岡 山 医 学 会 雑 誌

第75巻456 合併号（第821, 822, 823号）

昭和38年6月30日発行

576.852.211：615.517

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 1 編

INH 耐性結核菌の耐性低下に関する研究

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2章
第1節 INH 耐性菌各菌株の Population の動態について
第1項 実験方法
第2項 実験成績
第2節 INH 耐性菌の栄養条件の悪い培地での Population の動態について
第1項 実験方法
第2項 実験成績
第3節 INH 耐性低下に及ぼす培地条件の検討について
第1項 実験方法
第2項 実験成績
第3章 総括ならびに考按
第4章 結 論

第1章 緒 言

結核菌が Isonicotinic acid hydrazide (INH) に対して容易に耐性を示すようになることは周知[1)2)]の事実であるが，この INH 耐性の試験管内での安定性についての今までの報告は一定せず，Pansy ら[3)]は INH 耐性の BCG を使つて速かに INH の耐性が復帰することを認めており，Szybalski ら[4)]は INH 耐性の M. ranae で継代につれ高度耐性菌が減少し，低度耐性菌が残存し，あるいは感性菌にのみなることを報告している．また Barnett ら[5)]も in vitro で耐性にした菌の中で早く耐性の復帰するものがあることを認めている．わが国においても小酒井[17)]，中山ら[18)]は耐性復帰を認め，なかんずく中山は INH 耐性菌の継代培養で8代継代目には 0.005%の耐性菌をみるのみとしており割合早い耐性復帰を認めている．

これに反し Fisher[6)]は耐性度の低下をみないとしており，Lecocq[7)]も INH 耐性の B.C.G. のみの継代培養ではやはり耐性菌のみであつたと報告し

ている．しかし佐藤[19]は $H_{37}Rv$-R-INH One step mutant は継代で耐性低下を示さないが，患者より分離した菌では継代につれて Population に大きな変動が起る例もあると報告している．

さらに Dissmann[8]は Slide culture 法によつて培養1日後から4日後まで1日ごとに発育菌数を数え，INH 感受性菌の発育速度が耐性菌のそれより速いことを報告しており，Lecocq[7]は INH に感性および耐性の B. C. G. を混合して継代培養し，継代9代で感性菌のみとなつたと報告し，佐藤[20]も INH 感受性菌および耐性菌を混合した Population の耐性度の動態について観察し，混合 Population 中に分布する耐性菌の比率は一定の割合で次第に減少していくのを認め，この現象は混合菌群中の INH 感受性菌と耐性菌の発育速度の差によるものと考察している．

このように INH 耐性菌の耐性度の安定性には諸説あつて一定していない．このことは実験に際し使用菌株の均一性を確かめていない場合が多いことに基因するのではないかと考えられるので私は One Step に得た耐性株，増量的継代法により得た耐性株，ならびに患者耐性株についてそれぞれより分離した INH 完全耐性の単離集落，すなわち Clone を母体として継代培養しその Population の動態を検討し，さらに耐性菌と感受性菌とを混合継代培養してその Population の変動を観察した．ついで INH 耐性菌の特殊の栄養要求性から考えて栄養条件の悪い培地を作成し，かかる培地上で上記菌株を継代培養し，その Population の動態を追求するとともに INH 耐性低下に及ぼす培地因子について検討し，些か新知見を得たのでここに報告する．

第2章

第1節 INH 耐性菌各菌株の Population の動態について

第1項 実験方法

1) 菌株； INH 耐性株としては INH 10γ 添加培地で One step に分離した $H_{37}Rv$·R-INH10γ 株と，接種菌量 0.1 mg/0.1 cc の増量的継代法により得た $H_{37}Rv$·R-INH 10γ 株（以下 H 株と略）ならびに同様の増量的継代法により得た Frankfurt R-INH 10γ 株（以下 F 株と略）を用い，患者株としては肺結核患者の喀痰より分離して間もない R-INH10γ 株を用い，INH 感受性株としては $H_{37}Rv$ 株を用いた．そしてすべての菌株より単離集落を分離し Population 構成をしらべ本実験に使用した．混合菌株は H 株より分離した単離集落の増菌株と $H_{37}Rv$ 株より同様に分離した単離集落増菌株のともに5週培養菌から菌液を作り菌量で1：1，1：9の割合で混合し，A，B株とした．

2) 培地；INH 耐性株の分離，耐性測定，ならびに継代にはすべて1% KH_2PO_4 培地を使用した．

3) 培養の方法；上記菌株のそれぞれ融合のない集落より湿菌重量2～3 mg の単一の集落をとり，水晶玉入りの磨砕コルベンで1 mg/cc の菌液を作り，混合菌液は湿菌重量で1：1，1：9になるように混合し，これらを滅菌蒸溜水で稀釈してメスピペットで 0.1cc づつ接種した．接種菌量は耐性測定には 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}mg とし継代培養には 10^{-1}mg を用いた．継代は培養5週目に行ない，各継代ごとに耐性度を検した．

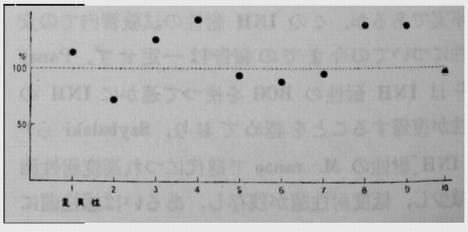
4) 判定；培養4週間で判定し，すべて集落数を算定し Population 構成を調べた．

第2項 実験成績

1) One step mutants の5代継代後の Population 構成

INH 10γ 加1% KH_2PO_4 培地で One step に分離した10ケの単離集落を用い，各集落を1% KH_2PO_4 培地でそれぞれ5代継代培養し，継代後の生菌数当りの INH 10γ 耐性菌の100分率を求め図1に示した．すなわち試験管内で One step に分離した10変異株は INH の含有しない1% KH_2PO_4 培地での5代継代後では 115%，70%，126%，140%，90%，88%，92%，132%，92%と各々の Population 構成には少しの差はみられるが初めの 10γ/cc の INH に殆んど完全な耐性を保持していることがわかり，One step mutants は単離集落を母体とした試験管内継代実験では安定した性質を持つているものと考えられる．

