

## 原 著

## 自然界抗酸菌に関する研究

## 1. 土壌抗酸菌の分離同定方法について

金 聖 光

韓国延世大学校医科大学微生物学教室  
 広島大学外国人研究生(医学部細菌学教室)

受付 昭和 53 年 2 月 1 日

STUDIES ON THE ACID-FAST BACILLI ISOLATED  
 FROM NATURAL SOURCE

## 1. Isolation and Identification Method of Acid-Fast Bacilli from Soil

Sung-Kwang KIM\*

(Received for publication February 1, 1978)

Acid-fast organisms were isolated from 240 soil samples collected at two areas in Japan and Korea. The biological and biochemical characteristics of the isolated mycobacteria were tested and compared with those of reference strains. The isolation rate and distribution of species of mycobacteria from soil were compared on three kinds of media with special reference to two different methods of isolation as well as different geographical areas.

The results are summarized as follows:

1. Acid-fast bacilli were isolated most frequently on the 1% Ogawa medium with pretreatment of soil samples by the Söhngen's method.

2. No demonstrable difference was observed on the isolation rate between the soil from Hiroshima area and Seoul area.

3. As for Runyon's grouping, 82.6% of the isolates from Hiroshima and 75.4% from Seoul were rapid growers. Scotochromogens were isolated 9.6% and 12.3%, and nonphotochromogens 4.5% and 8.2%, respectively. No photochromogens were isolated.

4. Three hundred and thirty-six strains were collected from the 240 soil samples. Neither tubercle bacilli nor *M. avium-intracellulare* complex were identified. The majority was *M. fortuitum* regardless of the area. The slow growers, especially *M. scrofulaceum*, were identified much more in Seoul than in Hiroshima, but the strain *M. chelonae* subsp. *chelonae* which was obtained in Hiroshima was not observed in Seoul.

## I. はじめに

1935年, Pinner<sup>1)</sup> は結核症とは臨床症状を異にするヒ

トの病巣から, 結核菌やらい菌とは異なる抗酸菌を証明し, これを atypical acid-fast microorganisms として, 既知の病原性抗酸菌以外にもヒトに対して病原性を示す

\* From the Department of Microbiology, Yon-sei University, College of Medicine, Seoul, 120, Korea.  
 Foreign Researcher of Hiroshima University (Dept. of Bacteriology, School of Medicine).

ものあることを示唆し、その後占部<sup>2)</sup>も雑菌的存在として看過されてきた抗酸菌群の中には、ヒトに対してもある程度病原性を発揮しうようになるものも存在するとして注目を喚起した。しかしこれらの報告に関しては必ずしも一般の関心をひくにいたらなかつた。

非定型抗酸菌の起病性について注目されるようになったのは1950年代の半ばに至つてからで、Pollak と Buhler (1951)<sup>3)</sup>、Buhler と Pollak (1953)<sup>4)</sup>、Timpe と Runyon (1954)<sup>5)</sup>、そして占部 (1956)<sup>6)</sup>のいわゆる非定型抗酸菌によるヒトの肺疾患の報告が行なわれて以後のことである。

しかしながら、非定型抗酸菌の起源および由来に関してはいまだ定説が明らかでなく、その感染、発症機構の解明が望まれている。

著者は自然界に広く存在している抗酸菌とヒトの非定型抗酸菌症との関係についての研究の一環として、まず自然界からの抗酸菌の分離方法と使用培地の検討を行ない、かつ分離された抗酸菌の同定を試みたので、その成績を報告する。

## II. 実験材料および方法

### A. 実験材料

1. 土壌：広島大学本部、同医学部および附属病院構内120個所の土壌と韓国ソウルの延世大学構内、医科大学およびセブランス病院構内120個所の土壌、総計240例。

2. 標準菌株：対照菌株として広島大学医学部細菌学教室で保存継代されているヒト型結核菌ほか35株を標準菌株とした。これらの菌株を1%小川培地に移植し、旺盛に増殖している時期の菌塊またはそれよりの菌浮遊液を用いた。

