

# 抗酸菌に対する Isoniazid の作用機作および 抗酸菌の Isoniazid 耐性機構

## 第 1 報 Isoniazid 感性および同人工耐性人型 結核菌の $^{14}\text{C}$ -isoniazid の取り込み

江 田 亨

東京大学医学部細菌学教室 (主任 秋葉朝一郎教授)

受付 昭和 37 年 9 月 10 日

1952 年はじめて結核症に対して isoniazid が使用されて以来、結核症治療の主力として、isoniazid の果たした役割は大きい。その臨床例における耐性菌の発現様式についての研究は多くみられ、また isoniazid の結核菌に対する殺菌効果に関する報告も多い。しかしその作用機作および耐性機構については、いまだ結論は得られていない。

isoniazid の作用機作について、Middlebrook<sup>1)</sup> は isoniazid はきわめて低濃度で殺菌効果を示し、結核菌を非抗酸性化するといい、Barclay ら<sup>2)</sup> は isoniazid 接触後 1 回分裂して、そこで発育が停止すると述べている。

一方、isoniazid 耐性菌の性質に関しては Cohn ら<sup>3)</sup> は isoniazid 耐性化により catalase 反応が陰転すると述べ、また Barclay ら<sup>2)</sup>、Garattini ら<sup>5)</sup>、Youatt<sup>6)</sup> は isoniazid 感性菌に比して  $^{14}\text{C}$ -isoniazid-uptake の減少を認めている。また菌の耐性機構として、薬剤に対する透過性を論じた報告<sup>8)</sup>および耐性菌より出る isoniazid 不活性化物質による耐性機構の説明<sup>10)</sup>もある。

著者は isoniazid の抗酸菌に対する作用機作および isoniazid 耐性機構を検討するため、まず人型結核菌が isoniazid と接触するとき、感性菌と耐性菌がどのような態度をとるか  $^{14}\text{C}$ -isoniazid を用いて追求し、さらに菌の  $^{14}\text{C}$ -isoniazid-uptake に及ぼす諸要因について検討した。

その結果、感性菌と耐性菌の態度に興味ある相違点を認めた。本報告では主に isoniazid 耐性機構について考察を加えた。

### 実験材料

#### 1) 使用培地

Tween 80 加合成培地 (以下 TSM 培地) を用いた。

培地の組成は表 1 に示したとおりで、この培地で人型結核菌を培養するとほぼ均等に発育し、約 2 週で最大の発育を示す。

Table 1. Tween synthetic medium (TSM)

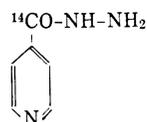
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.3 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.5 g
Na. citrate	1.2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Na. glutamate	2.0 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{citrate}$	0.01 g
Glycerol	2.0 ml
Tween 80	1.0 ml
Dist. water	1000.0 ml

Autoclaved at 20 pounds for 10 minutes.

#### 2) $^{14}\text{C}$ labeled isoniazid

第一化学薬品製のもので、 $^{14}\text{C}$  の位置は表 2 に示したように carbonyl 基に入っている。使用した  $^{14}\text{C}$ -isoniazid の specific activity は  $630 \text{ mc/mol}$  である。使用にさいしては acetone で滅菌した。

Table 2.  $^{14}\text{C}$  labeled isoniazid



#### 3) 使用菌株

人型結核菌  $\text{H}_{37}\text{Rv}$  株 (isoniazid 感性株) および同人工 isoniazid 耐性菌  $\text{H}_{37}\text{Rv RINH}$  株を用いた。

この isoniazid 耐性株は one step selection により得られたもので、isoniazid 耐性は 1% 小川培地で  $507 \text{ mc/ml}$  完全耐性であつた。これらの菌株は 2 週に 1 度 TSM 培

地に継代して用いた。この isoniazid 耐性株は TSM 培地では感性親株とはほぼ同程度の発育を示した。

### 実験方法

前記人型結核菌 2 株の TSM 培地約 2 週間培養菌 2 ml を、500 ml の三角コルペンに入れた TSM 培地 200 ml に接種し、10 日から 4 週間 37°C に培養した。この培養を無菌的に遠心して集菌し、菌体を pH 7.0 の燐酸緩衝液にて 3 回洗浄して培地成分を除いた。この洗浄菌体を 100 ml の燐酸緩衝液 (pH 7.0) に再浮遊し、濁度を一定にして、終末濃度が 1 r/ml または 5 r/ml になるよう <sup>14</sup>C-isoniazid を無菌的に加え、さらに 24 時間 5°C または 37°C に放置した。

