

単個菌培養による耐性ならびに感受性結核菌の研究

第1報 標準ならびに耐性結核菌の単個菌培養について

柴 田 一 郎

東京大学伝染病研究所臨牀研究部 (部長 北本治教授)

受付 昭和31年7月23日

I 緒 言

人型結核菌の抗結核剤に対する耐性上昇, 感受性復帰, あるいは薬剤耐性株のピルレンツ等の問題を検討する場合に, その菌株中に含まれる耐性菌の分布が問題にされることはしばしばであるが, この際菌1個を取り出し, これより分裂増殖した純系ともいふべき株を求め, それについて吟味することは有意義なことと考える。

私は P.deF onbrune の Micromanipulator を使用し, H₃₇Rv その他の人型標準株および各種薬剤耐性人型株ならびにこれと比較する意味において鳥型および牛型の標準株につき, その単個菌分離ならびに培養を試み, その実験方法, 実験条件, 培養成績ならびに単個菌分離前後の薬剤耐性の推移等について検索したので報告する。

II 文献的考察

細菌の変異, 解離, 遺伝, その他の細菌生理学的問題, 細菌の発育形式, 発育環の問題, あるいは菌体構造物の生物学的意義等の諸問題の研究は従来の如き一定数以上の生菌の集団に対する実験にてはその厳正を期することは困難であつて, 厳密な意味からいへば当然従来のいわゆる純培養株より単個菌分離により純粋株を求め, これを対象として実験を行うべきであると考える。

Micromanipulator およびそれに附随する顕微装物の器械, 器具ならびに術式に関しても漸次種々の工夫, 改良が加えられてきたが, Micrurgy を細菌学方面に応用した実験で従来発表されたものは主として単個菌の分離および動物接種試験である。すなわち, Barber¹⁾は自ら考案せる Micromanipulator を使用して, 大腸菌の種々の温度における増殖率を測定し, 37°C においてその率最大に達することを観察している。なお氏は 1920年²⁾嫌気性菌の純培養をうのに単個菌分離法の適切なることを主張している。

Péterfi³⁾ (1926) は単細胞の分離を明暗両視野において任意に行いうる Präparierwechselkondensor を考案し, 本 Kondensor を利用し生菌の単個菌分離には明視野よりも暗視野による方が容易であることを主張し, Hahn, Schütze および Wámoscher⁴⁾はその暗視野法を用いてビール加香料中より酵母菌の単個菌分離培養を試

み本法の優秀なるを述べている。Wámoscher⁵⁾ (1926) は III 型強毒肺炎双球菌の葡萄糖アイオン培養を使用し, 暗視野法にて単個菌分離を行い, 1 ないし 150 の菌数をもつてマウスに感染試験を行い, 1 個の菌数にても 9 頭中 6 頭 (23.8%) のマウスを死亡せしめるのを見ている。Georg, Zeltan および Maltos⁶⁾ は同様の方法で感染動物脾よりの脾脱疽菌につき, マウスに対する感染試験を行い, 20 個の菌を感染させたマウスは 100% 死亡し, 1 個の菌では 28% 死亡, 平均 5.6 日生存したのを見, Marx⁷⁾も連鎖状菌 (Aronson) 敗血症で斃死したマウスの脾または心血の生理的食塩水浮游液より単個菌分離を行い, それにつきマウス感染試験を施行し, 1 個注射では 32%, 2 個では 50%, 10 個では 90% 死亡させている。

Wámoscher⁸⁾ および Stoeklin (1928) は人型結核菌の単個菌分離を行い, これを海狸に接種し, 強毒菌 1 個接種率は 40%, 2 個率は 67% において Römer 反応陽性, 淋巴腺腫大を見たと述べている。

Kahn⁹⁾ (1928) は Long 培地を使用し, 懸滴法により鳥型結核菌の分離を行い, その増殖形式を観察し, 本菌が複雑な発育環を有することを証明しようとした。しかるにこの実験方法に対しては Oerskov¹⁰⁾ の反論もあつた。

