

イソニコチン酸ヒドラジッド (INH) 耐性結核菌の研究

第 1 報 INH 耐性結核菌の population 構成の変動について

永 島 誠

国立村山療養所

受付 昭和 35 年 9 月 3 日

緒 言

化学療法剤の発見以来、感染症の治療に著しい効果を示しているが、その反面薬剤に対する耐性菌の出現により種々の問題が起きている。結核菌においても例外ではなく、とくにイソニコチン酸ヒドラジッド (INH) に対する耐性菌では多くの場合薬剤に対する感受性の変化のみならず、種々の性状が原株と異なることが知られ^{1)~10)}、臨床的にも細菌学的にも興味もたれている。なかんずく INH 耐性結核菌の人体あるいは実験動物に対する毒力に関しては多くの学者により論議されているが^{6) 10)~20)}、これを解明するには対象とする菌株の INH 耐性に関する population 構成を常に念頭におかねばならないであろう。

INH 耐性菌は他の多くの薬剤耐性菌と同様に薬剤未接触株 population 中に spontaneous mutant として少数であるが含まれていることが知られており^{11) 21)~25)}、INH 耐性という性質は後代に遺伝すると考えられている。しかし耐性菌株が分離継代された場合、その株の population 構成は常に均一であるとはかぎらず、継代される培地が INH を含有すれば耐性菌に対する選択作用が影響を及ぼすであろうし、INH を含有しない場合は高度耐性菌の growth rate が低度耐性菌より劣るとすれば、より感受性菌の over growth が次第に起こるであろう^{21) 26)~30)}。また培地の影響を除外しても菌株固有の耐性分布の動揺性^{31) 32)}、あるいは耐性度の physiological distribution³³⁾ も考慮せねばならない。

私は以上のような諸点を顧慮して、INH 耐性菌の性状を正確に把握するための基礎実験として、INH 未接触結核菌およびそれから試験管内で得られた INH 耐性結核菌の INH 耐性に関する population 構成の変動の有無およびそのさいの population 構成菌のカタラーゼ活性の変動の有無を検討すべく実験を行なった。

実験方法

使用菌株：主として人型結核菌黒野株、牛型結核菌三輪株を用い、一部人型結核菌 H₃₇Rv 株および INH

未使用患者より分離した結核菌 No. 1 株を用いた。患者分離株以外はすべて慶大細菌学教室より分与された株である。

使用培地：すべて 1% KH₂PO₄ 加小川培地を用いた。

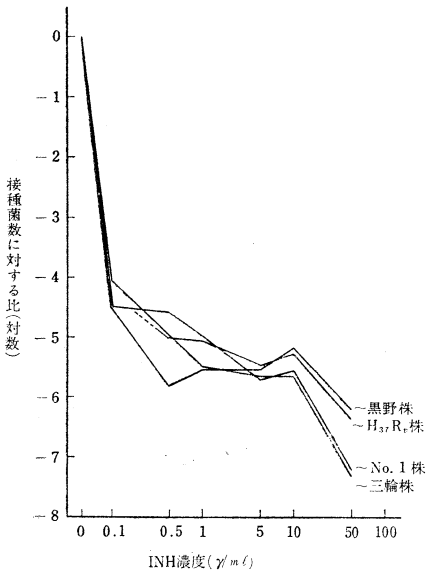
INH 耐性についての population 構成の分析：小川培地培養 3~4 週の菌を硝子玉入り磨砕コルペン中で振りながら滅菌蒸留水に浮遊、さらに軽く遠心沈澱することにより粗大菌塊を除いた均等菌浮遊液を比濁により一定濁度に規制した菌液について行なつた。すなわちこの菌液を 10 倍階段希釈し、各稀釈菌液を各種濃度 INH 含有小川培地および対照 INH 非含有培地 2 本ずつに 0.1 ml ずつ接種し、おおむね 4 週後集落数算定を行ない、対照培地および各 INH 濃度培地に増殖する当該菌液中の生菌数を求めることにより耐性分布をみた。培地に添加した INH 濃度は 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 γ/ml の 7 段階であり、凝固滅菌前に終末濃度を加えた。

