

結核化学療法の基礎的研究

第 6 3 報

各種抗菌性物質に就いての結核菌の耐性化実験*

金沢大学医学部薬理学教室（主任：岡本肇教授）

北 川 秀

（受付：昭和31年4月10日）

現下結核化学療法に於ける薬剤耐性の問題は
実地臨床上のみならず亦疫学的にも重大となつ
て来た事は周知の如くである。そして之に対す
る対策として、

- 1) Streptomycin, Para-aminosalicylic acid,
Isonicotinic acid hydrazide, Pyrazinamide
等既知抗結核剤の併用による耐性化の阻止、
- 2) 耐性から感性への復帰の方途如何、
- 3) 新抗結核剤——就中耐性化の起り難い物質
——を用意する事、

など諸多の方面から考査の歩が進められている
という現状である。

本論文は此の内特に第3の事項に関連せしめ
るの意図を以つて、その結核菌に対する抗菌性
が特異的であると否とに関せず、凡そ結核菌に
対し強力なる菌発育阻止作用を発揮する物質数
種を選び、之に対する結核菌の耐性化能如何の
関係を追究して得た成績を記載したものであ
る。

I 耐性化試験

被検物質並びに実験方法

A) 被 検 物 質

- (1) 3-Aminophenoxazone-(2)¹⁾⁻⁶⁾
- (2) 3-Diazophenoxazone-(2)⁵⁾
- (3) 3-Acethylamino-
phenoxazone-(2)⁵⁾
- (4) 3-Chloroacethylamino-
phenoxazone-(2)⁵⁾
- (5) 3-(N,N-Diethyl-β-alanyl-
amino)-phenoxazone-(2)⁶⁾
- (6) 3-(p-Acethylaminobenzyl-
deneamino)-phenoxazone-
(2)⁵⁾

夫々の 10
mg宛を秤
取し、之に
Dioxane**
10mlを加
えて100°C,
20分の加
熱消毒を
施した1:
1,000溶液
を原液と
す。

- (7) o-Aminophenol ⁷⁾⁻¹³⁾
- (8) Amethyst violet ^{3),14),15),16),17)}
- (9) 8-Hydroxyquinoline ⁷⁾
- (10) Acriflavine ^{7),18)}
- (11) Isonicotinic acid hydrazide ¹⁹⁾⁻²⁴⁾

夫々の10mg
宛を秤取し、
之に7.0%
Alcohol**
10mlを加え
て室温に4
時間置いた
1:1,000溶
液を原液と
す。

- (12) Dihydrostreptomycin ²⁵⁾⁻³⁰⁾...DIHYDRO-
STREPTOMYCIN SULFATE CRYSTALLINE
"SHIONOGI"

14.2mg (Dihydrostreptomycinとして10mg)を
秤取し、之を10mlの蒸留水に溶解、100°C、10分
の処置を施したもの(1:1,000溶液)を原液とす。

*本研究の遂行には文部省科学研究費の補助を受けた。

**10%血清加 Kirchner 培地に於ける Dioxane 及び Alcohol の結核菌に対する菌発育阻止限界濃度は夫々 5% (1:20) 及び 4% (1:25) であつた。

尙 Dihydrostreptomycin, Isonicotinic acid hydrazide, 及び Acriflavine の様に結核菌の耐性化を来たさしめたものでは、必要に応じて更に濃原液を調製した。

B) 実験方法

1) 供試結核菌：

原株として専ら当教室保存の人型結核菌“河上株”を使用す。

本菌を10%家兎血清加 Kirchner 培地 2ml に移植, 3~4 週間培養したものから松田(知夫)^{11), 12)} の記載に準じて稀釈結核菌浮游液を調製す。

2) メヂウム：

10%家兎血清(非働化)加 Kirchner 培地 (pH = 6.7~6.8)

3) 耐性化試験術式：

型の如く先づ所要数の滅菌試験管を架列し, 10%血清加 Kirchner 培地を第1管には 3.6ml を, 第2管以下には 2.0ml 宛を分注す。

次で第1管に被検物質の原液 0.4ml を加えよく混和した後, 此の 2.0ml を第2管に移しよく混和し, 以下順次各管に 2.0ml 宛を送つて被検物質の倍下稀釈液列を作る。最後の1管は被検物質を含まない対照管とす。こゝに於いて全管に対し一齊に結核菌原株の稀釈浮游液 1 滴宛を滴下せしめた後, 密封の上 37°C の孵卵器中に納め, 培養 1 週, 2 週 及び 3 週毎に菌発育の有無強弱如何を觀察