1935 年に至り中村教授^{11)~15)}により従来の懸滴法の欠点を除いた単個菌フィルム培地培養法が考案され, この方面の研究は一大進歩を遂げた観がある。すなわち同氏門下の許¹³⁾¹⁴⁾は本法により鳥型菌を用いてその発育環を詳細に観察し, かつ菌体の顆粒を切り取り, その単個培養によりこれより確実に新菌体を生ずるものがあることを証明した。なお同氏は Diphtherie 菌の発育形式および菌体内顆粒の意義について, また鼠チフス菌を用いて S 型, R 型の発育形式についても研究している。高橋教授¹²⁾は Pasteur 研究所にて本法により鼻疽菌の変異につき研究した。

最近 Zelle および Lederberg^{16,17)}は細菌の遺伝学の問題を扱い, フィルム培地を用いて diploid の細胞が haploid の細胞に分離することを確認し, また中村教授門下の坂本¹⁸⁾は薬剤含有フィルム培地を作成し, 大腸菌およびブドウ球菌より分離した単個菌, 極く微量菌およ

び単個菌分離培養株につき耐性を測定し、移植菌量の大きなほど抗生物質に対する耐性が高く現われることを認め、また単個菌を上記フィルム培地に継代して耐性獲得ならびに感性復帰の様相を研究した。

戸田教授門下の 占部教授^{19,20)} は自然界抗酸菌ならびに鳥型結核菌につき、4%グリセリン寒天培地における発育初期の菌苔より1/2白金耳を釣菌し、Kirchner 培地を加え軽く研磨し、その上層液をフィルム培地上に拡げ、これにつき Micromanipulator を用いずに単個菌について発育形式の研究を行い、その多形態性について種々観察した。

以上単個菌に関する研究の概略を列挙したが、人型結核菌の単個菌培養を行い、その純系株をえ、これによつて実験を行つたという報告は未だ聞かない。

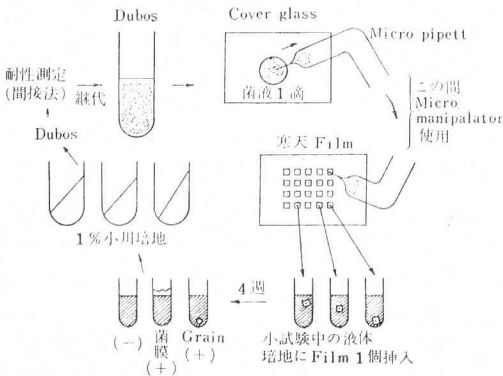
なお佐藤²¹⁾ は濾過寒天フィルムを作成し、これを20等分し、その小片1個の上に単個菌を取り出し、この単個菌含有寒天フィルムを少量の液体培地中に1個あて移し増殖せしめるといふ一変法を考案しているので私の実験には培養の便宜上本法を使用した。

III 実験方法

使用菌株は標準株としては伝研保存の H₃₇Rv, H₂, 青山Bおよび Frankfurt の人型4株, 牛型(10), 鳥型(A-62)の各1株を、耐性株としては患者から分離した各種薬剤の耐性株14株およびこれより単個菌分離した新株4株を使用した。

以上の各菌株につき、これを Dubos 培地に継代均等増殖せしめたものから、図1に示す如く滅菌被蓋硝子に菌液1白金耳を取り、P. de Fonbrune の Micromanipulator を用いて、長焦点の位相差顕微鏡下に直径8ないし10 μ の Micropipett により菌を多数吸引し、これを約2mm² の濾過寒天フィルム(図1に示す如きもの

