

人型結核菌のSM耐性上昇機作に関する研究

第Ⅱ部 形態学的観察

旗野 脩一

東京大学美甘内科

受付 昭和31年7月11日

緒言

著者は第Ⅰ部において、人型結核菌 H₃₇Rv株を用いて、SM耐性上昇現象の分析を行った。そのうちで、菌をSM 1γ/ml含有Dubos培地に培養すると、第Ⅰ部図1、図2に示した如く、(第1期)菌数減少・耐性不変、1週まで。(第2期)菌数やや増加・耐性ほとんど不変、2週まで。(第3期)菌数急増加・耐性やや上昇、3週まで。(第4期)菌数急増加・耐性急上昇、24日以降等を区別できることを報告した。

上に区分した各期において、菌がなんらかの形態学的変化を示すならば、臨床家にとっては、菌の増殖力の察知、なかんずく耐性上昇の早期判定等に有力な補助手段となるので、応用に便ならしめるため簡単な染色標本を使用し、菌の長さの分布、菌体内顆粒数について観察を行い、検討を加えた。

観察方法

第Ⅰ部図1、図2に示した実験で得られた菌液を、同

図1 結核菌の菌数の変化 (Dubos培地内)

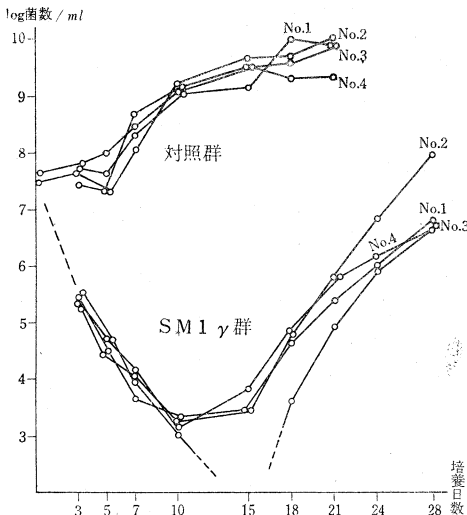
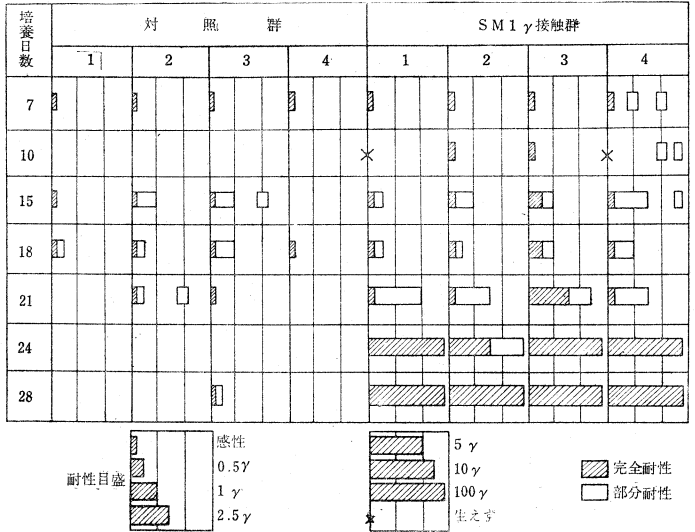


図2 Dubos培地における結核菌のSM耐性の変化



時に形態学的観察にも使用した。すなわち、対照およびSM 1γ/ml含有Dubos培地24mlをそれぞれ4組宛作り、それにDubos培地1週培養のH₃₇Rv株菌液1mlを加えて培養した。それぞれから、4, 8, 18時間, 3, 5, 7, 10, 15, 18, 21, 24, 28日の各時間に菌液を採取し、一部は生菌数測定および耐性測定に、一部は少量の石油エーテルを加え振盪して菌を更に分散させたものを、塗抹、乾燥、火焰固定後、次の染色を行って形態学的観察を行った。

1. アニリン水フクシン液¹⁸⁾で加温染色
2. 1%硝酸アルコールで脱色
3. 後染色。0.2%メチレン青 (pH 3.5)

