

岡山医学会雑誌

第70巻 6号 (752号)

昭和33年6月30日発行

576.852.211.095.18 : 615.517-092.257

結核菌の薬剤耐性に関する研究

第1編

薬剤耐性結核菌の復帰に関する研究

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

専攻生 景山 統二郎

[昭和33年3月25日受稿]

目次

第1章 緒言

第2章

第1節 耐性菌の他種薬剤添加による感性化

第1項 実験方法及び実験材料

第2項 実験成績

第2節 感受性菌の濾液又は死菌体の添加による感性化

第1項 実験方法

第2項 実験成績

第1章 緒言

一つの化学療法剤が普及すると、菌がそれに耐性を獲得し次第にその薬剤の効果が薄れて来る。殊に結核の化学療法は使用期間が長く治療中に耐性を獲得する場合がかなりみられる。耐性獲得の機序については現在二つの説がある。即ち一つは「突然変異と撰択」説であり、他は「適応乃至誘導変異」説である。前者は細菌が分裂増殖する過程に於て、極く少数ではあるが、薬剤耐性の変異菌が突然変異によつて出現するというもので Demerec⁽¹⁾ によつてとなえられた。後者は薬剤の遺伝子に対する直接作用という意味で誘導変異説といわれ Dean and Hinshelwood 等⁽²⁾ によつて提唱された。現在この両説

第3節 培地条件の変換による耐性復帰の実験

第1項 実験方法

第2項 実験成績

第4節 マウスに於ける耐性復帰の実験

第1項 実験方法

第2項 実験成績

第3章 総括及び考按

第4章 結論

が対立しているが、いずれとも決め難い状態にある。

次に試験管内で作つた薬剤耐性菌を薬剤を含まない培地に継代すると、長く耐性を持続する場合と、速かに乃至徐々に耐性が低下し、或は感受性に復帰する場合とある。

では耐性復帰の機序は如何にして起るのであろうか。先づ感性菌と耐性菌の増殖速度の差による場合がある。即ち感性菌が耐性菌より増殖速度が大きい場合には感性菌が耐性菌を圧倒して置き変つてしまうわけである。次に遺伝子の逆の自然的突然変異 (spontaneous back mutation) による場合が考えられる。即ち耐性株の増殖中に突然変異により極く少数ではあるが感受性の個体を生ずることが考えられ

る。その他遺伝子の組交え (re combination) 及び所謂 Sensitizer (感作物質) による誘導変異による場合が実験されている。殊に菌体成分による感敏化は Voureka²⁵⁾ 以来いろいろ研究され、感受性株のデオキシリボ核酸 (D. N. A.) の役割が重視されている。

一般細菌の耐性復帰に関する実験は多数発表されている。結核菌の薬剤耐性復帰についても臨床的には甚だ多くの報告がみられるが実験的にはそれ程多くなく、しかもその間に意見の一致をみない点が多々あるように思われる。即ち実験的には S M 耐性の持続は安定したものとされているにかかわらず小川⁹⁾、築山¹¹⁾ 等は S M 耐性菌に他種抗結核剤を接触させることを試み、耐性が低下したとなし、他方君野⁵⁾、中院⁹⁾ は低下しないとしている。INAH の場合は一層複雑で他剤を接触しなくても試験管内で継代のうちに低下する場合があるという人²³⁾²⁴⁾ と、否定する人²⁰⁾²¹⁾ とがある。又耐性菌を接種した動物実験に於いても同様のことがみられる。そこで私はかかる点を今少しく追求したいと思ひ次の如き耐性復帰についての実験を行つたのでその成績を報告する。

第2章

第1節 耐性菌の他種薬剤添加継代による感敏化

第1項 実験方法及び実験材料

S M 100 γ /cc 以上耐性 H₃₇R_vR 株 (H₃₇R_vR-S M という) 及び INAH 10 γ /cc 以上耐性 H₃₇R_vR 株 (H₃₇R_vR-INAH という) を用いたが、いずれも当所継代のもので耐性度は使用にあたり 1% 小川培地 (薬剤加) で測定した。初代耐性菌を接種するときは 1% 薬剤加小川培地上に発育した上記菌株をとり秤量の上ガラス球入りコルベンで手振り法で菌液を作り、その 0.1 mg/0.1cc を S M 耐性株は Kirchner-Albumin 加液体培地に、INAH 耐性株は Kirchner-Serum (10%) 加液体培地に接種し、予めそれらの液体培地に他種抗結核剤、例えば S M 耐性株には INAH, PAS, Viomycin, Pyrazinamide 等を、INAH 耐性菌には SM, PAS, Viomycin, Pyrazinamide 等を夫々各別に Sublethal に添加しておき、この液体培地で薬剤に接触培養し、発育した菌を白金耳又はピベットで 2 代に継代すると共に薬剤を含有しない 1% 小川培地に還元培養した。添加薬剤は継代数をますにつれてその量を増量して行つた。

このようにして薬剤との接触継代すると共に各代毎に小川の培地に還元培養した菌について、その菌を秤量しガス玉入りコルベンで手振り法で菌液をつくり、滅菌蒸留水で 10 倍希釈により 10⁻¹mg より 10⁻⁵mg まで希釈し、薬剤加 1% 小川培地で耐性度を判定した。

判定は 3 週及び 4 週後に行い、小川の培地に発育した集落数を数えることが出来ないときは、肉眼的に小川培地斜面のほぼ全体、約 3/4, 1/2, 1/4 を発育した菌がおおつているにしたがつてそれぞれ卍, 卅, 卅, + と表現する。+ と卅の中間の発育を卍と表現する。

第2項 実験成績

表 1 の如く対照として H₃₇R_vR-S M に何も添加せず継代したものは耐性低下はなく、INAH を添加継代したものは 10 代 50 γ /cc まで添加したが殆んど低下はなく、PAS 添加の場合も 13 代 10 γ /cc まで継代したが低下はみられなかつた。

次に Viomycin を 15 代 200 γ /cc まで継代したが低下はなく、Pyrazinamide は 13 代 500 γ /cc まで添加継代したが耐性低下はなかつた。

