

耐性結核菌の染色性ならびに形態学的変化と臨床像の関係

第 II 編 耐性結核菌の電子顕微鏡的形態

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 35 年 1 月 20 日

I 緒 言

細菌の形態学的研究は古くより細菌学者によつて行われていたが、電子顕微鏡の発達に伴い、その研究は飛躍的に進歩するに至つた。結核菌についての電子顕微鏡による形態的研究は、1942 年以来 Mudd, Scanga らを始めとして広く行われ、内部構造をほぼ明らかにしたが、耐性結核菌の形態的研究についての業績は乏しく、かつ、その意味づけも明らかにされていない。しかし、試験管内において実験的に耐性を獲得した菌は、菌体の伸長と顆粒数に変化をきたすといわれているが、生体内で生じた耐性菌についての研究はない。

かかる点より、私は生体内で耐性を獲得した結核菌の形態的变化を電子顕微鏡によつて追究した。すなわち、各薬剤による耐性菌の形態的变化、耐性の程度と形態的变化の関係および重複耐性菌との比較等について詳しく観察し、これによつて第 I 編に述べた染色性の研究とともに、耐性菌の発現機序に関する一端を解明せんとした。

II 文献的考察

耐性菌の電子顕微鏡による形態学的研究は金、河野、片山ら (1950) の Penicillin 耐性葡萄球菌および SM 耐性大腸菌に関する報告があり、それによると耐性の獲得とともに菌体は膨化し、電子透過性が増加すると述べている。Mudd, Lurie および Knysi (1942) は結核菌はきわめて繊細な細胞膜を有し、原形質内には顆粒が密在していると述べ、わが国においても伊藤、戸田ら (1953) は同様な研究成績を報告している。

次に耐性結核菌の電子顕微鏡学的研究は、Ruska (1952), Gupta (1956) が SM, P A S, INAH, T B₁ 等の耐性結核菌について行い、その結果、耐性菌は全般的に菌体の伸長と電子透過性の増加および菌体の不規則化をきたしていると報告し、またわが国でも河野、片山 (1950) および平本、多賀 (1953) らは同様な研究を行ひ、その結果、SM 耐性菌は一般に顆粒の増加を伴う菌体の伸長をみ、P A S 耐性菌はほとんど変化なく、INAH 耐性菌は軽度ながら菌の細長化があり、T B₁ 耐性菌は軽度の菌短縮を認め、かつ菌体の電子透過性が

やや増加しているといつている。篠原 (1955) は SM, P A S, INAH, T B₁ 耐性菌はともに菌体の伸長はきたさないが、顆粒数は減少ないし消失すると報告している。

以上の研究は、すべて試験管内で人為的に耐性を獲得せしめた菌株を対象にした実験であり、生体内よりえた耐性菌についての文献はまだ見当たらない。

III 各種薬剤耐性菌の形態

1) 実験材料ならびに方法

使用した菌株は完全耐性菌 (10 γ 以上) 30 株、不完全耐性菌 (5 γ 以下) 8 株、無耐性菌 20 株で、これらはすべてが切除肺病巣内より分離したもので、完全耐性菌のうち、SM 耐性菌 11 株、P A S 耐性菌 6 株、INAH 耐性菌 5 株、T B₁ 耐性菌 8 株で、これらはすべて単独に耐性を獲得している菌である。なお、対照として人型結核菌青山 B 株 3 株を用いた。

電子顕微鏡標本の作製法は、小川培地 4 週間培養よりえたコロニーを、水晶球を用いる手振法にて生食水菌浮游液を作り、コロチオン膜面に塗抹し、クロムシャドーを施した。電子顕微鏡は、電子光学 JEMT 4 型および日立 HS 2 型顕微鏡を使用し、直接倍率 5,000 倍、引伸倍率 15,000 倍にして観察した。

