

結核菌のカナマイシン耐性に関する研究

第2報 カナマイシン耐性上昇について

前 田 徹

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受 付 昭 和 34 年 8 月 6 日

緒 言

カナマイシン (以下 KM) が既往の抗結核剤耐性菌、とくにストレプトマイシン (以下 SM) 耐性菌感染動物に対して、感性菌に対すると同様の増殖阻止作用を示すことが報告されたこと¹⁾ は臨床上新しい治療計画をもたらしたといえるであろう。しかし SM についての豊富な臨床経験からすれば、その使用による KM 耐性獲得を考慮せずして KM 治療計画をたてることはできないと思う。そこで KM 耐性上昇を検討するために、研究室保存株、患者からの新鮮分離株、SM 耐性株および KM 耐性株を用いて KM 耐性上昇と SM 耐性上昇とを試験管内実験によつて比較考察した。

実 験 方 法

〔使用培地〕 前報告²⁾ と同様、Kirchner 寒天培地を用いた。

〔使用結核菌〕 次の4種を用いた。

- i) 研究室保存人型結核菌, H₂ 株。
- ii) KM 未使用肺結核患者より分離した P A S, I N H, S M のいずれにも感性の新鮮分離株。
- iii) H₂ 株より試験管内 one step で分離した S M 100 γ/ml 完全耐性株, (H₂R-SM 株)。
- iv) H₂ 株より試験管内 one step で分離した K M 100 γ/ml 完全耐性株, (H₂R-KM 株)。

〔継代培養法〕 1% 小川培地に上記の菌株を継代増菌し、約 14 日培養の発育良好な菌苔を掻取り、直径 7 mm の水晶球 50 コ入りの 300 ml の丸コルペンに入れ、手振法で 1 mg/ml の蒸溜水浮游液を調製した。これを原液として、10 倍稀釈系列を作り、0.1 ml 中にそれぞれ 10⁻¹mg, 10⁻³mg, 10⁻⁵mg を含む菌液 0.1 ml ずつを、所定濃度に各薬剤を含有する培地 2 本宛に接種した。接種生菌数測定には薬剤を含有しない Kirchner 寒天培地 (対照培地) 3 本宛を各接種菌量に対して用いた。培養 4 週間後発育集落数をかぞえて、(所定濃度薬剤含有培地に発育した生菌数) ÷ (対照培地に発育した生菌数, すなわち接種生菌数) × 100 の式を用いて耐性菌分布を測定した。

継代は次のように行なつた。すなわち 10⁻¹ mg 接種の各濃度薬剤含有培地のうちから、次代の耐性菌分布を測定するに十分な菌量を掻取れると思われる、したがつて集落数の多い最高濃度含有培地の菌を選んで、薬剤を含まない 1% 小川培地に 1 代増菌し、これを次代の耐性菌分布検査に用いた。具体的にいえば、100 集落以上を生じた 10⁻¹mg 接種薬剤含有培地のうち最高濃度を含む培地上の菌を 2 代目の継代に選ぶようにした。以後の継代には全く同様の方法を繰返した。

実 験 成 績

1. KM および SM 耐性上昇型式の比較

図 1, 3, 5 には KM 耐性上昇と SM 耐性上昇を継代ごとの耐性菌分布で示した。図 2, 4, 6 には 10⁻³ mg 接種の場合の継代ごとの耐性菌発育最高濃度を示した。

図 1, 2 から H₂ 株の KM および SM 耐性上昇を比較すると、ほとんど同様の上昇型式を示すことが分かる。

図 3, 4 は患者からの新鮮分離株について KM および SM 耐性上昇を比較したものである。SM 継代 7 代目は SM 増強性の耐性菌分布を示したので 6 代目までを比較すると、KM および SM に対して全く類似の耐性上昇型式を示すことが分かる。

