

# 結核菌の食塩水抽出液のマウスに 対する毒性について

(第 1 報)

金沢大学結核研究所薬理部 (主任: 伊藤 亮教授)

吉村 政弘・岡野 務・蕪城外 枝子

(受付: 昭和38年8月1日)

## 緒 言

さきに伊藤・細川<sup>1,2)</sup>は, Sauton 培地に培養した, 人型並びに牛型結核菌菌体の食塩水浮遊液が溶血性連鎖状球菌溶血毒 Streptolysin-S に対し試験管内で顕著な抗溶血作用を呈するという興味ある現象を観察し, 更にこの抗溶血作用が, 菌浮遊液から菌体を除去した遠心上清液でも同様に実証されることから, 人型及び牛型結核菌が, 抗 Streptolysin-S 性物質産生という従来未知の生物学的性状を具有していることを報告した。

この報告に引続いて著者等は, 伊藤・細川法によって作られた結核菌浮遊液の遠心上清液

(以下食塩水抽出液又は単に抽出液と呼ぶ)のマウスの生体内における抗 Streptolysin-S 効果の問題について検索中, たまたま抽出液をマウスの尾静脈内に注射すると, 動物はたちまち無力状態となり, 次いでけいれん, 呼吸困難等のショック様症状を起して重篤状態に陥りついにはへい死するものも少なくないことを目撃した。そこで著者等はこの予期せざる観察にもとづいて, 結核菌の食塩水抽出液のマウスに対する毒性作用について精査を行った。ここにその実験成績を報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 菌 株

実験に使用された結核菌は下記18株である。

- (a) 人型9株: Frankfurt, 河上, 青山B, H37Rv, H37Ra, H<sub>2</sub>, 長浜, SM\* 耐性青山B, PAS\*耐性青山B.
- (b) 牛型2株: No. 10, BCG.
- (c) 鳥型1株: 竹尾.
- (d) Timothy 型1株: *Mycobacterium phlei*.
- (e) 非定型5株: No. 1, No. 6, No. 22, 山本, 607.

但し本研究では実験の大部分は青山B株をもって行われた。

### 2. 培 地

結核菌の培養にはもっぱら Sauton 培地が用いられた。この外に一部実験では10%ウサギ血清加 Kirchner 培地及び5%グリセリン・ブイオンも使用された。内容 100ml のフラスコに培地 50ml あてを分注し, これに結核菌を移植して 37°C で培養を行った。

### 3. 結核菌の食塩水抽出液の調製

結核菌からの食塩水抽出液の調製は室温で, 無菌的注意のもとに行われた。

結核菌の Sauton 培養 (青山B株を用いた場合には通常約2週間培養) から菌膜を分離して濾紙上に集め

\* SM=Streptomycin, PAS=p-Aminosalicylic acid. これら耐性菌は各薬剤の 1:20,000 含有 Sauton 培地に発育するものである。

生理的食塩水でよく洗浄した後、滅菌濾紙間に圧搾して水分を十分に吸除して秤量する。次に所要量の結核菌を乳鉢にとり、菌 1gm に対して 5ml の食塩水を滴加しながら、菌塊をよく摩砕して、できるだけ均等な菌浮遊液をつくる。この菌浮遊液を、まず 4,000 R.P.M., 10分間遠心し、得られた上清液に更に 10,000 R.P.M. (10,500g.), 30分間の遠心を2回反復して行って、最後に淡黄色やや不透明、軽度粘ちゆう性の食塩水抽出液を得る。

#### 4. 菌検出並びに菌数算定.

菌浮遊液及び抽出液等の結核菌の検出は、塗まつ標本を石炭酸フクシン染色して顕微鏡検査すると共に、小川培地による培養試験を行い8週後の菌発生を検した。また菌数の算定には、食塩水をもって被検液の10倍希釈列をつくり、各希釈液から0.1ml あてを3本の小川培地に塗まつ培養して、4週間後に発生した菌集落数を算定してその平均数値をもって表示した。

## 実 験 成 績

以下記載する実験は、特に示さない限りすべて人型結核菌青山 B株から得られた食塩水抽出液をもって行われたものである。

### I, 結核菌の食塩水抽出液のマウスに対する毒性.

#### 1. 抽出液のマウス尾静脈内注射による毒性作用.

抽出液の適量をマウスの尾静脈内に注射すると、動物は注射後短時間内に(時には抽出液を注射し終らないうちに)逃走、跳躍等のような不安状態を示し、次いで横が位となり、後肢または全身の強直性けいれん(反弓緊張)を起し、更に呼吸促進、呼吸困難等の諸症状を呈して中毒状態に陥る。中毒動物の転帰は、動物の体重及び抽出液の投与量によって異なり、(a)中毒症状発現の途中において瞳孔散大をきたしてへい死するもの、(b)やがて症状緩解して回復するもの、及び(c)症状軽微であって、横が位から直ちに起立回復するものの3種類に大別できる。付表の実験成績ではこれら3種類の中毒症状の程度をそれぞれ+D, +及び±として示した。また全く症状を呈しなかったものは-とした。

