

한국전자현미경학회지 제8권 제1호 1978.  
Kor. Jour. Electron Microscopy, Vol. 8, No. 1, 1978.

## 抗結核劑의 結核菌에 對한 作用 및 微細構造 變化\*

滕 永 健      鄭 聖 德\*\*      金 聖 光\*\*

延世大學校 醫科大學 電子顯微鏡室, 微生物學教室\*\*

### Mode of Action of Antituberculosis Drugs and Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*

Young-Kun, Deung, Sung-Douk Cheung\*\* and Sung-Kwang Kim\*\*

Electron Microscopy Lab. and Dept. of Microbiology\*\*

College of Medicine, Yonsei University

Seoul, Korea

#### Abstract

The aim of this research was to discover the action mechanism of various antituberculosis agents (isoniazid, paraaminosalicylic acid and streptomycin) which act on *Mycobacteria tuberculosis hominis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>, and also to study the relationship of ultrastructural changes and the growth pattern in *Mycobacterium tuberculosis hominis*.

The ultrastructural change was observed with an electron microscope while the growth pattern was studied through *in vitro* culture.

The results are summarized as follows;

1. The ultrastructural changes found in the group treated only with isoniazid were the loss of nuclear materials and the appearance of electron dense granules.
2. In the group treated with paraaminosalicylic acid, thickening of nuclear filaments and mesosome arrangement disorders were observed.
3. In the group treated with streptomycin, the ribosome particles appeared indistinct and the cytoplasm was denaturalized.
4. In the group cross treated with all three agents, all the ultrastructural changes mentioned above could be observed in the cell just as they appeared in the single treated groups.
5. In all of the single and in the crossly treated group, there were no significant changes note in the cell wall or cytoplasmic membranes of any of the cells observed.
6. In the cultural data *in vitro*, through the crossly treated group and single treated group, growth was observed in 3-5 weeks of culture.

\* 본 논문은 1976년도 연세대학교 의과대학 교수연구비로 이루어 졌음.

### 서 론

항결핵제의 화학요법의 발전은 1944년 Waksman과 그 공동연구자들에 의해 *Streptomycin griseus*에서 추출된 항생제인 Streptomycin의 등장 이후 눈부신 발전을 거듭하여 왔다.

현재까지 여러 가지 항결핵제가 발견되어 실제 임상적으로 결핵치료에 사용되고 있으며 이러한 항결핵제는 그 항균 작용이 실험을 통하여 규명이 가능한 것들이었다. 예를들면 rifampicin은 DNA dependent RNA polymerase에 작용하여 RNA의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있으며<sup>(1)</sup>, 또한 kanamycin은 ribosome의 30S의 conformation에 장애를 주어 mRNA, tRNA 사이에 miscoding을 이끄시도록 하여 ribosome상의 아미노산 합성이 차단되는 것으로 규명되어 있다.<sup>(2-3)</sup>

한편 D-cycloserine은 D-alanyl-D-alanine합성반응을 저해하여 세포벽의 mucopeptide 합성을 저해하는 것으로 해석되고 있지만 다른 작용도 예상되고 있다<sup>(4)</sup>. 또한 ethambutol은 RNA대사에 의한 polyamine, 2가 양 ion의 기능을 장애하여 균의 증식을 저지하는 것으로 생각되고 있다<sup>(5)</sup>.

일차 항 결핵제 중에서 isoniazid는 선택적으로 결핵균에 작용하는 강한 항결핵제로 알려져 많이 사용되고 있으나 그 작용기전에 대하여는 아직 명확치않아 여러 가지 설이 있다. 즉 isoniazid와 결핵균이 접촉하면 세포질내 이상색소의 축적 및 soluble carbohydrate의 축적현상이 나타나며 접하여 인지질 성분에 변화를 주기 때문에 지방산의 합성저해를 생각할 수 있고 또한 핵산합성 저해가 예상되어 따라서 단백질합성에도 저해가 올 것으로 생각되고 있다<sup>(6)</sup>. 한편 streptomycin이 세포내 단백질합성기구인 ribosome과 결합하여 mRNA-tRNA-ribosome간의 정상적인 작용을 방해함은 잘 알려진 사실이며, Paraaminosalicylic acid 또한 그 작용기전은 잘 알려져 있지 않으나 Isoniazid나 Streptomycin과 병합사용할 경우 그 항결핵 효과가 증가하며 내성균의 출현을 지연시킨다고 알려져 있다.