この <sup>14</sup>C-isoniazid を加えた菌浮遊液を 60°C 30 分加熱滅菌し、遠心沈殿により上清と菌体とに分け、菌体を 50 ml の 0.2% Tween 80 加生理的食塩水をもつて、上清に count を認めなくなるまで 5 回洗浄した。この洗浄菌体をガラス玉を入れた試験管内で手振法により均等化し、その一定量 (約 2~3 mg 乾燥菌量) を試料皿 (アルミニウム製で直径 25 mm, 面積 480 mm) に取り、乾燥後 gas flow counter を用いて radioactivity を測定し、乾燥菌量 mg 当りの c. p. m. (counts per minute) で表わした。

### 実験結果

1) isoniazid 感性および同耐性人型結核菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake

H<sub>37</sub>Rv および同 isoniazid 耐性株 H<sub>37</sub>Rv RINH の TSM 培地 2 週培養菌体浮遊液に <sup>14</sup>C-isoniazid を 1 r/ml に加えた直後に加熱滅菌した菌体の示す count および 1 r/ml の <sup>14</sup>C-isoniazid 添加後 37°C で 24 時間保存した菌体の count を測定した結果を表 3 に示した。<sup>14</sup>C-isoniazid 接触直後においては、isoniazid 感性菌では 32 c. p. m., 同耐性菌では 30 c. p. m. となり、両菌株ともほとんど同じ数値を示した。<sup>14</sup>C-isoniazid 接触後 24 時間では、isoniazid 感性菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake は著明に増加し 164 c. p. m. となり、isoniazid 耐性菌では <sup>14</sup>C-isoniazid

Table 3. Uptake of <sup>14</sup>C-isoniazid by the isoniazid-sensitive and-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

Time exposed to <sup>14</sup> C-isoniazid	Uptake of <sup>14</sup> C-isoniazid (c. p. m./mg dry weight)	
	isoniazid-sensitive H <sub>37</sub> Rv	isoniazid-resistant H <sub>37</sub> Rv RINH
0 hours	32	30
24 hours	164	24

Cells cultured two weeks were exposed to 1 γ per ml of <sup>14</sup>C-isoniazid at 37°C.

接触直後とはほとんど同程度の 24 c. p. m. であった。

<sup>14</sup>C-isoniazid 接触後 24 時間では、isoniazid 耐性菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake は同感性菌の約 1/7 であった。

2) 人型結核菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake に及ぼす <sup>14</sup>C-isoniazid 接触時間の影響

H<sub>37</sub>Rv の TSM 培地 10 日培養菌体浮遊液に <sup>14</sup>C-isoniazid を 5 r/ml になるように加え、<sup>14</sup>C-isoniazid 接触後 3 時間、6 時間、24 時間の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を検した結果を表 4 に示した。

<sup>14</sup>C-isoniazid-uptake は <sup>14</sup>C-isoniazid 接触後 3 時間では 86 c. p. m., 6 時間では 214 c. p. m., 24 時間では 286 c. p. m. で、約 6 時間でほぼ最高に達した。

Table 4. Influence of exposure time on the amount of <sup>14</sup>C-isoniazid incorporated by the isoniazid-sensitive H<sub>37</sub>Rv strain

Time exposed to <sup>14</sup> C-isoniazid	Uptake of <sup>14</sup> C-isoniazid (c. p. m./mg dry weight)
3 hours	86
6 hours	214
24 hours	286

Cells cultured ten days were exposed to 5 γ per ml of <sup>14</sup>C-isoniazid at 37°C.

