HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗結核剤の影響下にみられる結核菌の形態，染色性及び増殖力の変化と耐性菌の出現について
Author(s)	有馬，純；月居，典夫；高橋，義夫
Description	
Citation	結核の研究，8，9-18
Issue Date	1958-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26638
Type	departmental bulletin paper
File Information	8_P9-18.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

抗結核剤の影響下にみられる結核菌の形態，染色性及び増殖力の変化と耐性菌の出現について

有馬　純・月居典夫・高橋義夫
（北海道大学結核研究所予防部）

（昭和33年1月16日受付）

I 緒　　言

化学療法剤の抗結核菌作用については，従来種々の方向から多くの研究が行われているが，形態学的立場からの研究においては，菌の形態的変化と生死の関係をしらべたものは極めて少く，就中電子顕微鏡像にみられる菌体内微細構造の変化を細胞化学的所見と比較した研究は未だみられない。

著者等は，前回の実験[1]で，電子顕微鏡により，主として結核菌の形態に及ぼすストレプトマイシン（SM）とイソニコチン酸ヒドラジド（INAH）の影響を，種々の作用条件下でしらべ，この結果，第一に結核菌はその増殖過程においては，これら2種の薬剤により徐々に形態的変化を示し，ことに電子不透過性小体（Knaysi 等[2]の云う A-body）が消失すること，第二に INAH の作用により非抗酸性菌が出現すること，第三に耐性菌が薬剤作用後，比較的短期間に出現することを明かにし得た。そこで今回は，前回とほぼ同様な条件下で，薬剤作用後の菌の形態の変化と生死の問題，形態の変化と薬剤の特異性の関係，さらに著者等の数年来の研究目標である電子不透過性小体（以下 A-body と略記す）の本態をしらべるべく，薬剤作用後の当該顆粒と細胞化学的に検出される諸種染色顆粒との関係について比較研究を試みた。

II 実 験 方 法

使用した菌株は人型結核菌 H 37 Rv 株で，tween-albumin 加 Dubos 培地に継代培養の菌である。薬剤としては SM（ヂヒドロ硫酸塩，科研），INAH（田辺製薬）及び PAS（日新製薬）を用いた。菌を Dubos 培地に移植して 14 日間 37°C に培養した後，上記薬剤をそれぞれ 20 r/m*l* の濃度になるように培地に加え，さらに孵卵器におさめた。薬剤添加後，1，7，10，14 及び 21 日目に各条件の試験管2本を取出し，遠心沈澱（3000 r. p. m. 15分）して上清を捨て，沈渣に 0.05 % tween 80 水溶液を無菌的に加え，前回同様に遠心沈澱して3回洗滌を繰返し，十分に薬剤を除いた後，2本の試験管の菌沈渣を集めて tween 液に再浮游した。このようにして得られた菌液について適宜 10 倍稀釈を繰返し，薬剤不加小川培地ならびに添加小川培地（何れも 1 % KH_2PO_4 培地）を用いて総生菌数と耐性菌々数を定量測定した。成績は培養4週後に判定し，各稀釈液につき培地3本ずつの集落数の平均値をもつて生菌数とした。なお，培養操作前の菌液の混濁度を ERMA 型光電比色計（λ: 650 mμ）で測定し，その値で上述の生菌数を補正した。

薬剤作用後の菌の形態学的細胞化学的諸検査には洗滌直後の菌液を用いた。

使用した電子顕微鏡は日本電子光学製 JEM-5L 型で，加速電圧 50～80 KV，直接倍率 3000～5000 倍で撮影した。

細胞化学的検査には，Feulgen 反応，Janus-green B 染色及び Toluidin-blue 染色を実施し，それぞれ核様物質，ミトコンドリア及びメタフオスフェート小体の検出を試みた。なおこの他，Ziehl-Neelsen 染色を行い，薬剤作用後の抗酸性をしらべた。これら染色試験については Toluidin-blue 染色以外は，著者等の一人[3]が既に詳しく報じているから簡単に述べる。

Feulgen 反応：前処理として，塗沫標本をアセトン・アルコールの等量液で数時間室温処理し，ついでエーテル・アルコール混合液（比率 1：2）で 60°C 1 分間処理した。次に標本を 1 N 塩酸中で 60°C 2 分間加水分解，水洗後，亜硫酸フクシン液で 6～24 時間処理，次に亜硫酸水で 2～3 回洗滌した後，5 分間水洗，最後にフクシンで室温下後染色。この染色で菌体は薄桃色に，顆粒は赤紫色に染る。

Janus-green B 染色法：Feulgen 反応同様に前処理後，0.04 % Janusgreen 水溶液で 38°C 24 時間処理。菌体は薄い紫色に，ミトコンドリアに相当する部分は濃