図1 結核菌単個菌培養実験法

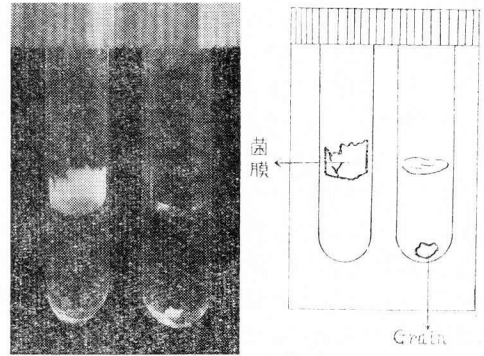


で、被蓋硝子上に約1cm²大の濾過寒天フィルムを作り、これにつきほぼ等分に縦5回、横4回、別の被蓋硝子の縁にて切断し、ずらせるようにして1枚の被蓋硝子の上

に碁盤状に20個の小濾過寒天フィルムをならべる。)の表面に単個菌として取り出し、予め6×70mm大の小試験管に約0.2ccあて分注せる液体培地の各1本に、この単個菌含有フィルム寒天1個あてを移し、2ないし4週間37°Cの孵卵器内に培養した。

使用液体培地としては Dubos 培地, Youmans 培地および Youmans 培地の血清の代りに Albumin-V (Difico) を10%の割に加えた私共のいわゆる Youmans-Albumin 培地を使用した。

図2 小液体培地中の菌発育状況



培養陽性の場合には図2に示す如く、菌膜を形成する場合もあるが、おおむね管底に1個の直径約1ないし2mmの白色塊状の顆粒(grain)の形成を見る。4週後に grain 形成の有無にかかわらず、各小培地の全量を1%小川培地に還元培養して結核菌集落の発生状況を6か月に亘り観察の上判定した。またかくしてえた単個菌培養の株を更に Dubos 培地に移植継代し、そのものについて薬剤耐性を Youmans 培地を用いて間接法により測定し、耐性分布の状況ならびに耐性の推移等につき検討した。

IV 実験成績

1) 使用液体培地の種類と培養成績:

表1 液体培地の種類と培養成績(人型株のみ)

培地	釣菌回数	陽性個数	陽性率
Dubos	87	1	1.1%
Youmans	146	1	2.8
Youmans-albumin	992	90	9.1

表1の如く Dubos 培地では釣菌回数87個中陽性1個(1.1%), Youmansでは146個中1個(2.8%), Youmans-Albumin では992個中90個(9.1%)に陽性で、Youmans-Albumin培地は最も高い陽性率を示したので、後半の実験ではすべてこの Youmans-Albumin 培地を使用した。

以上はすべて人型菌の成績であるが、鳥型菌(A-62)

表2 鳥型(A-62)株の各種培地における培養成績

培地	釣菌回数	陽性個数	陽性率
Dubos	22	10	45.5%
Kirchner	22	9	40.9
Youmans	22	12	54.5

を用いて Dubos, Youmans および Kirchner 培地について実験した成績は表2の如くで、40.9%ないし54.5%の陽性成績で、いずれの培地にてともほぼ同等に高率に陽性を示した。

2) 単個菌培養成績:

人型株全体としての実験成績は表3の如く釣菌回数1225に対し95個(7.8%)陽性であったが、陽性中9個は液体培地中には grain の形成等陽性の所見がなく、1%小川培地に移植後初めて集落の発生を見たものである。

表3 結核菌の単個菌培養成績

菌株		釣菌回数	陽性個数	陽性率	
人型株	標準株	H ₃₇ R _v	105	12	11.4%
		H ₂	35	13	37.1
		青山B	54	18	33.3
		F	52	14	25.8
	小計		246	57	23.2
	薬剤耐性株	SM	130	7	7.7
		PAS	95	10	
		SM+PAS	62	5	
	人型株	INH	449	8	2.3
		INH+P ^Δ S	176	3	
INH+PAS+SM		69	5		
小計		979	38	3.9	
総計		1225	95	7.8	
牛型(10)		48	10	20.8	
鳥型(A-62)		124	54	43.5	

注: 耐性株としてはSM, PAS 10γ/cc, INH 1γ/cc以上の株をとつた

使用菌株とその単個菌分離培養成績については、標準株は246個中57個(23.2%)陽性で、そのうち H₃₇R_v は105個中12個(11.4%)陽性、H₂は35個中13個(37.1%)陽性、青山Bは54個中18個(33.3%)陽性、Frankfurt は52個中14個(25.8%)陽性で、如何なる理由によるのかは不明であるが、H₃₇R_vは低率で、他の3標準株はほぼ同等の成績であった。

