

Haemophilus influenzae 感染症治療における

ペニシリン系抗生物質の意義について (第3編)

Haemophilus influenzae に対する Ampicillin, Chloramphenicol ならびに Kanamycin の抗菌作用についての電子顕微鏡学的観察

生方公子・沢井 稔・紺野昌俊

帝京大学医学部小児科学教室

(昭和53年6月2日受付)

緒言

第2編¹⁾で最近分離された *Haemophilus influenzae* (以下 *H. influenzae* と略) の各種ペニシリン系抗菌薬, Chloramphenicol (CP) および Kanamycin (KM) 等に対する薬剤感受性成績についてしらべると共に, 各抗菌薬の殺菌効果についても検討し報告した。それらの成績によれば, *H. influenzae* に対する殺菌効果は KM が最も優れ, 次いで CP であり, ペニシリン系抗菌薬は最小発育阻止濃度 (MIC) は優れているにもかかわらず, 殺菌力の面で最も劣っていることが明らかとなった。

H. influenzae でのこのような各種抗菌薬の殺菌力の相違を, 菌の形態変化の面から捉え比較した報告はほとんど見当らず, わずかに Ampicillin (ABPC) の作用についての報告が散見されるだけである^{2,3)}。そこで私たちは, ペニシリン系抗菌薬の中からは ABPC を選び, *H. influenzae* に ABPC, CP および KM を作用させた際の, 菌の経時的な形態変化を, 電子顕微鏡学的に比較観察したので報告する。

材料と方法

1. 使用菌株

第2編で抗菌薬の殺菌効果をしらべるために用いた化膿性髄膜炎患児由来の *H. influenzae* TK167株 (type b) を使用した。

2. 使用培地

培地は Bacto Tryptic Soy Broth (Difco) を 121°C, 15 分高圧滅菌後 Fildes enrichment (Difco) を 5% の割合に加えたものを使用した。

3. 電子顕微鏡用試料作製

H. influenzae の対数増殖期の菌に対して, ABPC, CP および KM を各々添加し, 添加後 1 時間, 2 時間, 3 時間および 6 時間後に電子顕微鏡用試料を作製した。なお TK 167 株の MIC は, 寒天平板法で 10⁶/ml の接種菌量の時 ABPC に 0.39 μg/ml, CP に 1.56 μg/ml, KM に

3.13 μg/ml である。CP と KM については, MIC 濃度の薬剤を作用させたが, ABPC については第2編で述べた光学顕微鏡下における菌の形態変化の成績から, 菌がフィラメントを形成し始める 0.2 μg/ml (1/2 MIC) と菌がスフェロプラストになり始める 3.13 μg/ml (8MIC) を作用させた時の試料を作製した。

試料の作製方法は, 各観察時間において, 培地に直接 1% になるように glutaraldehyde を加えて 4°C に 30 分ほど静置した後遠心集菌した。これは薬剤の作用によってもろくなった菌体が遠心時に損傷を受けるのを防ぐために行なったものである。菌はさらに 2% の glutaraldehyde 液 (0.1 M phosphate buffer で pH 6.1 に調整) に浮遊させ, 4°C で 3 時間固定し, その後 phosphate buffer で 3 回遠心洗浄した。次いで 1% の osmium tetroxide (veronal acetate buffer で pH 6.1 に調整) で 4°C, 1 晩固定した。翌日エチルアルコール・アセトン系列により脱水, Epon 812 に包埋した。Portor Blum MT-1 型ミクロームにより超薄切片を作製し, uranyl acetate と lead citrate の二重染色を施した後, 日立 11E 型電子顕微鏡で観察した。

結果

1. 薬剤無処理 (コントロール) における *H. influenzae* の形態

Fig. 1 には薬剤無処理の対数増殖期の *H. influenzae* の超薄切片像を示した。細胞質内にはリボゾーム粒子が均一に広がり, 核質部分に相当する構造も均一に散在している。菌体の最外層には 3 層構造を有する細胞壁, その内側には 2 層の細胞質膜が認められる。

2. ABPC を作用させた時の *H. influenzae* の形態変化

Fig. 2 は ABPC を 1/2 MIC 濃度 (0.2 μg/ml) で 3 時間作用させた時の菌の変化である。このような変化は ABPC を作用させた後 1 時間の像においてもまた 6 時間の像においてもほぼ同様で, 菌はフィラメント化するだ

けで、細胞質内はもちろんのこと、細胞壁にもほとんど変化が認められなかった。このような像は MIC 濃度でもほぼ同様で、少なくとも薬剤処理後 6 時間までの間においては溶菌を示すような像はみられなかった。

ABPC を MIC の 8 倍濃度 (3.13 $\mu\text{g/ml}$) で作用させた際の菌の形態変化は、作用後 1 時間でスフェロプラストを形成し始めるが、細胞の内部構造は比較的均一で、コントロールのそれと変りなく、また細胞壁もほとんど完全な形で認められる。Fig. 3 には薬剤作用後 3 時間の像を示したが、スフェロプラスト化した菌はさらに大きくなり、5~7 μm の球状となって細胞質内に空胞が出現し始める。細胞壁にはほとんどころに bleb 様構造も出現し、壁の脆弱化が推測されるが、スフェロプラスト全体に細胞壁は残っているのが観察された。視野全体の細胞をみても、溶菌している細胞はほとんど認められなかった。薬剤作用後 6 時間目の像は Fig. 4a に示したが、3 時間目の像に較べて菌の損傷が進んでいると思われる細胞は少なく、やはりほとんどの菌が溶菌することなく細胞実質を有し、また Fig. 4a の一部を拡大した Fig. 4b のように、不完全ながらも細胞壁を保持していた。溶菌像は全視野で 1~2 割の細胞に認められたが、細胞壁の剝離したプロトプラストの像はみ出されなかった。

