

抗結核剤による結核菌(ミコバクテリウム)の形態、

発育様式の変化に関する研究

I SMによる発育初期集落の変化

伊 藤 義 昭

京都大学結核研究所細菌血清学部(主任 植田三郎教授)

国立宇多野療養所(所長 日下部周利博士)

受付 昭和32年11月27日

緒 言

結核菌およびその他の Mycobacterium はその環境の条件によつて形態、染色性が著しく異なることは古くから注目されており、近時植田¹は特に発育極初期の菌膜を配列を乱さずに観察する方法によつて、形態、染色性を異にした菌体が順序よく配列していることを見、この方法によつてこれら各菌体の発育段階を推測することが可能であることを示した。

さて抗結核剤の作用機作を結核菌の形態学的な変化から追及しようとする報告は決して少なくない^{2)~15)}。しかし従来多くの研究者が用いた方法は菌液(種々なる発育段階の菌体が雑然と混在している)に薬剤を作用せしめ観察する方法であり、このような方法によつては如何なる発育段階の菌体が薬剤の影響によつてそれぞれ如何に変化するかを知ることはほとんど不可能であるから適切な方法とは考えられない。このような欠点を除き、発育の各段階の菌体に対する抗結核剤の影響を正確に知ろうという目的で著者は次の如き方法を用いた。すなわち植田がその観察に用いた方法にならつて、結核菌の発育極初期の集落(上記の如く形態、染色性を異にした菌体が発育段階にしたがつて順序よく配列している)に抗結核剤を作用せしめ、その配列を乱さずに観察した。このような方法によれば、さきに児玉¹⁶⁾もSMを用いて少しく試みているが、作用前の菌体と作用後の変化した菌体との関係、さらにその集落中配列の位置によつて如何なる発育段階の菌体がそれぞれ如何に変化するかを推測することができる。

抗結核剤としてはSMおよびINHを選び、初期集落に対する作用を観察すると共に、薬剤を作用せしめる条件を種々変化せしめた場合(例えば氷室中で作用せしめる等)の菌の起す変化の差異、さらに両剤を同時にあるいは時を異にして作用せしめた場合の変化、また薬剤作用後の菌の生残、耐性化、耐性菌の薬剤による変化等についても検討したが、本報ではまずSMによつて発育初期集落が如何に変化するかについて述べる。

材料および方法

菌株としては人型 H₃₇Rv 株、鳥型鳥京株、非病原性 Mycobacterium としてスメグマ菌および A-1 株(土壌より分離)を供試した。培養基はキルヒナー液体培養基を用いた。SMはDihydro-streptomycin sulfateを用い、適当な濃度となるようにキルヒナー培養基に添加した。

湿室内スライド培養法¹⁷⁾、滅菌スライド上にキルヒナー培養基を1滴置き、これに極く少量の菌液を混じて、湿室内に納めて37°Cに一定時間培養し、初期集落を形成せしめる。しかる後SMを含むキルヒナー培養基を1滴静かに添加し、所要のSM濃度となるようにした後、さらに37°Cで作用せしめ、一定時間後に湿室から取出し、そのまま乾燥、固定、染色した。

キルヒナー表面菌膜貼布法¹⁾、キルヒナー培養基の液面に初期集落を形成せしめ、これにSMを添加し、さらに37°Cで作用せしめ、一定時間毎にこの作用を受けた初期菌膜をスパーテルにて掬いとり、予めスライド上に置いた1滴の蒸溜水に静かに浮かばせ、孵卵器中で乾燥、固定、染色した。

染色法としては主に Ziehl-Neelsen 法を用いた。さらに一部には以下の如く核染色、NTC還元染色を併せ行つた。

核染色¹⁸⁾、主としてスメグマ菌について行つた。N-HCl 60°C 10分処置後、十分に流水水洗し、1% Crystalviolet (pH3.5) 液にて数秒間染色した。(薬剤作用後の菌体においてはCrystalviolet液によつて短時間染色するのみでEosin等による後染色は行わない方がよい結果が得られた。)