し, その成績を次の如くに記載す。

- 一：管底に全く菌聚落の発生を認め得ないもの (完全発育阻止)。
- 十：管底に明らかに菌聚落を認めるもの。
- 卅：菌発育が相当顕著なもの。
- 卍：菌発育の程度が対照の 3 週間培養のものと同等である場合。

而して培養 3 週後の成績に於いて菌発育阻止限界濃度に最も近接し, 而も菌発育の程度が卅程度を示した試験管を選出し, これから調製した稀釈菌浮游液を以つて前記と同様の方式によつて当該被検物質を以つてする第 2 回目の抗菌試験を行う。斯くて第 3 回, 第 4 回……と同様方式の継代培養を 10 回迄続行し, 此の間に結核菌の当該抗菌物質に対する感受性 (Sensitivity) に変化が招来される事なきや否やを追究した。

処で, 12 種の被検物質の内 Dihydrostreptomycin (DHSM), Isonicotinic acid hydrazide (INAH) 及び Acriflavine の 3 者では, 菌の耐性化が起つたのであるが, 此等の菌に就いては其の耐性化の恒常性如何を確めるべく, 夫々を正常培地に復帰継代せしめてから抗菌試験を行い, 夫々に対応する抗菌物質 (即ち DHSM, INAH 或は Acriflavine) に対する耐性度に異変がないかを吟味する実験もも行った。

実験成績

第 1 表は被検物質 12 に就いて人型結核菌“河上株”を対象として行つた耐性化実験の成績を総括的に展示したものであるが, 之を一目して,

A) o-Aminophenol* とその酸化成績体の一つである 3-Aminophenoxazone-(2) 並びにこの酸化成績体から誘導された 3-Diazophenoxazone-(2), 3-Acethylaminophenoxazone-(2), 3-Chloroacethylaminophenoxazone-(2), 3-(N,N-Diethyl-β-alanyl amino)-phenoxazone-(2), 3-(p-Acethylaminobenzylidene amino)-phenoxazone-(2)

更に Amethyst violet と 8-Hydroxyquinoline の 9 物質にあつては夫々の結核菌に対する抗菌力に於いては強弱の差異はあつても, 継代培養 10 代に及んでおりながら結核菌のこれ等抗菌物質に対する感受性には些の変異 (増強或は減弱) も起らず, 依然として当初のまゝ, 即ち

- | 抗菌物質 | 菌発育阻止限界濃度 |
|-----------------------------|-----------------------|
| 1) o-Aminophenol…… | 1 : 640,000~1,280,000 |
| 2) 3-Aminophenoxazone-(2)…… | |

*結核菌が o-Aminophenol 及び 3-(N,N-Diethylglycyl amino)-phenoxazone-(2) に対して耐性化しない事は既に松田によつて実証されている。11), 12)

- 1 : 1,280,000~2,560,000
- 3) 3-Diazophenoxazone-(2).....
1 : 640,000~1,280,000
- 4) 3-Acethylaminophenoxazone-(2).....
1 : 1,280,000~2,560,000
- 5) 3-Chloroacethylaminopheno-
xazone-(2).....
1 : 320,000~640,000
- 6) 3-(N,N-Diethyl-β-alanyl-amino)
phenoxazone-(2).....
1 : 320,000~640,000
- 7) 3-(p-Acethylaminobenzylideneamino)-
phenoxazone-(2).....
1 : 40,000~80,000
- 8) Amethyst violet.....
1 : 1,280,000~2,560,000
- 9) 8-Hydroxyquinoline.....
1 : 640,000~1,280,000

である、然し

B) DHSM, INAH 及び Acriflavine の3物質
にあつては、何れもその耐性化実験の成績は、
前記 A) の場合に於けるそれと大いに趣の異
なるものがあつて、継代培養を重ねる毎に結核
菌の之等抗菌物質に対する感受性の低下が起
つている、

