

P³² および S³⁵ とりこみからみた INH の作用形式

東 村 道 雄 ・ 水 野 松 司

国立療養所大府荘

受付 昭和 36 年 8 月 28 日

Isonicotinic acid hydrazide (INH) の作用機作については多くの研究があるが、まだ決定的な解明はなされていない。INH 作用機作に関する研究の歩みは次の 6 種に分けうる。

第 1 は INH と pyridoxamine との類似から出発したもので、INH が pyridoxal coenzymes と拮抗するとするものである。この説は Yoneda et al.¹⁾²⁾ により提出され、酒井³⁾ および山本⁴⁾ によりおのおの transaminase および cysteine desulfhydrase 阻害が報告された。しかし INH 自体がこれらの酵素作用を阻害するには M/100~M/500 という高濃度が必要であつて、実際の抗菌作用の説明には大にすぎる難点がある。Youatt⁵⁾ は INH の transaminase 阻害を認めつつ、これを INH の作用機作と考えることは困難であると述べている。なお、Pope⁶⁾⁷⁾ は INH の抗菌作用に対して pyridoxal および pyridoxamine が拮抗することを観察している。

第 2 は INH と pyruvate または α -ketoglutarate の拮抗⁶⁾⁸⁾⁹⁾ から出発したもので、Nitti e Curci⁹⁾ は INH が菌体内の pyruvate と結合して TCA cycle の回転を阻害し、ひいては脂質および蛋白の代謝を阻害すると想像しているが、実験的裏づけは行なわれていない。

第 3 は呼吸阻害説で INH が diphosphopyridine nucleotide (DPN) と拮抗する¹⁰⁾ または dehydrogenase を阻害する⁷⁾¹¹⁾ とすものである。しかし INH の大量を要する点で作用機作としては可能性が薄い。最近、以上とは異なり今野¹²⁾ は INH が DPN の nicotinamide に誤つて置換組入れられるという新説を発表した。

第 4 は porphyrin 代謝阻害説¹³⁾、catalase または peroxidase 阻害説¹⁴⁾ である。

第 5 は INH が分解して H₂O₂ を発生するという Winder¹⁵⁾ の観察および dehydrogenase-cytochrome 系阻害から二次的に生じる過剰の H₂O₂ による発育阻

害とする Krüger-Thiemer 説¹⁶⁾ である。

第 6 は直接的な作用機作ではないが、感性菌は C¹⁴-INH を uptake するが、耐性菌はこれをしていないという Barclay et al.¹⁷⁾ および Youatt^{18)~20)} の観察である。この観察は INH の作用機作について重要な基礎的面を示している。

以上のごとき INH の作用機作に関する諸説の多様性は反面いずれもまだ決定的なものはないことを示しているといえよう。本報で磷 isotope (P³²) および硫黄 isotope (S³⁵) を用いて代謝回転の面から INH 作用機作に観察を加えたのは、この面から一つの寄与をなさんがためである。もちろんいまだ作用機作に関する間接的一面を望む段階にすぎないが、研究の第一歩として報告する。

実験材料および方法

被検株：Mycobacterium 獣調株 (大府荘保存株) を用いた。菌は Sauton 培地 (200 ml Erlenmeyer flask 中 50 ml, pH 7.0) に 3~6 日培養したのち、生理食塩水で 3 回洗滌して用いた。

培地：P³² または S³⁵ とりこみ実験用には、Sauton 培地 (sodium glutamate 使用)、P なし培地 (P-deficient medium, Sauton 培地中の磷酸塩をぬいて代りに KCl を加えたもので、かつ成分の濃度は 1/2 となつている) および 磷酸緩衝液を用いた。INH 量は 10 $\mu\text{g/ml}$ を用いた。

Isotope 実験：P³²-orthophosphate または S³⁵-sulfate を含む培地に洗滌菌液を加えた aliquots を作り、37°C に培養して P³² または S³⁵ をとりこませ、一定時間後に菌を遠心洗滌すること 4 回ののち、Schneider 法²¹⁾ で分画した。P³² または S³⁵ の放射能は Geiger-Mueller counter で測定し、乾燥菌量 mg 当りの cpm (counts per minute) で表わした。被検条件での P³² 測定効率 は 5% である。

