

結核菌浮游液調製ニ關スル研究竝ニ 補體結合反應ニ及ボス影響ニ就テ

(昭和 14 年 11 月 15 日受領)

醫學士 鴻 上 光 明

目 次

第一章 緒 言	(1) 實驗方法
第二章 乾燥結核菌ノ食鹽水浮游液調製ニ就テ	(2) 實驗結果
(1) 浮游液トナラザル乾燥結核菌粉末ニ對スル諸種ノ處理方法ト浮游液ノ能、不能	第五章 「アセトン」處理結核菌ノ自家抑制作用ノ消長
(2) 結核菌粉末ノ生理的食鹽水浮游液ノ能、不能ト「アセトン」可溶性物質トノ關係	(1) 實驗方法
第三章 「アセトン」處理方法ト乾燥方法ニ就テ	(2) 實驗結果
(1) 「アセトン」處理方法	第六章 「アセトン」處理結核菌ノ結核補體結合性能力
(2) 乾燥方法	(1) 實驗方法
第四章 「アセトン」抽出液ノ性状	(2) 實驗成績
第一節 「アセトン」抽出液ノ自家抑制作用及ビ結核竝ニ微毒補體結合性抗元能力ノ有無	第七章 總括竝ニ考案
	第八章 結 論
	文 獻

第一章 緒 言

余ハ補體結合反應ニ使用スル抗元トシテ結核菌ノ乾燥粉末ヲ瑪瑙乳鉢中ニ生理的食鹽水ヲ以テ磨碎シタル浮游液トシテ使用ス。然ルニ乾燥結核菌粉末ハ之ヲ生理的食鹽水ヲ以テ磨碎浮游液ヲ調製スル際、全然平等ナル「ズ、ベンヂオン」(浮游液)トナラズ菌ガ互ニ粘著シ會ヒテ飴狀ノ塊トナリテ食鹽水トナジマス恰モ蠟又ハ脂肪ヲ水ヲ以テ擦潰シタルガ如キ状態トナルコト屢々アリ。斯カル乾燥菌ノ状態ニ遭遇シタル場合ハ勿論補體結合反應ヲ施行スルコト不能ナリ。吾々ノ實驗室ニ於テハ既ニ早クヨリ此ノ現象アルニ注目シタルモ乾燥結核菌ヲ鹽化「カルシウム」乾燥器中ニ貯藏スル方ガ室内ニ放置スルコトヨリモ「ズ、ベンヂオン」トナリ易キヲ以テ此ノ方法ニ依リテ今日マデ不便ヲ忍ンデ辛ウジテ浮游

液ヲ調製シテ實驗ヲ行ヒ來レリ。然ルニ今夏季(昭和 14 年)酷暑ノ候ニ至リテ余等ノ實驗室ニテ所有スル數株ノ結核菌粉末盡ク「ズ、ベンヂオン」トナラズ尙又他ノ研究室ヨリ分讓ヲ受ケタル數株ノ結核菌粉末ニ就キテ檢シタルニ之等ノモノモ同様ニ浮游液調製不可能ナレリ。茲ニ於テ如何ナル條件ノ下ニ於テモ充分ヨク「ズ、ベンヂオン」ノ状態トナルガ如ク乾燥結核菌粉末ニ改良ヲ加フル必要アルヲ痛感スルニ至レリ。

余ハ最も簡單ニ而モ例外ナク常ニ乾燥結核菌粉末ヲ「ズ、ベンヂオン」可能ナラシムル方法竝ニ其ノ補體結合反應ニ關係スル事項等ニ關シテ實驗的研究ヲ行ヒタルヲ以テ茲ニ其ノ結果ヲ報告セントス。

第二章 乾燥結核菌ノ食鹽水浮游液調製ニ就テ

(1) 浮游液トナラザル乾燥結核菌粉末ニ對

スル諸種ノ處理方法ト浮游液ノ能、不能

乾燥結核菌粉末ハ室温寒冷ニシテ且ツ濕氣少キ候ニ於テハ食鹽水ヲ以テ乳鉢中ニ磨碎スルニ平等ナル「ズ、ベンゼオン」トナリ易ク反之温度高ク濕氣ニ富ム夏季等ニ於テハ「ズ、ベンゼオン」トナリ難キコト等ヨリ推シテ浮游液調製不能ナル乾燥結核菌粉末ヲ24時間氷室ニ貯藏シタル後「ズ、ベンゼン」ノ可否ヲ檢シタルニ余ノ使用シタル結核菌ニアリテハ盡ク「ズ、ベンゼオン」トナラズ。尙又鹽化「カルシウム」乾照装置ニ入レタルマ、氷室ニ24時間放置シタルモノモ同様ニ「ズ、ベンゼオン」トナシ得ザリキ。

又「ズ、ベンゼオン」トナラザルモノヲ乾熱器中ニ130°Cマデ加温シタルモノニ就キテ試ミタルニ之モ亦「ズ、ベンゼオン」トナシ得ザリキ。

今茲ニ懸ツテ結核菌ノ構成スル物質ニ就キテ考察スルニ先人學者ノ研究ニ依レバ蠟質、脂肪質、磷脂質及ビ蛋白質等ヨリナル。而シテ磷脂質及ビ蛋白質等ハ一般ニ水トヨクナジム性質ノモノニシテ蠟質及ビ脂肪質ハ一般ニ水ト甚シクナジミ惡キ性質ヲ有ス。故ニ結核菌粉末ガ「ズ、ベンゼオン」トナラザル所以ノモノハ其ノ蠟質及ビ脂肪質ニ關係スルモノナルコトハ想像スルニ難カラズ。此ノ見地ヨリ余ハ「アセトン」、「ベンツォール」、石油「ベンチン」、「エーテル」、「アルコール」及ビ「クロ、フォルム」等ヲ以テ結核菌粉末ヲ洗滌、乾燥シタルモノニ就キテ「ズ、ベンゼオン」可能、不可能ヲ實驗セリ。

即チ實驗方法トシテ「ズ、ベンゼオン」トナラザル數株ノ乾燥結核菌粉末ニ上記ノ溶劑ヲ加ヘテヨク振盪、數分間後ニ遠心器ニカケ上液ヲ除去シ沈澱菌ヲ更ニ1回同溶劑ニテ洗滌、遠心沈澱菌ヲ乾熱器中ニ50乃至70°Cニ加温乾燥セルモノニ就キテ實驗ヲ行ヘリ。