#### 5. 動物.

使用した動物は主として体重 15gm 前後の (13-17 gm) 健常雄 DD 系マウスである。被検液の投与は尾静脈内注射によって行った。なお、マウスの尾静脈内注射に耐え得る最大液量を知るため行った予備実験で、一般に 13gm のマウスでは 1.0ml 食塩水の尾静脈内注射は全く無害であったが、1.5ml では注射直後一過性に跳躍、逃走を示すものがあった。この成績からマウスに対する被検液の1回注射量を 1.0ml 以内とし、また注射をできるだけ徐々に行うことによって、血管内注射による不慮の障害の発生防止に万全を期した。更に各実験毎に対照マウス群を置いて、適用した被検液の最大量に相当する食塩水の尾静脈内注射を行って、その際動物に何ら認むべき症状の起きないことを確かめた。試験動物の観察期間を1週間とし、その間死亡したものはすべて解剖して内臓の病理学的検査を行った。

抽出液の中毒作用はきわめて急性であって、注射後数十秒以内に発病、経過し、いったんこの急性期を耐え得た動物は皆正常に復し、その後の観察期間中に抽出液の毒性作用に因って後発的に死亡したと認められるものはなかった。

第1表は体重 11gm, 15gm, 20gm, 及び 23 gm の4群のマウスについて行った抽出液の毒性試験の成績を示したものである。この実験では各被検量に対してマウス2匹を実験に供した。この表から抽出液の毒性が動物の体重によって著しい影響を受けることが明らかである:

(1) 11gm マウスに対しては、抽出液の 0.1 ml は何ら認められる作用を示さなかったが、0.2ml は強い毒性を呈し、更に 0.3ml は試験 2 匹を致死させた。

(2) 15gm マウスに対しては、抽出液 0.3 及び 0.5ml はすべて致死性的であった。

(3) 20gm マウスに対しては、抽出液 0.3 ml は無害であったが、0.5ml は強い毒性作用を示した。

(4) 23gm マウスに対しては、抽出液 0.5 ml は無害であったが、1.0ml は軽微な毒性を示した。

(5) 各群の食塩水のみを静脈内注射した対照マウスはいずれの場合でも全く正常であった。

以上の実験成績から体重15gm前後のマウスが本研究実験に好適であることがわかる。

なお、抽出液の静脈内注射によってへい死したマウスの病理解剖所見としては、肉眼的に腹腔内臓器では腸管及び腸間膜の血管に拡張、充血が著明であった。また顕微鏡検査所見としては、脾及び腎において血管系に軽度ないし中等度の血管の拡張と充血を認め、肝では実質肝細胞に軽度の退行性変化があり血管は拡張をきたしているが充血量は少なく、脳では血管周囲における浸出性変化のため実質全般に軽度の水腫性変化が認められた。

## 2. 抽出液の投与方法と毒性作用との関係。

前記実験によって、結核菌の食塩水抽出液が静脈内注射によってマウスに対して強い毒性作用を呈することが実証されたのであるが、ここに注目されることは、抽出液の毒性が投与方法によって著しく相違するという事実である。第2表は抽出液の投与方法と毒性との関係を検した実験例であるが、この表に明らかなように、抽出液0.5mlを静脈内に注射された3匹のマウスは全部激しい中毒症状を起してへい死したのであるが、等量の抽出液を腹腔内又は皮下に注射されたマウスはいずれも認むべき症状を示さなかった。

## 3. 結核菌の菌浮遊液並びに無細胞性抽出液についての毒性試験。

結核菌の食塩水抽出液の組成は、その調製法から明らかなように、決して均一、単純なものではなくて、その中には少数ではあるが結核菌が残存しており、また調製操作中に一部菌体の破壊が起って、そのため菌体内成分の混在も予想される。これらの点について検討を加える目的をもって、結核菌浮遊液並びに菌体を破壊して得られる無細胞性抽出液の2つの材料について、マウスに対する毒性の有無を検索した。

