

抗結核薬の試験管内抗菌濃度と卵培地におけるその表現

工藤 祐 是

結核予防会結核研究所付属療養所

工藤 禎

国立療養所東京病院

受付 昭和42年9月14日

REDUCED ACTIVITY OF ANTITUBERCULOUS
DRUGS ADDED INTO EGG MEDIA*

Sukeyoshi KUDOH and Tei KUDOH

(Received for publication September 14, 1967)

There are some different opinions on the problem concerning the reduction of activity of antituberculous drugs added into the egg media. According to the "Handbook of Tuberculosis Laboratory Method" issued by Veterans Administration, the amount of streptomycin (SM) and viomycin (VM) customarily increased three times and 25% respectively of the required concentration to compensate for the loss of drug activity on inspissation in egg-containing media. And the "guide to the examination of tubercle bacilli" in Japan describes the increased concentration of antituberculous drugs in the drug sensitivity test, such as, two-fold for SM, ten fold for kanamycin (KM) and 1.25 fold for VM. The report on the worldwide research of drug sensitivity test techniques performed by I. U. A. T. committee revealed that a considerable number of laboratories in the world have taken this matter into consideration. On the other hand, a part of investigators deny this phenomenon.

In this paper, we attempt to clarify the reasonable concentrations of drugs which are added into egg media for drug sensitivity test of tubercle bacilli.

Experiment I: Minimal inhibitory concentrations of antituberculous drugs in both the serum liquid medium and the egg solid medium.

SM, VM, KM, CPM, CS, PAS, TB₁, INH, TH and EB were tested under the serious control repeatedly, and the results are shown in Fig. 1. In this figure, the length of each bar means the growth grade in each medium and strain (H₃₇Rv-standard strain, Yamamoto-fresh isolated strain, BCG). Of these drugs, SM, VM, KM, CPM and TH show remarkable differences between the drug-activities in the serum liquid medium and the egg solid medium.

Experiment II. Activity of drugs in water extracts of drug-containing media.

The activity of drugs in the supernatants of centrifuged homogenates of drug-containing media was measured by the vertical diffusion method. As shown in Fig. 2, a~j, each drug has the characteristic lines according to the media used. The similar results as in Experiment I were obtained in this experiment, and the grade of reduction of drugs in the egg medium is different depending on the concentration of drugs. The equations which show the correlation between the drug-concentration added into egg media and the activity expressed on media were led from these lines. These equations are considered to be very useful for a practical purpose in the drug sensitivity test.

* From Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose Machi, Kitatama Gun, Tokyo, Japan.

結核菌薬剤耐性検査の実施にさいし、同一菌株に対する種々の抗結核薬の阻止濃度が、使用した培地の種類によつて、かなり異なつて示されることが広く知られている。

とくに一部の薬剤では卵培地における結核菌の発育阻止濃度が、液体培地や血清寒天培地に比べてはなはだしく高く表現される。

結核菌薬剤耐性検査に主として卵培地による絶対濃度法を採用している本邦では、この問題を十分に解明しておく必要がある。

これまでの報告にみられるおおよその傾向は、狭義の抗生物質であるストレプトマイシン、バイオマイシン、カナマイシンと合成剤のエチオナミドについては、卵培地での活性低下が認められているが、一部にはそのような現象を認めない研究者もあり、また活性低下にしても、その程度や理由についての意見は必ずしも一致していない。また最近新たに加えられたいくつかの薬剤についてはほとんどデータがない。

本論文は現在広く用いられている抗結核薬 10 種すなわちデヒドロストレプトマイシン (SM), パラアミノサリチル酸ナトリウム (PAS), チオアセタゾン (TB₁), イソニコチン酸ヒドラジド (INH), バイオマイシン (VM), カナマイシン (KM), エチオナミド (TH), サイクロセリン (CS), カブレオマイシン (CPM), エタンブトール (EB) — 以下すべて () 内の略号を用う — について、キルヒナー半流動寒天培地と 1% 小川卵培地による感性菌の最小発育阻止濃度を求め、さらに薬剤添加固形培地の水抽出液の薬剤活性を生物学的に測定し、これらからこの問題の解明に手掛りを得ようとしたものである。

実験 1. 血清半流動寒天培地と卵培地における各薬剤の菌発育阻止濃度

実験方法

使用菌株: H₃₇Rv, H₃₇Ra (米国トルドゥ研究所より昭和 37 年 11 月にスミス培地に植えて直送された菌株を 1% 小川卵培地に 1 代植えて後、凍結乾燥し、保存してあつたもの)。山本株 (当所入院中の未治療患者喀痰より昭和 35 年 12 月に 3% 小川卵培地で分離し、1% 小川卵培地に 1 代植えて後、凍結乾燥し保存してあつたもの)、BCG (現行市販凍結乾燥品)。

