

INH 耐性結核菌の耐性低下ならびに catalase 活性と 毒力に関する研究

第 3 編

INH 耐性結核菌の catalase 活性と毒力に関する研究

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木潔教授)

中 谷 照

【昭和 38 年 3 月 5 日受稿】

内 容 目 次

第 1 章 緒 言	第 1 項 実験方法
第 2 章	第 2 項 実験成績
第 1 節 One step mutants の Catalase 活性について	第 3 節 INH 耐性菌の毒力に関する実験
第 1 項 実験方法	第 1 項 実験方法
第 2 項 実験成績	第 2 項 実験成績
第 2 節 種々耐性株の Catalase 活性ならびに継代によるその推移	第 3 章 総括ならびに考按
	第 4 章 結 論
	附 全編の総括

第 1 章 緒 言

INH 耐性結核菌の特殊性として細菌自体の Catalase (以下 C と略) の減弱及至消失が明らかにされたのは Aronson, Ehrlich¹⁾ 以来のことであるが、かかる C の減弱がモルモットに対する弱毒化を意味するという Middlebrook²⁾ の報告により俄然 INH 耐性菌の C と毒力との問題が注目されて来た。すなわち Middlebrook, Cohn³⁾ らは INH の耐性度と C 活性度の低下は逆の相関関係にあると述べた。しかしその後多くの人々の報告をみると耐性度の上昇と C 活性の減弱が平行するか否かについては見解の一致を見ないようであり、臨床的にわれわれが一般にみる INH を含む多重耐性菌の C 活性に関しても定説をみないようである。また山村⁴⁾ は INH 耐性菌の C 活性の減弱は Corpoporphyrin から C 形成への系路になにか障害があるか、または C の蛋白質部分の形成に障害があるものと考えており、勝沼⁵⁾、正田⁶⁾ は C 活性を増加する物質を抽出している。さらに教室大藤⁷⁾ は変法培地を作成し (私はこれを栄養条件の悪い培地と名付ける)、その培地に於ける C 活性陰性 INH 耐性菌の継代培養により C が

陽性化する可能性を述べている。

INH 耐性結核菌の Virulence に関しては当初 C との相関説を重視する余り、生体内において生ずる H₂O₂ が INH 耐性菌に発育阻止作用を及ぼし、ために INH 耐性菌は弱毒化していると述べられた。また事実 C を欠く細菌の細胞は H₂O₂ に高い感受性を示したが、その後 C 陰性の INH 耐性株でも必ずしも Virulence の減弱が認められないと云う報告⁸⁾ があり、また H₂O₂ 抵抗性がすなわち毒力を有する事を意味するとは簡単に断じ得ないと云う報告⁹⁾ もある。

私はかかる成績の不一致は使用菌株の均一性を確めていない場合が多いことに起因するのではないかと考え、色々の耐性度の One step mutants を分離して各々の Population を分析するとともに、耐性度と C との関係を検し、さらに単離集落を母体とする可及的純系菌株 (Clone) を 1% KH₂PO₄ 培地、ならびに栄養条件の悪い培地に継代培養し、各代毎の C の変化、H₂O₂ 感受性、モルモットに対する毒力などの関係について実験を行い些か知見を得たので以下報告する。

第2章

第1節 One step mutants の Catalase 活性について

第1項 実験方法

One step で INH 0.05 γ /cc, 0.5 γ /cc, 1.0 γ /cc, 5 γ /cc, 10 γ /cc 耐性菌を得るために保存 H₃₇R_v 株を無菌的に秤量の上, 水晶玉入り三角コルペンに取り 10 mg/cc の濃厚菌液をつくり, これを INH の所定濃度含有 1% KH₂PO₄ 培地に 0.1cc 宛接種し, 5週間培養して得た。そして最高の濃度の培地に発育した菌を再び秤量, 水晶玉入り三角コルペンで 1 mg/cc の菌液をつくり 10⁻¹~10⁻⁵ 倍に希釈, INH 加 1% KH₂PO₄ 培地に接種し INH に対する耐性度を検した。同時に各々の mutants について Slide 法によつて C 活性度を検した。すなわち載物硝子上に 30% H₂O₂ 液を滴下し, その上に白金耳にて最高の濃度の培地に発育した菌をかきとり浸し, 2分間以内に発泡するものを陽性としその発泡の程度と発泡に要した時間により (卅) から (±) までの程度に分類した。

第2項 実験成績

表1のごとく INH 0.05 γ ~10 γ 耐性菌の出現率は 0.04 \times 10⁻⁸~0.49 \times 10⁻⁸ で殆んど同一であり, その Population 構成は表2のごとく INH10 γ で分離した耐性株は 10 γ に耐性を示すことは勿論であるが 0.5 γ , 1 γ で分離したものも 10 γ に不完全に耐性を示した。

C 活性は表3のごとく 0.05 γ One step mutant ですでに弱くなり, 0.5 γ 以上では C 陰性となつた。すなわち One step で INH 耐性菌を分離した場合, INH に耐性となると同時に C 活性を減弱消失した。

第2節 種々耐性株の catalase 活性ならびに継代によるその推移

第1項 実験方法

表1 生菌数当りの耐性菌出現率

INH濃度	対照培地 (INH 0 γ) の生菌数を1とした時の生育菌数の比
0	1.00
0.01	0.92
0.05	0.49 \times 10 ⁻⁸
0.5	0.18 \times 10 ⁻⁸
1.0	0.12 \times 10 ⁻⁸
5.0	0.05 \times 10 ⁻⁸
10.0	0.04 \times 10 ⁻⁸
50.0	0
100.0	0

使用菌株は INH 耐性株としては増量的継代法で得た H₃₇R_v-INH 10 γ 耐性株より任意の 5 単離集落を分離し, 各々を 1% KH₂PO₄ 培地で増菌し C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, 変異株とし, その他同様の方法で得た Frankfurt-INH 10 γ 耐性株を使用し, 患者株としては間接法で分離した INH 10 γ 耐性の S.S 株, Y.M 株を使用した。これら菌株の INH に対する感受性は表4のごとくである。