カタラーゼ活性の測定：Peizer らのクエン酸-モリブデン酸アンモン法³⁴⁾を多少変えた半定量的方法を主として用い、Middlebrook の定性的な発泡法⁴⁾をも併用した。クエン酸-モリブデン酸アンモン法を略記すると、M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.55 ml、被検結核菌 2 白金耳、0.3% 過酸化水素水 0.05 ml を混和、6°C 60 分放置後、6% クエン酸 0.2 ml、1.1% モリブデン酸アンモン 0.2 ml を加えると、過酸化水素の残量に応じて黄色を呈するので、これをクロム酸カリ溶液をもつて調製した標準管と比色し、カタラーゼ活性度を半定量的に測定した。すなわちカタラーゼ活性の程度を(++)、(+), (±) の 4 段階に分け、本法および発泡法においてカタラーゼ活性の認められないものを (-) とした。なお、カタラーゼ活性の減弱化の少ない場合もあることを考え、0.3% 過酸化水素水を 0.1 ml とした方法をも併用した。そして INH 耐性に関する菌 population 構成と、このカタラーゼ活性との関係をみるために、上記耐性分布検査のさいの対照および INH 各濃度培地に増殖した菌について、それぞれカタラーゼ活性を測定した。

実験成績

I NH 未接触株における耐性分布：人型結核菌黒野株，H₃₇Rv 株，牛型結核菌三輪株，未治療患者よりの新鮮分離 No. 1 株の 4 株につき生菌数 10⁷~10⁸ 程度の population 中に存在する I NH 耐性菌の分布を観察した。I NH 各濃度耐性菌菌数の接種総生菌数に対する割合を求めると，図 1 に示すように菌株により差はあるが，0.1 γ: 3.1~9.0×10⁻⁵，0.5 γ: 0.15~2.7×10⁻⁵，1 γ: 3.0~10.0×10⁻⁶，5 γ: 2.0~3.6×10⁻⁶，10 γ: 2.3~6.7×10⁻⁶，50 γ: 0.5~5.8×10⁻⁷ であり，

図 1 I NH 未接触株における耐性分布



N. 1 株は肺結核患者よりの新鮮分離株。

本実験においては 100 γ 以上の耐性菌はいずれの株にもみられなかった。

次に耐性分布の動揺性の有無を検討する目的で，時を異にして同様の実験を人型結核菌黒野株および牛型結核菌三輪株について数回繰返し行なった結果は，図 2 および表 1 に示したように，黒野株においては各回の結果は耐性菌の含まれる比率に大なる動揺は認められず，多くの場合 10 倍以内の変動であつたが，三輪株の場合には 10 倍以上の変動を示すことが多く，100 倍の変動がみられる場合もあつた。とくに 10 γ 以上の耐性菌のみられなかつたこともあつたが，この場合は接種菌量が他の実験に比しやや少なかつたことが関係するのかもしれない。しかしながら以上の結果は，I NH未接触株における I NH 耐性に関する population 構成の動揺性の大小が菌株によつてみられることを推察せしめるものであろう。

I NH 1 γ 培地上に増殖した単個集落の示す耐性分布：黒野株および三輪株の稀釈菌液を I NH 1 γ 培地に接種，そこに生じた分離した単個集落を at random にとり，そのおのおのから菌液を作り，一定量を I NH 0, 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 γ/ml 加小川培地に接種してそれぞれの耐性分布をみた。結果は表 2 に示したように，黒野株より得た集落 11 コにおいては，I NH 1 γ をもつて select したにもかかわらず 50 γ 培地まで対照培地におけるとほとんど同程度の発育をみたものが 8 コ (a, c, d, f, g, h, j, k) あり，その他の集落 (b, e, i) においても 10 γ 以上の耐性菌の占める比率は相当大で，各集落を作る population の耐性は高度のものが多かつた。これに反し三輪株においては 7 コの被検集落のうち 1 γ 耐性 2 コ (d, g)，5