3. 培地および試薬：試料よりの抗酸菌の濃縮には Söhngen 培地 (Söhngen, 1913)<sup>7)</sup> と trypticase soy broth を、またそれよりの分離には1%および3%小川培地、Löwenstein-Jensen 培地 (以下 L-J) および American Trudeau Society 培地 (以下 ATS) を使用し、分離菌株の同定のための生化学的性状試験の基本培地としては Dubos 液体培地または Sauton 培地を使用した。試薬はすべて特級純粋試薬を用いた。

### B. 実験方法

1. 抗酸菌の分離：Fig. 1 および 2 に示すようにティースプーン1ばいずつの土壌試料を Söhngen 法 (1913)<sup>7)</sup> および Wolinsky 法 (1968)<sup>8)</sup> に従つて処理したのち分離培地に移植した。

2. Runyon 群別：上記各分離培地について試料移植後1週から8週まで毎週観察して集落の初発日数と集落性状を記録し、集落が形成された場合は、その集落の一部を取つて抗酸性染色を施して抗酸桿菌 (以下 AFB) を

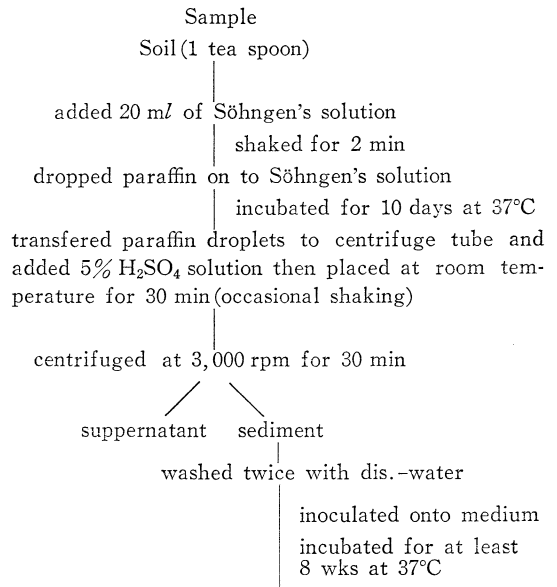


Fig. 1. Isolation method by Söhngen (1913).

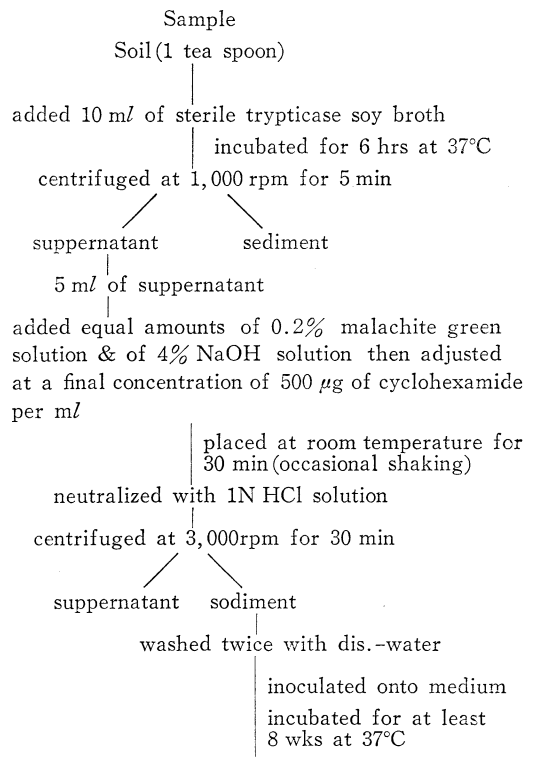


Fig. 2. Isolation method by Wolinsky (1968).