결핵균의 미세구조는 점차 세밀하게 밝혀지고 있으며<sup>(7)</sup>, 결핵균이 항결핵제와 접촉할 경우 그 미세구조에 변화를 주는 것은 명확하지만 항결핵제가 작용하는 일차작용점이 상기한 바와 같이 서로 다를지라도 그 후에 진행되는 대사과정의 변화는 같을지도 모른다. 따라서 형태학적으로 관찰되는 미세구조의 변화는 같은 양상을 나타낸다고 생각할 수 있다. 항결핵제 작용점의 차이에 따른 형태학적으로 달라질 수 있는 가능성

도 있다고 하는 문제에 관하여 그에 대한 소견을 얻고져 임상적으로 일차항결핵제로 알려진 isoniazid(INH) paraaminosalicylic acid(PAS), streptomycin(SM)의 일정농도에 노출된 결핵균의 미세구조 변화를 항결핵제의 일차 작용점에서 검토정리하고 또한 임상적으로 이들 3종약제의 병용의의를 시험관상에서 추구하고져 본 실험을 실시한 바 그 관찰성적이 약제 선택에 기초 자료가 될 것으로 생각되어 이에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### I. 실험재료

##### A. 실험에 사용된 균주

본 실험에 사용한 인형결핵균은 *Mycobacterium tuberculosis var hominis*, H<sub>37</sub>Rv로서 일본 Hiroshima대학의학부 세균학교실로부터 분양 받아 Dubos liquid media에 2주간 배양하여 이를 공시 균주로 하였다.

##### B. 실험에 사용된 배지 및 항결핵제

사용된 배지는 Dubos 액체배지로서 균의 부유배양을 위하여 0.1% Tween 80을 배지 100ml에 1ml씩 첨가하여 약제배지의 기본배지로 사용하였다.

항결핵제로서는 INH (isoniazid Lot No. I480NK, 武田), PAS(paraaminosalicylic acid Lot No. 2492 PM 53, 田邊), SM(streptomycin Lot No. ss264 明治)를 사용하였다.

농도는 INH 0.2mcg/ml, PAS 2.0mcg/ml 및 SM 2.0mcg/ml로 각 배지에 첨가하여 약제 배지로 사용하였다.

#### II. 실험방법

##### A. 결핵균의 시험관내 항결핵제 접촉방법

시험관내 약제배지는 Tween 80이 0.01% 함유된 Dubos 액체배지 1ml당 INH 0.2mcg, PAS 2.0mcg 및 SM 2.0mcg의 농도로 약제가 가해진 5ml가 분주된 액체배지로서 이에 1ml당 5.3×10<sup>7</sup>의 균 부유액 0.1ml 접종하여 섭씨 37° 항온기 내에서, 접촉 1일째는 정지배양하고 2일째부터는 1일 3회, 매회 30분간 간헐적으로 진탕배양하였다.

약제의 접촉기간은 각각 3일 7일 및 14일간 접촉시켜 이를 원심 사용하였다. 또한 항결핵제의 단독작용효과와 비교하기 위하여 상기 약제배지에 순서별로 각각 3일간 접촉시켜 단독 교차작용의 효과를 관찰하였다.

##### B. 전자현미경적 방법

상기 각 항결핵제를 처리한 균을 0.2M phosphate buffer(pH 6.1)로 수회세척하고 즉시 5% Glutaral-

ehyde로서 0~4°C에서 24시간 이상 고정한 후 상기완 용액으로 세척하였다. 2% Osmium산으로 24시간 다시 고정한 후 알콜 농도 상승순으로 탈수하여 propylene oxide로 완전 탈수하고 Epon 812에 포매하였다<sup>(8)</sup>. 초박 절편은 Sorvall MT-2B형 ultramicrotome으로 glass knife를 사용하여 민든 후 포화 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여<sup>(9)</sup> Hitachi HU-11E형 전자현미경으로 관찰하였다.