### (a) 菌浮遊液についての実験。

食塩水抽出液の調製法に従って、まず結核菌

1gmに食塩水を5mlの割合に加えて作った菌浮遊液を原液とし、その一部をとって、食塩水をもって約1mg/mlに希釈したものを被検結核菌浮遊液（菌数 =  $65 \times 10^7$ /ml）として用いた。残りの菌原液を遠心して食塩水抽出液（菌数 =  $19.7 \times 10^7$ /ml）を分離した。第3表はマウスの尾静脈注射による菌浮遊液及び食塩水抽出液の毒性比較試験の成績を示したものである。この表から明らかなように、抽出液が体重15-16gmのマウスに対し、0.3mlで重篤症状を起し、0.5mlで動物を致死せしめたのに対し、菌浮遊液0.5-1.0mlの静脈内注射は体重11-15gmのマウスに対し何ら認むべき症状を起さなかった。

この成績から食塩水抽出液の毒性が、単に混在しているごく少数の結核菌自体の作用——例えば菌による小血管腔の閉そくのような機械的障害等の如く——によるものではないと言える。

### (b) 無細胞性抽出液についての実験。

第4表は破壊菌体の無細胞性抽出液と食塩水抽出液との毒性比較試験の成績である。

破壊菌体抽出液の調製：菌体1gmを乳鉢にとり、これに2.5gmの滅菌酸化アルミナ（和光，No.800）を加え十分に研摩破碎し、次いで5mlの食塩水を滴加しながら更によく研摩する。かくして得られた泥状液の1滴をデッキグラスに塗まつし、石炭酸フクシン染色を施して顕微鏡検査し、結核菌がほとんど検出されないまでに至ったならば、泥状液を最初4,000R.P.M.，10分間1回、次いで10,000R.P.M.，30分間2回遠心を行い、分離した上清液を破壊菌体抽出液として使用した。

表示のごとく、食塩水抽出液0.5mlは、15gmマウスをすみやかに致死せしめるほどの強力な毒性を呈したにもかかわらず、等量の破壊菌体抽出液はほとんど毒性を示さなかったという興味ある結果が得られた。しかも破壊菌体抽出液の無効性が、使用した酸化アルミナによる毒性活性の吸着によるものでないことは、食塩水抽出液に酸化アルミナを加えただけではその

毒性効果に何ら変化がなかったという対照実験の成績からも明らかである。すなわちこの実験成績から食塩水抽出液の毒性作用が、調製操作中に起った破壊菌体から放出されたものでないことがわかる。

以上の2実験から、食塩水抽出液の毒性作用の出どころが、菌体外性に由来したものであると断定できるのであって、おそらく密集して増殖した結核菌菌塊内部に蔵されていた活性因子が、菌塊を食塩水で粉碎抽出する際メヂウム内に放出されるに至ったものと推想される。

## II. 抽出液調製条件の吟味

### 1. 菌 株.

人型、牛型、鳥型、Timothy 型及び非定型結核菌等総計18株について、上記青山B株に適用したと同様の方法で各菌株の Sauton 培養（培養日数は菌株によって異なる）菌体から食塩水抽出液を調製して、抽出液のマウスに対する毒性を比較検査した。第5表は毒性試験の成績を一括表示したものである。この表から下記諸事項が指摘される。

(a) 人型菌から得られた抽出液はすべて毒性はなほだ強力であって、その0.5mlは14—16gm マウスに対して致死性であった。また強毒株(H37Rv)と弱毒株(H37Ra)及び薬剤感受性株と薬剤耐性株との間には、抽出液の毒性に差がなかった。

(b) 牛型菌では、BCG 抽出液は人型菌抽出液と同等の毒性を示したが、No.10 抽出液の毒性はかなり弱かった。

(c) 鳥型、Timothy 型及び非定型菌から得られた抽出液は、いずれも皆毒性認め難く、0.5mlの静脈内注射は14—15gm マウスに対して何ら症状を起さなかった。

ところで結核菌の食塩水抽出液の有毒性が人型及び牛型菌に限られた特性であるとの結果は、さきに結核菌の食塩水抽出液の抗 Strep-tolysin-S 作用の研究<sup>1)</sup>において得られた成績と全く軌を一にしているのであって、両者の相似性を示唆したのものとしてはなほだ興味深い。

### 2. 培 養 日 数.

第6表は青山B株を Sauton 培地に培養し、培養日数と菌体の食塩水抽出液の対マウス毒性との関係を検した実験成績である。この表から明らかなように、培養3日から6週間までは抽出液の毒性は皆一様に強力であって、抽出液0.3—0.5mlは14—16gm マウスに対して致死性であった。しかし培養が更に長期に及ぶと抽出液の毒性は次第に減弱の傾向を示し、10週間培養から調製した抽出液は大量1.0mlをもってしてもマウスに中毒症状を起さなかった。