菌の長さの測定は顕微鏡写真を用いて測定した。顆粒は明らかに顆粒として確認できる輪廓鮮鋭で濃染したもののみを数えた。どちらも1標本について200箇宛の菌を調べた。

観察結果

初めに、菌数および耐性の変化を参照するために第Ⅰ部図1、図2の必要部分を再掲した。

1. 菌の長さ

長さの分布図を図3に、その平均値および不偏分散を

図3 Dubos 培地における菌の長さ—分布と平均値

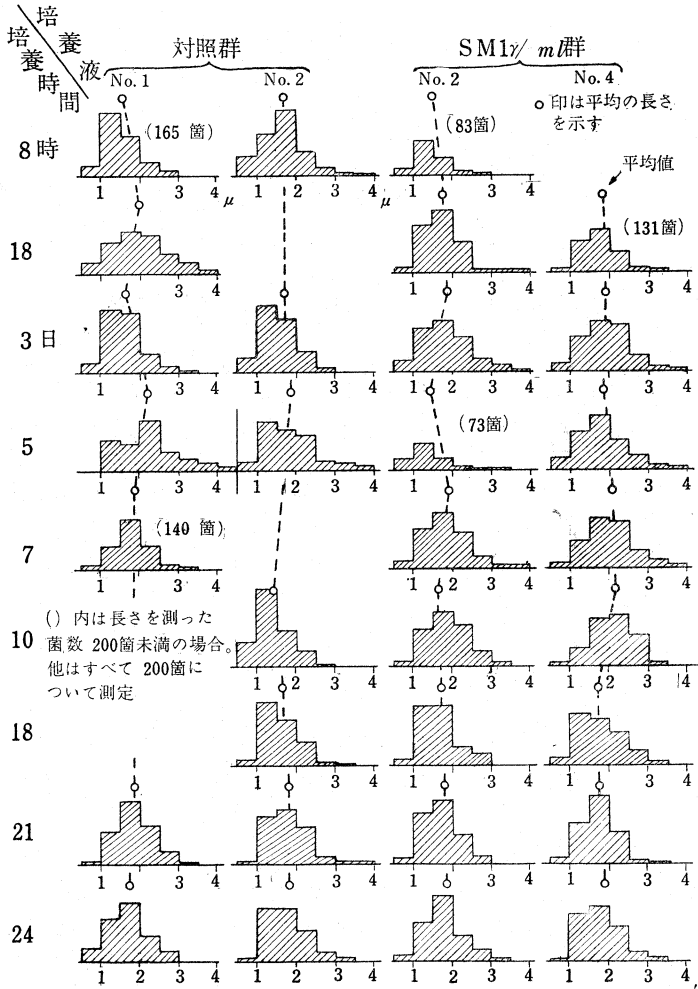


表4 Dubos 培地に培養せる結核菌の長さ

培養時間	SM 0				SM 1γ/ml 接触			
	No. 1		No. 2		No. 2		No. 4	
	平均値	u ² *	平均値	u ²	平均値	u ²	平均値	u ²
4時	1.57±0.07	0.180	1.68±0.08	0.191	1.39±0.07	0.157		
8	1.56±0.09	0.205*	1.69±0.11	0.332	1.47±0.08	0.165		
18	2.04±0.13	0.487			1.77±0.09	0.220	1.88±0.11	0.221*
3日	1.64±0.08	0.184	1.59±0.05	0.185	1.86±0.11	0.372	1.96±0.11	0.350
5	1.86±0.11	0.265*			1.85±0.10	0.298	2.08±0.12	0.395
7			1.44±0.08	0.198	1.94±0.10	0.294	2.15±0.10	0.303
10			1.50±0.07	0.154	1.63±0.09	0.214		
15			1.68±0.09	0.228	1.71±0.10	0.264	1.70±0.11	0.524
18	1.90±0.09	0.214	1.81±0.09	0.234	1.76±0.09	0.241	1.78±0.08	0.189
21	1.78±0.10	0.310	1.81±0.10	0.273	1.87±0.10	0.291	1.89±0.11	0.334
24	2.00±0.09	0.257	1.75±0.08	0.201			2.67±0.16	0.763

*u は不偏分散、信頼限界は1%危険率で計算、×印は200菌以下で計算するものを示す

表4に示した。菌の長さは0.6μから4.0μ位に互り、その平均値は1.4μから2.7μに互るが、平均値も分散も、SMの有無や培養時間に関連した特定の変化を示さず、不規則な変動を示した。