実験成績

(1) P³²-燐酸のとりこみに対する INH の影響 (Sauton 培地)

Sauton 培地に P³² 2 μg/ml を加えたときの対照の P³² とりこみをみると、3 時間後には酸溶性画分に多量の P³² がとりこまれているが、その後酸溶性画分の P³² 量が減少するとともに脂質、核酸、蛋白の各画分の P³² 量が増加する。とくに核酸画分の増加が著しい。菌体単位重量 mg 当りの P³² 総量でみると 3 時間以後一たん P³² 量が減少し、24 時間後に再び増加する。この中間的低下は一たんとりこまれた P³² が菌の増殖に伴って分配されるとともに菌体外へ溶出するものと思われる。

INH 10 μg/ml 添加では、3 時間後すでに核酸画分および蛋白画分へのとりこみ量が絶対量および % とも

に若干減少している。そして以後はますますとりこみの減少が著明になる。P³² とりこみの減少は核酸画分でもつとも著しい。(図 1, 2, 表 1 参照)

INH 中での P³² とりこみ阻害は比較的徐々に起こるが、この P³² とりこみの減少は菌の死滅による一般的機能阻害によるものではないと思われる。なんとなれば、もしそうなら各画分へのとりこみ阻害が一律に起こると思われるからである(このような場合は後述のごとく 18~22 時間後には観察される)。実際にみられる結果は、P³² とりこみ阻害が核酸画分できくに著しいし、また次の S³⁵ のとりこみはかえって総体的に逆に亢進している。すなわち、P³² とりこみに対する影響と S³⁵ とりこみに対する影響が逆である。したがって P³² とりこみ阻害は比較的特異的現象と思われる。以上の結果は間接的であれ INH が核酸合成阻害ないし蛋白合成阻害と関係していることを考えさせる。

Fig. 1. Effect of INH on the Incorporation of P³²-Phosphate into Cellular Fractions of Mycobacterium "Jucho" (See Table 1)

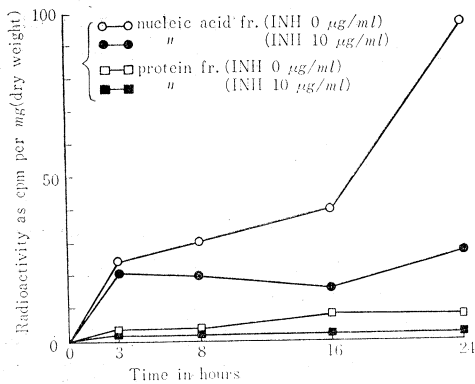


Fig. 2. Effect of INH on the Incorporation of P³²-Phosphate into Cellular Fractions of Mycobacterium "Jucho" (See Table 1)

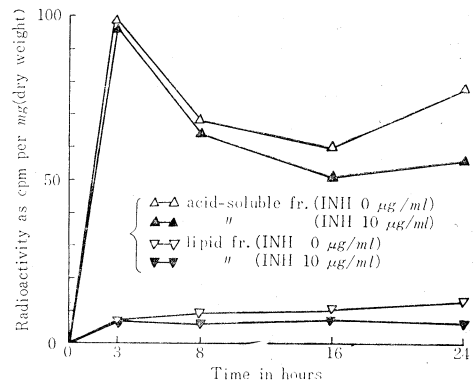


Table 1. Effect of Isoniazid (INH) on the Incorporation of P³²-Orthophosphate into Cellular Fractions of Mycobacterium "Jucho"

Reaction system *	Time in hrs.	Radioactivity as cpm per mg (dry weight) of cells				
		Acid-soluble fr.	Lipid fr.	Nucleic acid fr.	Protein fr.	Total (cpm/mg)
INH 0 μg/ml	3	96.9 (73.5%)	7.4 (5.6%)	24.1 (18.2%)	3.6 (2.7%)	132.0 (100%)
	8	68.0 (61.2%)	9.6 (8.6%)	30.0 (27.1%)	3.4 (3.1%)	111.0 (100%)
	16	60.0 (50.7%)	9.8 (8.3%)	40.0 (33.8%)	8.6 (7.3%)	118.4 (100%)
	24	77.9 (39.8%)	13.1 (6.7%)	97.3 (49.7%)	7.5 (3.8%)	195.8 (100%)
INH 10 μg/ml	3	96.0 (76.0%)	7.3 (5.8%)	21.0 (16.6%)	2.0 (1.6%)	126.3 (100%)
	8	63.9 (69.8%)	6.2 (6.8%)	19.7 (21.5%)	1.9 (2.1%)	91.7 (100%)
	16	51.3 (66.8%)	7.3 (9.5%)	16.0 (20.8%)	2.3 (3.0%)	76.9 (100%)
	24	56.1 (61.0%)	6.2 (6.7%)	27.6 (30.0%)	2.0 (2.2%)	91.9 (100%)