図1 One step mutants の1% KH_2PO_4 培地5代継代における INH 耐性菌と生菌数総数との比



2) 増量的継代により得た INH 耐性株の Population の動態

H株より INH 完全耐性を示す5集落を，F 株よりは同じく1集落を分離し，それぞれを母体とした変異株を1% KH_2PO_4 培地で継代培養し，各代ごとの耐性度の検査成績を表 1，2 に示し，その Population の推移を図2に示した．これによると増量的継代により得た INH 10γ 変異株は6変異株ともすべて継代により35～150%の Population 構成の動揺がみられるが，INH 10γ という性質はだいたい維持するように観察された．またその個々の変異株の Population の動揺にも特に一定の傾向をみいだすことはできなかつた．

3) 患者より得た INH 耐性株の Population の動態

間接法により INH 10γ 加1% KH_2PO_4 培地上で分離した集落を母体として継代培養を行つたが表3，図3に示すごとくその Population の動揺は100%，128%，76%，95%，65%，115%，100%と INH 10γ という性質はよく維持していた．

4) 混合菌株の Population の動態

表4，図4に示すごとくA，B菌株の各継代ごとの Population 構成の検討から両菌株中に分布している耐性菌の比率は継代培養をくりかえすとともにわずかづつではあるが次第に減少していくことがみられた．

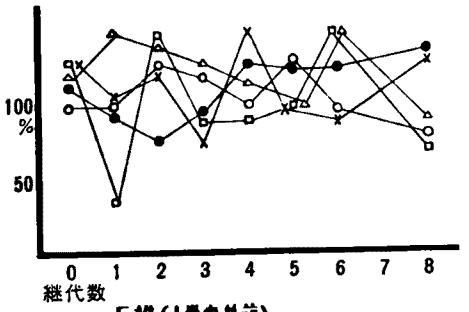
表1　増量的継代により得た菌株の1% KH_2PO_4 培地継代における耐性度の検査成績H株（5単離集落）

継代数	菌量 mg	1 培地中1NH濃度 γ/cc				2 培地中1NH濃度 γ/cc				3 培地中1NH濃度 γ/cc				4 培地中1NH濃度 γ/cc				5 培地中1NH濃度 γ/cc			
		0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10
0	10^{-1}	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||
	10^{-3}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+⊥	++	++	++	++	++	++	++	++
	10^{-5}	7	7	6	8	5	10	10	6	8	10	7	10	8	10	7	10	23	21	23	23
1	10^{-1}	|||	|||	|||	++	++	++	++	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||
	10^{-3}	+	+	+	+	76	63	50	⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-5}	15	13	7	14	16	49	46	24	6	7	6	9	50	⊥	36	39	25	⊥	26	24
2	10^{-1}	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||
	10^{-3}	+	+⊥	+⊥	+	++	++	++	++	+	+	98	+	++	++	++	++	+	+	+	+
	10^{-5}	53	35	57	40	7	7	8	10	19	15	6	7	37	33	34	46	4	3	2	5
3	10^{-1}	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||
	10^{-3}	+⊥	+⊥	+⊥	+	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	++	++	++	++	++	+⊥	+⊥	+⊥
	10^{-5}	23	24	17	22	27	34	23	33	16	20	13	14	+	+	⊥	⊥	24	33	39	30
4	10^{-1}	|||	|||	|||	++	++	++	++	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||
	10^{-3}	+	+	+	+	51	58	⊥	⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+	+	+	+	⊥	⊥	35	⊥
	10^{-5}	4	3	4	5	6	7	7	7	20	28	26	18	8	8	9	12	2	1	2	2
5	10^{-1}	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||
	10^{-3}	+	+	⊥	⊥	++	++	++	++	++	++	++	++	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥
	10^{-5}	4	10	4	5	⊥	⊥	⊥	⊥	11	17	13	11	31	36	50	34	15	5	12	19
6	10^{-1}	|||	|||	|||	|||	|||	|||	+⊥	++	++	++	|||	|||	|||	|||
	10^{-3}	+	⊥	⊥	⊥	++	++	++	++	17	18	26	38	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+⊥	+
	10^{-5}	4	2	5	5	6	11	7	9	2	4	4	3	40	36	34	36	37	18	34	35
8	10^{-1}	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||	|||
	10^{-3}	++	++	++	++	++	++	++	++	+⊥	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+⊥	+⊥	+
	10^{-5}	28	30	33	33	52	43	51	40	40	37	32	28	4	4	4	5	52	53	35	40

表2 増量的継代により得た菌株の1% KH_2PO_4 培地継代における耐性度の検査成績
F株（1単離集落）

継代数	菌量 mg	培地中1NH 濃度 γ/cc			
		0	1	5	10
0	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	9	11	12	8
1	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	14	8	10	10
2	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	⊥
	10^{-5}	8	11	2	4
3	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	⊥
	10^{-5}	9	8	6	5
4	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	4	3	3	4
5	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	2	0	0	2

図2 増量的継代により得た菌株の1% KH_2PO_4 培地継代における Population の推移
H株（5単離集落）



F株(1単離集落)

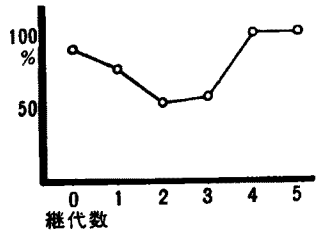


表3 患者より得た菌株の1% KH_2PO_4 培地継代における耐性度の検査成績

継代数	菌量 mg	培地中1NH濃度 γ/cc			
		0	1	5	10
0	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	⊥	⊥	⊥	⊥
1	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	58	⊥	⊥	＋
2	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	12	6	9	9
3	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	23	26	20	22
4	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	8	6	10	5
5	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	7	8	6	8
6	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	5	3	3	5