### 3. 培 地.

青山B株を Sauton 培地、10%ウサギ血清加 Kirchner 培地及び5%グリセリン・ブイオンの3種培地に2週間培養し、各培養菌体から食塩水抽出液を調製して、その毒性を比較検査した。第7表に示したごとく、Sauton 培地及び Kirchner 培地発育菌からはほぼ同等の強力毒性をもった抽出液が得られたが、グリセリン・ブイオン発育菌からの抽出液の毒性は前2者に比してやや弱いという成績であった。

### 4. 抽出用メヂウム.

蒸留水、M/60 リン酸緩衝液(pH6.8)及び生理的食塩水の3種類のメヂウムを用いて結核菌を抽出し、各抽出液のマウスに対する毒性を（蒸留水抽出液には食塩を0.85%になるように追加した）比較検査した（第8表）。表示のごとく、各抽出液は0.3—0.5mlの注射によってマウスを致死せしめたのであって、3種の抽出液の間には毒性の強さにおいて有意義な差異は認められなかった。

### 5. 抽 出 温 度.

食塩水をもって型のごとく結核菌の浮遊液をつくり、これを20°C(室温)及び37°Cで30分ないし5時間放置——時々振とうしながら——した後、遠心し、得られた抽出液について毒性試験を行って第9表の成績を得た。すなわち、20°C、30分放置の抽出液の毒性はすでにはなほだ強力であって、しかも抽出時間を5時間に延長しても毒性の増大は認められなかった。しかし、37°C 抽出液の毒性は室温抽出液に比し

てやや弱いという成績であったが、これは後述のごとく、抽出液の毒性が熱に対して不安定性であるという性質によるものではなかろうかと解される。

### III. 抽出液の性状.

#### 1. 細菌濾過器通過試験.

Chamberland L<sub>1</sub> 及び L<sub>3</sub> 型細菌濾過器を用いて、濾過器通過による抽出液の毒性の影響を検索した。第10表はその実験成績を示したものであって、濾過前の抽出液は、0.3—0.5ml 投与によってマウスを致死せしめたほどの毒性を示した。一方、L<sub>1</sub> 型濾過器を1回あるいはL<sub>1</sub> 型次いでL<sub>3</sub> 型濾過器と連続2回通過させた無菌濾液は、いずれもその1.0ml 投与で激しい中毒症状を呈したが、0.5ml では作用がなかった。この結果から、抽出液の毒性が、濾過操作によっていくぶん減弱（吸着によるものであろう）したとはいえ、細菌濾過器通過性であることが実証されたわけである。同時にこのことから抽出液の毒性活性が菌体自体とは全く無関係であることが更に確かめられた。

#### 2. 透析試験.

食塩水抽出液5mlを透析膜 (Visking Seamless Cellulose Tubing) に入れ、これを1*l* の生理的食塩水に対して氷室内で3日間透析を行った。その間透析外液を毎日1回更新した。第11表に示したように、透析後の抽出液はマウスに対する毒性において透析しなかった対照抽出液と全く変わるところがなかった。

#### 3. 加熱試験.

第12表は抽出液を56°, 70°, 80°, 100°Cで30分ないし8時間加熱した時の毒性の変化をしらべた実験成績である。この成績から、抽出液の毒性は

- (a) 100°C, 30分の加熱によって完全に失われる,
- (b) 80°C, 2時間の加熱によって著しく減弱する,
- (c) 70°C, 1時間ではほとんど変化がないが、4時間の加熱では著明に減ずる,

(d) 56°C, 3及び5時間の加熱ではほとんど変化がない、  
ことが実証された。

#### 4. 酸, アルカリの影響.

第13表は抽出液に塩酸 (N/5, N/50), 酢酸 (N/10, N/50), カセイソーダ (N/5, N/50) 及びアンモニヤ (5.6%, 0.56%) を25°Cで作用させた場合における毒性の変化を検した実験成績である。この実験に使用した食塩水抽出液は、結核菌1gmに対し食塩水2.5mlの割に加えてつくったものである。抽出液2.0mlに酸またはアルカリ0.5mlを加えて一定時間放置した後、NaOHまたは酢酸で中和し、更に食塩水を追加して全量を4.0mlとしたものを毒性試験に用いた。

表に示したように、抽出液の毒性は、

(a) N/5及びN/50塩酸の3時間処置並びにN/10酢酸の3時間処置によって不活性化されたが、N/5塩酸による30分処置並びにN/50酢酸の3時間処置では変化しなかった。

