

臨床微生物学の「礎」を築いた人々

— 気道関連の微生物研究に携わった研究者達の技術と思索 — 9

血液含有培地導入前後における肺炎球菌とレンサ球菌
(その1)

帝京大学名誉教授
 こん の まさ とし
 紺 野 昌 俊
 Masatoshi KONNO

前号では Pfeiffer によってインフルエンザの病原体¹⁾とされた *Influenzabacillus* は当初の発表と異なり、ヘモグロビンを必要²⁾としたことから、Haemophilus (血好属) なる用語が生まれてきた経緯と、ヘモグロビンを必要とする菌には百日咳菌などがあることも判明し、“Group of Hemoglobinophilic bacteria” なる用語が生まれたことについて記しました。しかし、そこには培地に用いる血液が凝固するというネックがありました。そして1897年 Delius & Kolle³⁾らによって脱繊維血液を混じたブイヨン中で *Influenzabacillus* を培養する方法が考えられ、そのことによって大量の菌の増殖が可能となり、本格的に菌の性状を検討することができるようになったことをも記しました。それと前後して脱繊維血液添加培地そのものはさまざまな菌の性状を調べる上に役立つものとなっていきました。いわば、血液寒天培地は細菌学発展の第2の出発点とも言うべきものでした。

本号では血液含有培地導入前後における肺炎球菌とレンサ球菌の動向について記すことにします。ただし、前号までの *Influenzabacillus* の動向については第一次世界大戦が始まる1914年頃までの動向を

記すに止めました。その理由は *Influenzabacillus* はインフルエンザの病原体として発表された菌ですから、第一次世界大戦末期から始まった“Spanish flu”との関連においても改めて記することが必要と考えたからです。肺炎球菌もまた“Spanish flu”と無関係ではないのですが、その論議はレンサ球菌と共に“Spanish flu”が終焉した後においても続いています。ことに肺炎球菌については1944年に Avery ら⁴⁾(註1)によって形質転換はDNAによると発表され、いわば細菌学発展の第3の出発点となるまでの間にも精力的に続けられています。しかし、それらのことをこの紙面だけで記述することは不可能です。ここでは1933年 Smith ら⁵⁾によってインフルエンザの病原体がウイルスであることが判明した頃までの論議について記すことにします。

肺炎球菌は1873年に Klebs⁶⁾ が肺炎患者の気管分泌物と脳室内に見出したことに始まるということはずで述べてきました(註2)。レンサ球菌は1868年に Billroth⁷⁾(註3)が化膿創中に連鎖する球菌を見出したことから始まるとされておりましたが、そこには Lister^{8,9)}(註4)による無菌的外科療法が介在しておりました。つまり、両菌の特徴は当初から分離に

註1: 遺伝学あるいは分子生物学の引き金となった研究者 Avery は1877年にカナダで生まれ、1904年にニューヨーク・コロロンビア大学の医学大学院を経て、1913年に Rockefeller の医学研究所との関わりを持ち、1923年に正規のメンバーとなっております。その間、市民権を得るために一時アメリカ陸軍に入隊しておりますが、その間を含めてインフルエンザ菌に関わる Avery の培地(1918年)やX, V因子の発見(1921年)など(本シリーズ第8号の註5参照)の業績を挙げております。これらの文献を含めて Avery の論文を読むと、Avery は全く未知の事象に向かって果敢な研究を遂行したということではなく、先人が発表した業績を巧みにまとめ上げる能力に長けた研究者との感がします。その点、肺炎球菌に関わる論争の間に、大葉性肺炎由来の双球菌が肺炎の起炎菌としてまとめ上げた Weichselbaum(註5参照)と通ずるものがあります。Avery が形質転換に関わる論文を発表したのは、彼が67歳のときですが、当時 Avery が弟の Dr Avery RC 宛に書いた書簡(1943; May 13、公表)に記載されている言葉が、Avery の研究姿勢を如実に物語っているように思われます。“It’s lots of fun to blow bubbles – but it’s wiser to prick them yourself before someone else tries to” 「シャボン玉を飛ばすことは楽しい。しかし、誰かがそれをチクリと刺す前に、貴方自身が試みる方が賢明である」と訳しました。