紫色の顆粒として染る。

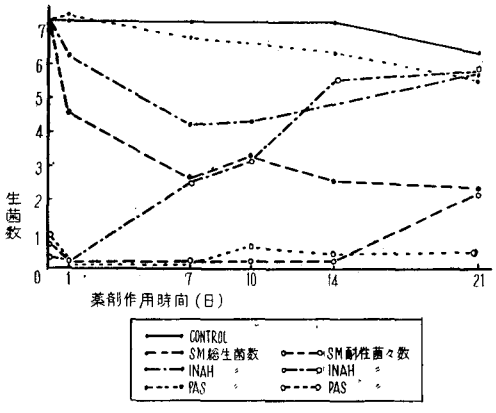
Toluidin-blue 染色法：前処理することなく，0.01～0.05％ Toluidin-blue 水溶液中室温 30 分間染色，水洗。菌体は殆んど染らず，紫色を帯びた青色の顆粒のみが異染小体としてみられる。

なお，A-body と上記染色顆粒の比較は，電顕像と各染色像で，それぞれ 100～500 個の菌体について数を算定して行つた。

III 実 験 成 績

薬剤作用後の生菌数の推移と耐性菌の出現状態：成績は Fig. 1 に一括して示した。

Fig. 1. 薬剤作用後の総生菌数の推移と耐性発現状態



SM の場合：生菌数の減少は最も強く，SM 添加後 1 日で既に対照の 1/100 以下になり，7 日では 1/1000 以下に達した。耐性菌は SM 添加以前の population 中にすでに極めて少数ながら混在していることが判つたが，添加後 2 週間は全く検出されず，3 週目に可成りの増加が認められた。

INAH の場合：生菌数の減少は，SM 程ではないが明かに認められ，添加後 1 日で対照の 1/10 以下，7 日で約 1/1000 になつた。しかし，その後菌数は漸次増加の傾向を示した。このことは，図から明かなように，INAH 作用後 7 日目から現われ始めた耐性菌によるものであり，耐性菌は増殖を続け，3 週目には総生菌数に一致する値を示した。

PAS の場合：菌の増殖力は殆んど影響されず生菌数は 3 週間に極めて緩慢な減少を示したに過ぎない。又耐性菌は薬剤添加以前にその存在が証せられたにも拘らず，その後 3 週間全く増殖の傾向が認められなかつた。

菌の形態学的変化と抗酸性の消失：薬剤作用後の菌形態の変化を電子顕微鏡写真（Fig. 2～5）によつて示した。

SM の場合：作用 1 日後（Fig. 3 a）では，形態上の変化は少しもみられず，A-body も明かに認められ，又細胞質も正常であつた。この点，生菌数が前述のように著明に減少している所見と一致しないように思われる。しかし，7 日目には菌体の輪廓は不明瞭になり，細胞質の透過性は増し，明かに菌体の融解が認められ，A-body は殆んど消失した（Fig. 3 b）。10 日以上たつと融解はますます強まり，菌の輪廓は全く明確さを失つた（Fig. 3 c, d）。次に菌の抗酸性は，SM 作用後急激に減弱消失して行く傾向がみられた。Fig. 6, 7 に示すように使用した菌株では薬剤作用前に既に非抗酸性菌が可成り多く，全体の 40％ を占めていたが，SM 添加により，その比率が急激に増加し，1 日後に 70％，2 週後に 90％ に達した。

Fig. 6. 対照培地における生菌数の推移と抗酸性の変動

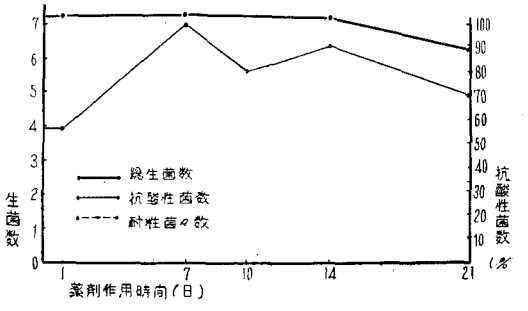
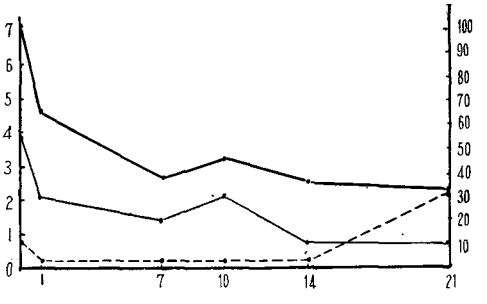


