

第 52 回 総 会 特 別 講 演

III. 結核化学療法剤の作用機序

今 野 淳

東北大学抗酸菌病研究所内科

受付 昭和 52 年 9 月 24 日

The 52nd Annual Meeting Special Lecture

III. MODE OF ACTION OF ANTITUBERCULOSIS DRUGS
ON TUBERCLE BACILLI

—Electron Microscopic Study and Biosynthetic Study—

Kiyoshi KONNO*, Masakichi MOTOMIYA, Kotaro OIZUMI and Fumio ARIJI

(Received for publication September 24, 1977)

Mode of action of antituberculosis drugs was studied by electron microscopy and biochemical methods.

1) Fine structure of tubercle bacilli treated with kanamycin revealed disappearance of normal structure of ribosome and aggregation of the cytoplasm. By biochemical study, it was observed that kanamycin inhibits polypeptide synthesis, followed by the break down of polysomes and detachment of m-RNA.

2) Fine structure of tubercle bacilli treated with rifampicin revealed marked changes in the cytoplasm such as loss of compact structure of ribosomes. Destruction of mesosomes and condensation of nucleoid were also observed. The cytoplasmic membrane and the cell wall were well preserved. By biochemical study, purified DNA-dependent RNA polymerase prepared from BCG, inhibited 70% of activity of RNA polymerase at a concentration of 0.1 μg per ml. Rifampicin seemed to affect the initiation of chain formation in RNA synthesis.

3) Fine structure of tubercle bacilli treated with ethambutol revealed the characteristic changes in nuclear region. Numerous vesicles and a little fiber structures of DNA were seen in the nucleus.

4) Fine structure of tubercle bacilli treated with isoniazid revealed the numerous vesicles in the nucleus. Fiber structures of DNA are scarcely observed. Cell wall and cytoplasm are not affected. By biochemical methods, thymidine uptake of bacilli seemed to be affected by isoniazid.

5) Fine structure of tubercle bacilli treated with cycloserine revealed the destruction of cell walls. By ruthenium red staining, it was assumed that peptidoglycan of cell wall was damaged.

はじめに

結核化学療法剤の結核菌に対する作用機序については

一部判明しているものもあるが、結核菌が扱い難い菌であることもあり、一般細菌に対する化学療法剤のように判明していないところも多い。殊に INH は他の細菌

* From the Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryochō, Sendai 980 Japan.

には抗菌作用がなく結核菌にのみ効果を示す大事な化学療法剤であるが、作用機序はまだ不明である。この稿では化学療法剤の作用機序を結核菌の超微形態学的方面と生化学的な方面とから観察した結果を報告する。結核菌の微細構造に対する抗結核剤の作用については結核菌の超薄切片を作ることが難しいので、諸外国より報告はほとんどない。

1) 結核菌の超微細構造と酵素・ムコ多糖

結核菌の超微細構造をみると外から細胞壁、細胞質膜があり、その内側に dense な細胞質が存在する。細胞質にはライボソームの顆粒が密に観察される。菌体中央は less dense な核でその中に DNA の filamentous structureが見られる。また細胞質から核にかけて一つの膜構造が見られる。この構造は1957年、篠原らによつて報告されたもので当初ミトコンドリア説が提唱されたが、現在は広くメソソームと呼ばれている。メソソームは細胞質膜と連続した膜構造であるが、一方では常に核と接触しており、核の形成と重要な関係があると考えられる。またメソソームは分裂時において隔壁形成と密接な関係を有し、隔壁形成部位にきまつてこの構造が出現する。メソソームは次に述べるように各種膜酵素のいない手となつており、一方 DNA の replication への関与あるいは隔壁形成、更に細胞壁合成への関与等が考えられている。写真1はコハク酸脱水素酵素、チトクローム酸化酵素、ATPアーゼおよび酸性フォスファターゼの局在をみた超薄切片像を一括したものである。コハク酸脱

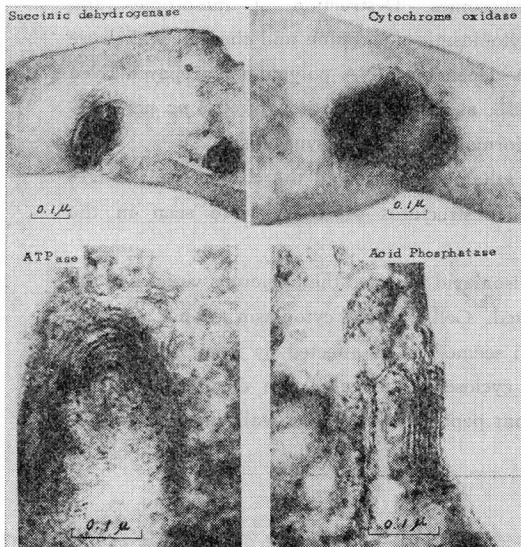


Photo. 1. Electron microscopic localization of enzymes in *M. tuberculosis* H₃₇Ra. All enzymes examined such as succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, ATPase and acid phosphatase localize on the membrane system, especially on the mesosome.