C. 시험관내 항결핵제의 항균력 관찰 방법

결핵균이 시험관내에서 항결핵제에 접촉할 때는 그 조건에 따라 차이가 있지만 미세구조 변화 정도와 약제를 처음 작용한 결핵균의 viability와는 어떠한 상관적인 영향이 있는지 알아보기 위하여 이를 1% Ogawa 난사면 배지 각 5본에 옮겨 심어 섭씨 37° 항온기 내에서 6주간 배양하면서 그 성장도를 관찰하였다.

결 과

I. 전자현미경에 의한 미세구조 변화

A. 정상 무처리 대조군

대조군의 세포들은 두 개의 전자밀도가 강한 층 및 그 중간에 존재하는 전자투명층으로 구성되어 있는 세포벽(cell wall)내에 세포막(cytoplasmic membrane)이 존재하고 있었으며 세포질에는 크기 약 150~200Å 정도로 측정되는 ribosome 입자 및 세포막에 연결되어 있는 막제로 구성된 mesosome이 관찰되었고 비교적 투명한 부위인 nucleoid에는 많은 섬유상 구조물

(filament)들이 존재하고 있었다(Fig 1).

B. INH 처리군

INH 3일 처리군과 7일 처리군에서는 nucleoid내 filament의 불규칙상 및 양적 감소현상을 나타내었고 세포질에서는 막제인 mesosome에는 그 배열에 이상이 관찰되었으며 겹하여 전자밀도가 강한 원형의 과립들이 나타나기도 하였다(Fig. 2).

또한 14일 처리군에서는 상기 변화 이외에도 세포질에 다수의 공포들이 관찰되었는데 세포벽 및 세포막의 변화는 각군 공히 관찰되지 않았다(Fig. 3).

C. PAS 처리군

PAS를 3일 및 7일 동안 처리한 초기 변화는 INH 처리군과 유사하여 nucleoid내 섬유상 구조물의 불규칙상과 mesosome 막제배열의 이상 및 세포질내 거대한 공포의 출현이 관찰되었으나 (Fig. 4) 14일 처리군에서는 상기한 변화 이외에 nucleoid내 섬유상 구조물의 thickening이 겹하여 관찰되었다. 세포의 외부 막제인 세포벽 및 세포막의 변화도 비교적 잘 보존되어 있는 상태로 관찰되었다 (Fig. 5).

D. SM 처리군

SM 처리군에서 관찰된 소견은 세포벽 및 세포막은 잘 보존되어 있는 상태로 관찰되었으나 nucleoid내에 존재하는 섬유상 구조물도 대조군과 비하여 별 특이한 변화는 없었으나 세포질에 다수의 공포가 나타나고, ribosome 입자들이 변성되어 분명한 입자상의 구조로 관찰하기가 어려웠다 (Fig. 6).

E. INH, PAS, SM의 교차 처리군

3종 항결핵제를 각기 순서로 달리하여 교차 처리한

제 1 표, 시험관내 항결핵제 단독작용 후 균배양 성적

처리기간 처리약제	배 양 기 간						
	1 주	2 주	3 주	4 주	5 주	6 주	
INH 0.2mcg/ml	3일	-	-	+	++	+++	++++
	7일	-	-	+	++	+++	++++
	14일	-	-	-	-	±	+
PAS 2.0mcg/ml	3일	-	-	+	++	+++	++++
	7일	-	-	+	++	+++	++++
	14일	-	-	+	+	+	+
SM 2.0mcg/ml	3일	-	-	+	++	+++	++++
	7일	-	-	+	++	+++	++++
	14일	-	-	±	+	++	+++
대 조 군	-	-	++	++	+++	++++	

- : Negative      + : 균집락 50개 이하      ++ : 균집락 50~100개      +++ : 균집락 100개 이상

제 2 표, 시험관내 항결핵제 각 3일씩 교차작용 후 균배양 성적

배양기간 약제교차 처리순서	1 주	2 주	3 주	4 주	5 주	6 주
INH→PAS→SM	-	-	+	++	++	++
INH→SM→PAS	-	-	+	+	+	+
PAS→SM→INH	-	-	+	+	+	+
PAS→INH→SM	-	-	-	-	±	+
SM→PAS→INH	-	-	+	+	+	+
SM→INH→PAS	-	-	±	+	+	+
대 조 군	-	-	++	++	+++	+++