事が注目されよう。

今その代表的実験例を示せば次の如くであ
る。

第2表は 3-Aminophenoxazone-(2) を以つ
ての成績である。即ちこゝでは結核菌を始めて
3-Aminophenoxazone-(2) に露呈せしめた
第1回の抗菌試験では培養3週目に於いて 3-
Aminophenoxazone-(2) の 1 : 1,280,000 まで
結核菌の発育が起らず、1 : 5,120,000 で卅程
度の発育が起つている。而してこの培養をもと
として第2回目の抗菌試験を行つたものでは菌
発育阻止限界濃度は 1 : 1,280,000 で、1 : 2,560,
000 では卅程度の発育が起つている。この様に
して第3→4→5→6→7→8→9→10 と継代培養を
続行すること10代に至つても菌発育阻止限界濃
度は依然として 1 : 1,280,000 にとどまり、全実

験経過を通じ結核菌の本物質に対する感受性に
鈍化が起つたという様な徴は些も認められな
い。

而して第3表及び4表は夫々 Amethyst
violet 及び 8-Hydroxyquinoline に於ける実
験成績であるが、この両場合に於いても菌の感
受性は終始同じく何等低下していない(菌発育
阻止限界濃度は終始一定であり、前者にあつては
1 : 1,280,000、後者にあつては 1 : 640,000)。

処で、第5表は DHSM に於ける成績である
が、継代培養第2代から第3代に移る時に菌発
育阻止限界濃度が 1 : 320,000 から 1 : 10,000 (即
ち菌の当初の DHSM に対する感受性の 1/64)
への低下が起つている。而も以後継代培養を重
ねる毎に感受性低下の度を増し、第8代に於て
1 : 625 液に於ても猶菌発育が起る様になつて
いる。

又、第6表の INAH に於ける実験では継代
培養2代で既に菌の INAH に対する感受性の
顕著な低下が起り、以後継代培養を重ねる毎に
低下の度を増している。しかしこの場合は、
DHSM の場合に於けると異り、第4~6代目
に INAH に対する感受性が 1 : 10,000 ~ 1 : 5,
000 までとなり、以後この状態を10代まで保持
している。

他方、Acriflavine を以つての実験では第7表
に示す様に継代培養6代までは階段的に感受性
の低下 (1 : 320,000 → 1 : 20,000) があるが、
以後は大体この状態を保持して10代に及んでお
り、この点 INAH に於ける実験成績に類似し
ている。

以上の様に DHSM, INAH 及び Acriflavine で
は結核菌の耐性化が起るという成績が得られた
のであるが、此等の耐性菌の継代培養10代目の
ものを普通の Kirchner 培地に転培を重ねて 7
ヶ月後に抗菌試験を行つたところ、第5, 6 及
び7表に示した様に夫々の菌の耐性度に異変が
なく耐性化の度が恒定したものであるという結
果が得られた。

猶本項の実験で 3-Aminophenoxazone-(2)

と 3-Acethylaminophenoxazone-(2) との抗菌力が大体同一であり、3-Chloroacethylaminophenoxazone-(2) 及び 3-Diazophenoxazone-(2), 3-(N,N-Diethyl-β-alanyl amino)-phenoxazone-(2) では効力やゝ劣り、3-(p-Acethylaminobenzylideneamino)-ph-

enoxazone-(2) では著しく微弱であるという成績は 3-Aminophenoxazone-(2) の NH₂-基に対し合成的操作を施す場合、その側鎖の種類如何が抗菌性に影響する事を示すものであつて、此は亦化学構造と抗菌作用との関係から留意に値する処といえよう。

II 交叉試験

前項の耐性化試験で結核菌が DHSM, INAH の外に Acriflavine に対しても耐性となるという結果が得られたので、茲に此等耐性菌の諸他

抗菌物質に対する感受性如何、即ち換言すれば交叉耐性の有無如何に就いての検討に移つた。

実験方法

1) 耐性菌株:

- i) Dihydrostreptomycin-耐性河上株
- ii) Isonicotinic acid hydrazide-耐性河上株
- iii) Acriflavine-耐性河上株

何れも前項の第10代継代培養の菌より夫々正常の10%血清加 Kirchner 培地に移植し、37°Cで3週間培養したものを使用する。

2) 供試抗菌物質:

- a) o-Aminophenol*
- b) 3-Aminophenoxazone-(2)

c) Amethyst violet

d) 8-Hydroxyquinoline

e) Dihydrostreptomycin

f) Isonicotinic acid hydrazide

g) Acriflavine

3) 実験術式:

10% 家兔血清加 Kirchner 培地を「メヂウム」とする抗菌試験法に準じ、各耐性菌株に就いて、上記7抗菌物質を以つての比較抗菌力試験を行う。

実験成績

第8表は Dihydrostreptomycin-耐性河上株に於ける成績である。即ち本耐性株は Dihydrostreptomycin の 1:625~1,250 液でも尙發育するという程の鈍感さであるに対し、o-Aminophenol, 3-Aminophenoxazone-(2), Amethyst violet, 8-Hydroxyquinoline, Isonicotinic acid hydrazide 及び Acriflavine に対しては感性母菌株に於けると同程度に感性(夫々の菌發育阻止限界濃度は 1:1,280,000, 1:1,280,000, 1:1,280,000, 1:640,000, 1:640,000 及び 1:320,000) である事を見る。

而して第9表及び第10表は夫々 Isonicotinic

acid hydrazide-耐性河上株及び Acriflavine-耐性河上株に於ける成績であつて、こゝでは

- a) Isonicotinic acid hydrazide-耐性株は Isonicotinic acid hydrazide のみに鈍感であり、爾他の6物質には高度感性である事、及び
- b) Acriflavine-耐性株は Acriflavine のみに鈍感であり、爾他の6物質には高度感性である事、

が注目されよう。

今此等の成績を総括展示すると第11表の如くなるのであるが、兎に角、本項の実験では結核菌の DHSM, INAH 及び Acriflavine に対す

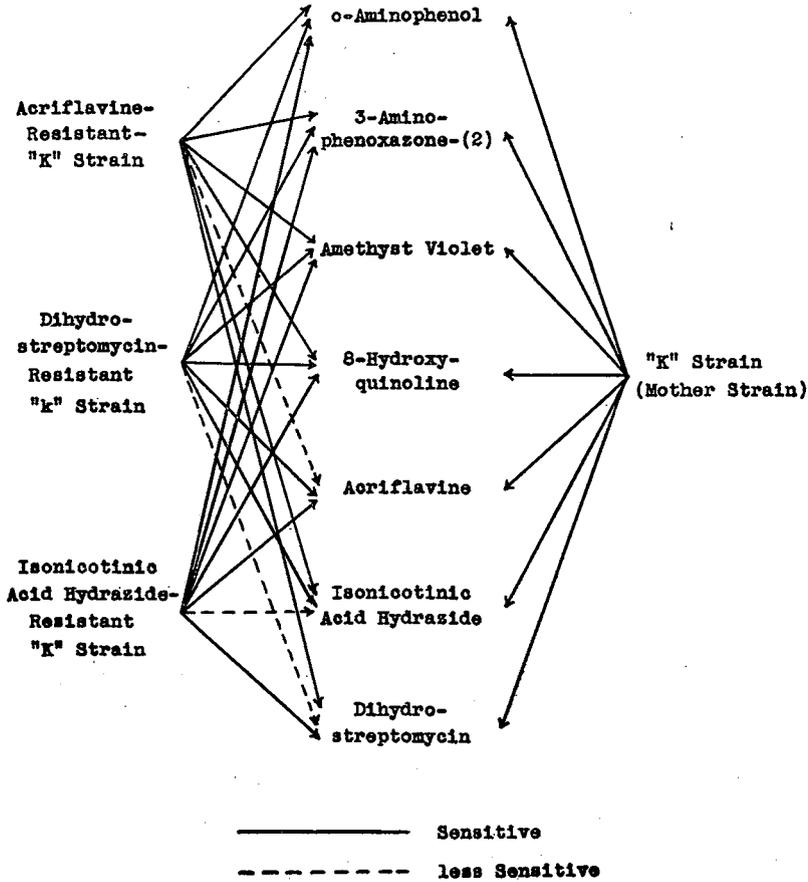
* 岡田¹³⁾は DHSM 治療患者の喀痰から分離した DHSM-耐性結核菌に就いて、o-Aminophenol が有効である事を試験管内抗菌試験並に実験的結核海狸に於ける治療実験で証明している。