図3 患者より得た菌株の1% KH_2PO_4 培地継代における Population の推移
Y.S. 株より得た INH10γ 耐性単離集落

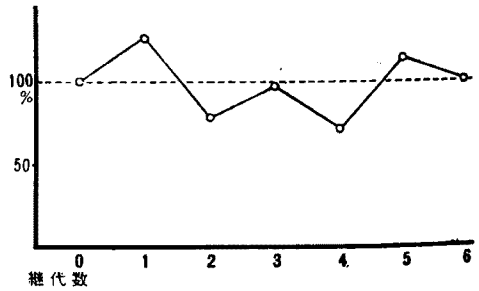
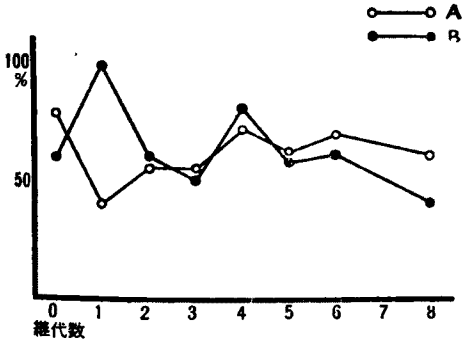


表4　混合菌株の1 %KH_2PO_4 培地継代における耐性度の検査成績

継代数	菌量 mg	A 培地中1NH濃度 γ/cc				B 培地中1NH濃度 γ/cc			
		0	1	5	10	0	1	5	10
0	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰
	10^{-3}	∔	∔	∔	∔	∔	∔	+	+
	10^{-5}	77	45	40	58	10	10	7	6
1	10^{-1}	∰	∔	∔	∔	∰	∰	∰	∔
	10^{-3}	+	⊥	⊥	⊥	+	+	⊥	⊥
	10^{-5}	5	1	1	2	4	3	5	4
2	10^{-1}	∰	∔	∔	∔	∰	∰	∔	∔
	10^{-3}	∔	+	+	+	∔	∔	∔	∔
	10^{-5}	75	42	30	39	+	⊥	⊥	⊥
3	10^{-1}	∰	∔	∔	∔	∰	∰	∔	⊥
	10^{-9}	∔	+	+	⊥	∔	⊥	+	⊥
	10^{-5}	34	18	22	18	4	4	1	2
4	10^{-1}	∰	∰	∔	∔	∰	∰	∔	∔
	10^{-3}	∔	∔	∔	∔	∔	∔	∔	∔
	10^{-5}	29	31	41	21	22	19	13	18
5	10^{-1}	∰	∔	∔	∔	∰	∔	∔	∔
	10^{-3}	∔	+	∔	+	∔	⊥	⊥	+
	10^{-5}	17	11	11	11	11	8	8	6
6	10^{-1}	∰	∔	∔	∔	∰	+	+	+
	10^{-3}	+	⊥	⊥	⊥	∔	+	⊥	⊥
	10^{-5}	6	5	5	4	5	4	9	3
8	10^{-1}	∰	∔	∔	∔	∰	+	+	+
	10^{-3}	+	⊥	⊥	⊥	∔	⊥	⊥	⊥
	10^{-5}	10	8	6	6	10	3	3	4

図4　混合菌株の1 % KH_2PO_4 培地継代における Population の推移



第2節　INH 耐性菌の栄養条件の悪い培地での Population の動態について

第1項　実験方法

1) 菌株；第1節と同様に増量的継代法により得たH株，F株，患者株，ならびに混合菌株としてA，B株を用いた．

2) 培地；継代には1 % KH_2PO_4 培地よりグリセリン，グルタミン酸ナトリウムを除外した KH_2PO_4 1g，蒸溜水 100cc，卵液 200cc，2 %マラカイト緑液 6cc のみの栄養条件の悪い培地を使用し，耐性度測定には1 % KH_2PO_4 培地を用いた．

3) 培養の方法，ならびに判定は第1節と同様である．

第2項　実験成績

1) 増量的継代により得た菌株の Population の動態

H株，F株について1 % KH_2PO_4 培地継代実験と同様に単離集落を母体とした変異株を用い継代したが表5，6，図5のごとくH株では60～142%の，F株では24～100%の Population 構成の変動はみられるが INH 10γ という性質はだいたい維持し，特に低下するという傾向はみられなかつた．

2) 患者より得た菌株の Population の動態

1 % KH_2PO_4 培地継代実験と同様に患者株より得た INH 10γ 耐性の単離集落を母体として継代実験を行つたが表7，図6のごとく100%，132%，100%，92%，60%，128%，134%と Population 構成の変動はあつたが INH 10γ という耐性度はよく維持していた．

3) 混合菌株の Population の動態

1 %KH_2PO_4 培地継代と同時に栄養条件の悪い培地でA，B株について継代培養を行つたが表8，図7のごとく両菌株中に分布する INH 耐性菌の比率は継代につれ速かに低下し，継代8代目にはA菌株では8%，B菌株では4%となつた．すなわち1 % KH_2PO_4 培地継代実験に比し急激な Population の低下がみられた．

第3節　INH 耐性低下に及ぼす培地条件の検討について

第1項　実験方法

グリセリンならびにグルタミン酸ナトリウムを除外した栄養条件の悪い培地継代で1 % KH_2PO_4 培地継代に比し混合菌株の急激な INH 耐性低下がみられたところから，かかる栄養条件の悪い培地の INH 耐性に対する mutagenic effect の有無を検討

