

# 重層培地による結核菌の定量培養

## 第1報 重層培地の完成までの経過

小 川 辰 次  
上 野 高 正\*  
高 倉 廉\*\*

北里研究所付属病院

\* 虎の門病院

\*\* 鬼子母神診療所

受付 昭和34年10月8日

### I 緒 論

培養による結核菌の検出および耐性結核菌の検査は、結核症を取扱う場合の欠くことのできないものであり、今後ますます重視されるものと思われる。しかしこれらの方法には大きな1つの欠点がある。それは判定までかなりの長い期間を要するという点である。この点に関しては今まで多くの諸先進の努力があるが、その歩みは遅々たるものがある。われわれもこの点の改良を試みておつたが、1つの解決の方法として固形と液体培地の混合した培地、すなわち重層培地を考案したのでここに発表する次第である。

### II 実験方法

種々の試作培地を作り3%小川培地と比較した。培養する材料には、保存人型結核菌 ( $H_{37}Rv$  株、森脇株) および肺結核症患者の喀痰を用いた。保存菌株は1%小川培地、2~3週培養のものを使用した。まず型のように滅菌蒸留水で菌液の原液を作り、これを4%水酸化ナトリウムでさらに10倍宛何段階かに希釈し、喀痰は4%水酸化ナトリウムで5倍、あるいは10倍に希釈して均等化したものを原液として、さらに菌液同様何段階かに希釈して、発育した集落の計算できるところの適當の希釈と思われるところを、メスピペットで0.1cc宛、5cc宛分注した培地に培養し、1週間ごとに観察して、一部は3週、大部分は4~5週で判定し、主として集落の発育するまでの期間および集落数により比較し、3%小川培地の集落数と同等、あるいはそれ以上のもので、しかも発育の早い培地を求めた。なお、培地は各希釈段階について4~5本宛使用した。液体培地および重層培地では、接種後ただちに振盪して混ぜて均等化したのち、封蠟するかゴムのキャップにかえて培養した。また固形培地では、斜面の全体にうおうように培地を縦軸に沿ってゆり動かし、斜面を上にして水平に斜

面合にねかし、1~2日、37°Cの孵卵器に放置し、培地内の液のほぼ乾燥するのをまつて封蠟し、あるいはゴムのキャップにかえ、たてて培養を継続した。

### III 実験成績

#### i. Kirchner 液体培地と3%小川培地の比較

まず保存人型結核菌の森脇株を用いて表1でみるように  $5 \times 10^{-4} mg \sim 5 \times 10^{-7} mg$  まで培養し、4週で判定した。成績は表1のようであつて、大体において、両培地においては著明の差はない。次に塗抹陰性の13の喀痰を4%水酸化ナトリウムで5倍に希釈して両培地に接種した。その結果、発育の点では菌液の場合と同様著明の差はない。しかし Kirchner 液体培地は39本中の18本、すなわち約半分において雑菌の発育をみた。3%小川培地ではその1本に雑菌の発育をみたにすぎない。

以上2つの実験から、Kirchner 液体培地に4%水酸化ナトリウムで処理したものを0.1cc培養すれば、発育はするが、とくに3%小川培地に比して優秀な点はない。また雑菌の混入が多い点でも、実際的には使用できないことを知つた。

#### ii. Kirchner 液体培地に寒天を混ぜ、うすい流動とした培地による実験

Kirchner 培地では菌量の多い場合は菌膜のように発育し、少量の場合は試験管の底に沈渣のように発育するので集落数を数えることができない。集落が液の中で撒布されたように発育すれば数えることができるし、また見落すこともない。この目的で寒天を加えて半流動とすることを試みた。寒天はわが国の製品を使用した。最初0.3%~0.5%に加えてみたが、この程度でも結核菌の発育には影響ない。しかしこれでは多少硬いので、寒天の量を少なくし、0.1%~0.3%に混入し、5cc宛分注して4%水酸化ナトリウムで前処理した、 $H_{37}Rv$  株を0.1cc宛培養した。成績は表2でみるようにこれら Kirchner 寒天培地では発育の点では差はなく、