註2: 本シリーズ“臨床微生物学の「礎」を築いた人々”の第1号(モダンメディア57巻7号2011; 211-214)を参照してください。

註3: Billroth は胃癌の摘出手術を最初に行ったドイツの外科医で、残胃と十二指腸の吻合術は「ビルロート法」として今日でもよく知られております。また、本邦では1869年(明治2年)に順天堂の第3代堂主である佐藤進がウーン大学の Billroth のもとで外科学を学び、本邦の近代外科学の道を開いたことでも知られております。Billroth の著書は多く、その中に Billroth の顕微鏡観察法も含まれています。Billroth は敗血症を伴った丹毒と思われる病巣から流出する膿汁を顕微鏡下で観察して連鎖した球菌を見出しております。ただし、Billroth はその菌を敗血症に伴って創傷部位に二次的に発育してきた菌、即ち“*Coccobacteria septica*”と記述しております。その理由は、Billroth は当時 Lister’ antiseptic method(註4参照)を手術に導入しており、その成功・不成功を手術創部からの分泌物中における菌の有無を顕微鏡下で観察していたことによるものでした。菌の培養はしておりません。

成功した菌ではなく、顕微鏡下で見出されたことにあります。しかし、当時の顕微鏡は集光器や反射鏡はもちろんのこと immersion もまた優れた製品が考案された以前のものでした(註5)。染色法も Weigert-Koch 法が確立される以前のものです(同上註5参照)。適当な培地もなく、家兎を用いての感染再現実験が主体でありました(註6)。

肺炎球菌発見当時の培地の変遷を見ますと、卵白(Klebs¹⁰ 1875年)、仔牛のブイヨン(Pasteur¹¹ 1881年)、ブイヨンにゼラチンや寒天を添加(Friedländer¹² 1883年)などの他に、Friedländer と肺炎球菌の論争をした Fränkel¹³ は当初はミルク、次に凝固した血清、最終的にはブイヨン添加寒天を使用しています(1886年)。その後、ブイヨン血清培地(Nissen¹⁴ 1891年)や喀痰含有培地(Grawitz & Steffen¹⁵ 1894年)、あるいは脳組織含有培地(Carnot & Fournier¹⁶ 1900年)などの報告もあります。このような変遷は、肺炎球菌の栄養要求性に加えて、莢膜をはじめとする培地上で見られる特異的な変化を見極めようとしたために考案されたものでした。

当時の肺炎球菌に関わる論文の主要な点を経年的に追及していきますと、年度的に多少前後しますが、培地の検討に続いて培養に成功しても保存が難しい、また毒性が保てないという点にありました。毒性とはマウスに対する毒性を意味しておりました。肺炎球菌の保存に関する論文は Friedländer¹⁷ によ

る莢膜を有する微小物体発見(註2)の2年後に、Emmerrich¹⁸ によって乾燥した状態に置くとよいとする報告から始まっております。それでも当時は低温を保つことが難しく、それに関わる論文は手許にあるものだけでも23篇になります。その中の代表的な論文を紹介しますと、1887年に Foà & Bordoni-Uffeduzzi¹⁹ による感染した家兎の血液を冷暗室に保存する方法(生存期間: 50~60日)や、1891年に Nissen¹⁴ による肺炎球菌を絹糸に染み込ませてデシケータ中に保存する方法(生存期間14~16カ月)などがあります。

1891年には肺炎球菌にとって重要な論文が二つ発表されています。一つは Metchnikoff²⁰ によって肺炎球菌の抗血清による凝集反応が報告されたことです。このことは肺炎球菌の莢膜血清型に関わる研究に繋がっていききました。もう一つは Kruse & Pansini²¹ らによって肺炎球菌の dissociation (解離) が報告されたことです。この報告は肺炎球菌の培地上に形成される集落は次第に変形し、菌形もまた双球菌から連鎖球菌あるいは桿菌状に変形し、莢膜は喪失し、マウスに対する毒性もまた減弱する。さらには、それらの変異株はマウスの腹腔を通過させると元の状態に復元するという千変万化な変化で衝撃的なものでした(註7)。そして、このことが将来の形質転換への研究に繋がっていききました。加えて、彼らはこの報告の中で肺炎球菌はレンサ球菌と種の起源を一