表5 増量的継代により得た菌株の栄養条件の悪い培地継代における耐性度の検査成績H株

（5単離集落）

継代数	菌量	1				2				3				4				5			
		培地中1NH濃度 γ/cc				培地中1NH濃度 γ/cc				培地中1NH濃度 γ/cc				培地中1NH濃度 γ/cc				培地中1NH濃度 γ/cc			
	mg	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10
0	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰
	10^{-3}	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯
	10^{-5}	7	7	6	8	5	10	10	6	8	10	7	10	8	10	7	10	23	21	23	23
1	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰
	10^{-3}	+	+	+	+	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	+	+	+	⊥	+	+	∯	+
	10^{-5}	11	31	42	17	31	⊥	32	24	43	⊥	⊥	44	59	⊥	68	⊥	82	⊥	⊥	+
2	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰
	10^{-3}	∯	∯	+	∯	+	+	+	+	+	+	+	∯	∯	∯	+	∯	∯	∯	∯	∯
	10^{-5}	7	8	13	11	3	3	1	2	4	1	1	4	13	15	7	14	12	11	10	14
3	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰
	10^{-3}	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯
	10^{-5}	36	32	30	42	67	⊥	52	58	⊥	+	61	48	⊥	⊥	⊥	⊥	+	+	+	+
4	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∯	∯	∯	∯	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∯	∯	∯	∯
	10^{-3}	∯	∯	∯	∯	24	24	11	17	+	+	+	+	∯	∯	∯	+	33	16	22	20
	10^{-5}	21	18	35	18	2	0	3	2	12	16	11	10	22	38	28	18	1	1	1	1
5	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∯	∯	∯	∯	∯	∰	∰	∰	∰	∯	∯	∯	∯
	10^{-3}	∯	∯	∯	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	∯	∯	+	∯	∯	∯	∯	∯
	10^{-5}	16	16	20	19	8	8	3	6	4	6	2	4	43	44	61	⊥	45	43	42	51
6	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∯	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰
	10^{-3}	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯
	10^{-5}	+	+	+	+	32	27	38	29	39	26	44	45	53	24	45	35	61	63	54	62
8	10^{-1}	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰	∰
	10^{-3}	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯	∯
	10^{-5}	12	10	9	10	10	8	7	10	10	18	12	9	12	16	13	10	+	+	+	+

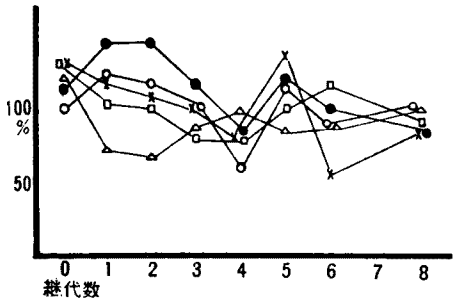
するため INH に感性の $H_{37}Rv$ 株より単離集落を分離し，この増菌株を1% KH_2PO_4 培地ならびに栄養条件の悪い培地に5代継代した際のそれぞれの INH 耐性菌出現率を1% KH_2PO_4 培地で検した．さらに耐性低下の培地因子を確定するために1% KH_2PO_4 培地よりグリセリンのみを除外した培地，ならびにグルタミン酸ナトリウムのみを除外した培地を作成し，1% KH_2PO_4 培地を対照として INH 10γ 耐性 $H_{37}Rv$ 株より単離集落を分離し増菌した変異株，ならびに INH 10γ 耐性 $H_{37}Rv$ 株と INH 感性 $H_{37}Rv$ 株よりそれぞれ単離集落を分離し増菌した菌株を湿菌量で1：1，1：9の割合で混合したC，D株を継代し，各代ごとに1% KH_2PO_4 培地にて耐性度を測定した．継代ならびに判定の方法は第1節と同様である．

第2項 実験成績

表9に示すごとく1% KH_2PO_4 培地ならびに栄養条件の悪い培地継代後の INH 耐性菌出現率は大差なく，かかる栄養条件の悪い培地の INH 耐性に対する mutagenic effet はみられなかつた．

つぎに INH 完全耐性株を1% KH_2PO_4 培地，グリセリンのみを除外した培地，ならびにグルタミン酸ナトリウムのみを除外した培地に継代した成績は表10，図8に示すごとく85～120%の Population の動揺はみられるが耐性低下の傾向はみられなかつた．混合菌株についてはC，D株を1% KH_2PO_4 培

図5　増量的継代により得た菌株の栄養条件の悪い培地での継代における Population の推移
H株（5単離集落）



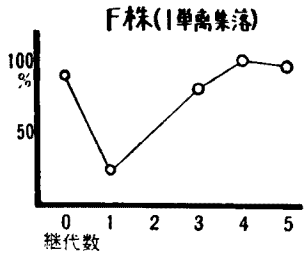


表6　増量的継代により得た菌株の栄養条件の悪い培地継代における耐性度の検査成績
F株（1単離集落）

継代数	菌量 mg	培地中1NH濃度 γ/cc			
		0	1	5	10
0	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	9	11	12	8
1	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	8	2	3	2
2	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	20	1	雑菌	雑菌
3	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	5	9	8	4
4	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	7	7	8	7
5	10^{-1}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	12	10	11	11

表7　患者より得た菌株の栄養条件の悪い培地継代における耐性度の検査成績

継代数	菌量 mg	培地中1NH濃度 γ/cc			
		0	1	5	10
0	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	⊥	⊥	⊥	⊥
1	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	⊥	56	⊥	＋
2	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	15	6	⊥	15
3	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	44	68	42	40
4	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	5	5	18	3
5	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	63	68	⊥	⊥
6	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	55	48	49	⊥

