

耐性結核菌の染色性並に形態学的変化と臨床像の関係

第 I 編 耐性結核菌の染色性について

助 手 中 村 智

東京医科大学外科教室 (指導 篠井金吾教授)

受付 昭和 32 年 6 月 17 日

I 緒 言

肺結核に対する抗結核剤の普及に伴い、これら薬剤に対する耐性獲得菌の出現が問題となり、これに関しては 1951 年以来内外共に広く研究され、わが国においても日比野、小酒井らの研究を始めとして、現在まで多くの報告がある。教室の打越は 140 例の肺結核の切除肺病巣内における結核菌の動態についての研究を行った結果、切除肺病巣内の約 40% に耐性菌が出現していると報告している。

長期間に亘る多量の抗結核剤の使用に対して、結核菌はそれに対する防禦反応として形態的および機能的に異常を起すことは理論的に考えられることである。また各薬剤の作用機序が相異なる点より考えると、このような変異も抗結核剤の種類によつては異なるのではないかと予想される。しかしながらかかる考えから結核菌の耐性獲得の機序を解明する一端として、耐性菌の形態ならびに性状の変化を研究した業績は少ない。

かかる点より私は耐性菌の特性を、主として染色性の変化および電子顕微鏡による形態的变化の面から追究し、さらに形態的に強い変化を示した耐性菌を保有している症例の臨床像と菌形態との関係について研究を行ったが、本編においては染色性の変化について述べる。

II 文献的考察

一般に耐性を獲得した菌が染色性に变化を示すか否かについては、Hunter (1953) は葡萄球菌のスルファチアゾール耐性菌では核染色が容易になると述べ、Shanahan (1954) はペニシリン耐性大腸菌の核染色で、通常 light pink を呈する核が、light blue に染色されると報告している。

耐性結核菌については H. Ruska (1952) は試験管内で実験的に作成した SM, P A S, T B₁ 耐性菌の染色性を検討したところ、染色性の低下と顆粒の不規則化をきたしているとして述べ、わが国でも平本 (1953) は P A S 耐性菌の 18%, T B₁ 耐性菌の 8% に染色性の低下が見られると言ひ、また多賀 (1953) も同様に SM 耐性菌に染色性の低下と顆粒の不規則化を認め、INAH 耐性菌は抗酸性を失つたものが多数見られると述べている。馬場

(1955) も顆粒染色によつてほぼ同様な結果を示している。しかしながらこれらの研究はすべて試験管内で実験的に耐性を獲得せしめた結核菌を対象としたもので、生体より分離した耐性菌の染色性を系統的に追究した研究報告は見当たらない。

しかしこの問題は日常結核菌の検索を行う臨床医にとつては重要なことであろうと考え、私は当教室における切除肺病巣内より分離した耐性菌について、その染色性を検討した。

なお、実験に使用した菌株は、肺結核患者 40 例より 3% の小川培地に分離した SM, P A S, INAH, T B₁ 耐性菌のおのおの 10 株ずつで、対照には標準結核菌青山 B 株 10 株 (培養時期別) を使用した。

まず分離したコロニーを標準白金耳を用いて 1 エーゼ採り、2cc の蒸留水に入れ均等化して菌浮游液を作り、これの 1 エーゼを載物ガラスに薄く塗抹し、全標本を同時に一定条件下にチールネルセン染色、グラム染色および Fontes 顆粒染色を行い、一標本について、100 個の菌数を数え、その染色状態を標準菌と比較した。

III 抗酸染色性の変化ならびにその複元性

チールネルセン染色法で菌体の抗酸染色性を見ること (表 1)、SM 耐性菌では、正常に染色されているものは

表 1 耐性結核菌の抗酸染色性

	標準菌	SM 耐性菌	P A S 耐性菌	INAH 耐性菌	T B ₁ 耐性菌
正 常	92%	61%	50%	80%	36%
軽度淡染	8%	11%	9%	10%	3%
淡 染	0	26%	39%	10%	54%
可染性著減	0	2%	2%	0%	7%

61%、やや淡染のもの 11%、淡染 26% で、さらに染色性が著減しているものは 2% である。P A S 耐性菌では、正常染色は 50%、淡染 41% で、染色性の低下が著しい。また INAH 耐性菌では正常染色が 80%、中等度の淡染が 10% で、染色の著減は全くなく、染色性は標準菌に近い。しかし T B₁ の耐性菌は正常染色が 36%、淡染が 61% で、4 剤に対する耐性菌の中では最も抗酸性が低下し