表 1 H₃₇R_vR-S M を継代したものの耐性度：(Kirchner albumin 加培地で継代)

継代数	添加薬剤	菌量 (mg)	培地中の S M の濃度 (γ /cc)		
			100	10	0
1	なし (対照)	10-1	卍	卍	卍
		10-3	70	85	81
		10-5	1	2	3
5	なし (対照)	10-1	卍	卍	卍
		10-3	卍	卍	卍
		10-5	31	44	73
10	なし (対照)	10-1	卍	卍	卍
		10-3	卍	卍	卍
		10-5	+	+	+
14	なし (対照)	10-1	卍	卍	卍
		10-3	+	卍	+
		10-5	⊥	⊥	⊥
1	INAH 0.025 γ /cc	10-1	卍	卍	卍
		10-3	卍	卍	卍
		10-5	34	18	30
5	INAH 0.1 γ /cc	10-1	卍	卍	卍
		10-3	卍	卍	卍
		10-5	0	0	1

10	INAH 50 γ /cc	10-1	+	+	+
		10-3	+	+	+
		10-5	⊥	⊥	+
1	PAS 0.1 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	12	10	17
5	PAS 1.0 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	42	+
		10-5	20	36	18
10	PAS 10 γ /cc	10-1	卅	+	+
		10-3	15	⊥	⊥
		10-5	29	19	0
13	PAS10 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	⊥	⊥
		10-5	35	15	1
1	VM 0.5 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	48	43	40
		10-5	0	4	2
10	VM 100 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	+	+	+
15	VM 200 γ /cc	10-1	+	+	+
		10-3	⊥	⊥	⊥
		10-5	9	17	45
5	PZA 500 γ /cc	10-1	+	+	卅
		10-3	+	+	卅
		10-5	35	30	+
13	PZA 500 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	⊥	⊥	⊥
		10-5	25	20	4

註. 1%小川培地, VMは Viomycin, PZA は Pyrazinamide.

(これらの成績の各代毎の耐性度は省略する)

INAH 耐性菌の場合:

表2の如く, 対照として添加薬剤なく継代したも

表2 H₃₇R_vR-INAH を継代した場合の耐性度 (Kirchner-Serum 加培地で継代)

継代数	添加薬剤	菌量 (mg)	培地中の INAH の濃度 (γ /cc)		
			10	1	0
1	なし (対照)	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	0	+
		10-5	0	0	0

5	なし (対照)	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	+	+	+
10	なし (対照)	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	93	雑	72
1	VM 1 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	+
		10-5	15	25	11
5	VM 100 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	+	卅	卅
10	VM 100 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	卅	+
		10-5	+	卅	+
1	PZA 100 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	卅	+
		10-5	14	23	13
5	PZA 500 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	卅	卅
		10-5	+	+	+
10	PZA 500 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	+	+	+
1	PAS 0.1 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	25	32	29
5	PAS 1.0 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	+	+	+
10	PAS 10 γ /cc	10-1	+	+	卅
		10-3	⊥	7	0
		10-5	+	1	+
1	SM 0.1 γ /cc	10-1	+	卅	卅
		10-3	+	+	+
		10-5	0	3	2
5	SM 50 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅
		10-5	44	+	+
10	SM 500 γ /cc	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	卅	+
		10-5	37	30	26

註. 1%小川培地.

のでは耐性低下はなく、Viomycin を10代100 γ /ccまで継代したもの、Pyrazinamide を10代500 γ /ccまで添加したもの、PAS を10代10 γ /ccまで添加継代したもの、SM を10代500 γ /ccまで継代したものすべてに耐性低下がみられなかつた。

第2節 感受性菌の濾液又は死菌体の添加による感化

第1項 実験方法

耐性菌は上記の H₃₇RvR-SM の他、Step-method で得た鳥型 SM 1000 γ /cc 以上耐性竹尾株を使用。

感受性菌の培養濾液を取るため H₃₇Rv 原株、青山 B 株、Frankfurt 株、鳥型竹尾原株を Sauton 液体培地に三角コルベンで表面培養し（人型菌は4週間、鳥型菌は5~7日間）、Seitz の Filter で濾過し、残りの菌を加熱死菌とした。

これらの菌の SM、INAH、PAS に対する感受性は Sauton 液体培地で判定すると表3の如く感受性であつた。

ただ鳥型竹尾原株のみは SM にのみ感受性である。

表3 H₃₇Rv 原株、Frankfurt、青山 B、鳥型竹尾株の抗結核剤感受性：

菌株		薬剤濃度 γ /cc										
		0	0.001	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	100.0
INAH	H ₃₇ Rv 原株	卅	卅	卅	+	±	-	-	-	-	-	-
	Frankfurt	卅	卅	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-
	鳥型竹尾	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	-
SM	H ₃₇ Rv 原株	卅	卅	卅	卅	+	+	±	-	-	-	-
	Frankfurt	卅	卅	卅	卅	+	±	-	-	-	-	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	+	±	±	-	-	-	-
	鳥型竹尾	卅	卅	卅	+	+	+	±	-	-	-	-
PAS	H ₃₇ Rv 原株	卅	卅	卅	卅	+	+	雑	-	-	-	-
	Frankfurt	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	±	-	-	-
	青山 B	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	-
	鳥型竹尾	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

: Sauton 液体培地 - 発育を認めず
 ± 接種菌程度
 + 僅かに増加
 卅 菌量 0.1mg/0.1cc
 卅 菌膜形成
 卅 判定は4週間（人型）鳥型菌は1週間判定
 卅 著しく増加

第2項 実験成績

表4の如く SM 耐性鳥型竹尾株に鳥型竹尾原株の濾液を20%及び50%添加（6代及び5代）継代し

表4 SM 耐性鳥型竹尾株に濾液及び死菌体添加の場合：

継代数	添加物	菌量 (mg)	培地中の SM の濃度 γ /cc			
			1000	100	10	0
6	なし	10-1	卅	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅	卅
		10-5	3	2	2	9
6	鳥型竹尾原株濾液20%	10-1	卅	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅	卅
		10-5	7	13	20	40