表 1 森脇株を4%水酸化ナトリウムで処理して Kirchner 培地と3%小川培地に培養した実験

| 接種菌量<br>観察日<br>(週) | 5×10 <sup>-4</sup> mg |    |     |    | 5×10 <sup>-5</sup> mg |    |     |    | 5×10 <sup>-6</sup> mg |    |     |    | 5×10 <sup>-7</sup> mg |    |     |    |
|--------------------|-----------------------|----|-----|----|-----------------------|----|-----|----|-----------------------|----|-----|----|-----------------------|----|-----|----|
|                    | I                     | II | III | IV | I                     | II | III | IV | I                     | II | III | IV | I                     | II | III | IV |
| Kirchner 培地        | -                     | -  | 冊   | 冊  | -                     | -  | 冊   | 冊  | -                     | -  | 冊   | 冊  | -                     | -  | +   | 冊  |
| 3%小川培地             | -                     | +  | 冊   | 冊  | -                     | -  | 57  | 71 | -                     | -  | 12  | 19 | -                     | -  | 3   | 4  |

注： 1) 表中の数字は5本平均の集落数を示す。  
2) 集落数の表示は次のようである。

|             |   |  |   |        |   |   |   |
|-------------|---|--|---|--------|---|---|---|
| Kirchner 培地 | { | +……底に砂様に発育したもの<br>冊……底に菌膜を作ったもの<br>冊……液の表面の一部に発育したもの<br>冊……液の表面のほぼ全体に発育したもの<br>冊……菌膜が試験管壁にまではい上がったもの | } | 3%小川培地 | { | +……かすかに発育しているが集落数ののはつきりしないもの<br>冊……斜面の全体に発育しているが集落が孤々になっているもの<br>冊……斜面に菌膜様に発育しているもの | } |
|-------------|---|--|---|--------|---|---|---|

表 2 Kirchner 培地に寒天を種々の濃度に混入して半流動とした培地に4% NaOH で前処理した H<sub>37</sub>Rv 株を接種した実験

| 接種菌量<br>観察日<br>(週) | 10 <sup>-5</sup> mg |    |     |    | 10 <sup>-6</sup> mg |    |     |    | 10 <sup>-7</sup> mg |    |     |     |
|--------------------|---------------------|----|-----|----|---------------------|----|-----|----|---------------------|----|-----|-----|
|                    | I                   | II | III | IV | I                   | II | III | IV | I                   | II | III | IV  |
| 混入した寒天の量<br>0      | -                   | -  | 冊   | 冊  | -                   | -  | 冊   | 冊  | -                   | -  | +   | 冊   |
| 0.1 %              | -                   | -  | 65  | 冊  | -                   | -  | 9   | 12 | -                   | -  | 0.2 | 0.5 |
| 0.2 %              | -                   | -  | 62  | 冊  | -                   | -  | 7   | 13 | -                   | -  | 1   | 0.5 |
| 0.3 %              | -                   | -  | 52  | 冊  | -                   | -  | 5   | 14 | -                   | -  | 2   | 2   |

注： 表中の記載は集落の多少を示す。

- 1) Kirchner 培地の場合は表1に同じ。
- 2) Kirchner 培地に寒天を混入した培地では数は5本の培地の平均集落数を、冊は無数であることを示す。

0.1%でも結核菌の集落は十分に撒布されたように発育することが分かった。それでわれわれは、重層する液体培地には0.1%の寒天を混入することとした。

iii. 重層培地における固形培地、液体培地の混合の比率の実験

固形培地としては3%小川培地を、液体培地としては0.1%寒天加 Kirchner 培地を用いて、培地は全体として5ccになるようにし、3%小川培地と Kirchner 培地の混合の比を4:1, 3:2, 2:3, 1:4のようにしてこれらの種々の混入比の異なる培地に、前処理した H<sub>37</sub>Rv 株の菌液を培養した。なお対照として3%小川培地を用いた。成績は表3のようである。

