実験的結核症における感染防衛力に及ぼす菌体成分の影響

寺井武雄・永管徳子

国立療養所刀根山病院

受付 昭和37年11月7日

結核の免疫においても，他の感染症のようにBCG生菌に代わつて種々の方法によつて得られた死菌あるいは物理的，化学的に分画された菌体成分を用いて宿主に抵抗性を与えようとする研究が続けられている。しかしそれらの成績は必ずしも一致せず，またそれらの活性は，BCG生菌に比べてはるかに弱い[1]。菌体成分によつて宿主に感染防衛力を与えることができるかどうかはBCG免疫の機作の解明にもつながる問題である。すなわち，BCGで免疫したときの宿主側の複雑な反応の解析を行なうと同時に，分画された菌体成分で前処置した宿主の感染に対するより単純な反応から感染防衛力に関与する因子を明らかにすることは，結核免疫の機構を解く手段である。

著者らは先に種々の量の結核菌の感染を受けたマウスについて生存率曲線を求めるとともに，BCG生菌免疫によつてその曲線に変化が認められる[2]ことを報告した。本報ではこれらの実験条件を用いて，結核菌菌体成分が宿主の抵抗性に与える影響について実験を行なうとともに，さらに宿主臓器の病変および感染菌の宿主体内における生菌数の推移に及ぼす影響を調べ，菌体成分による宿主の抵抗性獲得の機構について考察を加えた。

実験材料および方法

1. 動物

マウス：生後約6週体重16g前後のCF 1系マウスを用いた。マウスの大部分は本院動物室において同腹繁殖させて得たもの[2]で，一部は共栄動物大阪営業所より入手した。動物は共栄動物製固型飼料（MR-1）と水道水で飼育した。

モルモット：雑系の動物を入手後，1カ月間飼育したのち，ツベルクリン反応陰性で体重約400gのものを実験に供した。

2. 使用菌株

牛型結核菌Ravenel株：本院保存中の株[2]をときどきマウスを通過させながら小川培地に継代保存し，改めてSauton-potato培地に移し，4週後馬鈴薯上に発育した集落を感染に用いた。滅菌濾紙上に集めた菌塊を滅菌生理食塩水でよく洗滌し，滅菌濾紙で吸湿したのち，ガラス玉とフラスコによつて生理食塩水1mlにつき0.25mgとなるように菌液を調製した。

BCG：小川培地上に保存中のものをSauton培地に移し，液体表面に発育した菌苔を用いた。生菌免疫には上記の方法で2.5mg/mlの浮游液に調製したものを用いた。

3. ツベルクリン反応

人型結核菌のSauton培地培養液からSeibertの方法[3]によつて得た蛋白質Aを抗原とした。これを生理食塩水1mlあたり1mgの割合に溶解し，その0.1mlをモルモットの背部皮内に接種し，24および48時間後局所の硬結直径を測定した。

4. 菌体成分の分画

BCG加熱死菌体をAsselineauの系統的脂質分画法に準じて分画した。100°C，20分間加熱殺菌したBCG菌体を濾紙で十分吸湿したのち，これを10倍量のエーテル・メタノール（1：1）で2日間室温で抽出した。残渣をさらに5倍量の同溶媒で2日間ずつ2回抽出し，抽出液を集めて減圧濃縮後凍結乾燥した。この画分をアセトンで処理して，アセトン可溶性脂肪と不溶性画分に分けたのち，後者を熱アセトンによつて可溶性のロウAと不溶性の燐脂質に分画した。一方，エーテル・メタノール抽出残渣は10倍量のクロロホルムで1回，さらに5倍量のクロロホルムで2回，それぞれ4日間室温で抽出した。抽出液は40°C以下で減圧濃縮したのち，エーテルに溶解し，これにメタノールを加えて沈澱する精製ロウと可溶性のロウBに分けた。ロウB画分は減圧濃縮したのち凍結乾燥した。クロロホルム抽出残渣（以下残渣と略す）は白色の粉末状であるがなお抗酸性を残している。

5. 免疫処置および感染

BCG生菌は0.5mgを生理食塩水に浮游し，菌体成分は0.5mgを0.2mlのBayol F：Arlacel A：生理

Takeo TERAI and Tokuko NAGASUGA (National Sanatorium, Toneyama Hospital, Toyonaka, Osaka, Japan): Effect of Constituents of Mycobacteria on the Resistance of Experimental Animals against Tuberculous Infection.—Kekkaku, 38 (5) : 159～165, 1963.