(b) N/5及びN/50カセイソーダの3時間処置で失活したが、N/50カセイソーダの30分処置並びに5.6%アンモニヤの3時間処置によって影響を受けなかった。

#### 5. 有機溶媒に対する態度.

(a) アルコール及びアセトンによる沈澱試験。

食塩水抽出液1容量に対し、2容量のメチールアルコールまたはアセトン、あるいは1容量のエチールアルコールを加える。生じた沈澱を遠心分離し、食塩を加えて沈澱を溶解して原容量とする。かくして得られたアルコールあるいはアセトン沈澱分画についてマウスに対する毒性の有無を検した。第14表に示したように、抽出液から得られた3種のアルコールまたはアセトン沈澱分画溶液は、原抽出液とほぼ同等の毒性を示し、各被検液の0.5mlは15gmマウスに対し致死的であった。

(b) 石油エーテル及びエチールエーテルによる抽出試験。

食塩水抽出液5mlに対し石油エーテルまたは

エチールエーテル 35ml をもって3回連続振とう処置した後、抽出液の毒性作用の変化をしらべた。第14表の成績から明らかなように、抽出液の毒性は石油エーテル及びエチールエーテルをもって反復振とう抽出を行っても少しも減弱

## 考 察

上記の実験成績によって、Sauton 培地上に培養した人型結核菌青山B株の菌膜を生理的食塩水をもって破碎して濃厚な菌浮遊液とし、その遠心上清液あるいは無菌濾液をマウスの静脈内に注射すると、動物は急激な中毒症状を呈し、重篤な場合には短時間内にへい死することが実証された。しかも結核菌体を破壊して得られる無細胞性抽出液や菌体自体を注射しても同様な中毒症状が起らなかった事実から、抽出液の毒性作用は、Sauton 培地上で多数の結核菌が互に密着しながら分裂増殖する時、菌集塊の内部に蓄積された菌体外産物質に由来したものと考えられるのであって、菌塊の機械的破碎によってこの有毒物質がメヂウム中に溶出するに至ったものであろう。

細菌の菌体外すなわち細胞壁 (Cell wall) の外側にいろいろの物質が、あるいは厚くあるいは薄く附着して菌体を被覆していることは多くの細菌類について実証されている所であって、近年この菌体外表面層物質 (Extracellular surface components) に関する研究はめざましい進歩をきたし、なかんずく肺炎双球菌における多糖体莢膜やサルモネラ菌類における Endotoxin のごときはきわめて重要な生物学的意義をもつことが明らかとなった<sup>3)</sup>。しかるに結核菌においては、ただわずかに Knaysi<sup>4)</sup> 及び Werner<sup>5)</sup> が結核菌の電子顕微鏡検査において、菌体外に一種の Slime 様のものを認めたと報告しているだけであって、菌体外表面層

しなかった。

以上の実験成績から、結核菌の食塩水抽出液の毒性因子が、アルコール及びアセトン沈澱性で、石油エーテル及びエチールエーテル不溶性であることが実証された。

物質に関する知見は今なおはなはだ乏しい。しかし、この問題と関連して、Youmans 等<sup>6)</sup> が結核菌の血管内大量 (10-12mg) 感染によるマウスの急性死の原因として、結核菌の毒性因子の存在について言及しているのは注目し得る。

なお最近 Bloch<sup>7)</sup> によって結核菌体からマウスに対し毒性作用を示す脂質性物質いわゆる Cord Factor が分離されているが、著者等の食塩水抽出液が Cord Factor と異なることは、両者の性状やマウスに対する毒性作用の相違によって明らかである。著者等の観察した結核菌の食塩水抽出液の毒性因子がはたして菌体外表面層物質なりやいなや直ちに断定し得ない所であるが、本研究の成果は、さきに伊藤・細川<sup>1,2)</sup> が報告した食塩水抽出液の抗 Streptolysin 作用の実証と共に、この方面の今後の研究に有力な示唆を与えるものでなからうか。