其ノ結果ハ第1表ニ示セルガ如ク「アセトン」ニテ洗滌シタルモノハ例外ナク最モヨク「ズ、ベ

ンゼオン」トナリ、「ベンツォール」、石油「ベンチン」之ニ次ギ「エーテル」ハ上記ノ如キ操作方法ニ依リテハ菌株ニ依リ「ズ、ベンゼオン」可能ナルモ「アルコール」洗滌ニ依リテハ「ズ、ベンゼオン」トナシ得ザリキ。「クロ、フォルム」ハ之ヲ結核菌粉末ニ加フレバ平等ニ白濁浮游液トナリテ遠心器ニカクルモ菌體ノ沈澱容易ナラズ從ツテ目的ニ對シテ不適當ナルモノト認メラル。

抑々常温ニ於テ「アセトン」ハ結核菌ノ脂肪質ヲ溶解シ且ツ蠟質ノ一部ヲモ溶解スルモノト考ヘラル。「ベンツォール」、石油「ベンチン」等ハ蠟質ノ一部、脂肪質ノミナラズ磷脂質ニ作用シ、「エーテル」、「クロ、フォルム」等ハ蠟質、脂肪質、磷脂質ノミナラズ蛋白質ニモ作用スル性質ヲ有ス。「アルコール」ハ磷脂質溶解性ノ性質ヲ有スルモ蠟、脂肪質及ビ蛋白質等ヲ一般ニ溶解セズ。而シテ「ズ、ベンゼオン」トナラザル結核菌粉末ヲ「アセトン」ニテ洗滌スレバ最モ簡單ニ最モヨク例外ナク「ズ、ベンゼオン」ヲ調製シ得ルコトヨリ考ヘテ結核菌粉末ガ「ズ、ベンゼオン」トナラザル原因ガ果シテ結核菌ノ脂肪質及ビ磷脂質等ガ外温竝ニ湿度等ニ依ツテ變化セル爲メナリト思惟セラル。

斯クノ如ク「アセトン」處理ガ「ズ、ベンゼオン」トナラザル結核菌ヲ「ズ、ベンゼオン」可能ナラシムルニ最モ簡單、良好ナル方法ト認ムルヲ以テ以下「アセトン」處理方法ニ關シテ更ニ詳シク實驗ヲ行ヒ且ツ「アセトン」ニテ處理セラレタル結核菌ガ補體結合反應抗元トシテノ良否其ノ他ニ就キテ實驗ヲ行フコト、セリ。

本實驗ニ使用シタル結核菌 S. T No. 1 及ビ No. 2 ハ「グリセリン、ブイオン」液面ニ發育シタル鴻上氏ノ結核菌株ニシテ同一株ナルモ培養日數等ヲ異ニス。共ニ濕熱100°Cニ30分間殺菌後3回水洗シタルモノヲ130°Cノ乾熱器中ニ乾燥シタルモノナリ。及川株ハ患者喀痰ヨリ分離シ「グリセリン、ブイオン」液面ニ40日培養

第 1 表 浮游液トナラザル乾燥結核菌粉末ニ對スル諸種ノ處理方法ト浮游液ノ能、不能

菌株別	原乾燥結核菌粉末	水室ニ24時間放置	乾燥器ニ水入レテ24時間放置	乾燥器中ニ130°Cマテ加熱	「アセトン」處理	「ベンツォール」處理	石油「ベンチン」處理	「エーテル」處理	「アルコール」處理	「クロ、フォルム」處理
S. T. No. 2	平等ナル浮游液トナラズ	平等ナル浮游液トナラズ	平等ナル浮游液トナラズ	平等ナル浮游液トナラズ	平等ナル浮游液トナラズ	浮游液トナルモ塊粗大	浮游液トナルモ塊粗大	平等ナル浮游液トナラズ	平等ナル浮游液トナラズ	菌粉末ニ「クロ、フォルム」平遠シ遠シ菌體ナラズ目ニ適セズ
S. T. No. 1	〃	〃	〃	〃	〃	平等ナル浮游液トナル	平等ナル浮游液トナル	〃	〃	
及川	〃	〃	〃	〃	〃	〃	浮游液トナルモ塊粗大	〃	〃	
「エールリッヒ」	〃	〃	〃	〃	〃	〃	平等ナル浮游液トナル	平等ナル浮游液トナル	〃	

第 2 表 結核菌粉末ノ生理的食鹽水「ズ、ベンチオン」能、不能ト「アセトン」可溶性物質トノ關係

菌株別	「ズ、ベンチオン」能、不能	「アセトン」可溶性物質ノ多少
S. T.	「ズ、ベンチオン」トナラズ	卅
「エールリッヒ」9週間培養	トナラズ	+
「エールリッヒ」4週間培養	トナラズ	卅
三宅	トナラズ	+
及川	トナラズ	卅

ノモノヲ濕熱 100°C 30 分間殺菌 シタルモノヲ數回水洗、37°C ノ孵卵器中ニ乾燥シタルモノナリ。「エールリッヒ」株ハ同様「グリセリン、ブイオン」液面ニ4週間培養ノモノヲ濕熱 100°C 30 分間殺菌、3 回ヨク水洗、130°C ノ乾熱器中ニ乾燥シタルモノナリ。本實驗ヲ行ヒタルハ8 月中旬酷暑ノ候ナリ。

(2) 結核菌粉末ノ生理的食鹽水浮游液能、不能ト「アセトン」可溶性物質トノ關係

余ハ又試ニ數株ノ結核菌ニ就キテ「アセトン」可溶性物質ノ多少ト「ズ、ベンチオン」ノ難易トノ間ニ何等カノ關係アルカ否カニ就テ檢索シタ

ルニ第 2 表ニ示ス如ク「アセトン」可溶性物質多キモノハ「ズ、ベンチオン」トナリ難ク「アセトン」可溶性物質少キモノハ「ズ、ベンチオン」トナリ易キコトヲ認メタリ。此ノ事實ヨリスルモ「ズ、ベンチオン」トナリ難キ粘著物質ハ「アセトン」可溶性物質即チ蠟質及ビ脂肪質等ナルコトヲ窺知スルコトヲ得。

本實驗ニ供シタル結核菌 S.T. 「エールリッヒ」、及川株ハ前記實驗(1)ニ使用シタルト同様ノモノニシテ三宅株ハ患者喀痰ヨリ分離シ「グリセリン、ブイオン」溶面ニ1ヶ月間培養ノモノヲ濕熱 110°C ニ殺菌、水洗、130°C ニ乾熱器中ニ乾燥セルモノナリ。本實驗ヲ行ヒタルハ8 月下旬ニシテ「エールリッヒ」株9週間培養ノモノ及ビ三宅株モ此ノ時季ニハ原菌粉末ノマ、ヨク「ズ、ベンチオン」可能ナリシモ8 月初旬ノ酷暑ノ候ニ於テハ一時「ズ、ベンチオン」調製不可能ナリシモノナリ。「アセトン」可溶性物質ノ多少ヲ檢スル方法ハ被檢菌約 30 mg ニ 1 cc ノ「アセトン」ヲ加ヘ數分間放置後遠心器ニカケ抽出液ノ少量ニ生理的食鹽水數滴ヲ滴下シテ白濁ノ濃淡ニ依リテ比較セリ。卅ハ強白濁、十ハ弱白濁ヲ示ス。