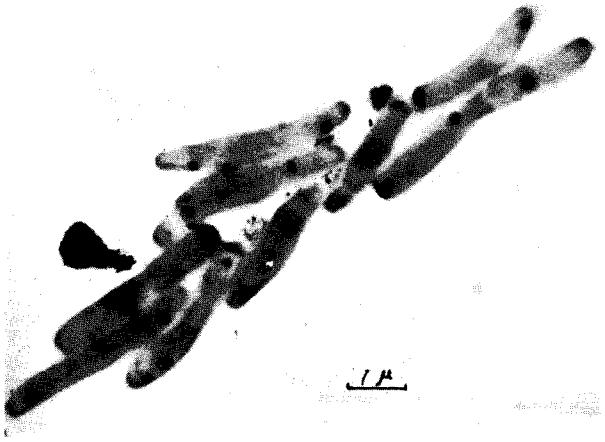
Fig. 7. SM 作用後の生菌数の推移と抗酸性の変動



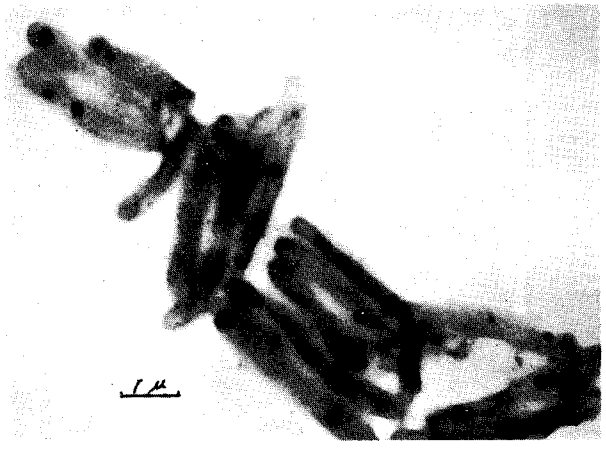
INAH の場合：作用後 1 日の電顕像（Fig. 4 a）では，SM 同様何等の変化もみられなかつた。しかしその後 1 週では（Fig. 4 b），細胞質の透過性の増加，菌体の輪廓の不明瞭化がみられ，また A-body も明かに減少して容易には認められなくなつた。一方菌体の融解は SM 程強くはなかつた。興味深いことは，作用後 10 日目に，耐性菌の出現を示す培養成績に一致して，電顕像

Fig. 2.

a



c



b

d

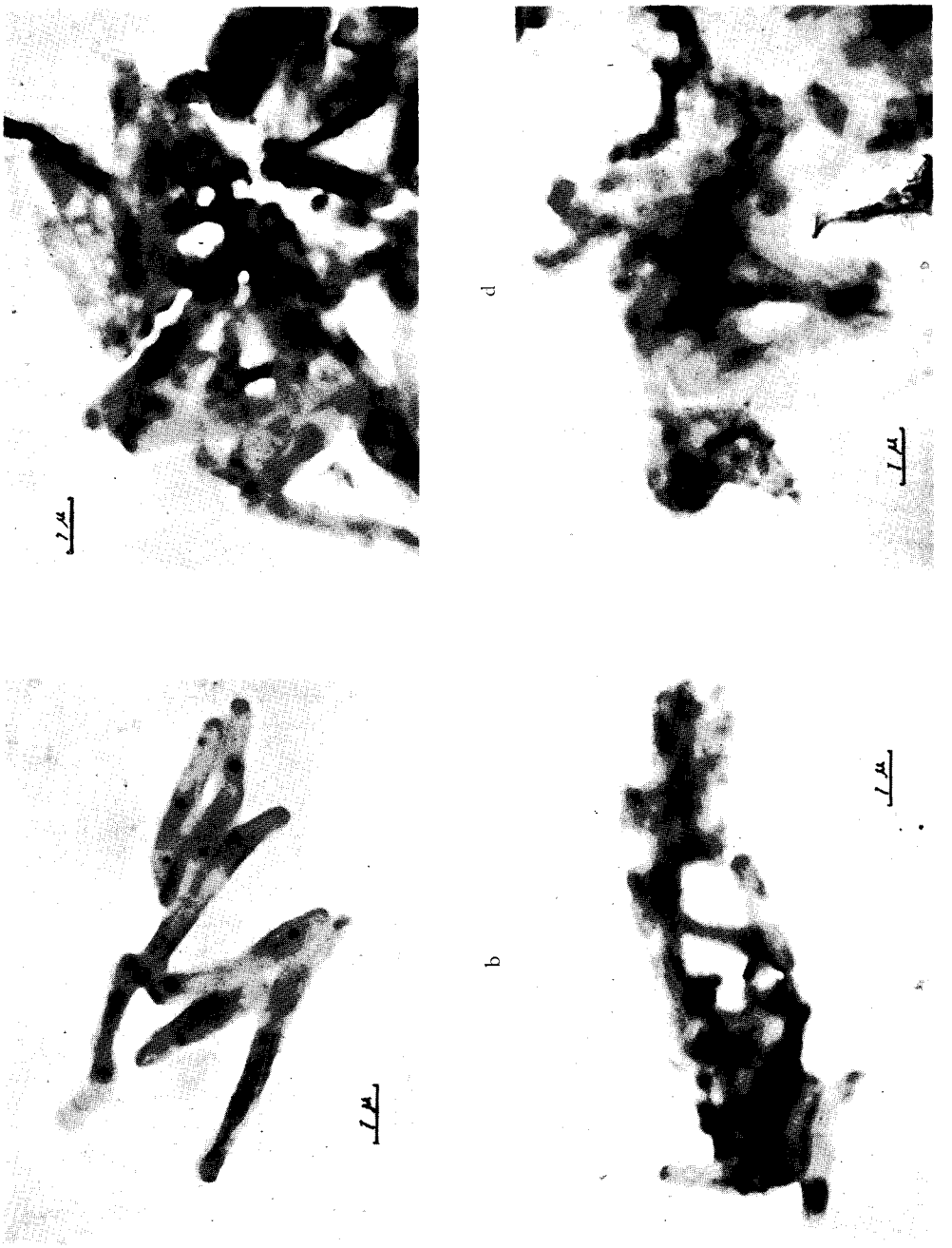
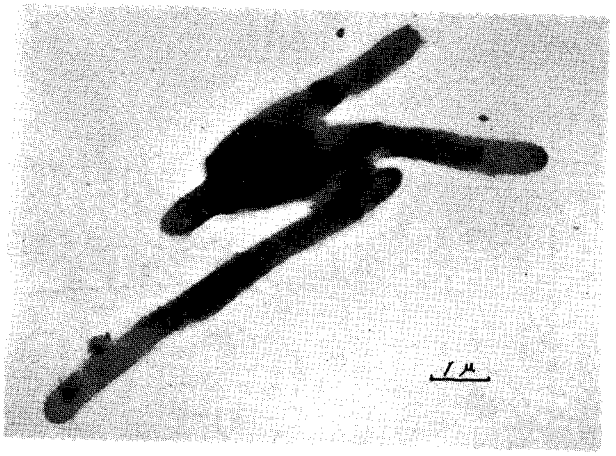