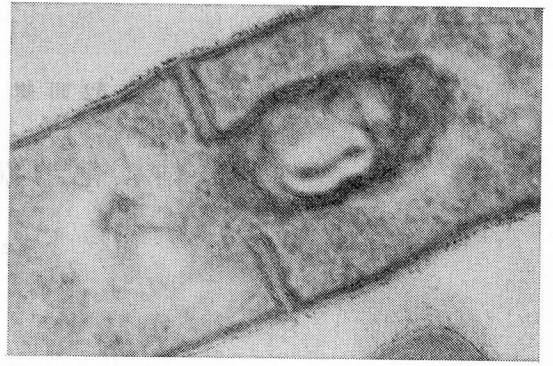


Photo. 2. A thin section of *M. smegmatis* 4172 stained with ruthenium red. Prominent increase of the electron density is observed at the slime layer, the unilateral layer of the membrane of mesosome. Note the electron dense layer of the membrane of the mesosome is continuous with the outer layer of the cytoplasmic membrane. $\times 61,000$

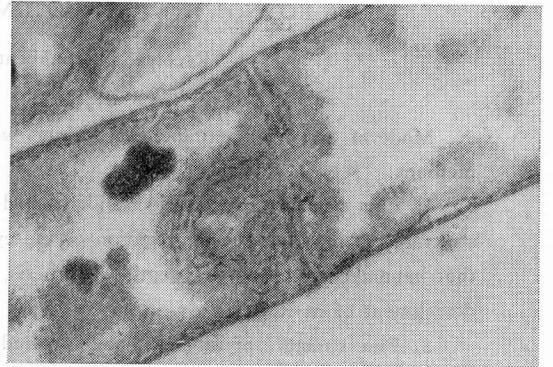


Photo. 3. *M. smegmatis* stained by osmium-black method. Similar findings as shown by ruthenium red, an increased density is observed at the slime layer, the cell wall and at outer lay of the membrane system. $\times 63,000$

水素酵素は Sedar らの TNBT 法、チトクローム酸化酵素は Burstone の diphenylamine 法、フォスファターゼは Gomori の硝酸鉛法を用いている。いずれの酵素も細胞質膜およびメソソームにその活性が検出され、特にメソソームに強く観察される。以上のようにメソソームは呼吸酵素の他、各種の膜酵素のいない手となつており、単にミトコンドリア様機能にとどまらず多様な機能を営むものと考えられる。

Smegma 菌と結核菌を用い、細菌の細胞膜特有のムコ多糖、すなわちペプチドグリカンの染色を試み、その電顕的局在をみようとした。最初はルテニウムレッド染色で、方法は Luft に従いそれぞれ 0.5mg/ml のルテニウムレッドを含むグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで二重固定をし、エタノール脱水後エポキシに包埋し、超薄切片を作製して電顕観察を行なつた。写真2はスメ

グマで撮つたものであるが、菌体表面の粘液層、細胞壁の最内層として細胞質膜の外層とメソソームの一層において著明な電子密度の増加がみられた。この写真ではメソソームのルテニウムレッドで染色されている一層は細胞質膜の外層と連続したものであることが判明した。ルテニウムレッドは6価の陽性荷電体で酸性ムコ多糖でみられるような硫酸基や Carboxyl 基等強い酸性基を有する polymer を染色するものと考えられている。またルテニウムレッドは滲透性に問題があり、細胞膜の中には入つていかない。それで次に Hanker らの過沃素酸オスミウム黒法を試みた。Diglycols を過沃素酸で酸化しアルデヒドとし、これにオスミウム親和性の thiosemicarbazide を conjugate し、最終的にオスミウムブラックとして glycol の存在を電子顕微鏡でみようとするものである。この方法は特に滲透性に問題はない。

ルテニウムレッドで染色される部位はいずれもこの方法で染色される。すなわち菌体表面の粘液層、細胞壁、それに細胞質膜の外層とこれに連続したメソソームの一層が染色されている。ただルテニウムレッド法と異なりこの方法では細胞壁の全層が染まる(写真3)。

次は結核菌でリパーゼによる前処理を行なつた後、リゾチームを作用させ、スフェロプラスト化した菌でルテニウムレッド染色を行なつた。方法は0.1Mの磷酸 Buffer の中にリパーゼ 6 mg を入れ deoxycholate を加え37°C 3時間作用させ、次にリゾチームを37°C 3時間作用させた。1例を示すと写真4では細胞壁は菌体より遊離し、細胞壁の最内層は所どころ断裂像を示し、ルテニウムレッドにより菌体表面の粘液層は染まつているが、細胞壁の最内層と膜系はもはや染色されなかつた。リパーゼ、あるいはリゾチーム単独ではこのような結果は得られて

