

抗酸菌の分離培養法の改良
 第5報 非定型抗酸菌と結核菌の混在の推定と
 両菌の分離の基礎実験

小川辰次

北里研究所

西村セツ子

北里研究所付属病院

受付 昭和44年1月27日

IMPROVEMENT OF CULTURE METHOD FOR PRIMARY
 ISOLATION OF MYCOBACTERIA*

V. Experimental Isolation of Tubercle Bacilli and Atypical Mycobacteria
 from Artificially Mixed Bacterial Suspension

Tatsuji OGAWA and Setsuko NISHIMURA

(Received for publication January 27, 1969)

Occasionally one may encounter primary culture in which both tubercle bacilli and other acid-fast organisms are growing simultaneously. Such a mixed culture, however, is particularly difficult to recognize provided that the two types of acid-fast organisms, especially of slow-growers, make entirely confluent colonies each other. If there is any sign of being mixed, the cultures should be subjected to certain procedures for separation. The purpose of this report is to introduce a method for separating mycobacterial mixed culture into its components of pure cultures.

1) Suspectable features of a mixed culture : In the experiment shown in Table 1, artificially mixed cultures of tubercle bacilli strain H₃₇Rv and nonphotochromogenic strain Mori were prepared by inoculating the mixture of the two bacterial suspensions in various proportions. The table shows that among their cultural characteristics colonial appearance or niacin test may serve as an aid for suspecting a culture of mixed one. However, it seems likely that most of the cases reveal no sign of being a mixed population.

2) Method for separating tubercle bacilli and atypical mycobacteria from their mixed culture (Table 2 and 3) : A 0.1 mg/ml aqueous suspension was made from each of the cultures of the tubercle bacilli and the atypical mycobacteria and, as shown in Table 2 and Table 3, they were mixed each other in varying proportions. Serial 10-fold dilutions were made up from these mixtures using distilled water, 4% NaOH solution and 4% H₂SO₄ solution, respectively. These dilutions were inoculated in an amount of 0.1 ml each into the following media : the aqueous dilution was inoculated into four 1% (KH₂PO₄) Ogawa egg slants two of which were incubated at 37°C and the other two at 22°C ; the alkaline and acidic dilutions were inoculated into 3% (KH₂PO₄) Ogawa egg slants and 3% Na₂HPO₄ egg slants, respectively. These were incubated

* From Kitasato Institute and Kitasato Institute Hospital, Shiba Shirogane Sanko-cho, Minato-ku, Tokyo 108 Japan.

at 37°C. Such an alkaline or acidic treatment aimed at recovering tubercle bacilli from the mixed culture where atypical mycobacteria were considered predominant.

Well-isolated colonies were obtained from each of the sufficiently diluted suspensions and distinguished by virtue of colonial appearance and growth temperature: rough colony grown at 37°C is evidence of the tubercle bacilli and smooth form of colony at 22°C or 37°C indicates the atypical mycobacteria.

3) Confirmation (Table 4): To make certain of the above differentiation, two types of separate colonies as differentiated above were removed and streaked on Ogawa egg slants. The data in Table 4 clearly showed that the colonies suspected of the tubercle bacilli gave no growth at 22°C and good growth at 37°C which proved niacin-positive and that the colonies suspected of atypical mycobacteria yielded niacin-negative cultures at both 22°C and 37°C. These results suggest that the above procedure including confirmation test may be useful for the aforesaid purpose in routine laboratories.

1. 緒 言

1本の分離培地の斜面に結核菌と非定型抗酸菌とが個々に発育することは時々経験することであるが、この2つの菌が融合して発育してくると、それを2つの菌の混在と正しく判定することはなかなか難しい。

そこで我々は、結核菌と非定型抗酸菌を人工的に混入して、その時の集落の発育、性状、ナイアシンテスト等を検査して、菌混在推定の足がかりとしたいと考えた。更に混入の菌より結核菌と非定型抗酸菌の分離を試み、実際に分離を行なう場合の基礎としたいと考えたので、ここに報告し、ご批判を仰ぎたい。