図 2 I NH 未接触株の耐性分布の動揺性

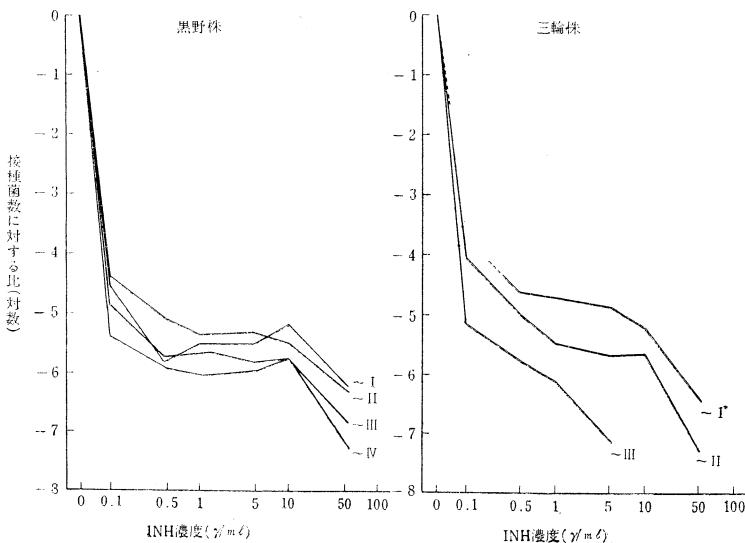


表1 INH 未接触株の耐性分布の動揺性

株	実験	0	0.1	0.5	1	5	10	50 γ/ml
黒野株	I	2.4×10^7	7.5×10^8	3.6×10	7.2×10	7.4×10	16.3×10	1.4×10
	II	4.2×10^7	16.8×10^3	34.8×10	17.8×10	19.6×10	13.6×10	2.0×10
	III	12.4×10^7	16.8×10^3	21.4×10	27.6×10	18.2×10	22.0×10	1.7×10
	IV	4.0×10^7	1.2×10^2	5.2×10	3.4×10	4.4×10	6.8×10	0.2×10
三輪株	I	36.9×10^7	—	880.0×10	700.0×10	467.6×10	226.0×10	14.6×10
	II	4.0×10^7	36.0×10^2	41.0×10	13.0×10	8.8×10	9.1×10	0.2×10
	III	2.7×10^7	1.8×10^2	4.2×10	2.0×10	0.2×10	0	0

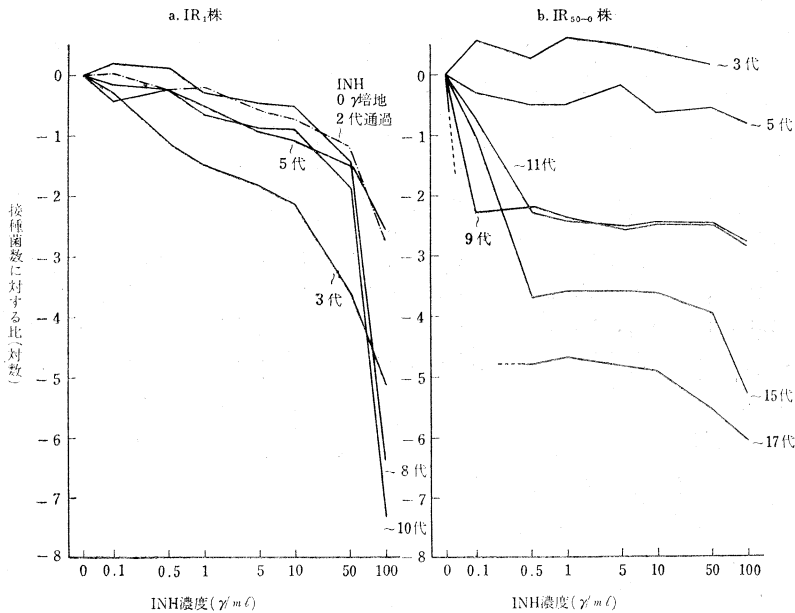
数字は各 INH 濃度培地に増殖しうる生菌数を示す。

表2 INH 1 γ 培地上に増殖した単個集落の示す耐性分布およびカタラーゼ活性

カタラーゼ活性	INH 濃度 γ/ml	黒野株											三輪株						
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	a	b	c	d	e	f	g
0	59	卅	卅	18	166	5	卅	卅	卅	+	卅	40	35	卅	卅	2	卅	卅	
0.1	99	卅	卅	12	103	3	卅	卅	卅	+	卅	57	—	卅	卅	27	卅	25	
1	69	卅	卅	12	100	13	卅	卅	卅	+	卅	卅	43	卅	卅	7	卅	卅	
5	75	卅	卅	30	155	9	卅	卅	卅	+	卅	卅	58	卅	6	18	卅	2	
10	105	卅	卅	16	70	5	卅	卅	卅	+	卅	1	45	卅	0	20	—	0	
50	68	卅	卅	12	19	4	卅	卅	卅	+	卅	0	0	120	1	12	56	0	
100	13	127	30	0	18	0	卅	+	+	5	+	0	0	118	0	4	0	0	
カタラーゼ活性		(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(+)