3. CP を作用させた時の *H. influenzae* の形態変化

Fig. 5 は CP を MIC 濃度 (1.56 $\mu\text{g/ml}$) で 1 時間作用させた時の切片像である。Fig. 1 のコントロールに較べ、核質部分が細胞の中心に凝集し始め、細胞質内には電子密度の多少高い凝集様の像がみられ、それとはほぼ同じ大きさの膜を欠いた空胞が出現する。細胞壁や細胞質膜にはほとんど変化がみられない。2 時間後になると、Fig. 6 に示したように、上述した変化の他に細胞質内に矢印で示したように、細胞の長軸の末端の位置に大きな空胞が出現し、中に顆粒がヒモ状になったような電子密度の高い構造が観察された。3 時間後になると細胞質内の変化は Fig. 7 のようにさらに進行し、核質部分の凝集は一段と強く、不定形な電子密度の非常に高い像が観察された。また細胞質もよりコントラストを増し、空胞は融合して大きな空胞像としてみられた。この他に、3 時間後の試料では一部の菌で細胞の実質の失なわれたと思われる像もみられた。

3. KM を作用させた時の *M. influenzae* の形態変化

KM を MIC 濃度 (3.13 $\mu\text{g/ml}$) で 1 時間作用させた時の形態変化を Fig. 8 に示す。矢印で示した長軸の末端の細胞質の部分に、電子密度はリボゾームと同じ程度であるが、顆粒がみられずもっと極小微細な物質でつまったような部分がどの細胞にも出現する。この時間では他の細胞質構造や細胞壁には著明な変化はみられない。

Fig. 9 は KM を作用させた 2 時間後の像であるが、1 時間の像と全く様子を異にしている。前述したように、菌体の長軸の末端の部分にみられる極小微細な構造物の他に、その周囲には電子密度の高い比較的大きなリボゾームが凝集したような顆粒が集合しているのが観察され、その他の細胞質部分は全体的に極めて希薄になり、その部分には正常なリボゾーム像も DNA 像も認められない。また細胞壁には明らかな危裂部位はみられない。3 時間後になると、菌は大部分溶菌し、細胞壁だけ残った像が多数観察された。細胞実質の残っている像はほとんどみられず、細胞の受けた損傷の強いことが推測された。Fig. 10 には先端の細胞壁が破れて菌体内内容物の流出したと思われる像を示した。KM を作用させた時に生ずる *H. influenzae* の溶菌像は、このように長軸の末端の極小微細な物質でつまったようにみえる部分から溶菌する像が多くみられた。

考 察

グラム陰性桿菌に対するペニシリン系やセファロスポリン系抗菌薬の抗菌作用を、菌の形態変化の面から追求した研究は既に多数報告がみられる。一般的にはどの薬剤によっても MIC の付近では菌のフィラメント化、さらにそれ以上の濃度では菌のスフェロプラスト化ないしはプロトプラスト化が起り、細胞壁の脆弱部分から菌体内内容物が流出して溶菌に至り菌は死滅する。ただしこのような形態変化の生ずる薬剤濃度は、それぞれの薬剤によってかなりの相違が認められる。すなわち、かつて私たちが *E. coli* についての成績で指摘したように、フィラメント形成の幅が狭く、スフェロプラストの形成が速やかに起こる薬剤のほうが、フィラメント形成の幅の広い薬剤よりも殺菌力が強く、菌の形態変化と薬剤の殺菌作用の間に相関のあることが認められている⁴⁾。

さて、第 2 編¹⁾で *E. coli* の場合と同様に、*H. influenzae* に対するペニシリン系抗菌薬の作用を、菌の形態変化と殺菌力の面から検討した成績を述べたが、薬剤によって殺菌力にかなり差のあることがみ出された。それらの中では ABPC がフィラメント形成の幅も狭く、殺菌力も最も優れていたが、その際同時に観察した培地の混濁の有無は、 16°C の接種菌量では MIC 以上の薬剤を含む液体培地中でも時間の経過とともに濁度の上昇が認められた。さらにそれらの塗抹標本および位相差顕微鏡下での観察によって、菌はフィラメントやスフェロプラストを形成しているだけで、ほとんどの菌が溶菌していない現象もみ出された。このように溶菌し難い像は *E. coli* 等ではみられなかった現象である。同じような現象は BOTTONE 等⁵⁾によっても指摘されているが、本編ではこの現象を菌の微細構造の面から追求し、解明し

ようと試みた。

結果の項に示したように、1/2 MIC 濃度の ABPC の作用では、菌は長いフィラメントを形成するだけで、細胞壁や細胞質にはほとんど損傷がみられず、また 8 MIC 濃度では、菌はスフェロプラスト化し、時間の経過に伴い細胞壁に bleb 様構造が出現した。従って、細胞壁には部分的に損傷のあることが推測されたが、薬剤作用後 6 時間でも 80~90% の菌は溶菌しておらず、細胞壁の残存が認められ、損傷の弱いことがうかがわれた。

H. influenzae の薬剤作用時における形態変化については、松本⁹⁾および KLEIN 等²⁾によって若干の報告がなされているが、私たちがここに報告した所見とは多少異なっているようである。松本によれば、5 μ g/ml の ABPC を作用させるとプロトプラストや溶菌像がみられたと報告しており、KLEIN 等は MIC の 10 倍濃度でもフィラメント形成がみられたと報告している点等である。

一方、私たちが観察した成績は、寒天平板法により感受性を測定する際にみられる菌膜の形成と結びつくのではないかと考えられた。すなわち接種菌量が多い場合には、ABPC 含有培地上でも単にフィラメントやスフェロプラストを形成するだけで体積は増大し、それが肉眼では菌膜となってみだし、接種菌量が少なければ菌は同様に変化しても体積増大が肉眼で判定出来ず、その点を MIC と判定していると考えられるのである。