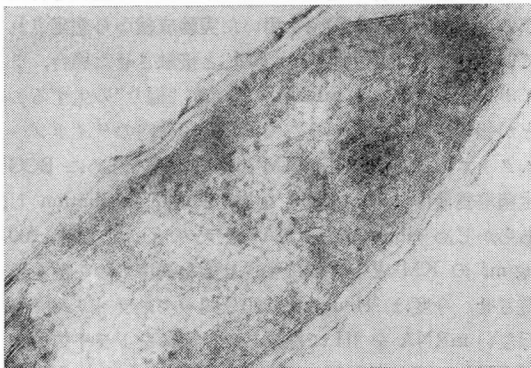


Photo. 4. *M. tuberculosis* H₃₇Ra stained with ruthenium red after treatment of lipase and lysozyme. The slime layer is stained so densely as in control cells, but the inner most layer of the cell wall and the membrane system are not stained with ruthenium red. Note separation of the cell wall from the cytoplasmic membrane and partial disruption of the inner most layer of the cell wall are recognized. $\times 64,000$

いない。いずれの影響かは確定できないが、多分にリゾチームの作用によるものと考えている。細胞壁と膜系にみられる染色物質はこの方法で消化され、ペプチドグリカンと考えているが、粘液層にみられる染色物質はこの方法では消化されないので異質のものと思われる。

2) 結核菌に対するカナマイシンの効果

アミノ配糖体ではストレプトマイシン(SM)とカナマイシン(KM)では全く同じ結果を得ているので KM について報告する。Dubos 培地を用い、対数増殖期に培地に 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の KM を加え、その後、経時的に超薄切片を作つて観察した。12時間作用菌では特にめだつた変化はみられなかつた。24時間作用菌で一部細胞質とメソソームに軽微な変化がみられ48時間でその変化は顕著になつている。写真5は48時間作用菌でみたものであるが、細胞質はリボソームの粒子構造が減少し、粗大な顆粒状を呈し、所どころに density の強い大きな granule がみられる。これは polyphosphate granule とは明らかに異なり変性した細胞質の aggregate によるものではないかと考えられる。もう一つは膜系の変化で、本来のメソソームは崩壊し、そこから長く伸びた lamellar structure がみられる。しかもその多くは dense な granule に接して伸びている。更に膜に包まれた dense な部位が空胞様に変化している像もみられた。更に極端な例では、細胞質は大きく空胞様に崩壊し、その周囲に長く伸びた膜の一端がみられる。細胞質の空胞化に膜が積極的に働いていることを思わせる。24時間作用菌で比較的变化の少ない菌では、コハク酸脱水素酵素、チトクローム酸化酵素の細胞化学的検出を試みたが、メソソームの形態変化に伴つて酵素活性の低下がみられる。なお、この結果は TTC 法により酵素活性をみた結果とよく一致した。こ

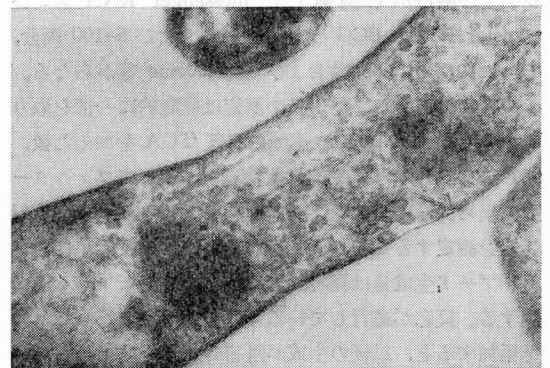


Photo. 5. *M. tuberculosis* H₃₇Ra treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin for 48 hours. Disappearance of the normal structure of ribosome and aggregation of the cytoplasm are observed. Some elongated lamellar structures from the disrupted mesosome and running to near the large dense aggregates are seen in the cytoplasm. $\times 50,000$

のように KM 作用下でメソソームはその本来の構造と機能を失うが、そこから伸びた膜によつて新たに lamellar structure が形成され、新たな機能が発揮されているようである。メソソームは流動的で、かつ多様な意義をもつものと思われる¹⁾。

アミノ配糖体で特徴的なことは細胞質の変化で、細胞質の変性、崩壊が印象的である。しかし結核菌でその初期像をとらえることは非常に困難である。

KM の結核菌に対する作用機序を生化学的な方法でペプチド合成の阻害を観察した²⁾³⁾。Cell free system で結核菌のポリペプチド合成に対する KM の阻害を観察するため、BCG よりライボソーム画分および上清酵素群を調製し、一方 f₂ ファージ粒子から精製した RNA を messenger RNA とし ¹⁴C-leucine の熱 TCA 不溶画分への取り込み、すなわちポリペプチド生成量を測定し、これに及ぼす KM の作用を観察した。f₂ ファージ粒子の分離およびこれからの RNA の抽出、精製法、酵母からの転移 RNA の調製法についてはすでに報告した。

BCG からライボソームを含む画分、すなわち S-30 extract を得る方法は BCG 菌体を磨碎し、緩衝液を加えペースト状にしたものを DNase で処理し粘稠度を下げ 2 万 G 15 分遠心し上清を再び 3 万 G、35 分間遠心し、上清を透析のち -70°C に凍結保存した。Aminoacylase, Translocase 等の上清酵素群を含む S-100 画分は既報のごとくにして調製した。すなわち透析前の S-30 画分を 105,000 g、3 時間遠心したものの上層 2/3 を取り透析後、再び 105,000 g、3 時間遠心し上清を -70°C で保存した。