食塩水 (7：2：1) に乳濁して，マウスの腹腔あるいはモルモットの左そけい部の皮下に注入した。感染は BCG 免疫後4週目，菌体成分前処置は2週間隔で2回処置後，2回目の処置から2週目に行ない，牛型結核菌 Ravenel 株 0.05 *mg* をマウスの尾静脈に，あるいは 0.5 *mg* をモルモットの右そけい部皮下に接種することによつて行なつた。

6. 感染防衛力の評価

感染後の各群動物の死亡日数の分布を比較するとともに，斃死動物の臓器病変の観察および臓器中の生菌数の定量を行なつた。また感染後一定日数ごとに屠殺した動物について，同様の方法を用いて病変の進展過程および臓器内における生菌数の推移を比較した。

実験成績

1. 死亡日数の分布および斃死マウス臓器の肉眼的所見

マウス入手の都合で実験は3回に分けて行ない，各実験ごとに BCG 生菌免疫群および無処置群を対照としてつくつた。

Table 1. Protective Effect of Constituents of Tubercle Bacilli against Tuberculous Infection in Mice

Number of exp.	Viable count of bacilli infected	Number of mice Per group	Constituent for vaccination	Survival times of mice after challenge infection in days	Per cent§ S-30 mice
1	2.6×10^6	12	Acetone soluble fat	15, 19, 20, 21, 22, 23, 23, 25, 25, 25, 28, 32	8
		12	Purified wax	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 15, 16, 20	0
		12	BCG, living	6, 6, 21, 22, 23, 23, 25, 28, 35, 37, S, S	33
		12	None	19, 20, 21, 21, 21, 22, 22, 22, 22, 23, 29, 35	8
2	18.7×10^6	12	Wax A	22, 24, 24, 25, 27, 27, 28, 28, 28, 45, 46, 57	25
		12	Phosphatide	24, 25, 27, 31, 31, 31, 31, 34, 36, 49, 55, 56	75
		12	BCG, living	25, 29, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 40, 42, 45, 50	75
		12	None	21, 21, 22, 23, 23, 23, 24, 25, 28, 31, 49, 49	25
3	8.9×10^6	12	Wax B	26, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 40, 47, S, S	58
		12	Defatted residue	26, 26, 27, 27, 28, 31, 34, 41, 43, 44, 47, 50	58
		12	BCG, living	26, 27, 27, 27, 28, 28, 28, 33, 38, 43, 53, 57	42
		12	None	22, 22, 23, 23, 24, 24, 27, 27, 28, 29, 29, 34	8

Mice were vaccinated intraperitoneally with 0.5 mg of constituent twice at interval of two weeks, or 0.5 mg wet weight of living BCG once. Four weeks after the first vaccination, mice were challenged by the intravenous administration of 0.05 mg wet weight of bovine tubercle bacilli, Ravenel strain.
S, at the fifth column, indicates that animals were still surviving when the experiment was terminated on the 60th day after challenge infection.
§ S-30, survived 30 days.

各群12匹のマウスを用い，表1に示すような群に分けて，それぞれ前処置および感染を行なつた。感染後の死亡日数を記録するとともに，斃死マウスの肺に形成された結節の大きさおよび数を肉眼的に調べ，さらに右肺を生菌数定量に供した。生菌数の定量は臓器をガラスホモゲナイザーで磨砕，苛性ソーダの終末濃度1%，組織の濃度 100 *mg/ml* になるようにそれぞれ苛性ソーダ溶液および滅菌蒸留水を加えて均等化したのち，段階稀釈してその 0.1 *ml* を小川培地に接種した。