る耐性化は夫々特異的であつて、交叉耐性がな いう結果が得られた訳である。

x x x x x

Table 11

Showing the summarized data in cross-resistance experiments



処で今以上の諸実験成績に対し、

- 1) Acriflavine^{7),18)}, 8-Hydroxyquinoline⁷⁾ 及び Amethyst violet¹⁷⁾ の3物質にあつては、此等は何れも結核菌のみならず、溶血性連鎖状球菌、黄色葡萄状球菌、肺炎双球菌等に対しても強力菌発育阻止的である、
- 2) DHSM^{25),26),27),28)} は結核菌以外に大腸菌、変形菌、インフルエンザ菌、百日咳菌、肺炎桿菌、淋菌、野兔病菌、緑膿菌、ペスト菌、黄色葡萄状球菌、溶血性連鎖状球菌等にも有効である。然し

- 3) 3-Aminophenoazone-(2) は結核菌¹⁹⁾ と百日咳菌⁴⁾ に対して強力抗菌性であるが、黄色葡萄状球菌、炭疽菌、大腸菌、志賀菌、チフス菌、コレラ菌、緑膿菌、溶血性連鎖状球菌、肺炎双球菌、チフテリア菌、脳脊髄膜炎菌等には無力⁴⁾ である、
- 4) o-Aminophenol^{7),10)} 及び INAH^{19),21)} は、結核菌のみに特異的に作用するが、溶血性連鎖状球菌、大腸菌、チフス菌、志賀菌、チフテリア菌、肺炎双球菌等には極めて微力である、という事実と相照合考察するならば、茲に結

核菌に対し特異的抗菌力を発揮し而も菌の耐性化が起らない物質は *o*-Aminophenol (或は百日咳菌の場合を除けば 3-Aminophenoxazone-(2)) のみであるという事となる訳である (第12表参照)。

即ち 結核菌が *o*-Aminophenol に対し特異

的に敏感であり、而も耐性化しない事は結核化学療法に於ける耐性菌問題に関連せしめても、亦結核化学療法に於いては多種抗結核剤の保有が要望 (Multiple Drug Recommendation) されている現状に鑑みても、甚だ重要視すべき処といえようか。

Table 12
Antibacterial substances in relation to their biological activity against *Myco. tuberculosis*

Antibacterial substance	Specific activity against tubercle bacilli	Possibility of tubercle bacilli to develop drug-fastness
<i>o</i> -Aminophenol	+	-
3-Aminophenoxazone-(2)	+ (-)	-
Amethyst violet	-	-
8-Hydroxyquinoline	-	-
Dihydrostreptomycin	-	+
Isonicotinic acid hydrazide	+	+
Acriflavine	-	+

結 語

本研究では *o*-Aminophenol とその酸化成績体の一つである 3-Aminophenoxazone-(2) 並びにこの酸化成績体から誘導された 3-Diazophenoxazone-(2), 3-Acethylaminophenoxazone-(2), 3-Chloroacethylaminophenoxazone-(2), 3-(*N,N*-Diethyl- β -alanyl-amino)-phenoxazone-(2), 3-(*p*-Acethylaminobenzylideneamino)-phenoxazone-(2) の5物質, 更に Amethyst violet, 8-Hydroxyquinoline, Acriflavine, Dihydrostreptomycin 及び Isonicotinic acid hydrazide 等各種系統に属する抗菌性物質12を選び、此等物質に対する人型結核菌の耐性化能如何を試験管内耐性化試験法に準じて追究した。其の主な知見を摘記せば次の様である:

1) *o*-Aminophenol, 3-Aminophenoxazone-(2), 3-Diazophenoxazone-(2), 3-Acethylaminophenoxazone-(2), 3-Chloroacethyl-

aminophenoxazone-(2), 3-(*N,N*-Diethyl- β -alanyl-amino)-phenoxazone-(2), 3-(*p*-Acethylaminobenzylideneamino)-phenoxazone-(2), Amethyst violet 及び 8-Hydroxyquinoline の何れに対しても結核菌の耐性化が全然起らなかった。

2) Dihydrostreptomycin 及び Isonicotinic acid hydrazide に対して結核菌は容易に耐性化したが、他方 Acriflavine に対しても亦結核菌の耐性化が起つた。

3) 斯くして得られた Dihydrostreptomycin-耐性菌株, Isonicotinic acid hydrazide-耐性菌株並びに Acriflavine-耐性菌株に就いて

a) 耐性株は何れも、之を正常培地に転培しても、耐性度の低下 (即ち感性への復帰) が起らず、夫等の耐性度が恒定したものであり、而も Dihydrostreptomycin, Isonicotinic acid hydrazide 及び Acriflavine に対