2. 実験方法と実験成績

① 結核菌と非定型抗酸菌を混入培養した時の集落の性状およびナイアシンテスト

結核菌としては H₃₇Rv 株、非定型抗酸菌としては、非着色光非発色性の森一無色株と、森一無色株より解離した黄色に着色する森一黄株の2株を用いた。H₃₇Rv 株は R 型、非着色性で発育は良く、1 mg/ml の菌浮遊液の生菌単位は 8.5×10⁶ である。森一無色株は S 型で発育は良く、1 mg/ml の菌浮遊液の生菌単位は 29.5×10⁷ である。森一黄株も S 型で、発育は良く、1 mg/ml の菌浮遊液の生菌単位は 15.5×10⁶ である。H₃₇Rv 株の 1 mg/ml と森一無色株、森一黄株の 10⁻¹ mg/ml の菌浮遊液を、表1のように種々の割合に混入して、これを(1)~(6)までの混入液とした。なお(1)は H₃₇Rv 株単独、(6)は森一無色株、森一黄株の単独で対照である。これらの混入液の 0.1 ml 宛を2本の1%小川培地に接種して、37°C に培養し、4週後に、その発育の状態をみるとともに、ナイアシンテストを行なった。

成績は表1のようで、結核菌と森一無色株の混入実験

Table 1. Growth Characteristics and Niacin Test of Mycobacterial Mixed Cultures of Tubercle Bacilli Strain H₃₇Rv and Nonphotochromogenic Strain Mori

Inoculum No.	Composition of inoculum			Resulting mixed culture on Ogawa egg medium			
	A (ml)	+	B (ml)	'H ₃₇ Rv' + 'Mori-White'		'H ₃₇ Rv' + 'Mori-Yellow'	
				(A : B)	Growth*	Niacin test**	Growth
(1)	2.5	—	(5 : 0)	### a R	(+)	### a R	(+)
(2)	2.0	0.5	(4 : 1)	### a R	(+)	### a S	(-)
(3)	1.5	1.0	(3 : 2)	### a R	(+)	### a S	(-)
(4)	1.0	1.5	(2 : 3)	### a R	(+)	### a S	(-)
(5)	0.5	2.0	(1 : 4)	### a R	(+)	### a S	(-)
(6)	—	2.5	(0 : 5)	### a S	(-)	### a S	(-)

Note: 1) A=Bacterial suspension of strain H₃₇Rv, 1 mg per ml.

B=Bacterial suspension of strain Mori (-Yellow or -White), 0.1 mg per ml; Strain Mori-Yellow is a Yellow-pigmented variant derived from parent strain Mori-White.

2) * ###.....innumerable and completely confluent colonies; a.....markedly raised (eugonic); R.....rough colony, S.....smooth colony.

3) ** Niacin test according to BrCN-benzidine method is expressed as follows:

(##).....strongly positive, (+).....moderately positive, (+).....weakly positive, and (-).....negative.

では、森一無色株の単独培養の(6)だけがS型を示し、結核菌単独と、結核菌を種々の割合に混入した(2)~(5)とは、全部R型で非着色性集落であつた。次にナイアシントテストは、H₃₇Rv株単独は+であるが、H₃₇Rv株混入の割合が少なくなるとともに+を示した。

H₃₇Rv株と森一黄株の混入実験では、森一黄株の発育が早いせいか、森一黄株単独と、森一黄株を種々の割合に混入したものの全部、すなわち混入番号(2)~(6)までは同様にS型となり、黄色に着色し、ナイアシントテストは全部陰性を示した。

② 結核菌と非定型抗酸菌との混入培養より両菌の分離の実験

(イ) H₃₇Rv株と非定型抗酸菌持田株(着色性、迅速発育菌)の混入

使用したH₃₇Rv株、1mg/mlの菌浮遊液の生菌単位は85×10⁴である。非定型抗酸菌持田株はS型黄色の迅速発育菌で1mg/ml菌浮遊液の生菌単位は125.5×10⁶である。4% NaOH液で処理して、その直後に3%小川培地に接種するとH₃₇Rv株は集落が約1/3に減少したが、持田株は発育しなかつた。

これらの菌株で10⁻¹mg/mlの菌浮遊液を作り、これを表2のように、種々の割合に混入して(1)~(9)までの混入液とし、まず滅菌蒸留水で10倍希釈して10⁻³~10⁻⁷mgまでの4段階を、4本宛の1%小川培地に接種し、これを2本宛、37°Cと22°Cに培養した。更に4% NaOH液で処理して10⁻³~10⁻⁶mgの4段階を3%小川培地に接種して37°Cに培養した。