NTC (Neo-tetrazolium chloride) 還元染色¹⁹⁾、培養基にSMを添加作用せしめた後、これに予め Autoclave にて滅菌した0.1% NTC水溶液を約10%量静かに添加し、37°C 2時間後、菌膜を上述の如くスライド上に貼布し、そのままあるいは1% Eosin 液にて数秒間後染色して観察した。

位相差顕微鏡下における観察一、一上述の如き方法では薬剤作用前の所見と対比することによつて推断するわけであるが、直接にその変化を追跡するために以下の如く行つた。すなわち滅菌スライド上にSMを含むキルヒナー培養基を置き、これに予め形成せしめた初期集落を浮かばせ、滅菌カバーガラスで覆い、周囲を封蝋し、恒温装置(37°C)内の位相差顕微鏡にて初期集落の変化を経過を追つて観察した。

実験成績

集落の配列の乱れが少ないよい標本をうるためには温室スライド培養法が優れていた。また各菌型の初期集落を形成せしめるに要する日数は $H_{37}Rv$ 株では7日、鳥京株では4日、スメグマ菌では3日、A-1株では1日前後が適当であつた。

これらの初期集落にSMの各濃度を作用せしめた場合、その示す変化の相違によつて阻止濃度、限界濃度、および変化を起さない濃度の3段階に分けることができ

表1 各菌型におけるSMの濃度と形態的变化の関係

菌株	SM						
	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.01 γ/cc
$H_{37}Rv$	++	++	++	++	+	-	-
鳥京	++	++	++	++	+	-	-
スメグマ	++	++	++	++	+	-	-
A-1	++	++	+	-	-	-	-

++: 阻止濃度の変化 +: 限界濃度の変化 -: 変化はみられない

た。すなわち表1に示す如く、例えば $H_{37}Rv$ 株の場合、10,000 γ ~10 γ の濃度範囲(阻止濃度)においてはほぼ同様な変化がみられ、阻止限界の1 γ (限界濃度)においては10 γ 以上の阻止濃度の変化とは少しく異なる変化を示した。0.1 γ 以下(限界以下)の濃度においては形態変化は認めず、発育にも影響を示さなかつた。さらに他の菌型においてもこの3段階に分けることができた。

以下観察の比較的容易なスメグマ菌より順に各菌型の変化を詳述する。

I スメグマ菌一、一SM各濃度における変化

(a) 阻止濃度(10,000 γ ~10 γ/cc) この濃度においては発育はもちろん阻止され、1日後にはすでに菌体の膨化、染色性の低下を主としたSMに特徴的な変化がみられ、さらに数日後にはこの変化が一層顕著にみられた。すなわちZ-N染色で配列の先端部の易染性の菌体においては菌体は膨化し、多少とも抗酸性を有していた菌体では抗酸性は弱くなり、全般的に染色性が低下した。時間の経過と共にこれらの変化は次第に顕著となり、膨化した菌体はその内部に易染性の顆粒の点在するのが辛じて観察しうるにすぎないまでに変化した。しかし抗酸性

は低下するが完全に消失するまでには至らない場合が多かつた。これらの変化を受けた菌体と共に配列の基部(集落の中心部)にはほとんど変化を受けない抗酸性の菌体が約2週間後においてもなお観察された。このような変化を受けない菌体はやや大きな集落では、その中心部にかなりの数存在した。以上の如き変化は10,000 γ ~10 γ の範囲においては濃度に関せず常にほぼ同様に観察された(図3)。

(b) 限界濃度(1 γ/cc) この濃度を作用せしめた場合のキルヒナー培養基の表面菌膜を肉眼的に観察すると、わずかながら1~2日間はなお菌膜が多少とも広さを増すのがみられ、その後はほぼ不変であるが、10日目頃から再び発育が起り、さらにその数日後においては対照と大差のないまでに増殖がみられた。

これを顕微鏡的に観察した場合も同様な経過を示した。すなわち限界濃度における変化は上述の阻止濃度の場合とほぼ同様な特徴の変化がみられたが、全般的に軽度であつた。ただ2~3日後すなわち菌膜が大きくなるのが止まる時期に一致して一部少数の菌体ではその一部分が特に膨大した(図2)。このような形態変化は10 γ 以上の阻止濃度では観察されなかつたものであつて、限界濃度における特徴ある形態変化の1つであつた。以上の如き変化は配列の先端部の菌体にのみみられ、基部の菌体にはみられなかつた。さらに10日目前後から再発育が観察されたが、この再発育は上記の膨大した形態の一部のものから起る如くであつた。