次に薬剤耐性株では、INH 1γ, SMおよびPAS 10γ/cc以上を耐性株として検討してみると、SM耐性3株では130個中7個陽性、PAS耐性3株では93個中10個陽性、SM, PAS 2者耐性2株では62個中5個陽性

を示し、以上を合計してINHに耐性なき耐性株は285個中22個(7.7%)陽性であった。INH耐性6株では449個中8個、INH, PAS 2者耐性3株では176個中3個、INH, PAS, SM 3者耐性1株では69個中5個陽性であり、以上よりINHに耐性を有する株は694個中16個(2.3%)陽性であった。

耐性株全体としては979個中38個(3.9%)陽性となった。したがって標準株の方が高率で、薬剤耐性株は陽性率が一段低く、またINH耐性を有するものと有しないものとは、INH耐性を有する方が低い陽性率を示している。

なお牛型標準菌1株は48個中10個(20.8%)陽性にてほぼ人型標準株に近く、鳥型標準菌1株では124個中54個(43.5%)でこれらに比し甚だ高い陽性率を示している。

3) 超音波照射と単個菌培養成績:

Dubos培地で均等増殖したものを顕微鏡下に釣菌する際、なお小菌塊を形成するものがあり、技術的に1個を釣菌するのに不便が感ぜられ、また菌の若さにおいても培地全体の菌を一様に均等化した方がよいのではないかと考えられたので、実験の中途より釣菌直前に500KC, 約300W出力の超音波を20秒作用せしめた菌液を使用したところ、表4に示す如く超音波を使用せざる場合には

表4 超音波照射と単個菌培養成績(人型菌のみ)

	釣菌回数	陽性個数	陽性率
照射せる場合	571	66	11.6%
照射せざる場合	654	29	4.4

釣菌回数654中陽性29(4.4%)であったが、使用せる場合には571中陽性66(11.6%)で、超音波を使用した場合の方が高い陽性率を示した。

4) Dubos培地培養期間と単個菌培養成績:

上述の各使用菌株はDubos培地中の保存株より新にDubosに移し、菌増殖の遅速に従い1週またはそれ以上培養のものを使用した。Dubos培地への移植後の日数と単個菌培養陽性率の間の関係を示すと表5の如く、1

表5 Dubos培養期間と単個菌培養成績(人型菌のみについて)

培養期間	釣菌回数	陽性個数	陽性率
1週	253	37	14.7%
2週	312	21	6.7
3週	316	19	6.0
4週	27	0	0

週内外のものは釣菌回数253中37個(14.7%)陽性、2週内外のものは312中21(6.7%)陽性、3週内外のものは316中19(6.0%)陽性、4週内外のものは27中陽性0で、1週内外の若い菌液を使用した場合が最も成績良好であった。

5) 単個菌分離培養株の薬剤耐性:

単個菌分離以前の菌株と分離培養後の新菌株とにつき耐性の比較測定を行つた。

PAS, INH両者に耐性の(111)株, すなわち(SM 1 γ , PAS 10 γ , INH 100 γ)は単個菌分離 Dubos 初代で(SM 0 γ , PAS 1 γ , INH 100 γ)を示し, (152)株, すなわち(SM 1 γ , PAS 10 γ , INH 10 γ)は分離初代にて(SM 1 γ , PAS 10 γ , INHは主動で1 γ , 中間で10 γ)を示し, 単個菌培養新株においてもこの新(152)株のINH耐性の如く一薬剤に対し程度の異なる耐性菌分布の認められるものがあつた。

表6はSM, PASに耐性の(P₅₇)株, およびこれより単個菌分離せる新株5株の耐性を示したが, これに見る如く新株は原株に対し必ずしも同様の耐性を示すものみではなく, ことに新株 Gr 5ではINH, PASに対し原株とは著しい差異を示した。

表6 薬剤耐性株(P₅₇)の単個菌培養における原株および鈎菌5株の耐性比較 (Youmans 培地, 接種菌量0.01mg)