第三章 「アセトン」處理方法ト乾燥方法ニ就テ

(1) 「アセトン」處理方法

前章ノ實驗ノ結果ノ如ク「ズ、ベンチオン」トナ

ラザル乾燥結核菌粉末ハ「アセトン」ヲ以テ洗滌スレバ最モ簡單ニ最モヨク「ズ、ベンチオン」ヲ

調製シ得ルコトが明トナレリ。而シテ單ニ「ズ、ベンヂオン」調製ノ目的ナレバ乾燥結核菌粉末ニ「アセトン」ヲ加ヘテ數回振盪、暫時ノ後遠心、「アセトン」ノ部分ヲ除去、沈澱菌ヲ乾燥スレバ充分ナルモ「アセトン」可溶性物質ヲヨク除去スル爲メニハ「アセトン」ヲ加ヘ50乃至60°Cノ重盪煎中ニ數分間抽出後遠心、沈澱菌ヲ更ニ「アセトン」ヲ以テ數回ヨク洗滌スルヲヨシトス。「アセトン」可溶性物質ガヨク除去セラレタルカ否カヲ檢スルニハ遠心上部ノ抽出液ノ少量ニ生理的食鹽水又ハ蒸溜水數滴ヲ滴下シテ蛋白々濁ヲ生ゼザル程度ナレバ可ナリ。斯クノ如ク「アセトン」ニテ處理乾燥セル結核菌ハ長ク室温ニ放置スルモ「ズ、ベンヂオン」調製可能ナリ。結核菌ノ「アセトン」抽出液中ニハ自家抑制物質ヲ認メラル、ヲ以テ此ノ物質ハ充分ヨク除去スルコトニ依リ抗元トシテ使用スル結核菌ノ自家抑制作用ヲ減弱セシムルヲ得ベシ。是等ニ關シテハ後章ニ詳記ス。

(2) 乾燥方法

上記ノ如ク「アセトン」ヲ以テ處理セラレタル結核菌ハ室温ニ一晝夜放置スレバヨク乾燥シテ「ズ、ベンヂオン」可能ナレドモ急ヲ要スル場合ハ之ヲ50乃至60°Cノ乾燥器中ニ加温スレバ極短時間ニ乾燥シテ使用シ得ル。

然ルニ曩ニ鴻上氏⁽²⁾ノ研究ニ依リバ乾燥結核菌ハ130°C乃至150°Cニ加温スレバ微毒血清ニ反應セズ而モ結核血清ニ對シテハ補體結合性特異性能動力ガ不變ナリトセラレタリ。余モ此ノ意味ニ於テ「アセトン」處理結核菌ヲ130乃至150°Cニ乾燥器中ニ加熱乾燥シタルモノヲ抗元ニ使用スルコト、セリ。

「アセトン」處理竝ニ加熱乾燥等ト自家抑制作用及ヒ補體結合性能動力ノ消長ニ關シテハ章ヲ改メテ記載セントス。

結核補體結合反應術式：

補體結合反應術式ニ就キテノ詳細ハ結核雜誌第14卷第1號及ヒ同第15卷第2號著者ノ論文

参照。

「ヘモリヂン」ハ約900倍溶血價ノモノヲ使用セリ。其ノ使用量ハ5單位ナリ。

抗元ノ自家抑制作用比較實驗ニハ第3表ノ術式ニ依リ補體結合反應本試驗ハ第4表ノ術式ニ依レリ。

抗元ハ生理的食鹽水1cc中ニ10mgノ菌ヲ含有スル浮游液トシテ使用ス。抗元使用量ハ最大完全溶血價ヲ示セルモノノ $\frac{1}{4}$ 量ナリ。而シテ菌量2mg以上ニ於テモ自家抑制ヲ認メザルモノニアリテハ $\frac{1}{2}$ mgヲ使用量トセリ。

補體結合反應術式表中感作抗元トアルハ被檢血清0.5cc中ニ使用量ノ抗元ヲ加ヘ時々振盪シツ、37°Cノ重盪煎中ニ30分間放置後、遠心器ニカケ上部ノ血清部分ヲ除去シタル沈澱物即チ抗元ト抗體トノ結合シタルモノナリ(感作抗元ニ關スル詳細ハ雜誌結核第19卷、第8號著者論文參照)。結果判定ハ卍ハ完全溶血阻止、一ハ溶血度、≡ハ完全溶血、≡spハ痕跡溶血阻止ヲ示ス。

第3表 抗元自家溶血阻止作用試驗術式

試験管	I	II	III	IV	V
抗元量	0.5mg	1,,	2,,	3,,	4,,
15倍補體	0.15cc	,,	,,	,,	,,
生理的食鹽水	1.1cc	1.05,,	0.95,,	0.85,,	0.75,,
37°C 重盪煎 30分間					
2%感作山羊血球	0.2cc	,,	,,	,,	,,
37°C 重盪煎 15分後結果判定					

第4表 補體結合反應本試驗術式

試験管	I	II (陽性血清對照)	III (陰性血清對照)	IV (抗元對照)
感作抗元	1.15cc	,,	,,	抗元
生理的食鹽水	1.15cc	,,	,,	,,
15倍補體	0.15cc	,,	,,	,,
37°C 重盪煎 30分間 (其ノ間1—2回内溶振盪混和)				
2%感作山羊血球	0.2cc	,,	,,	,,
37°C 重盪煎 15分間後結果判定				

第四章 「アセトン」抽出液ノ性狀

第一節 「アセトン」抽出液ノ自家抑制作用及ビ結核竝ニ微毒

補體結合性抗元能力ノ有無

古來結核菌ヲ「アルコール」或ハ「エーテル」等結核菌ノ磷脂質溶劑ト思ハル、モノヲ以テ處理セル抽出液ヲ結核補體結合反應用抗元トシテ使用セラレタルモノアリ。即チ Bouquet 及ビ Négre 氏ノ「アンチゲン」、Blumental 氏ノ「アンチゲン」等ノ如シ。擬テ余ハ「アセトン」ヲ以テ結核菌ヲ處理シタル關係上該抽出液中ニ溶解セラレタル物質ノ自家抑制作用ノ如何竝ニ結核補體結合反應抗元性ノ有無ニ就キテ實驗ヲ行フコト、セリ。結核菌粉末ヲ「アセトン」ヲ以テ抽出シタル抽出液ハ菌株ニ依リテ濃淡ノ差アルモ一般ニ淡橙黃色透明ナリ。

