

鳥型結核菌に関する研究

第1報 増殖期における速かな代謝不活性状態への移行について

金沢大学医学部微生物学教室(主任：谷 友次教授)

河 上 清

(昭和32年8月12日受附)

(本論文の要旨は第27回日本細菌学会総会においてこれを報告した.)

Studies of Mycobacterium Tuberculosis Avium

Report 1. Its Rapid Conversion to Metabolically Inactive State During Growth Period

KIYOSHI KAWAKAMI

Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director : Prof. Dr. Tomoji Tani)

緒 言

先に西田は *C. diphtheriae* を用いてジフテリア菌を生化学的に取扱う際における諸種の注意について記載した。^{1), 2), 3), 4)} 彼によれば従来この菌についての低い呼吸値は培養に際して収穫すべき時期が適当でない所に原因するものとされた。菌収穫の時期に関しては一般に **negative acceleration phase** が最も活性が強いと思われているが⁵⁾ このことはジフテリア菌の静置培養に際して全くあてはまらないように見える。結核菌についても極めて低い呼吸値が示されつつある現況であるが、結核菌とジフテリア菌は互に生物学的性状が似た種属であるから著者は上述の見地から

結核菌の低呼吸値の問題について検討を試みた。即ち従来用いられている結核菌についての基質呼吸値が内部呼吸値とあまり差をみないのは結核菌そのものに外界の基質(栄養物)に対して不反応な状態を形成する性質があることに原因するものではなからうかと著者は考えた。又一方 J. B. Gunnison 等⁶⁾ は近來治療の面から代謝不活性状態の結核菌について述べている。培養時期と酵素活性については既に断片的には諸種の人によつて^{7), 8), 9), 10), 11)} 述べられて来たが著者は本報で系統的に収穫時期と酵素活性の変動について検討を試みた。

実験材料並びに実験方法

使用菌株：鳥型結核菌 A₂₂ で2~3代 sauton 培地で継種した発育の良いものを用いた。

使用培地：Sauton 培地(窒素源として l-asparagine を使用した原法通りのものと Sod. glutamate を使用したものの2種を作製)並びに5% glycerinbouillon を用いた。

菌液：200ml 容量のフラスコに培養液 25ml を入れて 37°C で培養した。培養各時期に収穫された菌は濾紙にて濾過し水洗2回行き充分水をきった後乳鉢で約5分間磨砕し生理的食塩水を加え室温30分間静置して沈澱菌を除き肉眼的に均等な上液を採り光電光度計(Hitachi type-120s)で 2.5mgN/ml の菌液を作製し

実験を行つたが、最終的には各菌浮游液の乾燥重量値(60°C に24時間放置乾燥後重量測定)を求め mgN あたりの最低重量値のものを基準として得られた mgN あたりの呼吸値を乾燥重量比で修正した。従つて得られた呼吸値は厳密な意味では比較呼吸値であつて正確な mgN あたりの呼吸値ではない。

酸化酵素系の測定方法：Warburg's manometer を用い基質としてはこの菌の構成酵素の基質となるものを選んだ。即ち glycerin, Succinate, acetate, formate, lactate, glutamate, glucose, を用いた。主室には 2.5mgN/ml の菌液(又は酵素液) 0.4ml, M/10 基質液 1.0ml, M/5 磷酸緩衝液(pH 7.2) 0.5ml 加え

たものに蒸留水を加えて 2.3ml とし中央室には 20% KOH 0.2ml を入れた。振盪水浴 (恒温槽) の温度は 37.5°C, 振盪回数は90回/分, 振幅 5cm とし測定前15分間水浴中で振盪し検圧計内外の温度平衡を待つて測定を開始した。測定値はすべて1時間の観察によつて得られた。基質として脂肪酸が用いられた時には脂肪酸を正確に秤量し中和して該脂肪酸の石鹼を作り M/20 液を作つた。Tween 80, propionic acid, butyric acid 以外は水に難溶性であるから Potter-Elvehjem homogenizer で emulsion とした飽和液を用いた。