5	鳥型竹尾原株濾液50%	10-1	卅	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅	卅
		10-5	12	12	9	8
6	鳥型竹尾原株死菌体	10-1	卅	卅	卅	卅
		10-3	卅	卅	卅	卅
		10-5	17	23	27	17

たが耐性低下はなかつた。又鳥型竹尾株の死菌を添加し6代継代したが耐性低下はなかつた。

次に H₃₇RvR-SM に H₃₇Rv 原株の濾液を20%加えた場合は表5の如く低下はなく、青山 B 株、Frankfurt 株の濾液を添加継代（3代）したが耐性低下はみられなかつた。H₃₇Rv 原株、青山 B 株、Frankfurt 株の死菌添加でも耐性低下はみられなかつた。

表5 H₃₇RvR-SM に濾液及び死菌体を添加した場合:

継代数	添加物	菌量	培地中のSMの濃度 γ/cc		
			100	10	0
3	H ₃₇ Rv原株 濾液20%	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	+	+
		10-5	11	16	10
3	H ₃₇ Rv原株 死菌体	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	+	+
		10-5	2	4	2
3	青山B株 濾液20%	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	+	+
		10-5	2	5	2
3	青山B株 死菌体	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	卅	卅
		10-5	9	13	16
3	Frankfurt 株濾液20%	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	+	+
		10-5	0	5	3
3	Frankfurt 株死菌体	10-1	卅	卅	卅
		10-3	+	+	+
		10-5	9	15	10

第3節 培地条件の変換による耐性復帰の実験

第1項 実験方法

1%小川培地を基礎とし、原液としてKH₂PO₄のみを蒸溜水にとかし、之を鶏卵液に混合し、Malachitgreenを加え中試験管に分注し85°C、50分間で凝固せしめた。又之にGlycerinのみを5%、10%、

15%の割に加えた培地をつくつた。又同様にしてGlutamin酸ソーダのみを3%、6%、10%の割に加えた培地をつくつた。即ち小川培地からGlycerinをぬいてGlutamin酸ソーダを加えたもの、Glutamin酸ソーダをぬいてGlycerinのみを加えたもの、Glutamin酸ソーダもGlycerinもぬいたものをつくつてみたわけである。その組成を表にすれば表6の如くである。これ等の培地にH₃₇Rv原株、H₃₇RvR-SM、H₃₇RvR-INAHの諸菌株の1%小川培地上に発育した菌の1mg/ccの菌液の0.1ccを接種培養した。表7の如く1%小川培地に比し発育はやや劣るが、Glycerinのみの培地では10%まで、Glutamin酸ソーダのみの培地では6%までは発育があり、KH₂PO₄のみの培地にも発育がみられた。

この成績から勘案してKH₂PO₄のみを含む培地(KH₂PO₄のみの培地という)、このKH₂PO₄にGlycerinのみ8%を含む培地(Glycerin培地とい

表7 各種変法培地に於ける各菌株の発育状態

培地名	菌株名		
	H ₃₇ Rv原株	H ₃₇ RvR-SM	H ₃₇ RvR-INAH
1%小川(対照)	卅	卅	卅
5% glycerin	卅	卅	卅
10% "	43	+	⊥
15% "	-	-	-
3% glutamin酸ソーダ	+	+	+
6% "	15	⊥	⊥
10% "	-	-	-
KH ₂ PO ₄ のみ	卅	卅	卅

表6 各種変法培地の組成

成分	1%小川	glycerin	glutamin酸ソーダ	KH ₂ PO ₄ のみ
KH ₂ PO ₄	1g(0.3%)	1g(0.3%)	1g(0.3%)	1g(0.3%)
Aq. dest.	100cc	100cc	100cc	100cc
卵液	200cc	200cc	200cc	200cc
glycerin	6cc (2%)	15cc, 30cc, 45cc (5%), (10%), (15%)		
glutamin酸ソーダ	1g (0.3%)		9g, 18g, 30g (3%), (6%), (10%)	
2% Malachitgreen	6cc (0.04%)	6cc (0.04%)	6cc (0.04%)	6cc (0.04%)

う), 又 Glutamin 酸ソーダ 6% を KH_2PO_4 に加えた培地 (Glutamin 酸ソーダ培地という) を作成した。この 3 種の培地に 1% 小川培地を対照として $\text{H}_{37}\text{RvR-SM}$ 及び $\text{H}_{37}\text{RvR-INAH}$ の耐性菌を培養継代し、之の菌を用いて菌液をつくり、1% 小川の培地で耐性度を測定し、継代による耐性の推移を検討した。

第 2 項 実験成績

$\text{H}_{37}\text{RvR-SM}$ をこれらの 1% 小川, Glycerin 培地, Glutamin 酸ソーダ培地, KH_2PO_4 のみの培地の 4 種類の培地に 5 代継代して、1% の小川の培地で耐性を測定したが表 8 の如く、どの培地に継代した場合も耐性低下はみられなかつた。同様に 8 代継代した場合にも、この場合は菌量 10^{-1}mg のみであるが、低下はみられなかつた (表 9)。

表 8 $\text{H}_{37}\text{RvR-SM}$ 株を各変法培地に 5 代継代した場合の耐性度

継代培地	菌量 (mg)	培地中 SM の濃度 (γ/cc)		
		100	10	0 (対照)
1% 小川培地	10-1	卍	卍	卍
	10-3	+	+	+
	10-5	14	9	13
glycerin 培地	10-1	卍	卍	卍
	10-3	+	+	+
	10-5	2	4	3
glutamin 酸ソーダ培地	10-1	卍	卍	卍
	10-3	+	+	+
	10-5	9	14	15
KH_2PO_4 のみの培地	10-1	卍	卍	卍
	10-3	卍	卍	卍
	10-5	39	36	1

表 9 $\text{H}_{37}\text{RvR-SM}$ 株を 8 代変法培地に継代した場合

継代培地	培地中の SM の濃度 (γ/cc)		
	100	10	0 (対照)
1% 小川培地	卍	卍	卍
glycerin 培地	卍	卍	卍
glutamin 酸ソーダ培地	卍	卍	卍
KH_2PO_4 のみの培地	卍	卍	卍