* Reaction mixture consisting of cells (3-day-old culture), 160 mg/ml; P³²-orthophosphate, 2 μg/ml; and INH, 0 or 10 μg/ml¹ in Sauton medium (6.0ml).
(): Percentage distribution of radioactivity in cellular fraction.

(2) P³²- 磷酸とりこみに対する INH の影響 (P なし培地)
 P なし培地でも P³² とりこみに対する INH の影響はほとんど同じである。(表 2)
 INH の存在で、酸溶性画分の P³² 量が増加し、核

酸画分および蛋白画分とくに前者の P³² 量が著明に減少する。脂質画分の P³² 量は絶対量は減少するが、菌体内分布比では対照と同じである。本実験の結果も INH が核酸合成および蛋白合成阻害に関係することを示している。

Table 2. Effect of Isoniazid (INH) on the Incorporation of P³²-Orthophosphate into Cellular Fractions of Mycobacterium "Jucho"

Reaction system *	Time in hrs.	Radioactivity as cpm per mg (dry weight) of cells				
		Acid-soluble fr.	Lipid fr.	Nucleic acid fr.	Protein fr.	Total
INH 0 $\mu\text{g/ml}$	3	551. (25.6%)	121. (5.6%)	1420. (66.0%)	61. (2.8%)	2153. (100%)
	22	1330. (14.1%)	581. (6.2%)	7100. (75.0%)	445. (4.7%)	9456. (100%)
INH 10 $\mu\text{g/ml}$	3	496. (28.8%)	90. (5.2%)	1090. (63.0%)	50. (2.9%)	1726. (100%)
	22	1090. (19.4%)	338. (6.0%)	4000. (71.5%)	177. (3.1%)	5605. (100%)

* Reaction mixture consisting of cells (5-day-old culture), 33 mg/ml; P³²-orthophosphate, 1 $\mu\text{c/ml}$, and INH, 0 or 10 $\mu\text{g/ml}$, in P-deficient medium (8.0ml).

(3) S³⁵- 硫酸とりこみに対する INH の影響
 先の P³² の場合と異なり、S³⁵- 硫酸のとりこみは INH の存在で各画分とも増加する (表 3)。このような一般的なとりこみ増加は細胞膜透過性の亢進 (おそらく

く active transport の亢進) を示唆するように思われる。ただし 22 時間後には INH 添加例でとりこみが減少するが、これは菌の不活化のために二次的にとりこみが減少したものと解される。

Table 3. Effect of Isoniazid (INH) on the Incorporation of S³⁵-Sulfate into Cellular fractions of Mycobacterium "Jucho"

Reaction system *	Time in hours	Radioactivity as cpm per mg (dry weight) of cells				
		Acid-soluble fr.	Lipid fr.	Nucleic acid fr.	Protein fr.	Total (cpm/mg)
INH 0 $\mu\text{g/ml}$	3	229.	37.6	39.8	52.5	358.9
	22	492.	195.	148.	970.	1805.0
INH 10 $\mu\text{g/ml}$	3	258.	35.8	44.7	63.5	402.0
	22	447.	118.	86.5	599.	1250.5
INH 0 $\mu\text{g/ml}$ INH 10 $\mu\text{g/ml}$	3	967.	108.	293.	245.	1613.
	3	1050.	119.	353.	334.	1856.
INH 0 $\mu\text{g/ml}$ INH 10 $\mu\text{g/ml}$	3	966.	108.	293.	245.	1612.
	3	1050.	119.	352.	334.	1855.

* Reaction mixture consisting of cells (5 day-old cultures), 37.5mg/ml (the first experiment), 19.0mg/ml (the second) or 20mg/ml (the third); S³⁵-sulfate, 5 $\mu\text{c/ml}$; and INH, 0 or 10 $\mu\text{g/ml}$, in M/30 phosphate buffer, pH 7.0 (6.0ml).