脱水素酵素の測定方法 : Thunberg 管を用いて H₂ 受容体として常法の如く M/5000 methyleneblue を使用したが培養各時間の菌に活性の差が見られなかつたので大林等¹³⁾に従つて M 500 2,6-dichlorphenolindophenol を用いた。主室には 2.5mg N/ml 菌液 0.3ml, M/5 磷酸緩衝液 (pH 6.9) 0.7ml, 副室には M/5000 methyleneblue (又は M/500 2,6-dichlorphenolindophenol) 0.5ml, M/10 基質 (lactate) 0.5ml を入れて管内圧 20mmHg で実験を行つた。反応温度は 37.5°C であるが酸化酵素系同様水浴中で15分放置温度平衡を待つて副室の液を主室の液と混合反応させた。

カタラーゼ作用の測定方法 : Euler, Josephson の法¹³⁾により行つた。作用は次の式で表わされるが各培養日数のものを比較する時は K₀ の値を求めた。

$$K = \frac{1}{t \text{ (min)}} \log_{10} \frac{a}{a-x}$$

作用時間 …………… t
t=0 の時の滴定値… a
作用時間に対する
滴定値…………… a-x

即ち 0.07 M 磷酸緩衝液 (pH 6.8) 中 0.01N の H₂O₂ を含む基質溶液 50ml を 100ml 三角フラスコに取り細砕した氷中に深く挿入して 0°C に冷却しておく。別に M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.8) で稀釈した菌液 (0.2mgN/ml) を冷却 (0°C) しておきその 1.0 ml を基質溶液に加えてよく振盪した後なるべく速かに反応液 5.0ml を取り出して予め用意してある 2N H₂SO₄ 5.0ml の中に注加し 0.05 N KMnO₄ 溶液で微赤色迄滴定した。

エステラーゼ作用の測定方法 : Warburg's manometry (Rona & Lasnitzki 法)¹⁴⁾によつた。即ち主室に酵素液 (菌液) 0.2ml (2.5mgN/ml), リンゲル重曹液 1.8ml, 副室に M/10 tributyrin 0.5ml を入れ, ガス腔は N₂ と CO₂ を 95 : 5 の割に混じたもので満

たし 37°C の恒温槽に入れ温度が平衡に達した後両液を混和し発生する CO₂ 量 (cmm) を10分毎に計測し 1時間後の測定値を求めた。

乳酸々化酵素抽出液の製法 : 楠瀬の法¹⁵⁾に準じて行つた。即ち sauton, 5% glycerin bouillon 培地に 2日並びに 6日培養された菌を濾紙にて集菌し蒸留水にてよく洗いその 10倍量の氷冷アセトン (-15°C) 中に徐々に投入し同時に攪拌を行つた。投入後10分間静置し菌体をヌツツェで吸引濾別した。更に若干量の新しい冷アセトンを注いで急速に濾過し同様 3回繰返した。以後デシケータ中に入れ吸引ポンプで1時間吸引した後24時間放置乾燥しこの一定量即ち 0.4g をとり 8ml の蒸留水をよく磨砕しつつ加え 2日間 5°C の氷室中に自己融解させ 6000回/分40分遠心しその上清を乳酸々化酵素抽出酵素液として用いた。

補酵素の製法 : 乳酸々化酵素の抽出液中に補酵素の不足が予想される場合を考慮して酵母より補酵素を作つて用いた。即ち庄搾パン酵母を乾燥器(加熱送風)にて充分乾燥した後乳鉢にてよく磨砕しそれに10倍量の水を加えて 100°C 5分煮沸し 13000回/分 20分間遠心上清を用いた。