死亡日数の分布を示すと表1のごとくで，この結果からマウスに防衛力を与える活性を有するのは，ロウB，燐脂質および残渣で，しかもこれらの活性は BCG 生菌にほぼ等しい。アセトン可溶性脂肪およびロウAは無影響であつた。精製ロウ処置群では感染前に12匹中9匹が斃死し，残つた3匹も感染後対照群よりも生存日数が短い。このような現象は精製ロウの中に含まれている毒性糖脂質[5]によるものと考える。

各群の斃死マウスについて肺に形成された結核性病変を比較すると図1のごとくで，斃死マウスの肺における結節の数および大きさは必ずしも同じでなく，BCG 生菌免疫あるいは生存日数を延長させる活性のある菌体成分で前処置することによつて，病巣形成に変化のあることを認めた。すなわち，ロウAおよびアセトン可溶性脂肪処置群では対照群と同じように大きい結節が多数見られるのに反して，BCG 免疫群では結節が小さく，ロウB，燐脂質および残渣処置群では結節の小さい斃死マウスが対照群に比して多い。

肺における生菌数の推移をみると，ロウB，燐脂質および残渣処置群で BCG 免疫群のように斃死マウス中の生菌数の少ないものが多いが著明ではない。斃死試験に用いた感染菌量が生菌類推移を見るためには多すぎることによると考えられる。

2. 感染後屠殺したマウスにおける臓器の病変と臓器内生菌数の推移

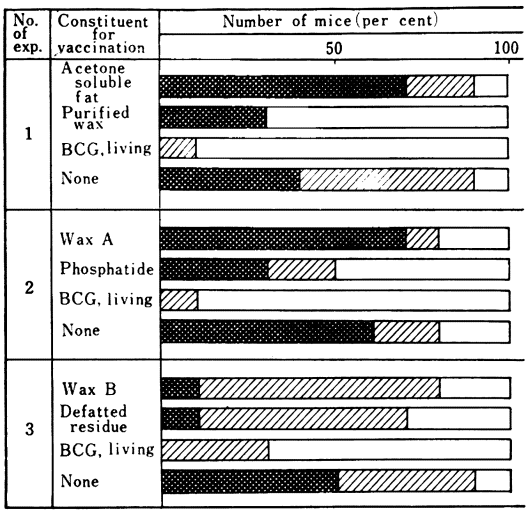
BCG 生菌，ロウBおよび残渣で処置したマウスに 7.5×10^5 生菌単位の Ravenel 株を尾静脈から注入して，

8, 20および28日後に各群3匹ずつ屠殺し肺と脾の重量および肺の生菌数を定量した。

臓器重量の増加は必ずしも結核に特異的な変化ではないが，他の疾病のない場合には結核性病変と相関関係があると考えられ[6),7)]るので，臓器重量を病変推移の指標とした。

図2に示すように，肺の重量は感染後日を追つて増加

Fig. 1. Comparison of the Extent of Lesion in the Lung of Vaccinated and Non-vaccinated Mice on the Succumbed Day



Experimental conditions were the same as table 1.
Assessment of lesions in lung:

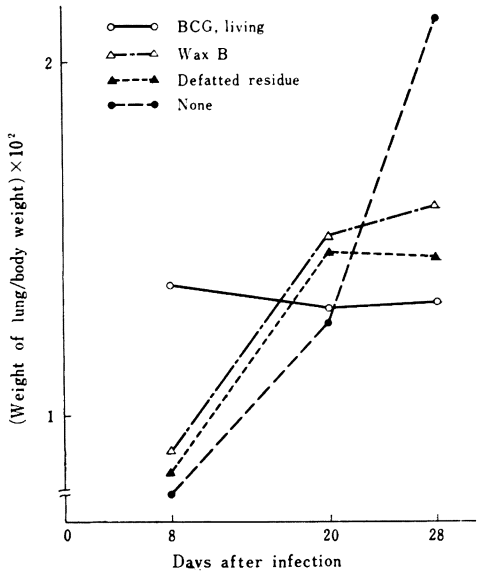
Severe macroscopic involvement.
Moderate macroscopic involvement.
Slight macroscopic involvement.