そして1カ月後に発育した集落数を数えた。このように同一菌混入液を何段階にも希釈して接種したのは、孤立して発育する集落を期待したからである。表2には集

落を数えることのできた蒸留水希釈接種の10⁻⁶mg、10⁻⁷mg、および4% NaOH液処理の10⁻⁵mg、10⁻⁶mgの成績のみを示した。またR型の集落をH₃₇Rv株、S型で黄色に着色しているものを持田株と仮定して別々に記した。

成績は表2のごとくで、蒸留水による菌浮遊液を37°Cに培養した時は、H₃₇Rv株も持田株も個々に分離して検出できた。なおH₃₇Rv株の検出集落数の少なかつたのは、混入したH₃₇Rv株が持田株に比して1/100以下の生菌単位であつたためであろう。また22°C培養では持田株のみが検出された。次に4% NaOH液処理では、H₃₇Rv株のみを検出した。これらのいずれの場合でも、混入の割合の多いもの程、検出集落数が多かつた。4% NaOH液処理で、H₃₇Rv株のみが検出されたのは、前述のように、4% NaOH液処理による集落の減少が、H₃₇Rv株で少なく、持田株では多かつたことによると思われる。

(ロ) H₃₇Rv株と非定型抗酸菌藤谷株の混入

結核菌にはH₃₇Rv株、非定型抗酸菌には、S型で、非着色性光非発色性の藤谷株を用いた。1mg/mlのH₃₇Rv株の菌浮遊液の生菌単位は、85×10⁴、藤谷株は、126.5×10⁷である。この両株の0.1mg/mlの菌浮遊液を作つて、これを表3のように、(1)~(5)までの種々の割合に混入した。まずこれらの混入液を滅菌蒸留水で10倍宛に希釈して、10⁻⁴~10⁻⁷mgの5段階を1%小川培地に4本宛接種し、前同様に2本は37°Cに、2本は22°Cに培養した。更に4% NaOH液、および4% H₂SO₄液で処理して、処理直後に10⁻³~10⁻⁶mgの4段階を、それぞれ2本宛の3%小川培地および3% Na₂HPO₄培地に接種して37°Cに培養し、4週後に発育

Table 2. Colonial Differentiation Between Tubercle Bacilli and Atypical Mycobacteria in Culture Tubes Inoculated with Mixtures of the Two Bacterial Suspensions (Tubercle bacilli H₃₇Rv : Rapid grower strain Mochida)

Inoculum No.	Ratio between H ₃₇ Rv and 'Mochida' in inoculum suspension*	Number of colonies grown per tube**					
		37°C		22°C		37°C	
		Inoculum size (mg) in aqueous suspension				I.S. (mg) in 4% NaOH-sus.	
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
(1)	1 : 9	-/148.0	-/ 18.5	-/ 87.0	-/ 19.5	5.5/-	-/-
(2)	2 : 8	-/159.0	-/ 17.0	-/ 90.0	-/ 15.0	12.0/-	1.0/-
(3)	3 : 7	-/120.5	-/ 15.0	-/148.5	-/ 3.5	17.0/-	1.5/-
(4)	4 : 6	-/ 87.5	-/ 10.5	-/ 63.5	-/ 7.0	20.0/-	1.0/-
(5)	5 : 5	-/ 67.0	-/ 8.5	-/ 64.0	-/ 9.0	22.0/-	3.0/-
(6)	6 : 4	1.0/ 59.0	0.5/ 5.5	-/ 67.5	-/ 3.5	35.5/-	1.5/-
(7)	7 : 3	1.5/ 54.0	1.5/ 5.5	-/ 25.0	-/ 9.0	37.0/-	2.5/-
(8)	8 : 2	4.0/ 42.5	1.0/ 6.0	-/ 45.0	-/ 3.0	33.0/-	4.5/-
(9)	1 : 9	6.0/ 23.5	1.0/ 2.5	-/ 25.0	-/ 2.0	43.5/-	1.5/-

Note : 1) * Composition of the original mixture = Tubercle bacilli strain H₃₇Rv-suspension (0.1 mg/ml) plus atypical mycobacteria strain Mochida suspension (0.1 mg/ml).