カタラーゼ活性は INH を含有しない培地上の菌のみについて検した。

図3 INH 耐性結核菌の継代による population 構成の変化



γ , 10 γ , 50 γ 各 1 \square (a, b, f), 100 γ 2 \square (c, e) と種々の程度の耐性を示していた。これらの単個集落に由来する菌のカタラーゼ活性を対

照培地上の菌について観察すると、黒野株の集落 c, f, i は高度耐性であつたにもかかわらず陽性であり、三輪株においては低い耐性を示した集落 a, d, g が

陽性であつた。しかしこれらの株のカタラーゼ活性度はいずれも著しく減弱していた。そしてその他の単個集落に由来する菌にはすべてカタラーゼ活性を認められず、菌の耐性度とカタラーゼ活性の間には判然とした関係はみられなかつた。しかし、この点をさらに検討するためには population 構成をより精細に分析、そのおのおのについてカタラーゼ活性を測定すべきであろう。

INH 耐性結核菌の継代による population 構成の変化：

i) 黒野株より one step selection により INH 1 γ 培地に生じた単個集落より得た不均一な population

構成をもつ株 (IR₁ 株と名づける) を INH 1 γ 培地に継代し、その population 構成の変動およびカタラーゼ活性について観察した結果は図 3 a および表 3 に示した。分離当初の単個集落より作製した菌液についての耐性分布は表 3 にみるように、培地の INH 濃度が增加するに従い生菌数が漸次減少し 50 γ 以上の耐性菌は認めえなかつた。すなわち 50 γ 以下の各種程度の INH 耐性菌の混合 population であつたといえる。この株を 1 γ 培地に継代すると、その初期 (5代) に比較的高濃度 (0.5~50 γ) の耐性菌は増加するが、なお不均一な構成を示し、以後 10 代までには著しい変化

表 3 IR₁ 株の INH 1 γ 培地継代による耐性分布およびカタラーゼ活性の変動

継代 INH γ /ml	1 代		3 代		5 代		8 代		10 代		※	
	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA
0	冊	(±)	2.9 × 10 ⁷	(±)	1.6 × 10 ⁷		2.5 × 10 ⁷	(±)	4.6 × 10 ⁷	(±)	3.1 × 10 ⁷	(±)
0.1	冊		1.8 × 10 ⁷	(±)	1.2 × 10 ⁷		4.2 × 10 ⁷	(±)	1.9 × 10 ⁷	(±)	3.7 × 10 ⁷	(±)
0.5	冊		2.0 × 10 ⁶	(±)	1.0 × 10 ⁷		3.2 × 10 ⁷	(±)	2.8 × 10 ⁷	(±)	1.9 × 10 ⁷	(±)
1	冊		1.0 × 10 ⁶	(±)	5.5 × 10 ⁶		1.4 × 10 ⁷	(±)	1.1 × 10 ⁷	(±)	2.1 × 10 ⁷	(±)
5	冊		4.3 × 10 ⁵	(±)	1.8 × 10 ⁶		8.6 × 10 ⁶	(±)	5.7 × 10 ⁶	(±)	8.5 × 10 ⁶	(±)
10	冊		2.2 × 10 ⁵	(±)	1.4 × 10 ⁶		7.4 × 10 ⁶	(±)	6.3 × 10 ⁶	(±)	7.0 × 10 ⁶	(±)
50	-		7.0 × 10 ³	(-)	4.8 × 10 ⁵		1.0 × 10 ⁶	(-)	5.9 × 10 ⁵	(±)	2.1 × 10 ⁶	(±)
100	-		2.0 × 10 ²	(-)	4.3 × 10 ⁴		1.0 × 10 ¹	(-)	2.0 × 10 ⁰	(±)	5.5 × 10 ⁴	(±)