3) 人型結核菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake に及ぼす <sup>14</sup>C-isoniazid 接触温度の影響

H<sub>37</sub>Rv および同 isoniazid 耐性株の TSM 培地 10 日培養菌体浮遊液に <sup>14</sup>C-isoniazid を 5 r/ml に加え、1 つは 37°C の孵卵器に、他の 1 つは 5°C の水室内に 24 時間放置して <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake をみた結果を表 5 に示した。isoniazid 感性菌では 5°C 保存で 133 c. p. m., 37°C の保存で 286 c. p. m. となり、5°C のときに比して 37°C の保存では約 2 倍の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を示したが、isoniazid 耐性菌では、5°C および 37°C における <sup>14</sup>C-isoniazid 接触で、それぞれ 48 c. p. m., 59 c. p. m. であり、ほとんど差がなく、また isoniazid 感性菌は同耐性菌に比して <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が多かった。

Table 5. Influence of temperature on the amount of <sup>14</sup>C-isoniazid incorporated by the isoniazid-sensitive and-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

Temperature exposed to <sup>14</sup> C-isoniazid	Uptake of <sup>14</sup> C-isoniazid (c. p. m./mg dry weight)	
	isoniazid-sensitive H <sub>37</sub> Rv	isoniazid-resistant H <sub>37</sub> Rv RINH
5°C	133	48
37°C	286	59

Cells cultured ten days were exposed for 24 hours to 5 γ per ml of <sup>14</sup>C-isoniazid.

4) 人型結核菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake に及ぼす培養日数の影響

H<sub>37</sub>Rv および同 isoniazid 耐性株の TSM 培地 10 日培養, 2 週培養, 4 週培養菌体浮遊液に <sup>14</sup>C-isoniazid を 5  $\gamma$ /ml になるように加え, 24 時間接触後の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を表 6 に示した。isoniazid 感性菌では 10 日培養菌 286 c. p. m., 2 週培養菌 228 c. p. m., 4 週培養菌 204 c. p. m. となり, 培養日数の増加とともに <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake は 多少減少の傾向を示した。isoniazid 耐性菌では菌の培養日数とは関係なく終始一定量の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake しか示さず, 各培養日数ともに isoniazid 感性菌に比して著明に <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が少なかった。

Table 6. Influence of the ages of tubercle bacilli on the amount of <sup>14</sup>C-isoniazid incorporated by the isoniazid-sensitive and-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

Culture period	Uptake of <sup>14</sup> C-isoniazid (c. p. m./mg dry weight)	
	isoniazid-sensitive H <sub>37</sub> Rv	isoniazid-resistant H <sub>37</sub> Rv RINH
10 days cultured cells	286	59
2 weeks cultured cells	228	57
4 weeks cultured cells	204	56

Cells were exposed for 24 hours to 5  $\gamma$  per ml of <sup>14</sup>C-isoniazid at 37°C.

### 考 察

抗菌性薬剤がその感受性菌に作用するとき, まず薬剤は菌に接触し, 吸着され, 生物学的選択的透過性を有する菌の外部構造を通過して菌体内に入り, その薬剤の有する特定の作用点に達し, ある特定の代謝系を阻害するものと考えられる。isoniazid の場合も例外ではないと思われる。

著者は <sup>14</sup>C-isoniazid を用いて, 人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv および同人工 isoniazid 耐性株 H<sub>37</sub>Rv RINH の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を検討したが, isoniazid 感性菌では <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が多く, 同耐性株では少なかった。この結果は Barclay ら<sup>4)</sup>, Youatt<sup>6)</sup>, Garattini ら<sup>5)</sup> の報告と一致したが, 著者の行なった実験条件では Barclay ら<sup>2)</sup> の言うほどその差は著明でなかった。

isoniazid は結核菌に接触したとき, まず菌体に吸着され, しかもそれが菌と isoniazid 接触後きわめて速やかに起こるのであろうことは, <sup>14</sup>C-isoniazid と菌を接触後ただちに菌を殺した場合, 耐性菌と感性菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake に差がなく, しかも耐性菌においては 24 時間の <sup>14</sup>C-isoniazid 接触でもほとんど <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake の増加を来さないことから十分推論されることである。

Barclay ら<sup>4)</sup> は isoniazid 耐性菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を吸着によるものとし, Youatt<sup>6)</sup> は <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を metabolic process によるものと non-metabolic process によるものと区別し, 耐性菌による <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を non-metabolic process によるものと述べているが, この吸着は isoniazid に対する菌の感受性とは関係なく, 感性および耐性菌ともに起こると思われる。

菌に吸着した isoniazid は菌体内に取り込まれると思われるが, isoniazid 感性菌では <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が 6 時間でほぼ最高に達する。すなわち 6 時間でおそらく菌の代謝活性がほぼ停止するものと思われる。