この限界附近の濃度についてさらに詳細に、また時間的にも詳しく検討したが、上述と差異を示す所見は得られなかつた。すなわち特に伸長した形態等を示したものもなく、また所謂刺戟帯を思わせる所見も得られなかつた。

(c) 限界以下の濃度(0.1 γ/cc 以下) この濃度では発育、形態共に対照と同様な経過を示し、影響は認めなかつた。

II A-1株一、一SM各濃度における変化

A-1株はSMに対して感受性が低く、10 γ 以下では影響を認めず、100 γ において限界濃度の所見を、1,000 γ 以上において阻止濃度の所見を認め、その変化はスメグマ菌とほぼ同様であつた。なお限界濃度附近において、濃度、時間共に詳しく検討したが、スメグマ菌の場合と同様で差異を示す所見は得られなかつた。

III 核染色およびNTC還元染色

主にスメグマ菌、A-1株について行つた。核染色において、阻止濃度作用後の菌体は全体として膨化しているが、染色される核は数、大きさ、位置等ほとんど作用前の対照にみられた核所見と同様であつて、SM作用後に核分裂が続いて起つたと考えられる所見はなく、またSM作用1週間後においてもほぼ同様に観察され消失するこ

とはなかつた。限界濃度においてもほぼ類似の核所見であつたが、特に膨大した形態内に2コないし3コの核が染色されるのが注目された。NTC還元顆粒は、阻止濃度において、特に配列の先端に位置する菌体内のものは早期に消失したが、配列の先端からやや離れた位置の菌体内には大形の顆粒の少数が数日後にも残存するのが観察された。

IV 位相差顕微鏡による観察

スメグマ菌を用い10 γ および1 γ を作用せしめて観察した。10 γ (阻止濃度)では発育は全然みられず、菌体の全体的な膨化のみが注目された。これに対して1 γ すなわち限界濃度では初期の変化のみ追跡しえたにすぎないが、この濃度ではSM作用後も発芽および分節がなお1~2回徐々に繰返された後に発育が停止するのが観察された(図7, 8)。

V 鳥京株一, SM各濃度における変化

鳥京株は10,000 γ ~10 γ において阻止濃度の変化を、1 γ においては限界濃度の変化を示したが、0.1 γ 以下では発育、形態共に何ら影響を受けなかつた。

鳥型菌では対照の初期集落において易染性のみ染色される菌体はすでに比較的少数であつた。しかしその変化は非病原性菌で観察した変化とほぼ同様な所見で本質的な差異はないようであつた。ただその変化の推移がやや遅く、また変化を受けない基部の抗酸性の菌体が比較的多数認められた。また鳥型菌は限界濃度における上記2菌株と同様な膨大した形態の形成が特に顕著であつた。

VI 人型菌 H₃₇Rv 株一, SM各濃度における変化

H₃₇Rv 株においてもその濃度と変化との関係は上記のスメグマ菌、鳥型菌と同様であつた。配列の先端部の菌体のみに変化がみられ、基部の菌体には変化がみられなかつたこともまた上記の3菌株とほぼ同様であつた。このような変化の推移は鳥型菌に比して遅く、一応明らかな変化を認めるに要する時間はスメグマ菌で約15時間、鳥型菌で約1日であるのに対して人型菌では約2~3日を要した。また時間の経過と共に変化を受ける菌体の数が漸次多くなる(配列の先端から基部に向つて変化が及ぶ)が、約1週後にはほぼ一定し、以後変化を受けない基部の菌体の数は不変となる如くであつた。人型菌においてもまた限界濃度では上記の3菌株と同様に数日後に膨大した形態が現われたが、その数は少なく顕著ではなかつた(図4, 5, 6)。

總括ならびに考按

以上予め Mycobacterium の初期集落を形成せしめて、これにSMを添加して作用せしめ、配列を乱さずに観察した。このような方法によつて集落中の辺縁部に位置する易染性の菌体(もちろんこの中には同時に多少と