※ 継代 7 代目の菌を INH を含有しない培地に 2 代継代後の耐性分布。
CA: catalase activity

表 4 IR₅₀ 株の INH を含有しない培地継代による耐性分布およびカタラーゼ活性の変動

継代 INH γ /ml	3 代		5 代		9 代		11 代		15 代		17 代	
	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA
0	8.5 × 10 ⁵	(-)	63.5 × 10 ⁴	(+)	1.27 × 10 ⁷	(+)	4.25 × 10 ⁷	(+)	5.50 × 10 ⁷	(+)	3.00 × 10 ⁷	(+)
0.1	36.0 × 10 ⁵	/	32.5 × 10 ⁴	(-)	6.50 × 10 ⁴	(-)	8.45 × 10 ⁶	(+)	4.80 × 10 ⁶	(+)	/	/
0.5	16.0 × 10 ⁵	/	20.0 × 10 ⁴	(-)	9.00 × 10 ⁴	(-)	2.15 × 10 ⁵	(-)	1.10 × 10 ⁴	(-)	5.50 × 10 ²	(-)
1	37.5 × 10 ⁵	(-)	22.0 × 10 ⁴	(-)	5.50 × 10 ⁴	(-)	1.65 × 10 ⁵	(-)	1.55 × 10 ⁴	(-)	6.40 × 10 ²	(-)
5	26.5 × 10 ⁵	(-)	47.0 × 10 ⁴	(-)	3.50 × 10 ⁴	(-)	1.40 × 10 ⁵	(-)	1.55 × 10 ⁴	(-)	4.60 × 10 ²	(-)
10	21.0 × 10 ⁵	/	15.5 × 10 ⁴	(-)	4.50 × 10 ⁴	(-)	1.60 × 10 ⁵	(-)	1.35 × 10 ⁴	(-)	3.75 × 10 ²	(-)
50	13.0 × 10 ⁵	(-)	21.5 × 10 ⁴	(-)	4.50 × 10 ⁴	(-)	1.65 × 10 ⁵	(-)	6.10 × 10 ⁴	(-)	9.00 × 10 ¹	(-)
100	0		9.9 × 10 ⁴	(-)	1.85 × 10 ⁴	(-)	0.75 × 10 ⁵	(-)	2.90 × 10 ²	(-)	3.00 × 10 ¹	(-)

CA: catalase activity

はなく耐性分布曲線は INH 濃度の高いほうに傾斜する傾向を示した。なお 100 γ 耐性菌の数は著しい動揺を示した。また一方継代 7 代目の菌を 2 代 INH を含有しない培地に継代し耐性分布を分析しても、population 構成は 1 γ 培地に継代を続けた株と著しい差異はみられなかつた。

IR₁ 株のカタラーゼ活性は分離当初より微弱陽性 (±) で、INH を含有しない培地 (3 代) あるいは INH 1 γ 培地 (11 代) に継代しても活性度には変り

はなかつた。また耐性分布検査のさいに对照および各種濃度 INH 培地に増殖した菌のカタラーゼ活性測定の結果から population 構成菌のうち、50 γ 以上の INH 培地に増殖する菌の一部を除いてほとんどすべてがカタラーゼ微弱陽性であることが推察された。

ii) one step selection により INH 50 γ 培地より得られた単個集落 (IR₅₀ 株と名づける) を INH を含有しない培地に継代した株 (IR₅₀₋₀ 株) の各継代時における耐性分布を図 3 b および表 4 に示した。継

代初期(5代)には100 γ までほとんど full resistant population と思われたが、継代9代目には0.1 γ 以上の耐性菌は明らかに減少し、全生菌数の1/100以下になった。そして0.5 γ 以上50~100 γ にいたる培地上に増殖する生菌数はほとんど同数と認められ、0.1 γ 以下耐性の感受性菌と50~100 γ の耐性を有する菌との混合 population となつたと思われる。さらに継代を続けると高耐性菌の比率は次第に減少してゆく傾向を示した。11代および15代の0.1 γ 培地にみられる集落数は、より高濃度INH培地上の集落数よりも著しく多く、全 population の1/10以上を占めており、0.1

γ 培地に増殖しうる菌の population 内における動揺性が認められた。

次に、これら各代における population のカタラーゼ活性を検した結果は、分離当初には培地のINHの有無に関係なくすべての菌にカタラーゼ活性は認められなかつたが、継代5代目にはINHを含有しない培地に増殖した菌のみに中等度(+)に活性を認めるようになった。さらに11代、15代目には0.1 γ 培地上の菌にもカタラーゼ活性を弱度ないし中等度に認めるようになったが、それ以上の濃度のINH培地に増殖した菌にはカタラーゼ活性を認めることはできなかつた。