このことは、Fildes enrichment を加えた培地の浸透圧が 341 mOsm/kg と通常の培地に比して多少高いために溶菌し難いこともあるが、*H. influenzae* のスフェロプラストそのものが *E. coli* や *Proteus mirabilis* のそれと較べてより低浸透圧に耐え得るとする報告もある⁹⁾。そのようなことから他にも数株の *H. influenzae* について検討したが、すべての株で ABPC 作用によっても菌は溶菌し難いことが判明し、臨床分離株ではスフェロプラストの形成が一般的な現象を推測された。なお临床上極めて大切なことは、このようなスフェロプラストが再増殖可能であるか否かということであり、このことに関しては既に BOTTONNE 等⁵⁾が寒天培地上の観察から再増殖可能であることを推測しているが、私たちが位相差顕微鏡下あるいは電子顕微鏡下で彼等の推測が正しいことをみ出している。それらについては別に第 4 編で述べるとして、このことから考察しても MIC 以上の濃度で形成されたスフェロプラストは溶菌し難く viability を失っていないと考えられた。ABPC の作用によって形成されたスフェロプラストがなぜ溶菌に至りにくいのかについては、今後 SPRATT⁷⁾の方法による細胞壁中の protein と薬剤の結合性の面から検討を加えたいと考えている。

次に CP を作用させた時の *H. influenzae* の形態変化について考察したい。従来 CP の作用機序に関しては、*E. coli* を用いて詳しく研究されており、その第 1 次作用点は蛋白合成系の 50S リボゾーム部分に付着してペプチド鎖の伸長を阻害すると考えられている。このような CP の菌に及ぼす影響については、既に MORGAN 等⁸⁾によって *E. coli* で詳細に観察されているが、彼等の成績と私たちが *H. influenzae* に CP を作用させた際の形態変化を比較してみると、膜構造を持たない小空胞の出現、核質部分の凝集、リボゾーム等の変化は、非常によく一致した形態変化であった。しかし、Fig. 7 に示したような変化を伴った *H. influenzae* は、第 2 編で述べた殺菌効果の成績と併せて考えると、もはや viability は失っていると推測しているが、*E. coli* の場合には一部の菌で薬剤除去後に元の正常な桿菌に戻りうると彼等は報告しており、*H. influenzae* についても今後どの程度までの CP 濃度を作用させた時に再増殖が可能なのか、その確認が必要であると考えられた。

最後に KM を作用させた時の形態変化について考察したい。KM の第 1 次作用点はリボゾームの 30S 粒子にあり、蛋白合成の initiation を阻害すると考えられている。KM を作用させた際の菌の形態変化は、若干の菌種^{9,10)}についてなされているが、腸内細菌や *H. influenzae* 等についてはほとんど検討されていない。ただしアミノ配糖体系薬剤のうち Gentamicin (GM), 3',4'-Dideoxykanamycin B (DKB), Amikacin (AMK) 等については、*E. coli*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa* に対する作用を形態変化の面から追求した成績は既にあり、それらによると、菌種や菌株によってその形態変化には多少の相違がみられているようである^{11,12,13,14)}。すなわち、IIDA 等¹¹⁾は DKB の作用により *E. coli* や *Pseudomonas aeruginosa* では細胞壁部分に多数の bleb 様構造の出現を報告しており、中沢等^{12,13,14)}は *Pseudomonas aeruginosa* においては GM や DKB の作用した細胞壁部分の cut 像やその部分からの菌体内内容物の流出像を認めているが、*Serratia* では細胞壁の cut 像があまりみられなかったと報告している。私たちが観察した *H. influenzae* に対する KM の作用では、溶菌像が 1~2 時間という極めて早い時期に出現したことで DKB に似ていたが、細胞壁の著しい cut 像はみられず、また細胞内の変化は *Serratia* の場合に似ていた。そして、とくに注目したいことは、桿菌の長軸の末端部分に極小微細な物質でつまったような像が出現し、その部分の外側から溶菌していることである。さらに、薬剤作用後 2 時間目で既に細胞質が希薄になった像や溶菌像が多くみられたことは、第 2 編の成績と考え合せると、*H. influ-*

Fig.1 Electron micrograph of *Haemophilus influenzae* No.167 strain. Control bacteria. Bar represents 1 μ m. $\times 60,000$

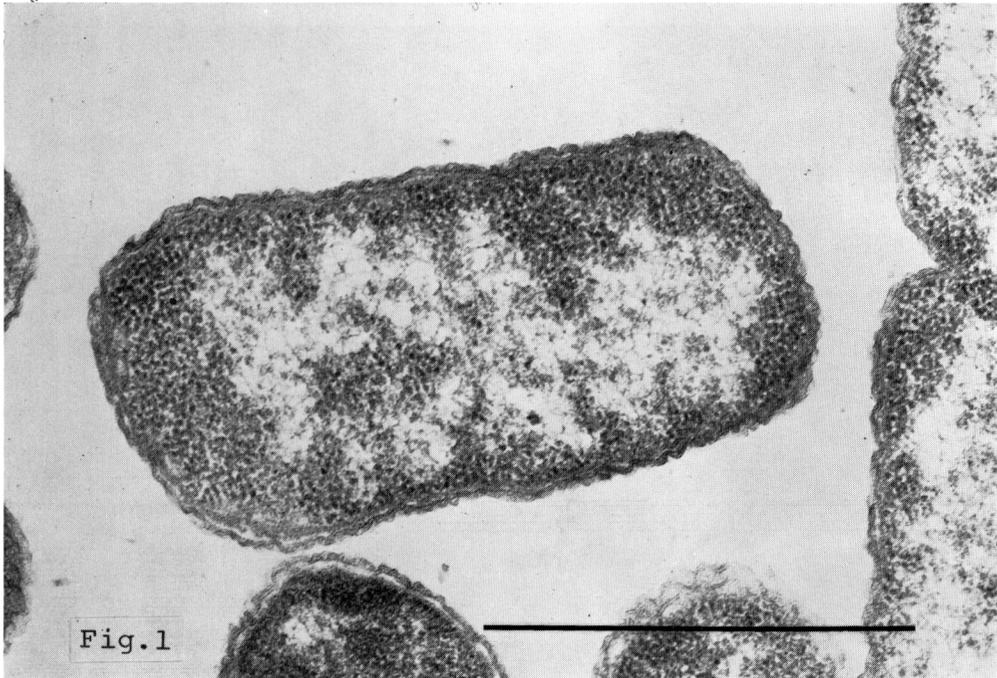


Fig.2 Thin section of *H. influenzae* exposed to 0.2 μ g/ml (1/2 MIC) of ampicillin for 3 hours. The cells markedly elongated. $\times 42,500$