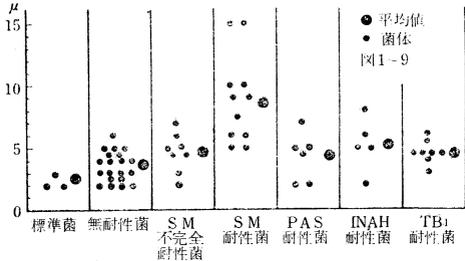
検査基準として、1 枚の標本中では菌体は種々な形態を呈しているが、一定の形態を呈するものが 80% 以上ある場合をこの標本の菌形態と決定した。

2) 菌体の大きさの変化

菌体の長さを測定すると (図 1)、標準菌は 2~3 μ 平均 2.3 μ、無耐性菌は 2~6 μ 平均 3.8 μ であるが、SM 耐性菌は 5~15 μ のものが多く平均 8.7 μ で耐性菌中もつとも長大であり、INAH 耐性菌は平均 5.2 μ でこれにつき、P A S 耐性菌は平均 4.2 μ で短かく、SM 不完全耐性菌は平均 4.6 μ、T B₁ 耐性菌は 4.6 μ でこの中間に位する。また無耐性菌は 5 μ 以上のものがわずかに 10% であるのに比し、SM 耐性菌は 5 μ 以上のものは 100% で、10 μ 以上のものが 36% を占めている。SM 不完全耐性菌でも 5 μ 以上のものが 50% で、SM 耐性菌は無耐性菌に比して菌の伸長が著しい。P A S, INAH 耐性菌は 5 μ 以上のものが 50~80%

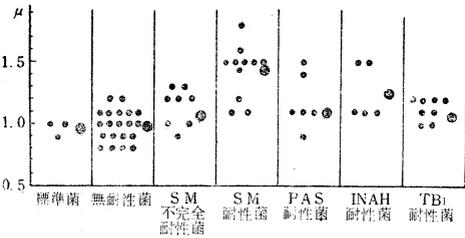
であるが、10 μ 以上のものは1株もなく、TB₁ では5 μ 以上のものがわずかに20% にすぎない。

図1 耐性菌の長さ



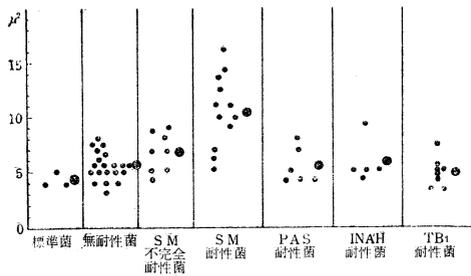
菌の巾を測定すると(図2)、標準菌は0.9~1.0 μ 平均0.9 μ であり、無耐性菌もほぼこれと等しく平均0.9 μ である。SM不完全耐性菌は平均1.1 μ で無耐性菌に比してやや大きい。完全耐性菌は平均1.4 μ で著しく太い。INAH耐性菌は平均1.3 μ であるがPAS耐性菌は平均1.0 μ 、TB₁耐性菌は平均1.0 μ で無耐性菌に近い。この中で1.5 μ 以上のものはSM耐性菌に25%をみるのみで他の菌群にはない。

図2 耐性菌の巾



菌体の平面積を算出して比較すると(図3)、標準菌はすべて5 μ^2 以下で平均4.3 μ^2 であるが、SM耐性菌はすべて5 μ^2 以上でありしかも10 μ^2 以上のものが40%を占め、平均10.4 μ^2 で耐性菌の中でもっとも大である。しかるに無耐性菌、PAS、INAH、TB₁耐性菌およびSM不完全耐性菌はすべて10 μ^2 以内で、5 μ^2 以上のものはINAH耐性菌の80%を除けば他は50~60%で、標準菌に比し軽度ながら大きいにすぎない。