(4) Fe⁵⁹- 第 2 塩化鉄とりこみに対する INH の影響
 INH の抗菌作用が hemin により拮抗される事実¹³⁾ および INH 耐性菌の catalase 活性²²⁾ および peroxidase 活性²³⁾ 減弱の報告から、INH が鉄酵素合成になんらかの影響を及ぼす可能性を考えて Fe⁵⁹ とりこみ

に対する影響を観察した。Fe⁵⁹ とりこみ量を 18 時間後に測定すると INH の存在で酸溶性画分、蛋白画分ともに減少しているが、両画分への分布比は対照と変わらない。したがってここにみられる Fe⁵⁹ とりこみ阻害は菌機能の一般的不活化から二次的にきた可能性が多いと思われる。

Table 4. Effect of Isoniazid (INH) on the Incorporation of F^{59} -Ferric Chloride into Cellular Fractions of Mycobacterium "Jucho"

Reaction system *	Time in hours	Radioactivity as cpm per mg protein **		
		Acid-soluble fr.	Protein fr.	Total (cpm/mg protein)
INH 0 $\mu\text{g/ml}$	18	5503. (57.2%)	4122. (42.8%)	9625. (100%)
INH 10 $\mu\text{g/ml}$	18	4711. (56.5%)	3621. (43.5%)	8332. (100%)

* Reaction mixture consisting of cells (5-day-old culture), 1.10 mg protein/ml (control) or 1.14 mg protein/ml (INH 10 $\mu\text{g/ml}$); F^{59} -ferric chloride, 1.3 $\mu\text{c/ml}$; INH, 0 or 10 $\mu\text{g/ml}$, in Sauton medium (without ferric ammonium citrate) (15 ml).

** Protein fraction, obtained by the Schneider procedure, was hydrolyzed by addition of 1 N KOH and determined for its protein amount by the Polin's phenol reagent.

(5) 菌体外への P^{32} 遊離に対する INH の影響
 P^{32} と S^{35} とりこみに対する INH の影響が異なり、 S^{35} とりこみが INH の存在で増加することはある程度選択的な細胞膜透過性の変化を示唆した。そこで菌をあらかじめ P^{32} 中で培養することにより菌を P^{32} でラベルして洗滌 4 回ののち、 P^{32} -free の磷酸液中に移して培養し、分画して P^{32} 分布の動きを調べた。 P^{32} -free の磷酸液中で菌体内 P^{32} は代謝回転により溶液中に遊離されて菌体内 P^{32} 量は減少する。このさい脂質画分

中の P^{32} は不変であるが、核酸画分および酸溶性画分中の P^{32} 量は著明に低下する。INH の存在でもつとも影響されるのは核酸画分であつて、核酸画分の P^{32} 減少がとくに著明である。(表 5)

P^{32} とりこみ阻害は核酸画分でもつとも著しいから、ここに得られた成績は前述の成績と一致するわけである。すなわち、核酸画分からの P^{32} 溶出が INH の存在により促進されるわけで、INH の作用が核酸代謝と関係することを示している。

Table 5. Leakage of P^{32} from P^{32} -labeled Cells Exposed to P^{32} -free Phosphate Solution after Treatment for 2 Hours in P^{32} -Containing Medium

Time of exposure to P^{32} -free phosphate solution	Radioactivity as cpm per mg (dry weight) of cells				
	Acid-soluble fr.	Lipid fr.	Nucleic acid fr.	Protein fr.	Total (cpm/mg)
Before exposure	429.	24.7	671.	10.3	1135.
3 hrs. INH 0 *	198.	25.4	353.	6.3	582.7
3 hrs. INH 10 **	215.	22.4	312.	6.7	556.1

Labeling: Cells of a 4-day-old culture (34 mg/ml) were incubated in P-deficient medium containing 1 μc P^{32}/ml for 2 hours. The P^{32} -labeled cells were washed in saline four times. Then, the cells were exposed to radioisotope-free phosphate buffer solution (M/15, pH 7.1) containing glucose (M/20) and INH (0 or 10 $\mu\text{g/ml}$).