註4: Lister の antiseptic method とは、英国の外科医 Lister が Pasteur によって唱えられた“Omne vivum ex vivo”説「肉汁の腐敗は外界からの微生物の侵入による」の記事に接し、防腐剤として石炭酸(註4-1参照)を使用して創部に侵入してくる微生物を防御しようと考えた方法です。その方法は創部を石炭酸で拭き取ることから始まって、手洗いや手術器具もまた石炭酸でスプレーするというもので、方法そのものは段階的に拡大されて、いくつかの文献に記載されております(文献8, 9参照)。しかし、Lister's method は当初は英国では受け入れられずに、ドイツで広く活用されたという経緯があります。リステリア菌は Lister の業績を記念して付けられた菌名です。

註4-1: 石炭酸は1834年に Runge によって石炭の蒸留物から見出されていますが、その前年にはブナの木ノタールからクレオソートが抽出されており、その相違が問題となった経緯もあります。一方、腐敗した食品(ヒトの死体をも含む)から発せられる悪臭を防止する性質を有することから、当時から下水道の悪臭防止などに用いられていました。Lister は手術創への微生物の侵入の他に、化膿創から発せられる悪臭の防止にも役立つことや、石炭酸で手を拭き取っている助産婦が扱った新生児には重篤な感染症が少ないことなども指摘しております。

註5: 本シリーズ“臨床微生物学の礎を築いた人々”の第3号(モダンメディア57巻9号2011; 264-268)を参照してください。

註6: 動物感染実験にマウスを用いて成功したのは、恐らく Koch による炭疽菌の継代実験であったと思われます。肺炎球菌の最初の発見者とされる Klebs も肺炎患者の気管分泌物を家兎に皮下注射して病原性を確かめようとしたましたが、失敗に終わっております(文献6、並びに本シリーズ“臨床微生物学の「礎」を築いた人々”の第1号(モダンメディア57巻9号2011: 264-268)を参照してください。

註7: Kruse & Pansini (文献21)らの肺炎球菌の dissociation の観察のために用いられた培地は血液が添加されていないペプトン含有ブイヨン培地です。また、彼らはこの論文の中で市販のペプトンには粗悪なものがあり、それを用いると肺炎球菌の発育が抑制されるとする耳の痛い報告も行っております。また、培地が肺炎球菌の発育と共に酸性に傾くことをも熟知しており(註7-1参照)、培地に1/10規定のアルカリを添加して酸性に傾くのを防止するという用意周到な計画の下に実験を行っております。

註7-1: 肺炎球菌に限らず、培地が菌の増殖に伴って酸性に傾くのみならず、菌が死滅することは、1891年頃にはすでによく知られていたようですが、培地の pH 等を測定した論文は肺炎球菌の自己融解(autolysis)が問題となり始めた1920年前後からのこととなります。

つにすると論述していることが注目されます。

肺炎球菌の解離に関する論文は、その翌年の1892年にも Arkharow²²⁾ によって報告されております。それは肺炎球菌を家兎に接種して作成した抗血清を含有する培地に当初の肺炎球菌を接種すると菌の発育が遅れ、球菌はレンサ状となり、毒性も失われるというものでした。このこともまた、その後の血清型の検証に役立つものとなっていきました。

肺炎球菌の培養と保存に関する論議はその後も続いておりますが、1896年に Gilbert & Fournier²³⁾ によって脱繊維血液寒天培地（註8）が肺炎球菌の培養にも菌の保存にも最適とする報告がなされました。それは *Influenzabacillus* の培養に脱繊維血液³⁾ が使用された1年前のことになります。Gilbert & Fournier らは脱繊維血液寒天上で肺炎球菌は2カ月間生存しており、莢膜も認められ、マウスに対する毒性も保たれていると記しています。ただし、この報告には先に記した肺炎球菌の dissociation²¹⁾ と異なるニュアンスがあります。その点は先に記した註7も参照にしてください。

1897年、血清学的にさらに重要と思われる論文が Benzançon & Griffon²⁴⁾ によって出されました。即ち、肺炎由来の肺炎球菌を家兎に接種して得た抗血清を、その菌が増殖しているブイオンに混入すると沈殿物が生じ、その沈殿物を検鏡すると菌は莢膜を失っていることを見出し、再現実験としてその菌の培養液中に7例の肺炎患者の血清を混じたところ、5例では沈殿物は生じたが、2例では生じなかったという報告です。また、その2例の中の1例は壊死性肺炎でランセット型よりやや大きい球状を呈する双球菌が検出されたと記しております。次の1例は化膿性胸膜炎で起炎菌は明らかに肺炎球菌であると記しております。そして、この沈殿物の成否に関する現象を理解するには、肺炎双球菌には凝集反応において特異性を有するいくつかの菌種があると考えざるを得ないと断じております。この報告が