Table 2. Effect of constituents on induction of skin hypersensitivity and protection to tuberculous infection in guinea pigs

Constituent for vaccination	Number of animals died before challenge	Skin reaction to 0.1mg of Protein A (size of induration in mm after 48hr.)	Number of survivors 60 days after challenge
Wax B	0 of 5	All were negative	3 of 5
Defatted residue	2§ of 5	21×25 25×30 24×32	3 of 5
BCG, living	0 of 5	14×14 13×15 16×16 18×22 18×18	4 of 5
None	0 of 5	All were negative	0 of 5

§: No visible change was observed in the organs of dead animals.
Animals were vaccinated subcutaneously with the same way as table 1, and skin tests were carried out four weeks after the first vaccination. After recording the result of skin test, all animals were challenged subcutaneously with 0.5 mg wet weight of Ravenel strain of bovine tubercle bacilli.

Fig. 2. Change of the Weight of the Lung of Vaccinated and Non-vaccinated Mice



Conditions were identical with those in table 1, except that challenge dose was 0.02 mg. After infection each three mice per group were sacrificed on the 8th, 20th and 28th day.
Figure was shown by mean value of three mice.

し，対照群では28日後には感染前の3倍におよんだ。しかしロウBおよび残渣処置群では20日以後増加は停止した。一方 BCG 免疫群では初期に高い値を示すけれども進行する傾向は認められなかつた。これは BCG 免疫処置によつて肺にできた顕微鏡的な変化が感染時にもなお残つているためと考えられる[8)]。

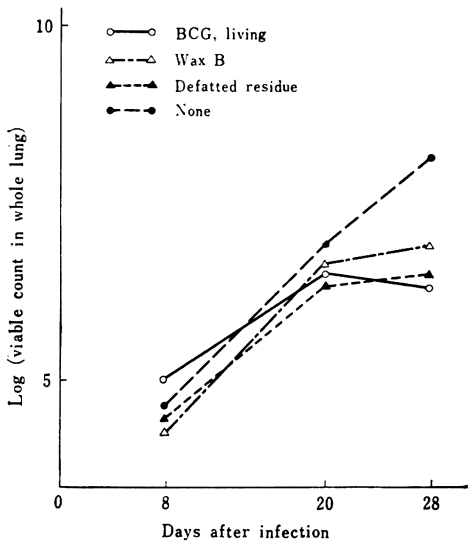
また脾においては肺におけるほど著しい差は認められなかつたが，残渣処置群で初期から値が高く，また高度な腹膜との癒着を認めた（9例中8例）。この原因については明らかでないが，前処置が腹腔内に行なわれているので，血行性に作用したとするよりも局所性に作用したものと考えられる。この癒着は感染とは関係なしにおこり，他の実験では残渣を 0.5 *mg* 腹腔内に注入すると10日後3例中3例に中等度の癒着を認めた。

肺内生菌数の推移は図3に示すごとくで，8日目では各群の間で差はないが，28日後に対照群では臓器 10 *mg* あたり 10^6 まで増加しているのに反して免疫および菌体成分処置群では20日以後増加がなく28日目で 10^4 生菌単位であつた。

3. モルモットに対するロウBおよび残渣の生物学的活性

体重 400 *g* 前後の雑系モルモット5匹ずつを BCG 免疫，ロウB処置，残渣処置および対照群とした。BCG 免疫後4週目，菌体成分処置は2週間隔で2回行ない，第2回目から2週後に「ツ」反応を行なつた。判定後 Ravenel 株 0.5 *mg* を右そけい部皮下に接種した。表2

Fig. 3. Change of Viable Count of Tubercle Bacilli in the Lung of Vaccinated and Non-vaccinated Mice



Experimental conditions were shown in figure 2.