確認した後、これを2%のNaOH溶液で処理した菌浮遊液0.1mlずつを、分離時に使用した各培地12本に接種した。このうち2本は光線を遮断したまま37°Cの恒温室で培養し、残り10本は2本ずつ28, 33, 37, 45および52°Cで6週間培養した。接種後1週間は毎日、2週目からは1週間間隔で、集落形成の有無と形成された集落の

形態および着色の有無を観察し、Runyon 群別(1959)<sup>9)</sup>によつてこれを分類した。

3. 生化学的性状試験：純培養菌について niacin 産生試験(Konno ら, 1958<sup>10)</sup>; Runyon ら, 1959<sup>11)</sup>), arylsulfatase 試験(Kubica と Beam, 1961<sup>12)</sup>; Tarshis, 1963<sup>13)</sup>), Tween 80 hydrolase 試験(Wayne ら, 1964<sup>14)</sup>), acid-phosphatase 試験(Saito ら, 1968<sup>15)</sup>; Tsukamura ら, 1974<sup>16)</sup>), catalase 活性試験(Kubica ら, 1966<sup>17)</sup>), nitrate 還元試験(Virtanen, 1960<sup>18)</sup>; Tsukamura, 1967<sup>19)</sup>, 1969<sup>20)</sup>), neutral red 試験(Dubos と Middlebrook, 1948<sup>21)</sup>; 前田, 1965<sup>22)</sup>)のほか炭水化合物ならびに有機酸利用能, amidase 試験および薬剤感受性試験を実施し標準菌株の性状(Saito, 1975<sup>23)</sup>; Tsukamura, 1975<sup>24)</sup>)と対比観察して分類, 同定の指標とした。

III. 実験成績

A. 抗酸菌分離培養成績

広島およびソウルの土壌試料それぞれ120例からの分離方法別および分離培地別の抗酸菌分離成績は Table 1 のようである。

供試した4種の分離培地のうち、特に1%小川培地における培養陽性率が高く、ソウル地域の土壌からは Wolinsky 法では120例中70例(58.3%)の高率であつた。地域別にみると、広島およびソウル両地域間に全般的には分離率に特にいうほどの差は見出せなかつたが、広島地域からは速発育菌の、またソウル地域からは遅発

育菌の分離率がやや高い傾向を示した。

試料の処理方法別では両地域ともに Söhnngen 法の方がやや勝つていたが、3週以後になつてようやく集落の初発をみた例は Söhnngen 法では皆無であつたのに対して、Wolinsky 法では4週以後にも集落初発例がみられた。また、Söhnngen 法では抗酸菌以外の夾雑微生物の一部がその処理に耐えて残存し、培地を汚染して3週以後の観察不能となつた例が Wolinsky 法に比べてより多かつた。

B. 培養抗酸菌の Runyon 群別成績

Söhnngen 法により分離され、純培養が可能であつた抗酸菌株について試みた Runyon 群別の成績は Table 2 のようである。

広島地域で分離された抗酸菌総計178株中IV群が147株(82.6%), II群が17株(9.6%)そしてIII群が8株(4.5%)であつた。ソウル地域のものでは、総計171株中IV群が129株(75.4%), II群が21株(12.3%), そしてIII群が14株(8.2%)で、両地域ともにI群の光発色菌は1株も分離されなかつた。

なお分離された抗酸菌中1%小川培地の7株、L-J培地の2株、ATS培地の4株がそれぞれ継代培養では発育しえなかつた。

C. 培養温度別発育性状の観察成績

各培地別分離培養抗酸菌株の発育温度域は Table 3 のようである。

広島地域の遅発育抗酸菌株の25株とソウル地域の35株

Table 1. Isolation of Acid-fast Bacilli from 120 Soil Samples Each from Hiroshima and Seoul