균에서의 미세구조 변화는 대동소이하게 나타났는데, 그 변화 양상은 세포막 및 세포벽이 비교적 잘 보존되어 있는 반면 nucleoid 내섬유상 구조물의 불규칙상 내지는 thickening, 다수의 거대한 공포출현, mesosome 구성막제의 disorder 및 세포질내에서 전자밀도가 강한 파립이 관찰되었고 곁하여 ribosome 입자들이 불분명하여 개개의 입자로서 관찰하기 어려웠다 (Fig. 7, 8, 9).

II. 약제처리후 균의 배양성적

항결핵제의 단독작용 기간별, 약제별 배양성적은 제 1 표와 같다.

실험군 전균에서 2주동안이나 약제에 작용시켰으나 균의 viability는 소실되지 않았으며 대조군 보다 성장이 지연되는 것으로 관찰되었다.

INH의 경우 14일간 노출시킨 것에는 배양 제 5주까지는 균집락의 형성이 관찰되지 않았으나 제 6주에 수개의 균집락이 관찰되어 성장이 지연된 것을 관찰할 수 있었다.

교차작용후의 배양성적은 대조군에 비해 성장이 지연되는 경향을 보였으며 PAS→INH→SM 순의 교차처리균에서 배양 제 5주에 균집락의 형성이 관찰되었다. (제 2 표)

고 찰

결핵균은 전형적으로 약간 구부러진 간균으로서 길이 2~4μ 넓이 0.2~0.5μ 정도이며 전자현미경하에서는 다른 세균과 같이 glycopeptide층을 가진 두꺼운 벽인 세포벽을 갖고 있으며 거대한 층판구조로된 mesosome을 갖고 있다. 제일 외측에 있는 세포벽(cell wall)에 인접한 내부에는 세포막(cytoplasmic membrane)이 있으며 균체의 내부에는 DNA로 간주할 수 있는 미세한 섬유상 구조물을 갖는 핵이 있고 여기에 접해있는

세포질에는 ribosome 입자가 가득 차 있다.

INH는 항균력이 강한 일차항결핵제로서 임상적으로 실제 많이 사용되고 있으나 아직 그 작용기전이 명확하지 않다. 이에 대하여는 여러가지 설이 있는데 Youatt가 서술한 바를 살펴보면 INH와 결핵균이 접촉하면 그 흡수와 관련된 색소생성 및 축적현상이 생겨나 이러한 현상이 작용기전과 연관이 있을 것이라는 것과 soluble carbohydrate가 균체내에 축적하는 사실과도 어떤 관계가 있을 것이며 곁하여 결핵균의 phosphate ester의 축적 및 지질성분의 변화를 야기하고 이러한 변화는 세포의 투과성에도 이상을 초래하여 아마도 세포벽의 구조에도 어떠한 변화가 있을 것이라 하였다. 또한 <sup>32</sup>P의 흡입이 INH에 의하여 저해되는 것으로 미루어 보아 핵산의 합성이 저해될 것이며 이에 따라 단백질합성도 저해받을 것이라 추측하였다(6).

결핵균에 ethambutol을 처리했을 때 나타나는 미세구조 변화는 여러가지 형태의 소공포가 출현하고 핵의 구조는 불규칙하며, 섬유상 구조물의 감소, mesosome의 막제 배열에 이상을 초래하고 곁하여 그 막의 신장(伸長)이 관찰되는데 이때 세포벽 및 세포막은 잘 보존되어 있는 상태로 나타난다고 하였다(10).

본 실험에서 INH 처리균에서의 변화는 nucleoid내 섬유상 구조물의 불규칙상 내지 감소, mesosome 막제 배열의 이상 및 거대한 공포들의 생성으로서 ethambutol에 의한 변화와 유사하였다. 이러한 사실로 미루어 보아 INH의 작용점은 Ethambutol의 작용점과 같다고 할 수 있다. 그러나 INH가 ethambutol과 비교하여 항균력이 현저히 강한 것을 생각할 때 그 작용점과 작용기전에 어떤 차이가 있을 것으로 기대되며 세포질에서 관찰된 전자밀도가 강한 파립은 색소축적현상과 어떤 연관이 있지 않을까 사료된다.