以上 4 菌株の凍結乾燥アンブルに蒸留水を加えて菌浮遊液とし、おのおのデュボス培地で 1 代増菌、その希釈液を 1% 小川卵培地に展げて得られた孤立集落 1 コを再び小川卵培地で増菌後、グリセリン馬鈴薯培地に移し、生じた菌膜をソートン培地に浮かべた。ソートン培地の菌膜は 3~4 週ごとに継代し、全実験を通じ、常に 3~4 週の培養菌を用いた。

この菌膜を吸湿、秤量し、磨砕コルペン手振りにより 1 mg/ml、蒸留水浮遊液を作り、これより、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ mg/ml の浮遊液に希釈し、その 0.1 ml ずつを培養した。

供試試薬: SM (硫酸ジヒドロストレプトマイシン, 科研, XD-263), VM (硫酸塩, ファイザー, 206-64271), KM (硫酸塩, 三共, 043), CPM (重硫酸塩, リリィ, 1162-P-86271), CS (サイクロマイシン原末, 塩野義, FH 115 S), INH (ナイブレン, 田辺), PAS (パスナール, 第一), TB₁ (テベロゾン, 田辺), TH (ツベロゾン原末, 塩野義, FA 102), EB (カプセル入, 科研) の 10 種である。

このうち TB₁ のみは 5% Na₂HPO₄ 水溶液に 240 mg/ml に溶かしたものを原液とし、これより培地基汁で所要濃度に希釈し、TH はプロピレングリコールに 10 mg/ml に溶かしたのから蒸留水で希釈したが、他の薬剤はすべて蒸留水に 10 mg/ml に溶かしたものを原液とし、蒸留水で希釈した。

濃度表示は PAS-Na は PAS に換算し、SM, VM, KM, CPM は 1 バイアルの全量を 1 g とし、他は秤量した重量そのままとした。

検査した濃度段階は、従来の報告に照らして、各薬剤の最小阻止濃度を中心とする倍数希釈列の 5~7 段階を選んだ。しかし一部には選んだ濃度段階が偏りすぎ、再度検査せざるをえないものもあつた。

使用培地: TB₁ を除く全薬剤はキルヒナー血清半流動寒天培地と 1% 小川卵培地で検討されたが、TB₁ のみは 1% 小川卵培地の代りに岡・片倉卵培地が用いられた。これは培地の組成を全く変えずに TB₁ を溶解混和するために、サルファ剤の感受性検査の目的で以前考案した Na₂HPO₄ 水溶液にあらかじめ溶かす方法を応用したものである。TB₁ 以外の薬剤はすべて所要培地内濃度の 50 倍溶液を作り、これを 5 ml ずつ分注した培地液へ 0.1 ml ずつ加えた。

キルヒナー血清半流動寒天培地は、基汁に馬血清を 10% に加えたものを中試験管に 5 ml ずつ分注し、2 昼夜無菌試験後、各薬液を加えた。1% 小川卵培地も凝固前培地液を 5 ml ずつ分注したものに薬液を加え、振盪混和し、しばらく時間をおいて薬液の拡散を計つた後 90°C 1 時間滅菌凝固した。

培養と判定、培地はすべて薬剤添加後 2 日以内に使用した。培地管口には和紙で包んだ綿栓を使用し、キルヒナー半流動寒天培地では菌液流入後ただちに、1% 小川卵培地では菌接種後 2 日間斜面位置で 37°C に収容し、初期通気と培地面の乾燥を計つた後に溶けたパラフィンで封臘し、培養を続けた。この綿栓封臘法は、以前の検討により、多くの管口の封じ方のうちで最もよい成績を示したものである。

