



## 論 文 内 容 要 旨

二次抗結核剤による結核菌の形態変化に関する研究はあまりみられていない。二次抗結核剤のうち Kanamycin (KM), Cycloserine (CS), 2-Ethyl-thioisonicotinamide (TH), Dextro-2, 2'-(Ethylenediimino)-di-1-butanol (EB) の人型結核菌 H<sub>37</sub>Ra 株に与える形態変化を膜面培養法ならびに超薄切片法によつて電子顕微鏡で観察し、一次抗結核剤による形態変化と比較し、さらに二剤併用時の形態変化も検討した。

### 実 験 方 法

1. 使用菌株を Dubos 培地に 7 日間培養、又膜面培養には Sauton 液体培地を使用した。  
2. 膜面培養法による観察の場合 Hillier 法の変法を用い、滅菌ペトリ皿中の Sauton 培地上にコロジオン薄膜を張り、その表面に菌液を滴下して 37°C で培養し、増殖を認めたとのち、ペトリ皿内の Sauton 培地を無菌的に捨て、諸薬剤を含有する Sauton 培地と交換した。この小集落を含むコロジオン膜を薬剤作用後切りとり、水槽に浮かせ銅製グリッドに載せ空気乾燥した。薬剤の濃度は試験管内最小発育阻止濃度および臨床的最高血中濃度を考慮して、次の通りとした。

#### a 二次抗結核剤単独

1) KM: 0.1, 1 および 10  $\gamma/ml$  2) TH: 0.2, 2 および 10  $\gamma/ml$  3) CS: 1, 10 および 20  $\gamma/ml$  4) EB: 0.5, 1, 5 および 500  $\gamma/ml$

#### b 二次抗結核剤の二剤併用

1) KM+CS: ① KM 0.1  $\gamma/ml$  + CS 1  $\gamma/ml$  ② KM 1  $\gamma/ml$  + CS 10  $\gamma/ml$  2) KM+TH : ① KM 0.1  $\gamma/ml$  + TH 0.2  $\gamma/ml$  ② KM 1  $\gamma/ml$  + TH 2  $\gamma/ml$  ③ KM 1  $\gamma/ml$  + TH 10  $\gamma/ml$  3) KM+EB: ① KM 0.1  $\gamma/ml$  + EB 1  $\gamma/ml$  ② KM 1  $\gamma/ml$  + EB 5  $\gamma/ml$  作用時間は 24 時間から 7 日までとした。

3. 超薄切片による観察の場合 Dubos 培地培養菌に直接 10  $\gamma/ml$  濃度になるように KM を加え 48 時間 37°C 培養後遠心、洗浄してエタノール系列で脱水、Epon 812 を主剤とする Luft の方法で包埋して切片を作製し、カーボン補強コロジオン膜上に載せ、日立 HU-11 B 型電子顕微鏡で観察撮影した。

### 実 験 成 績 お よ び 考 察

#### I 二次抗結核剤単独使用時の菌の形態変化

- 1) 膜面培養法による対照菌は数個の電子線顆粒を含有し細胞質内が充実していた。
- 2) KM 処理菌は試験管内最小発育阻止濃度以下の 0.1  $\gamma/ml$  濃度 48 時間作用した場合

子線顆粒が縮小し、細胞質が疎となり、一部空胞化も認められ、 $1 r/ml$ 、 $10 r/ml$  濃度となるにつれその変化が増強し融解像も認められた。

3) TH 処理菌は  $0.2 r/ml$  濃度 48 時間および 4 日、 $2 r/ml$  濃度 48 時間で不変、後者の 4 日目で小胞出現、 $10 r/ml$  濃度 48 時間で電子線顆粒の縮小、減少、空胞化がみられた。

4) CS 処理菌は  $1 r/ml$  7 日および  $10 r/ml$  濃度 48 時間で不変、後者の 7 日目で電子線顆粒の縮小や減少著明、空胞化、細胞質が疎になつた。