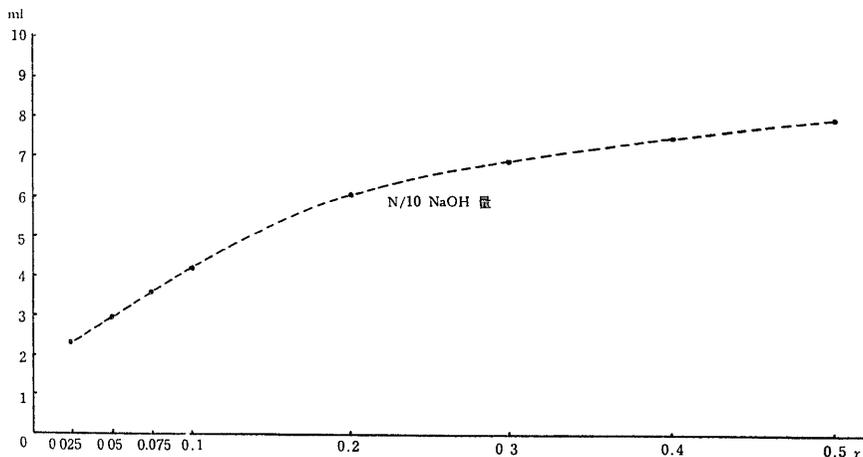
結核菌からの Riboflavin 抽出方法 : 菌を型の如く acetone powder とした後その 0.5g を少量の水にとかし乳鉢で磨砕 5分の後蒸留水を加えて 10ml とし 80°C で10分加熱して抽出後遠心上清につき次の方法で実験した。¹⁸⁾

ビタミン B₂ の測定法 : Lactobacillus casei を使用する Bioassay 法によつた。^{17), 18)} 使用菌株は武田薬品工業生物化学研究所大村氏の好意で入手したビタミン測定用の L. casei である。菌株の保存は 10% yeast water agar (glucose 1% 添加) に高層培養し stockculture としては 1週間毎に接種保存した。定量用基本培養基はすべて型の如く Riboflavin を除去した。その組成は I) ペプトン 0.5% II) 酵母水 0.5% III) 葡萄糖 1% IV) 無機塩類 0.1% V) シスチン 0.01% である。各個の調製法は江口の法¹⁸⁾によつた。標準 Riboflavin 溶液は純リボフラビン結晶 (和光純薬) を温めた N/50 醋酸液で正確に 100γ/ml の溶液とした。貯蔵はすべてトルオールを加え氷室に入れた。定量用基本培養基は pH 6.7 最初 2倍濃度のものを作製しその 5ml 宛をとつて Riboflavin 含有試料を加え, 更に蒸留水を加えて 10ml とし 15 lds 15分高圧滅菌した。接種菌の培養は予め前日 Riboflavin 1γ を含有させた上記基本培養基 10ml に L. casei を高

層培養から1白金耳接種し 37°C 24時間培養した。菌体を 3000回/分 15分遠沈し上清を捨て更に 0.9%滅菌食塩水 10ml を加えて菌浮遊液を作った。これの 0.05ml を上記基本培養基 (Riboflavin 含有試料入り) に接種し 37°C 72時間培養して産生乳酸量を測定した。標準曲線は上記基本培養基 10ml 中に Riboflavin 0.

0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 γ 含有させた試験管各を 3日間培養後フェノールフタレンを標示薬として N/10 NaOH をもって産生乳酸を滴定した。被検液並びに基準液の測定は共に 3本の試験管を用い平均値をとって値とした。標準曲線は江口と略々等しい値を示した。(第1図)