恐らく肺炎球菌には血清型が相違する菌種が存在すると断じた最初の報告であります。また、ランセット型より大きい球菌は、現在の血清型Ⅲ型の肺炎球菌と思われませんが、この菌は当時は肺炎球菌に加えられておりませんでした（註9）。同年、Eyre & Washbourn²⁵⁾ らは肺炎球菌の解離現象はブイオン培地中での継代培養によっても観察され、その変異株は家兎を通過させることによって元に戻ったと記しています。

1900年には、もうひとつの注目すべき論文が Neufeld²⁶⁾ によって報告されております。それは Neufeld 現象とも言われる胆汁溶解現象です。Neufeld は肺炎球菌を増殖させたブイオン中に家兎の胆汁を混入すると、数分間でブイオンが透明になることを見出しています。そして、透明になったブイオンを顕微鏡下で観察すると、そこには固形成分は見出せなかったと報告しております。そして、この溶菌現象は他の動物やヒトの胆汁でも認められますが、加熱した死菌では見られないことも確かめております。また、その成因については glycocoll や taurin 単独の添加では観察されないことから、両者が結合した cholic acid に起因するのであろうと推論しております。この Neufeld 現象は、肺炎球菌の病原性の認定や自己溶解との関係、あるいはレンサ球菌との鑑別等の論議へと発展していきました。

1902年、Neufeld²⁷⁾ はさらに注目すべき論文を発表しております。それは膨化反応です（以下 Quellung と略す）（図1）。Quellung は Benzançon & Griffon²⁴⁾ による凝集反応をスライド上で実施する観点から行われています。そして、Neufeld は Quellung は凝集反応に勝る検査法と記しておりますが、事実 Quellung はその後肺炎球菌の同定のみならず、莢膜の型別に活用されることになりました。

1902年にはもう一つ現在まで受け継がれている報告があります。それは Hiss²⁸⁾ の考案による20%の硫酸銅で洗い流す莢膜染色法です。さらに Hiss²⁹⁾

註8：血液を無菌的に脱繊維する方法は、1889年に Nissen が無菌的にした砂利で脱繊維をしたという報告（Nissen F. Zur kenntniss der bacterienvernichtenden Eigenschaft des Blutes. Zeitschr Hygiene. 6 : 487-520, 1889.）がありますが、それが脱繊維血液を作成した最初の報告であるかは定かではありません。また、Nissen の報告では脱繊維した血液数滴を培地に滴下してさまざまな菌種の培養を試みておりますが、脱繊維血液を混釈した平板培地で試みたものとは些か異なっているようです。

註9：現在Ⅲ型に分類されている肺炎球菌については後述しますが、集落が大きく、その表面は粘着で検鏡によると円形の大双球菌であることから、当時は *Streptococcus mucosus* と称されておりました。しかし、1897年の時点では、まだ血液寒天培地は使用されておらず、Benzançon & Griffon らが壊死性肺炎から分離した球状の菌がⅢ型菌であるとの認識には至っていなかったようです。