すなわち3%小川培地の量を減少し、Kirchner 培地の量を増すとともに発育が次第によくなる。それでわれわれは固形培地1ccに対して、液体培地4ccを重層したものを用いることとした。なおこの固形1:液体4に混入した重層培地と3%小川培地を比較すると、いずれの接種量においても重層培地のほうが発育がよい。

iv. 重層培地に使用する固形培地の実験

1%小川培地、3%小川培地、および固形培地(鶏卵培地)の基汁を、蒸溜水にかえた固形培地をそれぞれ試験管の底に1cc宛分注して固め、その上に0.1%寒天加 Kirchner 培地にマラカイト緑を10万倍に混入したものを4cc宛重層して3種の重層培地を作った。これらの培地に Gaffky 5号の喀痰 O.S. を4%水酸化ナトリウムで10<sup>1</sup>~10<sup>7</sup>位の5段階に稀釈したものおよび塗抹標本の検査で菌のみえない喀痰 K.K. を同様にして10<sup>1</sup>~10<sup>2</sup>に稀釈して、各稀釈を0.1cc宛培養した。その成績は表4のようである。すなわち3%小川培地、1%小川培地を台にして作った重層培地では、いずれの喀痰においてもまたその稀釈度の如何にかかわらず発育の差はないが、蒸溜水で固めた固形培地を台としたものではいずれも前2者に比して多少発育が悪い。

以上の成績からわれわれは、重層培地の台としての固形培地は1%小川培地を用いることとした。

v. 重層する0.1%寒天加 Kirchner 培地の組成に関する実験

1%小川培地を台として、これに重層する液体培地を次のような種々のものにして比較した。重層する量は

表3 固形培地と液体培地の混合比を種々にして前処理した H<sub>37</sub>Rv 株を接種した実験

| 重層培地における<br>固形培地と液体培地の量 | 接種菌量             |             |    | 10 <sup>-5</sup> mg |   |     | 10 <sup>-6</sup> mg |    |    | 10 <sup>-7</sup> mg |     |    | 10 <sup>-8</sup> mg |     |  |
|-------------------------|------------------|-------------|----|---------------------|---|-----|---------------------|----|----|---------------------|-----|----|---------------------|-----|--|
|                         | 観察日<br>(週)       | I           | II | III                 | I | II  | III                 | I  | II | III                 | I   | II | III                 |     |  |
| 3%小川培地                  | Kirchner<br>変法培地 | 4 cc + 1 cc | -  | 1                   | 冊 | -   | 1.5                 | 3  | -  | -                   | 0.2 | -  | -                   | -   |  |
|                         |                  | 3 cc + 2 cc | -  | 29                  | 冊 | -   | 2                   | 5  | -  | -                   | 0.2 | -  | -                   | -   |  |
|                         |                  | 2 cc + 3 cc | -  | 51                  | 冊 | -   | 3                   | 9  | -  | -                   | 1   | -  | -                   | 0.2 |  |
|                         |                  | 1 cc + 4 cc | -  | 90                  | 冊 | -   | 8                   | 12 | -  | -                   | 2   | -  | -                   | 1   |  |
| 3%小川培地                  |                  | -           | 6  | 36                  | - | 0.2 | 1.6                 | -  | -  | 0.2                 | -   | -  | -                   |     |  |

注：表中の記載は集落の多少を示す。

- 1) 数 5本平均の集落数を示す。
- 2) 冊は集落が無数で数えられないことを示す。

表4 固形培地の台を種々にして作った重層培地に喀痰を前処理して培養した実験

| 喀痰を採取した<br>患者名および<br>Gaffky 番号  | 台の種類            |      | 1%小川培地 |    |      |     | 3%小川培地 |    |      |     | 基汁を蒸留水にか<br>えて作った培地 |    |     |      |
|---|-----------------|------|--------|----|------|-----|--------|----|------|-----|---------------------|----|-----|------|
|   | 観察日<br>(週)      | 稀釈倍数 | I      | II | III  | IV  | I      | II | III  | IV  | I                   | II | III | IV   |
| (1) <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span><br>Gaffky 5号 | 10 <sup>3</sup> |      | -      | +  | 冊    |     | -      | +  | 冊    |     | -                   | ±  | 冊   |      |
|   | 10 <sup>4</sup> |      | -      | +  | 冊    |     | -      | +  | 冊    |     | -                   | -  | 冊   |      |
|   | 10 <sup>5</sup> |      | -      | +  | 41.5 | 50  | -      | +  | 47.3 | 54  | -                   | -  | 9   | 30.5 |
|   | 10 <sup>6</sup> |      | -      | +  | 2.3  | 5   | -      | +  | 4.3  | 5.7 | -                   | -  | 1.8 | 3.5  |
|   | 10 <sup>7</sup> |      | -      | -  | 2.3  | 2.3 | -      | -  | 0.3  | 0.8 | -                   | -  | -   | -    |
| (2) <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span><br>Gaffky 0号 | 10 <sup>1</sup> |      | -      | +  | 冊    |     | -      | +  | 冊    |     | -                   | -  | 冊   |      |
|   | 10 <sup>2</sup> |      | -      | -  | 19.3 | 48  | -      | -  | 24.7 | 43  | -                   | -  | 5.8 | 30.5 |

