

# 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

## Ⅳ 薬剤作用後の菌の生残およびそれからの再発育

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18日

### 緒 言

前報<sup>1)~3)</sup>においては SM および INH を結核菌およびその他の *Mycobacterium* の発育初期集落に作用せしめた場合、配列の先端部の菌体は変化を示すが、配列の基部の菌体は変化しないこと、さらに休止あるいは死滅状態の菌に薬剤を作用せしめた場合には形態的变化を起さないこと等が明らかとなつた。さて菌に薬剤を作用せしめる場合、その条件によつてはその数に多少の差はあるとしても、多くの場合に一部の菌体が生残しうることはよく知られている。ことに *Mycobacterium* の場合それぞれの菌体は発育段階によつてその形態、染色性に著しい差異があり、上記からも明らかなごとく薬剤に対する態度もまたそれぞれの菌体で異なるが、これらの菌体中にはさらに薬剤に比較的良好に抵抗して生残しうるような発育段階のものがあるのではなからうかと考えられる。本報においてはこのような点を検討すべく、前報と同様な方法で発育初期集落に薬剤を作用せしめ、一定時間後、薬剤を除去し、集落中配列のいかなる部位のいかなる菌体から再発育が起るかを観察し、これから生残菌の状態およびその菌体の元の発育段階を推測しようとした。

### 材料および方法

方法の前半は前報<sup>1)</sup>と同様で、各菌型の初期集落に薬剤（SM あるいは INH）を作用せしめ、一定時間後、薬剤の作用を除く操作を行い、さらに一定時間再発育が起るまで培養し、その配列を乱さないように固定し観察に供した。

薬剤を除く操作としては SM の場合は無効な濃度となるまで十分に稀釈する方法によつた。Cystein による Competition を利用する方法<sup>4)</sup>も記載されているが、これはよい結果は得られなかつた。INH の場合には新しい培養基による稀釈のほか、活性炭を添加することによつてよい結果が得られた。この場合 INH 10 $\gamma$ /cc に対し活性炭を 1% の割合に加えると十分に INH の作用を除きえた。しかし欠点としては炭末によつて標

本が汚染され、ときに観察が妨げられた。酸化剤による INH の不活性化の報告<sup>5)</sup>もあるが、生残菌の酸化剤による障害を顧慮して用いなかつた。

### 実験成績

一般に高濃度の薬剤を長時間作用せしめた場合、生残した菌からの再発育は非常に遅れ、またその数も非常に少なかつた。しかし比較的低濃度（もちろん阻止濃度以上ではあるが）の場合には生残する菌体も比較的多く、また再発育も速やかに起つたために観察は容易であつた。また形態、染色性にまだ十分な薬剤による変化を起さない以前に薬剤を除去した場合には、薬剤作用前にあつた菌体とそれ以後に発育した菌体とを区別することは不可能であつたが、明瞭な形態的变化を示したのちに薬剤を除いた場合には、再発育した菌体は強く易染性に（ときには同時に弱抗酸性にも）染色され、明瞭な形態を示し、明らかに判別しえた。

#### I. SM 作用後生残した菌体からの再発育

##### (a) SM 高濃度あるいは長時間作用後の生残およびそれからの再発育

高濃度あるいは低濃度でも比較的長時間 SM を作用せしめ、明瞭な変化が起つたのちには、生残、再発育はやや少数の菌体のみ観察された。この場合元の集落中配列の先端部の変化を受けた菌体中でも、少しく配列の基部—スズメ菌においては配列の最先端から4~6コ目に位置する菌体から、まず2コの相接する発芽を生ずる場合が多かつた（図1）。それ以後の発育は通常のごとく続くが、発芽しないその他の菌体では変性が進むのみであつて、それらからも遅れて順次発芽するとき所見は得られなかつた。

この場合薬剤によつて形態変化を受けなかつた配列基部の菌体についてはとくに注意して観察したが、このような菌体からの再発育を明らかに認めた例はなかつた。

また鳥型菌、人型菌が SM 作用後再発育する場合には、再発育する前にあらかじめ膨大した形態の形成があり、これから再発育が起るとき所見を示す場合が多かつた。いずれにしても元の集落中配列のほぼ一定部位の

菌体から再発育が起ることは同様に注目された(図5)。

(b) SM 低濃度, 短時間作用後の生残およびそれからの再発育

たとえばスメグマ菌に対して SM 10 $\gamma$  24 時間前後作用後薬剤を除いた場合には, 上述のごとき強い作用をまだ受けないためか, 相当多数の菌体から再発育が起り, 図2のごとく (a) に述べたごとき部位からはもちろんのこと, 配列の先端の菌体からも再発育が起るのが観察された。この場合にもやはり再発育しえない菌体ももちろん存在した。鳥型菌, 人型菌においてもまたほぼ同様であった。