フラン室内温度の変動は、培地の位置で全培養期間を通じ 37±1°C をこえなかった。

判定は3, 4, 5週で行なつた。

なお再現性を確かめるために PAS, TH, TB₁, KM, VM, CPM については2ないし3回実験をくり返したが、成績はよく一致した。

成績

一括して図1に示す。

この図は培養4週目の成績を示したものである。しかし一部の薬剤では5週目の成績が4週目と異なつていものがあり、このような場合は5週目の成績を点線で補つてある。

またこの図にとり上げた成績は、前記3段の菌液濃度のうち、対照培地上の集落数が衛生検査指針¹⁰⁾の1から10⁵の間を示したものである。この図で同じ幅のバー

は、その濃度では対照培地と同程度の発育を示したことを意味し、クサビ状の部分は対照培地より少ない部分発育を示している。

なお H₃₇Ra 株は H₃₇Rv 株と全く同じ成績を示したので、図の煩雑を避けるため図より除いた。

図にみられるように菌株によって同一薬剤に対する感受性に差がみられる。H₃₇Rv, H₃₇Ra, 山本株の間には、PAS を除けば、ほとんど差はみられないが、BCG は SM, VM, CPM などの抗生物質に結核菌3株よりもやや高い感受性を示し、より低い濃度でも発育が阻止されるようである。これに反し CS および合成剤のほとんどは逆に結核菌よりも BCG に阻止力が低く、効果が少ないといえる。とくに PAS にこの差が大きい。

次にキルヒナー半流動血清寒天培地と1%小川卵培地の成績を比べると、従来述べられたように薬剤の種類によつてはかなり大きな差がみられる。

これらの薬剤のうち両培地の成績にほとんど差がないか、あるいはむしろ卵培地のほうに阻止濃度が低く示されたものは CS, INH, PAS, TB₁, EB で、卵培地が半流動血清寒天培地より高い阻止濃度を示すものは SM, VM, KM, CPM, TH である。後者の薬剤群における両培地上の阻止濃度の差は、キルヒナー培地に対して小川卵培地は、SM 2~4 倍、VM は4倍、KM 16倍、CPM 8倍、TH 8~16倍と考えられる。

実験 2. 薬剤添加培地水抽出液の薬剤活性

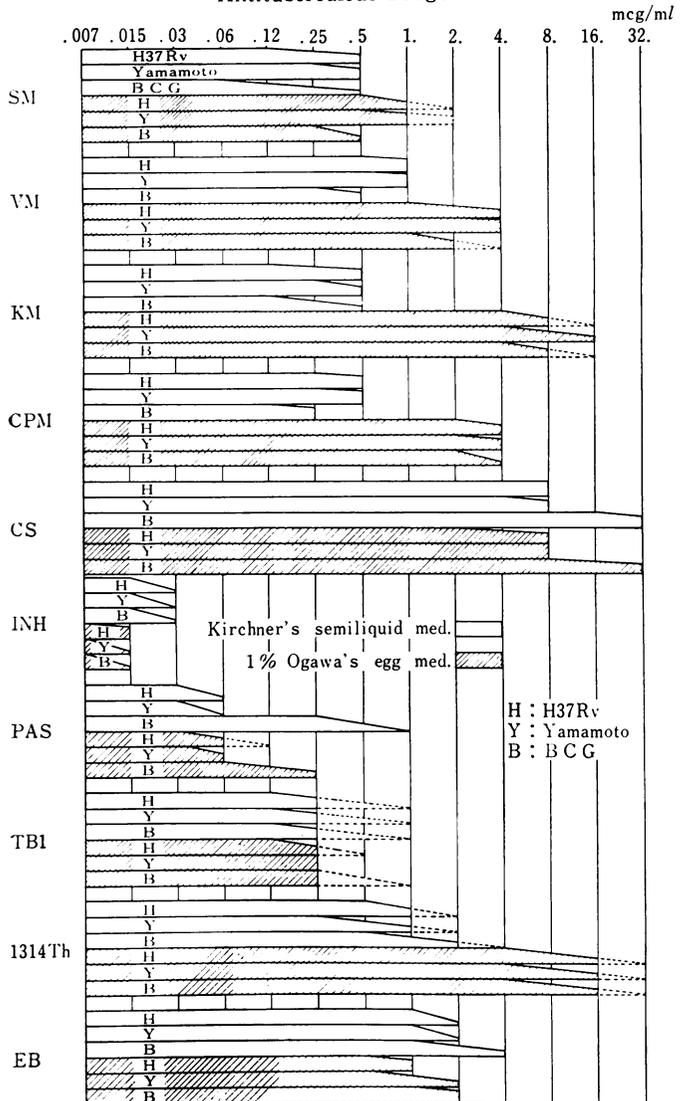
実験方法

供試薬剤：SM, VM, KM, CPM, CS, INH, PAS, TH, EB, TB₁

薬剤添加培地水抽出液、測定しようとする薬剤濃度の50倍の倍数希釈系列を作る。

SM を例にとれば、測定しようとする濃度を 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.5, 9.3, 4.6 mcg/ml の倍数希釈列とし、その50倍液、すなわち 30,000, 15,000, 7,500, 3,750, 1,850, 930, 460 mcg/ml の水溶液を作る。蒸留水および1%小川卵培地凝固前卵液を 5 ml ずつ、溶解キルヒナー寒天液を 4.5 ml ずつ中試験管に分注しておいたものへ、この薬液の各濃度を蒸留水系列へは 0.1 ml、両培地の凝固前のものへは 0.2 ml ずつ加え、キルヒナー寒天にはさらに馬血清を 0.5 ml ずつ加えて、十分に混和後、培地は斜面に凝固する。