注：表中の記載は集落数の多少を示す。

- 数字は平均集落数
- は陰性
- ± は5本の中の1~2本が陽性で、しかも数が小さく数えられないもの
- + は5本全部が陽性であるが集落が小さくて数えられないもの
- 冊 } は集落が無数であることを示し、+の数の多いものほど集落が多いことを示す。
- 冊
- 冊
- 冊

前同様 4 cc とした。

- ① 0.1% 寒天加 Kirchner 培地
- ② 0.1% 寒天加 Kirchner 培地より硫酸マグネシウムと枸橼酸ナトリウムを除去したもの
- ③ 前者の②において、第一磷酸カリウムの量を 100 cc の液に対して 1.0 g と増量したもの
- ④ 前者の②において、第一磷酸カリウムの量を 100 cc の液に対して 1.5 g としたもの

以上の4種とし、これらを 1% 小川培地を 1 cc 固めた上に重層して培地を作り、これに H<sub>37</sub>Rv 株の 4% 水酸化ナトリウムで前処理して 10<sup>-5</sup>mg / cc としたものを 0.1 cc, 0.2 cc, 0.3 cc 宛を培養した。成績は表5のようである。すなわち 0.1 cc の培養では、第一

磷酸カリウムが 1.0 g, 1.5 g に混入された ③ ④ の培地が ① ② の培地に比して早く発育し、また 0.2 cc, 0.3 cc の培養では、第一磷酸カリウムの量の多いものほどよい発育を示した。以上の成績から、液体培地の中に第一磷酸カリウムの 1.0 g に混入された培地は、1.5 g のものとはほぼ同様の発育を示し、かつ ① ② の培地より発育がよく、また 0.2 cc をうえても発育する。また前処理をしない菌液の培養でも、第一磷酸カリウムが 1.0 g の量では発育に悪い影響のないことが分かっているので、第一磷酸カリウムの量を 1.0 g とし、また硫酸マグネシウム、枸橼酸ナトリウムは除去しても発育に影響のないことが証明されたので、Kirchner 培地の基礎液の組成を次のように変更し、これに寒天を 0.1% に

表 5 重層する 0.1% 寒天加 Kirchner 培地の組成を種々にして 4% 水酸化ナトリウムで前処理した H<sub>37</sub>Rv 株を種々の量培養した実験

| 接種量 (cc)    |                                   | 0.1 cc |    |      |      | 0.2 cc |    |      |      | 0.3 cc |    |      |      |
|-------------|-----------------------------------|--------|----|------|------|--------|----|------|------|--------|----|------|------|
|             |                                   | I      | II | III  | IV   | I      | II | III  | IV   | I      | II | III  | IV   |
| 重層した液体培地の組成 |                                   |        |    |      |      |        |    |      |      |        |    |      |      |
| ①           | 0.1% 寒天加 Kirchner 培地              | -      | -  | 48   | 61.2 | -      | -  | -    | -    | -      | -  | -    | -    |
| ②           | ①より硫酸マグネシウムと枸橼酸ナトリウムを除去したもの       | -      | -  | 56   | 81.8 | -      | -  | 0.6  | 0.6  | -      | -  | -    | -    |
| ③           | ②において第一磷酸カリウムの量を 1.0g/100cc としたもの | -      | +  | 73.6 | 88.8 | -      | +  | 53.6 | 86.8 | -      | -  | 8    | 34.5 |
| ④           | ②において第一磷酸カリウムの量を 1.5g/100cc としたもの | -      | +  | 85   | 86   | -      | +  | 84.3 | 92.5 | -      | -  | 78.4 | 94   |