5) EB 処理菌は  $500 r/ml$  の高濃度処理によつても殆ど形態に変化を示さなかつた。

以上のように KM, CS, TH では試験管内最小発育阻止濃度で形態変化が出現し、この変化は薬剤の濃度と作用時間に平行して増強した。とくに KM による変化は SM に類似し、TH と CS では KM に比して形態変化が晩期に起き PAS, INH と類似している。しかし EB では殆ど変化がなく石炭酸等の殺菌剤と類似していた。

## II 二次抗結核剤二剤併用時の菌の形態変化

二剤を併用した時の特異的な変化は認められず、いずれの場合もその形態変化の出現の仕方が KM 単独使用の場合に類似しており、形態変化を早期に出現させる KM の効果が表現されるものと考えられる。

## III 抗結核剤処理による菌幅の変化

各薬剤ごとに無選択的に一定菌数を抽出し、この菌幅の平均値を算出すると KM, TH, CS の処理菌では高濃度で菌幅が増大した。これは薬剤による菌体の膨化に基く形態変化と考えられる。

## IV 薬剤処理菌の超薄切片像

対照菌では、菌膜、細胞質膜、隔壁、核、メソゾームなどが明瞭に区別されるが、 $KM 10 r/ml$  48 時間処理菌ではメソゾームの断裂がみられ、KM の特異的作用に基くものと考えられる。

## 結 論

1) KM では  $0.1 r/ml$  48 時間ですでに電子線顆粒縮小、空胞化等の変化が認められ、高濃度、長時間処理で増強され、超薄切片像ではメソゾームの断裂が著明となつた。

2) TH では  $2 r/ml$  4 日で初めて小胞形成を見たが高濃度では短時間で著しい形態変化を見た。

3) CS では  $10 r/ml$  7 日目で形態変化が現れたが、 $20 r/ml$  では 48 時間で顆粒縮小空胞化を見た。

4) これらの二剤併用処理菌においては常に KM 単独処理における変化に類似し、併用による特異的な変化は認められなかつた。

## 審査結果の要旨

二次抗結核剤による結核菌の形態変化を電子顕微鏡で追求した研究はあまり行われていない。とくにこの変化を超薄切片で観察した研究はきわめて少ない。

二次抗結核剤のうち Kanamycin (KM), Cycloserine (CS), 2-Ethyl-Thioisonicotinamide (TH), Dextro-2, 2'-(Ethylenediimino) di-1-Butanol (EB) の人型結核菌 H<sub>37</sub>Ra 株に与える形態変化を膜面培養法および超薄切片法により電子顕微鏡で観察追求したものである。

著者の実験は二次抗結核剤単独と二剤併用時にわけ、濃度は試験管内最小発育阻止濃度を考慮した。著者の実験によつて得られた成績を要約すれば、次のとおりである。

### 1. 膜面培養法

1) KM では  $0.1 \gamma/ml$  48 時間の低濃度、短時間で電子線顆粒縮小、空胞化等の変化が認められた。

TH では  $2 \gamma/ml$  4 日、CS では  $10 \gamma/ml$  7 日の高濃度、長時間で初めて形態変化が見られた。

2) EB では  $500 \gamma/ml$  の高濃度でも変化は見られなかつた。

5) これらの二剤併用時には KM 単独による変化と類似し、併用による特異的な変化は認められなかつた。

2. 超薄切片法による観察で KM  $10 \gamma/ml$  48 時間でメソゾームの断裂という特異的な変化が認められ、これは従来知られていなかった新しい知見である。

以上本論文は薬剤作用菌の形態観察に最も適當な方法を応用して詳細に観察しており、これらの結果は結核の治療に現在広く用いられているいわゆる二次抗結核剤の作用機序を考える上での有力な裏づけを与えるものと思われる。

よつて本論文は学位を授与するに値するものと認める。