BCG ライボソームを用いたポリペプチド合成の assay system は GTP, ATP, ATP 再生系、および f₂ ファージおよび酵母から調製した messenger RNA および transfer RNA, BCG ライボソームおよび S-100 画分、それに 19 種のアミノ酸および ¹⁴C-leucine 等からなる。生成されたポリペプチド量の測定は経時的に一部を取り bovine serum albumin を加え 5% TCA を加えた後、90°C に加熱し熱 TCA 不溶性物質をミリポアフィルター上に集め洗浄の後、シンチレーションカウンターで放射活性を測定することにより行なつた。この反応系でのポリペプチド生成量は経時的に増加し 120 分でプラトーに達する。反応が進行している系に反応開始後 25 分で KM を添加すると、以後の生成が阻害される。すなわち KM はペプチド鎖の伸長を阻害することが判明した。

KM を種々の濃度に添加した場合のポリペプチド生成では 1 μg/ml の濃度でコントロールの 58%、10 μg/ml で 46% に減少する(表 1)。

以上のごとくファージ RNA を mRNA として用いた場合に比べ poly U を用いた場合、このコードに相当す

Table 1. Amino Acid Incorporation into Polypeptide with Phage f₂RNA by the Ribosomes from Mycobacterium Bovis, BCG in the Presence of Kanamycin

Concentration of Kanamycin (μg/ml)	Phage f ₂ RNA directed [¹⁴ C]-Leucine incorporation	
	c. p. m.	(%)
0	1,425	(100)
1	822	(57.7)
10	653	(45.8)
100	599	(42.0)
250	526	(36.9)
500	407	(28.6)

るポリフェニルアラニン生成に対する KM の阻害効果は KM 10 μg で 81%、100 μg で 80% と 20% 位の減少しかなく軽度であつた。一方 KM によるコードの misreading (読み誤り) のため poly U のコードに相当しないポリイソロシンの生成も観察され、その量は KM の濃度が増すにつれて増加して KM 10 μg では 190%、100 μg では 294% と大幅に増加する。Davis ら⁴⁾⁵⁾によれば SM は大腸菌の 30 S ライボソーム上のアミノアシル RNA が付着する部位、すなわち A-site に歪みを与え、A-site へのアミノアシル tRNA の結合を妨げる結果、ペプチド鎖の伸長は停止するといひ、また A site は同時にコード・アンチコードの認識の部位でもあるので A site の歪みは poly U, poly A などの人工メッセンジャーを用いた場合の misreading の原因にもなると説明している。BCG ライボソーム対 KM の場合にも同様の現象が認められた訳である。

菌体内では 30 S および 50 S ライボソームサブユニットが結合、解離を繰り返しながらポリペプチド生成を行なうことが主として大腸菌を用いた実験成績から想定されている。また大腸菌生菌を SM と接触させた場合、ライボソームクラスと mRNA の分布に「偏り」の生ずることが報告されている。そこで BCG 菌体内のライボソームクラスの分布に与える KM の影響をみるために BCG 生菌培養液中に ¹⁴C-uracil を加え 24 時間 incubation し、あらかじめ ribosomal RNA をラベルして置き 100 μg/ml の KM と 1 時間接触させ菌を洗浄のち菌を浮遊させ、今度は ³H-uracil で 20 分間パルスラベリングを行ない mRNA を ³H で標識した。菌体をドライアイスで冷却しながら磨碎し、ホモジェネートを 15~30% の蔗糖密度勾配上に重層しスウィングローターで 25,000 回転 12 時間遠心し、遠心後 32 ずつの分画に分け、各分画の ¹⁴C および ³H の放射活性を測定した。コントロールではポリソームのピーク、特に dimer および trimer のピークが明瞭であるのに対し、KM 1 時間処理菌ではポリソームの消失と、これに相応して 70 S モノマーおよび

Fig. 1. Disappearance of Polysomes Consistent with Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) in that Region and Accumulation of the 70S Monosome were Observed in the Cells Treated with Kanamycin for 60 Minutes

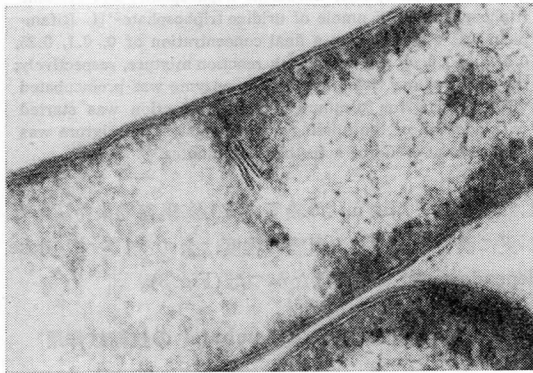
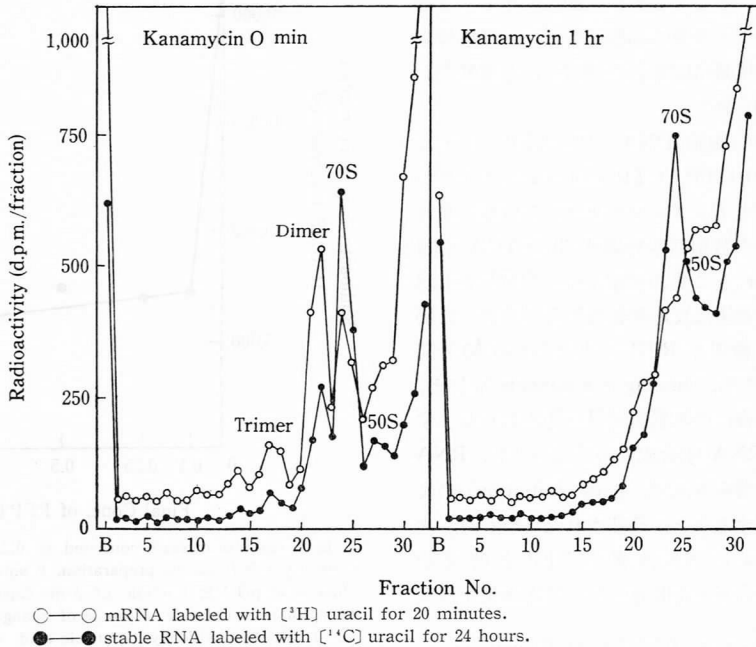