注: 1) 表中の数字は培地 5 本の平均集落数を示す。  
 2) + は 5 本全部陽性であるが、集落が小さくて数えられないことを示す。

表 6 重層する 0.1% 寒天加変法 Kirchner 培地にマラカイト緑を種々の量に加えて作った重層培地に 4% 水酸化ナトリウムで前処理した喀痰を培養した実験

| 培地の種類                           |                 | 重 層 培 地     |             |             |             |             | 3%小川培地      |
|---------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                                 |                 | 10 万 倍      | 20 万 倍      | 40 万 倍      | 80 万 倍      | 0           | 2,500 倍     |
| 患者番号・<br>喀痰の性状<br>および Gaffky 番号 | マラカイト緑<br>の混入量  | I II III IV | I II III IV | I II III IV | I II III IV | I II III IV | I II III IV |
|                                 | 観察日<br>(週)      | I II III IV | I II III IV | I II III IV | I II III IV | I II III IV | I II III IV |
| (1)                             | 粘液膿様 Gaffky 3 号 | - 卅 卅 卅     | - 卅 卅 卅     | - 卅 卅 卅     | - 卅 卅 卅     | - 卅 卅 卅     | - - 卅 卅     |
| (2)                             | 粘液膿様 Gaffky 0 号 | - 86 68 67  | - 46 46 48  | ×           | - 48 50 45  | ×           | - - 73 85   |
| (3)                             | 粘液様 Gaffky 0 号  | - 15 20 20  | - 13 15 15  | - 13 17 15  | - 14 19 20  | ×           | - - - 16    |
| (4)                             | 粘液様 Gaffky 0 号  | - 2 2 2     | - 2 2 2     | - 1 1 1     | - 1 1 1     | ×           | - - - -     |
| 使用培地総数                          |                 | 24          | 24          | 24          | 24          | 24          | 24          |
| 雑菌侵入培地数                         |                 | 4           | 5           | 11          | 13          | 23          | 3           |

注: 1) × は雑菌の侵入を示す。雑菌の侵入培地数は結核菌の発育したものでも全部入れた。  
 2) 数字は平均集落数を示す。  
 3) 卅, 卍, 卍等は数えられないくらい多いことを示す。

加えることにした。なお第二磷酸ナトリウムはこれを除去しても発育には影響はないが、これを除去すると培地が濁るのでそのままとした。

- 第一磷酸カリウム……………1.0 g
- 第二磷酸ナトリウム……………0.3 g
- アスパラギン……………0.5 g
- グリセリン……………2.0 cc
- 蒸 溜 水……………100.0 cc

この培地の pH は 6.2 であつて、4% 水酸化ナトリウムを 0.1 cc 加えてよく振盪して混和したときの pH は 6.4~6.5 である。

vi. 液体培地中に混入する色素の実験

実験成績 i でもみられたように、液体培地が重層すれば当然雑菌は入りやすい。それで雑菌を阻止するためのマラカイト緑の量をきめるために 1% 小川培地で台を固め、その上に重層する 0.1% 寒天加 Kirchner

変法培地に、マラカイト緑を 10 万倍、20 万倍、40 万倍、80 万倍に加えたものと、対照として加えないものを作り、これらの培地に塗染染色標本の検査で菌の陰性の喀痰を、4% 水酸化ナトリウムではほぼ 5 倍に稀釈、均等化した喀痰を 6 本宛の培地に培養し、雑菌の侵入の程度および発育の状態を比較した。

その成績は表 6 のようである。すなわちマラカイト緑を加えた培地は対照に比して雑菌の侵入培地数は明らかに少ない。そして 10 万倍、20 万倍混入の培地ではほぼ 3% 小川培地と同じであつた。また 10 万倍、20 万倍混入の培地における菌の発育をみると、3% 小川培地に比して集落数はほとんど差がないが、集落の発育までの期間は明らかに早い。

以上の成績から、雑菌の発育を阻止するためにマラカイト緑を 10 万倍に加えることにした。すなわち 0.1% のマラカイト緑を、液体培地 100 cc に対して 1 cc の



ため、結核菌は点状の集落を作り液中で撒布されたような形で発育する。それで集落を数えることができる。また雑菌の侵入を防ぐためにマラカイト緑を混入している。

以上のようなことによつて、3% 小川培地と同様水酸化ナトリウムで処理したものをそのまま 0.1 cc 培養でき、しかも 3% 小川培地に比して早く発育するし、集落数も多い。