SM 耐性株としては保存 H₃₇R_v · SM 100 γ 耐性株, PAS 耐性株としては保存 H₃₇R_v · PAS 10 γ 耐性株を使用した。それぞれの耐性度は表5, 6のごとくである。

2重耐性株としては SM-PAS, SM-INH, INH-PAS の各々の耐性株で, 保存 SM 100 γ 耐性 H₃₇R_v 株および INH 10 γ 耐性 H₃₇R_v 株を 10% 血清加 Kirchner 液体培地で夫々 INH, PAS を含ませた培地に 7 代継代し, その菌を 1% KH₂PO₄ 培地に還元培養した菌株を用いた。それぞれの耐性度は表7, 8, 9のごとくである。また臨床的に SM 100 γ , INH10 γ 2者耐性と判定されている 5 患者株より真の二重耐性株を分離する目的で SM 100 γ , INH 10 γ 2薬剤含有の 1% KH₂PO₄ 培地を作成し, その培

表2 Onestep mutant strains の Population 構成

株	INH 耐性菌と生菌数総数との比 (%)					
	INH 0 γ	INH 0.05 γ	INH 0.5 γ	INH 1.0 γ	INH 5.0 γ	INH 10.0 γ
INH 0.01 γ	100.0	0	0	0	0	0
0.05	100.0	87.0	2.0	0	0	0
0.5	100.0		66.6	54.1	41.6	16.6
1.0	100.0	75.0	87.5	31.2	62.5	56.2
5.0	100.0					
10.0	100.0	100.0	100.0	33.3	133.3	86.6

表3 Onestep mutant strains の catalase 活性

INH 濃度 γ	0	0.01	0.05	0.5	1.0	5.0	10.0
Catalase 活性	卅	卅	+	-	-	-	-

表4 INH 耐性株の耐性度

菌 株	菌 量 mg	INH の濃度 γ			
		0	1	5	10
C ₁	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻³	+	+	+	+
	10 ⁻⁵	15	13	7	14
C ₂	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻³	+	+	+	+
	10 ⁻⁵	16	49	46	24
C ₃	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻³	+	+	+	+
	10 ⁻⁵	9	15	6	7
C ₄	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻³	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻⁵	37	33	34	46
C ₅	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻³	+	+	+	+
	10 ⁻⁵	25	50	26	24
Frankfurt R-INH	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻³	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻⁵	9	11	12	8
S.S 株	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻³	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻⁵	12	6	9	9
Y.M 株	10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
	10 ⁻³	+	+	+	+
	10 ⁻⁵	8	6	10	5

表5 H₃₇Rv · R-SM の耐性度

菌 量 mg	SM の濃度 γ		
	0	10	100
10 ⁻¹	卅	卅	卅
10 ⁻³	卅	卅	卅
10 ⁻⁵	25	23	22

地で分離し得た KU, TU, 2 株を使用した。

3 重耐性株としては上記 2 重耐性株の中 SM 100 γ , PAS 10 γ 耐性 H₃₇Rv 株を 10% 血清加 Kirchner

表6 H₃₇RV · R-RAS の耐性度

菌 量 mg	PAS の濃度 γ			
	0	1	5	10
10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅
10 ⁻³	卅	卅	卅	卅
10 ⁻⁵	⊥	⊥	⊥	⊥

表7 H₃₇RVR-SM · PAS の耐性度

菌 量 mg	0 γ (対照)	SM の濃度 γ			PAS の濃度 γ		
		10	50	100	1	5	10
10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻³	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻⁵	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥

表8 H₃₇RVR-SM · INH の耐性度

菌 量 mg	0 γ (対照)	SM の濃度 γ			INH の濃度 γ		
		10	50	100	1	5	10
10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻³	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻⁵	26	27	29	27	30	27	29

表9 H₃₇RvR-INH · PAS 耐性度

菌 量 mg	0 γ (対照)	INH の濃度 γ			PAS の濃度 γ		
		1	5	10	1	5	10
10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻³	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+
10 ⁻⁵	12	11	6	8	11	12	4

液体培地で INH に接触せしめて継代し、1% KH₂PO₄ 培地に還元培養した菌を用い、その耐性度は表10のごとくである。

これらの菌株を秤量の上水晶玉入りコルペンで手振り法で菌液を作り、その 0.1 mg/0.1cc を 1% KH₂PO₄ 培地ならびに栄養条件の悪い培地 (変法培地, 第1編, 第2節参照) に接種, 継代培養した。C 活性は継代前と継代ごとに培養 5 週目に Slide 法で検した。

第2項 実験成績

継代培養前の C 活性は表11, 12に示すごとく INH 10 γ 以上の耐性株は Y.M 株以外 C (-) であつたが、中に C (±) 程度のもも含まれていた。その他の耐性株は INH を含む多重耐性株の場合のみ

表10 H₃₇RvR-SM・PAS・INH の耐性度

菌 量 mg	0 γ (対照)	SM の濃度 γ			PAS の濃度 γ			INH の濃度 γ		
		10	50	100	1	5	10	1	5	10
10 ⁻¹	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10 ⁻³	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅
10 ⁻⁵	20	18	18	22	21	20	16	25	22	23

表11 INH 耐性株の Catalase 活性並びに継代による推移

菌 株	H ₃₇ Rv・R-INH					Frankfurt RINH	S. S 株	Y. M. 株
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅			
継代前	-	±	-	-	-	-	-	卅
小川 培地 継代 数	1	-	±	-	-	-	-	卅
	2	-	±	-	-	-	-	卅
	3	-	±	-	-	-	-	卅
	4	-	±	-	-	-	-	卅
	5	-	±	-	-	-	-	卅
変法 培地 継代 数	1	±	±	±	±	-	-	卅
	2	+	+	+	+	+	+	卅
	3	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅
	4	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅
	5	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅
INH 加地 継代 培	1	±	±	±	±			
	2	+	+	+	+			
	3	卅	卅	卅	卅			
	4	卅	卅	卅	卅			
	5	卅	卅	卅	卅			