図 5, 6 は H₂R-SM 株の KM 耐性上昇と H₂R-KM 株の SM 耐性上昇を比較したもので、ほとんど同様の型式で耐性が上昇している。

2. 菌株相互間の違い

薬剤濃度 1 γ/ml , 10 γ/ml , 100 γ/ml に対して耐性菌分布が 75% 以上を占める場合をそれぞれ完全耐性とみなして図 1, 3, 5 を検討すると、菌株によつて差があり、H₂ 株の KM 継代では 3, 4, 7 代目, SM 継代のそれは 3, 5, 6 代目である。新鮮分離株の KM 継代では 1 γ/ml 完全耐性は 4 代目, 10 γ/ml 完全耐性は 7 代目にみられ, 100 γ/ml 完全耐性は 7 代目まではみられなかつた。SM 継代の場合、1 γ/ml 完全耐性が 5 代目にみられ, 6 代目には 5 γ/ml に対して 94% の耐性菌分布であるが, 10 γ/ml に対しては 1.8

図1 KM および SM に対する H₂ 株の耐性上昇の比較

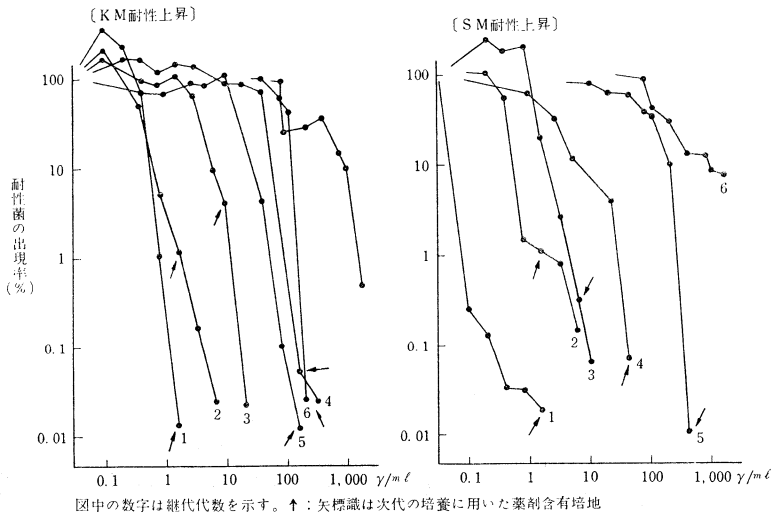
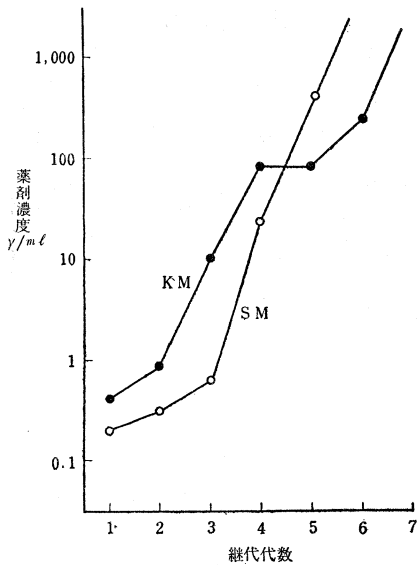


図2 H₂株の耐性上昇 (接種菌量10⁻³mg)



% の分布を示した。H₂R-SM 株の KM 継代の場合 1 γ/ml , 10 γ/ml , 100 γ/ml に対する完全耐性分布はそれぞれ 3, 5, 6 代目にみられ, H₂R-KM 株の SM 継代の場合のそれはそれぞれ 3, 4, 6 代目にみられた。すなわち保存株では新鮮分離株より明らかに早く耐性が上昇している。また耐性株の場合には感性株とは違った初代の耐性菌分布が認められた。それは H₂R-SM 株の KM 継代 1 代目と H₂R-KM 株の SM 継代 1 代目における耐性菌分布で, 図 7 に示すごとく, H₂感性株のそれに比べて高い耐性と高率の耐性菌分布を認めた。しかし継代すると, その後は両耐性株とも H₂感性株と同程度の耐性上昇を示した。

3. 高濃度耐性獲得後のそれぞれ相手薬剤すなわち KM および SM に対する感受性

7 代目までに高濃度耐性を獲得しえなかつた新鮮分離株を除いて, H₂ 株の KM 継代 7 代目, SM 継代 6 代目, H₂R-SM 株の KM 継代 6 代目および H₂R-KM 株の SM 継代 6 代目の耐性菌分布検査を行な