Methods		Söhnngen				Wolinsky			
Weeks	Media Area	Ogawa		L-J	ATS	Ogawa		L-J	ATS
		1%	3%			1%	3%		
		~1	Hi* Se	45** 37	40 29	33 26	31 21	44 39	33 27
1~2	Hi Se	9 14	7 9	8 13	2 8	7 11	6 4	6 2	20 6
2~3	Hi Se	2 4	1 2	0 4	0 4	0 9	1 3	1 1	1 1
3~4	Hi Se	0 0	0 0	0 0	0 0	2 10	1 4	0 0	0 1
4~	Hi Se	0 0	0 0	0 0	0 0	0 1	0 2	0 1	1 1
Total (%)	Hi	56 (46.7)	48 (40.0)	41 (34.2)	33 (27.5)	53 (44.2)	41 (34.2)	36 (30.0)	39 (32.5)
	Se	55 (45.8)	40 (33.3)	43 (42.9)	33 (27.5)	70 (58.3)	40 (33.3)	18 (15.0)	33 (27.5)

\* Hi : Hiroshima in Japan, Se : Seoul in Korea

\*\* : Number of positive culture

Table 2. Runyon's Grouping with the Acid-fast Bacilli Subcultured

Runyon's group	Media	No. of strains	Hiroshima					Seoul				
			Ogawa		L-J	ATS	Total (%)	Ogawa		L-J	ATS	Total (%)
			1%	3%				1%	3%			
			56 (100)	48 (100)	41 (100)	33 (100)	178 (100)	55 (100)	40 (100)	43 (100)	33 (100)	171 (100)
Group-I Photochromogen			0 —	0 —	0 —	0 —	0 —	0 —	0 —	0 —	0 —	0 —
Group-II Scotochromogen			5 (9.6)	5 (10.4)	5 (12.2)	2 (6.1)	17 (9.6)	7 (12.7)	5 (12.5)	2 (4.7)	7 (21.2)	21 (12.3)
Group-III Nonphotochromogen			4 (7.1)	3 (6.3)	1 (2.4)	0 (0.0)	8 (4.5)	5 (9.1)	4 (10.0)	4 (9.3)	1 (3.0)	14 (8.2)
Group-IV Rapid-grower			44 (78.5)	40 (83.3)	33 (80.5)	30 (90.9)	147 (82.6)	39 (70.9)	31 (77.5)	37 (86.0)	22 (66.7)	129 (75.4)
No growth in subculture			3 (5.4)	0 (0.0)	2 (4.9)	1 (3.0)	6 (3.3)	4 (7.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (9.1)	7 (4.1)

Table 3. Growth Pattern of Subcultured Acid-fast Bacilli at Different Temperatures

Media	No. of subcultured strain		Temperatures (°C)										
			28		33		37		45		52		
	Hi	Se	Hi	Se	Hi	Se	Hi	Se	Hi	Se	Hi	Se	
1% Ogawa	Sl:	9	12	7	10	9	12	9	12	0	0	0	0
	Ra:	44	39	44	39	44	39	44	39	17	10	3	2
3% Ogawa	Sl:	8	9	7	9	8	9	8	9	0	0	0	0
	Ra:	40	31	40	31	40	31	40	31	19	6	5	2
L-J	Sl:	6	6	5	4	6	6	6	6	0	0	0	0
	Ra:	33	37	33	37	33	37	33	37	17	8	4	3
ATS	Sl:	2	8	2	7	2	8	2	8	0	0	0	0
	Ra:	30	22	30	22	30	22	30	22	15	6	3	1
Total	Sl:	25	35	21	30	25	35	25	35	0	0	0	0
	Ra:	147	129	147	129	147	129	147	129	68	30	15	8

Sl: Slow grower of AFB., Ra: Rapid grower of AFB., Hi: Hiroshima in Japan, Se: Seoul in Korea

はともて45°C以上では1株も発育しなかつたが、速発育抗酸菌株の場合は、前者147株中45°Cで68株、52°Cで15株が発育し、後者129株中45°Cで30株、52°Cで8株がそれぞれ発育可能であつた。