Fig. 1. Minimal Inhibitory Concentration of Antituberculous Drugs



この凝固した培地を試験管より取り出し、等量すなわち 5 ml の蒸留水を加え、ホモジナイザーで2分間冷却細砕する。得られた泥状混合物を 3,000 RPM で1時間遠心沈殿し、その上清液を分離する。この液は小川卵培地では乳濁し、キルヒナー血清寒天培地ではほぼ透明である。

もし培地内で薬剤の活性低下が起こらなければ、培地へは薬液を蒸留水対照の倍量加え、細砕に当たつて蒸留水で2倍に希釈したのであるから、この上清液と蒸留水対照の同じ濃度のところでは、力価が等しいはずである。

測定：首曲り試験管(小川)²⁾³⁾にキルヒナー血清寒天培地を凝固させ、直立拡散法を用いて生物学的に薬剤活性を測定した。指示菌には $H_{37}R_v$ 0.5 mg/ml 蒸留水浮遊液 0.2 ml を用いた。菌液接種後、培地面を水平にして 37°C 2 日間培養してから、薬液および両培地の水抽出液をそれぞれ 1 ml ずつ管底に流し込み、立てて培養を続け、生じた阻止帯の長さ (mm) を 3, 4, 5 週目に測定した。

片対数方眼紙の対数側に薬剤濃度、等間目感側に阻止帯の長さを取り、これらの測定値をプロットすると、お

の直線が得られる。この場合、直立拡散法の測定値はやや不安定で、薬剤によつてはかなりの幅に分散するので、同一濃度に5本の培地を用い、そのうち値の近い3本の計測値を平均するなどの工夫をした。

成績

図 2 a~j に示すように TH を除いた各薬剤とも、蒸留水溶液とキルヒナー血清寒天培地抽出液の阻止帯の長さはほぼ一致している。これは TH を除くいずれの薬剤も血清寒天培地内では添加した濃度が、そのまま表現されることを示している。これに反して小川卵培地抽出液の示す阻止帯の長さが、蒸留水溶液と著しい差を示すものがかかり多くみられる。

このような薬剤としては、SM, VM, KM, CPM および TH があげられ、大きな差を示している。CS, EB にも卵培地における阻止帯の低下がわずかにみられる。

INH, PAS, TB₁ では卵培地抽出液と対照蒸留水溶液の値がよく一致しほとんど差が認められない。

これらの各直線を数式で表わしたものを各図に記入してあるが、これらの薬剤のうちで蒸留水溶液と卵培地抽出液の阻止帯に大きな差のあるものについて、両直線の

Fig. 2 a.

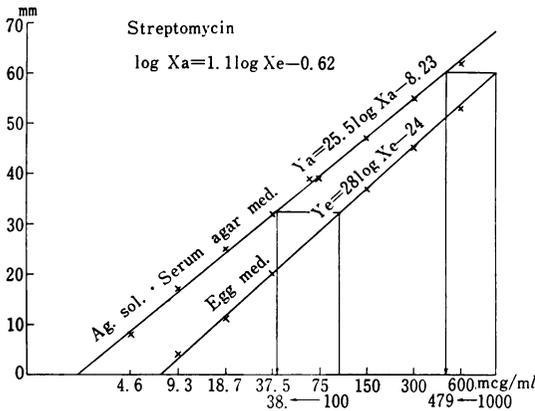


Fig. 2 b.

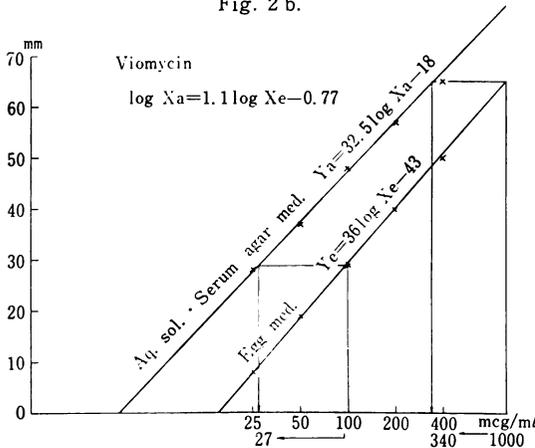


Fig. 2 c.