Photo. 6. *M. tuberculosis* H₃₇Ra treated with 10 μg/ml of rifampicin for 12 hours. The cytoplasm is loose, and irregular coarse granules are seen. The structure of the mesosomes is destroyed. × 82,000

50S サブユニットの蓄積が著明であつた (Fig. 1)。

以上の実験成績から、結核菌に対する KM の作用機序はポリペプチド生成阻害と、これに引き続くポリソームの崩壊と mRNA の離脱にあると結論された³⁾。

3) リファンピシンの抗結核作用

超微細構造と生化学的の実験を行なつた。結核菌に RFP を 10 μg/ml, 12 時間から 42 時間作用させると、アミノ配糖体と似て細胞質の空胞様変性が起こるが、アミノ配糖体と異なり比較的早期に細胞質の空胞化とメソソームの崩壊像が得られる。KM 作用菌に見られたような

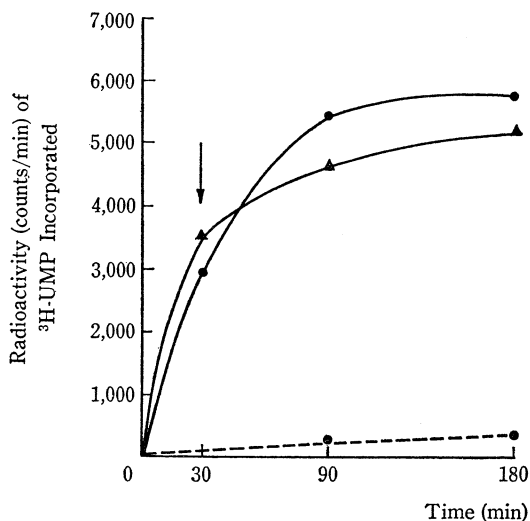
細胞質における dense な granule や長く伸びた膜様構造は見られない。細胞質は明るく、その中にライボソームの痕跡を思わせる less dense な微粒子が観察される。また RFP では比較的早期に核質の condensation が起こってくる⁶⁾ (写真 6)。

RFP の作用機序は大腸菌を用いた実験から DNA 依存性 RNA polymerase 活性阻害であることが明らかにされている⁷⁾。われわれは結核菌 BCG から本酵素を調製し、RFP の阻害効果を検討した⁸⁾。DNA 依存性 RNA polymerase は DNA を鋳型 (template) とし、ATP, GTP, CTP, UTP の 4 種のヌクレオチドを基質とする反応を触媒する酵素である。この反応は DNA と酵素の会合、合成開始、ヌクレオチド鎖の延長および終了の 4 段階を経て完成する。RFP は大腸菌由来の本酵素を用いた実験から合成開始の段階で DNA 酵素複合体に作用し、活性の発現を阻止することが明らかにされている。結核菌 BCG から Fuchs らが⁹⁾大腸菌を用いた方法の変法により DNA 依存性 RNA polymerase を調製し、本酵素に対する RFP の作用を観察した。BCG 菌体を Ribi の cell-fractionator で破壊し homogenate を 70,000 g, 40 分遠心した上清を更に 105,000 g, 10 時間遠心し pellet を得、これを DEAE-セルロースカラムにかけ、0 から 1M に至る塩化カリの濃度勾配により溶出する。活性のある画分を集め、硫酸分画を行なうと、活性は主として 30~65% 飽和で沈殿する部分に集まる。この画分を透析

後に部分精製酵素として用いた。酵素活性を経時的に追跡すると、生成量は30分で最大に達し、その後は急激に減少してくる。すなわち、この部分精製酵素には RNase の混在が推測される。そこで5%から30%に至るグリセロール密度勾配遠心により更に精製を行ない、精製酵素を用いると、反応生成量は経時的に増加し、分解酵素を除去し得たことが知られた。