Schaefer<sup>11)</sup> は isoniazid は growing phase に作用し, resting phase には作用しないと述べ, また稲津<sup>12)</sup> は竹尾株で培養時間の経過とともに isoniazid の殺菌効果が減弱すると述べ, isoniazid の作用が菌の代謝活性と関係が深いことを思わせる。人型結核菌を TSM 培地に培養すると約 2 週で生菌単位が最高に達し, 1 ml あたりの生菌数含量は 10 日ごろ最高となり, 以後漸次減少する。isoniazid 感性菌の 10 日, 2 週, 4 週の培養菌に <sup>14</sup>C-isoniazid を加えると, 培養日数の経過とともに <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が少なくなっているが, 生菌単位含量の多い場合に <sup>14</sup>C-isoniazid の取り込みが多いと考えられ, また代謝活性の高い若い菌に <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が多いと思われる。

人型結核菌は 37°C で増殖し, 30°C 以下の温度では増殖しないといわれている。したがって, 緩衝液中で 37°C では代謝活性はほぼ増殖時の活性を示し, 5°C では代謝活性は極度に低下するものと思われる。しかし生菌数はさほど変化を示さない。Barclay ら<sup>4)</sup> は, <sup>14</sup>C-isoniazid 接触温度を 5°C と 37°C で比較すると, 5°C において多量の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を認めている。著者は, 5°C および 37°C の <sup>14</sup>C-isoniazid 接触温度を比較したが, isoniazid 感性菌では, 37°C のときが 5°C の <sup>14</sup>C-isoniazid 接触より <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が多かった。これもまた, isoniazid の作用が菌の代謝活性と関係があることを示すものである。

isoniazid 耐性菌が同感性菌より <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が少ないことは, さらにこの菌の増殖過程における <sup>14</sup>C-isoniazid の uptake を検討する必要があるが, 一応この事実より isoniazid 耐性機構について 3 つの推論が成り立つと考えられる。

1) isoniazid 耐性菌は菌体外に isoniazid を不活化する物質を出し, これにより分解された産物は菌に摂取されないという可能性である。

中瀬<sup>13)14)</sup> は, 鳥型および人型菌 isoniazid 耐性株に isoniazid 分解能があることを報告し, 戸井田ら<sup>10)15)</sup> は isoniazid 耐性鳥型菌に isoniazid を isonicotinic acid と hydrazine に分解する hydrazidase が存在すること

を証明し、これにより isoniazid 耐性機構を説明しようとしている。しかし Youmans ら<sup>16)~18)</sup>および Kraus ら<sup>19)</sup>は、人型菌培養濾液中に抗 isoniazid 物質を証明しているが、この物質は isoniazid 耐性菌に比して isoniazid 感性菌に多いといっている。また友田<sup>20)</sup>は、isoniazid 耐性鳥型菌に isoniazid 分解能を認めていない。

これら isoniazid 分解物質および拮抗物質の本態についてはまだ不明の点も多いが、それぞれ別種の物質としても、isoniazid 感性菌にも同様な作用があり、またむしろ人型菌では感性菌に強い点、さらに培養が古いほうが活性が高い点<sup>18)</sup>等考えると難点が多い。また、かりに isoniazid が分解されたとしても、著者の成績よりその分解産物が菌体内に取り込まれないと思われ、菌の細胞質膜の透過性の問題に関連してくると思われる。

2) isoniazid 耐性菌においては同感性菌と異なり、ある特定の代謝系に変化があり、1度菌体内に入った isoniazid をなんらかの型で代謝排泄してしまう可能性である。鈴木<sup>21)</sup>は PAS 耐性人型菌では、同感性菌に比して増殖過程においては <sup>14</sup>C-PAS-uptake が少なく、これは耐性菌の PAS 代謝系の変化によると述べている。しかし isoniazid の作用機作については多くの報告および推論がなされているが、いまだに isoniazid 耐性菌の特定な代謝系の変化についての報告は見あたらないようである。また著者の実験結果から、もし isoniazid が耐性菌の菌体内で代謝を受けて排泄されるならば、代謝活性の異なる菌の発育令および isoniazid 接触温度において、isoniazid 耐性菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake に有意の差が現われてよいはずであるが、isoniazid 耐性菌ではそのような条件に関係なく <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake は常に一定であるので、isoniazid 耐性がこのような機構で起こるとは考えにくいと思われる。