食塩水抽出液中の毒性因子やその作用機序については本研究の結果からはとうてい十分な説明は得られないのであるが、ここで少なくとも次の点が注目される。

(1) 毒性因子はアルコール及びアセトン沈澱性、エーテル不溶性の高分子性物質であろう。

(2) 毒性作用が抽出液の血管内注入によって発現し、しかも速効性であることや、剖検所見等から推想して、作用因子の侵襲拠点は血管系であろう。

## 結 論

1. Sauton 培地上に約2週間培養した人型結核菌青山B株の洗浄菌体1部に対し食塩水5部を加え室温で摩擦してつくった濃厚菌浮遊液

の遠心上清液またはその無菌濾液 (食塩水抽出液) の 0.3-0.5ml を体重 15gm 前後の DD 系マウスに静脈内注射すると、動物は急激に無力状

態，呼吸困難，けいれん等の症状を示し，へい死した。

2. 食塩水抽出液のマウスに対する毒性は皮下または腹腔内注射では発現しなかった。

3. 人型及び牛型結核菌から得られた食塩水抽出液はすべて強い毒性を示したが，鳥型，Timothy 型及び非定型結核菌の食塩水抽出液には毒性は認められなかった。

4. 食塩水抽出液の毒性に及ぼす培地，培養日数，抽出メヂウム及び抽出温度の影響について検討した。

5. 食塩水抽出液の毒性に対する諸種理化学的処置の影響を検して，抽出液の毒性が，

- (a) 非透析性である，
- (b) 塩酸，酢酸，カセイソーダ処置によ

って破壊されるが，アンモニヤには比較的安定である，

(c) 100°C，30分の加熱で不活性される，

(d) メチール及びエチールアルコールやアセトンで沈澱する，

(e) 石油エーテルやエチールエーテルに不溶性である，  
ことを確かめた。

本研究の病理組織標本検査には当研究所細菌免疫部岩倉衛博士の御援助を賜わった。

本研究の遂行には文部省科学研究費の補助を受けた。

## 文

1. Ito, R. and Hosokawa, K.: Jap. J. Tuberc., 7, 1, 1959.
2. 細川孝一：金大結研年報，16, 489, 1958.
3. Salton, M. R. J.: The bacteria, edited by Gunsalus, I. C. and Stanier, R. Y., I, 97, 1960.
4. Knaysi, G. et al.: J. Bact., 60, 423, 1950.

## 献

5. Werner, G. M.: Adv. Tuberc. Res., IV, 53, 1951.
6. Youmans, G.P. and Youmans, A. S.: Amer. Rev. Tuberc., 64, 534, 1951.
7. Bloch, H.: J. Exp. Med., 91, 197, 1950.

Table 1  
The toxicity of intravenous injection of saline extract of  
*M. tuberculosis* Aoyama B on mice

Mice		Dose of extract (ml)	Result
Body weight (gm)	Number		
11	7	0.1	-
		0.1	-
		0.2	+
		0.2	+
		0.3	+D
		0.3	+D
		saline 0.3 (Control)	-
15	5	0.3	+D
		0.3	+D
		0.5	+D
		0.5	+D
		saline 0.5 (Control)	-
20	5	0.3	-
		0.3	-
		0.5	+
		0.5	+
		saline 0.5 (Control)	-
23	5	0.5	-
		0.5	-
		1.0	±
		1.0	±
		saline 1.0 (Control)	-

+D = Died from the toxic symptoms.

+ = Recovered from the toxic symptoms.

± = Slight degree of the toxicity.

- = No toxic symptom.

Table 2  
Influence of route of administration upon the toxicity  
of saline extract of *M. tuberculosis*

Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract (ml)	Route of administration	Result
15	0.5	intravenously	+D
15	0.5		+D
15	0.5		+D
15	0.5	intraperitoneally	-
15	0.5		-
15	0.5		-
15	0.5	subcutaneously	-
15	0.5		-
15	0.5		-



Table 3  
Comparative experiments on the toxicity for mice of bacterial suspension and of saline extract of *M. tuberculosis*

Material	Number of bacilli per ml	Body weight of mice (gm)	Dose (ml)	Result
Bacterial suspension	$65 \times 10^7$	11	0.5	-
		11	0.5	-
		11	0.5	-
		13	0.5	-
		13	0.5	-
		13	0.5	-
		15	1.0	-
		15	1.0	-
		15	1.0	-
Saline extract	$19.7 \times 10$	15.5	0.3	+
		16	0.3	+
		15	0.5	+D
		15	0.5	+D
Saline	(Control)	15	1.0	-
		15	1.0	-

Table 4  
The toxicity for mice of the supernatant from tubercle bacilli disrupted with Aluminium oxide in comparison with that of saline extract

Material	Body weight of mice (gm)	Dose (ml)	Result
Saline extract	15.5	0.5	+D
	15	0.5	+D
Supernatant of tubercle bacilli disrupted with $Al_2O_3$	14.5	0.5	$\pm$
	15	0.5	-
	15	0.5	-
Saline extract treated with $Al_2O_3$ (Control)	14.5	0.5	+D
	15	0.5	+D