図6　患者株の栄養条件の悪い培地での継代における Population の推移
Y. S. 株より得た INH10γ 耐性菌単離集落

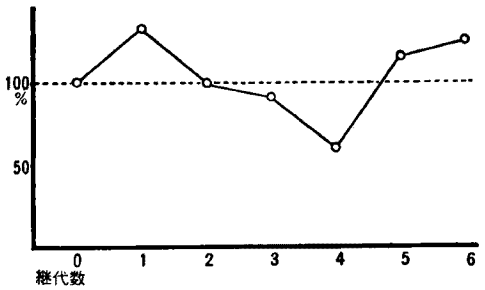


表8 混合菌株の栄養条件の悪い培地継代における耐性度の検査成績

継代数	菌量 mg	A 培地中1NH濃度 γ/cc 0	1	5	10	B 培地中1NH濃度 γ/cc 0	1	5	10
0	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋
	10^{-5}	74	45	40	58	10	10	7	6
1	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋
	10^{-5}	＋	＋	＋	＋	8	8	5	6
2	10^{-1}	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	＋	＋	＋	＋	＋	82	71	70
3	10^{-1}	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋＋	＋＋	＋	＋
	10^{-3}	＋＋	＋	＋	＋	＋＋	⊥	⊥	＋
	10^{-5}	71	31	23	31	12	3	1	4
4	10^{-1}	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋＋	＋＋	＋	＋
	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	⊥	15	33	12	68	20	33	16
5	10^{-1}	＋＋＋	＋＋	＋	＋	＋＋＋	＋＋	＋	＋
	10^{-3}	＋＋	⊥	⊥	⊥	＋＋	＋	⊥	＋
	10^{-5}	28	4	4	4	42	6	1	4
6	10^{-1}	＋＋＋	＋＋	＋	＋	＋＋＋	＋	＋	＋
	10^{-3}	＋＋	＋	＋	⊥	＋＋	⊥	⊥	⊥
	10^{-5}	78	47	50	22	24	5	2	2
8	10^{-1}	＋＋＋	＋	＋	＋	＋＋＋	＋	＋	＋
	10^{-3}	＋＋	⊥	⊥	⊥	＋＋	⊥	⊥	⊥
	10^{-5}	＋	10	8	8	＋	3	3	4

図7 混合菌株の栄養条件の悪い培地継代における Population の推移

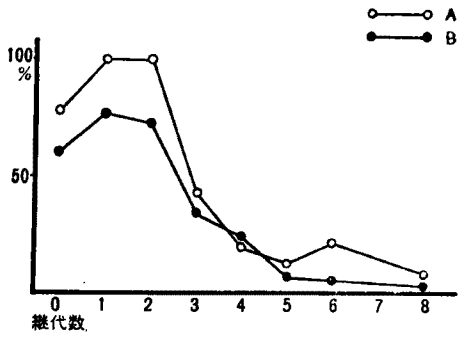


表9 H_{37Rv} 株の1% KH_2PO_4 培地並びに栄養条件の悪い培地継代による生菌数当りの耐性菌出現率

1% KH_2PO_4 培地継代菌株 INH濃度	対照培地の生菌数を1とした時の生育菌数の比	栄養条件の悪い培地継代菌株 INH濃度	対照培地の生菌数を1．とした時の生育菌数の比
0 γ	1.00	0 γ	1.00
0.01	0.92	0.01	1.00
0.05	0.49×10^{-8}	0.05	0.12×10^{-5}
0.5	0.18×10^{-8}	0.5	0.32×10^{-8}
1.0	0.12×10^{-8}	1.0	0.28×10^{-8}
5.0	0.05×10^{-8}	5.0	0.14×10^{-8}
10.0	0.04×10^{-8}	10.0	0.12×10^{-8}

表10 INH 完全耐性株の種々培地継代での Population の推移

その1．INH 耐性株の耐性度の検査成績

継代数	菌量 mg	継代培地 1% KH_2PO_4 培地 INHの濃度 γ 0	1	10	Glycerin 除外培地 INHの濃度 γ 0	1	10	Glutamin 酸 Na 除外培地 INHの濃度 γ 0	1	10
0	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	20	22	20	20	22	20	20	22	20
1	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
	10^{-5}	19	19	18	3	6	4	15	17	18
2	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	7	6	6	5	8	6	9	10	12
3	10^{-3}	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	＋
	10^{-5}	30	28	29	34	39	34	7	4	6

地を対照としてグリセリン除外培地，ならびにグルタミン酸ナトリウム除外培地に継代培養し各代ごとに耐性度を測定したが，表11, 12, 図9, 10に示すごとくグリセリン除外培地では耐性低下の度合は少ないが，1% KH_2PO_4 培地ならびにグルタミン酸ナトリウム除外培地では急激に耐性低下がみられ，D株では継代2代目で感性に復帰した．特にグルタミン酸ナトリウム除外培地では感性化が速くみられるようであつた．

図8　INH 完全耐性株の種々培地継代での Population の推移

その2．INH 耐性菌と生菌数総数との比

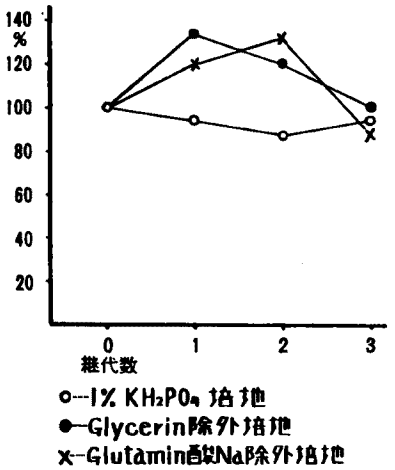


表11　混合菌株の種々培地継代での Population の推移

その1．C混合菌株のINH耐性度の検査成績

継代	培地	1% KH_2PO_4 培地			Glycerin 除外培地			Glutamin 酸 Na 除外培地		
継代数	菌量	INHの濃度 γ			INHの濃度 γ			INHの濃度 γ		
	mg	0	1	10	0	1	10	0	1	10
0	10^{-}	++	+	+	++	+	+	++	+	+
	10^{-5}	29	3	6	29	3	6	29	3	6
1	10^{-3}	++	+	+	+	+	+	++	+	⊥
	10^{-5}	47	7	7	7	2	1	29	10	5
2	10^{-3}	+	⊥	2	+	+	+	+	⊥	12
	10^{-5}	10	−	−	5	1	1	14	5	2
3	10^{-3}	++	3	2	++	++	+	++	−	−
	10^{-5}	37	−	−	22	12	5	60	−	−