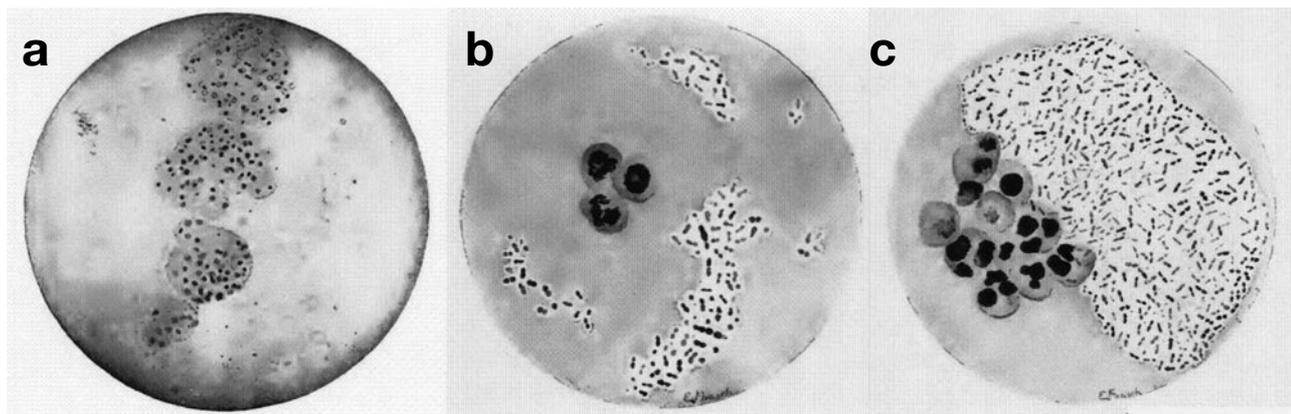


図 1

Neufeld が記述した総説 (1928 年) に記載されている肺炎球菌の凝集反応と膨化反応の模写図である。a) は試験管内で培養した肺炎球菌に同菌で作成した抗血清を滴下した際に、顕微鏡下で観察された凝集反応と膨化現象像を示している。b) はマウスの腹腔内に肺炎患者の喀痰を接種、数時間後に開腹して得た腹水を数枚のプレパラート上に滴下、それぞれに既知の肺炎球菌抗血清を滴下し、被検菌は抗血清の抗原菌と合致している際に見られる膨化像である。膨化現象が観察されれば肺炎球菌による感染の確定診断とその血清型が同時に判別できるといふ、当時において最も確実なおかつ迅速診断法として評価され、臨床のみならず、抗血清作成の際にも用いられていた。なお、白血球も描かれているが、貪食されていないことが莢膜を有する肺炎球菌による感染像の特徴である。c) は b) と同様の手法によって、大きな菌塊の周辺に形成された膨化現象像である。Neufeld F, Schnitzer R. Pneumokokken. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 3 Bd. Ed Kolle W, Kraus R, Uhlenhuth P. Jena: Gustav Fisher, Berlin, Wien. 4 : 913-914, 1928. より引用。

は 1905 年にレンサ球菌との鑑別のために 1% のイヌリンとリトマスを加えた牛血清含有液体培地を考案しております。その原理は肺炎球菌はイヌリンを特異的に発酵させることを活用し、発酵に伴って酸性となった培地中の血清を凝固させることにありました (図 2)。

年代は 1903 年に戻りますが、Schottmüller³⁰⁾ はレンサ球菌を血液寒天培地上で観察し、3 グループに分類しました。それは以下のとおりです。

- ① *Streptococcus pyogenes* : (コロニー周辺に透明な溶血域が見られ、長いチェーンを形成する)
- ② *Streptococcus viridans* (コロニー周辺に緑色の領域が見られ、短いチェーンを形成する)
- ③ *Streptococcus mucosus* (コロニーは非溶血で粘着、特有の莢膜を有する)

しかしこの分類ですと、*S. viridans* には一部の肺炎球菌や腸球菌も含まれるはずですが、また、*S. mucosus* は紛れもなく莢膜型Ⅲ型の肺炎球菌です (註 9)。菌種の同定については、すでに Neufeld²⁶⁾ や Hiss²⁹⁾ の報告もありますが、まだ多くの錯誤があったとい

うべきでしょう。

1905 年には、現在の医療関係者の念頭には希薄になっていると思われる報告が Wood³¹⁾ によってなされています。それは喀痰に含まれる肺炎球菌の生存状態について調べた成績です。膨大な論文ですが、結論の要約は以下の通りです。

1. 室温の暗室で保持された喀痰での肺炎球菌の生存は平均 11 日、0℃ では平均 35 日、室温で光に晒された際には 5 日未満
2. 乾燥した喀痰の生存期間は暗室で平均 36 日、散乱光のある室温で平均 35 日、日光に晒された際は 4 時間未満、粉末にした際は数時間で死滅 (咳嗽に伴って衣服に付着した場合を想定)
3. スプレーした際は 1 時間以内で死滅 (部屋の中での拡散を想定)

当時はすでに肺炎由来の喀痰については培養に至るまでの時間を考慮して、喀痰の懸濁液をマウスの腹腔内に接種して、24 時間以内に斃死したマウスの心血を血液寒天培地上で培養する方法が、肺炎球菌検出に関わるほぼ一致した検査法でした。現在の