Table 5  
Comparison of the toxicity for mice of saline extracts from  
different strains of *M. tuberculosis*

<i>M. tuberculosis</i>		Age of culture	Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract (ml)	Result
Type	Strain				
Human	Aoyama B	2 weeks	14.5	0.5	+D
			14	0.4	+D
			15	0.3	+D
			15.5	0.1	+
	PAS-resistant Aoyama B	3 weeks	15.5	0.5	+
			15.5	0.5	+
	SM-resistant Aoyama B	3 weeks	16	0.5	+D
			16	0.5	+D
H37Rv	2 weeks	14.5	0.5	+	
		14.5 14	0.5 0.8	+D	
H37Ra	2 weeks	14	0.5	+D	
		15	0.5	+	
H <sub>2</sub>	2 weeks	14	0.5	+D	
		14	0.5	+D	
		13	0.3	+	
Nagahama	3 weeks	14	0.5	+D	
		16	0.3	+	
Frankfurt	5 weeks	14	0.5	+	
		15	0.5	+	
Bovine	BCG	7 weeks	14.5	0.5	+D
			15	0.5	+D
No. 10	7 weeks	15	0.5	±	
		15.5	0.5	±	
Avian	Takeo	9 days	15	0.5	-
			15.5	0.5	-
Timothy	Phlei	1 week	15	0.5	-
			15.5	0.5	-
Atypical	No. 1	2 weeks	15	0.5	-
			15.5	0.5	-
	No. 6	9 days	15	0.5	-
			15.5	0.5	-
	No. 22	1 week	14	0.5	-
14.5			0.5	-	
Yamamoto S	2 weeks	14.5	0.5	-	
		15	0.5	-	
607	4 days	15	0.5	-	
		15	0.5	-	

Table 6  
Influence of age of cultures on the toxicity of saline extract  
of *M. tuberculosis* grown on Sauton's medium

Age of culture	Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract (ml)	Result
3 days	15	0.3	+
	14	0.5	+
1 week	15.5	0.2	+
	15.5	0.2	+
	15.5	0.3	+D
	15.5	0.5	+D
2 weeks	15.5	0.3	+
	15	0.5	+D
	15.5	0.5	+D
	16	0.5	+D
4 weeks	15	0.5	+
	15.5	0.5	+
	15.5	0.5	+
6 weeks	14	0.3	+D
	14	0.5	+D
	15	0.5	+D
8 weeks	15.5	0.5	-
	16	0.5	-
	16	0.8	+D
	15.5	1.0	+D
10 weeks	15	0.5	-
	15.5	0.5	-
	15.5	1.0	±
	17	1.0	-

Table 7  
Comparison of the toxicity for mice of saline extract of  
*M. tuberculosis* grown on different media

Medium	Body weight of mice (gm)	Saline extract		Result
		Dilution	Dose (ml)	
Kirchner's medium containing 10% rabbit's serum	14	undiluted	0.5	+D
	14		0.5	+D
	14	1 : 2 diluted	0.3	-
	14		0.3	-
	14		0.6	+
	16		0.6	+
	5% Glycerol-broth	13	undiluted	0.3
14		0.5		+
15		0.5		+
14		1 : 2 diluted	0.5	±
15			0.5	±
15			0.5	±
Sauton's medium	14	undiluted	0.5	+D
	14		0.5	+D
	13	1 : 2 diluted	0.3	±
	13		0.3	±
	14		0.6	+
	16		0.6	+

Table 8  
Effect of media used for extraction of tubercle bacilli  
on the toxicity of the extracts

Medium used for extraction	Body weight of mice (gm)	Dilution of extract	Dose of extract (ml)	Result
Distilled water	16	undiluted	0.1	+
	15.5		0.1	+
	15		0.2	+
	15		0.2	+
	15		0.3	+D
	15		0.3	+D
	15	diluted 1:2	0.3	-
	15		0.3	-
	16		0.5	+
	17.5		0.5	+
	16		1.0	+D
	16.5		1.0	+D
	15	diluted 1:5	1.0	-
	15		1.0	-
M/60 phosphate buffer solution (pH6.8)	16.5	undiluted	0.1	-
	17		0.1	-
	13		0.3	+
	14		0.3	+
	13		0.5	+D
	14		0.5	+D
	15	diluted 1:2	0.5	-
	15		0.5	-
	15		1.0	+
	14.5		1.0	+D
0.85% NaCl	13.5	undiluted	0.1	+
	14		0.1	+
	15		0.3	+D
	15		0.3	+D
	15	diluted 1:2	0.1	-
	15		0.1	-
	14		0.3	+
	15		0.3	+