しかし深部に発育する液体培地、たとえば Kirchner, 萩原・南谷<sup>3)</sup>, Dubos 培地<sup>4)</sup> だけでも固形培地に比して早い発育を示すことは多くの諸先進<sup>5)・10)</sup> によつて証明されている。最近 Robert Knox<sup>11)</sup> は変法 Kirchner 培地や Dubos 培地にわれわれのように寒天を 0.1%~0.125% に混入して前処理して中和した喀痰を培養し早く検出できることを証明しているし、井上・深川<sup>12)</sup> からもこれを追試しほぼ同様の成績を得ている。われわれの重層培地は液体培地のほかに 1% 小川培地を加えてある。このことによつて集落はさらに早く発育し、集落数も多くなっている。この優れた発育に対する 1% 小川培地の役割は今後さらに検討するつもりである。

なおわれわれの培地が Kirchner や Dubos の液体培地と大きな違いがあるのは、上述のように固形培地が加わったということだけではなく、液そのものの組成がかえられていることである。すなわち前述の液体培地では、酸で前処理した沈渣を白金耳でうるとか、あるいは水酸化ナトリウムで処理したものをさらに中和して接種する必要があるが、われわれの培地は前述のように中和する必要はないし、均等化した材料を 0.1 cc 宛うえるようにしてあるので、稀釈を一定にすれば定量培養が可能である。また非病原性抗酸性菌は、固形培地で着色した集落を示すものは重層培地の液中でも着色するし、無色の非病原性の抗酸性菌でも集落が粗であるから結核菌と区別することは可能である。われわれの考えとほぼ同様のものに植田<sup>13)</sup> の方法がある。すなわち氏は Löwenstein 培地に培養したのち、1 昼夜 37°C の孵卵器に保存し、雑菌侵入のないことを確かめ、Kirchner 培地を注加し、完全に斜面を Kirchner 培地中に没せしめ、そのまま培養を続けると集落は早く発育し、その後の発育も良好であることを認めている。

しかしわれわれの重層培地は氏らの培地とはかなり異なることは上述のようであつて、この種の培地は従来まで発表をみていない。

このようなことから本重層培地は実際に使用できるのではないかと考えているが、通常検査における使用に関してはさらに研究を続けてみるつもりである。

## V 結 論

結核菌の発育を良好にする培地を研究した結果、1% 小川培地 1 cc を中試験管の底に固め、その上に 0.1% に寒天を混入した変法 Kirchner 培地を 4 cc 重層した培地、すなわち重層培地を考案した。この培地は 4% 水酸化ナトリウムで処理したものを 0.1 cc うえるのに作った培地であつて、結核菌は液の中に分散して発育するから、集落を数えることができる。喀痰、保存菌株の培養による基礎実験では 3% 培地に比して発育が早く、集落数も多い。

本研究は結核予防会結核研究所在職中のものであつて、本研究の一部は昭和 25 年 11 月、昭和 26 年 7 月文部省科学研究費総合研究結核研究班細菌科会に発表した。

なお本研究には文部省科学研究費の補助をうけた。厚く感謝する。

## 文 献

- 1) Kirchner : Zbl. f. Bakt., 1 Abt., Orig., 124, 403, 1932.
- 2) 小川 : 結核, 24 (11), 11, 昭24.  
小川・佐波・鈴木 : 結核, 25 (5), 33, 昭25.
- 3) 萩原・南谷 : 細菌学雑誌, 571, 367, 昭18.
- 4) Réne J. Dubos & Middlebrook : Am. Rev. Tbc., 56, 187, 1947.
- 5) 広木・占部 : 満洲医学雑誌, 19, 373, 昭8.
- 6) Horace Goldie : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 65, 210, 1947.
- 7) 伊藤 : 日本細菌学雑誌, 4, 19, 昭24.
- 8) 群・伊津野 : 結核, 25 (9・10・11), 51, 昭25.
- 9) 室橋・吉田 : 結核研究の進歩, 12, 239, 昭31.
- 10) 林・大竹 : 日本細菌学雑誌, 12, 915, 昭32.
- 11) Robert Knox : Lancet, 6881, 110, 1955.
- 12) 井上・深川 : 医学と生物学, 47, 187, 昭33.
- 13) 植田 : 日本医学及び健康保険, 3323, 429, 昭18.