

# 抗結核剤による結核菌 (ミコバクテリウム) の形態、 發育様式の変化に関する研究

## II INHによる發育初期集落の変化

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

前報<sup>1)</sup>においては結核菌の發育初期集落にSMを作用せしめ、配列を乱さずに観察することによつて、変化を受けるのは配列の先端部の菌体であり、基部には変化を受けない抗酸性の菌体が認められることが注目された。SMとは作用機作が異なると考えられるINHについてはSMと趣を異にした形態学的変化すなわち菌の長さの短縮、顆粒状化、およびとくに抗酸性の顕著な消失等がMiddlebrook<sup>2)</sup>, Barclay<sup>3)</sup>, Schaefer<sup>4)</sup>らによつて報告されており、SMと比較して興味深い薬剤と考えられた。本報ではINHを前報と同様な方法で初期集落に作用せしめ、その変化を観察した。

### 材料および方法

供試菌株、方法いずれもほぼ前報<sup>1)</sup>と同様である。あらかじめ各菌型の初期集落を形成せしめて後、これにINHを添加し、37°Cにて一定時間作用せしめた後に、配列を乱さないようにして固定、染色、観察した。INH作用後の集落はSMの場合に比して配列が乱れやすく湿室内スライド培養法を用いた方がよい結果が得られた。

核染色、NTC還元染色、位相差顕微鏡による観察等の方法はいずれも前報と同様である。

INH (Isonicotinic acid hydrazide) は 100 mg/cc の水溶液を 100°C、20分滅菌後稀釈し、所要濃度となるように培養基に少量添加し作用せしめた。

### 実 験 成 績

INHに対して人型菌が最も感性であり、鳥型菌が最も作用を受けにくかつた。しかしながら各菌型を通じてINHによつて起る変化は本質的には差異は認められなかつた。また変化の様相からINHの濃度は以下のごとく分けられた。すなわち高濃度、中等阻止濃度、限界濃度および限界以下の全然影響を示さない濃度の4段階であつた(表1)。

以下順をおつて各菌型の変化について詳述する。

表 1 各菌型におけるINH濃度と形態的变化の関係

菌 株	I N H						
	10,000	1,000	100	10	1	0.1	0.01 $\gamma$ /cc
H <sub>37</sub> Rv	卍	卍	卍	卍	卍	+	-
鳥 京	卍	卍	卍	+	-	-	-
ス メ グ マ	卍	卍	卍	卍	+	-	-
A-1	卍	卍	卍	卍	+	-	-

卍 : 高濃度の変化

卍 : 中等阻止濃度の変化

+: 限界濃度の変化

- : 変化はみられない

#### I. A-1株, INH各濃度における変化

土壌から分離した非病原性のこの菌株は、發育が速く観察も容易であるため用いた(図1)。

(a) 中等阻止濃度(1,000 $\gamma$ ~10 $\gamma$ /cc) : この濃度範囲においてINHに最も特徴的な変化がみられ、少なくとも形態学的には濃度差による差異はほとんど判別されなかつた。Z-N染色の所見では配列の先端部の易染性の菌体はもとより、それに続く多少とも同時に抗酸性にも染まる菌体においてもまた変化が起つた。すなわちこの抗酸性がINH作用後10時間前後にはすでに全く消失し、しかもこれら変化した菌体中にはそれに加えてさらに易染性に濃染する顆粒が多数顕著に形成されるのが注目された。この顆粒以外の細胞質の部分は時間の経過とともに染色性が弱くなつた。約24時間前後でこれらの変化はほぼ一定し、以後菌体は膨化し、細胞質も染まりにくくなり濃染した顆粒のみは比較的長くその染色性を保持し続けるため一見連鎖状球菌をみるごとく顆粒が連つて観察された。しかしながら集落中配列の基部(中心部)には全然影響を受けず抗酸性に留つて変化しない菌体が認められた(図3)。

