影響については、投与 SM の宿主生体内濃度の外に、依存性菌自体における SM 依存性以外の菌力構成因子が同時に変異をおこして無毒化し SM の投与とは全く無関係になるということも考えねばならぬであろう。そのためには SM 依存性結核菌の菌力を更に詳細に分析することが必要である。

総括および結論

SM 依存性結核菌の1菌株を強毒人型結核菌 H₂ 株から分離することができた。この依存性菌はもとの H₂ 株からの変異菌であることを若干の生物学的性状から確認することができ、SM 要求量は 10γ/ml 以上で、長期間の培地継代においても極めて安定であつた。

てんじくねずみに対し依存性菌を皮下又は静脈内に大量接種しても殆んど肉眼的病変をつくらず、無毒化が著明であつた。しかし依存性菌の一部は動物体内に8週間、もとの SM 依存性を維持したまま生残することができる。これに対し SM の投与を試みたが、感染依存性菌の菌力を強めてもとの H₂ 株と同程度の菌力を恢復することはできず、感染経過に大きな影響を与えることはできなかつた。この理由について、生体内依存性菌発育環境における SM の到達濃度および依存性菌自体における菌力構成因子の変異の二面体が考察された。

終りにのぞみ、柳沢部長の御指導、室橋主任の御校閲に対して深く感謝する。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつたこと並びに第 25 回日本細菌学会総会において演説されたことを附記する。

文 献

- 1) Spendlove, G. A., Cummings, M. M., Fackler, W. B. & Michael, M. Jr. : Pub. Health Rep. , 63 : 1177, 1948.
- 2) Miller, C. P. & Bohnhoff, M. : J. Bact., 54 : 467-481, 1947.
- 3) Yegian, D. , Budd, V. & Vanderlinde, R. J.

- : J. Bact. , 58 : 257-259, 1949.
- 4) Tison, F. : Ann. Inst. Pasteur, 77 : 767-769, 1949.
- 5) Lenert, T.F. & Hobby, G. L. : Am. Rev. Tuberc. , 59 : 219-220, 1949.
- 6) Owen, C.R. , Adcock, J., Stow, R.M., Standt, L.W. & Davey, W.N. : Am. Rev. Tuberc., 61 : 705-718, 1950.
- 7) Vanderlinde, J. & Yegian, D. : Am. Rev. Tuberc. , 63 : 96-99, 1951.
- 8) Doane, E.A. & Bogen, E. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 191-195, 1951.
- 9) 村田太郎 : 結核, 28 : 453-458, 1953.
- 10) Yegian, D. & Budd, V. : J. Bact. , 55 : 459-461, 1948.
- 11) Yegian, D. & Vanderlinde, R.J. : J. Bact. , 57 : 169-178, 1949.
- 12) Yegian, D. & Budd, V. : J. Bact., 61 : 161-165, 1951.
- 13) 矢坂茂・山村雄一 : 日本臨床結核, 9 : 92-95, 1950.
- 14) Herzberg, M. & Elberg, S. : J. Bact. , 66 : 585-599, 1953.
- 15) Herzberg, M. , Elberg, S.S. & Meyer, K.F. : J. Bact. , 66 : 600-605, 1953.
- 16) 橋本達一郎 : 結核, 26 : 238-243, 1951.
- 17) Granville, G.E. , Jenkins, D.E. , Cooley, D.A., DeBakey, M.E. , Whitcomb, F.C. & Halpert, B. : Am. Rev. Tuberc. , 68 : 727-733, 1953.
- 18) Hurwitz, C. & Miller, J.B. : Am. Rev. Tuberc., 62 : 91-98, 1950.
- 19) Hurwitz, C. : Am. Rev. Tuberc. , 63 : 568-578, 1951.
- 20) Paine, T.F. Jr. & Finland, M. : J. Bact. , 56 : 207-218, 1948.
- 21) 牛場大蔵・高村長司・徐毓芝 : 医学と生物学, 20 : 265-268, 1951.
- 22) 平塚広保 : 日本細菌学雑誌, 7 : 91-94, 95-98, 1952.
- 23) Olitzki, A.L. & Szenberg, E. : Proc. Soc. Exptl Biol. Med. , 82 : 539-541, 1953.
- 24) Suter, E. : J. Exp. Med. , 96 : 137-150, 1952.
- 25) Mackaness, G.E. & Smith, N. : Am. Rev. Tuberc. , 67 : 322-340, 1953.