薬剤	γ/cc	原株	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4	Gr. 5
SM	0	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	1	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	10	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	100	-	G	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-	-
PAS	0	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	1	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	10	≡	-	≡	≡	≡	≡
	100	≡	≡	≡	≡	G	≡
	1000	G	-	-	-	-	≡
INH	0	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	1	-	-	-	-	+	≡
	5	-	-	G	-	+	≡
	10	-	-	-	-	-	≡
	100	-	-	-	-	-	-

注: Gr. 1より Gr. 5は同一原株(P₅₇)より単個菌分離せられた新株。Gは Youmans 培地にて Grain のみ認められたる場合である

次に前述の(111)株より単個菌分離せる新(111)株につき, さらに単個菌分離培養を繰り返えし, 新々株4株をえ, これらにつき新(111)株と耐性の比較を行うと表7の如く, Gr.3のPAS 1 γ に關し他の3株と差異を認めるのみでほとんど新々株4株の耐性に差異を見ない。

次にINH耐性株(M₇₀), これは(SM 0 γ , PAS 0 γ , INH 10 γ)であるが, これより単個菌分離によりえた新株につき耐性を測定せるに, 表8の如く分離後Dubos継代3代のもは(SM 0 γ , PAS 0 γ , INH 10 γ)で, さらに8代のもも(SM 0 γ , PAS 0 γ , INH 10 γ)であり, 8代までにはINH耐性の低下は認められず, かつこの新株はINH 10 γ/cc の耐性のみよりなり, 私共のいわゆる中間菌, 別動菌は認められない。

表7 単個菌分離株新(111)より更に単個菌分離せる新株4株の新(111)との耐性の比較 (Youmans 培地, 接種菌量0.01mg)

薬剤	γ/cc	新(111)	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4
SM	0	≡	≡	≡	≡	≡
	1	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
PAS	0	≡	≡	≡	≡	≡
	1	≡	-	-	≡	-
	10	+	-	-	-	-
	100	+	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
INH	0	≡	≡	≡	≡	≡
	1	≡	≡	≡	≡	≡
	5	≡	≡	≡	≡	≡
	10	≡	≡	≡	≡	≡
	100	+	-	-	-	-

注: Gr. 1より Gr. 4に至る4株は新分離株

表8 INH耐性株(M₇₀)の単個菌分離後継代3代および8代におけるINH耐性 (耐性測定は Youmans 培地, 接種菌量0.01mg, 継代は Dubos 培地)

INH γ/cc	3代	8代
0	≡	≡
1	≡	≡
5	≡	≡
10	≡	≡
100	-	-

V 総括ならびに考案

現今結核症に対する化学療法進展に伴い抗結核剤の結核菌に対する薬剤耐性の消長, ことにINH耐性の消長ならびにINH耐性菌のピルレンツの問題は目下吾人の最大関心事の一つとなつてきた。しかるに薬剤耐性菌の問題に關しては諸言にも触れた如く従来行われてきたいわゆる純培養を用いた実験は数百万個以上のPopulationを対象とした統計学的研究に止まり, 生物学的に純系というべき単個菌分離培養によつてえた菌株につき研究を行わぬ限り解決されない問題が多々あらうと考える。

私は人型菌を主とした結核菌の単個菌培養を行い, その実験方法, 実験条件, 培養成績ならびに単個菌分離前後の薬剤耐性の推移等について比較検討した。

標準株および患者耐性株を用い, これを Dubos 培地に均等増殖したものから, P. de Fonbrune の Micromanipulator を使用し, 佐藤法によつてこれを濾過寒天フ

イルムの小片上に単個菌として取り出し、これを更に少量の液体培地に移し増殖せしめた上、1%小川培地に還元培養の上判定した。小液体培地中にて培養陽性の場合には管底に白色塊状の grain の形成を認めることが多く、菌膜を形成するものもあつた。