(b) 高濃度(10,000 $\gamma$ /cc) : 高濃度となると肉眼的にはもちろん上記(a)と同様に發育が阻止されているが、上記のごときINHに特徴的な変化は観察されず、その変化はむしろSMを作用せしめた場合の変化に類似した。すなわち菌体は膨化し、全般的に染色性が低下したが、

抗酸性が全く消失するとき所見はみられなかつた(図4)。

この濃度付近においてさらに詳細に10,000 $\gamma$ , 7,500 $\gamma$ , 5,000 $\gamma$ , 2,500 $\gamma$ , 1,000 $\gamma$ について検討した。5,000 $\gamma$ までは10,000 $\gamma$ と同様の变化を, 2,500 $\gamma$ 以下において上述1,000 $\gamma$ (中等阻止濃度)と同様の变化を示した。

(c) 限界濃度(1 $\gamma/cc$ ): 次に阻止限界の濃度については, キルヒナー培養基における肉眼的発育の様子を観察すると, INH添加後1日前後は発育が抑制されるが, 以後再び発育がみられ4~5日後には対照に劣らず発育した。このような経過はSMの限界濃度における発育の経過と大いに異なる。Z-N染色によつてもまた同様の経過で変化がみられた。すなわち限界濃度においてもまた上記(a)の中等阻止濃度にみられたINHに特徴的な変化がまず軽度に現われた。ただ異なる主たる点は抗酸性の消失が著明でなく, 顆粒形成に大小不同が注目されたことである。この大形の顆粒はSMの限界濃度にみられた菌体の一部分が膨大した形態と類似のものではないかと考える(図2)。もちろんこの場合にも集落中配列の基部すなわち中心部には変化を示さない菌体が観察された。さらにこのように変化した菌体内の大形顆粒の一部のものから, INH作用後15時間内外の比較的短かい時間後にすでに再発育が起るのが観察された。

(これは耐性化によるものと考えられるが, その詳細は後報で考察したい。)以後この再発育はほぼ通常で続いたため, INH作用1日後には変化した集落と新しい再発育による集落とが混在し, しかも明瞭に区別して観察された。

この限界濃度については, 濃度および時間を種々にして詳細に検討したが, とくに上記と異なつた所見は得られず, またいわゆる刺戟帯を考えさせる所見も得られなかつた。

(d) 限界以下の濃度(0.1 $\gamma/cc$ 以下): 発育, 形態ともに全然影響を認めなかつた。

## II. スメグマ菌, INH各濃度における変化

各濃度における変化はA-1株ととくに差異はない。ただその変化の推移がやや遅いようであつた。

## III. 核染色およびNTC還元染色

主としてA-1株について観察した。INH中等阻止濃度を作用せしめた場合の核染色所見でとくに注目されたのは, 対照に比して変化を受けた菌体中に核と見做される顆粒がきわめて多数に, しかもその多くは2コずつ相接して対をなして観察された点である。このように染色された核と見做される顆粒と上記Z-N染色で観察された易染性の濃染顆粒との関係を確認するために, まずMethylene blueで単染色して観察し, 次にこれをHCl処置, 核染色を行つて同一の菌体について観察した。その結果易染性に染る顆粒のほとんどが核染色においても

また染色されることがわかつた(図10)。

高濃度(10,000 $\gamma/cc$ )のINHを作用せしめた場合はZ-N染色ではSMの変化に類似していたが, 核染色においてもまたSMの場合と同様対照と大差のない所見を示した。

NTC還元についてはINHを含む培養基にNTC液を添加した場合, 培養基が暗紫色に着色するのがまず注目された。さらにINHによつて変化を受けた菌体では濃い顆粒染色を起すと同時に菌体全般に紫色の呈色がみられかつ対照よりも一般に強く呈色することくであつた。しかしながら菌の存在に関係なくNTCはINHと反応して呈色することが明らかとなつたために, 下記にも観察することくINHの存在する場合にはこのような反応を利用する観察は当を得たものでないということが分つた。