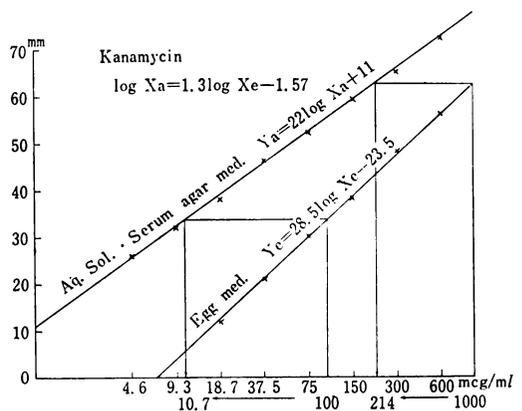
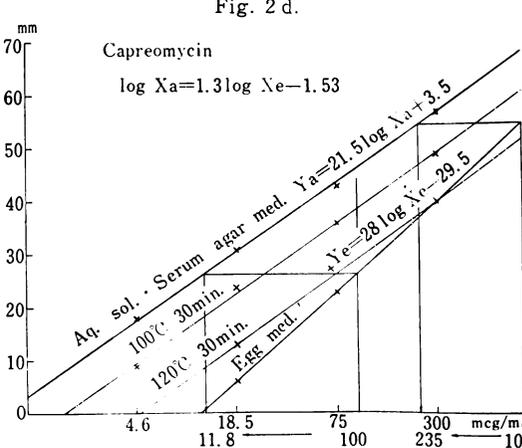


Fig. 2 d.



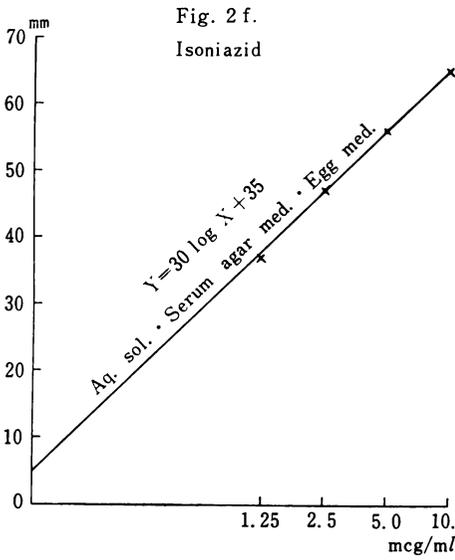
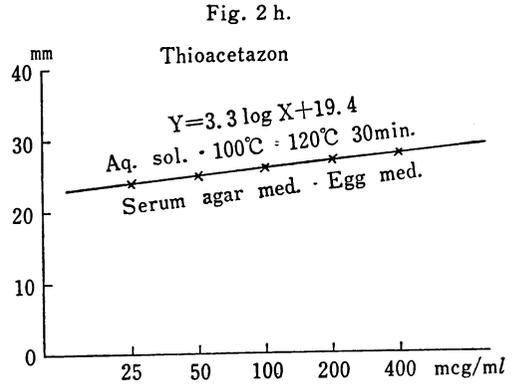
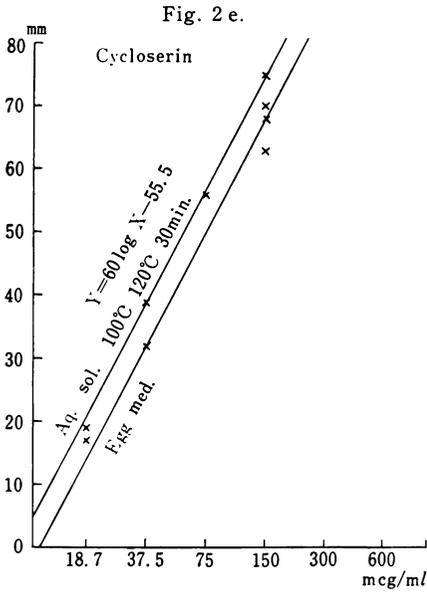


Fig. 2 i.