PAS의 작용기전도 잘 알려져 있지 않으나 SM이나 INH와 병합하여 사용할 경우 그 항균력이 현저히 증

가하며 겹하여 내성균의 출현을 지연시킨다고 알려져 있다. PAS를 처리한 균주들의 미세구조 변화에서 주목할 점은 nucleoid내 섬유상 구조물의 thickening 현상이 나타났다는 점이다. 이러한 변화양상이 PAS의 작용기전과 어떤 상관관계가 있는지는 추후 추적할 만한 문제라고 생각된다.

Kanamycin을 결핵균에 처리했을 경우 그 초기에 세포질의 변화가 나타나는데<sup>(11)</sup> 일반적으로 세포질 과립이 커지며 세포에 붕괴가 일어나 결손부위가 관찰되며 시간이 경과하면 세포질에 공포화 현상이 나타나고 핵의 섬유상 구조에도 변화를 인식할 수 있는데 이러한 조건들은 Kanamycin의 작용이 ribosome과 어떤 관계가 있다고 추정하고 있다. SM은 ribosome과 결합하여 mRNA-tRNA-ribosome간의 정상적인 작용을 방해하는 잘 알려진 사실이며 polypeptide chain의 elongation 및 extension을 방해한다는 보고와<sup>(12)</sup> ribosome cycle의 최초과정인 initiation을 block시킨다는 보고도 있다<sup>(13)</sup>.

본 실험에서 관찰된 SM에 의한 세포질의 변성은 기본적으로 존재하는 ribosome들이 그 기능을 수행하지 못하고 따라서 그 원래의 형태를 유지 못한 것으로 생각되며 세포질에 나타나는 다수의 공포들도 또한 타 연구자들의 결과와 부합됨을 알 수 있었다.

INH, PAS, SM 등 3종 약제를 서로 선후하여 교차처리한 군에서는 세포벽 및 세포막은 비교적 잘 보존되어 있으나 섬유상 구조의 불규칙상 내지는 thickening, 공포출현 mesosome 막계의 disorder 및 전자밀도가 강한 과립출현 등의 변화가 관찰되었는데 이는 INH에 의한 핵물질의 변화와 SM에 의한 세포질 변화가 동시에 나타나고 겹하여 PAS가 항균력을 증가시켰기 때문이라 생각된다. 각 약제의 작용점이 서로 다른 것으로 생각되지만 3종 항결핵제 중 어떤 것을 먼저 처리하여도 미세구조 변화가 동일하였던 점은 매우 흥미로운 사실이다.

시험관내의 실험에서 각종 단일약제를 시간별 (3일 7일, 14일)로 처리했을 때 INH 14일 처리군을 제외하고는 공히 배양제 3주에서 성장상을 나타내었다. 이는 INH를 장기처리 하였을 때에만 항균력을 나타내고 또한 3종 약제중 항균력이 제일 강한 것임을 알 수 있었다. 3종 약제를 교차처리한 군에서도 PAS→INH→SM순의 처리군을 제외하고는 공히 배양제 3주에서 성장상을 나타내었다. PAS→INH→SM순으로 처리한 경우는 PAS 선처리후 INH, SM을 처리하면 이들에 의한 PAS의 상승효과 작용에 기인한 것으로 사료된다.

이상의 실험결과 및 타연구자들의 보고를 종합하여

볼 때 INH, PAS, SM 등 일차 항결핵제를 처리했을 경우 미세구조상 심한 변화를 야기하지만 각군 공히 배양제 3~5주에서 성장상을 나타냈다는 점은 미세구조상의 변화만으로 결핵균의 사멸을 측정하기 어려우며 겹하여 농도상의 문제점도 있으나 짧은 기간 동안에 상기 약제들을 결핵균에 접촉시켰을 경우 결핵균의 사멸을 기대하기는 어렵다고 할 수 있다.