* After 3 hour-exposure to P^{32} -free phosphate solution without INH.

** After 3 hour-exposure to P^{32} -free phosphate solution with 10 μg INH/ml.

(6) 菌体外への S^{35} 遊離に対する INH の影響
 S^{35} 10 $\mu\text{c/ml}$ を含む磷酸液中で菌を 3 時間培養してラベルし、4 回洗滌後、M/20 glucose および M/20 MgSO_4 液に 3 時間培養して S^{35} 分布の変化をみたが、 S^{35} 遊離は INH の存否に関せず大差を示さなかつた。すなわち、酸溶性画分の S^{35} 量は mg 当り 540 cpm から 400 cpm に、蛋白画分の S^{35} 量は 120 cpm から 94 cpm に減じた。(表省略)

(7) 菌の viability に対する INH の影響被検条件下で INH 接触後の菌の viability を調べると表 6

のとおりであつた。

(8) 菌の代謝活性に及ぼす INH の影響
picric acid を水素受容体とする方法²⁴⁾で菌の代謝活性を測定すると、16 時間の INH の作用によつても菌の呼吸能ないし代謝活性に著明な影響を認めなかつた。用いた基質は glucose, glycerol, lactate, pyruvate, malate, acetate, succinate であつた。なお Sauton 培地に 0.1 % に picric acid を加え、種々の INH 濃度で菌を培養すると subinhibitory な濃度域でかえつて還元亢進が起こるのを認めた。

Table 6. Viability of Cells Exposed to Isoniazid under the Experimental Conditions

Condition of exposure	Duration of exposure to isoniazid	
	3 hours	24 hours
Sauton medium without INH	$1.56 \times 10^5/mg$ (100%)	$1.78 \times 10^6/mg$ (100%)
Phosphate buffer containing 10 μg INH/ml	$6.99 \times 10^5/mg$ (45%)	$3.24 \times 10^5/mg$ (18%)
P-deficient med. containing 10 μg INH/ml	$4.05 \times 10^5/mg$ (26%)	$2.24 \times 10^5/mg$ (13%)
Sauton medium containing 10 μg INH/ml	$8.57 \times 10^5/mg$ (55%)	$1.60 \times 10^5/mg$ (9%)

Cells (a 4-day-old culture) exposed to isoniazid solution were washed in saline three times and their viability was counted by a usual plate counting method. Cells were supplemented to the isoniazid solutions to give a final concentration of 33 mg (wet weight)/ml.

考 察

上述の結果を要約すれば、(1) 核酸画分および蛋白画分、とくに前者への P^{32} とりこみ阻害。(2) 核酸画分からの P^{32} 溶出の亢進。(3) S^{35} とりこみの一般的増加。(4) Fe^{59} とりこみ阻害、ただしこれは菌の不活化から二次的に起こる非特異的なものらしい。(5) 代謝活性ないし呼吸阻害はほとんど阻害されない。以上の変化が INH 10 $\mu g/ml$ の存在で認められた。

第1の結果は核酸合成および蛋白合成の阻害を意味するが、 P^{32} とりこみ阻害は時間の経過とともにとくに核酸画分でとくに著しくなるので、菌の不活化に伴う二次的変化とは考えがたい。INH によつて直接的あるいは間接的に核酸合成阻害が起こることが考えられる——もちろん核酸合成阻害が菌の発育停止の直接的原因であると証明できたわけではないが。またあらかじめ P^{32} でラベルした菌の P^{32} の動きをみても、INH 中で核酸画分中の P^{32} が溶出して、磷酸が核酸中に固定しないことを示している。強調する必要があるのは上述の結果が従来の報告にみるごとき高濃度の INH 中ではなく、わずか 10 $\mu g/ml$ の濃度でも起こりうるということである。

INH の存在で核酸合成の阻害が起こることは従来の報告にみられず、一見意外にみえるかもしれない。それではこの阻害がどうして起こるのか。もつとも考えやすいのは核酸合成に蛋白合成が必要であることから、transaminase 阻害に続いて二次的に核酸合成阻害が起こることである。しかし従来報告されたごとき INH による酵素作用の直接的阻害^{1)~4)} はあまりに大量の INH を要するので、われわれが抗菌作用として観察する INH の作用機作とは考えがたい。Youatt⁵⁾ もそのような意見を述べている。