#### D. 培養抗酸菌株の同定成績

各種試験成績を標準菌株のそれと比較観察して得られた同定成績は Table 4 に一括してまとめた。

総計336株中には結核菌および *M. intracellulare* は1株も存在しなかつた。広島とソウルの両地域を通じて最も多く分離された菌株は、*M. fortuitum* でほぼ40%を占め、*M. scrofulaceum* がこれに次いだ。地域別にみると、ソウルでは *M. scrofulaceum*、*M. nonchromogenicum* および *M. aurum* がより多く分離されたのに対して広島では *M. thermoresistibile*、*M. smegmatis* および *M. phlei* の分離率がソウルのそれより高く、また *M. chelonae* subsp. *chelonae* はソウルでは全く検出されなかつたことなど、地域的に若干の差異がみられた。

#### IV. 考 察

自然界からの抗酸菌の分離培養については今日まで多くの研究者たちにより多様の報告<sup>(7)(8)(25)~(38)</sup>が行なわれてきた。著者は広島およびソウル両地域の土壌内非定型抗酸菌の分布状況を比較する目的で土壌の前処理には Söhngen 法と Wolinsky 法とを用い、4種の抗酸菌分離培地における分離率と分離された菌の生物学的生化学的性状を検討した。抗酸菌の分離率は一般に1%小川培地上でのそれが最も高く、広島地域の土壌からは44.2~46.7%に、またソウル地域のそれからは45.8~58.3%に分離され、次いで3%小川培地、L-J培地、ATS培地の順であつた。

試料の処理方法を比較すると、分離率では Söhngen 法が Wolinsky 法にやや勝つていたが、前者では操作過程における腐敗菌の除去が5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> によるためか十分でないことが観察され、遅発育抗酸菌分離のためには

Table 4. Identification of Acid-fast Bacilli According to the Physiological and Biochemical Properties

Species	Area		Hiroshima				Seoul			
	Media		L-J	ATS	Total (%)	Ogawa		L-J	ATS	Total (%)
	1%	3%				1%	3%			
<i>M. tuberculosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. bovis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. scrofulaceum</i>	3	3	3	2	11 (6.4)	6	5	2	5	19 (11.6)
<i>M. gordonae</i>	2	2	2	0	6 (3.5)	1	0	0	1	2 (1.2)
<i>M. intracellulare</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	1 (0.6)	0	1	1	0	2 (1.2)
<i>M. nonchromogenicum</i>	3	3	1	0	7 (4.1)	5	3	3	1	12 (7.3)
<i>M. fortuitum</i>	19	16	14	10	59 (34.3)	20	18	19	11	68 (41.5)
<i>M. fortuitum</i> ( <i>thermophilum</i> )	4	2	2	2	10 (5.8)	4	2	2	2	10 (6.1)
<i>M. smegmatis</i>	3	5	2	3	13 (7.6)	2	0	1	1	4 (2.4)
<i>M. aurum</i>	1	1	1	1	4 (2.3)	3	2	3	2	10 (6.1)
<i>M. agri</i>	3	3	2	2	10 (5.8)	2	2	2	2	8 (4.9)
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	2	1	0	0	3 (1.7)	0	0	0	0	0
<i>M. thermoresistibile</i>	4	4	5	5	18 (10.5)	1	1	2	1	5 (3.0)
<i>M. phlei</i>	3	5	2	3	13 (7.6)	1	1	1	0	3 (1.8)
Unidentifiable strain	5	3	5	4	17 (9.8)	6	5	7	3	21 (12.8)
Total	53	48	39	32	172 (100.0)	51	40	43	30	164 (100.0)