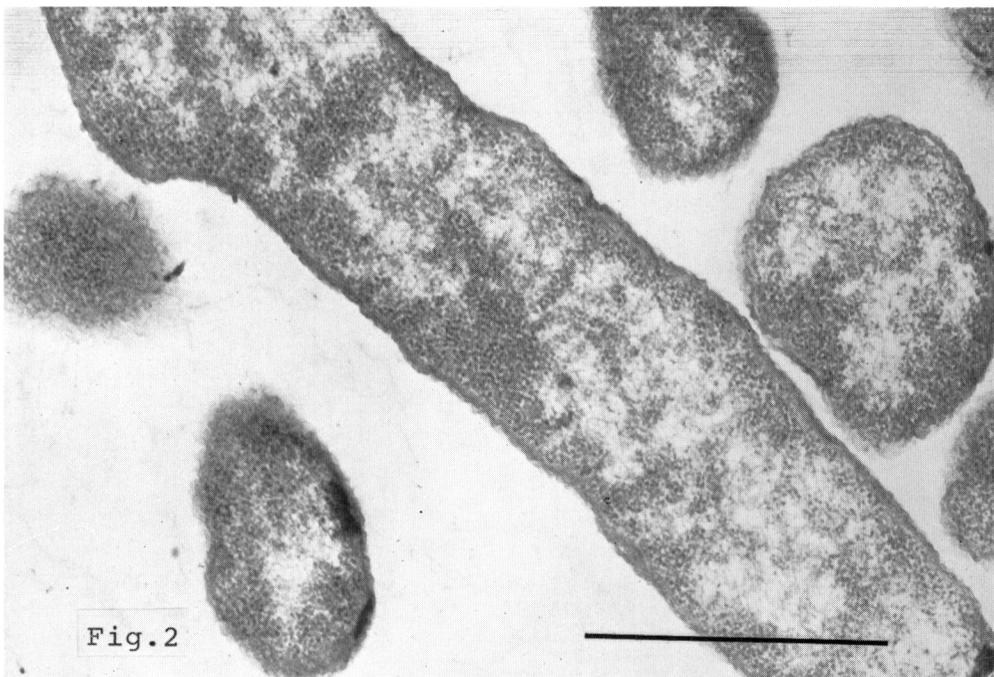


Fig.3 Thin section of *H. influenzae* exposed to 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (8 MIC) of ampicillin for 3 hours. Large spherical bodies were observed. A few blebs on the cell wall and vacuoles in the cytoplasm were shown. $\times 18,630$

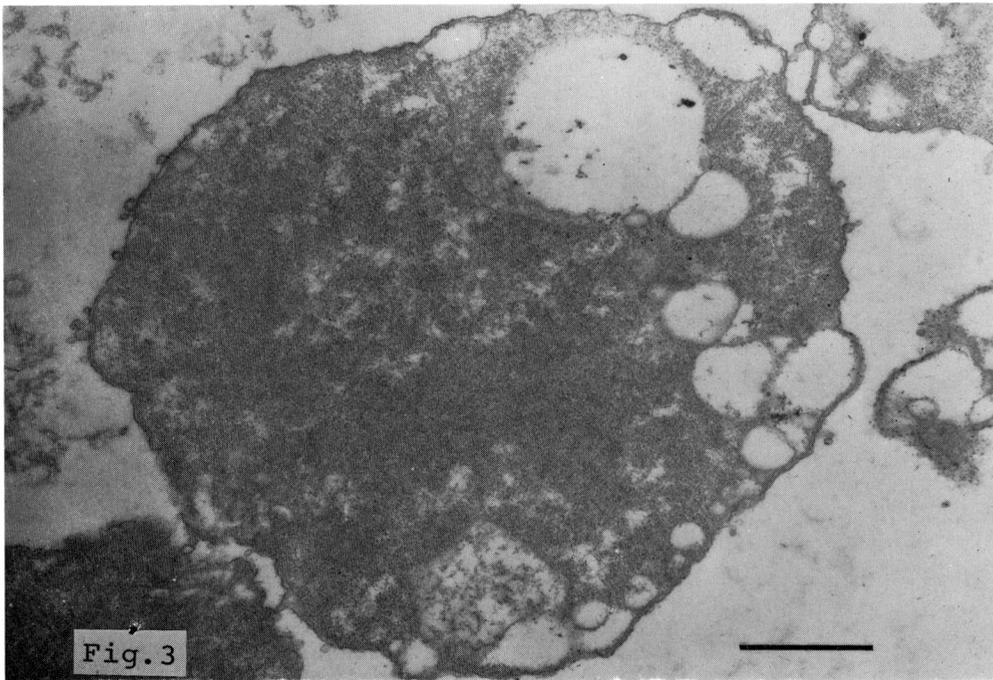


Fig.4 a) Thin section of *H. influenzae* exposed to 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (8 MIC) of ampicillin for 6 hours. $\times 20,250$
b) High magnification of cell wall. Damages of cell wall almost were not shown. $\times 44,550$