最近、今野¹²⁾ は、おそらく抗癌剤の作用機作からヒントを得て、INH が DPN の nicotinamide 部に誤入するための DPN 機能の不活化が INH の作

用機作であるとの新説を発表した。この説は向後 INH 誤入の程度および時期と実際に起こる菌の発育停止の関係を追求する必要があるが²⁵⁾、注目し値する説であろう。ただ INH の呼吸阻害作用を認めたい点はやや難点といえる。INH 誤入の考えははなはだ興味深く、われわれが認めた核酸合成および蛋白合成阻害も、INH による transaminase の直接的阻害が作用機作として考えがたいとすれば、INH が誤入することによる transaminase の不活化によるものかもしれない。この考えは INH による菌の発育能力喪失が比較的緩徐に起こることとも矛盾しない。(表6)

われわれの実験結果が示す第2の点は、 S^{35} -硫酸とりこみの一般的な増加である。このようなすべての画分への S^{35} とりこみ増加は細胞膜透過性の変化を示唆する。ただし P^{32} -磷酸のとりこみは S^{35} -硫酸とは逆に減少するから、透過性亢進があつたとしても、かなり選択的な変化と思われる。そしてまた、このような選択性の存在は、透過性増加が菌の不活化による二次的な変化ではないことを示唆しているともいえる。この透過性増加が先の核酸合成阻止と関係があるかどうかは分からない。薬剤の作用機作は必ずしも一義的なものでないかもしれないから、先の核酸合成ないし蛋白合成阻害とは全く別個に起こりうることも考えられるし、また両者に関連したものかもしれない。現段階では不明であつて向後の研究にまたねばならない。要するにわれわれの研究もまたなおその第一歩を踏み出したばかりであつて、INH の作用の間接的な一側面をみている可能性も多い。向後なお研究を重ねて欠を補いたいと考えている。

結 論

INH は 10 $\mu g/ml$ の低濃度で Mycobacterium 獣調株に次のごとき変化を起こした。(1) 核酸画分および蛋白画分、とくに前者への P^{32} -磷酸のとりこみを阻害した。(2) あらかじめ P^{32} でラベルした菌を INH 溶液中に浸漬すると、菌体内からの P^{32} 溶出が起こつ

た。この溶出は INH の存在では核酸画分からの溶出がもつとも著しかった。

以上の所見は INH の存在で直接的あるいは間接的に(おそらく間接的に)核酸合成阻害および蛋白合成阻害が起こることを示している。しかもこれらの合成阻害は菌不活化から二次的に由来する非特異的現象ではないと思われた。

(3) S^{35} -硫酸のとりこみは INH の存在で各画分とも増加した。この所見は INH の存在で細胞膜透過性の比較的選択的な亢進 (P^{32} については亢進しないので) が起こることを示唆している。

勝沼六助荘長ならびに日比野進教授の御校閲を謝する。

文 献

- 1) Yoneda, M., Kato, N. & Okajima, M.: Nature, 170: 803, 1952.
- 2) Yoneda, M. & Asano, N.: Science, 117: 277, 1953.
- 3) 酒井淳三: 結核, 29: 161, 昭29.
- 4) 山本実: 結核, 30: 252, 昭30.
- 5) Youatt, J.: Biochem. J., 68: 193, 1958.
- 6) Pope, H.: Amer. Rev. Tuberc., 66: 938, 1953.
- 7) Pope, H.: Amer. Rev. Tuberc., 73: 735, 1956.
- 8) Schaeffer, W.B.: Amer. Rev. Tuberc., 68: 273, 1953.
- 9) Nitti, V. e Curci, G.: Arch. Tisiol., 8: 859, 1953.
- 10) Zatman, L. T., Kaplan, N. O., Colowick, S.P. & Piotti, M.M.: J. Biol. Chem., 209: 453, 1954.
- 11) 山本実: 結核, 29: 195, 昭29.
- 12) 今野淳他: 日結総会, 昭36.
- 13) Fisher, M. W.: Amer. Rev. Tuberc., 69: 469, 1954.
- 14) Knox, R., Meadow, P. M. & Worssam, A. R. H.: Amer. Rev. Tuberc., 73: 726, 1956.
- 15) Winder, F.: Amer. Rev. Tuberc., 73: 779, 1956.
- 16) Krüger-Thiemer, E.: Amer. Rev. Tuberc., 77: 364, 1958.
- 17) Barclay, W.R., Ebert, R.H. & Koch-Weser, D.: Amer. Rev. Tuberc., 67: 490, 1953.
- 18) Youatt, J.: Austral. J. Exp. Med., 36: 223, 1958.
- 19) Youatt, J.: Austral. J. Exp. Med., 38: 245, 1960.
- 20) Youatt, J.: Austral. J. Exp. Med., 38: 331, 1960.
- 21) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem., 161: 293, 1945.
- 22) Middlebrook, G.: Amer. Rev. Tuberc., 69: 471, 1954.
- 23) Tirunarayanan, M. O. & Vischer, W. A.: Amer. Rev. Tuberc., 75: 62, 1957.
- 24) 東村道雄: 医学と生物学, 34: 111, 昭30.
- 25) 飯尾正明他: 日結総会, 昭36.