図3 KM および SM に対する新鮮分離株の耐性上昇の比較

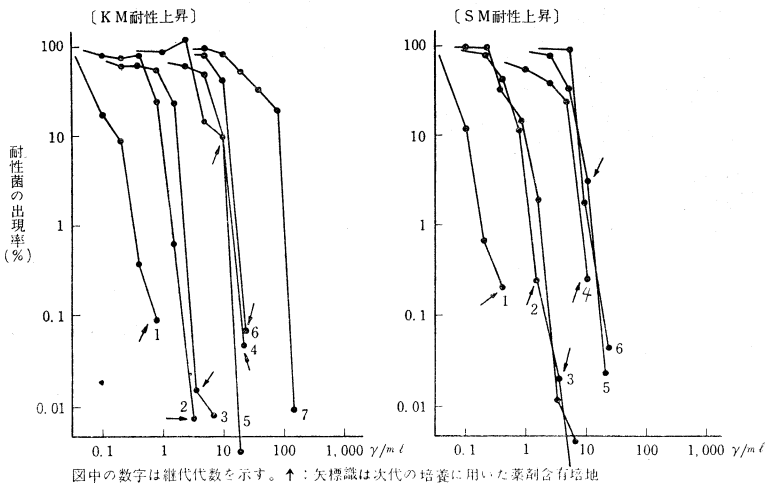


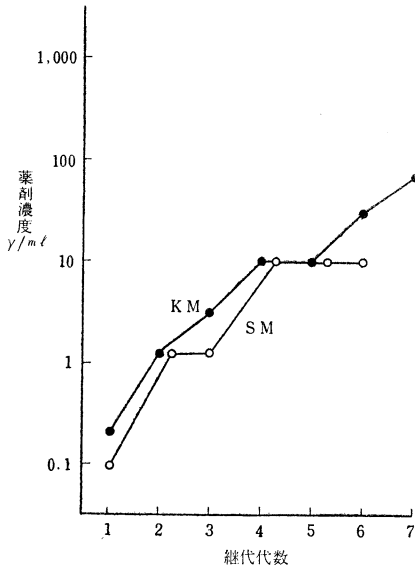
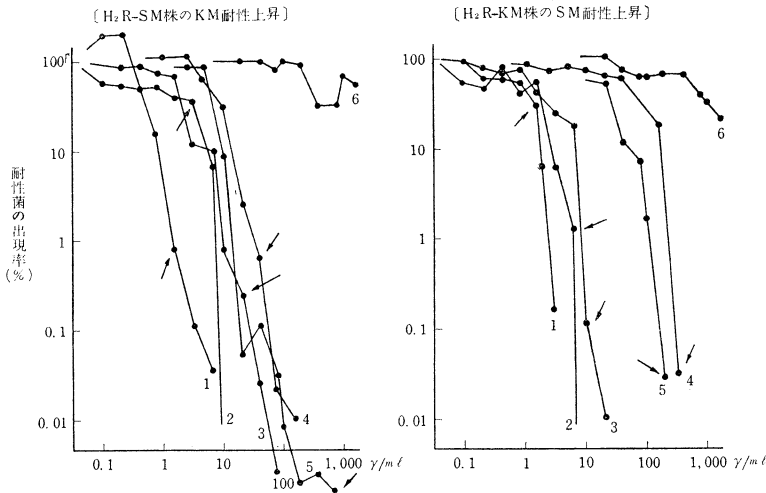
図 4 新鮮分離株の耐性上昇 (接種菌量 $10^{-3}mg$)

図 5 KM および SM に対する耐性株の耐性上昇の比較



図中の数字は継代数を示す。↑: 矢標識は次代の培養に用いた薬剤含有培地

M 1 γ/ml 含有 Kirchner 寒天培地に、原則として 4 週間ごとに継代して、5 代目と 10 代目に耐性検査を行なった。 $10^{-3}mg$ を接種した場合の成績を表 3 に示した。 H_2 株、新鮮分離株および H_2R-SM 株ともに KM 1 γ/ml 含有培地継代によつて明らかな KM 耐性上昇を認める。とくに新鮮分離株が 5 代目で他の 2 株とおよそ同じ耐性を示し、10 代目では他の 2 株より高い耐性を示したことが注目される。