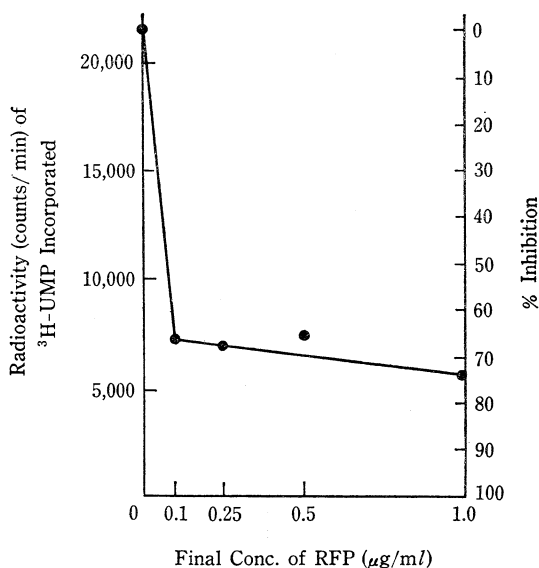
反応系の組成は仔牛胸腺 DNA, ^{14}C -ATP または ^3H -UTP および他の GTP, CTP のヌクレオチド等から成り、この条件下でポリヌクレオチド中に取り込まれた ^{14}C , または ^3H の放射活性物質を 10% TCA を加えて millipore filter 上に集め測定した。RFP の本酵素活性に対する阻害効果は反応開始後30分で添加した場合には認められず、酵素と RFP をあらかじめ30分間 preincubation したのち、missing components を加え、反応を開始させた場合にのみ阻害効果が認められた。すなわち、RFP は RNA 合成の各段階のうち、RNA 鎖の伸長過程には影響を与えず、開始 (initiation) の段階で阻害効果を発揮することが確認された (Fig. 2)。次いで 0.1 から 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に至る濃度の RFP と酵素を preincubate したのち反応を開始させ、阻害効果を観察

Fig. 2. Effect of Time of Addition of Rifampicin on the Ribonucleic Acid Polymerase Reaction



The reaction mixture contained 0.776 mg protein of the purified enzyme preparation, 60 μmole of Tris hydrochloride at pH 7.9; 25 μmole of β -mercaptoethanol; 20 μmole of magnesium chloride; 10 μmole of manganese chloride; 250 μg of calf thymus deoxyribonucleic acid; 200 nmole each of guanosine triphosphate, adenosine triphosphate, and cytosine triphosphate; 0.45 nmole of uridine triphosphate- ^3H in a final volume of 1.0 ml. At intervals, an aliquot of 0.2 ml was withdrawn for the assay of the enzyme activity. ●—● = control; ▲—▲ = rifampicin added 30 minutes after the start of the reaction (at the point indicated by arrow) at a final concentration of 1 μg per ml; ●---● = enzyme pre-incubated with the drug for 30 minutes at 37°C and then reaction started by addition of missing components.

Fig. 3. Effect of Rifampicin (RFP) on Ribonucleic Acid Polymerase Activity



Each reaction mixture consisted of 0.155 mg of protein from a purified enzyme preparation, 8 μmole of Tris hydrochloride at pH 7.9; 5 μmole of β -mercaptoethanol; 4 μmole of magnesium chloride; 4 μmole of manganese chloride; 50 μg of calf thymus deoxyribonucleic acid; 40 nmole each of guanosine triphosphate, adenosine triphosphate, and cytosine triphosphate; 0.045 nmole of uridine triphosphate- ^3H . Rifampicin was added to give a final concentration of 0, 0.1, 0.25, 0.5, and 1.0 μg per ml to each reaction mixture, respectively; the final volume was 0.2 ml. The enzyme was preincubated with the drug for 30 minutes, and the reaction was started with addition of the missing components. The mixture was incubated at 37°C for a further 150 minutes.

した結果、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 70% 阻害効果を認めたが更に濃度を上げて阻害の程度は余り増さず、dose dependency は著明ではなかつた (Fig. 3)。

4) 結核菌に対する Ethambutol の抗結核作用

結核菌に対するエタンブトール (EB) の作用機序について超微形態学的検索を行なつた。EB を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24 時間、あるいは 48 時間結核菌に作用させると注目されることは、核質の減少で核の filamentous な構造は消失し、核内に vacuole ないし vesicle 様の構造が見られる。核の中、あるいは核に接して多数の vesicle 様構造がみられ、核の filament が占める部位は著明に減少している。vesicle の中には homogenous でやや dense に見える。また vesicle は一層の限界膜をもっているが、その一部はこわれたメソソームから伸びた膜に連続している像が見られる (写真 7)。なお typical なメソソームは見られない。細胞質の aggregation, あるいは欠損といったものはみられていない。また細胞壁や細胞質膜には特にめだつた変化はない。EB は結果としては核における変化が多くみられた。Forbes らは EB の *M. smegmatis* にお