Fig. 3.

Fig. 4.

a



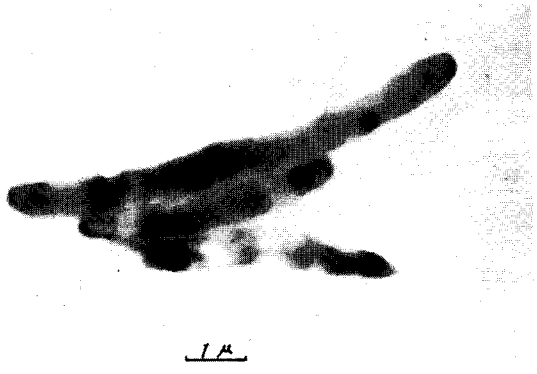
c

b

d

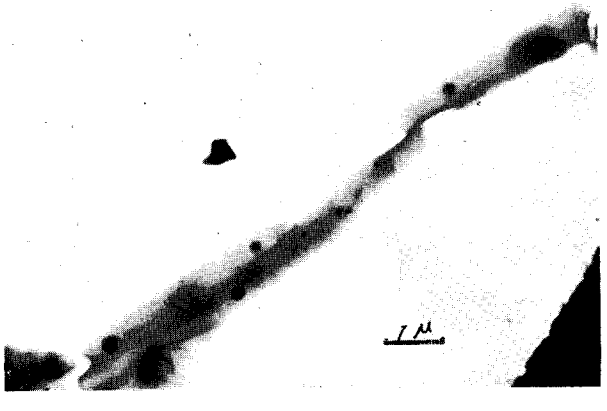
Fig. 5.