第 1 図 Riboflavin 標準曲線



実 験 成 績

I 酸化酵素系における酵素活性について

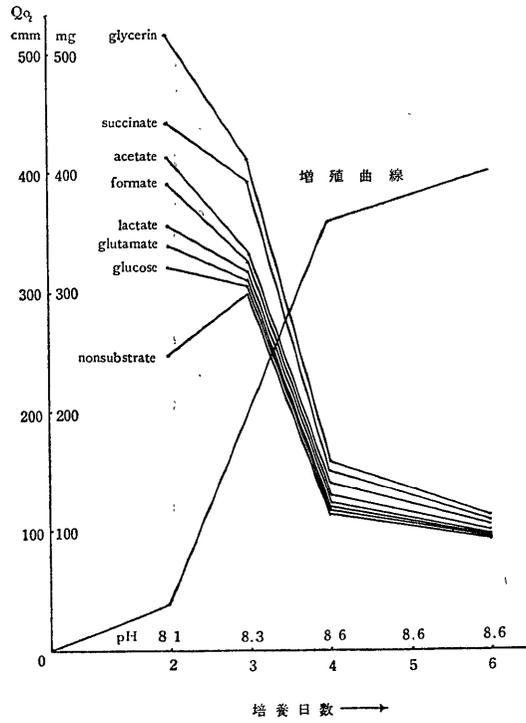
第2図はこの菌の Sauton 培地における増殖曲線とその増殖の各時期における一定菌量を取りこの菌の生物学的代謝に関係すると思われる諸種基質(即ち glycerin, succinate, acetate, formate, lactate, glutamate, glucose)を用いて酸化酵素値を調べた成績を示している。この成績からみて一定菌量の活性はその内部呼吸値を差引くと否とに係らず(結核菌のような大きな内部呼吸値を差引くことは適当ではないだろう)その増殖期に著しく下つて来る。即ち対数増殖期に著しく酵素活性が下降し増殖が極期に達する4日には活性が(特に基質呼吸が)殆んど認められない。一方 glycerinbouillon 培地では第3図に示す如く増殖曲線は前者と同様であるが、酵素活性の降下は(特に基質呼吸) sauton 培地における如く著しくはないがやはり対数増殖期に急激な下降がみられる。これらの対数増殖期における特異な酵素活性の下降をみるにこれらの現象は培地 pH の上昇によるものではないかと考え sauton 培地のN源として sod. glutamate をや

めて l-asparagine を使用して実験した所第4図の如き成績を得た。即ちこの特異な酵素活性の下降現象は pH に関係なく存在することが明らかになった。次に第5図は sauton 培地発育菌についてこの菌の他の重要なエネルギー源と考えられている脂肪酸に対する酸化の成績を示している。Tween 80, propionic acid, butyric acid, stearic acid, は活性が認められるが lauric acid, capric acid, caprylic acid, palmitic acid, は活性なく前4者も tween 80 を除いて基質呼吸は殆んど認められない状態である。以上の成績から脂肪酸の酸化は寧ろ抑制的で sauton 培地上に生える菌のエネルギー源とは考え難い成績を示した。

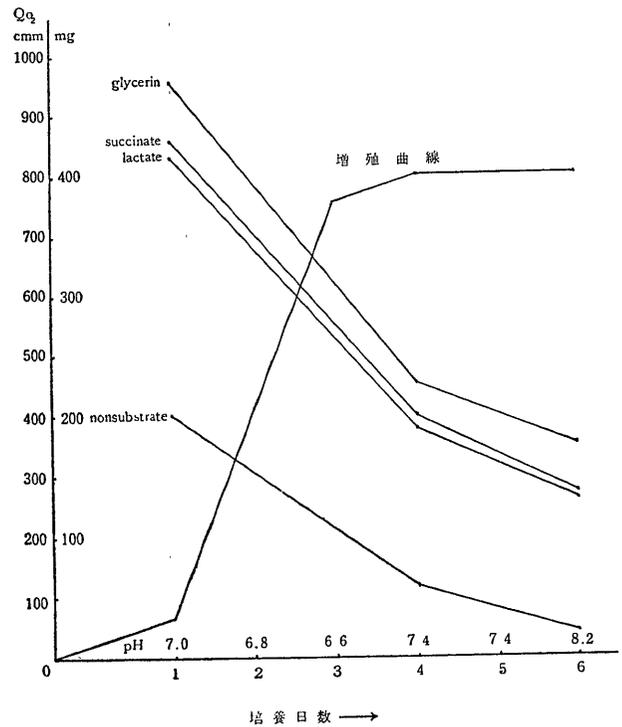
II 脱水素酵素系における活性について

複雑な反応系をもつ酸化酵素系は増殖期に酵素活性が著しく下降するが次に比較的簡単な脱水素酵素について調べた。第1表の H₂ 受容体として methylene-blue を用いた方は増殖時期によつて活性の差を認めることは出来なかつた。そこで一応同一のようにみえるけれども結核菌のような菌体電位の高いと予想され