C (-) であつた。

これらの耐性株は全て表11, 12のごとく1% KH₂PO₄ 培地(小川培地)継代ではC活性の変化を来さなかつたが、栄養条件の悪い培地(変法培地)に継代するとINHのみの耐性株(Single resistance)の中C(-)株は継代につれC陽性化して来た。一部INH 107加栄養条件の悪い培地(INH加変法培地)で検したがC陽性化して来た。すなわち単離集落を母体とする可及的純系の菌株(Clone)でも耐性度の低下なくして(第1編, 第1節参照)特殊培地条件によりC(-)よりC(+)に変つたわけである。しかしC(-)株でも2重耐性株はC陽性化を来さなかつた。またC陽性株はいづれも特殊培地継代でCの変化を来さなかつた。

第3節 INH 耐性菌の毒力に関する実験

第1項 実験方法

1. INH 耐性菌のCとH₂O₂抵抗性との関係を検するために、C強陽性のH₃₇Rv原株を対照としてC(-)のINH 107耐性H₃₇Rv株と第2節でC陽性化した菌とのH₂O₂抵抗試験を行つた。すなわちH₂O₂の30%溶液0.2ccを0.1mg/cc蒸留水

表12 種々耐性株の Catalase 活性並びに継代による推移

菌 株	H ₃₇ Rv	H ₃₇ Rv	H ₃₇ Rv	H ₃₇ Rv	R-SM・INH		H ₃₇ Rv	H ₃₇ Rv
	R-SM	R-PAS	R-S-P	R-S・H	K. U. 株	T. U. 株	R-H・P	R-S・P・H
継代前	卅	卅	卅	-	-	-	-	-
小川 培地 継代 数	1	卅	卅	卅	-	-	-	-
	2	卅	卅	卅	-	-	-	-
	3	卅	卅	卅	-	-	-	-
	4	卅	卅	卅	-	-	-	-
	5	卅	卅	卅	-	-	-	-
変法 培地 継代 数	1	卅	卅	卅	-	-	-	-
	2	卅	卅	卅	-	-	-	-
	3	卅	卅	卅	-	-	-	-
	4	卅	卅	卅	-	-	-	-
	5	卅	卅	卅	-	-	-	-

浮游菌液 5.8cc に加えて 1% H₂O₂ 溶液とし、正確に10分作用させたのち順次 10⁶ 倍まで定量希釈し、普通菌液の10倍段階希釈のものと 1% KH₂PO₄ 培地に接種、培養 4 週間後の成績とを比較した。

2. INH 耐性菌の C と毒力との関係を検するためにモルモットにおいて次のごとき実験を行った。第 2 節において分離した INH 107 耐性の C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 株の 1% KH₂PO₄ 培地 5 代継代の C (-) 株、同様に栄養条件の悪い培地 (変法培地)、ならびに INH 107 加栄養条件の悪い培地 (INH 加変法培地) に 5 代継代し C 陽性化した菌株についてモルモットに対する毒力を検した。特に C₅ 株については継代各代ごとに C の推移を見るとともにモルモットに対する毒力の推移を検した。

毒力の判定には 350~400g 前後のツ反応陰性のモルモットの右側腹部皮下に 1mg/cc の菌液を接種、8 週後、一部 3 週後にツ反応を検し屠殺剖検し、局所リンパ腺、肺、肝、脾を肉眼的に検査し脾重量を測定した。病変の程度は佐藤秀三法によつて区分し

た。また全てのモルモットにおいて脾を、局所に病変のあるものはその局所を乳鉢で均等に磨砕し 1% NaOH 液で処置し約 10 倍に希釈、1% KH₂PO₄ 培地に定量培養するとともに直接法により INH の耐性を測定した。分離し得た菌については Slide 法によつて C を検査した。

第 2 項 実験成績

1. 1% H₂O₂ 作用下においては表 13 に示すごとく INH 耐性菌は (-) のものも C 陽性化したものも死滅し、C 強陽性の H₃₇Rv 株のみ幾分抵抗性を示した。

2. モルモットに対する毒力は、1% KH₂PO₄ 培地に継代した C (-) の INH 107 耐性株接種の場合は表 14 のごとく継代 4 代目で 1 匹に脾に病変を認め、同じく継代 4 代目の 1 匹の局所に病変を認めただけであつて、またそれらから分離した菌は INH 107 完全耐性で C (-) であつた。栄養条件の悪い培地 (変法培地) ならびに INH 107 加栄養条件の悪い培地 (INH 加変法培地) に継代し C (+)

表 13 INH 耐性菌の Catalase と H₂O₂ 抵抗性との関係

菌 株	カタゼラ	1% H ₂ O ₂ 作用前菌数					1% H ₂ O ₂ 作用後菌数				
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
H ₃₇ RVR-INH 1%KH ₂ PO ₄ 培地継代	-	++	++	+	30	6	-	-	-	-	-
		++	++	+	30	8	-	-	-	-	-
H ₃₇ RVR-INH 変法培地継代	++	++	++	+	15	22	-	-	-	-	-
		++	++	+	26	C	-	-	-	-	-
H ₃₇ Rv	+++	++	++	+	24	5	6	10	3	-	-
		++	++	C	31	5	2	C	1	-	-

表 14 各種培地継代における INH 耐性菌の毒力の推移

その 1

継代数	接 種 菌				動物番号	ツ反応	病 変							脾重量 (g)	分 離 菌					
	継代地	耐性度	カタゼラ	菌量			局所	リンパ腺				肺	肝		脾	部 位	INH の濃度 %			catalase
								局所	腸膜	腋窩	そい						0	1	5	
1	小川培地	107	-	1mg	No 1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-	-	
					2	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	脾	-	-	-
	変法培地	107	±	1mg	3	17	+	-	-	-	-	-	-	0.8	脾局所	-	-	-	-	
					4	10	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	75	79	75	72
	INH 加法地 変培	107	±	1mg	5	12	-	-	-	-	-	-	-	0.5	脾	-	-	-	-	
					6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-	-	