表5 IR₅₀株のINH 100 γ (50 γ)培地継代による耐性分布およびカタラーゼ活性の変動

継代 INH γ/ml	3代		5代		9代		13代		16代		18代	
	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA	生菌数	CA
0	16.0 × 10 ⁶	(-)	10.0 × 10 ⁶	(-)	27.9 × 10 ⁶	(-)	37.0 × 10 ⁶		8.80 × 10 ⁶	(-)	46.0 × 10 ⁶	(-)
0.1	17.5 × 10 ⁶	/	10.0 × 10 ⁶	(-)	25.6 × 10 ⁶	(-)	35.0 × 10 ⁶		7.45 × 10 ⁶	(-)	37.0 × 10 ⁶	(-)
0.5	28.5 × 10 ⁶	(-)	11.0 × 10 ⁶	(-)	28.2 × 10 ⁶	(-)	50.0 × 10 ⁶		6.15 × 10 ⁶	(-)	52.5 × 10 ⁶	(-)
1	18.0 × 10 ⁶	(-)	13.0 × 10 ⁶	(-)	29.9 × 10 ⁶	(-)	42.5 × 10 ⁶		7.30 × 10 ⁶	(-)	22.0 × 10 ⁶	(-)
5	17.0 × 10 ⁶	(-)	16.5 × 10 ⁶	(-)	23.0 × 10 ⁶	(-)	47.0 × 10 ⁶		7.85 × 10 ⁶	(-)	27.5 × 10 ⁶	(-)
10	22.0 × 10 ⁶	/	12.0 × 10 ⁶	(-)	22.7 × 10 ⁶	(-)	39.5 × 10 ⁶		5.05 × 10 ⁶	(-)	18.5 × 10 ⁶	(-)
50	19.2 × 10 ⁶	(-)	9.5 × 10 ⁶	(-)	15.9 × 10 ⁶	(-)	31.5 × 10 ⁶		3.75 × 10 ⁶	(-)	26.0 × 10 ⁶	(-)
100	0		3.25 × 10 ⁶	(-)	24.1 × 10 ⁶	(-)	23.5 × 10 ⁶		3.25 × 10 ⁶	(-)	12.0 × 10 ⁶	(-)

CA: c talase activity

iii) IR₅₀株を原株より分離後50~100 γ 培地に継代した株(IR₅₀₋₁₀₀株)の耐性分布は表5に示した。この表より明らかのように、その population を構成する菌は常に50~100 γ まで full resistance で、またすべてカタラーゼ活性陰性であり、継代によつて耐性分布の変化あるいはカタラーゼ活性の回復等はみられず安定した性状を示した。

考 察

INHに接触したことのない結核菌の示すINHに対する耐性は接種菌量、培地等によつて異なることはもちろんであるが、一方菌株あるいは菌型によつても感受性に差異がみられている^{21) 23) 35)~37)}。このことは菌株あるいは菌型によつてINHの低濃度における耐性分布に相違があることを推察せしめるが、より高濃度の耐性分布にも差異が見出される可能性もあり、より精細なINH耐性に関する population 構成の分析が必要であろう。私の行なつた上記実験の結果では人型結核菌黒野株のINH耐性に関する population 構成は安定しているが、牛型結核菌三輪株のそれは動揺しやすいことを示した。また黒野株 population 中のINH 1 γ 培地に増殖した集落の多くは高濃度のINHにまで耐性を示すのに対して、三輪株においては区々の耐性を

示すことが明らかにされた。これは両株の耐性分布曲線において前者では0.5 γ ないし10 γ 培地上の集落数がほとんど同数であるのに対し、後者ではINH濃度を増すに従い集落数が減少することと考えあわせると、両株の間に、population を構成するINH耐性変異菌のもつ耐性度の分布に差異があることを示すものと思われる。もちろん、INH 1 γ 培地により one step selection を行なわれた集落にも、渡辺³⁸⁾のいう relative inhibition and relative selection が働く可能性はあり、黒野株集落はこの作用を三輪株集落よりも受けやすかつたのではないかと考えられる。しかしながら黒野株と三輪株のINH耐性分布に差のあつたことは、relative inhibition and relative selection を考慮しないでも上述の説明を可能とするものと考えられる。この点を明らかにするためには replica plating method³⁹⁾を行なうべきであろうが、今回は行なうことができなかった。またこれらの2菌株間の差異は人型結核菌と牛型結核菌との差異である可能性もあるが、この点に関しては検討しなかつた。