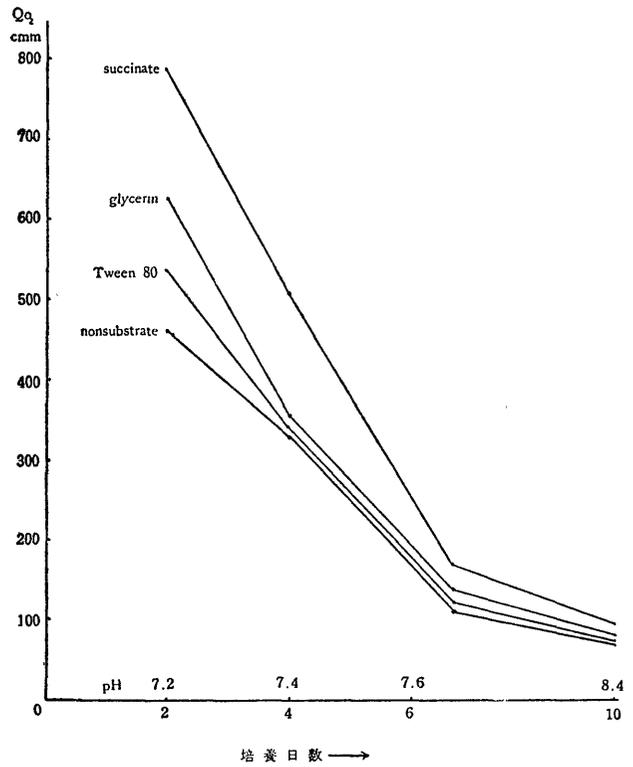
第2図 Souton 培地發育菌の増殖曲線並びに酵素活性(1時間値)
(培地N源: sod. glutamate)



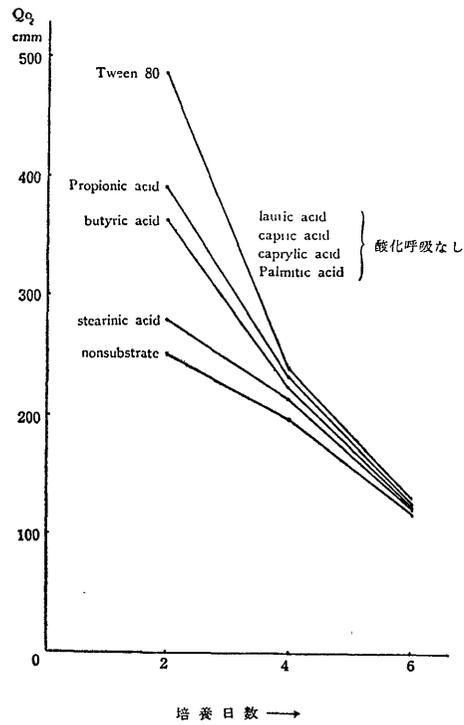
第3図 Glycerinbouillon 培地發育菌の増殖曲線並びに酵素活性(1時間値)



第4図 Souton 培地(N源: l-asparagine)
発育菌の酵素活性(1時間値)



第5図 Souton 培地発育菌の脂肪酸に対する酵素活性(1時間値)
(培地N源: sod. glutamate)



第1表 脱水素酵素試験
(メチレン青使用)

培養日数 基質	二日培養	四日培養	六日培養	八日培養
乳酸	2分20秒	3分	2分	2分
琥珀酸	2分	3分	2分	2分15秒

るものに対して **methyleneblue** が適当でないことは充分推定されるので大林等の法¹²⁾に従つて別の高電位色素である **2,6-dichlorphenolindophenol** を用いた時は第2表に見る如く明確にその差をみる事が出来

た。即ち脱水素酵素も酸化酵素同様な活性の降下現象をみた。

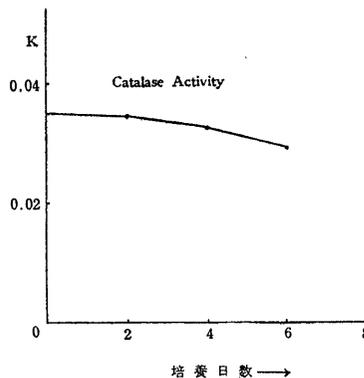
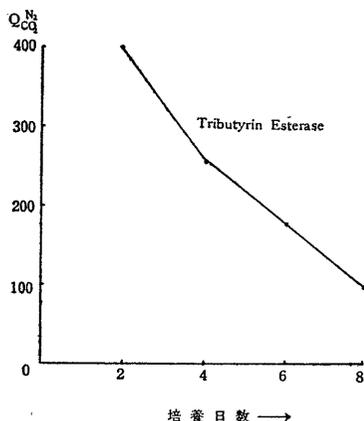
第2表 脱水素酵素試験
(2,6-dichlorphenolindophenol 使用)