2) ** Rough, cream-colored colonies of strain H₃₇Rv/Smooth, yellow-colored colonies of strain Mochida.

Table 3. Colonial Differentiation Between Tubercle Bacilli and Atypical Mycobacteria in Culture Tubes Inoculated with Mixtures of the Two Bacterial Suspensions (Tubercle bacilli H₃₇Rv : Nonphotochromogenic strain Fujitani)

Inoculum No.	Ratio between H ₃₇ Rv and Eujitani in inoculum suspension*	Number of colonies grown per tube**									
		37°C					22°C				
		Inoculum size (mg) in aqueous suspension					I.S. (mg) in 4% NaOH-suspension				
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
(1)	1 : 9	-/++	-/++	-/22.0	-/++	-/87.0	-/18.0	0.5/++	-/88.0	-/++	-/105.0
(2)	3 : 7	1.0/++	-/++	-/18.5	-/++	-/71.5	-/ 7.0	2.0/++	-/97.5	-/++	-/109.5
(3)	5 : 5	4.0/++	-/++	-/13.0	-/++	-/37.0	-/ 5.5	-/++	1.0/40.5	-/++	-/ 50.0
(4)	7 : 3	6.5/++	0.5/++	-/16.5	-/++	-/37.0	-/ 4.5	2.5/++	-/72.5	0.5/++	-/ 29.0
(5)	9 : 1	7.5/++	1.5/26.5	1.0/ 3.0	-/++	-/ 5.5	-/ 1.0	4.0/++	-/11.5	1.0/++	-/ 22.5

Note: 1) * Composition of the original mixture=Tubercle bacilli strain H₃₇Rv-suspension (0.1 mg/ml) plus atypical mycobacteria strain Fujitani-suspension (0.1 mg/ml).
 2) ** Rough, cream-colored colonies of strain H₃₇Rv/Smooth, nonpigmented colonies of nonphotochromogenic strain Fujitani.

Table 4. Identification Test : Growth Characteristics and Niacin Test of the Differentiated Colonies as Tubercle Bacilli and Atypical Mycobacteria

Differentiation	Source of colonies	Subculture at 37°C		Subculture at 22°C			
		Growth	Niacin test	Growth	Niacin test		
Tubercle bacilli	Strain H ₃₇ Rv	2 { (9), Distilled water, 37°C (1), 4% NaOH solution, 37°C		+++ a R	(+)	-	-
		3 { (5), Distilled water, 37°C (3), 4% NaOH solution, 37°C		+++ a R	(+)	-	-
		Strain Mochida 2 { (1), Distilled water, 37°C (3), Distilled water, 22°C		+++ a S	(-)	+++ a S	(-)
Atypical mycobacteria	Strain Fujitani	3 { (1), Distilled water, 37°C (1), Distilled water, 22°C (5), 4% NaOH solution, 37°C (5), 4% H ₂ SO ₄ solution, 37°C		+++ a S	(-)	+++ a S	(-)
				+++ a S	(-)	+++ a S	(-)
				+++ a S	(-)	+++ a S	(-)

Note: The symbols are the same as those for Table 1.

したR型の集落を H₃₇Rv 株, S型の集落を藤谷株と仮定して, 同一培地に発育した集落を分けて記載した。ここでは簡単にするために, 蒸留水で希釈接種したものは 10⁻⁵~10⁻⁷ mg を, 前処理したものは 10⁻⁵ mg, 10⁻⁶ mg の成績を示した。

成績は表3のごとくで, H₃₇Rv 株の分離できたのは, 滅菌蒸留水希釈, 37°C 培養で, しかも H₃₇Rv 株の混入の割合に多かつた部分と, 4% NaOH 液処理, 4% H₂SO₄ 液処理の一部にすぎなかつた。しかし H₃₇Rv 株が分離できたとしても, 無数の藤谷株の中にまじっていることが多く, 実際に個々の集落として分離できたのは, (5) の混入液の蒸留水希釈, 37°C 培養と, (3) の混入液の 4% NaOH 液処理だけであつた。

次に藤谷株は, いずれの場合にも分離できた。22°C 培養では, 藤谷株だけが分離できたことは(イ)と同様であるが, 4% NaOH 液処理, 4% H₂SO₄ 液処理, 10⁻⁶ mg