に示すように，BCG 免疫および残渣処置群において「ツ」反応の陽性化が認められたが，ロウB群では全例陰性であつた。残渣群における硬結の直径は BCG 群よりも大きく，また3例中2例には中心部に壊死を認めた。残渣群で5例中2例が感染前に斃死したが臓器に著明な変化はみられなかつた。感染後60日目の生存率で防衛力を評価すると，ロウBおよび残渣はモルモットに対しても BCG に近い活性を有するものと考えられる。

考　　察

結核菌の菌体成分を用いて宿主に抵抗性を与えようとする研究については多くの報告がなされているが，その中でも Nègre[9] あるいは Weiss および Dubos[10] によつて得られたメタノール抽出画分について多くの業績がある。しかしこの画分についても両者の間に抽出温度の不一致がみられるし，また全く活性がないとする成績[11]もある。そこで著者らは結核菌体脂質を系統的に分画し，マウスの生存日数の延長を指標としてそれぞれの画分の活性を調べた。その中でクロロホルムおよびメタノールに可溶な画分（ロウB），エーテル・メタノール可溶でアセトンに不溶な画分（燐脂質）および有機溶媒抽出残渣（残渣）に，このような活性を認めた。有機溶媒に可溶な画分は，組成上 Nègre や Weiss および Dubos の画分に類似するものとも考えられるが，これらの画分が著者らの実験条件で活性の認められない（未発表）ことから，活性基が全く異なるか，あるいは活性基が共通であるなら著者らの得た画分はさらに精製の進んだものと考えられる。Dubos らは乾燥菌体の 10 %として得られたメタノール抽出画分についてさらに分画を行なつているが[12,13]，活性は漸次不明瞭となつている。著者らもカラムクロマトグラフィを用いて分画を試みているが，ロウBと燐脂質画分の活性が共通の成分によるかどうかまだ明らかでない。また有機溶媒に対する溶解度による分画法にも問題があると思われる。一方，残渣にもなおこのような活性が認められることは Weiss[14] や Smith[15] の成績にもみられ，本報でも動物の生存日数が延長されることを確めた。しかし調製によつては毒性を示して動物を無処置群よりも早く斃死せしめることがあり，また生存日数の延長を示す場合でも動物の腹腔臓器に高度な癒着あるいは他の群よりも高度な脾の腫大を認めたことは，この画分に毒性物質が含まれている[16]ことを示唆する。さらに残渣には「ツ」アレルギー化活性も認められるし，また完全な菌体の混入も否定できないので，その作用は一層複雑であろう。この画分に adjuvant 作用があるという成績[14]もあるが組成の複雑性から考えて，さらに分画を行なう必要がある。

菌体成分によつて得られた抵抗性が，結核菌の感染に対して特異的であるかどうかは今までに報告された成績[17,18]から考えて疑問である。この問題は BCG 生菌免疫の場合についても同じである。そこで菌体成分の作用機構を明らかにする手段として BCG 生菌の作用との比較を行なつた。まずマウスの斃死実験で survival curve をみると，BCG 免疫群では中間死亡日数の延長がみられるだけでなく，曲線全体の勾配が緩やかになるいわゆる第2相型[2]となる。しかし菌体成分処置群ではちょうど感染菌量を少なくしたときのように中間死亡日数が延長し，対照群の曲線に平行な線（第1相）と第2相の連なつた2相曲線となる。そこで中間死亡日数や30日目生存率[19]で等しい値として得られる両者の間にも作用機構の相違があると考えられる。臓器内結核菌の推移をみると両者の間に著明な差は認められないが，臓器病変の推移および斃死マウスの肉眼的所見を比較すると，菌体成分処置群では BCG 生菌ほど病変の進展が抑制されないことが認められる。しかし菌体成分処置群でも第2相で斃死したマウスで病変が軽度であることは，この時期になつて感染免疫が成立したことによると考えられる。したがつて BCG 生菌を用いた場合には菌体成分のみによつては得られない宿主の防衛機転が作用するものと思われる。

結　　論

BCG 加熱死菌体を中性有機溶媒で分画して得られた画分の中でロウB，燐脂質および残渣に，マウスおよびモルモットの結核菌に対する抵抗性を高める作用のあることを認めた。さらに宿主体内における感染菌の推移および肉眼的な病変の推移から，菌体成分の処置によつて感染菌の増加は抑制されるが，結核性病変の進展は抑制