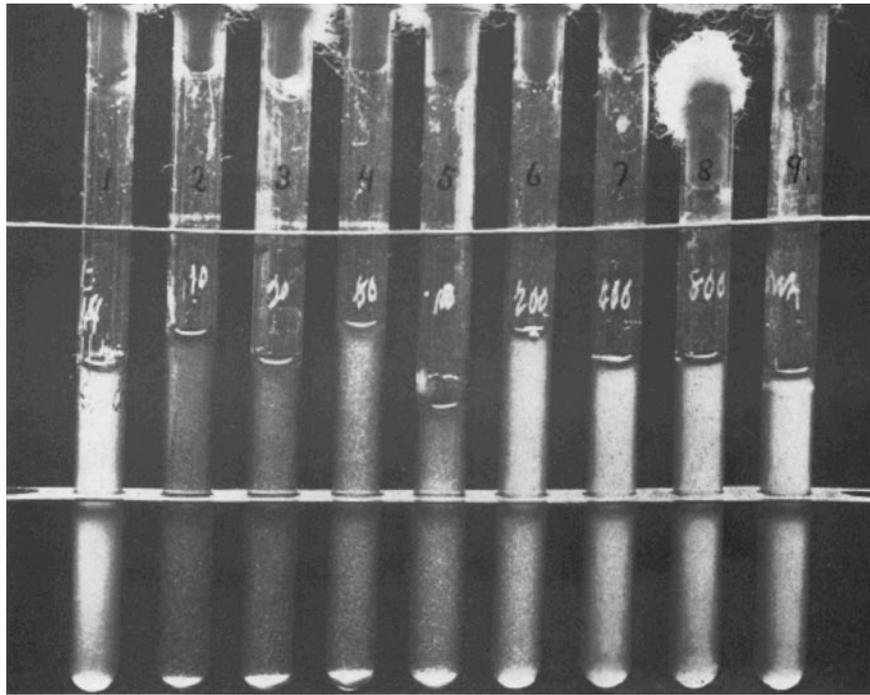


図 2

Hiss が考案した 1% のイヌリンとリトマスを加えた牛血清含有培地において見られた培地中の血清凝集像である。当時の写真であるから、像そのものが明瞭でないが、被検体が肺炎球菌である際には白濁が観察されている。Hiss の原著 (文献 28) より引用。

洗浄喀痰の直接培養法での菌陽性率と比較すると、その格差を感じざるを得ないようです。

紙面の都合上、肺炎球菌の発見以来の記述は 1905 年頃までとなりました。しかし、ここまでの記述では抗血清や胆汁溶解現象あるいは解離現象等の解説は不十分のままとなります。ましてや、レンサ球菌については、まだその糸口にも達していません。

加えて、この誌上で引用した論文は独文が 16 篇、仏文が 7 篇、英文が 8 篇となりますが、年代を経るに従って仏文と英文の論文が増えてきております。独文の論文の多くは莢膜という病原性を Koch 以来の固形培地によって探求されているのに対し、仏文のそれは抗血清に関わる問題を Pasteur 以来の液体培地によって探求する論文が目立ち、それらの研究には何か民族的な誇りと執念が入り混じっているようにさえ感じられます。一方、英文の論文の多くは当時の新興米国の Rockefeller 医学研究所の膨大な財力に支えられたものであることに気がつきます。

次号では、それらの研究の流れをも記していきたいと考えています。

文 献

- 1) Pfeiffer R. Vorläufige Mittheilungen über die Erreger der Influenza. Dtsch Med Wochnschr. 2 : 28, 1892.
- 2) Pfeiffer R. Die Ätiologie der Influenza. Ztschr. Hyg. 13 : 357-386, 1893.
- 3) Delius W, Koll W. Untersuchungen über Influenzaimmunität. Ztschr Hyg. 24 : 327-348, 1897.
- 4) Avery OT, MacLord, CM, MacCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J Exp Med. 79 : 137-158, 1944.
- 5) Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. Lancet. 222 : 66-68, 1933.
- 6) Krebs E. Beiträge zur Kenntniss der Pathogenen Schistomyceten. Arch Exper Pathol Phamakol (Leipzig). 1 : 31-443, 1873.
- 7) Billroth T. Untersuchungen über die Vegetationsformen