表12　混合菌株の種々培地継代での Population の推移

その1．D混合菌株のINH耐性度の検査成績

継代	培地	1% KH_2PO_4 培地			Glycerin 除外培地			Glutamin 酸Na 除外培地		
継代数	菌量	INHの濃度 γ			INHの濃度 γ			INHの濃度 γ		
	mg	0	1	10	0	1	10	0	1	10
0	10^{-3}	++	+	⊥	++	+	⊥	++	+	⊥
	10^{-5}	42	6	5	42	6	5	42	6	5
1	10^{-3}	+	+	⊥	++	+	6	++	3	9
	10^{-5}	16	4	2	10	2	1	35	−	−
2	10^{-3}	+	−	−	++	+	10	++	−	−
	10^{-5}	7	−	−	24	−	−	2	−	−
3	10^{-3}	++	−	−	++	3	8	++	−	−
	10^{-5}	30	−	−	18	−	−	10	−	−

図9　混合菌株の種々培地継代での Population の推移

その2．C混合菌株中に分布する INH 耐性菌と生菌数総数との比

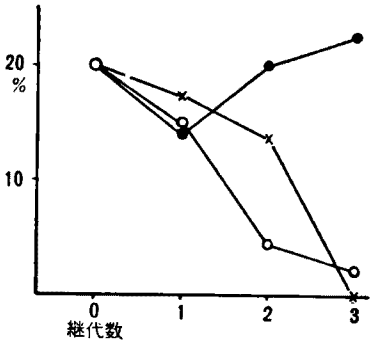
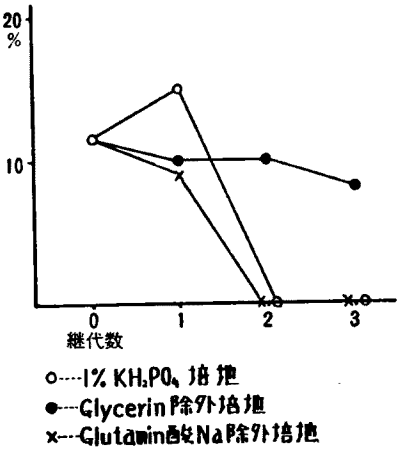


図10　混合菌株の種々培地継代での Population の推移

その2．D混合菌株中に分布する INH 耐性菌と生菌数総数との比



第3章 総括ならびに考按

INH 耐性菌の諸性状を検討する際，使用菌株が可及的均一な性状の菌群より構成されていることが望ましく，私はこの目的で単離集落を母体として，すなわち所謂 Clone[21] として継代実験を行ない，菌株中に含まれる耐性菌の割合の変化について検討した．

その結果 INH 10γ 耐性菌株は One step に得たものも，増量的継代により得たものも継代培養につれて Population 構成の変動はみられるが 5～8 代の継代ではその耐性度の低下は来さないことが知られた．安淵ら[22] も鳥型菌について Population 均一な INH 耐性菌は15代継代培養を行なつても，その耐性の程度に変化のないことを認めている．一方堀[23] は鳥型菌竹尾株より分離した INH 耐性菌は INH の存在下にある程度その耐性の程度を上昇せしめることができるが上昇された耐性度の維持は困難であつて，なにかの原因でふたたび耐性の程度が低下することを認めており，このような現象はおそらく菌の物質代謝と密接な関係があるのではないかと推定している．秋葉[24] もこれに追加して同様の現象を微量継代培養法によつて認め，この現象は適応的に INH 耐性となつてくるとともに代謝系の変化を伴ない，そのためにまた感性な代謝状態になる結果と想像し，これに反し One step mutant（突然変異菌に由来するものと思われる）は安定であり，適応的に耐性となつた菌と Spontaneous mutant では代謝系に判然たる差があるものと想像している．私も One step mutant と増量的継代により得た菌株の間に継代培養による耐性度の動態に差がないものかと実験を行なつたが，いづれも耐性度の変化はみることができず，さらに増量的継代法により得た菌株については INH 耐性菌の栄養要求性の面から考えて，栄養条件の悪い培地を作成して継代実験を行なつたが，かかる培地でも耐性低下をみることはできなかつた．しかし私の増量的継代により得た菌株は堀，秋葉の Single Cell culture によつたものではなく，かかる点から差異がでたのではないかと考えられる．

患者株については先述のごとく佐藤は継代につれて Population に大きな変動が起る例もあり，これは Population 中に相当数の感受性菌が存在していたものと解している．私は INH 完全耐性の単離集落を分離し継代培養を行なつたが耐性の低下をみることはできなかつた．しかし稲垣[25] は患者株より単個菌分離培養によつて分離した純系 INH 耐性株について継代実験を行ない16代または22代で急激な耐性復帰がみられるものがあると報告し，かかる耐性復帰は耐性菌が継代中にわずかにでも生ずる感受性菌によつておきかえられたものと解釈している．しかしこのように16代または22代までほとんど完全に耐性を持つていたものが急激に復帰する現象を，Dissmann，佐藤のいうごとき菌株の側の発育速度の差によつて一定の割合で次第に低下する現象と比較すると，菌株の側の因子の他に培地，さらに培養期間など何か培養環境の側に発育速度を修飾する因子のあることが想像される．そこで私は患者株について継代培地の栄養条件を悪るくした場合の耐性度について検討を加えたが，単離集落を母体として継代培養した際には耐性度を低下することはなかつた．

さて一般に臨床上得られる耐性株とは耐性菌と感受性菌の混合したものであると考えられる．そこで私は in vitro の実験に際しても積極的に耐性菌と感受性菌とを混合し，その中に含まれる耐性菌の Population 構成を追求すれば臨床的にみられる INH 耐性低下の現象，さらに進んで耐性を低下せしめ得る可能性を引き出せるのではないかと考え，混合菌株を用いる実験方式，（私はこの方式を mixed population 方式と名付ける）を用い，INH 耐性低下現象を追求した．この方式によると mixed population の中 INH 耐性菌の比率は継代につれて次第に減少して行つた．しかし減少の度合は佐藤，稲垣の報告よりさらにゆるやかであつた．ところが栄養条件の悪い培地で継代すると速かに INH 耐性菌の Population の低下をきたすことがみられた．この特殊培地でみられる急激な耐性低下の原因の一つとして遺伝子の逆の自然的突然変異（Spontaneous back mutation）が考えられるので感受性菌より単離集落をとり出し，この増菌株を 1% KH_2PO_4 培地と栄養条件の悪い培地に同時に継代培養し，5代継代後の各々の INH 耐性菌出現率を検したが栄養条件の悪い培地継代後の INH 耐性菌出現率は 1% KH_2PO_4 培地継代のそれに比し，決して低率でなく，栄養条件の悪い培地の INH 耐性に対する back mutagenic effect は先づ考えられなかつた．次いで INH 耐性菌の特殊の栄養要求性からみて，かかる栄養条件の悪い培地での INH 耐性菌の viability の低下，さらに発育速度の遅延が考えられるので Viability の一つの Index[26] として湿菌量 1mg 当