培養日数 基質	二日培養	六日培養
乳酸	1分20秒	2分50秒

III エステラーゼ, カタラーゼについて

エステラーゼ, カタラーゼについて調べた結果は第6図の如くである。即ちトリブチリンエステラーゼは脱水素酵素同様活性の著しい下降を認めしたが, カタラーゼは極く僅少の下降を認めたのみであつた。

第6図 エステラーゼ, カタラーゼの活性



IV Cell free 抽出液による乳酸々化酵素について

上述の **intactcell** を用いての実験成績は別な見地にとればこれは菌膜の基質に対する透過性の相違であつて菌体内の酵素量の相違ではないのではなからうかという問題が生ずることは避け難いだろう。そこで著者は細胞膜を粉碎して抽出し得る酵素の活性を定量的に知ることによつて一層正確に上述の現象を分析し得ると考え構成酵素として抽出容易な乳酸々化酵素によつて実験を試みた。即ち乳酸を基質として抽出乳酸々化酵素の作用を **Warburg'smanometry** で検査したところその結果は **intactcell** の場合と同様著明な下降現象をみたのである。しかし山村によればこの乳酸々化酵素は補酵素たる **FAD** と蛋白担体からなりたつているから古い培養菌中の **FAD** が減少している場合(培養が古くなると培地が次第に黄色になるから菌体内の

第3表 抽出乳酸々化酵素活性

Sauton 培地発育菌から抽出した乳酸々化酵素活性(1時間値) (培地 N 源: sod. glutamate)			
	煮沸酵母抽出液	2日培養	6日培養
No. 1	—	96cmm	56cmm
No. 2	+	192cmm	92cmm
Glycerinbouillon 培地発育菌から抽出した乳酸々化酵素活性(1時間値)			
	煮沸酵母抽出液	2日培養	6日培養
No. 1	—	569cmm	104cmm
No. 2	+	543cmm	104cmm

flavin 流出が考えられる)蛋白担体の非活性化がなくとも酵素活性の下降があることは一応推定されるので補酵素たる FAD (酵母エキス使用) を充分加えて実験したところ第 3 表の如く FAD を加えない場合と同様著明な降下をみた。即ち非活性化が蛋白担体部にも存在することが判つた。又上述した如く菌体内の flavin が培養日数の経過と共に減少することが予想されたので測定したところ第 4 表の如く果して古い培養菌に著明な減少がみられた。即ち乳酸々化酵素全体 (FAD + 蛋白担体) が落下していることが判つた。したがって乳酸々化酵素に関する限り intactcell の活性の降下は基質の透過性に由来するものではない。その他のトリカルボン酸酵素群の抽出は補瀬¹⁹⁾にならつ

て試みたがいずれも満足な酵素液を得ることは不能で

第 4 表 鳥型結核菌の含む Vitamin B₂ 含量
Sauton 培地 (N源: sod. glutamate
使用) 発育菌使用. 測定法: L. casei
使用による Bioassay