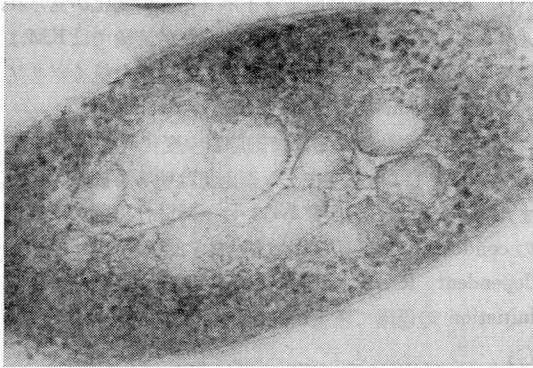


Photo. 7. *M. tuberculosis* H₃₇Ra treated with 100 µg/ml of ethambutol for 48 hours. Characteristic changes are seen in the nuclear region. Numerous vesicles and a little fiber structures of DNA are seen in the nucleus. The normal structure of the mesosome are not recognized. ×61,000

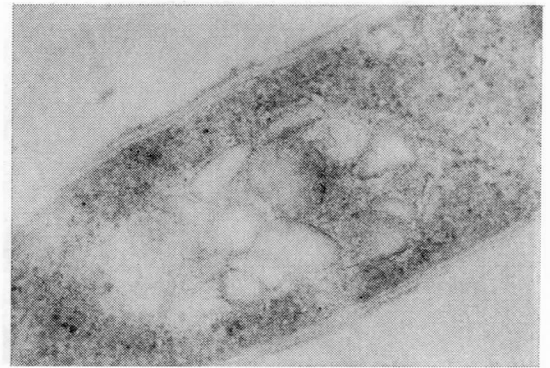


Photo. 8. *M. tuberculosis* H₃₇Ra treated with 10 µg/ml of isoniazid. Similar findings are observed as in the ethambutol treated bacilli. Numerous vesicles are seen in the nucleus. Fiber structures of DNA are scarcely observed. ×54,000

ける核酸代謝阻害効果を観察している⁹⁾。

5) 結核菌に対する INH の効果

結核菌に対する INH の作用機序を主として超微細構造から観察した。10 µg の INH を 24 時間および 48 時間作用させた。24 時間では著明な変化はなかつたが、核の filament はやや loose に存在し、核の構造ははつきりしない。また菌体の中央近くで核に接して vesicle 様の構造がみられる。一層の膜に包まれ、中は homogenous でやや dense に見える。その外に単位膜構造がみられ、メソソームに由来するものと思われる。また 48 時間作用菌では核内に多数の vesicle 様構造がみられ、filament の減少がみられる。これらは EB 作用菌と非常に類似した形態所見である。その意味はわからないが、形態上 EB と INH 作用菌では一つの結果として DNA の減少が起こっているものと推定される。またメソソームの動態が注目された(写真 8)。

これらの所見は INH の DNA 合成障害を示唆するものと考えられるので chemical な点から実験した。アミノ酸として ¹⁴C-valine, RNA 前駆体として ³H-uridine, DNA 前駆体として ³H-thymidine を用い、それぞれの物質の BCG 生菌体への取り込みに対する INH の影響を観察した。Uridine の取り込みに対し、INH は全く阻害効果を示さなかつたのに反し、thymidine の取り込みは複雑な経時的推移を示すが、9 時間の時点でみると非添加対照と INH 50 µg/ml 添加とでは両者間に開きがみられるようになる。また valine の取り込みも軽度抑制される。Incubation の時間を 8 時間、24 時間、48 時間と長くし、かつ時間ごとのサンプルを 5% ice-cold TCA で 15 分間処理したのち菌体内に保持されている ¹⁴C-valine, ³H-uridine, および ³H-thymidine の放射

活性を測定してみると valine および uridine の菌体内への取り込みは経時的に増加し、INH の添加によつて軽度の阻害がみられる。Thymidine の取り込み量は 8 時間でピークに達し、以後漸減してくる。これは菌体内 thymidine プールが比較的短時間で極期に達するが、これが直ちに DNA 分子中に取り込まれた量を示すものではなく、遊離の thymidine は時間の経過とともに菌体外に遊出するものと考えられる。48 時間後の値はほぼ、DNA 分子中に取り込まれた量に一致するものと推測されるが、対照に比べて INH を添加した場合、その量は低下している。

6) 結核菌に対するサイクロセリンの効果

David らは結核菌の wax-D (ペプチドグリコヒド) 生合成、および D-alanyl-D-alanine synthetase に対する D-cycloserine の阻害効果を観察している。

サイクロセリン (CS) 50 µg/ml 48 時間作用菌に更にルテニウムレッド染色を行なつた。細胞壁は菌体より遊離し、その最内層は所どころで断裂崩壊像を示している。ルテニウムレッドで染色した菌では表面の粘液層は強く染色されているが、細胞壁の内層と細胞質膜は染まらない。細胞質内には一部メソソームの痕跡と思われるものがみられ、やや dense に観察される(写真 9)。これらの所見はリパーゼとリゾチームで処理した菌と非常に類似したものであり、ペプチドグリカンの融解が起こっていると考えられた。CS 50 µg を 12 時間作用させた結核菌でルテニウムレッド染色を行なつた。12 時間作用菌では形態上、特に目立つた変化はない。ルテニウムレッド染色により細胞壁の染色性はむしろ低下しているが、メソソームが非常に dense に観察される。膜の表面だけでなく、膜と膜の間が強く dense に観察される。ルテニウムレッドで染まる物質がここに蓄積しているように