ている。

これをさらにグラム染色法で検討すると(表2), 染

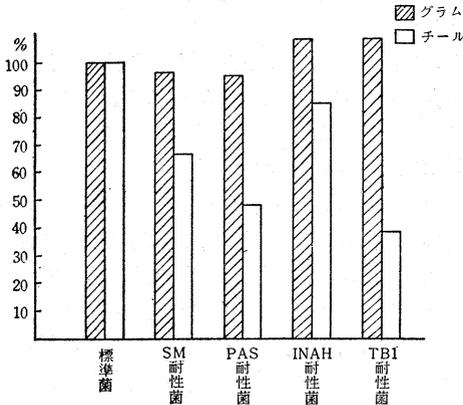
表2 耐性結核菌のグラム氏法による可染性

	標準菌	SM耐性菌	PAS耐性菌	INAH耐性菌	TB ₁ 耐性菌
正 常	89%	87%	85%	92%	97%
軽度淡染	11%	11%	12%	8%	2%
淡 染	0	2%	3%	0	1%
可染性著減	0	0	0	0	0

色性はSM耐性菌は87%, PAS耐性菌は85%, INAH耐性菌は92%, TB₁耐性菌は97%が正常染色で, この4者は標準菌の89%と比較して著明な差異は認められない。

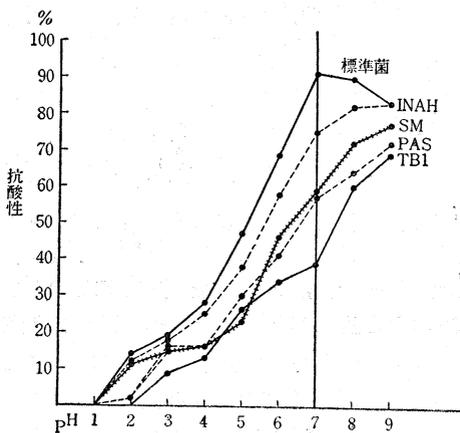
以上の両染色法による実験成績を, 標準菌を100として比較検討すると(図1), グラム氏法の染色性には

図1 抗酸染色性の低下度(50例)



ほとんど変化がないが, 抗酸性が標準菌に近いものは, INAH耐性菌(85%), SM耐性菌(66%), PAS耐性菌(56%), TB₁耐性菌(39%)の順で, INAH耐性菌以外は低下している。

図2 各種 pH 濃度における抗酸性の減衰および復元性



次に, これら結核菌を各濃度のpH緩衝液に24時間作用させた後に, チール染色を施してその抗酸性の増減を検討すると(図2), pH7においては抗酸性は標準菌では91%, 耐性菌ではINAH75%, SM59%, PAS57% TB₁39%に保たれているが, それより酸性が増すにつれ抗酸性は急激に低下し, pH1~2では全く抗酸性を失うが, これをアルカリ性液に作用させると, 標準菌では酸性液と同様に抗酸性低下の傾向を示すのに反して, 耐性菌では, さらに抗酸性は増大し, その復元性を示している。以上の成績より, 耐性結核菌は標準菌と同様に酸性メデューム中においてはその抗酸性が弱められるが, アルカリ性液に作用させると, 標準菌はpH7以上境地では酸性液と同様に抗酸性は低下する傾向があるが, 耐性菌では逆に抗酸性が復元するようである。

IV 顆粒染色性の変化

Fontes 氏の顆粒染色を施し, 耐性結核菌の顆粒数および顆粒の形態の変化について検討した。

表3 耐性結核菌の顆粒数の変異

	標準菌	SM耐性菌	PAS耐性菌	INAH耐性菌	TB ₁ 耐性菌
1~2個(正 常)	91%	52%	64%	53%	37%
3~5個(軽度増加)	8%	17%	6%	15%	12%
5~ (増加著明)	1%	27%	2%	5%	11%
不 明 瞭	0	4%	28%	29%	40%

まず顆粒数を算定すると(表3) SM耐性菌では顆粒1~2個の正常数のものが52%, 3~5個の軽度増加のものが17%, 5個以上に増加著明なもの27%を占め, また, 顆粒の不明瞭なものは4%にすぎない。しかるにTB₁耐性菌は正常数のものは37%の低率で, 不明瞭のものが40%の高率を占め, PASおよびINAH耐性菌はこの中間にある。

以上の如く耐性菌の顆粒数は一定せず, SM耐性菌では顆粒数の増加するものが多いが, PAS, INAHおよびTB₁耐性菌では顆粒数の増加するものは少なく, むしろ顆粒の不明瞭なものが多く見られ, 特にTB₁耐性菌ではこれが著しい。

表4 耐性結核菌の顆粒の可染性

	標準菌	SM耐性菌	PAS耐性菌	INAH耐性菌	TB ₁ 耐性菌
正 常	92%	82%	55%	68%	41%
軽度淡染	8%	14%	15%	3%	15%
強度淡染	0	0	2%	0	4%
不 明	0	4%	28%	29%	40%

顆粒の染色性においても(表4), SM耐性菌では正常に染色されているものは82%で, 軽度に淡染されているものは14%, また, 顆粒の染色性が不明瞭なものは4%で標準菌に近いが, TB₁耐性菌では正常がわずか41%で, 染色性の著減および不明瞭なものが44%を占め, PASおよびINAH耐性菌はこの中間にある。