Table 9  
Effect of temperature and time on extraction on the toxic  
activity of *M. tuberculosis*

Extraction		Body weight of mice(gm)	Dose of extract		Result
Temp. (°C)	Time		Dilution	ml	
20	30 min.	13	undiluted	0.3	+D
		12.5	1 : 2	0.3	+
	2 hr.	13	undiluted	0.3	+D
		12.5	1 : 2	0.3	+
	5 hr.	13	undiluted	0.3	+D
		12.5	1 : 2	0.3	+D
37	30 min.	13	undiluted	0.3	+
		13		0.3	+
	2 hr.	13		0.3	+
		12.5		0.3	+
	5 hr.	13		0.3	+
		12.5		0.3	+

Table 10  
Effect of filtration through Chamberland candles on the  
toxicity of saline extract of *M. tuberculosis*

Material	Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract (ml)	Result
Original saline extract	15	0.3	+
	15	0.3	+
	15.5	0.5	+D
	16	0.5	+D
Chamberland L <sub>1</sub> filtrate	16	0.5	-
	16.5	0.5	-
	16.5	1.0	+
	17	1.0	+
Chamberland L <sub>1</sub> and L <sub>3</sub> filtrate	16	0.5	-
	16.5	0.5	-
	15.5	1.0	+
	16	1.0	+
Saline (Control)	15	1.0	-
	15.5	1.0	-

Table 11  
Dialysis test on the toxic activity of saline extract  
of *M. tuberculosis*

Saline extract	Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract (ml)	Result
Dialysed*	16	0.5	+D
	16	0.5	+D
Non-dialysed	16	0.5	+D
	16	0.5	+D

\* 5ml saline extract contained in a cellulose tube was dialysed against 1 litre saline with daily exchange for 3 days in a cold room.

Table 12  
Effect of heating on the toxic activity of saline extract  
of *M. tuberculosis*

Heating		Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract (ml)	Result
°C	Time			
Non-heated (Control)		16	0.5	+D
		16	0.5	+D
56	1 hr.	15.5	0.5	+D
		16	0.5	+D
	3 hr.	15.5	0.5	+D
		16	0.5	+D
	5 hr.	15.5	0.5	+
		16	0.5	+
	8 hr.	15.5	0.5	+
		16	0.5	+
70	1 hr.	15	0.5	+
		15	0.5	+
	2 hr.	15	0.5	+
		16	0.5	+
	4 hr.	16	0.5	±
		16	0.5	±
80	30 min.	15	0.5	+
		15	0.5	+
	1 hr.	15	0.5	+
		15	0.5	+
	2 hr.	15	0.5	±
		15	0.5	±
100	30 min.	14	0.5	-
		15	0.5	-



Table 13  
Effect of acids and alkalis on the toxic activity of saline  
extract of *M. tuberculosis*

Treatment with acid or alkali			Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract (ml)	Result
Acid or alkali	Final concentration	Time			
HCl	N/5	30 min.	15	0.5	+D
			15	0.5	+D
		3 hr.	16	1.0	-
			16	1.0	-
	N/50	30 min.	15	0.5	+D
			15	0.5	+D
3 hr.		16	1.0	-	
		17	1.0	-	
Acetic acid	N/10	3 hr.	17	0.5	-
			17	1.0	-
	N/50	3 hr.	17	0.5	+D
			17	0.5	+D
NaOH	N/5	30 min.	15	0.5	+D
			15	0.5	+D
		3 hr.	17	0.5	-
			17	1.0	±
	N/50	30 min.	15	0.5	+D
			16	0.5	+D
5 hr.		16	0.5	-	
		17	0.5	-	
NH <sub>4</sub> OH	5.6%	3 hr.	17	0.5	+D
			17	0.5	+D
	0.56%	3 hr.	17	0.5	+D
			17	0.5	+D
Saline extract without treatment			17	0.5	+D
			17	0.5	+D

Table 14

Effect of precipitation or extraction with various organic solvents  
on the toxicity of saline extract of *M. tuberculosis*

Treatment of saline extract		Body weight of mice (gm)	Dose of saline extract (ml)	Result
Precipitation with	Methanol	15	0.5	+
		15	0.6	+D
	Acetone	15	0.5	+D
		15	0.5	+D
	Ethanol	15	0.5	+
		15	0.5	+D
Extraction with	Petroleum ether	15	0.5	+D
		16	0.5	+D
	Ethyl ether	15	0.5	+D
		16	0.5	+D
Saline extract without treatment		15	0.5	+D
		15	0.5	+D