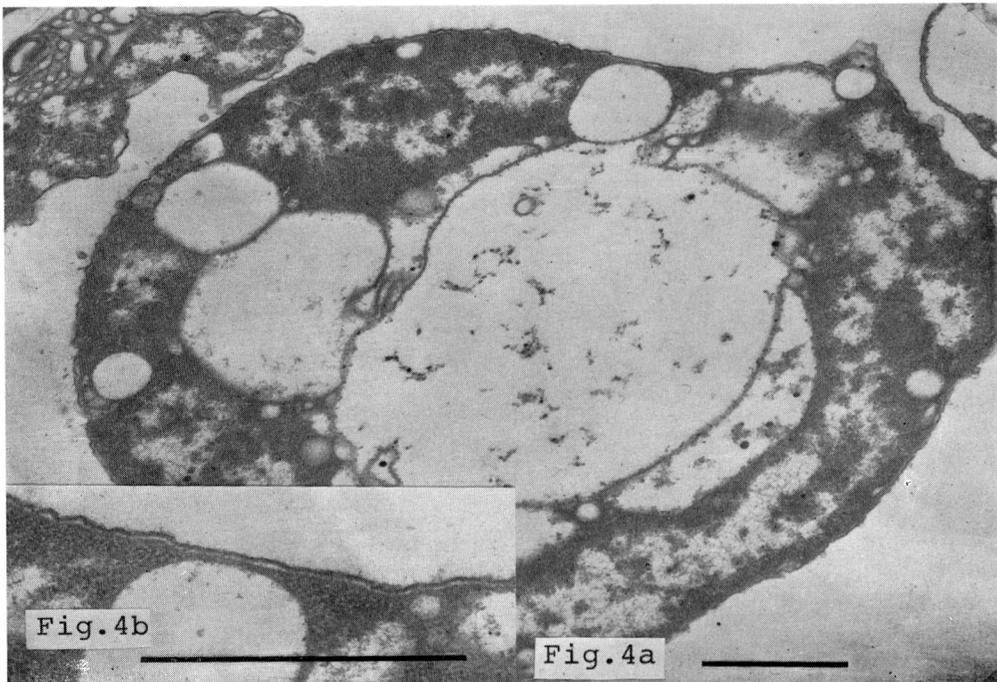


Fig.5 Thin section of *H. influenzae* exposed to 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (MIC) of chloramphenicol for 1 hour. The nuclear material had begun to aggregate at the center of the cell. Cytoplasmic vacuoles devoid of limiting membranes were shown (\uparrow). $\times 72,000$

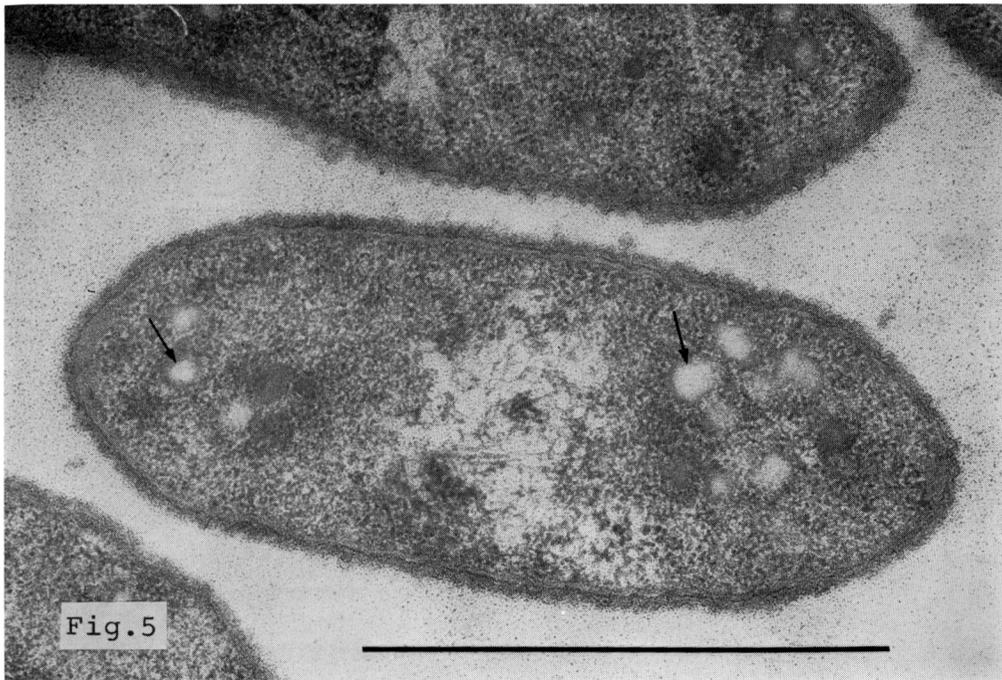


Fig.6 Thin section of *H. influenzae* exposed to 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (MIC) of chloramphenicol for 2 hours. The large clusters tended to be located at the end of the cell (\uparrow). $\times 72,000$