むしろ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水にかえて NaOH 水を用いればより効果的ではないかと考えられた。他方 Wolinsky 法は cyclohexamide と NaOH との併用により一般細菌の殺菌がより効果的に行なわれるため培地の汚染は少ない反面、NaOH 水が 4% という比較的高濃度で用いられるため、結核菌に比べると NaOH 感受性の比較的高い自然界抗酸菌にも障害が及び、分離率がより低い結果となつたのではないかと思われる。

分離された抗酸菌のうち13株が継代培養不可能であつた。土壤内に存在する抗酸菌中に人工培地上に継代培養が不可能な抗酸菌、すなわち fastidious なものが存在しているかどうかは現時点では明らかでないが、この点について継続して研究したいと考える。

Söhngen 法により分離され継代可能であつた抗酸菌株の発育速度および光感受性検査による Runyon 群別の結果、Table 2 に示したように、両地域ともに IV 群菌が大多数を占めていた。Kubica ら (1961<sup>28</sup>), 1963<sup>30</sup>) および Jefferies ら (1963)<sup>39</sup> は自然界からは II 群菌と III 群菌

との分離率が高く、IV 群菌はその中間程度にすぎないと述べており、また Gerszten (1963)<sup>40</sup> は人体における非定型抗酸菌の分離率は I 群菌が 4%、II 群菌が 79%、III 群菌が 35%、IV 群菌が 4% と報告し、IV 群菌の分離率はいずれの場合も著者の今回の成績のように高くはない。このことは土壤という試料が同じであつても地域別の差異があり、また人体と土壤とは抗酸菌の分布が異なるためであろう。

なお遅発育抗酸菌株については、広島分離の 25 株中 4 株、ソウル分離の 35 株中 5 株が 28°C では発育できない低温感受性菌であつた。

一方各種試験に基づいた成績を Saito (1975)<sup>23</sup>) および Tsukamura (1975)<sup>24</sup>) の抗酸菌標準菌株の各種酵素活性成績と比較した結果広島地域の IV 群菌 147 株中 17 株とソウル地域の IV 群菌 129 株中 21 株は必ずしも標準株の成績とは一致しなかつたので、一応 unidentifiable 株とした。

両地域の分離菌種にはやや差が認められ、ソウル地域

からは広島地域に比べて遅発育菌,特に *M. scrofulaceum* の分離率が高かった。

現在非定型抗酸菌のうち *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* (subsp. *chelonae* および subsp. *abscessus*) はその起病性が明らかにされており, それ以外にもまれに感染する可能性があると考えられるものに *M. simiae*, *M. shimoidaei* がある。更に *M. gordonae*, *M. triviale* および *M. nonchromogenicum* は「非病原性」非定型抗酸菌とされ, まれに人体に感染したという報告 (Tsukamura, 1977<sup>38)</sup>) もある。

非定型抗酸菌の由来に関してはいまだ定説は得られていない。古く Runyon (1959)<sup>9)</sup> は病原性非定型抗酸菌の出現に関して自然界で非病原性抗酸菌と病原性抗酸菌とが混在することによつて新しい変異型抗酸菌が発生し, 臨床症状をひき起こすのであろうと推定し, このようにしてできた菌種が偶然な機会に人体と共生ないし寄生し, 人体に対する病原性抗酸菌へと変異発展してきたのではないかと述べた。

Tarshis (1958)<sup>41)</sup> や Xalabardar (1961)<sup>42)</sup> も病原性抗酸菌の一部が抗結核剤の使用や免疫作用等によつて非定型抗酸菌に変異すると考えた。