5. 次代の耐性菌分布に及ぼす薬剤含有培地の薬剤濃度の影響

図 8 に示すごとく、 H_2 株の KM 継代 6 代目の耐性菌分布検査 (B) で 200 γ/ml に発育した eugonic

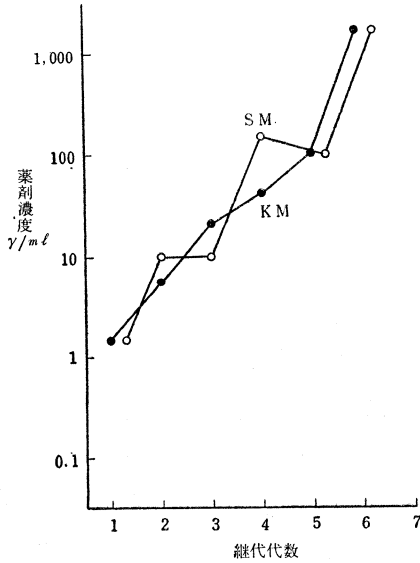
い、1,000 γ/ml 薬剤含有培地に発育した菌をそれぞれ 1% 小川培地に 1 代増菌し、KM 1,000 γ/ml に発育した耐性菌に対しては SM 感受性を、SM 1,000 γ/ml に発育した耐性菌に対しては KM 感受性を検討した。その成績は表 1, 2 に示すごとくで、 H_2 株が 1,000 γ/ml KM 耐性を獲得したのちは SM 5 γ/ml でも発育し、SM 1 γ/ml では 10.7% の耐性菌分布を示すようになる。また SM 1,000 γ/ml 耐性獲得後は KM 10 γ/ml でも発育し、KM 1 γ/ml では 4.2% の耐性菌分布を示した。 H_2R-SM 株が 1,000 γ/ml KM 耐性を獲得しても、また H_2R-KM 株が 1,000 γ/ml SM 耐性を獲得しても、それぞれもとの SM および KM 100 γ/ml 完全耐性は失つていなかった。

4. KM 1 γ/ml 含有 Kirchner 寒天培地に恒量継代した場合の KM 耐性

図 1, 3, 5 に示した KM 継代 1 代目において、 H_2 株および H_2R-SM 株の KM 1.6 γ/ml に発育した菌と新鮮分離株の KM 0.8 γ/ml に発育した菌とを K

な集落と 3~4 週で発育してきた dysgonic な集落の混合発育菌 ($b^1 \uparrow$) と 400 γ/ml に発育した 76 = の eugonic な集落からなる菌 ($b^2 \uparrow$) について、それぞれ前述と同じ方法で次代の耐性菌分布を検査した。400 γ/ml に発育した菌の耐性菌分布は 1,600 γ/ml まで 100% 前後の発育を示す (b^2) が、200 γ/ml に発育した菌には 200 γ/ml で発育を阻止される菌が 74% も含まれていた (b^1)。薬剤含有培地の低濃度の影響について、A のごとく耐性菌分布を示した H_2 株より、5 γ/ml に発育した菌 ($a^1 \uparrow$) は次代の耐性菌分布検査で耐性は 40 γ/ml まで上昇しているが、耐性菌分布は著明に上昇していない (a^1)。10 γ/ml に発育した菌

図6 H₂R-KM株およびH₂R-SM株の耐性上昇(接種菌量10⁻³mg)



(a²↑)は明らかな耐性上昇, すなわち100γ/ml完全耐性に近い耐性度と耐性菌分布の上昇を示した(a²)。

以上の実験成績から次のようなKMおよびSMに共通の特徴ある耐性菌分布像がみられた。

(i) 耐性菌分布下降: H₂株およびH₂R-SM株のKM継代5代目およびH₂R-KM株のSM継代5代目の分布が前代の分布より下降した。

(ii) 耐性菌分布上昇の遅滞: 新鮮分離株のKM継代5, 6代目およびSM継代3, 6代目の耐性菌分布が前代の耐性菌分布に比べて上昇が明らかでなく遅滞とみられる。

(iii) 低濃度薬剤含有培地における増強性発育: H₂株およびH₂R-SM株はとくに1γ/ml以下のKMおよびSM含有培地において, 対照培地より発育が良好で生菌数も多かつた。薬剤による増強性発育と思われる。