註. 菌量 $0.1\text{mg}/0.1\text{cc}$ 接種。

之に反し興味のあることには、 $\text{H}_{37}\text{RvR-INAH}$ の場合には 1 代ではこの 4 種培地では耐性低下はみられなかつたが、5 代継代後耐性を測定した場合は表 10 の如く、 KH_2PO_4 のみの培地及び Glutamin 酸

表 10 $\text{H}_{37}\text{RvR-INAH}$ 株を 5 代変法培地に継代した場合の耐性度

継代培地	菌量 (mg)	培地中の INAH の濃度 (γ/cc)		
		10	1	0 (対照)
1% 小川培地	10-1	卍	卍	卍
	10-3	+	+	+
	10-5	21	25	23
glycerin 培地	10-1	卍	卍	卍
	10-3	46	1	1
	10-5	8	13	7
glutamin 酸ソーダ培地	10-1	+	卍	卍
	10-3	8	+	+
	10-5	-	8	10
KH_2PO_4 のみの培地	10-1	+	卍	卍
	10-3	36	卍	卍
	10-5	-	44	1

ソーダ培地に継代したものでは僅かに耐性低下の傾向があり、1% 小川培地及び Glycerin 培地継代では耐性低下はみられなかつた。8 代継代後に於いても表 11 の如く、この場合も菌量 10^{-1}mg のみで測定

表 11 $\text{H}_{37}\text{RvR-INAH}$ を 8 代変法培地に継代した場合

継代培地	培地中の INAH の濃度 (γ/cc)		
	10	1	0 (対照)
1% 小川培地	卍	卍	卍
glycerin 培地	卍	卍	卍
glutamin 酸ソーダ培地	+	卍	卍
KH_2PO_4 のみの培地	24	卍	卍

註. 菌量 $0.1\text{mg}/0.1\text{cc}$

したが、5 代と同様に KH_2PO_4 のみの培地及び Glutamin 酸ソーダ培地継代では耐性低下がみられた。

以上の如く INAH 耐性菌では継代により耐性低下の傾向を認めたので、培地の条件を変えることにより高耐性菌が selection されるために耐性低下が起つた様にみえるのではないかと考え、 H_{37}Rv 原株、

H₃₇RvR-SM 及び H₃₇RvR-INAH の菌種をこれらの培地に 10⁻¹ mg より 10⁻⁴ mg まで培養してみた処、表12の如く 1%小川の培地と余りコロニー数に差が

表12 各種培地に於ける耐性菌の発育状態

各種培地名 菌株名	菌量 (mg)	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴			
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
H ₃₇ Rv 原株	1%小川培地	+++	++	+	+
	glycerin 培地	+++	++	+	127
	glutamin 酸ソーダ培地	+++	++	+	143
	KH ₂ PO ₄ のみの培地	+++	+++	+	179
H ₃₇ RvR-SM	1%小川培地	+++	++	+	41
	glycerin 培地	+++	++	+	35
	glutamin 酸ソーダ培地	+++	++	+	22
	KH ₂ PO ₄ のみの培地	+++	++	+	48
H ₃₇ RvR-INAH	1%小川培地	+++	++	+	4
	glycerin 培地	+++	++	16	1
	glutamin 酸ソーダ培地	+++	++	37	6
	KH ₂ PO ₄ のみの培地	+++	++	82	9

みられなかつた。ただ 1%小川培地のコロニーに比し、KH₂PO₄ のみの培地等変法培地に発育したコロニーはやや小なるコロニーの発育がみられた。即ち耐性菌の selection によつて耐性低下がみられたのではないということが一応は説明しようと思われ

第4節 マウスに於ける耐性復帰の実験

第1項 実験方法

市販の雑種 15 g 前後のマウスに、三角コルペンで手振り法で作成した上記の H₃₇RvR-SM 株及び H₃₇RvR-INAH 株の 1.0mg/0.1cc の菌液を尾静脈に注入せしめ、接種翌日より PAS4.0mg, Viomycin 0.4mg, Pyrazinamide 0.8mg, INAH 0.02mg, SM 0.5mg を 0.1cc の滅菌蒸留水に含ませ、各薬剤単独にマウスの大腿皮下に注射を行つた。

PAS, Viomycin, Pyrazinamide は隔日, SM, INAH は毎日注射を行つた。マウスが実験途中で死亡した場合、又は 1~2ヶ月間 (一部は長期のものもある) 注射後殺し、その肺を取り出しガラスホモゲナイザーで磨碎し、4% NaOH 液で約 10 倍に希釈し、3%小川薬剤加培地で耐性を測り、その分離した菌を再びマウスに初回と同様の方法で接種し

て継代し、注射を続けて行い感性化をはかつた。

第2項 実験成績

H₃₇RvR-SM 株を接種したものでは、1代では対照として放置せるものは耐性低下はなく、PAS を注射したものでも低下はなく、Viomycin, Pyrazinamide 注射でも殆んど低下はなく、INAH を注射のものでは表13の如く 5 匹中 2 匹に低下がみられた。

表13 H₃₇RvR-SM をマウスに接種した場合 (1代)

動物番号	注射薬剤	注射日数又は生存数	培地中の SM の濃度 γ /cc			
			1	10	100	0 (対照)
301	なし (対照)	32	+++	+++	+++	+++
303		15	+++	+++	+++	+++
314		87	+++	+++	+++	+++
315		104	+++	+++	+++	+++
304		48	69	77	68	80
305	PAS 4 mg	16	+++	+++	+++	+++
308		17	++	+	++	++
313		66	+++	+++	+++	+++
306	VM 0.4 mg	16	+++	+++	+++	+++
310		18	+++	0	+++	+++
311		18	++	+	++	++
312		26	+++	14	++	++
302		PZA 0.8 mg	15	+++	+++	+++
307	17		+++	+	+++	+++
309	18		+++	+++	+++	+++
401	INAH 0.02 mg	21	++	++	++	+
403		42	+	+	0	+
405		42	+	0	0	+
408		76	+++	+++	+++	+++
409		76	++	+	++	++