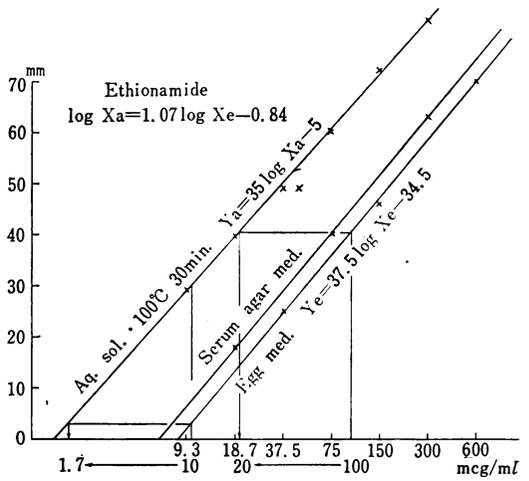
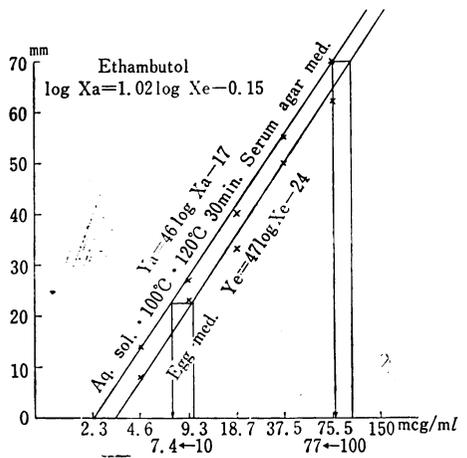
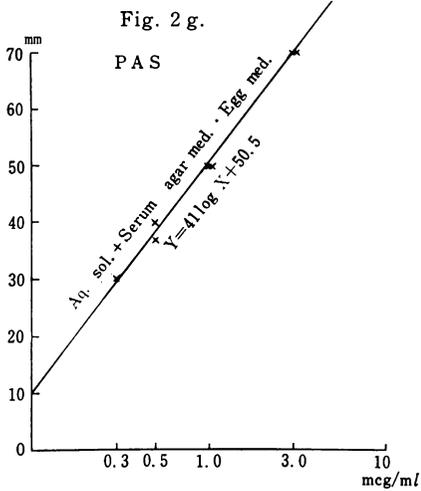


Fig. 2 j.



数式から 両者の相互関係を示す式を導いた。

SM を例にとると、

$$\log X_a = 1.1 \log X_e - 0.62$$

ただし、 X_a : 培地作製後表現さるべき薬剤活性
(培地抽出液の薬剤濃度 mcg/ml)

X_e : 培地に添加した薬剤濃度 mcg/ml

という式が示されている。この式を用いて計算すると、SM では 1,000 mcg/ml 添加すると、抽出液濃度は 479 mcg/ml で約 1/2 となる。同様 100 mcg/ml では 38 mcg/ml、10 mcg/ml では 3 mcg/ml で 1/3 以下となり、さらに 2 mcg/ml 添加では 0.5 mcg/ml と表現され、実験 1 におけるキルヒナー半流動寒天培地と、1% 小川卵培地の成績の差にかなりよく似た成績となる。

またこの式から逆に卵培地において SM 10 mcg/ml に相当する活性を期待するには、

$$\log 10 = 1.1 \log X_e - 0.62$$

$$\log X_e = \frac{1.62}{1.1} X_e \approx 30 \text{ (mcg/ml)}$$

となり、3 倍の添加が必要ということになる。

以下同様に各薬剤の感性結核菌の最小阻止濃度付近の薬剤濃度について計算値を求めると、VM では 4 mcg/ml 添加が 0.6 mcg/ml、KM では 8 mcg/ml が 0.4 mcg/ml、CPM では同じく 8 mcg/ml が 0.4 mcg/ml となり、TH では 16 mcg/ml が 2.8 mcg/ml となる。これらを実験 1 の最小阻止濃度の実験と比較すると、SM、VM、KM ではかなりよく成績が一致している。CPM は実験 1 では 8 倍程度の差であるが、実験 2 では KM と同程度すなわち 20 倍もの差で低下を示し、直線の傾斜も KM と酷似している。また TH も実験 1 の成績と著しい食違いがあり、この場合は実験 2 のほうの差が少なく、さらに血清寒天培地抽出液でもかなりの活性低下を示している。

実験補遺

この卵培地における活性低下の理由を知ろうとして 2、3 の小実験を試みた。

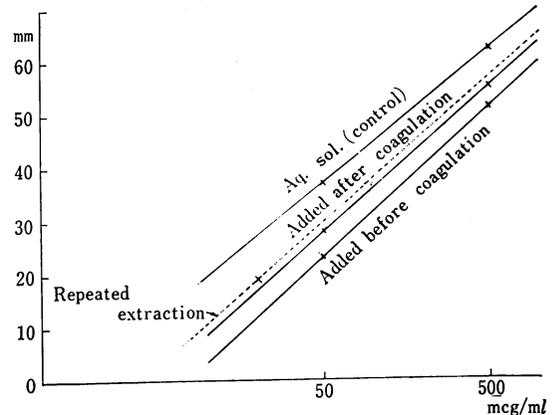
1. 加熱の影響

一部の薬剤について、水溶液を加熱し熱安定性を直立拡散法で測定した。CPM では 100°C 30 分でもやや低下するが、卵培地抽出液よりもはるかに軽度である。また TH では 100°C 30 分で力価低下を全く認めないが、卵培地における低下は著しい。卵培地作製時に加えられる温度は 90°C 1 時間であるから、このような低下は加熱による薬剤の変化によるものとは考えがたい。