2. 顆粒数

表5に示す如く、対照群では4週間程度の期間では過半数が顆粒のない菌で占められ、平均顆粒数は0.17~0.71菌程度に互っていたが、時間的な差は余りなかった。SM群では初めは対照群と同様で過半数の菌は顆粒をもたないが、その後次第に顆粒がふえて、3~4週後には、顆粒をもたない菌、顆粒数1菌の菌、2菌の菌が30~50%宛でほぼ同率を占め、平均顆粒数は0.94~1.54位となった。

考 按

工藤¹⁹⁾、小池²⁰⁾らの如く「単個菌」から出発した観察は菌の発育環を明らかにするには有意義であるが、耐性上昇と関連した「菌群」の形態学的変化傾向を知ることも有意義である。ただこの場合、例外的な特殊形態を誇大に強調することは無意味であつて定量的な取扱いが必要である。著者は馬場²¹⁾、篠原²²⁾らのように統計的観察を行い、かつ Fenner²³⁾らのように推計学的検討を加えた。

著者の方法では0.4μ以下の長さは解像の限度で測れなかつた。それにもかかわらず、他の報告に比して測定値が短いのは処理条件の影響かと思われる。石油エーテル処理によつても菌の長さは僅かながら(1/10程度)短縮する。しかし処理方法は各標本に共通しているから相対的比較には差支えない。中村²⁴⁾、Fenner²⁵⁾らのような系統的な菌の伸縮は観測されなかつた。分散にさえ不規則な動揺があることから、菌は均等に混和せず、菌齢を異にする部分が不規則に分布しているものの如くである。あるいはごく僅かの染色手技の差異が菌の長さ大きな影響がある可能性もある。したがつてこの種の染色標本で200菌程度を測つた菌の長さは耐性判定の資料とはなし難い。SMの作用についても、菌が伸長するという説²⁵⁾、不変という説¹³⁾、TB₁²¹⁾やINH²⁶⁾では短縮するという説などがあ

表 5 Dubos 培地培養結核菌の顆粒数

培養時間	SM 0																							
	No. 1								No. 2								No. 3							
	顆粒数								顆粒数								顆粒数							
	0	1	2	3	4	5	計	0	1	2	3	4	5	計	0	1	2	3	4	5	計			
4時								168	24	10	0	0	0	34										
8	151	36	12	1	0	0	63								144	34	20	2	0	0	80			
18	152	34	13	1	0	0	63	150	28	18	4	0	0	76	169	10	16	3	0	0	61			
3日	142	42	11	0	0	0	64	121	50	20	8	1	0	118	155	25	18	2	0	0	67			
5	166	25	6	3	0	0	46																	
7	149	130	19	2	0	0	74	136	36	23	5	0	0	97	127	46	17	10	0	0	110			
10								130	47	15	7	1	0	102	132	37	23	3	0	0	97			
15	147	33	14	5	1	0	80	115	30	52	3	0	0	143	120	39	36	3	0	0	122			
18	170	11	19	0	0	0	49	138	25	18	4	0	0	73	115	20	19	6	0	0	76			
21	131	28	33	5	3	0	121	158	30	10	2	0	0	46	111	38	26	7	0	0	71			
24	141	18	23	13	5	0	123	119	54	26	1	0	0	109	161	26	12	1	0	0	55			
28															90	53	47	8	2	0	126			

培養時間	SM 1γ/ml																							
	No. 1								No. 2								No. 4							
	顆粒数								顆粒数								顆粒数							
	0	1	2	3	4	5	計	0	1	2	3	4	5	計	0	1	2	3	4	5	計			
4時	172	12	12	4	0	0	46	157	32	10	1	0	0	55										
8	153	25	20	2	0	0	71	138	30	30	2	0	0	96	148	34	26	2	0	0	72			
18	169	13	14	3	0	0	55	190	4	5	1	0	0	17	153	24	21	2	0	0	72			
3日	122	37	30	10	1	0	131	133	33	23	11	0	0	112	140	34	22	4	0	0	90			
5								105	41	40	7	7	0	170	44	77	59	12	1	0	235			
7	106	38	54	13	1	0	189	111	40	35	12	2	0	154	79	57	53	19	2	0	228			
10	128	40	28	4	0	0	108	101	50	38	9	2	0	161	92	50	43	14	1	0	182			
15	117	39	32	11	1	0	140	114	38	37	10	1	0	146	100	54	41	5	0	0	151			
18	76	46	61	14	3	0	222	113	43	27	15	2	0	154	60	76	51	10	3	0	219			
21								74	40	65	18	3	0	196	89	60	45	11	2	0	191			
24	77	55	51	13	4	0	212	94	55	36	13	2	0	174	119	41	25	13	1	1	139			
28	48	47	56	27	12	4	308	140	27	26	6	1	0	101	59	62	46	31	1	1	256			