そ の 2 各種培地継代における INH 耐性菌の毒力の推移

継代数	接 種 菌				動物番号	ツ反	病 変						脾重量 (g)	分 離 菌									
	継培地	耐性度	カタラ	菌量			局所	リンパ腺				肺		肝	脾	部 位	INH の濃度 γ				catalase 0 γ 10 γ		
								局所	腸間	膜窩	そいけ						0	1	5	10			
2	小川培地	10 γ	-	1mg	No 7	7	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-	-				
					8	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	脾	-	-	-	-		
					10	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-	-	
	変法培地	10 γ	+	1mg	11	15	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	脾	-	-	雑	雑			
					13	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	脾	雑	-	-	-	
					14	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	脾	-	-	-	-	
	INH 加培地変法	10 γ	+	1mg	15	14	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	脾	-	-	-	-			
					16	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-	雑	
					17	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-	-	
					18	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	脾	-	-	-	-	

そ の 3 各種培地継代における INH 耐性菌の毒力の推移

継代数	接 種 菌				動物番号	ツ反	病 変						脾重量 (g)	分 離 菌							
	継培地	耐性度	カタラ	菌量			局所	リンパ腺				肺		肝	脾	部 位	INH の濃度 γ				catalase 0 γ 10 γ
								局所	腸間	膜窩	そいけ						0	1	5	10	
3	小川培地	10 γ	-	1mg	No 20	18	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	脾	-	-	-	-	
					21	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-
	変培地	10 γ	+	1mg	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-	-	
					24	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-
	INH 加培地変培	10 γ	+	1mg	26	18	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	脾	-	-	-	-	
					27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-

そ の 4 各種培地継代における INH 耐性菌の毒力の推移

継代数	接 種 菌				動物番号	ツ反	病 変						脾重量 (g)	分 離 菌									
	継培地	耐性度	カタラ	菌量			局所	リンパ腺				肺		肝	脾	部 位	INH の濃度 γ				catalase 0 γ 10 γ		
								局所	腸間	膜窩	そいけ						0	1	5	10			
4	小川培地	10 γ	-	1mg	No 28	10	+	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾局所	-	-	-	-			
					29	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	脾	93	雑	80	98	-
					30	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.8	脾	8	8	3	9	-
	変法培地	10 γ	+	1mg	31	10	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-	-			
					32	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-	-	
					33	13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	脾局所	+	+	+	+	+
	INH 加培地変法	10 γ	+	1mg	34	15	K	-	-	-	-	-	-	-	0.7	脾	-	-	-	-			
					35	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	雑	-	雑	
					36	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	脾	-	雑	雑	-	

K.....痂皮

その 5 各種培地における INH 耐性菌の毒力の推移

継代数	接 種 菌				動物 番号	ツ 反 応	病 変							脾 重 量 (g)	分 離 菌							
	継培 地地	耐 性 度	カ タ ゼ	菌 量			局 所	リンパ 腺				肺	肝		脾	部 位	INH の濃度 γ				catalase	
								局 所	腸 間	腋 窩	そ い け						0	1	5	10	0 γ	10 γ
5	小川 培地	10 γ	-	1 mg	No 37	15	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-	-			
					38	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-	-
	変培 法地	10 γ	+	1 mg	39	12	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-	-			
					40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	脾	-	-	-	-
	INH 加法地 変培	10 γ	+	1 mg	41	10	-	-	-	-	-	-	-	1.0	脾	-	-	-	-			
					42	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	脾	-	-	-	-

となつた INH 10 γ 耐性株接種の場合も、継代 1 代目で 1 匹に、継代 4 代目に 3 匹に局所に病変を認めただけで脾重量も重くなかつた。しかし僅かに分離し得た菌は INH 10 γ に完全耐性でありながら C (+) であつた。また栄養条件の悪い培地 (変法培地) に 5 代継代し C 陽性化した C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 株についてモルモットに対する毒力を検したが表 15 に示すごとく C₄ 株接種の 1 匹に局所に病変を認めただけであつた。しかしその局所から分離した菌の C は (+) であつた。さらに C₅ 株の各培地 3 代継代目において分離した菌株を、接種したモルモットにおいて接種後 3 週目に屠殺し、前記 8 週目屠殺群と剖検比較したが表 16 のごとく 3 週屠殺群の 2 匹に局所病変がみられたのに対し 8 週屠殺群には病変をみ

なかつた。

すなわち INH 10 γ 耐性菌は C (-) であろうと C (+) であろうとモルモットに対して弱毒化していると云えよう。

第 3 章 総括ならびに考按

先述のごとく INH 耐性菌の耐性度の上昇と C の減弱が平行するか否かについては見解の一致をみないようであり、Peizer et al⁶⁾, Knox⁷⁾, Kreis et al⁸⁾, 徳久²⁵⁾, 三輪²⁶⁾ の成績によれば INH 10 γ 以上の耐性菌においては C 活性が低下しているが 10 γ ではなお陽性のももまれには存し、50 γ 以上では全部陰性であるとしている。杉山ら²⁷⁾ は 20 γ では尚 C (+) のものもあるが、発泡時間は他の菌株に比

表 15 変法培地 5 代継代に於ける INH 耐性菌の毒力

菌 株	接 種 菌				動物 番号	ツ 反 応	病 変							脾 重 量 (g)	分 離 菌						
	耐 性 度	カ タ ゼ	菌 量	局 所			リンパ 腺				肺	肝	脾		部 位	培 地 中 の INH 濃度 γ				catalase	
							局 所	腸 間	腋 窩	そ い け						0	1	5	10	0 γ	10 γ
C ₁	10 γ	+	1 mg	No 43	10	-	-	-	-	-	-	-	1.3	脾	-	-	-	-			
				44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	脾	-	C	-	-	
C ₂	10 γ	+	1 mg	45	12	-	-	-	-	-	-	-	1.3	脾	C	-	-	-			
				46	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-	-	
C ₃	10 γ	+	1 mg	47	15	-	-	-	-	-	-	-	0.9	脾	-	-	-	-			
				48	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	脾	C	C	C	C	
C ₄	10 γ	+	1 mg	49	-	+	-	-	-	-	-	-	1.0	脾	+	+	+	+	+	+	
				50	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	局所 脾	-	-	-	-	+
C ₅	10 γ	+	1 mg	39	12	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-	-			
				40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	脾	-	-	-	-	