註. 3%小川培地。

この菌を継代した 2 代に於いても、対照は低下はなく、PAS, Viomycin, Pyrazinamide を注射したのものには低下はみられず INAH を注射したものは 1 代に低下したものを継代したもの他、新に 1 匹 No. 409 に低下あり 3 代でも PAS, Viomycin, Pyrazinamide 注射のものは低下はなく、INAH 注射ではあらたに低下のものはみられなかつた (表14 及び15)。

H₃₇Rv R-INAH 株を接種したものでは、表16にみられる様に 1 代では対照として放置せるものは低下は殆んどなく、PAS, Viomycin, Pyrazinamide

表14 H₃₇RvR-SM をマウスに接種した場合
(2代)

動物 番号	注射薬剤	注射日 数又は 生存 日数	培地中のSMの濃度 γ /cc			
			1	10	100	0
301A	なし (対照)	114	雑	+	+	雑
301B		140	+	+	+	+
303		10	+	+	+	+
314		53	+	+	+	+
315		77	+	+	+	+
304	PAS 4mg	30	0	+	+	雑
305		10	+	+	+	+
308		22	+	+	+	+
313		17	+	+	+	+
306	VM 0.4mg	15	雑	雑	+	雑
310		85	+	+	+	+
311		24	+	+	雑	+
312		111	+	+	+	+
302	PZA 0.8mg	20	+	+	+	+
307		17	+	+	+	+
309		10	+	+	+	+
401A	INAH 0.02mg	81	+	0	+	+
401B		85	+	+	+	+
401C		85	+	+	+	+
403		52	0	+	+	+
405		55	+	0	0	+
406		25	15	6	45	+
408		27	+	+	+	+
409		28	9	0	0	+

表15 H₃₇RvR-SM をマウスに接種した場合
(3代)

動物 番号	注射薬剤	注射日 数又は 生存 日数	培地中のSMの濃度(γ /cc)			
			1	10	100	0
303	なし (対照)	42	+	+	+	+
314		56	+	+	+	+
315		57	雑	+	+	+
305		70	+	+	+	+
308		PAS 40mg	85	+	+	+
313	70		+	+	+	+
311	75		+	+	+	+
310	VM 0.4mg	70	+	+	+	+
312		85	+	+	+	+

307	PZA 0.8mg	56	+	+	+	+
309		57	+	+	+	+
401A	INAH 0.02mg	29	6	3	4	5
401B		29	+	20	+	+
403		32	0	3	0	1
405		31	0	1	0	1
406A		47	+	+	+	+
406B		21	+	+	+	+
409A		33	+	0	0	+
409B		39	+	0	0	+

表16 H₃₇RvR-INAH をマウスに接種した場合
(1代)

動物 番号	注射薬剤	注射日数 又は生存 日数	培地中のINAH の濃度 γ /cc		
			1	10	0
351	なし (対照)	10	+	+	+
352		10	31	+	+
353		10	+	+	+
365		296	+	+	+
354	PAS 4.0mg	12	25	43	30
356		24	+	+	+
359		261	+	+	+
364		265	+	+	+
358	VM 0.4mg	154	+	+	+
361		265	+	+	+
362		265	+	+	+
369		296	+	+	+
355	PZA 0.8mg	22	+	+	+
357		21	雑	+	+
360		263	+	+	+
363		265	+	+	+
402	SM 0.5mg	21	+	4	+
404		42	+	0	+
407		42	+	+	+
410		76	+	+	+
411		91	+	0	+
413		102	+	+	+

を注射したものでも低下はみられなかつた。SMを注射したものに於いては6匹中5匹に低下がみられた。この菌を継代した2代に於いても対照の放置群及びPAS, Viomycin, Pyrazinamideを注射したものには耐性低下はみられず、3代に於いても同様であつた(表17及び18)。

表17 H₃₇RvR-INAH をマウスに接種した場合
(2代)

動物 番号	注射薬剤	注射日数 又は生存 日数	培地中の INAH の濃度 γ /cc		
			1	10	0
351	なし (対 照)	53	卅	卅	卅
352		16	卅	卅	卅
353		100	卅	卅	卅
354	PAS 4.0mg	12	+	+	+
356		46	卅	卅	卅
359		30	卅	卅	卅
358	VM 0.4mg	30	卅	卅	卅
361		46	卅	卅	卅
362		30	+	卅	+
366		30	卅	卅	卅
355	PZA 0.8mg	32	卅	+	+
357		30	卅	卅	卅
360		46	+	+	+
402 A	SM 0.5mg	81	+	+	卅
402 B		81	0	0	0
404		55	雑	+	卅
407		55	+	14	+
410		27	+	+	+
411 A		30	+	+	+
411 B		30	卅	+	卅
413		31	+	+	+

第3章 総括及び考察

先づ私の実験では試験管内に於いて SM 耐性 H₃₇Rv 株及び INAH 耐性 H₃₇Rv 株を Kirchner 液体培地で他種抗結核剤の添加継代による感化をはかつたのであるが、そのどちらの株をも試験管内に於いて継代しても感化することは出来ず、耐性の低下はみられなかつたわけである。

耐性菌が復帰をする場合その菌株の耐性度及び感受性菌の混在率(不完全耐性か完全耐性か)によりその耐性復帰に難易のあるのは当然である。栗村⁷⁾は SM 100 mcg/cc 不完全耐性 H₃₇Rv 株を使用し、TB₁, INAH 加小川培地に継代し、対照より他種薬剤加培地のものに復帰の傾向をみとめ、INAH 耐性 H₃₇Rv 株は 125 mcg/cc 完全耐性で、SM, PAS, TB₁ 加培地継代のものに復帰の傾向をみている。築山¹¹⁾は SM 10 γ /cc 以上耐性人 F 型株を Kirchner 液体培地に VK₃, PAS, TB₁, INAH の他多数の物質を添加して継代し、VK₃, PAS 添加では耐性低下

表18 H₃₇RvR-INAH をマウスに接種した場合
(3代)