されがたいと考えられる。またこのような機構が survival curve のうえにも現われることを示した。

文　献

1) Crowle, A. J.: Bact. Rev., 22: 183, 1958.
2) 寺井武雄，永管徳子：結核，37：283，昭37.
3) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tuberc., 59: 86, 1949.
4) Asselineau, J.: Adv. Tuberc. Research, 5: 1, 1952.
5) Nagasuga, T., Terai, T., and Yamamura, Y.: Am. Rev. Resp. Dis., 83: 248, 1961.
6) Crowle, A. J.: Am. Rev. Tuberc. & Pulm. Dis., 77: 681, 1958.
7) Gray, D.F. and Affleck, M.N.: Am. Rev. Tuberc. & Pulm. Dis., 78: 226, 1958.
8) Levy, F.M., Conge, G.A., Pasquier, J.F., Mauss, H., Dubos, R.J., and Schaedler, R.W.: Am. Rev. Resp. Dis., 84: 28, 1961.
9) Nègre, L.: Ann. inst. Pasteur, 39: 101, 1925.
10) Wéiss, D.W., and Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 101: 313, 1955.
11) Youmans, G.P.: J. Chronic Dis., 6: 606, 1957.
12) Curtis, A.W., and Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 110: 981, 1959.
13) William, C.A.: J. Exp. Med., 111: 369, 1960.
14) Weiss, D.W.: Am. Rev. Tuberc., 77: 719, 1958.
15) Erikson, R.L., andSmith, D.W.: Am. Rev. Resp. Dis., 85: 402, 1962.
16) Azuma, I., Nagasuga, T., and Yamamura, Y.: J. Biochem., 52: 92, 1962.
17) Dubos, R.J., and Schaedler, R.W.: J. Exp. Med., 106: 703, 1957.
18) Boehme, D., and Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 107: 523, 1958.
19) Youmans, G.P., and Youmans, A.S.: J. Immunol., 78: 318, 1957.

Effects of Constituents of Mycobacteria on the Resistance of Experimental Animals against Tuberculous Infection

There have been many experiments to induce tuberculoimmunity with constituents of tubercle bacilli. A summary of these results can be found in the review of Crowle, however, there has not been coincidence in results derived from these experiments as to whether or not extracted bacillary constituents have such protective properties as living bacilli in tuberculosis, and it has also become a problem what difference in mechanism there is between acquired resistance induced by living bacilli and by chemical preparation.

In the present paper, bacterial cells were fractionated according to the method of Asselineau with some minor modifications and protective activities of each fraction were measured by the mice survival test. Moreover, the difference in response among the animals of BCG vaccinated, constituents treated and of the control following the challenge infection has been measured by the following procedures: 1) comparing the extent of lesions in the organs; 2) enumerating the numbers of tubercle bacilli in the lung.

Fractionation method of bacillary constituents: Heat-killed BCG were extracted with ether-methanol (1 : 1), and the extract was fractionated into *acetone soluble fat* and acetone insoluble fraction. From the latter, hot acetone soluble *wax A* and insoluble *phosphatide* were derived. The residue, extracted with ether-methanol, was fractionated into chloroform soluble fraction and *defatted residue.* From the former, methanol soluble *wax B* and insoluble *purified wax* were obtained. All soluble fractions were condensed under reduced pressure and lyophilized, and insoluble fractions were dried *in vacuo.*

Protective properties of constituents in mice: Each constituent was dissolved or suspended in 7 parts of Bayol F, and then emulsified with 2 parts of Arlacel A and 1 part of distilled water.

Mice were injected by the intraperitoneal rout with 0.5 mg. of each constituent in 0.2 ml. of above mixture twice at intervals of two weeks. BCG vaccinated mice were given once 0.5 mg. wet weight of living BCG in 0.2 ml. of saline, and non-vaccinated control mice were received adjuvant alone by the same way. All animals were challenged by the intravenous injection of 0.05 mg. of virulent bovine tubercle bacilli, Ravenel strain, four weeks after the first vaccination.

The result presented in table 1 shows that the resistance of mice against tubercle bacilli has been

elicited by wax B, phosphatide and defatted residue in the same degree as that following the vaccination with BCG, when the acquired resistance is evaluated by the survival time. At the autopsy of succumbed mice, as shown in figure 1, the number of mice which have numerous large tubercles in the lung was more in the groups of wax A, acetone soluble fat and of the control than those of wax B, defatted residue and of BCG.