## IV. 位相差顕微鏡による観察

前報<sup>1)</sup>と同様な方法でA-1株の初期集落をINHを含むキルヒナー培養基で封じ, 37°Cにおいてその変化を追跡した。

中等阻止濃度(10 $\gamma$ )における変化は図9にみるごとく, 伸長が許されないままで菌体は1~2回分節を繰返すのが注目された。また菌体内部には顆粒状の構造が顕著になつた。

限界濃度(1 $\gamma$ )においてもまた中等阻止濃度と同様に菌体の伸長がみられないままで, 分節および菌体内部の顆粒形成がみられた。これは前報のSMの限界濃度においては伸長, 発育が初期に少しく許されるのと比較して興味があつた。さらに高濃度(10,000 $\gamma$ )を作用せしめた場合は上記のごとくSM阻止濃度を作用せしめた場合と似た所見を示したが, 位相差においてもまたSM阻止濃度の場合とほぼ同様な所見であつた。

## V. 鳥京株, INH各濃度における変化

鳥型菌はINHに対して感受性が低いが, それによつて起る変化は他の菌型と同じ特徴を示した。INH添加後2週まで観察したが, 上記A-1株の場合に比して変化の推移はやや遅れた。1 $\gamma$ 以下では発育, 形態ともに変化はみられず, 10 $\gamma$ では限界濃度の変化を示し, 上記A-1株の場合と同様, 大小不同の顆粒の形成, その一部からの再発育(これは2~3日後より起つた)がみられた。100 $\gamma$ ~1,000 $\gamma$ においては中等阻止濃度の変化を示した。すなわち配列の先端部の菌体に顆粒の形成, 抗酸性の消失を特徴とした変化がみられた。10,000 $\gamma$ においては上記の菌型と同様に高濃度の変化, すなわち前報のSM作用時のそれに類似した変化であつた。以上のごとき変化を受けた集落の配列の基部にはほとんど変化を示さない抗酸性の菌体が明らかに観察されたことは他の菌型と同様であつた。

## VI. H<sub>37</sub>Rv株, INH各濃度における変化

人型菌においてもまたINHの中等阻止濃度によつて

変化を受けた菌体では抗酸性が完全に消失した。しかし基部には上記各菌型と同様に変化しない菌体が観察された。

0.01 $\gamma$ 以下では変化はみられず、0.1 $\gamma$ 前後において限界濃度の変化がみられた。すなわち変化はINHに特徴的な変化であるが、その程度は弱く、大形の顆粒が出現し、また数日後には再発育が一部から起つた(図6)。1 $\gamma$ ~1,000 $\gamma$ ではINHに特徴的な変化が上記各菌型とほぼ同様にみられ(図7)、10,000 $\gamma$ ではSMに類似した所見を示した(図8)。

これらの変化の推移はそれぞれの菌体について必ずしも一定ではないが、ほとんど大多数の菌体が一定程度の変化に達するのには3~7日を要し、他の菌型に比して最も緩徐であつた。

### 総括ならびに考案

INHを初期集落に作用せしめた場合にもまた前報<sup>4)</sup>のSMの場合と同様に配列の先端部の菌体は変化を受けるにもかかわらず、配列の基部の菌体はINHの濃度、菌型の如何を問わず変化を受けなかつた。菌液に直接INHを作用せしめた場合にもまた上記と同様に変化を受けない抗酸性の菌体が当然ある数観察されなければならないと考えるが、従来このような記載をした者がほとんどないのは、これらの研究者が専ら変化した菌体だけに注意しつつ観察したためではなからうか。しかもこのような依然抗酸性に留まる菌体を見出した場合には、従来一般の考え方にもついで、このような菌体をただちに抵抗性の形態に擬した<sup>5)</sup>。しかしながら植田<sup>6)</sup>の発育様式の考え方からすれば、集落の中心部に位置するこのようなINHの影響によつて変化しない菌体の多くは、もはや生活力を失いすでに変性した菌体であることを推断することができる。後報においてさらに検討したいと考えるが、このような考え方からすればINH作用後の菌体中になおかつ抗酸性の菌体が残存するという所見も一応理解しうるのではなからうか。