動物 番号	注射薬剤	注射日数 又は生存 日数	培地中の INAH の濃度 γ /cc		
			1	10	0
352	なし	42	+	+	+
353		40	+	+	+
354	PAS 4.0mg	83	+	+	+
356		46	卅	卅	卅
359		46	卅	卅	卅
358	VM 0.4mg	29	+	+	+
361		46	卅	卅	+
362		30	卅	卅	卅
355	PZA 0.8mg	32	雑	卅	卅
357		30	卅	卅	卅
360		30	+	+	+
402 A	SM 0.5mg	29	卅	+	卅
404		30	卅	+	卅
407 A		29	+	卅	卅
407 B		29	12	14	30
411 A		31	10	11	+
413 B		32	卅	+	卅

あるも、INAH 添加では耐性低下はないとしている。しかし小川⁹⁾は SM 耐性青山 B 株で INAH 添加により耐性低下をみとめている。一方君野⁵⁾は *M. tuberculosis avium* (獣調株)を用いて SM 耐性菌に INAH, PAS, TB₁ を添加し処理しても感化しないといい、中院⁹⁾も PAS は SM 及び INAH の耐性株の耐性除去には積極的に作用しないといっている。

所で INAH 耐性菌に他剤を接触する場合には、INAH 耐性菌の安定性そのものがすでに問題になつてくる。何となれば一般に INAH 耐性菌は SM 耐性菌より不安定であるといわれているからである。INAH 耐性菌の試験管内に於ける耐性の安定性については Pansy²³⁾, Sybalski²⁴⁾ は試験管内継代中に感性に復帰するとし、Fisher²⁰⁾, Lecocq²¹⁾ は低下しないという。佐藤¹²⁾ は試験管内で分離した耐性 H₃₇Rv 変異株は INAH の有無にかかわらず 5 代継代ではその耐性 Population には変化がなく、完全に INAH 耐性を保持しており、患者より分離した菌では INAH なしの培地に継代するとその Population に大きな変動のある例もあるという。Barnett¹⁶⁾ も患者より分離した菌で耐性低下をみている。

中山¹⁵⁾は 100 γ INAH 耐性菌を薬剤なしの岡、片倉培地に継代し 3 代までは不変、5 代より復帰をみている。

君野⁶⁾は INAH 耐性菌を SM 等で接触処理しても感感化しないといっているが、栗村は先述の様に INAH 耐性菌も SM, PAS, TB₁の添加継代により復帰の傾向をみとめている。

私は Kirchner 液体培地で他種薬剤と接触し、小川培地に一旦還元培養をして、1 号小川培地で耐性を測定しているのであつて、実験方法も少し異なるのであり耐性度も SM 耐性株は 100 γ /cc 以上であり、INAH 耐性菌は 10 γ /cc 前後であり Population は均一性のものである。私の実験では SM 耐性菌も INAH 耐性菌も他種抗結核剤に対する感受性は原株のそれとほぼ等しいと考えられ、又同一薬剤の高耐性菌も低耐性菌も他種薬剤に対して同様の感受性と考えられ、従つて高耐性菌のみが他の薬剤に感受性が高く、そのために死滅減少し耐性が低下するとは考えられない。SM 耐性菌は耐性度を 100 γ /cc までしか測定していないので、かりに 100 γ /cc 以上の耐性であり、その 100 γ /cc 以上の高耐性では耐性が復帰しているかもしれぬという事も考えられるが、INAH 耐性 H₃₇Rv 株の場合は 10 γ /cc 前後の耐性であり 50 γ /cc では殆んど感受性であり、この場合も他種薬剤接触により耐性低下をみないのであるから、SM 耐性の場合も否定できる様に思われる。勿論これらの実験は Population としての耐性度を測定しているものであり、個々の菌についての検討も必要であろう。

又耐性菌の出現の方法、即ち One-step selection で得た菌と、恒量的継代法又は増量的継代法で得た菌とでは耐性菌の由来によつて、耐性復帰に差が生ずることが考えられる。この点については、すでに牛場⁴⁾は一足跳びに得た菌を SM 不関性 (indifferent) の菌とし、普通の SM 耐性株と遺伝学的にことなるので区別することを提唱し、その菌の菌力に於いても、不関性株と耐性株とでは差違をみとめている。宮本¹⁴⁾は三者 (SM, PAS, INAH) 混合 Kirchner 培地に 14 代継代した菌より、SM 10 γ /cc 加小川培地にて、One-step mutant として SM 10 γ /cc 耐性菌を取り出し、その mutant の 1/3 (30 コロニーの内 9 コロニー) に分離後 2 代目すでに SM 耐性の復帰をみたというが、この場合は One-step mutant の SM 耐性菌のみの場合であり、復帰をしたといつてもなお検討を要する点がある様に思

われる。

東村¹⁰⁾は PAS 耐性菌についてその性質をしらべ、PAS 耐性菌はその性質が本来不均一であり、100 γ /cc 耐性菌の中にも 10 γ /cc にもはえぬ子孫を生ずる頻度がかかなりあり、又反面その低下した菌でもコロニーを at random にえらぶと、PAS 1 γ /cc にも発育を阻止されるはずのものでも、PAS 100 γ /cc に発育することがあるので、一旦耐性低下したものでも PAS 高耐性を mutate しやすい遺伝的性質をもつているという。かかる事が INAH 耐性の場合にも考えられるならば、他種抗結核剤添加により低下しているかもしれぬ菌が 1 代の還元培養の後、INAH 10 γ /cc 加培地に接種した場合 10 γ /cc 耐性に mutate しているのかもしれない。しかしかかることの真相はなお判断としない。

次に感受性菌の培養濾液の添加培養は所謂 Sensitizer による感感化をはかつたものであるが、一般細菌の Penicillin, SM 耐性に関しては多くの報告がみられるが、抗酸性菌では杉山¹³⁾らが鳥型菌で SM 感性菌より抽出した核酸の影響を調べ耐性復帰をみていないようであり、築山¹¹⁾は人型菌なりに SM に対し高い感受性をもつ非病原性の抗酸性菌の死菌体を SM 耐性-F 株に添加継代し若干の SM 耐性の緩解をみとめ、死菌体による Sensitizer の役割を推定している。