考 察

本実験においては, KM耐性上昇とSM耐性上昇

図7 H₂R-SM株およびH₂R-KM株の低濃度KMおよびSMに対する感受性の低下

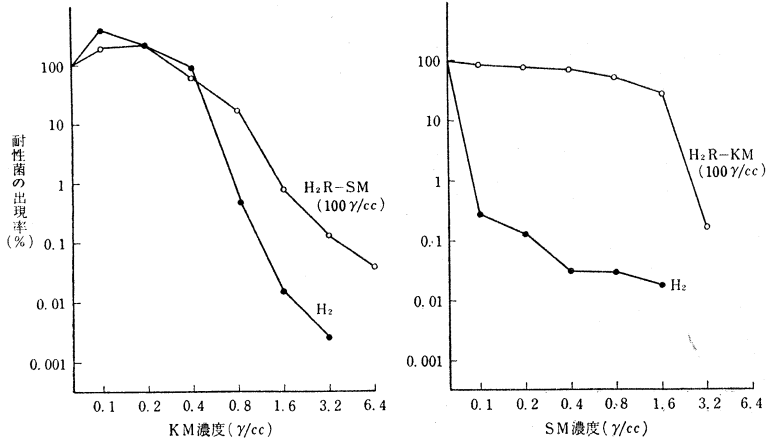
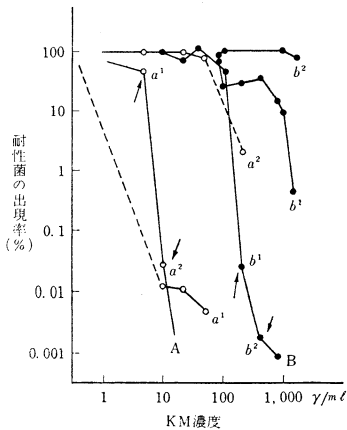


図8 次の耐性菌分布に及ぼす薬剤含有培地の薬剤濃度の影響



を比較するために継代ごとの耐性菌分布を比較した。そしてさらにその成績の評価を便利にするために, Xγ/mlで75%以上の耐性菌分布を示す場合をXγ/ml完全耐性とみなして, その点からの検討と, 10⁻³mg接種をもって半ば定量的に耐性検査を行なった場合の成績とについて述べた。

ところでH₂株のKM耐性上昇の場合, 1γ/ml, 10γ/ml, 100γ/mlの完全耐性を示したのはそれぞれ3, 4, 7代目においてであった。この3, 4, 7代目についてみると, 10⁻³mg接種の場合には, 菌の耐性度はそれぞれ10γ/ml, 80γ/ml, 1,600γ/ml以上, 10⁻¹mg接種の場合にはそれぞれ40γ/ml, 320γ/ml, 1,600γ/ml以上であり, また10⁻⁵mg接種の場合のそれはそれぞれ6.4γ/ml, 40γ/ml, 1,600γ/ml以上であつ

表 1 H₂ 株および H₂R-SM 株の KM 1,000 γ/cc 耐性上昇菌の SM 感受性

SM濃度 γ/cc	0	0.5	1	5	10	20	40	80	160	320
H ₂ 株KM 1,000γ/cc 耐性上昇菌	56×10 ⁵	5.5×10 ⁵	6×10 ⁵	+×10	0	0	-	-	-	-
H ₂ R-SM株KM 1,000γ/cc 耐性上昇菌	327×10 ⁵	326×10 ⁵	c	299×10 ⁵	305×10 ⁵	296×10 ⁵	285×10 ⁵	297×10 ⁵	321×10 ⁵	-

注：c…雑菌汚染

表 2 H₂ 株および H₂R-KM 株の SM 1,000 γ/cc 耐性上昇菌の KM 感受性

KM濃度 γ/cc	0	0.5	1	5	10	20	40	80	160	320
H ₂ 株SM 1,000γ/cc 耐性上昇菌	41×10 ⁵ 87.3×10 ⁸	41×10 ⁵	37×10 ⁵	41×10	+×10	-	-	-	-	-
H ₂ R-KM株SM 1,000γ/cc 耐性上昇菌	221×10 ⁵	213×10 ⁵	225×10 ⁵	163×10 ⁵	182×10 ⁵	200×10 ⁵	178×10 ⁵	204×10 ⁵	206×10 ⁵	214×10 ⁵