次に菌体がINHによつて受ける変化をみれば相当高い濃度においてさえ、作用後菌体の伸長が停止したままでなおかつしばらくは核分裂および菌体の分節が起りうる。このような変化はZ-N染色では多数の顆粒の形成およびこの場合に特徴的な抗酸性の消失として観察せられた。このような所見はSMの該当する濃度(阻止濃度)におけるそれと比較すれば、SMでは作用後ただちに菌体に変性過程が起るのに対して、INHでは一たん菌体構造に顕著な変化を起し、さらに分節を繰返して後、変性過程に移る点からみれば、この両剤の作用機作が本質的に異なることが理解できよう。Koch-Weser<sup>5)</sup>はSMおよびINHを比較した報告において、Tween-albumin培養基を用いた場合にSMではただちに濁度の上昇が止

まるのに対して、INHでは濁度は少しく上昇して後、下降に移ることを示した。また氏は菌液のTTC還元能はSMに比してINHでは長く残存すること(これは菌の活性の残存と見做される)を示したが、これらの記載は著者の上記の観察結果と軌を一にするものと考えられる。上記の位相差顕微鏡下における追跡からすれば、INHの場合分節が起つたために一時濁度が上昇することは十分首肯されるが、これはしかしながら通常の意味での発育、増殖が続けられたのでないことは自明である。

INH作用後TTCあるいはNTC還元能が菌液全体として低下することはKoch-Weser<sup>5)</sup>、有馬<sup>7)</sup>の示すごとく当然起りうるであろうが、顕微鏡的には、INHそのものによつてもNTCが還元されるものごとくであるから、INH作用後の菌体個々についての変化を追及することはこの方法では不可能であつた。

INHによる顕著な抗酸性の消失についてはMiddlebrook<sup>2-4)</sup>多くの研究者によつて注目された。しかし上記において繰返し述べたごとく集落中配列の基部に位置する菌体の一部はINH作用後もなおかつ抗酸性に留まることもまた同時に留意さるべきである。Mycobacteriumの抗酸性の機構については今日まだ十分な説明はないが、上記の所見からすればINHが菌体構造、染色性と共に抗酸性に顕著な変化を起しめることは興味深く、果していかなる機転によつてこのような変化を惹起するかを穿鑿することは傍ら抗酸性の解明に役立つであろう。このような試みの1つとしてRusse<sup>8)</sup>によつてINH作用後の菌体内脂質劃分の変動が報告されている。

以上INHの中等阻止濃度における変化について論じたが、INHの高濃度では趣を異にした変化を示した。すなわちSMの阻止濃度の場合と類似した変化を示し、ただちに菌体に変性過程が起るごとくであつた。この場合中等阻止濃度でみられた顕著な抗酸性の消失、濃染顆粒の形成等はみられなかつた。このような高濃度の変化についてはまだ記載はないようであるが、上記観察からも明らかなようにINHに感性を異にする各菌型のいずれにおいても10,000 $\gamma$ 前後では作用の様相が顕著に変貌することは(後報に述べるごとく、このことはINH耐性菌においても同様であるが)、このような高濃度のINHの作用機作が、それ以下の濃度の作用機作と本質的に異なることを示唆するものではなからうか。

阻止限界の濃度における所見では中等阻止濃度の場合と類似して菌の伸長は起らないままで、INHに特徴的な分節、顆粒状化が軽度のみられ、一部に大形の顆粒形成がみられた。これはSMの限界濃度においてみられた膨大した形態の出現と同様な意味の変化すなわちINHに多少とも抵抗しようとする反応の現われと考えられた。これらの所見とSMの限界濃度のそれとの差異を比

較すれば、SMでは薬剤作用後なお少しく発育増殖が許されるのに対して、INHでは菌は伸長は許されないことおよびSMでは一部からの再発育が約1週後から起つたのに対して、INHでは早期に、A-1株では約15時間後よりすでに再発育が始まったことが注目せられよう。INHの場合には上記のごとく比較的早期に再発育が起ることを顧慮すれば、通常の抗菌力試験の判定日数ではすでに対照とはほぼ同じ程度に再発育が起り、ために結果の判断を誤る場合があるのではないかということが気遣われる。なおINHの場合においてもまた前報のSMと同様にいわゆる刺戟帯のごとき所見は得られなかつた。