(1) 實驗方法

乾燥結核菌粉末約 50 mg ニ「アセトン」約 2 cc

ヲ加ヘテ 60°C ノ 重盪煎中ニ 5 分間抽出シタルモノヲ遠心器ニカケ上部抽出液ヲ實驗ニ供ス。「アセトン」抽出液ヲ放置シテ「アセトン」ノ部分ヲ蒸發シタル殘渣物ニ生理的食鹽水ヲ加フルモ該物質ハ生理的食鹽水ニ溶解セス。從ツテ實驗ニ適セス。故ニ「ワッセルマン」ノ「アンチゲン」

第 5 表 結核菌「アセトン」抽出液ノ自家抑制作用

菌株別	被 檢 液 量	0.3	以下倍數 稀 薄 液		
		cc	0.3 cc	0.3 cc	0.3 cc
「エール リッヒ」	抽 出 液	≡	≡sp	≡	≡
	「アセトン」ヲ生理 的食鹽水ニテ 5 倍 ニセルモノ、對照	≡sp	≡	≡	≡
S. T.	..	≡	≡	≡	≡
	..	≡	≡	≡	≡

第 6 表 結核菌「アセトン」抽出液ノ結核竝ニ微毒補體結合性抗元能力ノ有無

被檢血清	「アセトン」 抽出液ヲ抗 元トスル補 體結合反應	結 核 補 體 結 合 反 應	「ワッセルマ ン」反應	被檢血清	「アセトン」 抽出液ヲ抗 元トスル補 體結合反應	結 核 補 體 結 合 反 應	「ワッセルマ ン」反應
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	≡
■	—	≡	—	■	—	≡	≡
■	—	≡	—	■	—	≡	≡
■	—	≡	—	■	—	≡	≡
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	+	—
■	—	≡	—	■	—	≡	—
■	—	≡	—	■	—	+	≡
■	—	≡	—	■	—	+	≡

註 ≡ハ強陽性、≡ハ中等度陽性、+ハ弱陽性、—ハ陰性反應ヲ表ハス。

抽出液ノ使用量ハ溶血價ノ 1/2 量ナリ。

調製法ニ倣ヒテ「アセトン」抽出液 1 ccニ對シテ生理的食鹽水 4 ccヲ如ヘテ 5 倍ノ稀釋液ヲ造ル。稀釋方法ハ抽出液ト同量ノ生理的食鹽水ヲ滴下ノニ加ヘタル後殘餘ノ生理的食鹽水ヲ一時ニ迅速ニ追加セリ。斯クシテ得タル液ハ透明蛋白々濁ヲ呈ス。此ノ液ニ就キテ自家抑制作用ノ有無、結核竝ニ微毒血清ニ對スル抗元性ノ有無ニ就キテ實驗セリ。

自家抑制作用ハ此ノ原液及ビ其ノ遞減の稀釋液各々 0.3ccニ就キテ實驗ヲ行ヘリ。

(2) 實驗結果

上記ノ「アセトン」抽出液ヨリ調製セル液ノ自家抑制作用ノ有無ヲ「エールリッヒ」及ビ S.T. 菌株ノ 2 株ニ就キテ檢シタルニ第 5 表ニ示セル如ク明ニ自家抑制物質ヲ認メラル。

第五章 「アセトン」處理結核菌ノ自家抑制作用ノ消長

乾燥結核菌粉末ノ自家抑制作用ハ一般ニ相當強度ナルモノニシテ鴻上氏ニ依レバ結核菌粉末ハ水洗、130 乃至 150°Cニ加熱乾燥、更ニ又水洗スル如ク此ノ操作ヲ數回繰リ返ヘスコトニ依リテ結核菌ノ自家抑制作用ヲ減弱スルコトヲ述ベラレタリ。

扱テ前章ノ實驗ノ結果ノ如ク「アセトン」ヲ以テ結核菌ヲ抽出スレバ抽出液中ニ自家抑制物質ヲ認メラル、ガ故ニ今「アセトン」ヲ抽出操作ニ依ル結核菌ノ自家抑制作用ノ消長ニ就キテ檢セリ。

(1) 實驗方法

「アセトン」ヲ以テ既ニ記載セルガ如キ方法ヲ以テ充分ヨク「アセトン」可溶性物質ヲ除去シタルモノヲ 50 乃至 60°Cニテ乾燥セルモノト「アセトン」ニテ處理セザル原結核菌粉末及ビ「アセトン」處理菌ト之ヲ 130°C 以上ニ加熱シタルモノ等ヨリ各々生理的食鹽水「ズ、ベンヂオン」ヲ調製シ自家抑制作用ノ強弱ヲ比較實驗セリ。

實驗ニ供シタル結核菌粉末中第 7 表ノ三宅及ビ「エールリッヒ」ノ 2 株ハ今初夏酷暑ノ候ニハ共ニ「ズ、ベンヂオン」トナラザリシモノナレドモ

此ノ故ニ補體結合反應ニ使用スル抗元用乾燥結核菌粉末ハ「アセトン」ヲ以テ充分ヨク抽出シテ自家抑制物質ヲ除去スルヲヨシトス。

次ニ「アセトン」抽出液中ニ於ケル結核竝ニ微毒補體結合性抗元性物質ノ有無ニ就キテ實驗ヲ施行セリ。

即チ結核患者血清 32 例及ビ微毒患者血清 7 例ニ就キテ實驗ヲ行ヒタルニ反應盡ク陰性ニ終レリ(第 6 表參照)。微毒血清 7 例中補體結合反應陽性者ノ 6 例ハ何レモ結核ヲモ合併シ 1 例ハ結核ヲ認メザルモノナリ。

故ニ「アセトン」抽出液中ニハ結核及ビ微毒血清ニ反應スル抗元性物質ヲ抽出シ來ラザルモノト認メラル。

本實驗ヲ行ヒシ候ニハ「ズ、ベンヂオン」可能トナルニ至リタルヲ以テ實驗ニ供シタリ。第 7 表及ビ第 8 表ノ實驗ニ供シタル菌ハイヅレモ「グリセリン、ブイオン」液面ニ充分ヨク發育シタルモノヲ濕熱 100°Cニ殺菌シ水洗、130°Cニ加熱、乾燥シテ粉末トナセルモノナリ。