表 3 KM 1 γ/cc 含有 Kirchner 寒天培地に恒量継代した場合の KM 耐性

菌 株	継代	V.U./1mg	KM 濃度 γ/cc													
			0	0.8	1.6	3.2	6.4	10	20	40	50	100	200	400	800	1,000
H ₂	5	129×10 ⁵	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	26	/	/	/	/	/
	10	42×10 ⁶	卍	/	/	/	/	卍	/	/	卍	卍	+	+	-	-
新鮮分離株	5	8×10 ⁵	卍	卍	卍	卍	卍	卍	22	34	/	/	/	/	/	/
	10	78×10 ⁶	卍	/	/	/	/	卍	/	/	卍	卍	卍	卍	卍	+
H ₂ R-SM	5	120×10 ⁵	卍	卍	...	卍	卍	卍	卍	20	/	/	/	/	/	/
	10	46×10 ⁵	卍	/	/	/	/	卍	/	/	卍	卍	+	-	-	-

注：接種菌量 10⁻⁸mg；判定4週；- 発育集落を認めない，数字は集落数，+～卍 集落発育程度

た。これに対して H₂ 株の SM 耐性上昇の場合、1 γ/ml, 10 γ/ml, 100 γ/ml 完全耐性を示したのはそれぞれ 3, 5, 6 代目であった。この 3, 5, 6 代目についてみると、10⁻⁸mg 接種の場合には、耐性度はそれぞれ 6.4 γ/ml, 400 γ/ml, 1,600 γ/ml 以上、10⁻¹mg 接種の場合にはそれぞれ 10 γ/ml, 800 γ/ml, 1,600 γ/ml 以上、また 10⁻⁵mg 接種の場合にはそれぞれ 1.6 γ/ml 200 γ/ml, 1,600 γ/ml 以上であった。このように薬剤濃度を評価基準とした場合には、接種菌量によつて耐性度は大きく左右され、とくに 10⁻¹ mg という大量菌接種の場合の耐性薬剤濃度をとつて上昇過程を論議することは現象の本質を見逃がすおそれがないわけではない。この点は接種生菌数に対する耐性菌の出現率、すなわち耐性菌分布をとることにより是正され、これが耐性菌出現の上昇過程を比較するうえには適切であると思われる。

このようにした場合、耐性菌の分布が Treffers³⁾ のように正規分布を示すであろうことを予想したが、予想のごとき正規分布は得られなかつた。その理由として、方法論的には、各薬剤含有培地 2 本宛にしか接種しなかつたので、生菌数測定上相当の誤差を含むためと考

えられる。したがつて正規分布を示すことを確認することはできなかつたが、1% から 80% 前後の耐性菌分布を示す範囲ではほぼ正規分布を示すように思われた。

便宜的に 75% 以上の耐性菌分布を示した薬剤濃度を完全耐性度として検討する場合、継代数と完全耐性度の取り方によつて多少の誤差を免れない。すなわち H₂ 株について同じ 1 γ/ml 完全耐性を判定するにも、KM 継代 3 代目は 1.6 γ/ml と 3.2 γ/ml の中間に完全耐性度があるが、SM 継代 3 代目は 0.8 γ/ml と 1.6 γ/ml の中間に完全耐性度がある。そして耐性上昇過程において、10 γ/ml 完全耐性を示すようになると、SM 耐性上昇率が KM 耐性上昇率より高くなり、10 γ/ml 完全耐性を示す SM 継代 5 代目の耐性度は KM 継代 6 代目の耐性度に近い。

上述の耐性菌分布を各菌株の KM および SM 継代のそれぞれ 1 代目の分布について比較すると、同じ濃度では SM 耐性が KM 耐性より低率の分布を示し、耐性度もやや低い。すなわち SM は KM より増殖阻止作用がやや勝るとした既報⁴⁾ の成績と一致する。しかし継代を重ねると、耐性菌分布は全く共通類似の分布上昇態度を示している (図 1, 3, 5)。