も抗酸性にも染まる菌体が含まれているが)にのみ変化がみられ、基部(中心部)には変化を受けない抗酸性の菌体が存在することが明らかとなつた。ことに人型菌においては配列の極く先端部の菌体に比してやや基部に位置する同様の菌体は変化を受けるのが少しく遅れる傾向を示すが、約2週後においてもなお未だ変化を受けない菌体が中心部に残存した。後報²⁰⁾において明らかになるが、SMの如き抗結核剤が作用し特徴的な変化を起さしめうるのは、菌が生活状態に在る時に限られることから考へて、このような配列の基部の変化を受けない菌体は少なくとも生活状態にないものと考えられた。このように初期集落においてすでにその基部に生活状態にないあるいは生活力を失つた菌体が存在することは注目に値する。またこのような所見は初期集落に薬剤を作用せしめしかも配列を乱さないようにして観察する上記の如き方法によつて初めて得られたものであつて、従来多くの報告にみる如く、結核菌菌液に直接薬剤を作用せしめる方法では大略の傾向は知りえても、上記の如き所見は得られなかつたことは当然であらう。

次にSMをその作用の点から阻止濃度、限界濃度および全然作用を現わさない濃度の3段階に大きく分けうる事が明らかとなつた。すなわち阻止濃度とはいわゆる完全阻止濃度とも言うべきものであつて、このような濃度ではSMに特徴的な変化である菌体の膨化、染色性の下低を主とした変性過程を思ひしめる変化が起つた。この場合発育は直ちに止まることは位相差顕微鏡による直接の追跡によつても、また核所見からも明らかであり、SM作用後から直ちに変性過程が始まるものと考えられた。また極く高濃度に至るまでその所見はほとんど差異を認めなかつたが、これは少なくとも形態学的には一定以上の濃度のSMは同じ作用機作で菌に働くことを示しているものと考えられた。

これに対して限界濃度においては少しく異なつた所見であつた。すなわちSMを作用せしめた後でも少しく発育増殖が許される点がまず阻止濃度の場合との大きな相違であつた。このような高濃度と低濃度とのSMの作用の相違は Bridger ら⁷⁾、喜多⁹⁾らもその傾向を認めている。またSMによつて菌体の長さが延長する傾向を報告するものが多いが、この点に関しては低濃度における菌の微弱な発育の結果と見るならば充分ありうることと首肯された。しかしながら上記の観察においては顕著に伸長した形態は出現しなかつた。さて少しく発育が許された後には、発育が止まり、多くの菌体は阻止濃度の場合と同様に変性過程に移行するようであるが、その変化は一般に軽度で留まつた。しかし一部少数の菌体ではその一部分が特に膨大するのが注目された。しかもこのような特殊な形態は発育が止まる時期に一致して現われること、その内容が多核ないし多細胞であること、およびそ

のような形態から約1週後に再び発育がみられること等からしても、このような形態は変性による変化と言うよりもむしろ不適当な環境に対処する形態変化であろうと考えられた。この点は次報²¹⁾において明らかにするようにINHの限界濃度においてもまた類似の膨大した形態が出現すること、および高温下で培養した場合にも同様に出現すること²²⁾と考え合わせて興味深い。ここではしかしながらいわゆる刺戟帯とも言うべき所見は得られなかつたが、従来の報告中にも同様の記載のない点から見ても、いずれにしても顕著には発現しないのではないかと考えられた。限界以下の低濃度では、発育、形態共に何らの影響も受けなかつた。

供試した *Mycobacterium* 各菌型において、変化を起すに要する濃度はおのおの少しく異なるが、SMによつて起る変化には本質的な相違は認められなかつた。ただその変化の推移の速度が各菌型の通常の培養基上での発育速度によく比例した。このことは活動状態の菌にSMが作用することの証左の1つと考えられた。ことに人型菌では変化の発現が遅いため、比較的短時間後の観察のみでは変化の全貌をとらええないのではないかということが憂慮される。