(2) 實驗結果

原乾燥粉末菌ト之ヲ「アセトン」處理後 50 乃至 60°Cニテ乾燥セルモノトノ自家溶血阻止作用ハ第 7 表ノ如ク三宅、「エールリッヒ」株共ニ原乾燥粉末菌ハ菌量 1 mgニ於テ最大完全溶血ニ相當スルモ「アセトン」ニテ處理シタルモノニ於テハ其ノ倍量即チ 2 mgヲ示シタリ。即チ「アセトン」ヲ以テ結核菌ヲヨク抽出スレバ菌ノ自家溶血阻止作用ヲ減弱スルコトヲ認ム。

次ニ「アセトン」處理結核菌ヲ室溫ニテ乾燥シタルモノト之ヲ 130°C 加熱(燥熱器中ニ)セルモノトノ自家抑制作用ノ強弱ヲ比較シタルニ第 8 表ノ如ク 130°Cノ加熱ハ自家抑制作用ヲ減弱スルコトヲ認メラル。

鴻上氏ノ研究ニ依レバ 130°C 乃至 150°C マデノ加熱ハ抗元性能動力ヲ變ズルコトナク自家抑制

第 7 表 原結核菌ト「アセトン」處理結核菌ノ自家抑制作用比較

菌株別	抗元別	菌量			
		1 mg	1.5 ,,	2 ,,	3 ,, 4 ,,
三宅	原結核菌	≡	≡	≡	≡
	「アセトン」處理菌	≡	≡	≡	≡
「エールリッヒ」	..	≡	≡	≡	≡
	..	≡	≡	≡	≡

作用ヲ減弱シ 150°C 以上ノ加熱ハ自家抑制作用ノ減弱ヲ認ムルモ 抗元性能動力ガ低下シ 220°C ノ加熱ニ至レバ自家抑制作用ガ殆ンド消失スルモ 抗元性ヲモ失フニ至ルコトヲ記載セラレタリ。余ハ「アセトン」處理結核菌ニ就キテ加熱ニ對スル關係ヲ檢シタルニ 130°C 加熱ニ依ル自家溶血阻止作用ノ減弱ハ前記ノ實驗ノ如クニシテ

第 8 表 「アセトン」處理菌ト之ヲ 130°C 加熱セルモノトノ自家抑制作用比較

菌株別	抗元別	菌量			
		0.5 mg	1 ,,	2 ,,	3 ,, 4 ,,
「エールリッヒ」4 週間培養	「アセトン」處理	十	≡	≡	≡
	「アセトン」處理ノモノヲ 130°C 加熱	≡	≡	≡	≡
「エールリッヒ」9 週間培養	..	≡	≡	十	≡
	..	≡	≡	≡	十
及川	..	≡	≡	≡	≡
	..	≡	≡	≡	≡

更ニ 170°C、200°C ト加熱度ノ増加ト共ニ自家抑制作用ヲ減弱スルモ 130 乃至 150°C 以上ノ加熱ハ加熱度ニ反比的ニ抗元性ノ低下スルコトヲ認メタリ。

第六章 「アセトン」處理結核菌ノ結核補體結合性能動力

以上ノ實驗ノ結果ヨリ乾燥結核菌粉末ハ之ヲ「アセトン」ニテ抽出處理スルコトニ依リ常ニヨク浮游液ヲ調製シ得ベク且ツ該處理ハ菌ノ自家抑制作用ヲ減弱シ之ヲ更ニ 130°C ニ加熱スレバ尙一層之ヲ減弱スルヲ認メタリ。故ニ今茲ニ原乾燥結核菌、「アセトン」ヲ以テ處理セルモノ及ビ「アセトン」處理ヲ施セルモノニ 130°C 加熱セルモノ等ニ於ケル特異性抗元性能動力ニ就キテ比較實驗ヲ行フコト、セリ。

(1) 實驗方法

原乾燥結核菌浮游液トシテ使用シタル三宅、「エールリッヒ」9 週間培養ノ 2 株ハ初夏酷暑ノ候ニ

ハ共ニ「ズ、ベンヂオン」トナラザリシモノナルモ本實驗ヲ行ヒタル候ニハヨク「ズ、ベンヂオン」トナリタルモノナリ。S.T. 菌モ夏季ヨリ秋ニ至ルモ原粉末ノマ、ニテハ「ズ、ベンヂオン」トナラザリシモノ本實驗ヲ行ヒタル 11 月ノ候ニ至リヨク「ズ、ベンヂオン」トナリシヲ以テ是等 3 株ノモノニ就キテ原粉末ト「アセトン」處理及ビ「アセトン」處理ノモノヲ 130°C 加熱セルモノ等ヲ抗元トシテ抗元性能動力ヲ比較實驗セリ。

(2) 實驗成績

實驗ノ結果ハ第 9 及ビ第 10 表ニ示セルガ如ク原乾燥結核菌粉末ト之ヲ「アセトン」ニテ處理セ

第 9 表 原結核菌ト之ヲ「アセトン」處理、130°C 加熱セルモノトノ抗元性能動力ノ比較

菌株別	使用血清量 結核血清別	原 結 核 菌				「アセトン」處理菌ニ 130°C 加熱			
		0.5cc	0.25 ,,	0.125 ,,	0.0625 ,,	0.5 ,,	0.25 ,,	0.125 ,,	0.0625 ,,
三宅	No. 1	≡	≡	≡	十	≡	≡	≡	十
	No. 2	十	≡	≡	≡	十	≡	≡	≡
	No. 3	≡	十	≡	≡	≡	十	≡	≡
	No. 4	≡	≡	十	≡	≡	≡	十	≡
	No. 5	≡	≡	十	≡	≡	≡	十	≡
	No. 6	≡	十	≡	≡	≡	十	≡	≡

エール リッヒ」4 週間培養	No. 1	卅	卅	≡	≡	卅	十	≡	≡
	No. 2	卅	卅	≡	≡	卅	十	≡	≡
	No. 3	卅	≡	≡	≡	卅	≡	≡	≡
エール リッヒ」9 週間培養	No. 1	卅	卅	十	≡	卅	卅	卅	≡
	No. 2	卅	卅	卅	≡	卅	卅	卅	≡
	No. 3	卅	≡	≡	≡	卅	≡	≡	≡

註 補體結合反應ノ方法ハ抗體吸著法ニ依ル(雜誌第 19 卷、第 8 號著者論文參考)