数字は当該顆粒数をもつ菌数を示す、計は200菌についての総顆粒数を示す。

つて一定しない。著者の成績では特別の影響が認められなかつたが、培養液中の菌は新旧種々の菌の混合であることを考えるならば、規則的な長さの変化が認められないのがむしろ当然であろう。

菌体内顆粒についても、篠原²²⁾も述べているように染色法が異なるならば、等しく顆粒といても全く異なるものを見ている場合が多いであろうし、さらに同じ方法による顆粒についての見解さえ研究者によつて区々に観察され、考えられている。たとえば Fontes 染色による顆粒にしても、Yegian²⁷⁾はそれと等しいものと思われる Much 顆粒を人工産物なりとし、工藤¹⁹⁾、小池²⁰⁾は

位相差顕微鏡による観察で高密度を示す部分は Fontes 染色で染められるし、電子顕微鏡でも顆粒の位置は一致するといつてこの種顆粒の存在を肯定する。この顆粒は発育停止菌に多いというが、篠原²²⁾は電子顕微鏡下の顆粒は増殖旺盛な菌に多いという正反対の結論を出している。さらに Knaysi²⁸⁾、伊藤²⁹⁾は電子顕微鏡で核と思われる A 小体、細胞液胞と思われる C 小体を区別しているのに他の研究者は全くこれにふれていない。このような顆粒についての観察や見解の混乱は、菌種や実験手技の相違、何を顆粒の範囲と見るかによつて生ずるものであろう。それだけに顆粒の意味づけは難しく、本稿では、

酸性のメチレン青で輪廓鮮鋭に濃染し、通常の顕微鏡で認められるものについての観察事実のみを分析する。

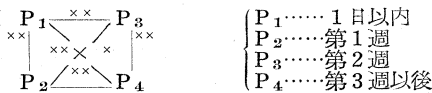
顆粒の計測値から、平均顆粒数、顆粒をもたない菌および顆粒数3箇以上の菌の百分率を計算してそれぞれを、SM含有の有無(要因S)、培養時間(要因P。1日以内P₁、1週までP₂、2週までP₃、3週以後P₄と4期に区分)、培養コルベンによる差(要因T)について有意性を検討した。

顆粒数についてはS^{**}、P^{**}、(S×P)^{**}が有意。(S×P)^{**}が有意なのでS(SM含有群の略)、 \bar{S} (対照群の略)を分離してPを検定し直すとP^{**}はSM含有の際のみ有意となる。Pの各期における顆粒数の差は表6に示す如く、すべて高度の有意性を示す。

顆粒をもたない菌の百分率でも、S^{**}、P^{*}、(S×P)^{**}が有意。(S×P)^{**}が有意なので $\bar{S}\bar{S}$ を分離してPを検定するとSM含有の際のみP^{*}が有意。各期において有意の差がみられるかどうかは表6のようで、総顆粒数のように鋭敏な差を示さない。

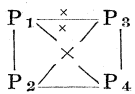
表6 SM含有 Dubos 培地培養結核菌の顆粒数の時間的変化の検定結果

1. 顆粒数

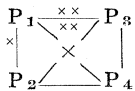


(P₁……1日以内
P₂……第1週
P₃……第2週
P₄……第3週以後

2. 顆粒数0の菌の百分率



3. 顆粒数>3の菌の百分率



計算は略す

** 1%危険率で有意の差を認めるもの
* 5%危険率で有意の差を認めるもの

顆粒数3箇以上の菌の百分率では、S^{**}、P^{**}、(S×P)^{**}が有意。同様にS、 \bar{S} を分離すると、対照群の(P×T)^{*}、SM群のP^{**}、(P×T)^{**}が有意の差を示す。この場合のP^{**}の有意性は表6の如くで前二者の中間程度に時間的変動がみられた。