a

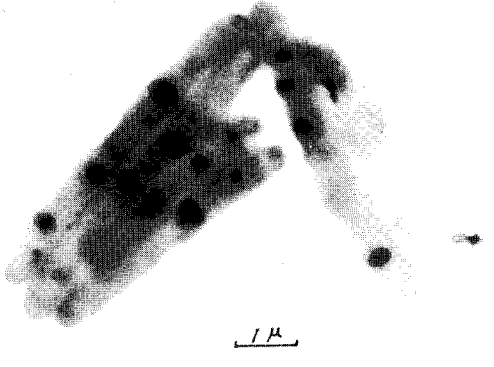


c

b

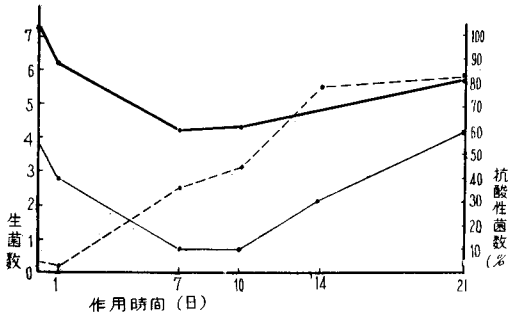


d



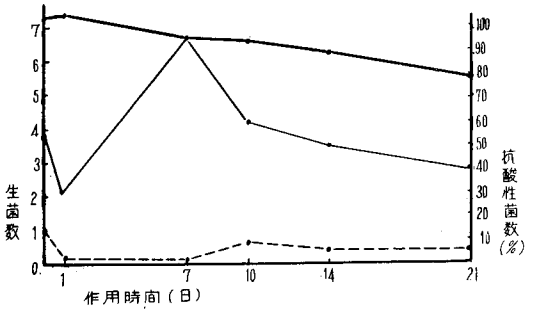
でも（Fig. 4 c）A-body が明かにみられる正常な菌体が多数現われ始めたことで，Fig. 4 d）は作用3週目に一見して耐性菌と考えられる菌が試料全体を占めている状態を表わす像と思われる。尤も，ここに注意すべきは，これらの菌は，それが INAH 作用後いちじるしく形態的変化を蒙つた菌集団に混つて出現，増殖したからこそ耐性菌と見做されたのであつて，形態的には従来著者等が観察して来た正常の，増殖過程にある結核菌と何等違わないのである。次に INAH 作用後の抗酸性は，Fig. 8 に示すように，著明に減弱し，非抗酸性の比率は，1日後に 60％，7日後に 90％ に達した。しかしその後，耐性菌の増加に伴つて，その比率は再び減少し，3週目には 40％ になつた。

Fig. 8. INAH 作用後の生菌数の推移と抗酸性の変動



PAS の場合：Fig. 5 a～d に示したように，菌体内の構造には殆んど著明な変化はみられず，ことに注目すべきことは，SM，INAH と異り，A-body が作用3週を経ても猶消失しなかつた点である。また菌体の融解や輪廓の不明瞭化も認められず，唯みるべき変化としては，屢々菌体の異常な膨化と伸長が認められたことを挙げ得よう。次に PAS 作用後の抗酸性の変化については，Fig. 9 に示すように，日によつて可成りの変動がみられたが，総括的には対照（Fig. 6）と大差ない成績を示した。

Fig. 9. PAS 作用後の生菌数の推移と抗菌性の変動



A-body と各種染色顆粒との比較：Fig. 10～13 に薬剤作用後の A-body と各種染色顆粒の推移を，これらの顆粒が確実に認められる菌数の比率（％）で表わした。これらの成績には可成りの変動がみられるが，これはサンプル中の菌体が培養の経過につれて菌塊を作り，この結果各種顆粒の判定が可成り困難になつた為である。しかし概括的に云えば，まづ Feulgen 顆粒の態度が A-body とは勿論，他の染色顆粒の態度とも一致せず，常に高い検出率を示したこと，次に Janus-green 顆粒は，SM 作用後10日目迄検出率が減少して行く点と，又 INAH 作用2週以後に耐性菌の増殖につれて増加する点では，A-body にやや近い消長を示したが，その他の場合は殆んど平行関係が認められず．又これとほぼ同様の傾向が Toluidin-blue 顆粒でもみられることである。事実．SM 作用の場合（Fig. 11），Janus-green と