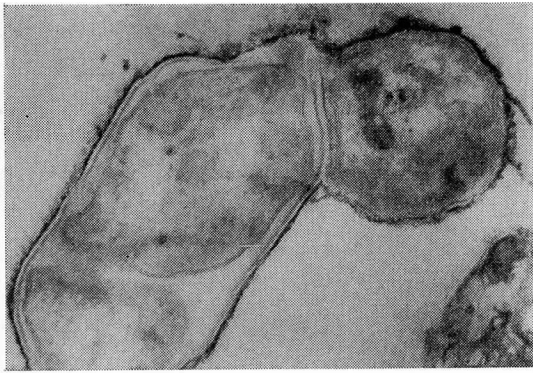


Photo.9. *M. tuberculosis* H₃₇Ra stained with ruthenium red after treated with 50 μ g/ml of cycloserine for 48 hours. The cell wall is separated from the cytoplasmic membrane and the inner most layer is partially disrupted. The slime layer is densely observed, but the inner most layer of the cell wall and the cytoplasmic membrane are not stained with ruthenium red. The remained structures of the mesosome slightly stained are seen in a cell at the right upper corner. $\times 55,000$

思われた。しかし結核菌で超薄切片を作ることは技術的に非常に困難で、technical limit から結核菌ではあまり詳細な観察はできない。

スメグマを使つて観察した。1,000 μ g の CS で菌の発育阻止があり、いずれ溶菌が起こるが、1時間ではほぼ完全な発育阻止がみられる。電顕像はこの時点でみると、細胞壁自体には特に変化はみられないが、ルテニウムレッドによりメソソームがやはり非常に dense に観察される。CS の作用によつて細胞壁のペプチドグリカンの合成が阻害されるが、まずメソソームに細胞壁のペプチドグリカンの前駆体と思われる物質が蓄積してくる。膜系にみられる前駆物質がメソソームの中に停滞し、メソソームから前駆体が出てゆけないために最終的には細胞壁でペプチドグリカンが融解し、細胞壁の遊離、内層の崩壊が起こつてくると考えられる。しかし結核菌ではペプチドグリカンの外側にもう一つの構造があり完全な cell wall の崩壊、完全なプロトプラスト形成をみることは困難である。結核菌では cell wall の出来方、あるいは隔壁の出来方はグラム陽性菌に似ている。これはメソソームの存在と関係していると思われる。また cell wall のこわれ方はグラム陰性桿菌に似ており、これは cell wall の構造の問題と考えられる。

結 語

抗結核剤の作用機序を結核菌の超微細構造の変化と生化学的な面から追求した。

1) KM では超微形態でライボソームの変化が見られ、メソソームも破壊されていた。生化学的実験では KM は結核菌のポリペプチド合成阻害とこれに引き続くポリソームの崩壊と m-RNA の離脱が観察された。

2) RFP では超微形態で細胞質の変化が著明でライボソームはまばらに存在し、細胞質は明るく観察された。またメソソームの崩壊像あるいは長時間作用菌では核質の condensation が見られた。生化学的実験では DNA-dependent RNA polymerase の阻害が見られ、殊に initiation の段階で阻害が発揮されたことが確認された。

3) EB では主として核質が減少し核内に多数の vacuole または vesicle 様の構造が見られるが、細胞壁や細胞質膜には変化がみられなかった。

4) INH では EB と同様主として核の構造が変化し、核内に多数の vesicle 様構造が見られた。生化学的には thymidine の取り込みの減少が観察された。

4) CS では超微形態学的には細胞壁は菌体より遊離し、断裂していた。ルテニウムレッド染色により細胞壁のペプチドグリカンが細胞壁で融解し細胞壁の遊離、内層の崩壊が起こつたことが考えられた。

結核菌の超微形態学的研究は東北大学抗酸菌病研究所内科、有路文雄博士、生化学的研究は大泉耕太郎博士が担当されたことを記し、ここに厚く謝意を表する。

文 献

- 1) 有路文雄・山口淳二・岡捨己：結核，46：53，1971.
- 2) Konno, K., Oizumi, K., Kumano, N. and Oka, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 108：101，1973.
- 3) 大泉耕太郎・熊野伸子・今野淳・岡捨己：結核，49：9，1974.
- 4) Davis, B.D.: Proceedings of the 6th International Congress of Chemotherapy, Vol.1, p.10, Univ. Tokyo Press, 1970.
- 5) Modolell, J. and David, B.D.: Nature, 224：345，1969.
- 6) Konno, K., Oizumi, K., Arijii, F., Yamaguchi, J. and Oka, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 107：1002，1973.
- 7) Hartmann, G., Honikel, K.O., Knüsel, F. and Nüesch, J.: Biochim. Biophys. Acta, 145：843，1967.
- 8) Konno, K., Oizumi, K. and Oka, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 107：1006，1973.
- 9) Forbes, M., Kuck, N.A. and Peets, E.A.: J. Bacteriol., 89：1299，1965.
- 10) David, H.L., Goldman, D.S. and Takayama, K.: Infect. Immunity, 1：74，1970.
- 11) David, H.L., Takayama, K. and Goldman, D.S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 100：579，1969.