使用液体培地としては Dubos, Youmans, Youmans-albumin 培地を用いたが Youmans-albumin 培地が最も良い結果をえた。当初 Dubos, 次いで Youmans 培地を使用し良果をえなかつたため、Dubos では恐らく Tween-80 が増殖に悪影響を及ぼし、Youmans では血清中の増殖抑制物質の影響によるものではないかと考え、また Albumin により、発生可能の増殖抑制物質を吸着せしめようと考え、Youmans-Albumin 培地を作成使用し良い成績をえた。

鳥型菌においては Dubos, Youmans および Kirchner 培地で実験を行つて見たがいずれの培地においてもほぼ同様に約半数において陽性を示した。

人型菌は釣菌回数1225回に対し95個(7.8%)陽性であつた。そのうち標準株は246個中57個(23.2%)陽性で、使用する菌株はほぼ同等の陽性率を示した。耐性株は979個中38個(3.9%)が陽性であり、INHに耐性を有しない株と、INH耐性株とに分けると前者は285個中22個(7.7%)に陽性で、後者は694個中16個(2.3%)に陽性であつた。すなわち標準株は最も陽性率高く、耐性株はこれより一段低く、なかでもINH耐性株は一層低い陽性率を示している。INH耐性株を用いた実験では陽性のものが少なかつたため頻回に釣菌を行つたが、実験中にもINH耐性株は生え難いという印象が強かつた。なお牛型標準株はほぼ人型標準株程度の、また鳥型標準株では甚だ高率(約50%)の陽性成績をえた。

また釣菌直前に菌液に超音波を作用させて見たところ、顕微鏡下に釣菌する際小菌塊がほとんどなくなり、各菌はほとんどすべて単個菌として存在し技術的に操作が容易となり、かつ培養成績も照射せざる場合の654中陽性29(4.4%)に対し、照射せる場合は571中陽性66(11.6%)となり良好であつた。これは50K C, 300W出力で20秒程度の超音波では菌増殖に悪影響を与えることなく、また培養液中の老幼種々の菌を一様に均一にするため若い菌を釣菌する場合が多くなるのではあるまいか。

Dubos 培養期間と単個菌培養成績との関係は1週内外の菌液を使用した場合が最も成績良く、4週内外のものでは陽性0という結果をえたが、これは菌の増殖の速かな場合が成績良好ということで当然の結果であろう。

単個菌分離以前の菌株と分離培養後の新菌株とにつき、耐性を比較してみると、一部の株では原株と新株との間にかなり著明な耐性の相違が見られるものがあつた。ことに(P₅₇)株、(SM 10 γ , PAS 100 γ , INH

0 γ)より分離した Gr. 5 (SM 10 γ , PAS 1000 γ , INH 10 γ) の如きは著明である。この事実から原株に種々の程度の薬剤感受性のものが混入していることが考えられ、当然の結果であると思ふ。かかるが故に単個菌分離培養が必要になつてくるのであろう。また新(111)株より更に単個菌分離された新々株4株においては相互の間にはほとんど耐性の差異を見ない。このことは単個菌分離株の生物学的純系であることを示すもので、これも当然の結果であると思ふ。

なお新(152)株のINH耐性の如く、一薬剤に対し程度の異なる耐性菌分布の認められるものがあつたが、この事実は何を意味するものか継代の上今後検討して行きたいと思ふ。

またINH耐性株(M₇₀) (INH 10 γ)は分離後Dubos 継代3代および8代においていずれも(INH 10 γ)であり、中間菌、別動菌は認められず全部INH 10 γ の菌のみより成り、継代中に耐性の減弱は認められない。

今後更に単個菌分離による各種耐性株の継代を続け、その耐性の推移ならびにヒルレンツの問題を観察検討して行く予定である。

VI 結 論

人型を主とする標準ならびに耐性結核菌について P. de Fonbrune の Micromanipulator を用いて濾過寒天フィルム上に単個菌分離を行い、さらにこの単個菌含有濾過寒天フィルムを小液体培地中に移し培養の上1%小川培地に還元培養を行い、陽性成績をえ、次の知見をえた。

1) 使用液体培地は Dubos, Youmans および Youmans-Albumin 培地のうち Youmans-Albumin 培地が最も成績良好であつた。