ここでSM作用後の核およびNTC還元顆粒の所見について考察しよう。ここに用いた核染色法ではFeulgen反応あるいはDNAaseの影響等は検討されておらず、またSMの作用で核以外のものが核と同様に染色される可能性も考えられるが一応上記の方法によつて染まつた顆粒を核として考察してきた。これは集落中における配列中の菌体の位置とその菌体内の核との関係から考えてきた矛盾を示さないからである。このような判断が許されるならば、SMを高濃度、長時間作用せしめ、菌体が崩解に近い像を示している場合でもなおかつ核は相当よくその染色性を保持していることがわかつた。さらにNTC還元については菌液としての活性をTTCあるいはNTCによつて測定しようとしたMacVandiviereら²³⁾、金井²⁴⁾、有馬²⁵⁾らの報告および菌体内の還元顆粒を観察しようとしたMuddら²⁶⁾の報告からみて、この反応は菌の活性の示標として興味深く、近時植田¹⁹⁾によつてさらに詳細に検討された。このNTC還元顆粒のうち配列の先端部の菌体内の顆粒はSMによつて比較的速度やかにかつ容易にその還元能を失うにもかかわらず配列の少しく先端から離れた位置の菌体中のその少数はよく残存しうることが注目された。これら核およびNTC顆粒の所見はSM作用後の菌の生残、再発育の問題と関連して後報²⁷⁾において詳述される。

結 論

結核菌およびその他の *Mycobacterium* の発育初期集落にSMを作用せしめ、その配列を乱さずにSMによる

菌体の変化を観察し次の如きことを知りえた。

- 1) 初期集落の辺縁部の菌体には変化が起るが、中心部のそれは変化を起さなかつた。
- 2) SMによつて起る変化の特徴としては、菌体の膨化、染色性の低下がみられ、これらの変化は変性過程の現われと考えられた。
- 3) 各菌型においては作用を受ける濃度はそれぞれ異なるが、変化の様相によつて、阻止濃度、限界濃度およびそれ以下の全然影響を示さない濃度の3段階に分けられた。阻止濃度では発育は直ちに阻止され変性が起つたが、これは高濃度までほとんど同様の様相であつた。これに対して限界濃度では少しく発育が許されて後、変性が起つたが、菌体の一部分が膨大した形態が出現することが注目された。
- 4) 各菌型における変化は本質的に差異はなかつた。ただそれぞれの菌型の変化の推移には遅速がみられたが、それはその菌型の通常の発育速度に比例した。

御指導御校閲を賜つた植田三郎教授に満腔の謝意を表するとともに御援助を賜つた国立宇多野療養所日下部周利所長に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) 植田：結核菌の研究I，昭28，南江堂。
Rev. Tuberc., 19: 8・9, 1955.
- 2) Smith, D.G. & Waksman, S.A.: J. Bact., 54: 2, 253, 1947.
- 3) Strauss, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 64: 1, 97, 1948.
- 4) 猪野：新潟衛生試験所報告，第13輯，昭25.
- 5) 金：J. Antibiotics, 3: 13, 854, 1950.
- 6) O. Ruziczka et E. Orth: Ann. Inst. Pasteur, 82, 334, 1952.
- 7) Bridger, E.M. et al.: Nature, 171: 4344, 211, 1953.
- 8) 安元：レプラ，22: 2, 27, 昭28.
- 9) 喜多：奈良医学雑誌，5: 1, 14, 昭29.
- 10) 谷野：京都医学会雑誌，5: 9, 269, 昭29.
- 11) 篠原：抗研誌，10: 4, 224, 昭30.
- 12) 村田：金沢結研年報，13: 1, 63, 昭30.
- 13) 田口：北海道医学雑誌，30: 7・8, 469, 昭30.
- 14) Gupta, K. C. et al.: Am. Rev. Tuberc., 73: 2, 296, 1956.
- 15) 生駒：神戸医大紀要，7: 2, 2487, 昭31.
- 16) 児玉：抗菌物質研究，4: 1・2, 79, 昭26.
- 17) 山田・岡田：結核，27: 3, 117, 昭27.
- 18) 植田：結核，32: 5, 241, 昭32.
- 19) 植田：結核，32: 4, 181, 昭32.