2. 卵培地磨砕物に混和した薬剤の力価低下

卵培地凝固前に薬液を倍量加えて凝固し、これに等量の蒸留水を加えて磨砕した泥状物の遠心上清(前述)と、薬剤を加えずに凝固した卵培地に 2 倍濃度の薬液を等量加えて磨砕したものの遠心上清、および対照蒸留水

Fig. 3. Absorption of SM in 1% Ogawa's Egg Medium



溶液について実験 2 と同様に活性を測定した。これは加熱しなくとも卵培地によつて力価低下が起ることを確かめようとしたものである。

図 3 に示すように SM の場合、凝固後の培地磨砕物と混和しただけで、かなりの力価低下が認められる。そしてこれらの直線の傾きが濃度の高いほうでは蒸留水溶液の直線に近づき、濃度の低いほうでは対照の直線との開きが大きくなる点からみて、以上の卵培地における活性低下は主として卵培地中の凝固蛋白質による吸着であると考えられる。

3. 卵培地抽出後の沈渣中における薬剤活性

以上のように卵培地抽出液中の薬剤活性が、添加した量よりも著しく低下している場合、その差に相当する薬剤が卵培地中に吸着されているとすれば、さらに大量の蒸留水で抽出をくり返すと、吸着された薬剤が蒸留水にもつと抽出されてくる可能性があると考えられるので、次の実験を試みた。

SM を 40 および 200 mcg/ml に含有させた 1% 小川培地 5 ml へ 10 ml の蒸留水を加えて磨砕し、遠心上清をとり、その沈渣に再び 10 ml の蒸留水を加え同様の操作を 3 回くり返した。この上清液を集め(約 30 ml)凍結乾燥し、これを 5 ml の蒸留水に再び溶解させた。この液で活性を測定した成績が、図 3 の破線で示したものである。これで見ると 1 回抽出に比べ、かなり高い価が示されている(これは意味の異なる実験であるから、この図に描き込むことは不適当であるが、便宜的に加えた)。そしてさらに 3 回抽出後の沈渣をキルヒナー液体培地で 2、4、8、16、32 倍に希釈し、 $H_{37}R_v$ 株を培養したが、いずれもキルヒナー培地のみ対照と全く同程度の発育をみた。したがつてこの沈渣中の SM は、もはやほとんど溶出しなくなつていと考えられる。

考 察

添加された抗結核薬のあるものは、卵培地中で活性が

低下し、結核菌の発育阻止力が血清加液体培地に比べてはなはだしく低く示されることが従来も問題になつている。この点について論じた報告はかなり多いが、たとえば小川⁴⁾は DHSM で 1/2, SM で 1/4 に低下することを認め、東村ら⁵⁾⁶⁾は KM について卵培地では 100mcg/ml 以上、キルヒナー寒天培地では 5 mcg/ml 以上を耐性であるとし、卵培地に 10 倍量入れることを推奨している。また TH については遠藤ら⁷⁾はキルヒナー寒天培地の 1 mcg/ml が小川培地の 10 mcg/ml に相当するとし、川合⁸⁾も TH の抗菌作用は培地により大差のあることを報告している。また賀来⁹⁾は小川培地とキルヒナー寒天培地およびキルヒナー半流動寒天培地で各抗結核薬の抗菌力を比較し、卵培地では血清寒天培地に比べ DHSM で 4 倍、KM で 16 倍、VM で 4~6 倍を加える必要があり、INH, TH は寒天培地でも低下、TH は卵培地での低下も著明であると報告している。

一方厚生省監修の衛生検査指針中¹⁰⁾の結核菌検査指針でも、小川培地において薬剤添加濃度と表示濃度を異にするよう指示している薬剤がある。すなわち DHSM では添加濃度を表示濃度の 2 倍とし、KM は 10 倍、VM は 1.25 倍となつている。また Veterans Administration 刊行の Handbook of Tuberculosis Laboratory Methods¹¹⁾にも SM では 3 倍、VM では 1.25 倍添加するように示されている。