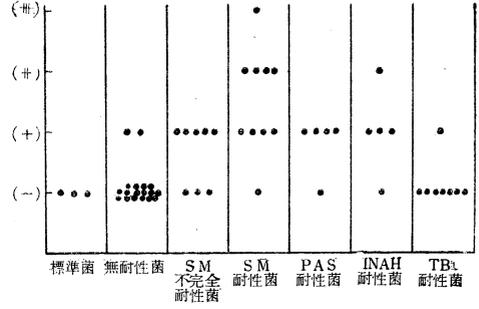
図3 耐性菌の平面積



3) 菌体の膨化ならびに屈曲度

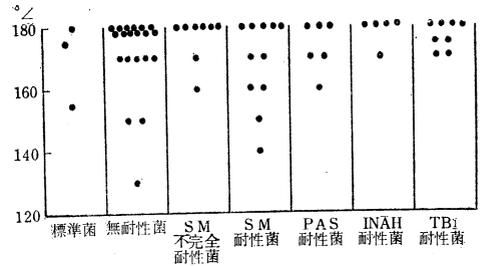
菌体の膨化の程度を、正常のものを(-)とし、膨化の程度を(+) (++) (###)に分けて比較すると(図4) SM耐性菌では90%に膨化がみられ、INAH耐性菌では80%、PAS耐性菌は65%であるが、無耐性菌およびTB₁耐性菌にはわずかに10%である。すなわち、SM耐性菌では膨化度が著しい。

図4 耐性菌の膨化



菌体屈曲度を計測すると(図5)、標準菌は150~180° \angle であるが、SM耐性菌は140~180° \angle 、PAS 160~180° \angle 、INAHは170~180° \angle 、TB₁ 165~180° \angle 、無耐性菌およびSM不完全耐性菌も150~180° \angle で屈曲度と耐性の間には著しい関係はみられない。

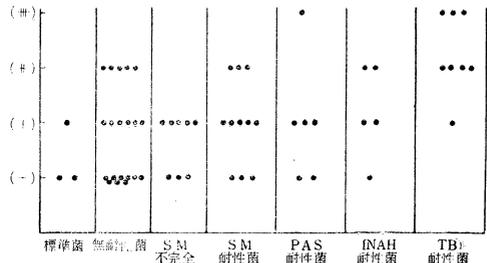
図5 耐性菌の屈曲度



4) 菌体の電子透過性および顆粒数

菌体の電子透過性は(図6)、標準菌は透過性のないものが多いが、SM耐性菌には透過性を有するものが約70%、PASには65%、INAHには80%、TB₁は100%である。また無耐性菌では55%、SM不完全耐性菌には60%にみられる。したがって耐性菌は電子の透過性が増加する傾向がある。しかし菌体の膨化は

図6 耐性菌の電子透過性



ど密接な関係はない。

菌体内の顆粒は不透過性小体と名付けられているごとく、電子線を全く透さない密なもので、標準菌ではほぼ円形で、大小数個を有している。これを大顆粒、小顆粒に分けて検討するに、大顆粒は(図7)、標準菌、無耐性菌および SM 不完全耐性菌はおおの2~4個で、SM 耐性菌もほぼこれと等しい。しかるに PAS, INAH, TB₁ 耐性菌は2個あるいはそれ以下のものが多く、平均値では2個以下で、かつ顆粒の不明瞭のものがみられる。次に小顆粒をみると(図8)、標準菌は5~6個であるが、SM 耐性菌は3~10個で、その40%は増加し、平均値も多い。PAS は3~7個、INAH は3~4個、TB₁ は2~3個でいずれも標準菌に比し減少の傾向があり、顆粒不明瞭のものがみられる。

図7 耐性菌体内顆粒(大顆粒)

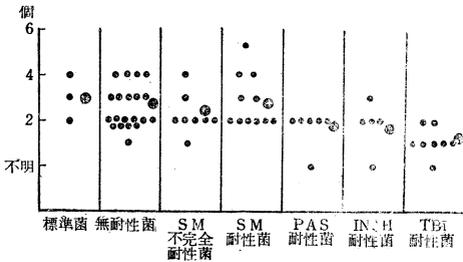
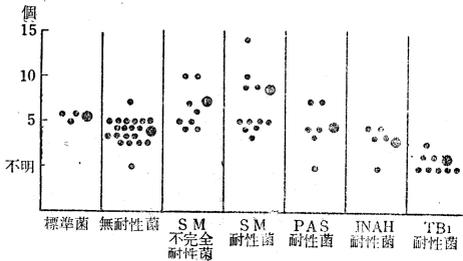


図8 耐性菌体内顆粒(小顆粒)