培養日数	2 日	4 日	6 日
V. B ₂ 量 (乾燥菌量 1g 中)	120~100γ	46γ	38γ

あつた。しかしながらこの乳酸々化酵素から類推して他の基質酸化の低下が基質の透過性の相違によるものではないように思われる。

考 按

永らく生存するためには代謝的に不活性状態を形成するという事は細菌に限らず一般生物に共通する原則であるだろう。生存力の強い *Bacillus* が特に孢子形成というメカニズムによつて代謝不活性の状態を形成していることはいうまでもない。孢子を持たぬ菌群の中で最も生存力の強いものの例として *Mycobacterium*, や *Corynebacterium* をあげることが出来る。これらの菌の生存のメカニズムを考える時これらの菌は孢子のような特に著明な構造をもたないだけに形態学的に生存力の強さを裏づけるものの存在を示すことは極めて困難である。しかし *Mycobacterium*, や *Corynebacterium* が他の細菌とちがつて特に granule を形成し易い菌であることは枚挙にいとまない程沢山の論文があることから考えても明白である。²⁰⁾ この granule が孢子に似たものであると述べたのは Koch, Löffler, Babes²¹⁾ であつて最も古典的な説明である。最近での有力な見解としては Knaysi の Nucleus 説²²⁾, Mudd の Mitochondria 説^{23), 24), 25)}, Bisset の Cytoplasm 濃縮説^{26), 27)} Bringmann の Karyoid 説²⁸⁾ があるだろう。このうち Bringmann の Karyoid 説は Bisset の Cytoplasm 濃縮説と略々同じ基盤の上に立つものと思われるし Knaysi の Nucleus 説も亦これらの見解と原則的には同一のものと見ることが出来る。これらの研究は純粋に細胞学的見地からなされているものであるが、著者は“それでは何故これらの菌群がこのような granule 形成へ容易に移行するか”という問題及び“この granule 形成の背後にどのような生化学的現象が起きているか”という問題に

興味をもつた。細胞質の濃縮化への移行性という点で細胞学的な類似性をもつ菌を探せば *Bacillus*, *Clostridium* をあげることが出来るが、これらについては目下生物学的、分類学的見地から比較参照して検討中である。この Cytoplasm の濃縮への傾向と共に生物学的には代謝不活性状態への形成が共に関連する 2 つの面であるように考えられ予想された。しかし爾來結核菌は内部呼吸と基質呼吸との差が殆んどないものと報告されているが²⁹⁾ 西田¹⁾ 吉田⁷⁾ 等の *Corynebacterium*, *Mycobacterium* についての研究はこれらの菌の早い非活性化の傾向を示しているから上述の結核菌についての報告は使用菌が既に非活性化しているものを使用しているのではないかと予想せしめた。しかし著者の鳥型結核菌についての実験成績も上述の如く著明な酵素活性(特に基質呼吸活性)の降下をみたのである。山根等³⁰⁾ は BCG 菌のような増殖の極めて遅い菌でも若し増殖速度を増せば内部呼吸と基質呼吸の間に著しい活性の差のあることを報告している。これらの非活性化への傾向がこの菌の生存性或いは形態と密接な関係にあるものかどうかについては著者は現在検討中である。結核菌の生存性については sauton 培地上の人型菌或いは BCG 菌が増殖の過程の中で著しく viability を喪失することが多くの人によつて認められているが^{31), 10)} 又一面適当な環境におけば 12 年の長きにわたつて菌が生存するという報告^{32), 33)} もあるからどのような形で最も生存に適するかは更に検討を必要とするだろう。著者の生化学的検討は主として intactcell で行われ抽出酵素によるものは乳酸々

化酵素活性に関するもののみであるから intactcell の非活性化が cell permeability の変化によるものではないとは否定し去ることは出来ない。しかしながら既に山村等³⁴⁾は鳥型結核菌を用いてその抽出液により発育の時期でエステラーゼ活性が著しく差のあることを報告し著者も亦乳酸々化酵素で同様な結果を得た。このことから菌体内においても代謝不活性がおきているものと考えてよいように思われる。抽出酵素による

実験は楠瀬等に従つて更に検討してみたが定量的には測定困難であつた。酸化酵素系、脱水素酵素、エステラーゼの活性が一様に下降するに反してカタラーゼの活性が下降しない点についてはカタラーゼ活性が細菌の崩壊と全く無関係であることを田上³⁵⁾が孢子形成菌で西田³⁾がジフテリア菌で証明しているため結核菌におけるカタラーゼ活性の下降もこれと同一の現象であると解釈した。

結 論

I 生物学的に重要と思われる諸種基質 (glycerin, succinate, acetate, formate, lactate, glutamate, glucose, Tween 80, propionic acid, butyric acid, stearic acid) を用いて鳥型結核菌における酸化酵素活性を検討したところ、増殖極期に達しない内に著しく活性が落下してゆくことが判つた。