2) 培養陽性の場合には小試験管底に直径1ないし2mmの白色塊状の顆粒(grain)を見ることが多く、菌膜を形成する場合もある。

3) 人型株全体としては釣菌回数1225中95個(7.8%)陽性であつた。そのうち標準株は最も陽性率が高く、耐性株はこれより一段低く、なかでもINH耐性株は低い陽性率を示した。牛型標準株は人型標準株に準じ、鳥型標準株は甚だ高い陽性率を示した。

4) 釣菌直前に菌液に対し超音波を照射し好結果をえた。

5) Dubos Tween-Albumin 培地による菌液を使用したか、1週内外のものが最も成績良好であり、古いものほど陽性率は低くなつた。

6) 単個菌分離以前の菌株と分離後の新菌株とにつき薬剤耐性の比較測定を行つたところ、新株の耐性は必ずしも原株に一致しないものがあつた。また更に単個菌分離より単個菌分離した新々株はほとんど等しい耐性を

示した。なお単個菌分離株においても同一薬剤に対し異なる耐性菌分布の認められるものがあつた。

7) I N H耐性10 γ の(M₇₀)株につき単個菌分離後、Dubos継代3代および8代のものの耐性を測定したが、いずれも(I N H 10 γ)であり、菌株はすべて(I N H 10 γ)の菌のみよりなり、また耐性の減弱は認められなかつた。

振筆するに当り、御懇切なる御指導と御校閲を賜つた恩師北本治教授、ならびに岡田晃昌、福原徳光の両博士に深甚の謝意を表するとともに研究室諸兄の御協力を感謝する。また実験の便宜を与えられ、かつ御指導をいただいた本研究第6研究部の工藤正四郎教授、佐藤和男博士ならびに栗原孝子氏の御厚意に深謝する。なお諸々御便宜をいただいた予研中村敬三部長に感謝する。

(本論文の要旨は第31回日本結核病学会において発表した。)

文 献

- 1) Barber, M.A. : J. Inf. Dis., 5: 379, 1908.
- 2) Barber, M.A. : J. Exp. Med., 32: 295, 1920.
- 3) Péterfi, T. & Wámoscher, L. : Zeitsr. f. Hyg. u. Infektionskrh., 106: 191, 1926.
- 4) Hahn, M., Schütz, F. & Wámoscher, L. : *ibid.*, 106: 747, 1926.
- 5) Wámoscher, L. : *ibid.*, 106: 421, 1926.
- 6) Georg, Zeltan & Maltos : *ibid.*, 107: 477, 1927.
- 7) Marx, E. : *ibid.*, 107: 472, 1927.
- 8) Wámoscher, L. & Stoeklin : Zentralbl. f. Bakt., 104: 86, 1928.
- 9) Kahn, M.C. : Am. Rev. Tbc., 20: 151, 1929.
- 10) Oerskov, J. : Zentralbl. f. Bakt., 123: 271, 1932.
- 11) 中村敬三 : 東京医事新誌, No. 2936: 1713, 昭10.
- 12) Takahashi, Y. : Annales de L'Institut. Pasteur, 62: 407, 1939.
- 13) 許 達 : 実験医学雑誌, 19: 1346, 昭10.
- 14) 許 達 : 朝鮮医学会雑誌, 25: 834, 昭10.
- 15) 中村敬三 : 自然, 8(5) : 54, 1953. 8(6) : 62, 1953.
- 16) Zelle, M.R. : J. Bact., 61: 345, 1951.
- 17) Zelle, M.R. & Lederberg, J. : *ibid.*, 61: 351, 1951.
- 18) 坂本成男 : 日本細菌学会雑誌, 9: 337, 1954. 9: 396, 1954.
- 19) 占部 薫 : 福岡医科大学雑誌, 29: 2983, 昭11. 29: 3008, 昭11.
- 20) 戸田忠雄 : 結核菌とBCG, 9頁, 昭22.
- 21) 佐藤和男 : 微生物ハンドブック (印刷中).
- 22) Fonbrune, P. : Technique de Micromanipulation, 1949.