私の場合は SM 耐性の鳥型竹尾株に感受性原 (鳥型竹尾) 株の濾液及び死菌体を添加継代したが耐性低下はみられず、又 SM 耐性 H₃₇Rv 株に H₃₇Rv 原株、青山 B 株、Frankfurt 株 (いずれも SM, INAH, PAS に感受性) の濾液又は死菌体を添加継代したが耐性低下はみられなかつた。これは添加する死菌体の菌株の違い及び継代数によつて差を生じたものと思われる。INAH 耐性の場合には、INAH 耐性菌が Sauton 培地に発育がわるいので感感化の実験は行はなかつた。

次に保存条件を変えることにより耐性の推移を観察したものでは Bellamy¹⁷⁾は試験管内で Penicillin 耐性としたブドウ球菌を或る特殊の培地に継代した処、耐性を失つたと報告し、君野⁶⁾は SM 耐性の M. tuberculosis avium 株を Sauton 液体培地及び固形培地に培養し、SM の耐性の変動を観察し、SM を含有しない Sauton 固形培地に継代すると復帰の方向に向い、SM なしの Sauton 液体培地に継代すると徐々に耐性が上昇していくという。

私は SM 耐性菌及び INAH 耐性菌を、1 号小川

培地を原法とする変法鶏卵固形培地をつくり、之に継代し耐性の推移を観察したが、SM 耐性菌では興味ある知見はなく、耐性の低下はみられなかつた。INAH 耐性では KH_2PO_4 のみの培地及び Glutamin 酸ソーダ培地に継代すると耐性低下の傾向がみられ、Glycerin 培地及び 1% 小川培地に継代した場合には低下の傾向はみられなかつた。この原因の一つとして栄養条件の悪い変法培地のため高耐性菌が Selection されて耐性低下がみられることが考えられるので前記の様に、H₃₇Rv 原株、H₃₇RvR-SM、H₃₇RvR-INAH の諸菌株を 10⁻¹mg, 10⁻²mg, 10⁻³mg, 10⁻⁴mg に稀釈し 1% 小川培地を対照として Glycerin 培地、Glutamin 酸ソーダ培地、 KH_2PO_4 のみの各変法培地に培養してみたところ 10⁻⁴mg に於いても表 12 にみる如く、対照 1% 小川培地に比してコロニーの大きさには差があり小さなものの発育が多かつたのであるが、生育したコロニー数そのものには比較差がみられないという結果を得たので、一応この Selection によつて耐性低下がみられたのではないかということ是否定し得る様に思われる。従つて培地の条件により Backmutation を促す何かの因子が生じたことが推定せられるわけであり、誠に興味深く思われる。

動物に於ける実験では岡田²⁾は患者より分離した SM 耐性菌をモルモットに接種し、O-Aminophenol 或いは PAS を投与し SM 耐性は若干減弱の傾向ありといひ、築山¹¹⁾は白鼠及びモルモットに SM 耐性 F 株を接種し、INAH, VK₃ で治療したものは僅かながらの耐性低下をみとめ、高橋⁸⁾は SM 耐性菌をマウスに静注し、INAH の注射を行うも SM の耐性低下はないという。Meissner²²⁾は INAH 耐性菌をモルモットに接種し、1 回の動物通過では INAH 耐性菌が感性菌に変らぬといつている。

私の実験に於いてはマウスに菌を接種する場合にはかなり接種菌量を多くしたために、菌を培地に分離する際に SM 耐性菌も INAH 耐性菌もよく発育しており、特に PAS, Viomycin, Pyrazinamide 等注射の場合は、SM 耐性菌接種でも INAH 耐性菌接種でも対照 (放置) 群と同様多量の菌を培地に分離している。そして SM 耐性菌接種マウスに対しては INAH 注射が、INAH 耐性菌接種マウスに対しては SM 注射が耐性復帰を来たさしめた。尤も PAS, Viomycin 等は隔日、SM, INAH は毎日注射をしているのであるから、PAS, Viomycin 等も、もつとも注射量をふやせば或は耐性復帰をするかもしれ

ない。表 13 にみる様に No. 403, No. 405 の如く INAH 注射をして低下しているものでは、No. 408, No. 409 等に比し分離菌が対照でも少く、かかる菌の少ないものが耐性復帰をしやすいという事が考えられ、接種菌量とマウスの個体差、注射薬剤の量も関係があると思われるので、菌の接種量等を変えてみると更に種々の成績が出るかもしれない。又 PAS, Viomycin, Pyrazinamide 等の注射のものは、薬剤の効果が少く生体の菌が多いので、この事も耐性復帰をしない一つの因子となるのかもしれない。同様の事は INAH 耐性菌を接種した場合にも考察されるところである。しかしながら表 14 の如く、2 代に於いては No. 403, 405, 409 の如く対照ではかなり菌が分離されながら SM 耐性低下をみているものもあるのであるから、一般に生体内の菌が少くなつたもののみが耐性低下しているとは限らぬ様であり、同様の事が表 17 の如く INAH 耐性菌を接種した場合にもみられるところである。

前述の如く試験管内に於いては、SM 耐性菌も INAH 耐性菌も他の抗結核剤に接触継代するも耐性の低下はみられないのに、動物体内に於いては、この様に或る薬剤の注射により耐性低下をみたのは何故であろうか。臨床的な耐性推移の観察に於いては、教室大藤¹⁾によると、SM 耐性は無処置よりも異種薬剤投与により耐性下例が増加し、特に INAH 投与はその傾向が強いといふ。この成績は私のマウスの実験成績とよく一致するところであり、この両者から考えるならば結局 in vitro と in vivo とで相違を生ずるのは、当然菌の増殖その他の条件にかなりの差異がある事に基くとも考えられるが、又一面生体内に於いては耐性菌の他剤に対する感受性が高まつて来るためではないかと推定せられる。

第 4 章 結 論

耐性結核菌の復帰の機作を究明するため他種抗結核剤の添加継代、感受性菌の濾液及び死菌体の添加、継代培地の変換等により耐性復帰の実験を試験管内で行い、又マウスで他種抗結核剤の注射を行つて復帰の実験を試み次の如き興味ある知見を得た。