5) 菌体細胞膜の肥厚

標準菌は菲薄な細胞膜によつて被われて、これを原形質膜あるいは菌体膜等と呼んでいる。細胞膜の肥厚の程度を(+) (++) (++)に分けて比較すると(図9)、標準菌には肥厚が1株もみられないが、SM 耐性菌は肥厚しているものが55%を占め、PAS, INAH およ

図9 耐性菌体細胞膜の肥厚

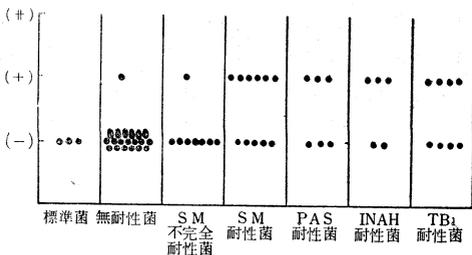


図10 標準菌 青山B株 × 15,000

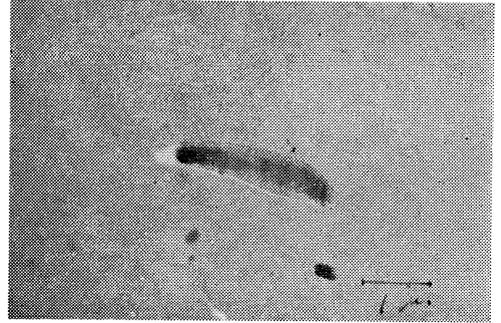


図11 SM 耐性菌 × 15,000



図12 PAS 耐性菌 × 15,000

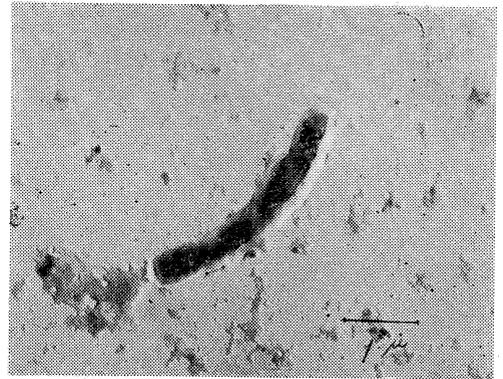


図13 INAH 耐性菌 × 15,000

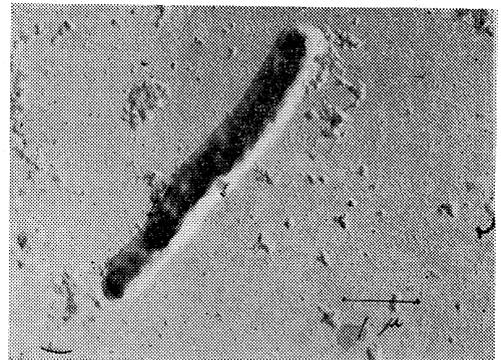
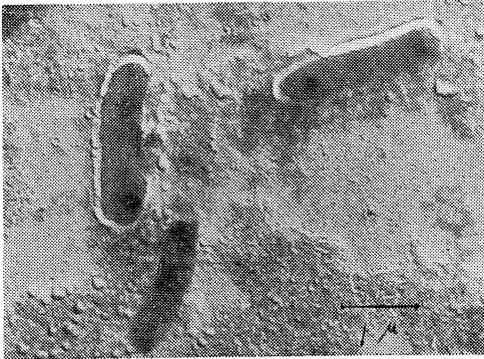


図 14 TB₁ 耐性菌 × 15,000



び TB₁ 耐性菌も 50% が肥厚している。これに反し、無耐性菌にはわずか 5%, SM 不完全耐性菌には 10% の肥厚をみるにすぎない。すなわち耐性菌は使用薬剤のいかにかわらず、明らかに細胞膜の肥厚がみられる (図 10 ~ 14)。