Mallmann ら (1962)<sup>43)</sup> はウシやブタ等における非定型抗酸菌の感染を報告しており, この分離菌は土壤に分布している Battey 型と類似の性状を示すのでそれが水や牛乳を媒体として伝播されるのであろうと推定した。また Kubica ら (1963)<sup>40)</sup> は農村の方が都市よりは非定型抗酸菌の感染率が高いこと, 非定型抗酸菌症が地理的に散発的であつて, ヒトからヒトへの感染がまだ知られていないこと, およびこれら原因菌の生物学的ならびに生化学的性状が土壤から分離された抗酸菌と類似している点が多いこと, などから非定型抗酸菌の土壤由来を強く示唆した。その後 Wolinsky と Ryneason (1968)<sup>8)</sup> は土壤が非定型抗酸菌の由来となる可能性が多いとしているし, Tsukamura (1977)<sup>38)</sup> は非定型抗酸菌が自然環境に散在的に存在しており, 宿主側の条件と抗酸菌の地理的分布および菌力と関連した一種の「Opportunistic infection」が非定型抗酸菌症であろうと述べている。

著者の今回の検討によると結核菌および *M. avium-intracellulare* complex は広島, ソウル両地域のいずれの土壤からも分離されなかつたが *M. fortuitum* が高率に検出されたばかりでなく, 特にソウル地域からは *M. scrofulaceum* がかなりの頻度で分離された。

これらの起病性が明らかでない菌種の感染経路とその発症要因との究明は非定型抗酸菌症の今後に残された重要な課題であろう。

## V. 結 論

自然界抗酸菌に関する基礎的研究の一端として, 広島およびソウル両地域の土壤試料計 240 例について, それよりの抗酸菌の分離方法と分離率を検討し, 更に分離された抗酸菌株の生物学的生化学的性状を観察してその同定を行ない, 地域的分布の比較を試みた。

1. 試料の前処理に Söhngen 法を用い, 1% 小川培地上で分離した場合の分離率が最も優れていた。

2. 両地域からの分離率にはほとんど差がみられなかつた。

3. Runyon 群別に従うと, IV群菌は広島地域では 82.6%, ソウル地域では 75.4% と最も多く, II群菌はそれぞれ 9.6% と 12.3%, III群菌は 4.5% と 8.2% であつたが, I群菌は 1 株も存在しなかつた。

4. 総計 336 株中結核菌および *M. avium-intracellulare* complex は 1 株もなかつた。両地域ともに最も多く分離された菌種は *M. fortuitum* であつた。またソウル地域では遅発育菌ことに *M. scrofulaceum* の分離率が比較的高かつたが, 広島地域で検出された *M. chelonae* subsp. *chelonae* は分離されなかつた。

## 謝 辞

本研究に対し終始懇篤なご指導とご校閲の労を賜つた松尾吉恭教授に対し, 心からお礼申し上げます。また菌の分離法, 同定観察をご指導下さつた細菌学教室の田坂博信助教授, 清谷克寛助手ならびに教室員皆様に深甚なる謝意を表します。本研究の機会を与えられた延世大学校医科大学長柳駿博士に鳴謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Pinner, M.: Amer. Rev. Tuberc., 32: 424, 1935.
- 2) 占部薫: 日新医学, 33: 68, 1944.
- 3) Pollak, A. and Buhler, V.B.: Amer. J. Path., 27: 753, 1951.
- 4) Buhler, V.B. and Pollak, A.: Amer. J. Clin. Path., 23: 363, 1953.
- 5) Timpe, A. and Runyon, E.H.: J. Lab. Clin. Med., 44: 202, 1954.
- 6) 占部薫: 日本細菌学雑誌, 11: 178, 1956.
- 7) Söhngen, N.L.: Zbl. f. Bakt. Abt. II, 37: 595, 1913.
- 8) Wolinsky, E. and Ryneason, T.K.: Amer. Rev. Resp. Dis., 83: 1, 1968.
- 9) Runyon, E.H.: Med. Clin. N. Amer., 43: 273, 1959.
- 10) Konno, K., Kurzonann, R., Bird, K.T. and Sabarra, A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 77: 669, 1958.
- 11) Runyon, E.H., Selin, M.J. and Harris, H.W.: Amer. Rev. Resp. Dis., 79: 663, 1959.
- 12) Kubica, G.P. and Beam, R.E.: Amer. Rev. Resp.