りの生菌数を検したが，かかる栄養条件の悪い培地上で発育した INH 感受性菌，耐性菌の湿菌量 1mg 当りの生菌数は 2.05×10^6 と 2.30×10^6 で特に INH 耐性菌にのみ viability の低下はみられなかつた．

このように栄養条件の悪い培地での back mutation，ならびに viability の低下がみられないのに急激な耐性低下がみられたことは，継代中の INH 耐性菌の発育速度に培地因子が微妙に影響することに因るものと考えられるので，さらに培地因子を分析するためにグリセリンのみを除外した培地，ならびにグルタミン酸ナトリウムのみを除外した培地を作成し，1% KH_2PO_4 培地を対照として INH 完全耐性株と mixed population とを継代培養したが，INH 完全耐性株はどの培地でも耐性を低下せず，mixed population 方式によるとその中に含まれる INH 耐性菌の Population はグリセリン除外培地では低下が少なく，1% KH_2PO_4 培地とグルタミン酸ナトリウム除外培地で急激に低下した．特にグルタミン酸ナトリウム除外培地では低下が速かのように観察された．稲垣[27] は混合菌株の継代実験で培地に焦性ブドウ酸を添加した場合，耐性低下は起らないと述べている．この点私のグリセリン除外培地と同じような結果となるが，一般に焦性ブドウ酸は INH と結びついて阻止力の弱いヒドラゾーンを生ずると云われるので，混合菌株の継代培養後，耐性測定に際し菌に附着する焦性ブドウ酸も微妙に影響するのかも知れない．グルタミン酸ナトリウム除外培地で急激な耐性低下をみたことに就いては先述のごとく Spontaneous back mutation によるというよりは，INH 耐性菌が感受性菌に比しその発育にグルタミン酸をより多く要求しているものと考えられ，そのためにグルタミン酸ナトリウム除外培地で INH 耐性菌の発育速度が遅延したものと推定される．

INH 耐性菌の栄養要求性については Fisher[10][11] は彼の合成培地に増殖不能の INH 耐性菌がその培地に牛血清，あるいはアルブミンを添加することにより良く発育することを述べ，Hemin が INH 耐性菌の増殖抑制作用に拮抗すること，また Hemin は One step mutants の INH 耐性菌（17/cc 以上）の発育因子であることを確めている．すなわち INH は感受性菌の porphyllin 代謝，すなわち Hemin の生合成を阻害し，耐性菌は Hemin の生合成能を失つたために発育因子として Hemin を要求するとともに INH に対して耐性を示すものと想定している．Middlebrook & Cohn は INH 耐性菌は卵培地ではよく増殖するがオレイン酸アルブミン固型培地では増殖しないものが多いと述べ，さらに Cohn et al[13] は INH 耐性菌に栄養要求性のあまり厳重でない菌株と，厳重な菌株のあることを明かにし，後者では Mn イオンの存在下にはその増殖に無機鉄，Hemin，α-ケト酸，Catalase，あるいは血清アルブミンなどを必要とするとしている．又 Middlebrook et al[14] は耐性結核菌にはその増殖の開始に Biotin もしくは CO_2 を必要とする菌株や，Pyridoxine，酵母抽出物などによつてその増殖が促進される菌株のあることを報告している．さらに Barry et al は，INH 耐性菌は人血清添加培地ではすべての菌株が増殖しえたが，その中には Hemoglobin，Hemin，$NaHSO_3$ あるいは $FeCl_3$ などの添加培地では増殖しえない菌株もあり，これらの菌株の栄養要求性は菌株によつて質的，量的にまちまちであり，血清の増殖促進作用はその中に含まれている Hemin あるいは Pyruvate では説明できないとしている．Middlebrook et al[14] は更に，INH 耐性菌のうちには培地の N 源が Asparagine もしくはカゼイン水解物のようなアミノ酸の混合物であると，その増殖が抑制される菌株があることを実験している．Knox[16] もまた INH 耐性菌が Hemin あるいは Catalase を発育因子として要求するのは培地中の N 源が Asparagine である場合で，Asparagine を他の N 源でおきかえると INH 耐性菌はその増殖を Hemin に依存しなくなることを立証して，Hemin は INH 耐性菌の真の意味での発育因子ではないとしている．私のグルタミン酸ナトリウム除外培地では，その培地の組成からみて INH 耐性菌は N 源を卵白のカゼイン水解物のようなアミノ酸の混合物に依存する可能性が充分考えられる．しかしかかるグルタミン酸ナトリウム除外培地での INH 耐性菌のみの培養の発育は感受性菌のみの培養の発育に比し差をみいだすことができず，また INH 耐性菌のみをかかる培地に何代継代しても完全耐性を維持するばかりか死滅することはなかつた．従つて mixed Population における耐性低下の機転としてはかかる N 源の変換が INH 耐性菌の発育速度に微妙に影響していることが考えられる．このように mixed Population における INH 耐性菌は耐性低下を示すが，特にある培地ではそれが速く起り，ある培地では緩やかに起るということは臨床での INH 耐性低下の難易を一

面説明するばかりか，さらに進んで INH 耐性菌のみのグルタミン酸摂取をおさえる薬剤が出来るなら，積極的に臨床での INH 耐性を低下せしめ得る可能性を示唆するものと云えるであろう．