IV 耐性の程度と形態の変化

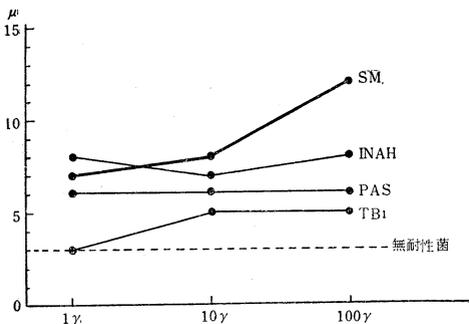
各耐性菌の耐性獲得の程度とその形態的变化にはいかなる関係があるかを検討した。なお、耐性の程度を 1γ, 10γ, 100γ に分け、図表には平均値をもつて示した。

1) 菌体の大きさと耐性度の関係

菌体の長さとの関係は (図15), 無耐性菌は 5 μ 以下であるが, SM 耐性菌では 1γ 群は 7 μ, 10γ 群は 8 μ, 100γ 群は 12 μ となり, 耐性度の上昇につれて長くなっている。しかし, PAS, INAH, TB₁ 耐性菌はともに無耐性菌に比し長大ではあるが, 耐性の程度と並行するとは限らない。

巾と耐性度との関係も長さの場合とはほぼ同様で, SM 耐性菌のみが耐性度の上昇につれて太くなくてゆく傾向がみられる。したがって菌体の平面積も SM 耐性菌は耐性度の進むにつれて増大している。

図 15 菌の長さとの関係



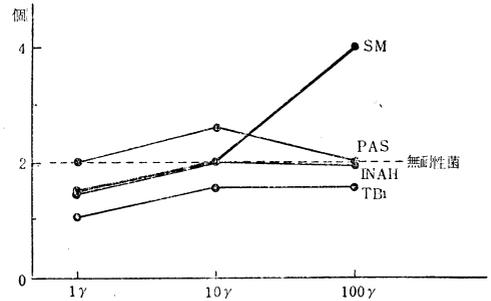
2) 菌体の透過性と耐性度との関係

菌体の透過性は耐性度の増大と一定の関係は見出しがたい。

3) 菌体の顆粒数と耐性度との関係

菌体の顆粒数は (図16), 不完全耐性菌ではやや減少する傾向があるが, SM 耐性菌は耐性上昇とともに大小顆粒数がともに増加する。PAS, INAH, TB₁ 耐性菌は耐性上昇とは無関係のようである。

図 16 顆粒数と耐性度との関係



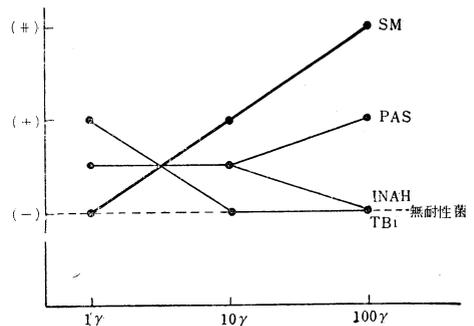
4) 菌体の膨化と耐性度との関係

菌体の膨化は SM 耐性菌は耐性の上昇につれて増大するが, PAS, INAH 耐性菌は一時膨化しても耐性度が増加しても並行せず, とくに TB₁ 耐性菌には全く膨化がみられない。

5) 細胞膜の肥厚と耐性度との関係

細胞膜の肥厚は (図17), SM 耐性菌は耐性の上昇に伴って明らかに増大しているが, PAS, INAH, TB₁ 耐性菌には明らかな関係がみられない。

図 17 細胞膜肥厚と耐性度との関係



以上形態的变化は, SM 耐性菌のみが耐性度の上昇に伴って強く変化し, TB₁ はもつとも少なく, 他のもはこの中間にあるようである。

V 重複耐性結核菌の形態

前章にて各種薬剤による耐性菌の形態および耐性度と形態の関係について述べたが, 本章においては, 重複耐性菌の形態変化について検討を試みた。二重耐性菌とは, 1つの菌が同時に2剤に対して耐性を有するもので, 主として SM+PAS 耐性であるが, PAS+INAH, SM+INAH, SM+TB₁ 等の場合もある。三重耐性菌とは私の研究材料では SM+PAS+INAH の3剤に同時に耐性のある場合のみで, 三重耐性菌 21

株、二重耐性菌 50 株である。対照として単独耐性菌 22 株を用いた。

1) 重複耐性菌の大きさの変化 (表1)