- 20) 伊藤：第3報，結核，掲載予定.
- 21) 伊藤：第2報，" " .
- 22) 植田他：第8回日本細菌学会関西支部総会演説，昭30.
- 23) MacVandiviere, M. et al. : Am. Rev. Tuberc., 66 : 1, 95, 1952.
- 24) 金井：日本細菌学雑誌，9 : 1, 27; 同誌，9 : 2, 95; 同誌，9 : 3, 181, 1954.
- 25) 有馬：Jap. J. of Tuberc., 2 : 3, 279, 昭29.
- 26) Mudd, S. et al. : J. Bact., 62 : 459, 1951.
- 27) 伊藤：第4報，結核，掲載予定.



図 1 スメグマ菌, 発育初期集落, 対照
Z-N 染色

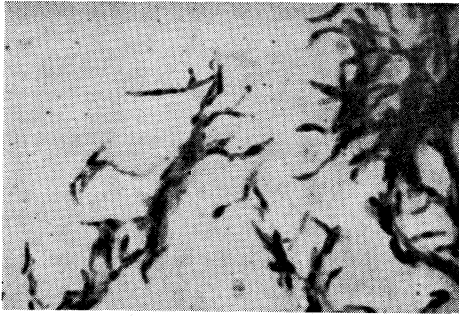


図 2 スメグマ菌, SM限界濃度(1γ)作用 3 日後,
膨大した形態が目される。 Z-N

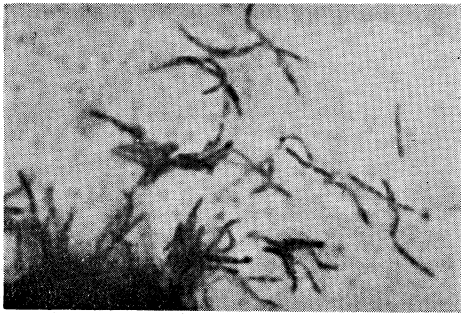


図 3 スメグマ菌, SM阻止濃度 (10γ) 作用 3 日後,
菌体は膨化し, 染色性は低下している。 Z-N

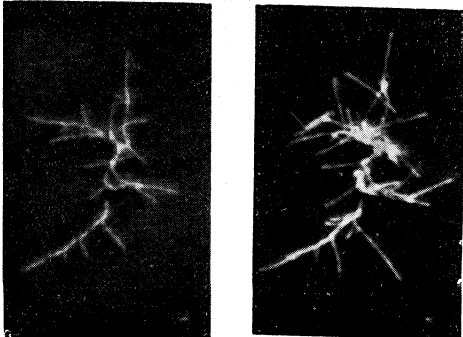


図 7 a b
スメグマ菌, SM限界濃度(1γ)作用, 位相差顕微鏡によつて観察, (a)作用直後, (b)3 日後, 少し発育後停止している。



図 4 人型 H₃₇Rv, 発育初期集落, 対照
Z-N



図 5 人型 H₃₇Rv, SM限界濃度(1γ)作用 6 日後,
少数ではあるが膨大した形態がみられる。Z-N

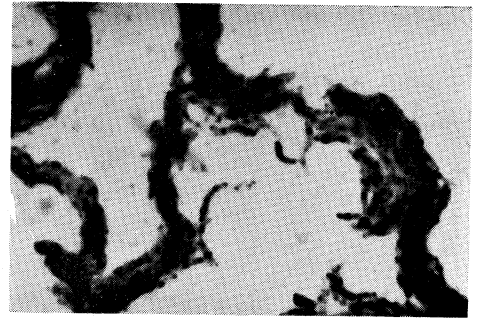


図 6 人型 H₃₇Rv, SM阻止濃度(1,000γ)作用
3 日後, 図 3 とほぼ同様の所見。 Z-N

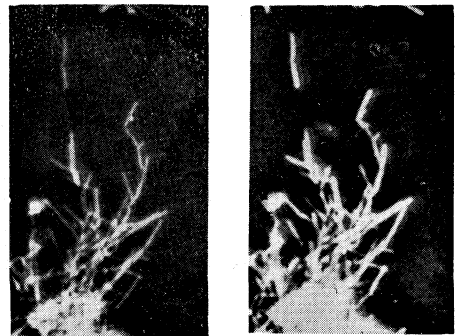


図 8 a b
スメグマ菌, SM阻止濃度 (10γ) 作用, 位相差顕微鏡によつて観察, (a)作用直後, (b)4 日後,
全然発育せず菌体は膨化している。