耐性株が感性株と異なる点としては、図7に示すごとく、one step で分離した H₂R-SM 株および H₂R-KM 株が低濃度でそれぞれ相手薬剤に対して感受性低下を示し、また step by step で H₂ 株が KM および SM 1,000 γ/ml の耐性を獲得した場合にもおよそ同程度の感受性低下を示したことである(表1, 2)。同様のことを Szybalski & Bryson⁵⁾ は E. coli について他の薬剤に対する耐性に関する研究で認めている。この程度の感受性低下を slightly reciprocal cross resistance として取扱えるものか、否か、今後の研究にゆだねたい。

X γ/ml 培地上の発育菌を1代増菌して、その耐性菌の分布をみるにあたって、X γ/ml 耐性菌の分布は100%、ときに100%以下、あるいはもとの分布以下に下降することがみられた。この点について薬剤含有培地の薬剤濃度の影響を検討したところ、薬剤含有培地によつて次代の耐性菌分布が大きく左右され、かつ耐性上昇も左右されることが分かつた(図8)。薬剤含有培地に発育する菌について考えると、Kirchner 寒天培地で時間経過とともに含有薬剤の増殖阻止作用が低下する経験的事実から、当初の含有薬剤濃度に感性であるはずの菌もまた発育してくる可能性が考えられる。さらに耐性菌への mutant とともに感性菌への back mutant が生ずることも考えられる。もし感性菌と耐性菌が1%小川培地を用いて1代増菌する過程で発育上のせり合いを行なうものと想定すると、感性菌の増殖が耐性菌より早ければ次代の耐性菌分布は前代より下降し、同等であれば上昇の遅滞、遅ければ上昇の分布を示すことになるわけである。

本実験で KM 1 γ/ml に恒量継代した場合にも、H₂ 株、新鮮分離株および H₂R-SM 株はともに10代目で高濃度耐性菌を相当高率に含む KM 耐性株にまで耐性上昇を示した(表3)。SM 耐性獲得機構について、SM 微量接触による SM 耐性上昇を認めた研究^{6) 11)} が数多く報告されていることから、KM 耐性獲得機構についても同様のことが考えうるかもしれない。しかし上述のごとき耐性上昇の基礎的因子については全く不明というほかはなく、耐性獲得機構に関する遺伝子の変化を考えると、突然変異選択説^{12)~21)}、誘導変異説^{22)~27)} あるいはその折衷説⁶⁾ のいずれで説明するかはこの実験のみからはもちろん結論づけえない。

実験事実としていいうことは、KM および SM に対する耐性上昇が同じ菌株では、ほとんど同様の上昇態度を示すことであり、このことから今後臨床上 SM 耐性が辿つた経過と同様の運命を KM 耐性もいずれ辿るのであることが予測される。

結 論

結核菌の KM 耐性上昇と SM 耐性上昇とを比較検討して、次の結果を得た。

- 1) KM 耐性は step by step による増量継代法によつても、KM 1 γ/ml 恒量継代法によつても耐性上昇を示した。H₂ 株および H₂R-SM 株は7および6代目で100 γ/ml 完全耐性となつた。新鮮分離株は7代目で10 γ/ml 完全耐性となつた。
- 2) SM 耐性は KM に対する場合と同様の増量継代法によつて、KM に対すると同様の耐性上昇態度を示し、H₂ 株および H₂R-KM 株は6代目で100 γ/ml 完全耐性を示した。新鮮分離株の耐性上昇は遅く、6代目で5 γ/ml に94%、10 γ/ml に1.8%の耐性菌分布を示した。
- 3) H₂R-SM 株および H₂R-KM 株は低濃度 KM および SM に対して、H₂ 感性株より高い耐性度と高率の耐性菌分布を示したが、継代を重ねると感性株と同じ程度の耐性上昇を示した。
- 4) H₂R-SM 株が KM 1,000 γ/ml 耐性を獲得しても、もとの SM 100 γ/ml 完全耐性は不変であり、H₂R-KM 株が SM 1,000 γ/ml 耐性を獲得しても、もとの KM 100 γ/ml 完全耐性は不変であつた。

稿を終るにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜つた予研柳沢副所長、室橋部長、佐藤博士、ならびに技術的援助を負うところ大であつた丸山技官に深謝の意を表す。