INH耐性結核菌の population 構成を分析すれば高濃度まで均一な構成を示す株と低濃度においてもすでに不均一な株のあることは知られており^{7) 32) 40)}、上記実験において50~100 γ まで均一な構成を示す株

(IR₅₀株)と低濃度より不均一性を示す株(IR₁株)を得ている。しかし前者においても、INH培地に継代された場合(IR₅₀₋₁₀₀株)にはその耐性分布およびカタラーゼ活性に変化がみられなかつたのに反し、INHを含有しない培地に継代された場合には感受性菌が次第に増加し17代目には耐性菌が 10^{-5} ~ 10^{-6} に減じている。そしてカタラーゼ活性も感受性菌の増加に伴い出現し、17代目には原株とほとんど同程度となつた。しかしこの活性はpopulationを構成する菌のうち、0.5%以下の耐性を示す菌によるものであつて、それ以上の耐性を示すpopulation構成菌は陰性であつた。このような分離後ただちにINHを含有しない培地に植え継がれたINH耐性菌の耐性度の不安定性についてはBarnettら²⁶⁾も指摘しているが、これは第1にback mutationおよびそれによつて生じた感受性菌のover growthによつて起こりうるし、第2には原株よりIR₅₀株を分離するさい不知の間に静止状態にあつた少数の感受性菌を混じて釣菌したものが継代によつてover grownしたとも考えられる。本実験においてはback mutationを積極的に証明しえないし、分離方法は特殊な器械を使用したものでもないで目的菌以外の菌を混合して培養することもありうるので一応第2の原因によつてかかる現象が起こつたと考えるのがより容易であろう。さらに、この考えを支持する実験結果として、INHを含有しない培地に継代したさいのpopulation構成の変化が感受性菌と高度耐性菌の2つに分かれるような結果を得たことがあげられる。なお、IR₅₀₋₀株11代および15代目にみられた0.1%培地の生菌数は総生菌数の1/10以内で、この数は原株に含まれる0.1%耐性菌数に比して著しく多いので単なる感受性菌よりの変異菌としては考えがたいが、0.1%培地に増殖する菌にはいわゆるphysiological distributionによるものがあると考えられ、ことにこの0.1%培地に増殖した菌にカタラーゼ活性の認められたことはこの考えを支持するものと思われるが、今後の追究がまたれる。

IR₁株は不均一な構成を有する耐性株であるが、2代INHに接触せしめなくとも耐性分布、カタラーゼ活性に変化を認めず、多少の動揺はあるにしても一応不均一のまま安定したpopulationということが出来る。

IR₁株はこの安定性においてIR₅₀株とは異なつてゐるほか、カタラーゼ活性に関してこのpopulation中のいかなる耐性度の菌でも同程度に減弱はしているが陽性であつた点でもIR₅₀株とは異なつてゐた。

以上からone step selectionによつてもpopulationの耐性度の均一性、あるいはカタラーゼ活性の異なるINH耐性菌が得られることが明らかにされたものと考えられる。

結 論

1) INH未接触菌株である人型結核菌黒野株および牛型結核菌三輪株について、数回にわたりINH耐性分布を検した結果、黒野株のINH耐性に関するpopulation構成は比較的安定してゐたが、三輪株のそれは動揺を示した。

2) 黒野株のpopulationを構成する耐性変異菌は高度耐性を示すものが多く、三輪株のそれは種々の耐性度をもつ菌の混合populationであつた。

3) INH 1%をもつてone step selectionされた個々の集落についてそれらのpopulation構成を検すると、黒野株においてはINH 1%をもつてselectしたにもかかわらず10~50%の高濃度耐性菌により構成されたものが多く、これに反し三輪株では種々の耐性度を示してゐた。

4) 黒野株よりone step selectionにより得られたINH耐性株にpopulation構成上不均一なもの均一なものがあり、その構成はINH含有培地に継代された場合はいずれも安定してゐた。そしてカタラーゼ活性は前者においてはpopulation構成菌のほとんどすべてが減弱しているが陽性であつたのに反し、後者では陰性であつた。