以上のごとき濃度につれて起る変化は供試した菌型のいずれにおいても常に同様であつて本質的な差異はないようであつた。ただSMにおいてみたと同様に、その変化の推移には遅速があつて、人型菌において最も緩徐であり、非病原性菌において最も速やかであつた。これは菌の薬剤と反応する速度がその菌の活性度と比例するものと考えられ、生活状態にある菌体のみがINHの作用を受けると考えられる根拠の1つといいよう。

### 結 論

結核菌およびその他の *Mycobacterium* の発育初期集落にINHを作用せしめ、配列を乱さずに観察する方法によつて、次のことを知りえた。

1. 集落中配列の先端部の菌体には変化がみられたが、配列の基部の菌体には変化が認められなかつた。
2. INHによる変化の特徴は、中等阻止濃度において最も明らかで、抗酸性の消失、顆粒の形成がみられた。すなわち菌は伸長しないままで核分裂および分節を起した。しかし高濃度においてはSMに類似した変化を示し

た。阻止限界の濃度においてもまたINHに特徴的な変化が起つたが、一部の菌体からは膨大した形態が出現し、比較的早期に再発育がみられた。すなわちこのような変化の様相からINHの作用は高濃度、中等阻止濃度、限界濃度およびそれ以下の影響を示さない濃度の4段階に分けられた。

3. INHに対する感性をおのおの少しずつ異にする上記各菌型においてみられた変化は本質的に同様であつて、ただその変化の推移にそれぞれの菌の発育速度に比例した遅速がみられた。

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) 伊藤：結核，33(5)，353，昭33.
- 2) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 56(6)，765，1952.
- 3) Barclay, W. R., Koch-Weser, D. & Ebert, R.H. : Am. Rev. Tuberc., 70(5)，784，1954.
- 4) Schaefer, B. : Am. Rev. Tuberc., 69(1)，125，1954.
- 5) Koch-Weser, D. et al. : Am. Rev. Tuberc., 71(4)，556，1955.
- 6) 植田：結核菌の研究I，南江堂，昭28.
- 7) 有馬他：Jap. J. of Tuberc., 2(3)，279，昭29.
- 8) Russe, H. P. & Barclay, W.R. : Am. Rev. Tuberc., 72(6)，713，1955.

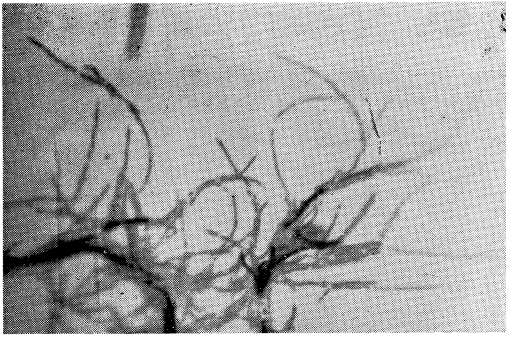


図1 A-1株, 発育初期集落, 対照。Z-N.

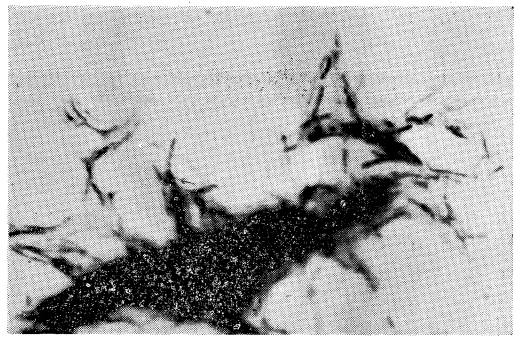


図5 人型H<sub>37</sub>Rv, 発育初期集落, 対照。Z-N.