表16 3 週 層 殺 群

接 種 菌				動物 番号	ツ 反 応	病 変								脾 重 量 (g)	分 離 菌					
継代培地	耐 性 度	カ ー ゼ ラ	菌 量			局 所	リンパ腺				肺	肝	脾		部 位	培 地 中 の INH 濃 度 γ				
							局 所	腸 膜 間	腋 窩	そ い け						0	1	5	10	catalase 0 γ 10 γ
小川培地	10 γ	-	1 mg	No. 19	18	+	-	-	-	-	-	-	0.8	脾 局所	-	-	-	-	-	-
変法培地	10 γ	+	1 mg	23	18	-	-	-	-	-	-	-	0.8	脾	-	-	-	-	-	-
INH 加変培地	10 γ	+	1 mg	25	15	+	-	-	-	-	-	-	1.5	脾 局所	53	47	61	35	+	+

し著しく遅延していると述べている。Schweiger⁹⁾は INH 80 γ 以上の高耐性菌はすべて C (-) であるが 5 γ から 10 γ のものは C (+) (-) 半々であったと述べている。さらに豊原²⁰⁾は C 活性を定量的に測定し、C 活性は 0.01, 0.1, 1, 10, 100 γ /cc INH 耐性の順に減少するが 0.01, 0.1, 1 γ /cc 耐性菌の間には有意の差が認められず、0.01, 10, 100 γ /cc 耐性菌の間に有意の差を認めたと述べている。いづれにしてもかかる実験の使用菌株には感受性菌が混入している可能性があり、事実教室景山²¹⁾は感受性原株と INH 耐性 H₃₇Rv 株の混合培養において感受性株が 10⁻⁵mg 含有していれば C (+) となることを認めている。

私がかかる点に注目し、使用菌株については可及的均一株を用いることに専念して Population 構成に注意をはらいつつ、C 活性について検索を加えた。

先づ第一に One step に色々の耐性度の INH 耐性菌を分離し、その耐性度と C との関係を検したが、0.05 γ One step mutant ですでに C 減弱し、0.1 γ 以上では殆んど C 陰性となった。同時に 0.05~10 γ One step mutants の分離率が殆んど同じであることがわかり、かつ低濃度で分離した耐性菌も 10 γ に不完全に耐性を示すことから 0.05~10 γ One step mutants の Geno type は類似していることが考えられ、従つて薬剤で selection して得た耐性菌と感受性菌との間には代謝系の変化があるものと推定され、そのために前記のごとく C 活性を減弱、消失しているものと考えられる。東村²⁰⁾も同様の実験成績を認め、0.05 γ と 10 γ 耐性に関する Geno type は同一のものと言う仮説を述べたが、その後の実験²¹⁾で比較的少数、恐らく数個の Gene によつて支配されると云つている。

その他種々の耐性株について C 活性を検したが、INH 10 γ 以上耐性菌の場合、単離集落を分離し所謂 Clone として検討したが殆んど C (-) であり、一部 C (\pm) のものも含まれていた。しかし患者から分離した Y. M 株は C (+) であつた。多重耐性株の場合は INH 10 γ 耐性を伴う場合は全て C (-) であつた。Nassau ら¹⁰⁾は先に PAS 耐性となり後に INH 耐性となつた菌株では INH 耐性度が高くても C 活性は低下しないと述べている。これに対し徳久²³⁾は否定的であるが私も PAS 耐性菌を使用し PAS・INH 2 重耐性菌を作つたが、INH 10 γ 耐性を伴うと C (-) となつた。また Bönickel¹¹⁾は echte Tuberkel Bazillen は INH 高度耐性化により必ず C 活性を失うが、鳥型菌その他いわゆる Atypische Tuberkel Bazillen は 100 γ INH 耐性株でも C 活性に変化がないと述べているが、患者から分離した C 陽性 INH 耐性株にかかる Atypische Tuberkel Bazillen も含まれていることも考慮に入れなければならないであろう。

次に C 陰性株の C 陽性化の実験であるが、私がかかる実験の感受性菌混入を防ぐ意味合いから INH 耐性菌株、多重耐性株から各々 Clone を分離し、それぞれを栄養条件の悪い培地 (変法培地) ならびに INH 耐性菌が耐性低下しないために INH 10 γ を加えた栄養条件の悪い培地 (INH 加変法培地) に継代培養した。その結果 Clone を用いる実験でも、教室大藤²²⁾が Clone を用いざる実験で述べたごとく C (-) の INH 耐性菌は C (+) となつた。しかし INH を含む多重耐性株は C (-) のままであつた。すなわち INH 耐性菌と INH を含む多重耐性菌の間にはその代謝系にさらに差があるものと思われる。

INH 耐性菌の Virulence に関しては幾多の報告

があり、Tuczek¹²⁾の発表以来 INH 耐性菌はモルモットには弱毒化していると云われる。さらに北本³²⁾は 107/cc 以上の INH 耐性菌が証明される患者の肺切除後の合併症が殆んど認められないとも報告しており、また INH 耐性菌喀出患者に新しい結核性病変の進展が少ないとする臨床的観察¹³⁾³³⁾がある。Coleman, Middlebrook⁴⁾は INH 耐性菌の Virulence の減弱に関連してその C 活性の消失を重視し、生体内においてグルタチオン、システインのごとき SH 基をもつ化合物が酸化される結果生ずる H₂O₂ が INH 耐性菌に阻止作用を及ぼす可能性を論じている。さらに Edson¹⁴⁾は結核菌が乳酸を酸化するさいにも H₂O₂ が産生される可能性があるとしている。