し夫々耐性化した菌の間には交叉耐性がない事、及び

- b) o-Aminophenol, 3-Aminophenoxazone-(2), 8-Hydroxyquinoline 及び Amethyst violet は Dihydrostreptomycin-, Isonicotinic acid hydrazide- 及び Acriflavine-耐性菌の何れに対しても強力抗菌性

であり、其の間に些も交叉耐性の存在がない事、

を確かめた。

- 4) 尙 o-Aminophenol (及び 3-Aminophenoxazone-(2)) にあつては、結核菌の耐性化が起らず、而もその抗結核菌性が特異的である点に就いて注記した。

文

- 1) 松田研吉 : 金大結研年報, 3, 1, 1945. 2) 岡本鑿, 他 : 金大結研年報, 3, 251, 1945. 3) 岡見富雄 : 金大結研年報, 5, 79, 1947. 4) 湯浅俊男 : 金大結研年報, 11 (下), 265, 1953. 5) Hirata, R. : Japan. J. Tuberc., 2, 249, 1954. 6) Yoshimusa, M., et al. : Japan. J. Tuberc., 2, 192, 1954. 7) 岡本鑿, 松田研吉 : 金大結研年報, 2, 93, 1944. 8) Okamoto, H. : Ann. Rep. Tbc. Kanazawa, Part I, 4, (Appendix), 1946 ; Part II, 6, 183, 1948. 9) Okamoto, H. : Japan. Med. J., 1, 422, 1948. 10) 吉村政弘 : 金大結研年報, 8 (上), 107, 1949. 11) 松田知夫 : 金大結研年報, 10 (下), 61, 1952. 12) Matsuda, T. : Japan. J. Tuberc., 2, 187, 1954. 13) 岡田景俊 : 金大結研年報, 13 (中), 37, 1955. 14) Hesse, E., Meissner, G. und Quast, G. : Arch. exp. Path. Pharmacol., 135, 82, 1928. 15) Meissner, G. : Centralbl. Bacteriol., Orig. 110, 172, 1929. 16) 竹谷幸太郎 : 金沢大学十全会雑誌, 46, 2240, 2301, 1941. 17) 吉村政弘 : 金大結研年報, 7 (下), 67, 1949. 18) Browning, C. H. and Gulbran-

献

- sen, R. : Proc. Royal Soc., Ser. B, 90, 136, 1918. 19) King, M. B., et al. : Lancet, 263, 854, 1952. 20) Steenken, W. Jr. and Woilinsky, E. : Am. Rev. Tuberc., 65, 365, 1952. 21) Pansy, F., Stander, H. and Donovan, R. : Am. Rev. Tuberc., 65, 761, 1952. 22) Buck, M. and Schnitzer, R. J. : Am. Rev. Tuberc., 65, 759, 1952. 23) 堂野前維摩郷, 他 : 最新医学, 7 (6), 121, 1952. 24) 日比野進, 他 : 日本臨床結核, 12, 96, 1953. 25) Bartz, Q. R., et al. : J. Am. Chem. Soc., 68, 2163, 1946. 26) Schatz, A., Bugie, E. and Waksman, S. A. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 55, 66, 1944. 27) Waksman, S. A. and Schatz, A. : J. Am. Pharm. Assoc., 34, 273, 1945. 28) 上田英雄 : ペニシリンとストレプトマイシンの臨床, 137, 1950. (協同医書出版社) 29) Williston, E. H. and Youmans, G. P. : Am. Rev. Tuberc., 55, 536, 1947. 30) Emmart, E. W., et al. : Am. Rev. Tuberc., 59, 438, 1949.