しかし他方、伊藤¹²⁾は DHSM において力価減弱を考慮する必要なしとし、Muftic¹³⁾も培地を酵素で消化した抽出液を測定し、力価は不変であつたと報告している。

このように卵培地中の力価低下については意見の食い違いがみられるが、その大部分は SM, KM, VM あるいは TH の力価減弱を認めているものと思われる。

この問題は実際の臨床検査にあたつて、耐性検査の判定値の評価を左右する重大な因子となるわけであるから、従来も多く報告があるにもかかわらず、再検討の必要を痛感し、以上のような実験を試みた次第である。

その結果卵培地における添加薬剤の活性低下は SM, VM, KM, CPM などの抗生物質と TH に著明であつて、他の薬剤では多少の変動はあつても、実際にはあまり問題はないと考えられる。そして低下の程度は薬剤によつて異なるが、一般に高濃度のほうに少なく、低濃度のほうに大きいという、吸着を思わせる成績が示された。直立拡散法による生物学的活性測定によつて得られた最小阻止濃度付近の成績は、SM, VM, KM については希釈法による(実験 1)液体培地と卵培地の比較成績にかなりよく似ている。CPM と TH はやや両実験間に差があるが、このうち TH は直立拡散法による測定が困難な薬剤で希釈法の成績をとるほうが適当であろう。

これらのデータから、添加濃度と表示濃度が異なる場

合に、2 倍とか 3 倍といった濃度に関係なく同率に薬剤を添加することには疑問がある。

それゆえに卵培地における活性低下を表わす簡単な数式を直立拡散法で得られた直線から導き出してみた。この数式は大まかに加えるべき薬剤量を割出すのに、実際上役立つものと思ふ。

なお卵培地における抗結核薬の活性低下の理由を推定しようとして 2, 3 の小実験を試みたが、その結果明確ではないが、この現象の大きな部分は薬剤の卵培地とくにその蛋白による吸着に起因するのではないかと考えられる。したがつて薬剤活性測定に培地を溶解したり消化する方法¹²⁾を用いたのでは、力価減弱が認められないという結論が出ることにならう。

結 論

抗結核薬の感受性検査にさいし、問題となつている卵培地中の薬剤活性低下の程度と理由を確かめるべく、各薬剤のキルヒナー半流動寒天培地と 1% 小川卵培地における結核菌および BCG の最小発育阻止濃度を、一定の条件下で検討し、さらに 1% 小川卵培地とキルヒナー寒天培地の磨砕水抽出液の活性を直立拡散法で測定し、対照水溶液との関係を求めた。

(1) 卵培地で著明な活性低下を示す薬剤は、SM, VM, KM, CPM, TH である。軽度の低下は CS, EB にみられるがその程度は実際の感受性測定にさいし問題にならない。INH, PAS, TB₁ では低下が認められない。

(2) 卵培地で活性低下がみられる場合、その程度は高濃度と低濃度では同率でなく、低いほうに高度である。

(3) このことと 2, 3 の実験から、この現象は薬剤の培地による吸着が主な理由と考えられる。

(4) 直立拡散法による阻止帯長の直線から、添加された薬剤濃度が、卵培地上でどのように表現されるかを推定する数式を出した。

本論文の一部は昭和 36 年、37 年、41 年の各日本結核病学会総会において発表した。

終りに本実験の遂行にあたり理解あるご助言を賜つた結核研究所岩崎所長ならびに国立予防衛生研究所室橋部長に深く感謝いたします。また数式の計算を援助された当所豊原博士ならびに長期にわたり協力を惜しまなかつた細島澄子技師に心から謝意を表します。

主要文献

- 1) 工藤祐是: 胸部疾患, 6: 1439, 昭 37.
- 2) 小川政敏: 日本臨床結核, 16: 417, 昭 32.

- 3) 小川政敏：日本胸部臨床，20：545，昭 36.
- 4) 小川政敏：結核研究の進歩，5：241，昭 29.
- 5) 東村道雄他：日本胸部臨床，22：844，昭 38.
- 6) 東村道雄：日衛検技誌，12：121，昭 38.
- 7) 遠藤信他：日衛検技誌，14：16，昭 40.
- 8) 川合満：京大結研紀要，13：184，昭 40.
- 9) 賀来隆二：結核，38：517，昭 38.
- 10) 衛生検査指針，結核菌検査指針，厚生省監修，昭 39.
- 11) Hobby, G.L. et al.: V.A. Handbook of Tuberculosis Laboratory Methods, p. 20, 1962.
- 12) Muftic, M. et al.: Acta Tbc. et Pneum. Scand., 44：316, 1964.