ルモノ及ビ「アセトン」處理ノモノニ 130°C 加熱
ヲ施シタルモノ等ニ於ケル補體結合性抗元能働

力ニ差無キヲ認メタリ。

第七章 總括竝ニ考案

乾燥結核菌粉末ガ外氣ノ溫度、濕度等ノ變化ニ影響セラレテ生理的食鹽水ヲ以テ乳鉢中ニ磨碎スルモ菌ガ互ニ相ヒ粘著シテ飴狀ノ塊トナリ平等ナル「ズ、ベンゼオン」トナラズ。而モ今日「ズ、ベンゼオン」調製可能ナリシモノガ數日後ニハ不可能トナリ甚シキハ午前中ニ「ズ、ベンゼオン」可能ナリシモノガ午後ニハ不可能トナルガ如ク全ク珍奇ト云フベキ現象ヲ現ハス。而シテ四季ヲ通ジテ一般ニ室溫寒冷ニシテ溫氣少ク乾燥セル季節ニハ「ズ、ベンゼオン」トナリ易ク反之シテ溫度高ク且ツ濕氣ニ富ム夏季ノ候ニアリテハ「ズ、ベンゼオン」トナリ難シ。著者ノ所有セル結核菌數株ノ内、四季ヲ通ジテ今日マデ常ニ「ズ、ベンゼオン」調製可能ナリシモノハ一株モナク尙又乾燥粉末トシテ以來四季ヲ通ジテ一度モ「ズ、ベンゼオン」トナシ能ハザル菌株サエアリ。斯クノ如ク若シ乾燥結核菌粉末ヨリ「ズ、ベンゼオン」ヲ調製シ得タリトスルモ其ハ寧ロ偶然ノコトニ屬スルト云フモ決シテ過言ニハ非ザルベシ。此ノ「ズ、ベンゼオン」トナラザル現象ハ乾燥シタル結核菌粉末ニ於テノミ特ニ見ラル、現象ニハ決シテ非ズ「グリセリン、ブイオン」液面ニ發育シタル結核菌ヲ濕熱 100°C ニシテ殺菌シタルモノヲ乳鉢中ニ生理的食鹽水又ハ水ヲ以テ磨碎スル際ニモ菌ガ互ニ粘著シ合ヒ飴狀ノ塊トナリテ平等ナル「ズ、ベンゼオン」ノ状態トナル能ハザルコトハ余ハ時ニ遭遇セリ。故ニ乾燥結核菌粉末ノ「ズ、ベンゼオン」ヲ使用

シテ實驗ヲ行ハントスル者ハ之ニ對シテ何等カノ改良方法ヲ考案セザル限リ實驗遂行不可能ノ場合ニ立チ到ルベシ。斯クテ余ハ乾燥結核菌粉末ヲ常ニ而モ例外ナク「ズ、ベンゼオン」トナシ得ル方法ニ關シテ檢索ヲ行ヒタル結果、乾燥結核菌粉末ヲ「アセトン」ヲ以テ洗滌抽出スルコトニ依リテ最モ簡單ニ而モ最モヨク其ノ「ズ、ベンゼオン」ヲ調製シ得ルコトヲ知レリ。「ズ、ベンゼオン」可能、不可能ノ因ツテ來ル處ノモノハ外溫ト溫度等ノ變化ニ對スル結核菌々體被膜物質ノ變化ニアルコトハ確實ナリ。而シテ結核菌ノ被膜物質ヲ蠟、脂肪及ビ磷脂質等トスレバ磷脂質ハ一般ニ水トヨクナジム性質ノモノニシテ蠟及ビ脂肪等ハ一般ニ水トナジマザル性質ヲ有ス。此ノ性質ヨリ考フルモ被膜物質中脂肪及ビ蠟ノ溶劑タル「アセトン」ニテ洗滌處理セラレタル結核菌ガヨク「ズ、ベンゼオン」トナル理由ヲ首肯シ得ベク尙又余ノ實驗ニ依レバ「アセトン」可溶性物質ノ多キ菌程外溫溫度等ノ變化ニ容易ニ支配セラレテ「ズ、ベンゼオン」トナリ難キヨリ見ルモ蠟質及ビ脂肪質ニ關係スルコトヲ知ル。

「アセトン」ニテ處理セラレタル結核菌ハ常ニヨク「ズ、ベンゼオン」ノ調製可能ナルノミナラズ補體結合反應ニ使用スル場合原菌粉末ニ比較シテ自家抑制作用ヲ減弱シ此ノ「アセトン」處理ノモノヲ 130°C ニ加熱スレバ更ニ一層自家抑制作用ヲ減弱シ而モ抗元性能働力ニ於テ「アセトン」

ニテ處理セザル原菌粉末ニ比較シテ勝ルトモ劣ル處ナシ。

元來補體結合反應抗元トシテハ自家抑制作用ナル可ク使用抗元量ノ副員廣キモノ程補體結合反應ノ結果ヲ明快ニ現ハス良好ナル抗元ト云フベ

第八章 結論

乾燥結核菌粉末ハ外温、溫度等ノ變化ニ依リテ屢々生理的食鹽水ヲ以テ乳鉢中ニ磨碎スルモ菌ハ互ニ相ヒ粘着シテ飴狀トナリテ平等ナル浮游液トナラス。特ニ外温高ク溫度多シト思ハル、夏季酷暑ノ候ニ於テ屢々此ノ現象ニ遭遇ス。余等ハ結核補體結合反應抗元トシテ乾燥結核菌ノ生理的食鹽水浮游液ヲ使用スルモノニシテ若シ浮游液調製不可能ナレバ試験ヲ施行スル能ハズ。故ニ余ハ最モ簡單ニ而モ常ニ浮游液(「ズ、ベンヂオン」)調製可能ナル方法ニ就キテ檢索、實驗ヲ行ヒ併セテ補體結合反應ニ關係スル實驗等ヲ行ヒタル結果次ノ如シ。

- (1) 乾燥結核菌粉末ヲ鹽化「カルシウム」乾燥器中ニ貯藏スレバ多少浮游液可能ヲ助クルモ四季ヲ通ジテ毎常浮游液調製可能ナラス。
- (2) 「ズ、ベンヂオン」トナラザル結核菌粉末ヲ氷室ニ24時間貯藏スルモ「ズ、ベンヂオン」トナシ得ザリキ。
- (3) 「ズ、ベンヂオン」トナラザル結核菌ヲ鹽化「カルシウム」乾燥装置ノマ、氷室ニ24時間貯藏スルモ「ズ、ベンヂオン」トナシ得ザリキ。
- (4) 「ズ、ベンヂオン」トナラザル結核菌ヲ130乃至150°Cニ乾熱器中ニ加熱スルモ「ズ、ベンヂオン」トナシ得ザリキ。
- (5) 「ズ、ベンヂオン」トナラザル結核菌粉末ヲ「アセトン」、「ベンツォール」、石油「ベンヂン」、「エーテル」、「アルコール」及ビ「クロ、フォルム」等ニテ簡單ニ2回洗滌、乾燥シタルモノニ就キテ「ズ、ベンヂオン」ノ可能、不能ヲ檢シタルニ「アセトン」ニテ洗滌シタルモノハ最モ簡單ニ最モヨク而モ例外ナク「ズ、ベンヂオン」トナシ得ル。而シテ余ハ數株ノ結核菌ニ就キテ「ア