Table 1
Summarized data of experiments of repeated exposure of
Myco. tuberculosis to various antibacterial substances

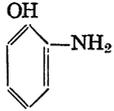
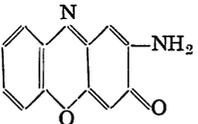
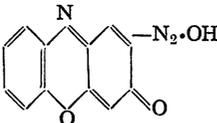
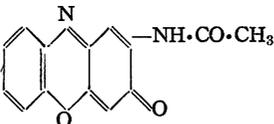
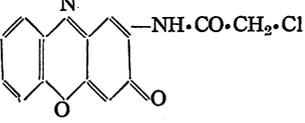
No.	Substance	Formula	Generations										Develop- ment of drug- fastness
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	o-Aminophenol		1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 640,000 ~1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 640,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	[-]
2	3-Aminophenoxazone-(2)		1 : 1,280,000 ~2,560,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 2,560,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000 ~2,560,000	1 : 1,280,000 ~2,560,000	1 : 1,280,000	[-]
8	3-Aminophenoxazone-(2) derivative 3-Diazo-phenoxazone-(2)		1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 1,280,000	1 : 640,000	1 : 640,000 ~1,280,000	1 : 640,000	[-]
4	3-Acethylamino- phenoxazone-(2)		1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 2,560,000	1 : 1,280,000	1 : 2,560,000	1 : 1,280,000	[-]
5	3-Chloroacethylamino- phenoxazone-(2)		1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 320,000	1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 320,000	1 : 640,000	1 : 640,000	1 : 320,000 ~640,000	[-]

Table 2

Tests for sensitivity of *Myc. tuberculosis* ("Kawakami" -strain)
following exposure to 3-aminophenoxazone-(2) *in Vitro*

Number of Generations	I			II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
	1	2	3									1	2	3
Age of Culture in Weeks														
Dilution of Substance														
1 : 10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 80,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 160,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 320,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 640,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 1,280,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 2,560,000	-	-	±	##	##	+	-	++	++	±	±	+	+	++
1 : 5,120,000	+	++	##	##	##	##	++	##	##	##	##	++	++	##
1 : 10,240,000	++	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	++	##	##
Control (without Substance)	++	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	++	##	##

Medium : Kirchner's nutrient fluid containing 10% rabbit's serum (pH6. 8)
Results of one- and two-week incubations were omitted in columns II—IX.

Table 3

Experiment with amethyst violet

Number of Generations	I			II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
	1	2	3									1	2	3
Age of culture in Weeks														
Dilution of Substance														
1 : 10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 80,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 160,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 320,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 640,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 1,280,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 2,560,000	-	+	+	±	+	±	±	##	+	-	++	±	+	++
1 : 5,120,000	+	++	##	##	##	##	##	##	##	+	##	##	##	##
1 : 10,240,000	+	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	+	##	##
1 : 20,480,000	++	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	+	##	##
Control (without Substance)	++	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	++	##	##

Table 4
Experiment with 8-hydroxyquinoline

Number of Generations	I			II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			
	1	2	3									1	2	3	
Age of Culture in Weeks															
Dilution of Substance															
1 : 10,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 20,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 40,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 80,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 160,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 320,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 640,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 1,280,000	-	+	+		+	+	+		+	+	+		+	+	+
1 : 2,560,000	+	+	+		+	+	+		+	+	+		+	+	+
1 : 5,120,000	+	+	+		+	+	+		+	+	+		+	+	+
1 : 10,240,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Control (without Substance)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			

Table 5
Experiment with dihydrostreptomycin

Number of Generations	I			II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			
	1	2	3									1	2	3	
Age of Culture in Weeks															
Dilution of Substance															
1 : 625	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 1,250	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 2,500	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 5,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 10,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 20,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 40,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 80,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 160,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 320,000	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
1 : 640,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
1 : 1,280,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
1 : 2,560,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
1 : 5,120,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
1 : 10,240,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Control (without Substance)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			

The organism was inoculated in 2ml of ordinary 10% Serum-Kirchner's medium and cultured for 1 month at 37°C. Thus, the transfer of organism in ordinary medium was repeated 7 times.

Table 6
Experiment with isonicotinic acid hydrazide

Number of Generations	I			II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
	1	2	3									1	2	3
Age of Culture in Weeks				3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	3
Dilution of Substance				3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	3
1 : 2,500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 5,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 40,000	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 80,000	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 160,000	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 320,000	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 640,000	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 1,280,000	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 2,560,000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 5,120,000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 10,240,000	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (without Substance)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

The organism was inoculated in 2ml of ordinary 10% Serum-Kirchner's medium and cultured for 1 month at 37°C. Thus, the transfer of organism in ordinary medium was repeated 7 times.