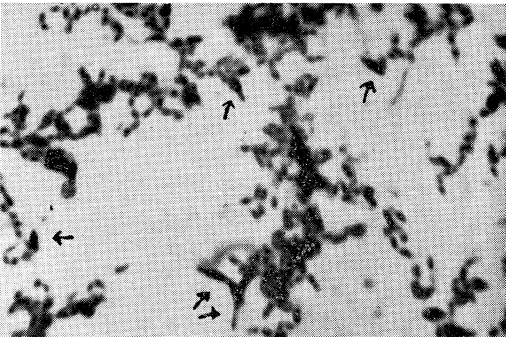


図2 A-1株, INH限界濃度(1 $\gamma$ )作用18時間後, 一部(↑印)に膨大した形態およびそれから再発育(↓印)。

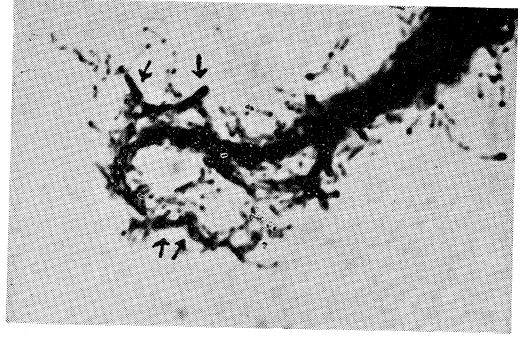


図6 人型H<sub>37</sub>Rv, INH限界濃度(0.1 $\gamma$ )作用6日後, 図2と同様で一部から再発育(↓)がみられる。Z-N.

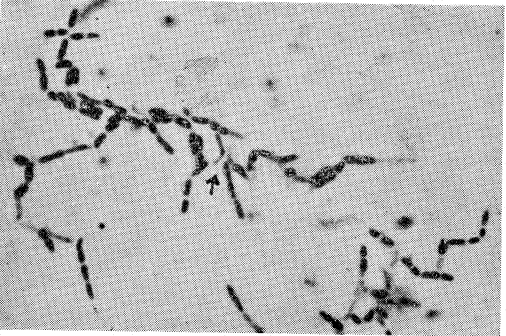


図3 A-1株, INH中等阻止濃度(10 $\gamma$ )作用1日後, 顆粒はいずれも易染性, 配列の基部に無変化の抗酸性の菌体(↑印)を認める。Z-N.

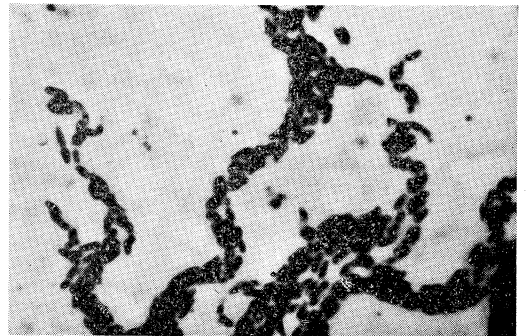


図7 人型H<sub>37</sub>Rv, INH中等阻止濃度(1 $\gamma$ )作用3日後, 変化を受けた菌体の抗酸性消失, 顆粒形成が顕著にみられる。Z-N.



図4 A-1株, INH高濃度(10,000 $\gamma$ )作用1日後, 変化はSM阻止濃度作用時に類似している。Z-N.

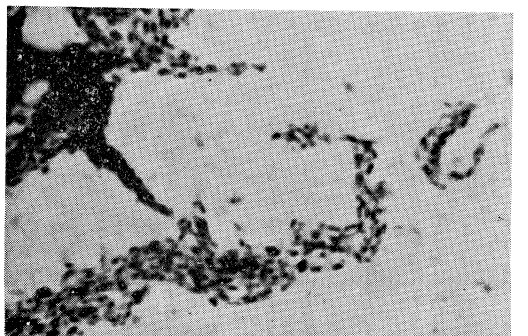


図8 人型H<sub>37</sub>Rv, INH高濃度(10,000 $\gamma$ )作用3日後, 図4と同様SMによる変化に類似した所見。Z-N.