二重耐性菌および三重耐性菌はともに単独耐性菌に比較して明らかに伸長が著しく、菌体の巾も同様である。したがって菌体平面積も耐性の重複につれて増大する。

表1 重複耐性菌の長さ

	単 耐 性 菌	独 耐 性 菌	二 耐 性 菌	三 耐 性 菌	重 重 菌
1.0~3.0 μ (標準菌)	3 (14%)		0	0	
3.1~6.0	11 (45)		23 (46%)	2 (9%)	
6.1~10.0	7 (32)		24 (48)	11 (48)	
10.1~	2 (9)		3 (6)	9 (43)	

2) 重複耐性菌の膨化 (表2)

膨化は耐性菌全般に認められ、重複耐性菌と単独耐性菌の間は有意の差はないが、強度の膨化を呈するものは三重耐性菌にもつとも多い。

表2 重複耐性菌の膨化

	単 耐 性 菌	独 耐 性 菌	二 耐 性 菌	三 耐 性 菌	重 重 菌
(-) (標準菌)	4 (18%)		23 (46%)	5 (24%)	
(+)	11 (5)		21 (42)	8 (38)	
(++)	6 (27)		5 (11)	3 (14)	
(+++)	1 (5)		1 (2)	5 (24)	

3) 重複耐性菌の顆粒および透過性

大顆粒は (表3)、単独耐性菌と二重耐性菌の間に大差がないが、三重耐性菌には顆粒数の増加がみられる。小顆粒は 11 個以上に増加するものが三重耐性菌に 33% もあり、大顆粒と同様の傾向を示している。電子透過性は、全般的に増加し 3 群の間に有意の差がみられない。

表3 重複耐性菌の大顆粒

	単 耐 性 菌	独 耐 性 菌	二 耐 性 菌	三 耐 性 菌	重 重 菌
1~2個 (標準菌)	14 (64%)		30 (60%)	10 (48%)	
3~5	6 (27)		14 (28)	5 (24)	
6~8	0		0	3 (14)	
不明	2 (9)		6 (12)	3 (14)	

4) 重複耐性菌の細胞膜の肥厚

細胞膜の肥厚は、単独、二重、三重耐性の 3 群の間に著しい差は認められないが三重耐性菌の肥厚がやや強度である。

以上、重複耐性菌とくに三重耐性菌は形態的变化が強いが、単独耐性菌と二重耐性菌との間にはほとんど差のないのは、二重耐性菌は形態变化の少ない PAS, TB, 耐性菌が多く存在しているためであろう。

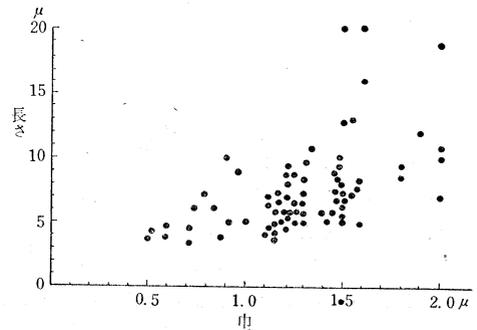
VI 形態变化の相関関係

個々の形態变化の間にはいかなる関係を有するかについて菌の長さを主体として検討を行った。

1) 長さとの関係 (図18)

長さ 5 μ 以内の菌には巾が 1.0 μ 以内のものが多いが、5 μ 以上のものでは長さとの関係は正の相関関係にあるが、一般に巾の増加の方が上廻っているようである。

図18 耐性菌の長さとの関係

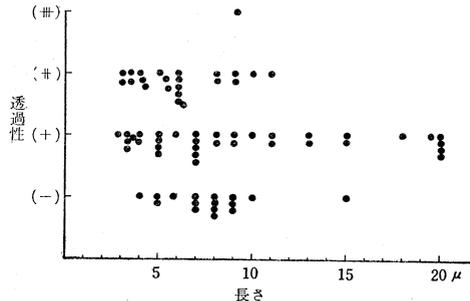


2) 長さとの関係は、長さ 5 μ 以内の菌は面積が 5 μ^2 以内であり、5 μ 以上となると、面積もそれに比して増大し、正の相関関係を示している。

3) 長さとの関係 (図19)