なお、本研究の要旨は第34回日本結核病学会総会「カナマイシン・シンポジウム」において柳沢博士によつて発表せられた。

文 献

- 1) 柳沢謙・金井興美：日本細菌学雑誌，13：95，昭33。
- 2) 前田徹：結核，34：772，昭34。
- 3) Treffers, H.P. : J. Bact., 72 : 108, 1956.
- 4) 柳沢謙・佐藤直行：日本細菌学雑誌，12：857，昭32。
- 5) Szybalski, W., & Bryson, V. : J. Bact., 64 : 489, 1952.
- 6) 金井興美：日本細菌学雑誌，10：177，昭30。
- 7) 横田健：日本細菌学雑誌，10：506，昭30。
- 8) 堀三津夫・吉川正吾・伊藤和夫・横井正照：結核，30(特別号)：102，昭30。
- 9) 箕野脩一・岡野正光・村尾誠：結核(特別号)：103，昭30。
- 10) 箕野脩一：結核，31：678，723，昭31。
- 11) 田中完巳：日本細菌学雑誌，12：675，昭32；13：386，467，687，770，775，昭33。
- 12) Demerec, M. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 31 : 16, 1945.

- Demerec, M. : J. Bact., 56 : 63, 1948.
 Demerec, M. : J. Clin. Invest., 28 : 891, 1949.
- 13) Klein, M., & Kimmelman, L.J. : J. Bact., 52 : 471, 1946.
 Klein, M. : J. Bact., 53 : 463, 1947.
- 14) Luria, S.E. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 61 : 46, 1947.
 Oakberg, E.F., & Luria, S.E. : Genetics, 32 : 249, 1947.
 Luria, E.F. : Bact. Rev., 11 : 1, 1947.
- 15) Yegian, D., & Vanderlinde, R.J. : J. Bact., 56 : 177, 1948.
- 16) Scott, G.W. : Brit. J. exp. path., 30 : 501, 1949.
- 17) Newcombe, H.B., & Hawirko, R. : J. Bact., 57 : 565, 1949.
 Newcombe, H.B., & Nyholm, M.H. : Genetics, 35 : 603, 1950.
- 18) Lederberg, J. : J. Bact., 59 : 211, 1950.
 Lederberg, J., & Lederberg, E.M. : J. Bact., 63 : 399, 1952.
- 19) Cavalli, L.L., & Maccacaro, G.A. : Nature, 166 : 991, 1950.
- 20) English, A., & McCoy, E. : J. Bact., 61 : 51, 1955.
- 21) 牛場大蔵・渡辺力 : 日本細菌学雑誌, 9 : 349, 昭29.
 渡辺力 : 日本細菌学雑誌, 10 : 231, 昭30.
 牛場大蔵・後藤敏夫・清水邦彦・渡口精吉・坂本光弘 : 結核, 30 : 648, 昭30.
 草間久子 : 結核, 33 : 260, 昭33.
- 22) Linz, R. : Ann. Inst. Pasteur, 78 : 105, 1950.
 Linz, R., & Lane, J. : Compt. rend. soc. biol., 143 : 577, 726, 1949.
 Linz, R., Martin, L., & Lecocq, E. : Compt. rend. soc. biol., 143 : 728, 1949.
- 23) Gibson, M.I., & Gibson, F. : Nature, 167 : 113, 1951.
- 24) Eagle, H. : J. Exp. Med., 99 : 207, 1954.
 Eagle, H. : J. Exp. Med., 100 : 103, 1954.
 Eagle, H. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 59 : 243, 1955.
 Eagle, H., Fleischman, R., & Levy, M. : J. Bact., 63 : 623, 1952.
- 25) Yanagizawa, K., Kanai, K., Shiga, Y., & Ito, F. : Jap. Med. J., 4 : 99, 1951.
 Kanai, K., Nakamoto, T., & Yanagizawa, K. : Jap. J. Med. Sci. and Biol., 6 : 365, 1953.
- 26) 秋葉朝一郎・横田健 : 医学と生物学, 24 : 218, 昭27.
 秋葉朝一郎 : Chemotherapy, 1 : 1, 1953.
 横田健 : 日本細菌学雑誌, 10 : 261, 昭30.
- 27) 君野徹三・都築敏男 : J. Antibiotics, Ser. B, 7 : 62, 89, 1954.
 君野徹三 : 最新医学, 9 : 167, 昭29.