- Dis., 83 : 733, 1961.
- 13) Tarshis, M.S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 88 : 847, 1963.
  - 14) Wayne, L.G., Doubek, J.R. and Russell, R.L.: Amer. Rev. Resp. Dis., 90 : 588, 1964.
  - 15) Saito, H., Hosokawa, H. and Tasaka, H.: Amer. Rev. Resp. Dis., 97 : 474, 1968.
  - 16) Tsukamura, M., Mizuno, S., Murata, H. and Osima, T.: Iryo (Tokyo), 28 : 275, 1974.
  - 17) Kubica, G.P., Jones, W.D., Jr., Abbott, V.D., Beam, R.E., Kilburn, J.O. and Cater, J.C., Jr.: Amer. Rev. Resp. Dis., 94 : 400, 1966.
  - 18) Virtanen, S.: Acta Tubercul. Scand. (Suppl.), 48 : 1, 1960.
  - 19) Tsukamura, M.: Tubercle (London), 48 : 31, 1967.
  - 20) Tsukamura, M.: Tubercle (London), 50 : 51, 1969.
  - 21) Dubos, R.J. and Middlebrook, G.: Amer. Rev. Tubercul., 58 : 698, 1945.
  - 22) 前田文彦: 九大胸研紀要, 10 : 61, 1965.
  - 23) Saito, H.: Kekkaku, 50 : 401, 1975.
  - 24) Tsukamura, M.: Research Lab. National Sanatorium Chubu Chest Hospital, Obu, Aichiken, Japan 474, June, 1975.
  - 25) 占部薫: 満州医学雑誌, 22 : 1125, 1935.
  - 26) 草場幹人: レプラ, 9 : 625, 1938.
  - 27) 神本元一郎: 広島医学, 8 : 3041, 1950.
  - 28) Kubica, G.P., Beam, R.E., Palmer, J.W. and Rigdon, A.L.: Amer. Rev. Resp. Dis., 84 : 135, 1961.
  - 29) 斉藤肇: 胸部疾患, 6 : 898, 1962.
  - 30) Kubica, G.P., Beam, R.E. and Palmer, J.W.: Amer. Rev. Resp. Dis., 88 : 718, 1963.
  - 31) Sang-Joon, Lee: Tuberc. Resp. Dis. (KOREA), 23 : 37, 1966.
  - 32) Tsukamura, M.: Japan. J. Microbiol., 11 : 163, 1967.
  - 33) Reznikov, M., Leggo, J.H. and Dawson, D.J.: Amer. Rev. Resp. Dis., 104 : 951, 1971.
  - 34) Kleeberg, H.H. and Nel, E.E.: Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 53 : 405, 1973.
  - 35) Tsukamura, M., Mizuno, S., Murata, H., Nemoto, H. and Yugi, H.: Japan. J. Microbiol., 18 : 271, 1974.
  - 36) Kim, S.K., Choi, T.K. and Lew, J.: New Med. J. (Korea), 18 : 1049, 1975.
  - 37) Goslee, S. and Wolinsky, E.: Amer. Rev. Resp. Dis., 113 : 287, 1976.
  - 38) 東村道雄: 結核, 52 : 261, 1977.
  - 39) Jefferies, M., Prather, E.C., Hardy, A.V. and Wharton, D.J.: Amer. Rev. Resp. Dis., 88 : 129, 1963.
  - 40) Gerszten, E., Allison, M.J. and Brunner, D.L.: Amer. Rev. Resp. Dis., 88 : 128, 1963.
  - 41) Tarshis, M.S.: Transaction of 17th VA-Armed Forces Conference on the Chemotherapy, p.298, 1958.
  - 42) Xalabarder, C.: Amer. Rev. Resp. Dis., 83 : 1, 1961.
  - 43) Mallmann, W. L.: Proceeding U. S. Livestock Sanitary Association 65th Annual Meeting, p. 180, 1962.