Table 7
Experiment with acriflavine

Number of Generations	I			II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
	1	2	3									1	2	3
Age of Culture in Weeks				3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	3
Dilution of Substance				3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	3
1 : 10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 80,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 160,000	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 320,000	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 640,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 1,280,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 2,560,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 5,120,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 : 10,240,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (without Substance)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

The organism was inoculated in 2ml of ordinary 10% Serum-Kirchner's medium and cultured for 1 month at 37°C. Thus, the transfer of organism in ordinary medium was repeated 7 times.

Table 8

Cross-resistance experiments with dihydrostreptomycin-resistant strain of *Myc. tuberculosis*

Antibacterial substance	3-Aminophenoxazone-(2)	8-Hydroxyquinoline	Amethyst violet	O-Aminophenol	Isonicotinic acid hydrazide	Acriflavine	Dihydrostreptomycin
Age of culture in weeks	3	3	3	3	3	3	3
Dilution of substance	3	3	3	3	3	3	3
1 : 625	—	—	—	—	—	—	+
1 : 1,250	—	—	—	—	—	—	+
1 : 2,500	—	—	—	—	—	—	+
1 : 5,000	—	—	—	—	—	—	+
1 : 10,000	—	—	—	—	—	—	+
1 : 20,000	—	—	—	—	—	—	+
1 : 40,000	—	—	—	—	—	—	+
1 : 80,000	—	—	—	—	—	—	+
1 : 160,000	—	—	—	—	—	—	+
1 : 320,000	—	—	—	—	—	—	+
1 : 640,000	—	—	—	—	—	+	+
1 : 1,280,000	—	+	—	—	+	+	+
1 : 2,560,000	+	+	+	+	+	+	+
1 : 5,120,000	+	+	+	+	+	+	+
1 : 10,240,000	+	+	+	+	+	+	+
Control (without substance)	+	+	+	+	+	+	+
Minimum growth-inhibitory concentration	1 : 1,280,000 ~2,560,000	1 : 640,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 640,000	1 : 320,000	1 : 313 ~625

Table 9

Cross-resistance experiments with isonicotinic
acid hydrazide-resistant strain of
Myco. tuberculosis

Antibacterial substance	3-Aminophenoxazone-(2)	8-Hydroxyquinoline	Amethyst violet	o-Aminophenol	Dihydrostreptomycin	Acriflavine	Isonicotinic acid hydrazide
Age of culture in weeks	3	3	3	3	3	3	3
Dilution of substance	3	3	3	3	3	3	3
1 : 5,000							
1 : 10,000							
1 : 20,000							≡
1 : 40,000							≡
1 : 80,000							≡
1 : 160,000							≡
1 : 320,000							≡
1 : 640,000						≡	≡
1 : 1,280,000		≡			+	≡	≡
1 : 2,560,000		≡	+		+	≡	≡
1 : 5,120,000	≡	≡	≡	+	≡	≡	≡
1 : 10,240,000	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
Control (without substance)	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
Minimum growth-inhibitory concentration	1 : 2,560,000	1 : 640,000	1 : 1,280,000	1 : 2,560,000	1 : 640,000	1 : 320,000 640,000	1 : 10,000

Table 10

Cross-resistance experiments with
acriflavine-resistant strain of
Myco. tuberculosis

Antibacterial substance	3-Aminophenoxazone-(2)	8-Hydroxyquinoline	Amethyst violet	o-Aminophenol	Dihydrostreptomycin	Isonicotinic acid hydrazide	Acridiflavine
Age of culture in weeks	3	3	3	3	3	3	3
Dilution of substance	3	3	3	3	3	3	3
1 : 10,000	—	—	—	—	—	—	—
1 : 20,000	—	—	—	—	—	—	—
1 : 40,000	—	—	—	—	—	—	+
1 : 80,000	—	—	—	—	—	—	≡
1 : 160,000	—	—	—	—	—	—	≡
1 : 320,000	—	—	—	—	—	—	≡
1 : 640,000	—	—	—	—	—	—	≡
1 : 1,280,000	—	≡	+	—	≡	—	≡
1 : 2,560,000	+	≡	+	≡	≡	+	≡
1 : 5,120,000	≡	≡	≡	≡	≡	+	≡
1 : 10,240,000	≡	≡	≡	≡	≡	+	≡
Control (without substance)	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
Minimum growth-inhibitory concentration	1 : 1,280,000	1 : 640,000	1 : 1,280,000	1 : 1,280,000	1 : 640,000	1 : 1,280,000	1 : 20,000