菌体の長いものは必ずしも透過性が強いとは限らず、むしろ透過性の強いものは短いものに多く、逆の関係が認められる。

図19 耐性菌の長さとの関係



4) 長さとの関係

長さ 5 μ 以内の菌には細胞膜の肥厚がみられないが、5 μ 以上のものでは細胞膜の肥厚しているものが多くみられる。しかし 10 μ 以上となると肥厚はそれに伴わない。

5) 長さとの関係

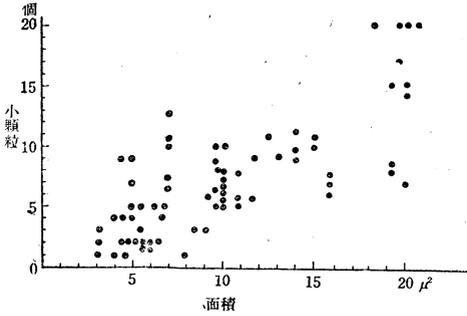
長さに対して膨化の方が優位にあるが、ほぼ正の相関

関係を認める。

6) 面積と小顆粒数の関係 (図20)

面積の広いものほど顆粒数も多く、ほぼ並行関係があるが、大顆粒数との間には明らかな関係はない。

図 20 耐性菌の面積と小顆粒の関係



VII 実験的作成耐性菌との比較

次にこれら切除肺病巣内の自然耐性菌と、試験管内で人工的に獲得させた耐性菌を比較すると (表4), SM耐性菌では菌の増大, 顆粒数の増加および菌体透過性ならびに膨化が, 自然耐性菌は人工耐性菌に比し明らかにその程度が顕著である。これに反して PAS, INAHでは, 自然耐性菌は人工耐性菌に比し菌体の膨化, 透過性の増大, 細胞膜の肥厚の点では変化が顕著であるが, 形態の増大, 顆粒の増加の点では著しい差がみられない。

表 4 人工耐性菌と自然耐性菌の形態変化

	人 工 耐 性 菌	自 然 耐 性 菌	重 複 耐 性 菌
形態の増大	S M	20 %	57 %
	P A S	10	10
	INAH	10	10
菌体の膨化	S M	10 %	80 %
	P A S	5	60
	INAH	0	80
顆粒数の増加	S M	30 %	60 %
	P A S	0	0
	INAH	0	0
透過性の増加	S M	10 %	80 %
	P A S	10	60
	INAH	10	80
細胞膜の肥厚	S M	0	60 %
	P A S	0	50
	INAH	0	50

以上のごとく自然耐性菌は, 人工耐性菌に比してはるかに形態変化が著しい。これは人工耐性菌に比べて自然耐性菌は, 薬剤の使用量および使用期間という問題と, 病巣における種々な免疫および防禦機転に因するものと推定できる。