Numbers of tubercle bacilli and lesions in the organs of sacrificed mice: Three groups of 9 mice were vaccinated with BCG, wax B and defatted residue by the above method, and one group was injected adjuvant alone as the control. After the infection with 0.02 mg. of Ravenel strain, each three mice of each group were sacrificed on the 8 th, 20 th and 28 th day, and the weight of the lung and the spleen, the number of tubercle bacilli in the lung were determined, and pathological change of the lung was observed.

Twenty days after the challenge injection, many scattered large tubercles with necrosis were seen in non-vaccinated mice, on the other hand, a small number of tubercles were observed in BCG vaccinated mice, and their size was smaller and necrosis was not visible in all of these mice. In the mice treated with wax B and defatted residue the pathological findings were intermediate. Remarkable changes were also seen in the peritoneal cavity, that is, severe adhesion of peritoneum was observed in 8 of 9 mice treated with defatted residue.

When the weight of the organs was adopted to measure the pathological change of the lung or the spleen, interesting figures were seen. The weight of the lung of BCG vaccinated mice was the highest on the 8 th day, and did not increased thereafter. Those of other three groups were lower than that of BCG group on the 8 th day, but afterwards increased gradually. In wax B and defatted residue groups, the increase of the weight of the lung was ceased on the 20 th day. On the 28 th day, the weight was highest in the control, lowest in the BCG group and intermediate in the wax B or the defatted residue group. In the case of the spleen, the increase of the weight was highest in the residue group and lowest in the control group on the 8 th day, but in the latter the weight increased gradually until the experiment terminated. These values in BCG and wax B groups were intermediate on the 8 th day and increased gradually, but this increasing trend ceased on the 20 th day.

From the above results, the early increase of the lung weight in BCG group will be ascribed to the microscopic lesion produced by vaccination, and that of the spleen in defatted residue group will probably be due to the toxic effect of the constituent which was not extracted as cord factor and left in the residue fraction. The residue fraction displayed also an allergenicity as will be shown later, however, it was not yet ascertained that whether or not these two effects were brought from the same constituent.

The number of tubercle bacilli in the lung was determined by plating the homogenates of the removed right lung of sacrificed mice on the Ogawa's medium. As seen in figure 3, there was no remarkable difference between vaccinated and non-vaccinated group in the number of colonies recovered from mice sacrificed on the 8 th and 20 th day. In contrast, on the 28 th day the bacterial populations in mice vaccinated with BCG, wax B and defatted residue were smaller than those in non-vaccinated mice.

From these data, it is suggested that the protective effect of vaccination with bacterial constituents is also manifested in a retardation of multiplication of virulent tubercle bacilli in the lung just as in the case of BCG vaccination.

Allergenicity of constituents in guinea pigs: The animals were vaccinated by the subcutaneous rout in the same way as the experiment in mice. Skin test was carried out four weeks after the first vaccination with 0.1 mg. of Protein A (prepared by the method of Seibert) and the size of induration was measured after 48 hours. All animals were challenged subcutaneously with 0.5 mg. wet weight of Ravenel strain after skin test. At the time of death, the extent of gross diseases was estimated.

From the data of survival rate of guinea pigs (table 2), the best protection was afforded by BCG, and a little lower resistance was induced by wax B and defatted residue. Skin test showed that no appreciable hypersensitivity was developed in the animals vaccinated with wax B, while nearly the same level of skin hypersensitivity was induced in animals by treatment with the defatted residue and vaccination with BCG.

In summary, the constituent extracted with neutral organic solvent has been capable of eliciting in animal a state of increased resistance to tuberculous infection without any toxicity and skin hypersensitivity. The resistance has also been elicited by the treatment with the residue, however, the residue shows both toxicity and allergenicity. Protective effect of vaccination with bacterial constituents is chiefly manifested in a retardation of multiplication of virulent bacilli in the lung just as in the case of BCG vaccination, with a little inhibition of the lesion formafion.