## 결 론

일차항결핵제로 알려진 Isoniazid, Paraaminosalicylic acid 및 Streptomycin의 결핵균에 대한 항균작용의 기전을 규명코져 결핵균의 미세구조 변화와 그 일차작용점을 관찰하고 또한 이들의 시험관내 항균력과의 상관적인 영향을 검토 정리코져 전자현미경 및 시험관내 실험관찰을 한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 약제 단독처리군의 미세구조변화는 INH에서 핵물질의 감소 및 전자밀도가 강한 과립의 출현, PAS에서 핵내 섬유상 구조물의 thickening 및 mesosome 막배열의 이상, SM에서 ribosome입자의 불분명 및 세포질의 변성이 관찰되었다.
2. 3종약제 교차처리군에서는 각 약제 단독 처리한 미세구조 변화양상들이 공존하는 것으로 관찰되었다.
3. 단독 및 교차처리군 등 전군을 통하여 세포벽 및 세포막은 잘 보존되어 있는 상태로 관찰되었다.
4. 시험관내 배양성적은 전 처리군을 통하여 배양제 3~5주에서 성장상을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

- (1) Umezawa, H., Mizuno, S., Yamazaki, H. and Nitta, K. (1968); Inhibition of DNA-dependent RNA synthesis by rifamycin, *J. Antibiotics Ser. A.* 21 : 234.
- (2) Yamaki, H. and Tanaka, N. (1963); Effects of protein synthesis inhibitors on the lethal action of Kanamycin and Streptomycin, *J. Antibiotics, Ser. A.*, 16 : 222.
- (3) Davis, J., Gilbert, W. and Gorini, L. (1964); Streptomycin suppression and the code, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51 : 883.
- (4) David, H.L., Takayama, K., and Goldman, D.S. (1969); Susceptibility of mycobacterial D-alanyl-D-alanine synthetase to D-cycloserine,

Am. Rev. Resp. Dis., 100 : 579.

- (5) Forbes, M., Kuck, N. A. and Peets, E. A. (1965); Effect of ethambutol on nucleic acid metabolism in *Mycobacterium smegmatis* and its reversal by polyamines and divalent cations, J. Bacteriol., 89 : 1299.
- (6) Youatt, J. (1969) : A review of the action of isoniazid, Am. Rev. Resp. Dis., 99 : 729.
- (7) 山口淳二 ; 結核菌の微細構造, 結核, 45 : 430, 1970.
- (8) Luft, J. H. (1961); Improvements in epoxy resin embedding methods, J. Biophy. Biochem Cytol., 9 : 409.
- (9) Reynolds, E. S. (1963); The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy, J. Cell Biol., 17 : 208.
- (10) 岡捨己(1972) : カナマイシンの結核菌微細構造に對する作用とその作用機作に關する實驗, 抗酸菌病研究所報, 24 : 43.
- (11) 岡捨己, 山口淳二, 有路文雄, 眞所弘一, 熊野伸子, 大泉耕太郎(1971) ; 抗結核劑の作用機作と結核菌の微細構造, 抗酸菌病研究所報, 23 : 146.
- (12) Davis, B. D. (1970) : Use of antibiotics in the study of the ribosome lecture dedicated to the memory of alex gourvich, Progress in Antimicrobial and Anticancer chemotherapy, Proc. 6th Int. Cong. Chem., Univ. of Tokyo Press p. 10.
- (13) Schlessinger, D., Mangiarotti, G. and Apirion D. (1967) : The formation and stabilization of 30S and 50S ribosome couples in *Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci., 58 : 1782.

### 사진부도설명

- Fig. 1. 정상무처치 대조군 결핵균의 미세구조. (×65,000)
- Fig. 2. INH 7일 처치군 결핵균의 미세구조. (×65,000)
- Fig. 3. INH 14일 처치군 결핵균의 미세구조. (×50,000)
- Fig. 4. PAS 7일 처치군 결핵균의 미세구조. (×50,000)
- Fig. 5. PAS 14일 처치군 결핵균의 미세구조. (×60,000)
- Fig. 6. SM 14일 처치군 결핵균의 미세구조. (×50,000)
- Fig. 7. INH→PAS→SM순으로 교차처치된 결핵균의 미세구조. (×83,000)
- Fig. 8. SM→INH→PAS순으로 교차처치된 결핵균의 미세구조. (×83,000)
- Fig. 9. PAS→INH→SM순으로 교차처치된 결핵균의 미세구조. (×43,000)