したがつてもつとも有効な指標となるものは総顆粒数であるが、対照では3週程度の培地の新旧は影響がない。SM含有の場合は表5にみられるようにP₁→P₄へと一貫した増加が認められる。別に感性菌と耐性菌とを比較したが顆粒数の差は認められず、この場合の増加は生菌数増加や耐性上昇を意味するよりも、死菌ないし休止菌の絶対数増加の指標であると思われる。耐性上昇はP₃とP₄の間で起るが、特にこの時期を区別できるような顆粒数の増加の特徴は認められず、臨床応用上は余り

価値がない。Tおよび誤差項は常に有意性を示さなかつた。

結 語

Dubos 培地中で人型結核菌 H₃₇Rv株が、菌数および耐性の変動と関連して何等かの形態学的変化を示すかどうかを調べた。日常菌検索の際観察できるように染色標本を用い、200箇宛の菌について、菌の長さ、顆粒数を調べ、推計学的検討を加えて次の結論をえた。

1. 菌の長さは極めて不規則に変化し、一定の傾向が認められなかつた。
2. 顆粒数はSM接触群に多い。対照群では3~4週培養によつて有意の変化を示さない。SM接触群では時間の経過とともに著しくその数を増すが、これはSMによる死菌または休止菌に起る変化とみられる。生菌数や耐性上昇と関連した形態学的変化は認められない。

稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜つた恩師美甘義夫教授に深謝し、御援助頂いた村尾誠講師、岡野正光博士に感謝します。

有意義な御指示を賜つた秋葉朝一郎教授、推計学的処理に関し御援助下さつた高橋既正博士、菌株の分与と実験上多くの御助言を頂いた高橋昭三学士にも厚く謝意を表します。

(本研究費の一部は厚生省科学研究費の補助によつたものである。)

文 献

- 1) Demerec, M. : J. Bact., 56, 63, 1948.
- 2) Klein, M. and Kimmelman, L.J. : J. Bact., 52, 471, 1946.
- 3) Yegian, D. and Vanderline, R. J. : J. Bact., 56, 177, 1948.
- 4) 牛場・渡辺 : 日本細菌学雑誌, 10, 177, 1955.
- 5) 牛場・後藤・清水・渡口・坂本 : 結核, 30, 648, 1955.
- 6) Linz, R. : Ann. Inst. Past., 78, 105, 1950.
- 7) 秋葉・横田 : 医学と生物学, 24, 218, 1952.
- 8) 横田 : 日本細菌学雑誌, 10, 261, 1955.
- 9) 金井 : 日本細菌学雑誌, 10, 177, 1955.
- 10) 君野 : 最新医学, 9, 167, 1954.
- 11) 堀・吉川・伊藤・横井 : 結核(特別号)12, 1955.
- 12) 旗野・岡野・村尾 : 結核(特別号), 12, 1955.
- 13) 秋葉, 上条 : 科学, 23, 459, 1953.
- 14) Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 88, 73, 1948.
- 15) 大久保・古川・藤本 : J. Antibiotics, 4, 573, 1951.
- 16) 明石 : Chemotherapy, 2, 191, 1954.

- 17) 渡辺: 日本細菌学雑誌, 10, 231, 1955.
- 18) 隈部: 人体内に於ける結核菌の生態, 保健同人社刊, 1950.
- 19) 工藤: 結核研究の進歩, -2, 177, 昭28.
- 20) 小池: 同上, -7, 232, 昭29.
- 21) 馬場: 医療, 7, 15, 昭28.
- 22) 篠原: 抗研誌, 10, 141, 昭30.
- 23) Fenner, F. and Leach, R.H.: Am. Rev. Tuberc., 68, 321, 1953.
- 24) 中村: 抗研誌, 8, 18, 昭27.
- 25) 平山: J. Antibiotics, 5, 658, 昭28.
- 26) 馬場: 医療, 8, 19, 昭29.
- 27) Yegian, D. and Kuring, J.: Am. Rev. Tuberc., 56, 36, 1947.
- 28) Knaysi, G., Hillier, J. and Fabricant, C.: J. Bact., 60, 423, 1950.
- 29) 伊藤: 結核, 28, 400, 昭28.