5) one step selectionで得られたpopulation構成の均一な50%耐性株をINHを含有しない培地に継代することにより、感受性菌の出現、増加を認め同時にpopulation中の感受性ないし低度耐性を示す菌にカタラーゼ活性の回復をみたが、これは分離時に静止状態にあつた感受性菌を釣菌したためと考えられた。

one step selectionにより得られたpopulation構成の不均一な耐性株は、INHを含有しない培地に継代してもpopulation構成、カタラーゼ活性に変化はなかつた。

稿を終るにのぞみ、御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜つた慶応義塾大学医学部細菌学教室牛場大蔵教授、斎藤和久講師および終始御助言と御鞭撻を下さつた国立村山療養所田中堅輔所長、小坂久夫医務課長、前田謙次研究検査科医長に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Fisher, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 66 : 626, 1952.
- 2) Fisher, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 797, 1954.
- 3) Knox, R. : J. Gen. Microbiol., 12 : 191, 1955.
- 4) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 5) Cohn, M.L., Oda, U., Kovitz, C. & Middle-

- brook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 465, 1954.
- 6) Cohn, M.L., Kovitz, C., Oda, U. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 7) 堀三津夫 : 結核, 33 (増刊) : 14, 昭33.
- 8) Barry, V.C., Conalty, M.L., Denney, J.M., Gaffney, E.E. & Widner, F. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 785, 1955.
- 9) Middlebrook, G., Cohn, M.L. & Schaefer, W.B. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 852, 1954.
- 10) Neumayer, R.B., Morse, P.Z. & Morse, W. C. : P.S.E.B.M., 89 : 468, 1955.
- 11) Karlson, A.G. & Ikemi, Y. : Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 27 : 239, 1952.
- 12) Middlebrook, G. & Cohn, M.L. : Science, 118 : 297, 1953.
- 13) Peizer, L.R., Widelock, D. & Klein, S. : Am. Rev. Tuberc., 68 : 290, 1953.
- 14) Steenken, W.Jr. & Wolinsky, E. : Am. Rev. Tuberc., 68 : 548, 1953.
- 15) Bloch, H., Widelock, D. & Peizer, L.R. : Am. Rev. Tuberc., 68 : 734, 1953.
- 16) Morse, W.C., Weiser, O.L., Kuhns, D.M., Fusillo, M., Dail, M.C. & Evans, J.R. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 464, 1954.
- 17) Oestreicher, R., Dressler, S.H., Russel, W.F. Jr., Grow, J.B. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 390, 1955.
- 18) 金井興美 : 医学と生物学, 34 : 154, 昭30.
- 19) 金井興美 : 医学と生物学, 34 : 248, 昭30.
- 20) 佐藤直行 : 結核, 30 : 455, 昭30.
- 21) Szybalski, W. & Bryson, V. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 768, 1952.
- 22) Knox, R., King, M.B. & Woodroffe, R.C. : Lancet, ii : 854, 1952.
- 23) Hobby, G.L. & Lenert, T.F. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 771, 1952.
- 24) 佐藤直行 : 医学と生物学, 25 : 142, 昭27.
- 25) 牛場大蔵・後藤敏夫・清水邦彦・渡口精吉・坂本光弘 : 結核, 30 : 648, 昭30.
- 26) Barnett, M., Bushby, S.R.M. & Mitchison, D.A. : Lancet, i : 314, 1953.
- 27) Pansy, F., Stander, H. & Donovan, R. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 761, 1952.
- 28) 佐藤直行 : 結核, 30 : 119, 昭30.
- 29) 佐藤直行 : 医学と生物学, 31 : 250, 昭29.
- 30) 中山瑛一 : 九大結研紀要, 2 : 1, 昭30.
- 31) 三浦幸二 : 結核, 31 : 616, 昭31.
- 32) 長田進 : 結核, 33 : 699, 昭33.
- 33) 氏家淳雄 : 結核, 34 : 457, 昭34.
- 34) Peizer, L.R. & Widelock, D. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 305, 1955.
- 35) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 765, 1952.
- 36) 佐藤直行 : 医学と生物学, 24 : 61, 昭27.
- 37) 林治 : 結核, 28 : 567 (学会講演), 昭28.
- 38) Watanabe, T. : Keio J. Med., 3 : 193, 1954.
- 39) Ushiba, D., Hsu, Y. & Fukazawa, T. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 841, 1957.
- 40) 三浦幸二・林光男・野田用・安保孝・鳥居太 : 結核, 32 : 567, 昭32.