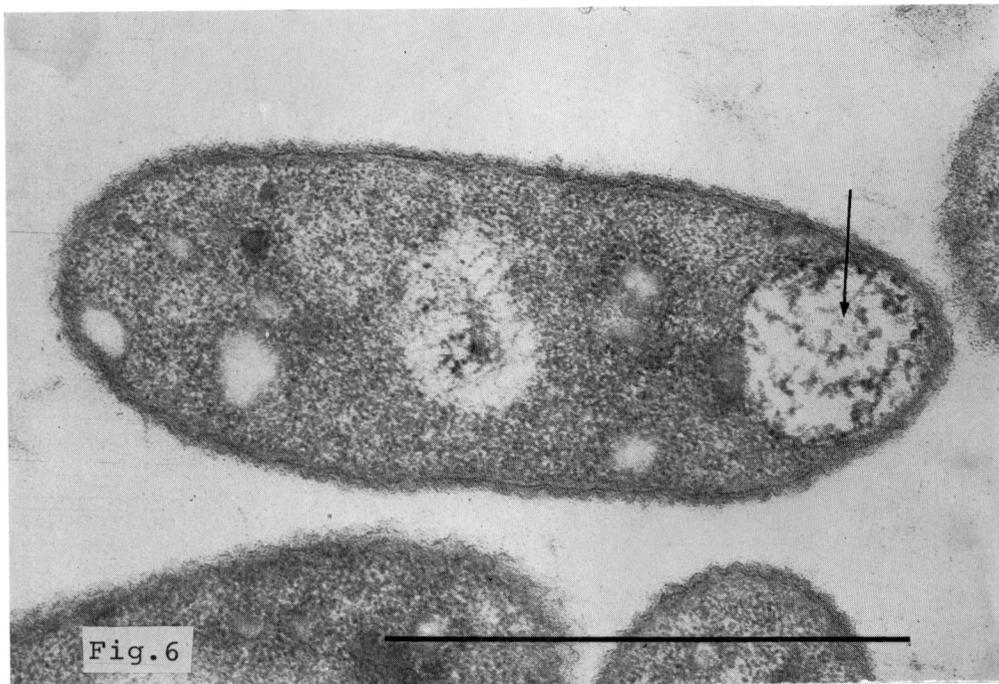


Fig.7 Thin section of *H. influenzae* exposed to 1.56 $\mu\text{g/ml}$ (MIC) of chloramphenicol for 3 hours. The nuclear material was more coarse (\uparrow), and the cytoplasm was finely granular. $\times 62,000$

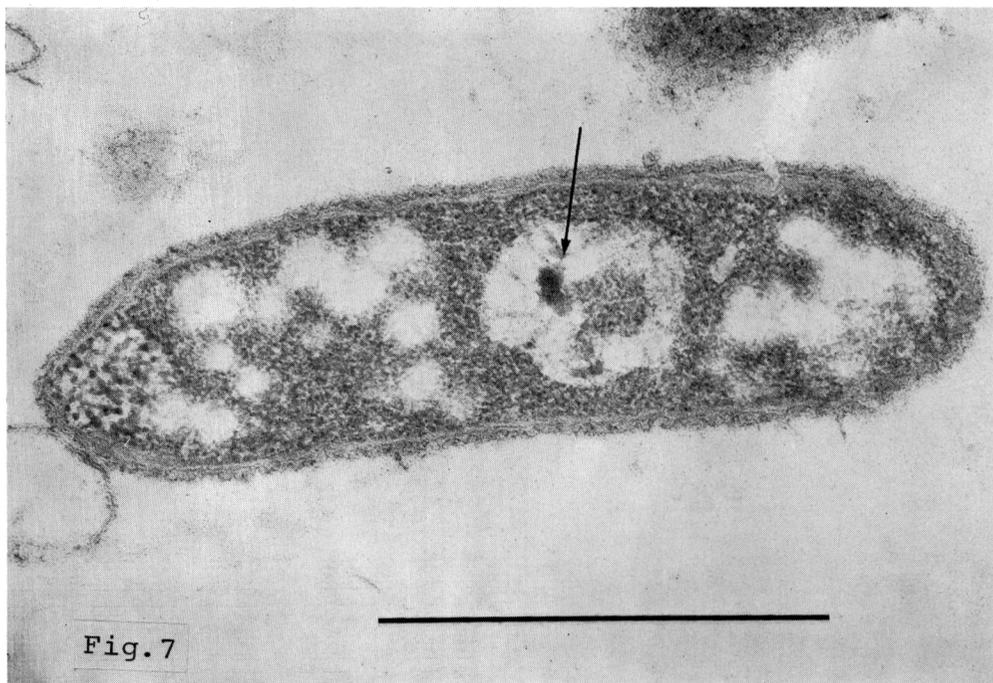


Fig.8 Thin section of *H. influenzae* exposed to 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (MIC) of kanamycin for 1 hour. The structure with uniform electron density were observed in the cytoplasm (\uparrow). $\times 60,000$

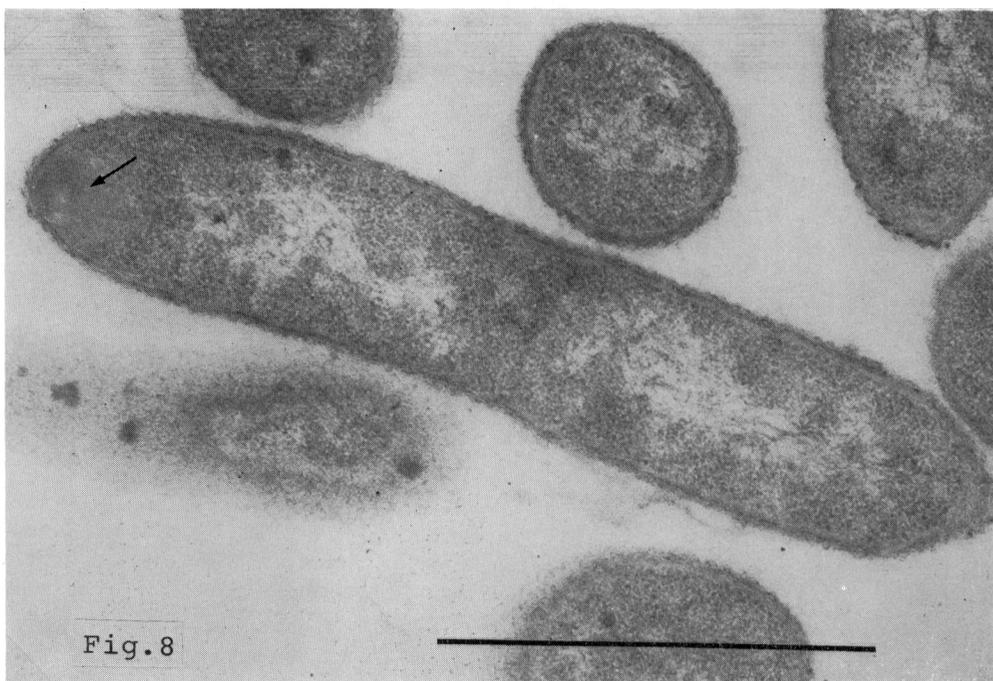


Fig.9 Thin section of *H. influenzae* exposed to 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (MIC) of kanamycin for 2 hours. Thinning of cytoplasm and electron dense granules at the ends of the cell were shown (\uparrow). 60,000