そこで私は C (-) の INH 耐性菌、さらに第 2 節実験で C 陽性化した INH 耐性菌について H₂O₂ 抵抗試験を行った。その結果対照の C 強陽性の感受性原株は H₂O₂ で発育を阻止され難いが C (-)、C 陽性化した INH 耐性菌はいずれも H₂O₂ で発育を阻止された。このことは C 陽性化した INH 耐性菌の C 活性が感受性菌のそれに比し遙かに弱いものであることを示している。一般に感染の結果宿主体内に成立する炎症が防禦作用を有することは知られているが、感染菌に対し阻止作用を及ぼす炎症部位の物理化学的要因として酸素消費の増大による酸素張力の低下、乳酸の蓄積、pH の低下などが指摘¹⁵⁾されている。かかる条件の下で結核菌が乳酸を酸化して生ずる H₂O₂ により C (-) の INH 耐性菌が阻害されるとも考えられる。さらに Middlebrook¹⁶⁾は C (-) の INH 耐性菌を発育させるためには培地に C を加えることが必要であることを報告しているが、結核病変では組織化学的にその壊死組織中には C を証明されないとされており³⁴⁾、従つてかかる宿主体内に発生した結核性病変の諸性状が INH 耐性菌の増殖に阻止効果を及ぼす可能性が考えられる。事実砂原³⁵⁾は重症肺結核の治療法の一つとして INH 耐性菌が H₂O₂ に弱いことを利用して monaldi 吸引法により H₂O₂ 空洞注入を考慮している。

しかし北本³⁶⁾、柴田³³⁾らは C (-) の INH 耐性株の中でもモルモットに対する Virulence の減弱が認められないものもあることを報告している一方、Middlebrook³⁾、Peizer⁶⁾、海老名³⁾らは INH 耐性でも C 陽性のものは毒力の減弱は比較的僅かであることを報告している。

私は第 2 節実験と同様に感受性菌混入を防ぐ意味

あいから Clone を母体として C (-) の INH 耐性株、C 陽性化した INH 耐性株を使用し、モルモットに対する毒力を検した。さらに第 2 節実験で C 陽性化した INH 耐性株については、継代中に毒力の変化がみられはしないかと考え、継代ごとの毒力を検した。その結果 C (-) の INH 耐性株も C 陽性化した INH 耐性株も共にモルモットに対し弱毒化しており、継代によつても毒力に変化をみなかった。Wolinsky¹⁷⁾、小酒井³⁸⁾らは C 陽性の INH 弱耐性菌でも毒力の弱いものもあると報告しており、高瀬³⁹⁾も C (+) INH 耐性 H₃₇Rv 株を分離し、C (-) INH 耐性 H₃₇Rv 株とのモルモットに対する毒力を比較し、両株間に著差を認めなかつたと報じている。すなわち私の成績、およびこれらの報告から INH 耐性菌のモルモットに対する毒力の減弱は C 活性には関係なく、より本質的なものではなからうかと考えられるが、一方先の H₂O₂ 抵抗試験の結果からみると C (+) INH 耐性菌の C 活性が感受性株の C 活性に遠くおよばないのではないかと考えられるので、あながち毒力と C 活性の関係を完全に否定しきることも出来ないようである。いづれにしても C (-) の INH 耐性株も一般にはモルモットに対しては弱毒化しているが、マウスに対しては相当の病変を作ることが認められており、さらに Shepard¹⁸⁾は Hela 細胞の中では INH 耐性菌は強毒株と同じ速度でふることを報告している。このように INH 耐性菌のモルモットに対する弱毒化が他動物では認められず、ましてや人体内の毒力減弱を早急に結論づけることは危険と云えるであろう。

ところがここに興味あることに高橋⁴⁰⁾は INH 耐性菌が BCG 免疫マウス体内で原株よりも強く抑えられることを見て、毒力と免疫力による抑制のされ方との関係を推論しており、また一方一般にモルモットに接種された INH 耐性菌は各臓器内で一たん増殖するが、間もなく減少し、発生した病変も治癒傾向を示すことが認められている⁴¹⁾⁴²⁾。

そこで私は前記動物実験において C (-) INH 耐性株と C 陽性化した INH 耐性株を接種後 3 週目と 8 週目に屠殺剖検比較したが C (-) のものも、C (+) のものも 3 週目屠殺群に局所病変が多かつた。すなわち INH 耐性菌による病変は感受性菌によつて起る病変を慢性の進行性病変というならば、可逆性病変ということが出来よう。いいかえるなら INH 耐性菌による病変は INH 耐性菌そのもの

の性質上感染部位に生ずる諸性状のために次第に消失していくものか、あるいは生ずる免疫によつて次第に抑えられていくものということが出来、いずれにしてもこの現象は宿主と菌との間の総合的關係、すなわち *host parasite relation ship* として検討すべきものと考えられる。

第4章 結 論

One step で得た INH 耐性菌の C 活性、種々耐性株の C 活性ならびに継代による C 活性の推移、INH 耐性菌の H₂O₂ 抵抗性、および INH 耐性菌の毒力について実験を行い、つぎのごとき知見を得た。

1) One step で得た INH 耐性菌は 0.05 γ 以上の耐性で C 活性を減弱消失した。また INH 0.05 \sim 10 γ 耐性菌の分離率は殆んど同一であることが分り、それぞれの Population 構成にもかなり類似な点があり、従つて薬剤で selection して得た INH 耐性菌は感受性菌と代謝系を異にし、ために C が変化しているものと考えられた。

2) C (-) の INH 10 γ 耐性株を Clone として検討しても培地条件を変えることにより C (+) とすることが分つた。他の多重耐性株では INH 耐性

を含むものは全て C (-) であり、培地条件を変えることにより C (+) とはならなかつた。すなわち INH のみの耐性株と INH 耐性を含む多重耐性株とでは代謝系にさらに差があるものと推定された。