セトン」ノ意味ヨリスルモ「アセトン」ニテヨク洗滌シテ之ニ可溶性ノ物質ヲ充分ヨク除去シタル後之ヲ130乃至150°Cニ加熱乾燥スルコトガ抗元ヲ優秀化スルツノ方法トモ云ヒ得ベシ。

セトン」可溶性物質ノ多少ト「ズ、ベンヂオン」調製ノ難易ヲ檢シタルニ「アセトン」可溶性物質多キ菌ハ「ズ、ベンヂオン」トナリ難キコトヲ知レリ。

即チ「ズ、ベンヂオン」トナリ難キ原因ハ結核菌ノ「アセトン」可溶性物質ナル蠟及ヒ脂肪質ニアルモノト思惟セラル。

(6) 「ズ、ベンヂオン」トナラザル乾燥結核菌粉末ヲ單ニ「ズ、ベンヂオン」可能ナラシムル爲メニハ「アセトン」ヲ以テ簡單ニ1回洗滌スレバ足ルモ「アセトン」可溶性物質ヲ充分ヨク除去スルニハ50乃至60°Cノ重盪煎中ニ數分間抽出シ遠心シテ抽出液ヲ除去、更ニ3、4回「アセトン」ヲ以テ洗滌スルヲ可トス。而シテ「アセトン」可溶性物質ガ充分ヨク除去セラレタルカ否カナ知ルニハ洗滌液ノ少量ニ生理的食鹽水又ハ水ノ數滴ヲ滴下シテ白濁ヲ生ゼザレバ可ナリ。

(7) 「アセトン」可溶性物質ヲ充分ヨク除去シタル結核菌ハ室温ニ放置スルモヨク乾燥シテ「ズ、ベンヂオン」トナルモ急ヲ要スル場合ハ50乃至60°Cノ乾熱器中ニ乾燥スレバ可ナリ。

余ハ「アセトン」ニテ處理セラレタル結核菌ハ130°C乃至150°Cニ乾熱器中ニ加熱スルコト、セリ。蓋シ微毒血清ニ對スル非特異性反應ヲ防グ爲メト自家抑制作用ヲ除去スルガ爲メナリ。

(8) 結核菌ヲ「アセトン」ニテ抽出シタル抽出液中ニハ自家抑制物質ヲ含有ス。

該抽出液中ニハ結核竝ニ微毒補體結合性抗元性物質ヲ認メズ。

從ツテ抗元トシテ使用スル結核菌粉末ハヨク「アセトン」ニテ抽出シ自家抑制物質ヲ可及的ヨク除去スルヲヨシトス。

(9) 原結核菌粉末ヨリモ之ヲ「アセトン」ニテ抽出處理ヲ行ヒタルモノ、方ガ自家抑制作用ヲ減弱シ。「アセトン」抽出處理セルモノヨリ之ニ 130 乃至 150°C 加熱セルモノ、方ガ更ニ自家抑制作用減弱ス。然レドモ 150°C 以上ノ加熱ハ加熱度ト共ニ自家抑制作用ヲ減弱スレドモ抗原能働カヲ低下ス。

(10) 原乾燥結核菌ト「アセトン」ニテ抽出處理ヲ施セルモノト「アセトン」處理ノモノニ更ニ 130°C 加熱セルモノ等ニ於ケル補體結合性抗原能働カニ差異アルヲ認メズ。

(11) 以上ヨリ結核菌粉末ヨリ「アセトン」可溶性物質ヲ充分ヨク除去スルコト、之ニ更ニ 130 乃

至 150°C ノ加熱ヲ施スコト、ガ抗原性ニ何等ノ影響ヲ及ボサズシテ自家抑制作用ヲ減弱スルヲ以テ單ニ「ズ、ペンヂオン」トナラザル結核菌粉末ヲ「ズ、ペンヂオン」可能ナラシムルノミナラズ抗原ヲ優秀化スル一ツノ方法ナリト思惟ス。蓋シ補體結合反應ニ使用スル抗原ハ自家抑制作用ナル可ク少ク抗原使用量ノ幅員廣キ程可ナルガ爲メナリ。

擱筆スルニ臨ミ實驗上ノ御便宜ヲ與ヘラレタル東京市療養所田澤博士ニ深謝シ、本論文ノ御指導、御校閲ヲ賜ハリタル東京市療養所醫務課長春木博士ニ深く感謝ス。

文 獻

1) 鴻上, 川上氏, 結核, 第 15 卷, 第 2 號.

2) 鴻上氏, 結核, 第 16 卷, 第 8 號.

nicht, weder im Zimmertemperatur noch im Brutofen (37°C); diejenige bei Leichttuberkulosen steigert sich nicht in Zimmertemperatur, wohl aber im Brutofen, während sich diejenige bei Schwertuberkulosen steigert, sowohl in Zimmertemperatur als auch im Brutofen.

Wenn wir das Verhältniss der Temperatur zu der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit in der Korrelationstafel beobachten, so können wir die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (in der Korrigierungstafel) bei Männern den Einstundenwert bis 40 mm., den Zweistundenwert bis 60 mm. korrigieren; bei Frauen den Einstundenwert bis 20 mm., den Zweistundenwert bis 30 mm., jedoch wäre die Korrektur: bei Männern Einstundenwert über 71 mm., Zweistundenwert über 91 mm. vernunftwidrig; das Gleiche gilt von der Korrektur: bei Frauen Einstundenwert über 41 mm., Zweistundenwert über 51 mm.

Wenn wir die Korrelationskoeffizienten des Einstundenwertes und des Zweistundenwertes, des Einstundenwertes und Dreistundenwertes, des Einstundenwertes und Vierstundenwertes sowie des Halbstundenwertes und Einstundenwertes ausrechnen, dann ist der Korrelationskoeffizient, bei 37°C beobachtet, grösser als derjenige bei Zimmertemperatur; auch ist er grösser als derjenige bei Temperaturen von 20°C und 25°C; da können wir der Zahl der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, bei 37°C beobachtet, Glauben schenken.

Da die Verhältnisse des Einstundenwertes und des Zweistundenwertes, des Einstundenwertes und Dreistundenwertes sowie des Einstundenwertes und des Vierstundenwertes sich jederzeit sehr nahe liegen, kann der Einstundenwert alle anderen Werte vertreten.