Mode of Action of Isoniazid Viewed from Isotope Incorporation Studies.

There are many studies dealing with the mechanism of action of isoniazid; (1) pyridoxal coenzyme inhibition; (2) TCA cycle inhibition; (3) dehydrogenase inhibition; (4) inhibition of porphyrin metabolism; (5) inhibition due to peroxide production. However, there is no decisive elucidation to account for different observations presented. This study has been designed to present some findings through radioisotope incorporation studies.

Mycobacterium "Jucho" growing in Sauton medium was washed in saline and used for experiments. Fractionation was conducted accord-

ing to the procedure of Schneider. Concentration of isoniazid used was 10 $\mu\text{g/ml}$ throughout the experiments.

1) Incorporation of P^{32} -orthophosphate into nucleic acid and protein fractions, especially into the former, were inhibited significantly in the presence of isoniazid. This inhibition increased after 3 hours of incubation (figures 1 and 2 and tables 1 and 2). Since, as shown later, incorporation of S^{35} -sulfate was not inhibited and, in addition, the inhibition of the P^{32} incorporation was most significant not in all fractions but in the nucleic acid fraction, the inhibition of the P^{32} incorporation observed does not appear to be derived from an unspecific

inhibition due to the general cease of cell function. It seems likely that the inhibition of nucleic acid synthesis and protein synthesis may be a secondary effect due to an inhibition of transaminase activity. Since a direct inhibition of transaminase by the drug requires too much amount of isoniazid to account for the antibacterial action of this drug, it appears rather possible that disfunction of transaminase is derived from a substitution of pyridoxal phosphate or pyridoxamine by isoniazid. This possibility remains to be studied in the future.

2) When P^{32} -labeled cells were exposed to a P^{32} -free phosphate solution, a considerable amount of P^{32} was released from cells. Decline of P^{32} compounds in the presence of isoniazid occurred most significantly in the nucleic acid fraction (table 5). This finding shows that phosphorus compounds incorporated into the nucleic acid fraction are not stabilized in the presence of isoniazid.

3) Incorporation of S^{35} -sulfate into different cellular fractions were increased in the presence of isoniazid. This suggests that an increase of permeability in cell membrane may be present (table 3). However, incorporation of S^{35} was

reduced in the presence of isoniazid after 22 hours of incubation. The delayed decrease of incorporation may be due to a general inactivation of cell functions.

4) Incorporation of $Fe^{59}Cl_3$ was inhibited by the presence of isoniazid. However, the ratio of distribution of Fe^{59} in cellular fractions remained unchanged (table 4). Therefore, it is likely that the inhibition remains unspecific and is derived from a general inactivation of cell activity.

In summary: Incorporation of P^{32} -phosphate into the nucleic acid fraction and the protein fraction, especially into the former, were inhibited by the presence of isoniazid ($10 \mu g/ml$). Accordingly, it is conceivable that inhibition of nucleic acid synthesis and protein synthesis take place in the presence of isoniazid. This inhibition does not appear to be an unspecific phenomenon derived from a general inactivation of cells. Incorporation of S^{35} -sulfate is increased by the presence of isoniazid, suggesting the presence of a change in permeability (change of permeability seems to be some selective one, because incorporation of S^{35} is increased and that of P^{32} is not increased).