接種では, 大部分は藤谷株だけが分離できたことは, 藤谷株の生菌単位が多かつたことと, 4% NaOH 液処理, 4% H₂SO₄ 液処理による集落の減少が, H₃₇Rv 株と藤谷株とでは, 大差なかつたことによるとと思われる。

3. 分離した結核菌と非定型抗酸菌の吟味

結核菌 H₃₇Rv 株と非定型抗酸菌持田株および H₃₇Rv 株と非定型抗酸菌藤谷株との混入菌浮遊液の培養菌苔より分離した H₃₇Rv 仮定の4株, 持田株仮定の2株, および藤谷株仮定の4株を, それぞれ4本の1%小川培地の斜面に塗抹接種し, 2本宛 37°C, 22°C に培養し, 週1度4週間観察し, 発育および集落の性状を見るとともに, ナイアシメントを行なつた。

成績は表4のようで, H₃₇Rv 株と仮定した4株は, 37°C だけに発育し 22°C では発育せず, 集落はR型非着色性で, ナイアシメントはいずれも中等度陽性を示し

た。非定型抗酸菌と仮定した持田株の2株、藤谷株の4株は、37°C、22°Cともに良く発育し、集落はS型で、持田株は黄色に着色し、藤谷株は無色であつた。ナイアシメントは37°C、22°C培養のいかに拘らず、その全部が陰性を示した。なお、これらのH₉₇Rv株仮定、持田株仮定、藤谷株仮定の菌株の発育、集落の性状、およびナイアシメントの成績は、混入前のH₉₇Rv株、持田株、藤谷株と全く同様であつた。したがつて分離した菌株は、それぞれH₉₇Rv株、持田株、藤谷株であるものと考えてよいであろう。

4. 考 察

結核菌はその集落がR型で、多少薄い黄色の着色はあるとしても、非定型抗酸菌に見るようなはつきりしたものではない。非定型抗酸菌の集落はS型で、あるものは非着色性、あるものは着色性である。これは両菌の本来の姿であるから、同一培地斜面の上に、集落性状の異なる集落が見られるなら、当然、両菌の混在が推定できる。しかし結核菌が変異してS型を示し、これが本来S型の非定型抗酸菌に混じるとか、変異したR型の非定型抗酸菌が、本来R型の結核菌に混じっているならば、両菌の混入は推定不可能であろう。また非定型抗酸菌の発育が結核菌に比して劣るなら、その中に非定型抗酸菌が混じついても、結核菌だけのような外観を示すし、反対に非定型抗酸菌の発育が結核菌に比して優れておれば、非定型抗酸菌だけのような外観を示すことになる。これらのことは、集落の性状や着色の有無だけで、両菌の混在の存在を推定することが、かなり範囲を限られることを意味するであろう。また一方、結核菌単独の姿を示す場合でも、非定型抗酸菌の混在していることが、また逆に、非定型抗酸菌単独の姿を示している場合でも、結核菌の混入していることがありうることを示唆するものである。

ナイアシメントは、実験で示したように、両菌の混在を推定するある程度めやすとなる。結核菌¹⁾は本来は強陽性、中等度陽性を示すものが大部分である。もし結核菌単独の姿を示す発育の良い菌株が、ナイアシメント弱陽性、あるいは疑陽性で、しかも化学療法を長期間継続された患者より分離された耐性菌でないことが分かれば¹⁾、非定型抗酸菌の混在を考えるべきであろう。また非定型抗酸菌単独の姿を示しているのに拘らず、ナイアシメントが弱陽性を示す場合は、結核菌の混在を推定すべきであろう。しかし大量の結核菌の中に、少量の非定型抗酸菌が混じれば、ナイアシメントは、本来の強陽性、中等度陽性を示すであろうし、大量の非定型抗酸菌の中に、少量の結核菌が混じれば、ナイアシメントは陰性を示すであろうから、ナイアシメントだけで、両菌の混在の推定可能な場合も、ごく一部分にすぎ

ないであろう。

このように集落の性状やナイアシメントだけで結核菌と非定型抗酸菌の混在が推定できるものは、ごく一部分であるから、我々は臨床所見や検査室の検査所見を総合して考察し、少しでも混在の疑いがあれば、分離を試みるようにしたいものである。