3) C (-) の INH 耐性菌と C 陽性化した INH 耐性菌とについて H₂O₂ 抵抗試験を行なつたが、いずれも感受性菌に比し抵抗性が落ちており、C 陽性化した INH 耐性菌の C 活性も感受性菌のそれに比し遙かに弱いものと考えられた。

4) C (-) の INH 耐性菌と C 陽性化した INH 耐性菌とについてモルモットに対する毒力を検したが、いずれも減弱しており、また継代培養ごとの毒力を検したがいずれも弱毒化していた。すなわち INH 耐性菌の毒力の減弱はその本質的なものと考えられるが、先の H₂O₂ 抵抗試験の結果からして、あながち毒力と C との関係を否定出来ないように思われた。

さらに C (-), C (+) INH 耐性菌接種後、3 週屠殺群と 8 週屠殺群とに分けて病変を比較すると、C (-), (+) INH 耐性菌接種いずれとも 3 週屠殺群に局所に病変が多く、INH 耐性菌の病変は可逆性のものであることがわかつた。

附 全編の総括

第1編 INH 耐性結核菌の耐性低下に関する研究

臨床的にみられる INH 耐性低下の現象を解明するために *in vitro* で One step に得た耐性株、増量的継代法により得た耐性株、患者より分離した耐性株、ならびに INH 耐性菌と感受性菌とを混合した mixed Population を継代し、その Population の動態を追究した。さらに継代培地条件を変え INH 耐性を低下せしめる培地因子を追究した。その結果いかなる方法で得た INH 耐性株も Clone として検討した場合は継代により耐性を低下せず、培地条件を変えても耐性低下はみられなかつた。しかし mixed Population 方式を用いた場合は次第にその INH 耐性菌の比率を減じ、さらに継代培地の栄養条件を悪くすることによつて急激にその耐性を低下した。しかしかかる栄養条件の悪い培地の INH 耐性に対する mutagenic effect はみられず、またかかる培地培養後の INH 耐性菌と感受性菌との viability の差は明らかでないで、かかる培地のある因子が INH 耐性菌のみの発育速度を微妙に遅延せしめていると考えられた。そこでさらに mixed Population 方式を用い培地因子を追究したところ INH 耐性菌発育速度遅延にはグルタミン酸が大きな役割を占めていることが明らかになつた。

第2編 サルファ剤影響下の INH 耐性低下に関する研究

INH 耐性を獲得している肺結核患者にサルファ剤を使用している時みられる INH 耐性低下現象を解明するために、*in vitro* で SI を subinhibitory に添加した培地に INH 完全耐性株、ならびに mixed Population を継代培養し、その Population の動態を追究した。その結果 INH 完全耐性株継代では耐性低下がみられず、mixed Population 方式では薬剤非添加培地に比し幾分急激に耐性が低下した。さらにかかる低下現象が INH 耐性菌と感受性菌とのサルファ剤に対する感受性の差によるものではないかと考え、SI ならびに最近登場した SD, SIM, SP, SMP について INH 耐性菌と感受性菌との感受性を追究し、各自の抗菌力の比較を行なつた。その結果微量菌接種では各剤とも INH 耐性菌、感受性菌の感受性の差がみられず、大量菌接種の場合には INH 耐性菌のサルファ剤に対する感受性が強いようにみえる場合もあることが分つた。すなわち INH

耐性菌と感受性菌の間にはサルファ剤の感受性自体には差はないが、SI が INH 耐性菌の発育速度を微妙に遅延せしめ、そのために低下現象がおこつたものと考えられた。またサルファ剤各自の抗菌力では SD, SIM がもつとも強く SI の2倍を示し、SP がこれにやや劣つていた。ついでサルファ剤使用時には他抗結核剤使用時と同様に耐性獲得が考えられるので、*in viro* で SI 耐性獲得実験を行つた。その結果 125% 迄は容易に耐性が上昇するが、それ以上は継代を重ねても上昇せず耐性に上限があるのではないかと考えられた。また INH 耐性菌と感受性菌の間には SI に対する耐性獲得形式に差がみられなかつた。

第3編 INH 耐性結核菌のC活性と毒力に関する研究

INH 耐性結核菌の C 活性と毒力との関係を調べるため、*in vitro* で INH 耐性菌を Clone として検討し、その C 活性ならびに継代による C の推移、C 活性と H₂O₂ 抵抗性との関係を調べ、さらに継代ごとにモルモットに接種しその毒力を検した。その結果 One step に得た INH 耐性菌は 0.05% 耐性以上で C を減弱、消失した。その際 0.05~10% の One step mutants の分離率は殆んど同様であり、それぞれの Population 構成も類似の点があるので薬剤で Selection して得た INH 耐性菌は感受性菌と代謝系を異にし、そのために C を失っているものと考えられた。ついで栄養条件の悪い培地に C (-) の INH 耐性株を継代すると C (+) となることがみられた。すなわち培地条件を変換することにより C (-) が C (+) となることがわかつた。しかし C (-) の INH を含む二重、三重耐性株は C の変化がみられず、INH のみの耐性株と、INH を含む多重耐性株との間には代謝系にさらに差があるものと推定された。さらに C (-) の INH 耐性株と C (+) となつた INH 耐性株について H₂O₂ 抵抗試験を行なつたが C 強陽性の感受性原株に比し著しく抵抗を失つていた。すなわち C (+) となつた INH 耐性株の C 活性も感受性原株のそれに比しはるかに弱いものと考えられた。つぎに C (-) の INH 耐性株と C (+) となつた INH 耐性株とのモルモットに対する毒力はいずれも弱毒化しており C と毒力とは相関しない結果を得たが先の H₂O₂ 抵抗試験で C (+) INH 耐性菌の C 活性が感受性菌の C 活性に遠くおよばなかつたことからみると、あながち C と毒力との関係を否定することもできない

ように考えられた。またC (-), C (+) INH 耐性菌接種後モルモット屠殺群を3週目と8週目に分け検討したが, Cのいかんにかかわらず3週屠殺群にやや病変が多く, INH 耐性菌のモルモットに対する病変は可逆性のものと考えられた。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師平木潔教授, 大藤真助教授に深く感謝します。