Fig. 10. 対照培地における電子不透過小体と染色顆粒の推移

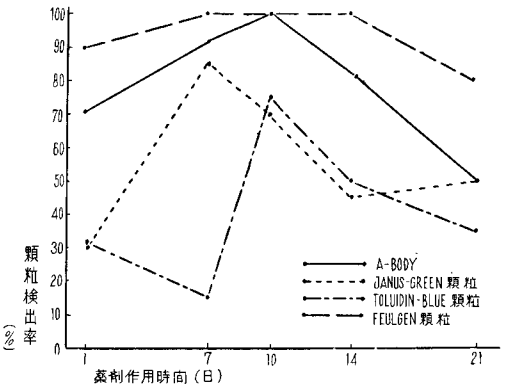


Fig. 11. SM 作用後の電子不透過小体と染色顆粒の推移

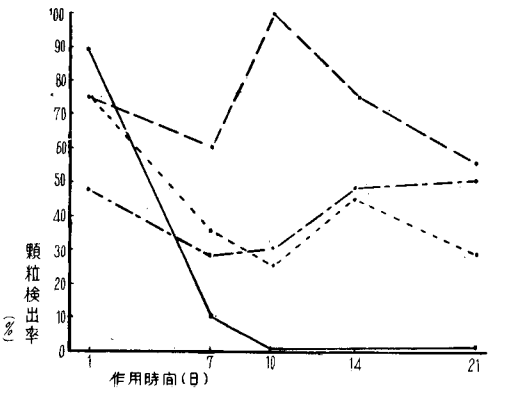


Fig. 12. INAH 作用後の電子不透過小体と染色顆粒の推移

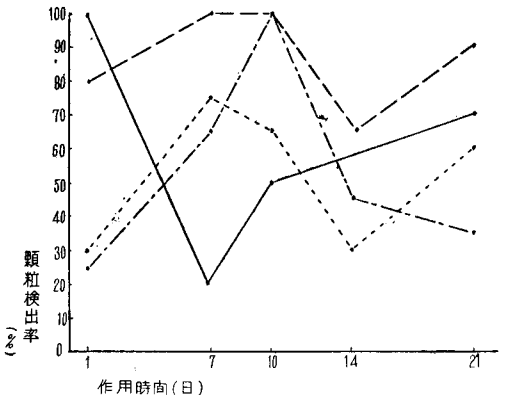
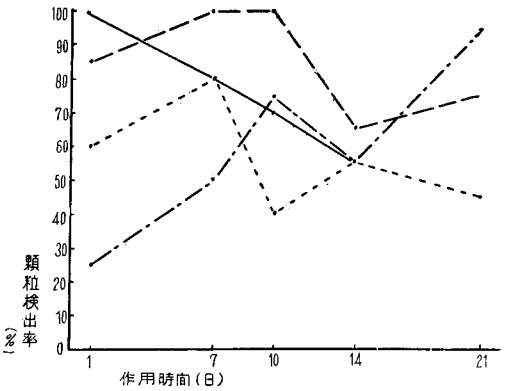


Fig. 13. PAS 作用後の電子不透過性小体と染色顆粒の推移



Toluidin-blue の顆粒は. 10 日目迄，ともに検出率が減少するが，A-body のように完全に消失することなく. その後 3 週目迄，それぞれ 30 乃至 40 % の率を維持している。これを要するに上記 3 種の染色顆粒は，薬剤作用後の推移の上では，何れも A-body と違つた態度を示した。

IV 総括ならびに考察

上述の成績から，まづ SM と INAH は増殖中の結核菌に対して，ある程度の殺菌効果を有し，PAS にはこの効果がないことが確められた。即ち薬剤添加により生菌数が 1 日目に，SM では対照の 1/100 以下に，INAH では約 1/10 に減少し，さらにその後一定期間，両薬剤の場合とも菌数が減少したが，PAS では 3 週目迄極めて緩徐な減少を示したに過ぎない。SM と INAH が結核菌に殺菌的に作用することについては，既に Middlebrook[4], Brouet et al[5], Barclay et al[6], 金井[7,8], Schaefer[9], 山本[10], Koch-Weser[11,12], Linz[13,14] 等が報じて居り，この中 Linz[11,12] と Schaefer[9]によれば，液状培地に増殖中の結核菌は，SM あるいは INAH の作用を受けると，結局は菌体の融解を生じて死滅するが，薬剤作用後数日間，菌は分裂，増殖を数回繰返すと云い，このことを，ことに Linz[14] は turbidimetric に，また培養菌液中の菌体計算の方法で確めて居る。又金井[8] も Linz 等と同様に，SM 添加後，培地の混濁度の一時的増加を認め，この事を，別に SM 加寒天培地に接種した単一菌が短期間で数回分裂することから，恐らく液状培地中での分裂増殖に由るものであろうと考えている。しかし一方，Brouet 等[5]は，SM, INAH の添加により液状培地内の菌数が直ちに減少することを，Linz 同様菌数計算の方法で証明している。著者等の今回の実験では，培養菌液自体について，洗滌前に，時間を追つて混濁度と菌数の測定を行わなかつたので，薬剤作用後の短期間中の生菌数の減少が，果して Linz や金井が考えるように菌の数回の分裂後に起きたものかどうか判断することは出来ない。しかし従来，結核菌の generation time が 20 時間内外であることと，またその後，著者等が行つた実験で，SM, INAH 作用後，菌の増殖は，少くとも混濁度の上からは全く認められなかつたことを考え合せると，上記の様な短時間内の分裂，増殖という現象の起る可能性は少いように考えられる。

次に，これら 3 薬剤作用後の菌の電子顕微鏡像を吟味してみよう。SM と INAH 作用後の菌は，徐々に細胞質の透過性の増大，A-body の減少，さらに菌体の融解を示し，ことにこれらの所見は殺菌効果の強い SM に著明であつた。PAS では，殺菌効果欠除の成績に一致して，電顕像にも何ら著明な変化がみられず，作用後長期間を経ても A-body は明瞭に保持されていた。この点篠原等[5] が Sauton 培地上の菌に PAS を添加して，A-body の数と大さが減少すると述べている所見と必ずしも一致しないが，これは使用した菌株や薬剤の作用条件の相違によるものであろう。この他 PAS 作用後の形態的変化としては，屢々菌体の異常な膨化と伸長が起ることを指摘しうるが，これは安元[16] の光学顕微鏡所見と一致し，又 Fitzgerald[17] がサリチル酸で同様の所見を報じていることを考え合せると興味深く思われる。