以上の如く顆粒の染色性低下を標準菌に比べると, TB₁が最も悪く, 次いでPAS, INAH, SM耐性菌の順である。

V 実験的作成耐性菌との比較

試験管内で人工的に薬剤耐性を獲得せしめた耐性菌の染色性を, 病巣より分離した自然発生の耐性菌と比較すると(表5), 実験的耐性菌の染色性の低下は, SM, P

表5 実験的耐性菌と生体内耐性菌の可染性の低下率

	例数	SM耐性菌	PAS耐性菌	INAH耐性菌	TB ₁ 耐性菌
実験的耐性菌	28	10%	18%	15%	8%
生体内耐性菌	40	40%	50%	20%	60%

ASおよびTB₁は共に自然発生の耐性菌に比して遙かに染色性が低下しているが, INAH耐性菌のみは両者が近似している。

VI 総括ならびに考案

以上の実験を総括すると, 耐性結核菌のグラム氏液による染色性には著しい変化が見られないが, 抗酸染色性は全般的に低下し, その順位は下記の如くである。

標準菌 < INAH < SM < PAS < TB₁

次に耐性結核菌の菌体内顆粒は, 実験的耐性菌ではSM耐性菌の顆粒数が著しい変動を見るといわれているが, 私の生体内よりの分離菌では, SM耐性菌は顆粒数の増加をきたすに反し, PAS, INAH耐性菌では数の変化よりも, 顆粒不明瞭のものが多く, 特にTB₁耐性菌に著しい。

さらに顆粒の染色性を見ると, SM耐性菌では著明な低下は見られないが, PAS, INAH, TB₁では染色の不良なものが多く, その変化の順位は下記の如くである。

標準菌 < SM < INAH = PAS < TB₁

細菌の生活力は, 培養基上の発育状態, 動物に対する病原性によって決定されているが, 形態的あるいは染色性の変化によって, その菌の生態を憶測することは必ずしも容易ではない。しかし菌の染色性によって菌の生態を推知することができるとすれば, 一定の色素に対する親和性をもって判定する以外に, この意味において

以上の実験成果から考えると, 耐性菌は一般に抗酸性を失うものであつて, その程度は, INAHおよびSM耐性菌は抗酸性を失うことが比較的少なく, PAS, TB₁耐性菌はその率が高く, 特にTB₁は顕著である。また菌を酸性メヂューム中に一定時間作用させると, そのpHの低下につれて耐性菌も標準菌も共に抗酸性が著しく阻害される。しかるにpH7以上のアルカリ性メヂュームに作用させると, 標準菌では同様に抗酸性が低下するに反し, 耐性菌ではかえつて抗酸性が増加し復元される。このことは, 耐性菌はその環境によつては本来の姿に復元しうることを示している。

また, 顆粒の数およびその染色性の点から見ると, 耐性菌は一般に顆粒数が増加する傾向にあり, その程度はSM耐性菌が最も著明である。これに反し, 顆粒の染色性が悪くなるものはTB₁耐性菌が最も多くSM耐性菌はその%にすぎない。

以上のような点から考えると, 同じ耐性菌ではあるが, SMおよびINAH耐性菌は, その生活力がかえつて増大している感をいだかせ, PASおよびTB₁(特にTB₁)はその生活力を抑圧されているように考えられる。

なお, このような変化の起る理由は, 各薬剤の結核菌に対する作用機序が明らかにされない限り決定的なことは主張できないが, TB₁耐性菌の変化が最も強く, SM耐性菌に少ないことは, その作用機序に差異のあることを予想される。

次に染色性の変化が臨床的に如何なる意義を有するかを考察するに, 耐性菌が抗酸性を失うような場合には, 臨床抗酸性染色によつて結核菌の有無を判定することは, 耐性菌を対象とした場合には十分な検査法でないといえる。しかし私の研究によれば, このようなものでもpH9のアルカリ性液に24時間作用させると, その抗酸染色性が復元されるので, 耐性菌の塗抹検査に対する1つの新しい方法ともなるのではないかと考える。また, このことは治療上にも1つの示唆を与えるもので, 耐性菌が抗酸性を復元することが, 無耐性菌へ復元することを意味するものと仮定すれば, 治療上における意義は大である。この点については目下引き続き研究中である。

VII 結 論

1954年より1956年までの間に, 東京医大外科において, 肺結核患者より耐性菌を分離し, その染色性について観察したところ, 耐性菌は一般に抗酸染色性の低下が見られるが, 顆粒数および顆粒の染色性は増加する場合と減少あるいは消失する場合がある。SMおよびINAH耐性菌ではこの変化が軽度であるが, PASおよびTB₁耐性菌では変化が著しい。(文献は第三編に記載)