- von Coccobacteria septica und den Antheil, welchen sie an der Entstehung und Verbreitung der accidentellen Wundkrankheiten haben. Versuch einer wissenschaftlichen Kritik der verschiedenen Methoden antiseptischer Wundbehandlung. G Reimer, Berlin.: pp10-11, 1874.
- 8) Lister J. On a new method of treating compound fracture, abscess, etc.: with observations on the conditions of supuration. *Lancet*. **89** : 326-329, 357-359, 387-389, **90**: 95-96, 1867.
 - 9) Lister J. On the antiseptic principle in the practice of surgery. *BMJ*. **351** : 245-260, 1867.
 - 10) Krebs E. Beiträge zur Kenntniss der Schistomyceten. 4. Die Monadinen. *Arch Exper Pathol Phamakol (Leipzig)*. **4** : 440-488, 1875.
 - 11) Pasteur L, Chamberland C, Roux E. Sur une maladie nouvelle, provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Compt rend Acad sc*. **92** : 159-165, 1881.
 - 12) Friedlander C. Die Mikrokokken der Pneumonie. *Fortschr. Med*. **22** : 715-733, 1883.
 - 13) Fränkel A. Weitere Beiträge zur Lehre von den Mikrokokken der genuinen fibrinösen Pneumonie. *Ztschr klin Med*. **11** : 437-458, 1886.
 - 14) Nissen F. Ein Vergleich des sog. Sputumsepticamieococcus mit dem A. Frankel's Pneumonieerreger. *Fortschr Med*. **9** : 661-668, 1891.
 - 15) Grawitz E, Steffen W. Die Bedeutung des Speichels und Answurfs für die Biologie einige Bakterien. *Berliner Klin Wochenschr*. **31** : 419, 1894.
 - 16) Carnot P, Fournier L. Recherches sur le pneumocoque et ses toxines. *Arch méd expér d'anat path*. **12** : 357-378, 1900.
 - 17) Friedländer C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Virchow's Arch Pathol Anat Physiol*. **87** : 319-324, 1882.
 - 18) Emmerrich R. Pneumonieococcon on der Zwischendeckenfüllung als Ursache einer Pneumonieepidemie. *Dtsch Med Wochenschr*. **10** : 181-182, 1884.
 - 19) Foà P, Bordoni-Uffeduzzi G. Ueber die Aetiologie der "Meningitis cerebro-spinalis epidemica". (Translation). *Ztschr Hyg*. **4** : 67, 1887.
 - 20) Metchnikoff E. Études sur l'immunité. IV. L'immunité des cobayes vaccinés contre le vibrio Metchnikowii. *Ann Inst Pasteur*. **5** : 465-478, 1891.
 - 21) Kruse W, Pansini S. Untersuchungen über den Diplokokkus pneumoniae und verwandte Streptokokken. *Ztschr Hyg*. **11** : 279-380, 1891.
 - 22) Arkharow J. Recherches sur la guérison de l'infection pneumonique chez les lapins au moyen d'un sérum des lapins vaccinés. *Arch méd expér d'anat path*. **4** : 492-544, 1892.
 - 23) Gilbert A, Fournier I. La culture du pneumocoque dans le sang defibrine. *Comp rend Soc biol*. **48** : 2-5, 1896.
 - 24) Benzaçon F, Griffon V. pouvoir agglutinatif du sérum dans les infections expérimentales et humaines à pneumocoques. *Compt rend Soc biol*. **49** : 551-579, 1897.
 - 25) Eyre JW, Washbourn JW. Resistant form of the pneumococcus. *J Path Bact*. **4** : 394-400, 1897.
 - 26) Neufeld F. Ueber eine spezifische bakteriolytische Wirkung der Gall. *Ztschr Hyg*. **34** : 454-464, 1900.
 - 27) Neufeld F. Ueber die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. *Ztschr Hyg*. **40** : 54-64, 1902.
 - 28) Hiss PH Jr. A contribution to the physiological differentiation of pneumococcus and streptococcus, and to methods of staining capsules. *J Exp Med*. **6** : 317-345, 1902.
 - 29) Hiss PH Jr. A method for obtaining mass cultures of bacteria for inoculation and for agglutination tests; with special reference to pneumococci and streptococci. *J Exp Med*. **7** : 223-227, 1905.
 - 30) Schottmuller H. Die artunterscheidung der für den Menschen pathogenen kokken durch Blutagar. *Munch med Wchnschr*. **50** : 849-853, 909-912, 1903.
 - 31) Wood FC. The viability of the pneumococcus after drying: A study of one of the factors in pneumonic infection. *J Exp Med*. **7** : 592-625, 1905.