(本論文の要旨は日本結核病学会中国四国第11回地方会において発表した)。

文 献

- 1) Aronson, J. D., Ehrlich, S. L., Flagg, W.: Proc. Exp. Biol. & Med., 80, 259, 1952.
- 2) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 69, 471, 1954.
- 3) Cohn, Middlebrook et al: Am. Rev. Tuberc., 70, 641, 1954.
- 4) Coleman, C. E., & Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 74, 421, 1956.
- 5) Widelock, D.: Am. Rev. Tuberc., 72, 246, 1955.
- 6) Peizer, L.: Am. Rev. Tuberc., 72, 246, 1955.
- 7) Knox, R. et al: Am. Rev. Tuberc., 73, 723, 1956.
- 8) Kreis, eE. Le Joubioux: Ann. Inst. Pasteur, 92, 190, 1957.
- 9) Schweiger O. & Vandra E.: Am. Rev. Tuberc. 78, 5, 1958.
- 10) Nassau E. & Hamilton G.: Tubercle 36, 281, 1955.
- 11) Bönicke R.: Tuberkuloseforschungsinstitut Borstel Jahresbericht, 58, 1957.
- 12) Tuzcek H. et al: Münch, Med. Wschr., 94, 1307, 1952.
- 13) Ostreicher R. et al: Am. Rev. Tuberc., 71, 390, 1955.
- 14) Edson N. L.: Biochem. J. 41, 145, 1947.
- 15) Dubos, R. J.: Lancet, 2, 1, 1956.
- 16) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 75, 155, 1957.
- 17) Wolinsky E.: Am. Rev. Tuberc., 73, 768, 1956.
- 18) Schepard: J. Exp. Med., 107, 237,
- 19) 山村: 日結, 18, 453, 1959.
- 20) 勝沼: 結核, 32, 増刊号, 105, 1957.
- 21) 正田: ビタミン, 13, 331, 1957.
- 22) 大藤: 胸部疾患, 3, 903, 1959.
- 23) 柴田: 結核研究の進歩, 22, 69, 1958.
- 24) 永木: 結核研究の進歩, 26, 121, 1959.
- 25) 徳久: 呼吸器診療, 12, 313, 1257.
- 26) 三輪: 第31回日本結核病学会総会演説より引用.
- 27) 杉山: 臨床と研究, 32, 41, 1955.
- 28) 豊原: 結核, 32, 695, 1957.
- 29) 景山: 岡山医学会雑誌, 70, 1897, 1958.
- 30) 東村: 医学と生物学, 44, 180, 1957.
- 31) 東村: 医学と生物学, 55, 165, 1960.
- 32) 北本: 日本胸部外科学会誌, 7, 447, 1959.
- 33) 大藤: 結核研究の進歩, 26, 188, 1959.
- 34) 加納: 日本胸部臨床, 19, 198, 1960.
- 35) 砂原: 日本医事新報, 1845, 3, 1959.
- 36) 北本: 結核研究の進歩, 22, 83, 1958.
- 37) 海老名: 日結, 15, 833, 1956.
- 38) 小酒井: 日結, 16, 573, 1957.
- 39) 高瀬: 結核, 34, 810, 1959.
- 40) 高橋: 日本細菌学雑誌, 13, 228, 1957.
- 41) 北本: 診断と治療, 44, 326, 1956.
- 42) 高橋: 日本細菌学雑誌, 12, 315, 1957.

Study on Weakening of Resistance of Isoniazid-Resistant Tubercle Bacilli, Catalase-Activity and Virulence

Part III

Study on Catalase Activity and Virulence of INH Resistant Bacilli

By

Akira NAKATANI

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

In order to see the relation between the catalase activity and virulence of INH resistant bacilli, the author studied the clone of INH resistant bacilli in vitro, looked into its catalase activity and the change of activity as generation descends and tested the virulence by inoculating guinea pigs with each generation of the bacilli. The results found were as follows:

1. The INH resistance bacilli obtained in one step was found to have a resistance potential of 0.05 γ or more and to have lost its catalase activity. At this stage the selectivity of INH resistant bacilli which has a resistance of 0.05 γ —10 γ and the population composition of each group were similar. Therefore it is believed that the metabolic system of INH resistant bacilli made available by means of selection by use of drugs is different from that of receptive bacilli, and that the loss of catalase activity is attributable to this difference.

2. It was found that the negative catalase activity of INH 10 γ resistant strains using the clone can be changed to positive by changing the conditions of the culture medium. Other multiple resistant strains which have the INH resistance are all C (-) and could not be changed to C (+) by changing the conditions of the culture medium. Therefore it is presumed that there is greater difference in the metabolic system between a single resistance strain which resists only INH and multiple resistance strain which resists not only INH.

3. A H₂O₂ resistance test was given in respect of C (-) INH resistant bacilli and INH resistant bacilli the catalase activity of which had been changed from negative to positive and found that the resistance of both bacilli weakens compared to that of receptive bacilli and also that even the catalase activity of INH resistant bacilli changed from negative to positive is far weaker than that of receptive bacilli.

4. The author tested the virulence of C (-) INH resistant bacilli and INH resistant bacilli the catalase of which changed from negative to positive on guinea pigs, and found that the virulence of both had weakened. The author also tested virulence of each generation of cultured bacilli and found that it had lost its virulence. Judging from the results of the tests, it appears that the weakening of the virulence of INH resistant bacilli is an inherent property of the bacilli itself. However, the results of the H₂O₂ resistance tests seem to indicate that the relation between the virulence and catalase cannot be completely denied. Further the author inoculated guinea pigs with C (-) INH resistant bacilli and some with C (+) INH resistant bacilli and separated them into two groups, one group killed at 3rd week and the other group killed at 8th week after the inoculation and found many cases of local disorder in the group killed at 3rd week irrespective of the kind of catalase, which led to believe that the disorder of guinea pigs attributable to INH resistant bacilli is reversible.