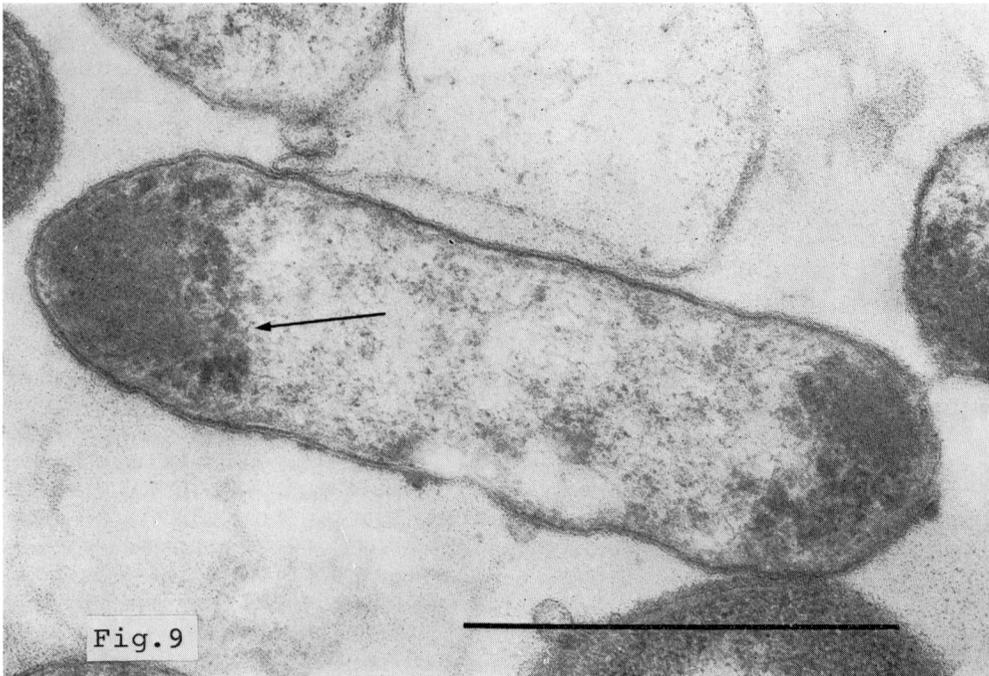
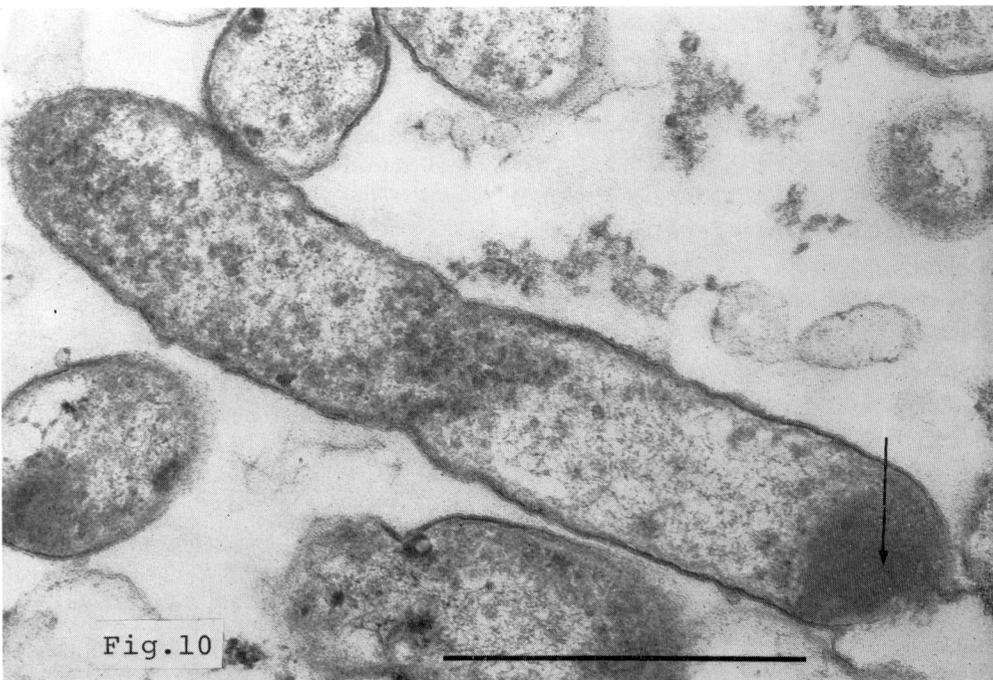


Fig.10 Thin section of *H. influenzae* exposed to 3.13 $\mu\text{g/ml}$ (MIC) of kanamycin for 3 hours. Efflux of the cytoplasm was observed (\uparrow). $\times 50,000$



enzae の損傷の程度は KM の場合が最も強いと考えられた。アミノ配糖体系薬剤の作用が蛋白合成阻害にあるにもかかわらず、細胞壁部分にも強い損傷を与えていることが示唆されたが、菌種による形態変化の差についての再検討と共に、各種アミノ配糖体系薬剤の作用機序についてもさらに詳細に検討すべきではないかと考えられた。

以上、ABPC、CP および KM の *H. influenzae* に対する作用について、主に菌の微細構造の変化から考察を加えた。近い将来本邦においても ABPC 耐性の *H. influenzae* が問題視されようが¹⁾、そのような臨床例に遭遇する時、果してどの薬剤が使用可能であるか、選択をせまられる時期が必ず到来すると思われる。その時のために、本編で述べたことをも含めて *H. influenzae* に対する CP や KM の作用を再検討する必要があることが痛感された。