第4章 結 論

INH 耐性低下の機序を究明するために，試験管内において INH に完全耐性の単離集落を継代培養し，また mixed population 方式による継代実験を行ない，さらに栄養条件の悪い培地で継代培養を行ない Population の変動を検討し，耐性低下に及ぼす培地因子を追究した．その結果次のごとき知見を得た．

1) INH 10γ 耐性株は Clone として検討した場合は One step に得た菌株，増量的継代により得た菌株，ならびに患者より分離した菌株いづれも1% KH_2PO_4 培地では耐性低下はみられず安定した性質を持つているものと推定される．

2) 増量的継代法により得た INH 10γ 耐性株と患者より分離した INH 10γ 耐性株について栄養条件の悪い培地を作成し継代実験を行なつたが耐性低下はみられなかつた．

3) mixed population 方式によるとその中に含まれる INH 耐性菌の比率は1% KH_2PO_4 培地継代につれ次第に減少をきたした．

4) mixed population 中の INH 耐性菌の比率は栄養条件の悪い培地継代では1% KH_2PO_4 培地継代に比し急激に低下をきたした．しかしかかる栄養条件の悪い培地上での INH 耐性菌と感受性菌との Viability の差は明らかでなく，またかかる培地上での INH 耐性に対する mutagenic effect はみられなかつた．

5) 栄養条件の悪い培地上で急激な耐性低下をみたところから，さらに耐性低下の培地因子を確定するため，グリセリン除外培地とグルタミン酸ナトリウム除外培地を作成し，mixed population 方式による継代実験を行つたが，前者の培地では耐性低下が遅れるのに反し，後者の培地では速かに耐性低下がみられ，INH 耐性菌は感受性菌に比しグルタミン酸を特に要求しており，ためにかかる培地で発育速度が遅延したものと推定される．

擱筆するに臨み，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師平木潔教授，大藤真助教授に深甚なる謝意を表する．

（本論文の要旨は日本結核病学会中国四国第10回地方会，ならびに第11回地方会において発表した）

文 献

1) Petit, A.: Schweiz. Med. Wschr., 82, 1266, 1952.
2) Tempel, et al: Ann. Int. Med., 39, 61, 1953.
3) Pansy, et al: Am. Rev. Tuberc., 65, 761, 1952.
4) Szybalski et al: Am. Rev. Tuberc., 65, 768, 1952.
5) Barnett et al: Lancet, 314, 1953.
6) Fisher, M. W.: Am. Rev. Tuberc., 66, 626, 1952.
7) Lecocq, E.: Compt. rend. Soc. Biol., 147, 522, 1953.
8) Dissmann, E.: Naturwissenschaften, 41, 218, 1954.
9) Demerec, M.: J. Bact., 66, 63, 1948.
10) Fisher, M. W.: Am. Rev. Tuberc. 69, 467, 1954.
11) Fisher, M. W.: Am. Rev. Tuberc. 69, 797, 1954.
12) Middlebrook et al: Science, 118, 297, 1953.
13) Cohn et al: Am. Rev. Tuberc., 701, 641, 1953.
14) Middlebrook et al: Am. Rev. Tuberc., 70, 852, 1954.
15) Barry et al: Am. Rev. Tuberc., 71, 785, 1955.
16) Knox, R.: J. Gen. Microbiol., 12, 191, 1955.
17) 小酒井：診療の実際，204, 1953.
18) 中山：九大結研紀要，2, 1, 1955.
19) 佐藤：医学と生物学，31, 250, 1954.
20) 佐藤：結核，30, 119, 1955.
21) 堀 ：第33回日本結核病学会総会特別講演より引用．
22) 安淵ら：日結，14, 987, 1955.
23) 堀：結核，33, 増刊号，346, 1958.

24) 秋葉：結核，33，増刊号，347，1958.
25) 稲垣：胸部疾患，3，430，1957.
26) 東村：医学と生物学，52，1，1959.
27) 稲垣：胸部疾患，3，435，1957.
28) 小川：臨床病理，4，4，1956.

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

Part I
Study on Weakening of Resistance of Isoniazid-Resistant Tubercle Bacilli

By

Akira NAKATANI

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

In order to bring light to the mechanism of weakening of resistance to INH, the author cultured several generations of a perfect INH-resistant single colony of bacilli, conducted experiments on several generations of mixed population, further cultured generations of bacilli in a poorly fed culture medium and studied the change of population and thoroughly examined the factor in culture medium which has effects on the weakening of resistance. The results of the experiments observed were as follows:

1. No weakening of resistance could be observed in INH 10γ resistant strains obtained by one step, step by step cultured or by direct separation from patient if strains have been cultured in 1% KH_2PO_4 medium.

2. No weakening of resistance could be observed by testing generations of strains, some of which were obtained by step by step culture and some by means of separation from patient, in a poorly fed culture medium.

3. According to the method of mixed population, the ratio of INH resistant bacilli contained therein decreased as generation of bacilli cultured in a 1% KH_2PO_4 medium descends.

4. The ratio of INH resistant bacilli in mixed population cultured in a poorly fed medium rapidly decreased as generation descends compared to corresponding generation of bacilli cultured in 1% KH_2PO_4 medium. However, the difference in viability between INH resistant bacilli and INH receptive bacilli cultured in a poorly fed medium could not be observed clearly. Neither could any mutagenic effect on the INH resistance of bacilli on a poorly fed culture medium be found.

5. Upon finding the rapid weakening of the resistance of INH resistant bacilli cultured in a poorly medium, the author prepared a glycerine lacking medium and also a sodium glutamine lacking medium and conducted experiments on generations of bacilli cultured in such mediums to determine the factors in the medium which cause the weakening. The author found that in the former case (glycerine lacking medium) weakening is delayed whereas in the latter case weakening process is observed promptly. It is presumed that INH resistant bacilli requires glutamic acid far more than INH receptive bacilli and that for that reason the growth of bacilli in a sodium glutamine lacking medium is delayed.