さてこれらの電顕像から著者らは 2 つの重要な点を指摘したいと思う。その第一は SM と INAH による菌の形態的変化に，何ら質的な差違が認められない事である。武谷[15] によれば，A-body は本質的にはメタフオスフェートであり，その生成は SM によつて強く阻止され，従つて SM 感受性菌では SM によりこの顆粒が消

失するが耐性菌では影響されぬと述べ，田中[19]がSMの作用機序を燐の菌体内へのincorporationの阻害と見做していることを形態学的に裏ずけるものと考えている。しかし，上述のように，少くとも本実験の成績からは，A-bodyの消失はSMに特異的な現象ではなく，INAHによつても起ることを指摘し得よう。次に注目すべき第二の点は，SMとINAHの作用により生菌数が急速に減少し，菌の大多数が死滅したにも拘らず，その時の電顕像が対照と殆んど違わず，A-bodyも明瞭に保持されていたことである。著者らの従来の電子顕微鏡的研究によれば，A-bodyは菌の増殖力の旺盛な時期に出現するもので，この点篠原ら[15]の意見と一致するのであるが，SM及びINAH作用1日後の所見では，これらの考えに反する成績が得られたわけである。しかし同様な所見は，同じく篠原ら[15]によれば，フェノール誘導体にもみられると云い，従つて菌の死滅が薬剤作用その他によつてin situに起きた場合は，A-bodyは一定期間intactに残つているだろうことは想像に難くない。

次に菌の抗酸性に及ぼす薬剤の影響について考察を加えたい。INAHが増殖過程にある結核菌の抗酸性を著明に減弱消失させることは，近年Middlebrook[4]，Rist et al[20,21]，Koch-Weser[11,12]，Schaefer[9]，Russe et al[22]，Dunber[23]等が述べて居り，この中，Middlebrook[4]は0.1γのINAH作用により24時間以内に95％以上の菌が非抗酸性すること，しかしSMではこの現象がみられないことを述べ，Koch-Weser等[12]も同様にSMでは非抗酸性化は起らず，INAHではこの現象と平行して，菌のテトラゾリウム還元能も減弱し，また増殖力も失われると云う。又Rist[21]によるとINAHによる抗酸性の減弱乃至消失は，INAH存在下で菌の分裂が行われる際にこのagentの作用を受けて起るものであり，この非抗酸性化がSMによつて阻止されるのは，SMがINAH作用下の菌の分裂を直ちに抑えるためであろうと論じている。更にRusse等[22]は，最近NAHによつて非抗酸性化した菌の脂質の抽出を行い，とくにメタノール抽出分画が著明に減少していること，及びこれらの菌の動物に対するツベルクリン・アレルギー賦与性が著るしく減弱していることを報じて居り，Dunbar[23]は非抗酸性化がINAH以外にα-エチル・イソニコチン酸チオアミドやサイクロセリンでも著明に起ることを述べている。さて，著者らの実験でも，INAHの作用によつて可成り顕著な非抗酸性化がみられたが，上記諸家と異る点は，非抗酸性化がSMによつても明かにみられたことである。思うにこの現象は著者等が用いた菌株がたまたま極めて不安定な抗酸性をもつて居り，このためINAHでは勿論，SMでも菌体構造に強い変化を来した結果生じたものであろう。事実，菌の抗酸性の安定性が，薬剤による非抗酸性化に影響することは，本実験の対照例で既にpopulation全体の約40％に非抗酸性菌が検出された事，これに反して著者らのその後の実験で，極めて安定した，強い抗酸性をもつ菌株ではINAH，SMの何れによつても殆んど全く抗酸性を失わない事実によつて容易に肯かれよう。