要 約

H. influenzae に対する Ampicillin (ABPC)、Chloramphenicol (CP) および Kanamycin (KM) の抗菌作用を、電子顕微鏡を用いて菌の微細構造の変化の面から検討し、以下の結果を得た。

1. ABPC の 1/2 MIC 濃度の処理では、菌はフィラメント状に伸長するだけで、細胞壁や細胞質にはほとんど変化がみられなかった。
2. MIC の 8 倍濃度の ABPC 処理では、菌はスフェロプラスト化したのが、6 時間後までの観察ではこのスフェロプラストの溶菌がほとんど認められなかった。また形成されたスフェロプラストには、細胞壁が残存していた。
3. MIC 濃度の CP の処理では、処理後 1 時間で細胞質内に膜構造を有しない小空胞の出現と核質部分の凝集が認められた。2 時間後には細胞の端の部分に大きな空胞、3 時間後には細胞質の density の増強と空胞の融合像もみられた。
4. MIC 濃度の KM 処理では、1 時間後に細胞の長軸の末端に顆粒を有しない極小微細物質でつまった density の一様な構造が出現するが他には変化は認められない。しかし 2 時間後になると、細胞内容物は菌の長軸の末端に片寄り、顆粒状化し、菌の中心部は著しく希薄になっている像が認められた。2～3 時間後には、菌の長軸の末端部分からの溶菌像が多数みられた。検討した 3 剤の中では KM 処理の場合が最も溶菌が早く、強い損傷を菌に与えることが推測された。

引 用 文 献

- 1) 柳瀬義男, 高橋洋子, 生方公子, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について。第 2 編。最

近臨床から分離された *Haemophilus influenzae* に対する各種抗生物質の抗菌作用についての基礎的検討。Chemotherapy 26: 508~516, 1978

- 2) KLEIN, R. D. & G. H. LUGINBUHL: Ampicillin-induced morphological alterations of *Haemophilus influenzae* type b. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11: 559~562, 1978
- 3) 松本慶蔵: インフルエンザ菌性慢性呼吸器感染症の基礎的臨床的研究。感染症学雑誌 48: 117~125, 1974
- 4) 紺野昌俊, 生方公子, 藤井良知: ペニシリン, セファロスポリン C 系薬剤による大腸菌のフィラメント形成並びにその臨床的意義について。第 2 編。基礎的検討。感染症学雑誌 44: 72~85, 1970
- 5) BOTTONE, E. J.; Z. BRANDMAN & S. S. SCHNEIDERSON: Spheroplasts of *Haemophilus influenzae* induced by cell wall-active antibiotics and their effect upon the interpretation of susceptibility tests. Antimicrob. Agents & Chemoth. 9: 327~333, 1976
- 6) ROBERTS, D. E.; A. INGOLD, S. V. WANT & J. R. MAY: Osmotically stable L-forms of *Haemophilus influenzae* and their significance in testing sensitivity to penicillins. J. Clin. Path. 27: 560~564, 1974
- 7) SPRATT, B. G.: Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K 12. Eur. J. Biochem. 72: 341~352, 1977
- 8) MORGAN, C.; H. S. ROSENKRANZ, H. S. CARR & H. M. ROSE: Electron microscopy of chloramphenicol-treated *Escherichia coli*. J. Bact. 93: 1987~2002, 1967
- 9) 今野 淳: 結核化学療法剤の作用機序。結核 52: 661~668, 1977
- 10) NAKAO, M. & S. NAKAZAWA: Cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus* in the presence of protein synthesis inhibitory agents-tetracycline and aminoglycoside antibiotics. Chemotherapy 22: 193~195, 1974
- 11) IIDA, K. & M. KOIKE: Cell wall alterations of gram-negative bacteria by aminoglycoside antibiotics. Antimicrob. Agents & Chemoth. 5: 95~97, 1974
- 12) NISHINO, T. & S. NAKAZAWA: Morphological alteration of *Pseudomonas aeruginosa* by aminoglycoside antibiotics. J. Electron Microsc. 24: 73~86, 1975
- 13) 中沢昭三, 大槻雅子, 中尾雅文, 塚沢志津代, 那波久彰, 二木克己: 3', 4'-Dideoxy-Kanamycin B の細菌学的研究, とくに電子顕微鏡応用による作用機序研究。Chemotherapy 22: 779~785, 1974
- 14) 中沢昭三, 西野武志, 山岸純一: *Serratia marcescens* に関する実験的薬療法。第 3 報。抗菌像。Chemotherapy 25: 372~379, 1977
- 15) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: 本邦で分離された Ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の性状について。Chemotherapy 26: 491~498, 1978

THE SIGNIFICANCE OF PENICILLINS IN THE TREATMENT OF
HAEMOPHILUS INFLUENZAE INFECTION. PART III

Electron Microscopical Observations of Antimicrobial Activities of
Ampicillin, Chloramphenicol and Kanamycin against *Haemophilus influenzae*

KIMIKO UBUKATA, MINORU SAWAI and MASATOSHI KONNO

Department of Pediatrics, Teikyo University School of Medicine, Tokyo

The actions of ampicillin (ABPC), chloramphenicol (CP) and kanamycin (KM) on *H. influenzae* were examined through the observations of changes in the fine structure of the organisms under electron microscope, with the following results:

1. With the treatment of ABPC in 1/2 MIC, the organisms were merely elongated of filamentous shape, and scarcely any changes were observed in their cytoplasm or cell wall.
2. With the treatment of ABPC in 8 times MIC, the organisms became spheroplasts, but lysis of these spheroplasts was hardly noted during observation continued up to 6 hours. The cell walls, moreover, remained in the spheroplasts.
3. With the treatment of CP in MIC, small vacuoles devoid of membranous structure appeared in the cytoplasm 1 hour after treatment, as well as agglutination of nucleoplasm. Two hours after that, large vacuoles appeared in the peripheral parts of the cells. Three hours later, the density of the cytoplasm increased, and fusion of the vacuoles was observed.
4. With treatment of KM in MIC, no change occurred 1 hour after except for appearance of a structure with uniform density packed with ultrafine substances and containing no granules at the end of the long axis of the cell. When 2 hours elapsed, the contents of the cell were concentrated at the end of its long axis forming granules, while the central portion of the cell was markedly sparse. After 2~3 hours, a number of organisms were observed to be undergoing lysis at the end of the long axis. It was inferred from the above findings that, of the 3 drugs, KM caused bacteriolysis in the shortest time and most severely injured the organisms.