3) isoniazid 耐性菌は、その生物学的選択性を有する細胞外部構造の isoniazid に対する透過性の低下をきたし、isoniazid がその作用点に達しうという可能性である。坂口ら<sup>8)9)</sup>は、細胞壁に作用する lysozyme および penicillin で処理した isoniazid 耐性人型菌はその耐性が低下することを認め、isoniazid 耐性機構の一部として、isoniazid に対する菌の透過性の低下を推論した。また Youatt<sup>6)</sup>は isoniazid 耐性 BCG を CO<sub>2</sub> で処理することにより、感性菌と同程度の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が起こることを明らかにし、これは細胞質膜の透過性の変化として説明している。さらに横田ら<sup>22)</sup>は腸内細菌の R 因子による多剤耐性菌の耐性機構の主なものとして、菌の細胞質膜の薬剤に対する透過性の低下をあげている。著者の実験結果から、<sup>14</sup>C-isoniazid 接触直後においては isoniazid 感性および耐性菌で、その <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake にほとんど差がなく、しかも isoniazid 耐性菌では <sup>14</sup>C-isoniazid 接触直後と 24 時間後で <sup>14</sup>C-

isoniazid-uptake にほとんど差がないこと、また代謝活性の異なる菌においても耐性菌では常に一定の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を示していること等を考えると、isoniazid 耐性菌の耐性機構の一部として菌の細胞質膜の isoniazid に対する選択的透過性の低下が関係することは十分考えられることである。

以上述べたように、人型結核菌に接触した isoniazid は菌体表面に吸着し、isoniazid 感性菌では菌体内に入り、その特定の作用点に達するものと思われる。isoniazid 耐性菌では、接触した isoniazid は菌体表面に吸着されるのみでほとんど菌体内に入りえないものと思われ、人型結核菌の isoniazid 耐性機構は菌の isoniazid に対する細胞質膜の選択的透過性の低下が主なものと思われる。しかし腸内細菌ですでに知られるように<sup>22)</sup>、自然耐性菌と人工耐性菌との間に耐性機構の相違があることもあるので、なお多数の分離耐性株について実験を行なう必要がある。また isoniazid 耐性菌特有な isoniazid 代謝系の存在も否定できない。この点に関しても検討したので次の報告に述べることにしたい。

## 結 論

人型結核菌 isoniazid 感性株および同人工 isoniazid 耐性株の洗浄菌体を燐酸緩衝液に浮遊し、<sup>14</sup>C-isoniazid の uptake を検討して次の結果を得た。

1) isoniazid 耐性菌は、同感性菌に比して、<sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が少ない。

2) <sup>14</sup>C-isoniazid 接触時間と菌の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake をみると、isoniazid 感性菌では <sup>14</sup>C-isoniazid 接触後 6 時間で、ほぼ最高の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を示した。isoniazid 耐性菌では <sup>14</sup>C-isoniazid 接触直後と 24 時間後でほとんど同程度の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を示し、これは isoniazid の菌体表面への吸着によるものと思われ、この吸着は isoniazid 感受性とは関係ないものと思われた。

3) 菌と <sup>14</sup>C-isoniazid の接触温度を検すると、isoniazid 感性菌では 5°C の接触に比して、37°C の接触温度のほうが <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が多かつた。

4) 菌の培養日数と <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake との関係は、isoniazid 感性菌では培養日数の増加とともに <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake が減少したが、isoniazid 耐性菌では各培養日数ともにほとんど同程度の <sup>14</sup>C-isoniazid-uptake を示した。

5) 以上の成績より、人型結核菌に対する isoniazid の作用機作および isoniazid 耐性機構について考察し、isoniazid 耐性機構は細胞質膜の isoniazid に対する選択的透過性の低下が主なものと推論した。しかしなお多数の分離菌株について検討する必要がある、また isoniazid 耐性菌に特有な isoniazid 代謝系の存在も否定しえ