次に分離の方法としては、まず結核菌が沢山混入していることが推定できれば、実験で示したように、菌浮遊液を作つて、これを何段階かに希釈して接種し、37°Cに培養し、菌が個々に分離発育する状態にしておいて、つかめばよい。大部分が非定型抗酸菌であつて、結核菌が少なく混在している場合は、結核菌に弱く、非定型抗酸菌に強い前処理液²⁾を用いて、非定型抗酸菌を殺して、その中から結核菌を分離すればよい。我々は4% NaOH液、4% H₂SO₄液を用いたが、非着色性の非定型抗酸菌なら、前処理による障害の程度は同じである³⁾から、処理液はどちらでもよいと思われる。着色性非定型抗酸菌の混在では、4% NaOH液の障害が4% H₂SO₄液に比して強いから、4% NaOH液を用いて結核菌を分離した方がよい。

次に非定型抗酸菌の分離には、前述のように、何段階かの蒸留水希釈菌浮遊液を接種、22°Cで培養し、22°Cで個々に発育した集落をとれば、それは非定型抗酸菌としてよい。結核菌分離の目的で、4% NaOH液、4% H₂SO₄液で前処理を行なつた時に、非定型抗酸菌も分離できることは我々の実験の示すところであるが、非定型抗酸菌分離の目的には、必要なさうに思われる。なお分離された非定型抗酸菌が鳥型結核菌の疑いがあれば、更に鳥型結核菌⁴⁾の同定実験を行なうことは当然である。

以上は結核菌の集落がR型で、非定型抗酸菌の集落がS型である時の菌の集落を土台とした分離の方法である。しかし結核菌の集落と非定型抗酸菌の集落が、同じような性状であると推定される場合は、何段階かの希釈菌浮遊液を37°Cで培養し、個々に発育した集落を1%小川培地に継代して、ナイアシメントを行ない、陽性のもは結核菌、陰性のもは非定型抗酸菌と推定するか、あるいは37°Cと22°Cに培養し、37°Cのみに発育するものを結核菌、22°Cに発育するものを非定型抗酸菌としてもよいであろう。

このような方法で分離した結核菌と推定される菌、および非定型抗酸菌と推定される菌は37°C⁵⁾と22°Cに培養して、菌の発育、性状を検査し、更に発育した菌については、ナイアシメントを実施して、推定通りの菌であるかどうかを吟味する必要がある。

以上の方法は学問的にはずさんであるが、日常検査として行なうことは許されてもよいと思われる。

5. 総 括

結核菌と非定型抗酸菌を種々の割合に混入して、その際に見られる菌の性状や、ナイアシントテストより、両菌の混在を推定する方法を考案するとともに、菌分離の方法を検討した結果、次のような成績を得た。

① 混在を推定する方法：菌の集落の性状や、ナイアシントテスト等によつて、ある程度推定できることもあるが、これはごく一部のように思われる。

② 分離の方法：集落を個々に発育させることを目的として菌浮遊液を作り、数段階に希釈して1%小川培地に接種して、37°Cと22°Cに培養する。同時に4% NaOH液、4% H₂SO₄液で処理して、それぞれ3%小川培地、3% Na₂HPO₄培地に接種し37°Cに培養する。この方法により37°Cに発育するR型の菌を結核菌と推定し、

22°C、37°Cに発育するS型の菌を非定型抗酸菌と推定する。

③ 以上の方法で分離した菌を、更に1%小川培地に接種し、37°Cと22°Cに培養し、ナイアシントテストを行なう。ナイアシントテスト陽性で、37°Cのみに発育する菌株なら結核菌、陰性で22°Cにも発育する菌株は非定型抗酸菌としてよい。

文 献

- 1) 小川辰次・飯塚素子：結核，43：17，昭43.
- 2) 小川辰次・大谷典子：Kitasato Arch. of Exp. Med., 36：37，昭38.
- 3) 小川辰次・西村セツ子：未発表.
- 4) 堀三津夫：結核，43：437，昭43.
- 5) 室橋豊穂：日本医師会雑誌，60：87，昭43.
- 6) 厚生省監修：衛生検査指針（結核菌検査指針），日本公衆衛生協会発行，昭39.