(Autoreferat.)

A New Study on Obtaining Suspension of Tubercle Bacilli and on the Complement-fixation Test.

By

Mitsuaki Kogami.

(From the Tokyo Municipal Sanatorium, Tokyo.)

The dried powder of tubercle bacilli does not always give its homogeneous suspension when triturated in an agate mortar with the physiological saline solution, when the temperature and humidity are unfavourable, making the mixture glutinous and sticky. This phenomenon is experienced frequently in the summer season of sweltering heat when the humidity may proportionately be high. As we use the physiological saline suspension of tubercle bacilli for the complement-fixation test for tuberculosis, it becomes impossible to conduct our experiment if the emulsion cannot be obtained.

Consequently, the author has conducted a series of researches and experiments to find a simple and sure method of obtaining the required suspension, and at the same time some tests about its complement-fixation reaction. The results were as follows:

1) The emulsion may be obtained to some extent by storing the powder of tubercle bacilli in the calcium chlorid desiccator, but the method is not always effective for every seasons of the year.

2) It has been impossible to make a suspension of the powder of tubercle bacilli which cannot be emulsified by storing it in a refrigerator for 24 hours.

3) It has been impossible to make a suspension of the tubercle bacilli powder which cannot be emulsified, by storing it in a refrigerator for 24 hours, after having put it in a calcium chlorid desiccator.

4) It has been impossible to make a suspension of tubercle bacilli powder which cannot be emulsified by heating it in a hot-air sterilizer at temperatures ranging between 130° and 150°C.

5) I have tested whether a suspension may be obtained from the unemulsified tubercle bacilli, which have been previously dried after washing them twice with acetone, benzole, benzine petrole, alcohol, chloroform, ether, etc. It has been found that the dried bacilli washed with acetone have been emulsified through the simplest and easiest processes and without any exception.

I have examined the relation between the facility in getting their suspension and their acetone-soluble substance with several strains of tubercle bacilli. It has been found that the strains which yield much substance soluble in acetone are not easily emulsified. It may be presumed that the difficulty in getting their suspension is due to the waxy and fatty substances in tubercle bacilli, which are soluble in acetone.

6) In order to ensure merely the emulsification of the dried powder of tubercle bacilli whose suspension cannot be easily be obtained, it is sufficient to wash them once with acetone, but in order to eliminate the acetone-soluble substance perfectly, it is necessary to infuse them in a water-bath at the temperatures ranging between 50° and 60°C. for a few minutes, centrifugate it, and wash the residue with acetone three or four times. In order to find out whether the acetone-soluble substance has been perfectly eliminated, you are to drip a dose of the physiological saline solution or water upon the small quantity of the extract. If no white precipitation takes place, the result is satisfactory.

7) The tubercle bacilli cleared of their acetone soluble substance become a suspension well dried even in the room temperature, but in urgent cases, they may be dried in a desiccator at temperatures ranging between 50° and 60 C.

I have adopted the method of heating the tubercle bacilli washed with acetone in a desiccator at temperatures between 130° and 150°C. This is to provide against their non-specific reaction to the sera of syphilis and eliminate their anti-complementary reaction.

8) In the acetone-extract of tubercle bacilli the anti-complementary substance is contained. Any complement-fixing antigenic substance for tuberculosis and syphilis is not observed in the extract. Consequently, it is advised to give a full acetone-treatment to the tubercle bacilli used as antigen and eliminate any anti-complementary reaction as far as possible.

9) The anti-complementary reaction is made weaker in the acetone-washed powder of tubercle bacilli than those not subjected to the process, while the reaction is further debilitated in the materials heated at temperatures ranging between 130°C and 150 C than the acetone-washed ones. The heating at above 150°C may weaken the anti-complementary action, but it lowers also the antigenic power.

10) We do not recognize any difference in the complement-fixing antigenic power between the original powder of tubercle bacilli, acetone-washed bacilli and the bacilli acetone-washed and heated at 130°C.

11) Judging from the above tests, it may be observed that thorough elimination of the acetone-soluble substance and its heating at temperatures between 130°C and 150°C does not give any influence upon their antigenic power and weakens the anti-complementary reaction. It is therefore concluded that the method not only serves to emulsify the dried tubercle bacilli which are not in a suspended state, but also a method to improve

the nature of the antigen. This is because the antigen used for the complement-fixation test serves our purpose better in proportion to the weakness of its anti-complementary reaction, namely the width of the useable dose of antigen. (By the author.)

The "Three-Colors Method" of Staining Acid-Fast Bacilli in Paraffin Sections.

By

Assist. Prof. Dr. **Kaoru Urabe.**

*From the Bacteriological Department (Prof. Dr. T. Toda) of the Kyūshū
Imperial University, Hukuoka, Japan.*

The following method is given by the Author and is found to be the reliable means of staining acid-fast bacilli in sections.

Method: Begin with sections dry and adherent to the slide.

Then treat in the following way:

1. Place in xylol 1 minute
2. Second jar of xylol..... 1 minute
3. Alcohol, absolute 1 minute
4. Alcohol, 95%..... 1 minute
5. Alcohol, 80%..... 1 minute
6. Water 1 minute
7. Stain in, Nachtblau (Gruebler) 0.5 g., alcohol abs. 10 cc., phenol crystals 5.0 g. and distilled water to make 100.0 cc., or Nilblau (Gruebler) 1.0 g., alcohol abs. 20.0 cc., phenol crystals 5.0 g. and distilled water to make 100.0 cc., at 37°C for from 15 to 30 minutes, or steam for from 1 to 2 minutes. The longer periods are recommended for lepra bacilli.
8. Wash in water
9. Decolorized in 1% Hcl-alcohol . . . 1/2 to 1 minute (until blue disappears)
10. Wash thoroughly in water
11. Place in Lugol's fluid . . . 10 to 15 minute at room temperature
12. Water 1/2 minute
13. Stain in hematoxylin 5 minute or longer
14. Decolorize in 1% Hcl-alcohol 10 to 15 seconds
15. Wash in running water until hematoxylin is blue, usually . . . 30 to 60 minutes
16. Stain in eosin 15 to 30 seconds
17. Water 1/2 minute
18. Blot with filter paper
19. Dehydrate in alcohol, absolute 10 seconds
20. Clear in xylol 5 seconds
21. Blot with filter paper and mount in neutral balsam.

By these staining procedures acid-fast bacilli (tubercle bacilli as well as human and rat leprosy bacilli) stain clear beautiful marine blue, nuclei brown-violet and the cytoplasm red.

(Author's abstract.)