ないので、この点については今後の研究にまきたい。

本論文の要旨は昭和35年7月第33回細菌学会総会(札幌)において発表した。

稿を終わるにのぞみ、終始御指導下さいました恩師秋葉朝一郎教授ならびに当教室の横田健博士、高橋昭三博士、栗田口重美博士に心から感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Middlebrook, G.: Amer. Rev. Tuberc., 65:765, 1952.
- 2) Barclay, W. R., Ebert, R. H. and Koch-Weser, D.: Amer. Rev. Tuberc., 67:490, 1953.
- 3) Cohn, M. L., Kovitz, C., Oda, U. and Middlebrook, G.: Amer. Rev. Tuberc., 70:641, 1954.
- 4) Barclay, W. R., Koch-Weser, D. and Ebert, R. H.: Amer. Rev. Tuberc., 70:784, 1954.
- 5) Garattini, S., Leonardi, A. and Paoletti, R.: Amer. Rev. Tuberc., 80:110, 1959.
- 6) Youatt, J.: Austral. J. Exp. Biol., 36:223, 1958.
- 7) Youatt, J.: Austral. J. Exp. Biol., 38:331, 1960.
- 8) 坂口喜兵衛他:第36回日本結核病学会総会, 昭 36.
- 9) 坂口喜兵衛他:第37回日本結核病学会総会, 昭 37.
- 10) 戸井田一郎:結核, 37:287, 昭 37.
- 11) Schaefer, W. B.: Amer. Rev. Tuberc., 69:125, 1954.
- 12) 稲津舜介:鹿児島大学医学雑誌, 12:161, 昭 35.
- 13) 中瀬真一:金沢大学結核研究所年報, 18:239, 昭 35.
- 14) 中瀬真一:金沢大学結核研究所年報, 18:247, 昭 35.
- 15) 戸井田一郎:斎藤千代:結核, 34:545, 昭 34.
- 16) Youmans, A. S. and Youmans, G. P.: Amer. Rev. Tuberc., 72:196, 1955.
- 17) Youmans, A. S. and Youmans, G. P.: Amer. Rev. Tuberc., 73:764, 1956.
- 18) Youmans, A. S. and Youmans, G. P.: Amer. Rev. Resp. Diseases., 81:929, 1960.
- 19) Kraus, P., Urbancik, R., Simane, Z. and Reil, I.: Amer. Rev. Resp. Diseases., 84:684, 1961.
- 20) 友田恒典:結核, 36:205, 昭 36.
- 21) 鈴木治:医学と生物学, 47:173, 昭 33.
- 22) 秋葉朝一郎・横田健:医学と生物学, 58:151; 161; 172, 1961. 63:115; 160, 1962. 64:5; 9, 1962.

#### Studies on the Action of Isoniazid to Tubercle Bacilli and the Mechanism of the Isoniazid-Resistance in Mycobacteria. 1.

The action of isoniazid on tubercle bacilli and the mechanism of the isoniazid-resistance in mycobacteria were studied with  $^{14}\text{C}$ -labelled isoniazid. The drug-sensitive, parent  $\text{H}_{37}\text{Rv}$  strain of *Mycobacterium tuberculosis* and its mutant strain resistant to 50 mcg/ml of isoniazid were cultivated in a synthetic, liquid medium containing Tween 80 for 10 to 28 days at  $37^\circ\text{C}$ . The cells of tubercle bacilli were centrifuged and washed thrice with phosphate buffer. These cells were resuspended in phosphate buffer and  $^{14}\text{C}$ -isoniazid was added to the suspension to give the concentration of 1 to 5 mcg/ml. After the incubation at  $5^\circ$  or  $37^\circ\text{C}$  for 24 hours, the cells were washed thoroughly with saline containing Tween 80, placed on sample dishes and counted with a gas flow counter.

Results obtained were as follows, the isoniazid-resistant  $\text{H}_{37}\text{Rv}$ -RINH strain bound less amount of isoniazid than the sensitive  $\text{H}_{37}\text{Rv}$  strain did; the

amount of isoniazid bound by the sensitive strain reached maximum at the 6th hour of incubation, whereas isoniazid absorbed by the resistant strain did not differ in amount throughout the first 24th hours of incubation; the isoniazid-sensitive strain bound more amount of isoniazid at  $37^\circ\text{C}$  than at  $5^\circ\text{C}$ , whereas the resistant strain absorbed the same amount of isoniazid either at  $37^\circ\text{C}$  or at  $5^\circ\text{C}$ .

In the sensitive strain, cells harvested from a young culture bound more amount of isoniazid than the cells harvested from an old culture, whereas in the resistant strain, no difference was observed in the amount of isoniazid absorbed the cells from an old culture and those from a young culture. These results suggested that the binding of isoniazid by the resistant strain would be due to the non specific absorption having no relation to the metabolic activity of the cells. On the other hand, the sensitive strain was observed to bind a larger amount of isoniazid taken up by the metabolic activity of the cells.