1) SM 耐性 H₃₇Rv 株及び INAH 耐性 H₃₇Rv 株を使用し、Kirchner albumin 又は serum 加液体培地に他の抗結核剤、即ち SM 耐性菌には PAS, INAH, Viomycin, Pyrazinamide を、INAH 耐性菌には PAS, SM, Viomycin, Pyrazinamide 等の抗結核剤を添加継代し、小川培地に還元培養し、こ

の菌を使用し 10^{-4} mg より 10^{-5} mg までの菌液をつくり、1%薬剤加小川培地で耐性測定をしたが、耐性低下はみられなかった。

2) SM 耐性 H₃₇R_v 株及び SM 耐性鳥型竹尾株に、前者には H₃₇R_v 原株、青山 B 株、Frankfurt 株の培養濾液及び死菌体を、後者には鳥型竹尾原株の濾液及び死菌体を夫々添加継代したが、どちらにも耐性低下はみられなかった。

3) SM 及び INAH 耐性菌を 1%小川培地の変法培地に継代し、耐性の推移を観察したところ、SM 耐性菌はいずれの培地でも耐性低下はみられなかった。INAH 耐性菌では 5 代頃より、KH₂PO₄ のみの培地及び Glutamin 酸ソーダ培地継代のものは耐性低下がみられたが、1%小川及び Glycerin 培地継代では耐性低下はみられなかった。この耐性低下の培地と対照 1%小川培地とではコロニー数の差が

みられないので、この耐性低下の機転としては変法培地中の因子による誘導逆変異の可能性が推定せられる。

4) SM 及び INAH 耐性 H₃₇R_v 株をマウスに接種し、PAS, Viomycin, Pyrazinamide, INAH, SM 等を注射したところ、SM 耐性菌接種のものには INAH 注射のものに、INAH 耐性菌接種のものには SM 注射のものに、耐性低下がみられるものがあつた。即ち生体内では耐性菌の他剤に対する感受性の高揚が推定された。

筆を擱くにあたり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、並びに国立岡山療養所長市村丑雄博士に深く感謝いたします。

(本論文の要旨は第31回日本結核病学会総会、第32回同総会に報告した)

参 考 文 献

- 1) 大藤真：日本結核病学会第8回中四国地方会総会特別講演より引用。
- 2) 岡田景俊：十全医学雑誌，55，645，1953。
- 3) 小川辰次：結核，28，568～569，1953。
- 4) 牛場大藏他：日本細菌学雑誌，9，349～353，1954。
- 5) 君野徹三：Th J. of Antibiotics, Ser. B., 7, 122～125, 1954。
- 6) 君野徹三他：The J. of Antibiotics, Ser. B., 7, 58～61, 1954。
- 7) 栗村武敏：日本化学療法学会雑誌，4，352～359，1956。
- 8) 高橋金弥他：結核，30増刊号，209，1955。
- 9) 中院孝円他：結核，28，696～697，1953。
- 10) 東村道雄：医学と生物学，38～1，11～14，1956。
- 11) 築山明：医学研究，25，178～190，1955。
- 12) 佐藤直行：医学と生物学，31，250～254，1954。
- 13) 杉山正雄他：結核，28，566，1953。
- 14) 宮本泰：結核，32，81～87，1957。
- 15) 中山英一：九大結研紀要，2，1～21，1955。
- 16) Barnett, M.: Lancet, (7), 314～320, 1953。
- 17) Bellamy, W. D., J. W. Klimek: J. Bact., 55, 153, 1948。
- 18) Dean, A. C., C. Hinshelwood: Adaptation in microorganisms, Davis and Gale 編，21, Cambridge, 1953。
- 19) Demerec, M.: J. Bact., 56, 63, 1948。
- 20) Fisher, M. W.: Am. Rev. Tuberc., 66, 626～628, 1952。
- 21) Lecocq N. de E. C. R.: Soc. Biol., 147, 522～525, 1953。
- 22) Meissner, G.: Beitr. Klin. Tub., 113, 621～674, 1954。
- 23) Pansy, F., H. Stander, R. Donowick: Am. Rev. Tuberc., 65, 761～764, 1952。
- 24) Sybalski, W. et al.: Am. Rev. Tuberc., 65, 768～770, 1952。
- 25) Voureka, A.: Lancet, i. 62, 1948。

Studies on the Drug-Resistance of Tubercle-Bacilli

Part 1. On the Reversibility of Drug Resistance in Tubercle Bacilli

By

Tojiro Kageyama

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

With a view to elucidate the mechanism of reversibility of resistant tubercle bacilli, the author has performed *in vitro* experiments of resistance reversibility by observing changes occurring in successive culture of resistant bacilli together with different antituberculous agents, the filtrate of sensitive strain or dead bacilli, by changing ingredients of successive media; and also by injecting different kinds of antituberculous agents into mice the reversibility *in vivo* has been studied. As the result the following interesting data were obtained.

1) In the successive cultures of SM-resistant H₃₇Rv-strain and INAH-resistant-H₃₇Rv-strain in the medium of Kirchner's albumin or serum liquid medium, each loaded with PAS, Viomycin, Pyrazinamide, INAH or SM, no reversibility of resistance could be recognized.

2) In the successive cultures of SM-resistant-H₃₇Rv-strain and SM-resistant avian type Takeo strain in the medium loaded with the filtrate of sensitive parent strain or dead bacilli, no reversibility of resistance could be observed.

3) In the cases of successive cultures of SM-resistant-H₃₇Rv-strain and INAH-resistant-H₃₇Rv-strain in modified media of 1% Ogawa's medium, SM-resistant bacilli revealed no resistance-reversibility in any of these media. INAH-resistant strain successively cultured in the medium containing solely KH₂PO₄ or only sodium glutamate, they began to show a diminution in resistance about the fifth generation. As for the mechanism of this diminution in resistance it is possible to assume an induced backmutation in modified media.

4) In the experiments with mice, the diminution in resistance has been observed in the cases inoculated with SM-resistant strain and injected with INAH as well as in the cases inoculated with INAH resistant strain and injected with SM. It is assumed that the susceptibility of resistant bacilli to other agents is elevated *in vivo*.