VIII 総括ならびに考案

以上の成績を総括し, 形態的の各変化の比率を標準菌および無耐性菌を1として, 比較検討すると以下のごとくである (図21)。

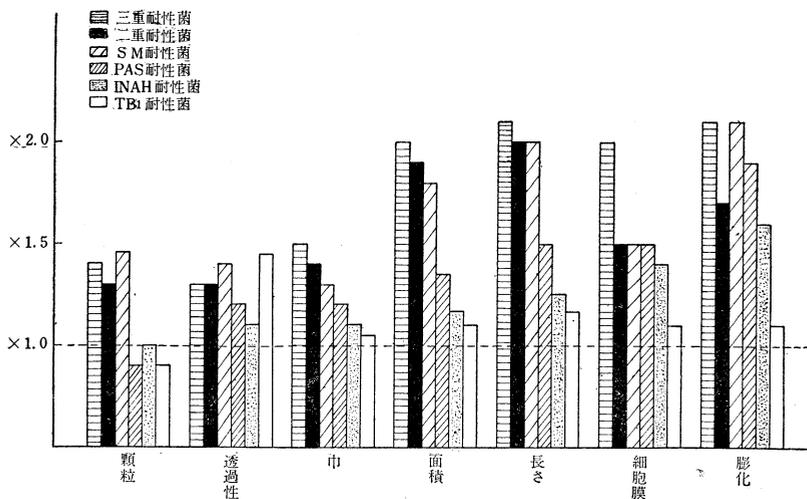
すなわち, 耐性菌を電子顕微鏡によつてその形態的变化を検討すると, まず菌体の大きさの変化が明らかに認められ, 菌体の膨化, 細胞膜の肥厚等の変化をきたし, とくに SM 耐性菌ではその度が強く, INAH, PAS がこれにつき, TB₁ 耐性菌が一番変化が弱い。また, 各薬剤の耐性の程度 (1%, 10%, 100%) によつてその変化が増大し, とくに SM 耐性菌に強く現われており, 重複耐性菌では, さらにこのような変化が強く, とくに三重耐性菌に著しく, 使用薬剤の相乗的变化ということが出来る。

このような変化をもつてただちに耐性の問題に直結することはもちろん危険であり, その意義は結核菌の代謝と薬剤の作用機序が明らかにされない限り憶測の域を脱しないが, 少なくとも, このような変化の著しいものでは, 臨床像も悪いことを考え合わせると, このような変化は菌体の薬剤に対する防禦作用の現われと考えることは大きな誤りでないといえる。すなわち, 菌面積の増大と被膜の肥厚は薬剤に対する自己防禦として好都合なものと推定できる。また, 顆粒不明瞭および透過性増大等は, 菌の大きさの変化と逆の関係があるので, これを薬剤によつて受けた障害を意味するものとするならば, SM 耐性菌はそのような変化をもつとも少なく, TB₁ 耐性菌に強く起つている。すなわち, これらの変化は薬剤の種類によつて差異があり, SM 耐性菌は菌体の増大, 被膜の肥厚が他に比して著しく, 顆粒増加等の増強的傾向が認められる点から考えると, 真の意味での抵抗性を獲得したものと推定できる。これに類した所見はまた INAH 耐性菌にもみられる。これに反し, PAS および TB₁ 耐性菌は菌体の大きさおよび被膜肥厚等をもつとも軽度で, むしろ顆粒不明瞭化および透過性増大等の害的傾向が多い。

以上のことは前編で述べた染色性の変化と全く一致するので, SM および INAH 耐性菌と TB₁ および PAS 耐性菌では耐性の様相が異なるのではないかと考えられる。また, 試験管内で作成した耐性菌では, このような変化が少ないので, 病巣内耐性菌とは別個に考えるべきである。

以上のような電顕像による耐性菌の形態的变化の状況

図 21 耐性菌の形態変化の比率



より判断して、耐性ということに2つの考えが想定出来る。すなわち1つは積極的に防禦力を増大して耐性を獲得したものであり、他は防禦力の増大を伴わないいわば消極的な耐性であつて、臨床には前者の状態はSM耐性菌に多くみられる点から、これらの薬剤によつて耐性を獲得したものはもつとも好ましからざるもので、薬剤の効果はそれ以上期待できないのである。後者の状態はTB₁に強くみられ、PAS、INAHはこの中間に位するのであるが、これらのものは臨床には耐性を得ても薬剤を継続投与すれば、さらに菌の生活力を抑圧しうる可能性があることを示唆していると思われる。

IX 結 論

1) 耐性菌を電子顕微鏡によりその形態を検討した

が、SM耐性菌がもつとも著しい変化を示し、ついでPAS、INAH耐性菌の順で、TB₁耐性菌はほとんど標準菌および無耐性菌に近い。

2) 重複耐性菌は単独耐性菌よりも形態変化が著しく、とくに三重耐性菌がもつとも強い。

3) 形態の個々の変化との相関関係は、菌が長くなるものほど巾も太くかつ面積も広く、膨化も強くなり、面積の広いものほど顆粒数も増し、これらの変化はともに増強的である。

4) 試験管内での実験的作成耐性菌は生体耐性菌より形態的变化は僅少である。

(参考文献は第三編に記載す)