II 2,6-dichlorphenolindophenol を H₂ 受容体として脱水素酵素活性を調べたところ、酸化酵素活性の

落下と期を一にして落下することが判つた。

III エステラーゼ活性も著しく落下することが判つたがカタラーゼ活性は著明な変化がなかつた。

IV 菌体から抽出した乳酸々化酵素の活性は新旧両菌の間に著しい差を示し細胞内部の酵素の活性降下を予想させた。

稿を終るに臨み御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた谷友次教授、西田尚紀助教授に深く感謝します。

文 献

- 1) S. Nishida : Jap. J. Med. Sci & Biol., 7 : 453, (1954).
- 2) S. Nishida : Jap. J. Med. Sci & Biol., 7 : 495, (1954).
- 3) S. Nishida, M. Ishida and M. Murakami : Jap. J. Med. Sci & Biol. : (発表予定).
- 4) S. Nishida, M. Ishida and M. Tagami : Jap. J. Med. Sci & Biol. : (発表予定).
- 5) 米田正彦訳 : 細菌の化学的活性(株式会社本田書店発行) : 68.
- 6) J. B. Gunnison, E. Kunishige, V. R. Coleman and E. Jawetz : J. gen. Microbiol., 13 : 509, (1955).
- 7) 吉田清 : 金沢大学結核研究所年報, 10(下) : 112, (昭27).
- 8) 戸田忠雄 : 結核菌と BCG (南山堂発行) : 39.
- 9) 瀧川次郎 : 臨床と研究, 26(1) : 39, (1949).
- 10) 浅見望・細井正春・土屋皖司・上野一恵・土田誠三・三浦馨 : 結核, 28 : 117, (1953).
- 11) 浅見望・細井正春・土屋皖司・上野一恵・土田誠三・三浦馨 : 結核, 28 : 164, (1953).
- 12) 大林容二・続木正大・古屋さと代 : 医学と生物学, 10 : 311, (昭22).
- 13) 江上不二夫編 : 標準生化学実験(文光堂発行) : 325.
- 14) Rona, P. and Lasnitzki, A. : Biochem. Z., 152 : 504, (1924).
- 15) 楠瀬正道・楠瀬恵美・山村雄一 : 結核, 27 : 72, (1952).
- 16) 八木国夫・石黒伊三雄 : 医学と生物学, 17 : 105, (1950).
- 17) P. György : Vitamin methods (Academic Press Inc., Publishers.), 1 : 332, (1950).
- 18) 江口良太 : ビタ

- ミン, 5 : 29, (昭23).
- 19) 楠瀬正道・楠瀬恵美 : 結核, 28 : 34, (1953).
- 20) Mudd : Annual Rev. Microbiol., 8 : 10, (1954).
- 21) Koch, Löffler, Babes : Handbuch. Patho. Mikroorgani. (W.Kolle u. A. V. Wassermann), 5 (1) : 457., 5 (2) : 618.
- 22) Knaysi : J. Bact., 60 : 423, (1950).
- 23) Winterscheid, L. C. and Mudd, S. : Am. Rev. Tuberc., 67 : 59, (1953).
- 24) Mudd, S, Winterscheid, L. C., De Lamater, E. D. and Henderson, H. J. : J. Bact., 62 : 459, (1951).
- 25) Davis, J. C., Mudd, S. : J. Bact., 69 : 372, (1955).
- 26) Bisset, K. A. : J. Gen. Microbiol., 8 : 50, (1953).
- 27) Bisset, K. A. : J. Gen. Microbiol., 3 : 93, (1949).
- 28) Bringmann, G. : Zbl. Bakt., 1 org., 157 : 349, (1951).
- 29) Edson : Bact. Rev., 15 : 147, (1951).
- 30) K. Minami, I. Yamane, T. Yasui : Fukushima J. Med. Sci., 1 : 95, (1954).
- 31) Wilson, G. S. & Schwabacher, H. : Tubercle, 18 : 161, (1939).
- 32) Corper & Cohn : Am. Rev. Tubercul., 28 : 856, (1933).
- 33) Corper & Cohn : J. Bact., 35 : 223, (1938).
- 34) 山村雄一・小倉克彦・今津四郎 : 結核, 28 : 51, (1953).
- 35) 田上三雄 : 十全医学会雑誌, 58 : 332, (昭31).