最後に，これら薬剤作用後のA-bodyと種々染色顆粒との比較であるが，既に述べたように，薬剤作用後生ずる菌塊のため，個々の菌体内の顆粒の観察が可成り困難で，このため得られた成績に変動が多く，断定的な結論を下し得ないが，SM作用後のA-bodyの消失，INAH作用後耐性菌増殖後のその増加に比較的忠実な態度を示したのは，Janus-green顆粒で，ついでToluidin-blue顆粒であつた。ことにSM作用の場合に両種顆粒はA-bodyの消失につれて減じて行く結果を示したが，A-bodyが全く消失した後も，ともに約30～40％の検出率を保つて居り，両種顆粒は，その何れもがA-bodyと必ずしも一致した態度をとらないことが判つた。又Feulgen反応陽性顆粒は何れの条件下でも常に高い検出率で観察され，3種の染色顆粒中最もA-bodyと違つた態度を示した。この所見は著者らの一人[3]が既に述べている成績と全く一致した。以上，今回の実験からは，勿論A-bodyの本態について断定的なことは云えないが，少くともA-bodyの消長がFeulgen顆粒，Janus-green顆粒及びToluidin-blue顆粒の何れの消長とも一致しないこと，従つてA-bodyを核とも，ミトコンドリアとも，又メタフオスフェートとも見做し得ないと云えよう。なお，本実験と平行して，A-bodyの本態を追究するべく，同一菌について電子顕微鏡的及び細胞化学的観察を行つた高橋・山下等[24]の実験においても，上述の著者らの見解と全く同じ成績が得られたことを附記しよう。

V 結　　語

1. SMとINAHは，増殖中の結核菌に対して，ある程度の殺菌効果を有する。しかしPASにはかかる効果はない。

2. SMとINAHの作用により，菌の細胞質の透過性の増大，電子不透過性小体（A-body）の消失，及び菌体の融解を生ずるが，その変化にこれら薬剤による質的差違はない。PASの場合は殆んど形態上の変化はみられない。

3. しかし，SM, INAH作用後，菌の死滅する過程

において，形態的変化が殆んどみられない時期があるように思われる。

4．菌の抗酸性は INAH のみならず SM によつても著明に減弱・消失することがある。

5．INAH 及び SM の耐性菌は上述の条件で 1～3 週で出現・増殖する。而して INAH 耐性菌の形態は感受性菌のそれと違わない。

6．A-body は Feulgen 反応-，Janus-green B 染色-，及び Toluidin 染色-陽性顆粒と，薬剤作用後の態度が一致しない。

文　献

1) 高橋・有馬：文部省科学研究費結核研究班報告，1956.
2) Knaysi, G. et al: J. Bact., 60, 423, 1950.
3) 月居：結核の研究，6，17，1956.
4) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 65, 765, 1952.
5) Brouet, G. et al: Rev. Tuberc., 17, 274, 1952.
6) Barclay, W.R. et al: Am. Rev. Tuberc., 67, 490, 1953.
7) 金井：日本菌学雑誌，9，181，1954.
8) 金井：Ibid., 10, 177, 1955.
9) Schaefer, W.B.: Am. Rev. Tuberc., 69, 125, 1954.
10) 山本：結核の研究，4，53，1955.
11) Koch-Weser, D. et al: J. Lab. and Cl. Med., 42, 828, 1953.
12) Koch-Weser, D. et al: Am. Rev. Tuberc., 71, 556, 1955.
13) Linz, R.: C.R. de Soc. Biol., 146, 1449, 1952.
14) Linz, R.: Ann. Inst. Past., 85, 295, 1953.
15) Shinohara, C. et al: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ., C, 6, 207, 1955.
16) 安元：レプラ，22，85，1953.
17) Fitzgerald, R.J. et al: Am. Rev. Tuberc., 58, 210, 1948.
18) 武谷：日本臨牀結核，16，528，1957.
19) 田中：第32回日本結核病学会シンポジウム，1957.
20) Rist, N. et al: Ann. Inst. Past., 82, 757, 1952.
21) Rist, N. et al: Rev.Tuberc., 16, 665, 1952.
22) Russe, H.P. et al: 72, 713, 1955.
23) Dunbar, J.M.: Ann. Inst. Past., 92, 451, 1957.
24) 高橋(義)・山下・月居・高橋(昭)：本誌 8，　，1957.

写 真 説 明

Fig. 2　Dubos 培地培養の人型結核菌 H 37 Rv 株（×10,000）
- a　薬剤添加 1 日後の対照の菌（培養日数 15 日）
- b　同じく 7 日後の菌（培養日数 21 日）
- c　同じく 10 日後の菌（　〃　24 日）
- d　同じく 21 日後の菌（　〃　35 日）

Fig. 3　培養 14 日目に SM 20γ/ml を添加した場合（×10,000）
- a　SM 添加 1 日後の菌。
- b　同じく 7 日後の菌。
- c　同じく 10 日後の菌。
- d　同じく 21 日後の菌。

Fig. 4　培養 14 日目に INAH 20γ/ml を添加した場合（×10,000）
- a　INAH 添加 1 日後の菌。
- b　同じく 7 日後の菌。
- c　同じく 10 日後の菌。
- d　同じく 21 日後の菌。

Fig. 5　培養 14 日目に PAS20γ/ml を添加した場合（×10,000）
- a　PAS 添加 1 日後の菌。
- b　同じく 7 日後の菌。
- c　同じく 10 日後の菌。
- d　同じく 21 日後の菌。