II. INH 作用後生残した菌体からの再発育

(a) INH 高濃度あるいは長時間作用後の生残およびそれからの再発育

INH による形態, 染色性の変化は SM の場合に比して本来顕著であるから, 薬剤除去時の変化を受けた菌体と薬剤除去後の再発育した菌体との判別はより容易であった。

ある程度以上の作用を受けた場合は薬剤を除いてのち, 少し遅れて6~18 時間前後から再発育を開始した。元の集落中配列の先端からやや基部—A-1 株においては最先端から4~6 コ目—の菌体から多くの場合まず2 コ (あるいはそれ以上) の相接する発芽がみられた(図3)。その他の菌体からは遅れて発芽することはなく, 発芽したものから発育が通常のごとく続くのみであった。また元の集落の配列基部に位置した変化を受けなかつた菌体からの再発育についてはとくに注意して観察したが, 明らかに再発育と判断されたものはなかつた。

またたとえば A-1 株に対して, INH 1,000 $\gamma$ , 10 $\gamma$  を作用後, 1~3 日後になお生残して再発育しうる菌体の数およびその様相には濃度によつて大きな差異はないようであつた。

ただ INH 10,000 $\gamma$  作用の場合は前報<sup>2)</sup>のごとく, その変化は SM に類似していたが, この場合の再発育も, 上述と同様元の集落中配列のやや基部に位置した一部少数の菌体から起るのが観察された。

鳥京株, H<sub>37</sub>Rv 株においてもまたほぼ同様な所見であつて, 配列中のやや基部の菌体から再発育が起るごとくであつた。

(b) INH 低濃度, 短時間作用後の生残およびそれからの再発育

たとえば A-1 株については INH 10 $\gamma$  作用8 時間前後まではほとんど形態変化を認めず, INH の作用を除けばそのまま通常のごとく発育を再開するごとくであつた。約 10 時間以後になればほぼ明らかな INH に特徴的な変化が起り, この時期に INH を除去すれば相当多数の菌体から再発育がみられた(図4)。この場合にもまた濃染する2 コの相接した顆粒(核であろう

と考えられる)をもつ菌体を基にして2 コの相接する発芽が出る場合が多かつた。INH 作用時間の延長とともに再発育する菌体の数は減少した。

なお鳥型菌, 人型菌においてもまたほぼ同様の傾向を認めた。

(なお上述の所見とともに SM, INH の限界濃度からの再発育—これは多くは耐性化による—もまた配列中のやや基部の菌体から起ることをも観察しているが, これについては耐性化の検討とともに次報に述べたい。)

総括ならびに考案

一般に薬剤作用後の生残菌の定量的な測定は主として薬剤の効果を測ろうとする目的で行われてきたけれども, それをみるに化学療法剤が殺菌的に働くと考えられる場合でさえ作用を受けた菌集団中の全生菌を死滅せしめない場合が少なくないことがわかる。この場合いわゆる耐性菌の出現あるいは耐性化による生残ももちろん考えられるが, そのような考え方に先立つて, まず薬剤の作用を受けるそのときの各菌体の状態がそれぞれ異なり, なかにはかなり抵抗しうる状態の菌体が存在することを考えなければならない。この点に関連して, たとえば結核菌はかなり高濃度の酸・アルカリの影響にさえ耐えうるものがその特性の一つとしてよく知られているが, この場合にも一部の菌体のみが抵抗して生残するものであることが示されている<sup>7)</sup>し, また SM に抵抗し生残した菌体は他の影響(たとえば熱等)に対しても抵抗を示すという成績も得られている<sup>8)</sup>。近時一般細菌において試みられているごとく菌の生理的状态(発育段階)を揃えようとする Synchronous culture の提唱<sup>9)</sup>はこのような意味から非常に興味深い。以上のごとき見地から前報に続いて, 発育した集落に薬剤を作用させ種々なる時間ののちに薬剤を除去し, 元の集落の配列を乱さないようにして, その中の生残菌からの再発育の模様を観察しようとした。

薬剤の影響が軽度である場合には単に一時的に発育が抑制されたのみで, 薬剤を除くとそのまま通常発育が続くごとくであつた。また今少し影響が強い場合には薬剤を除いても再発育しえない菌体が観察されるようになるけれども, なお相当多数の菌体から再発育がみられた。このような薬剤作用の段階では, まだどのような菌体が比較的抵抗するのかが推測することは困難であつた。しかしさらに強い作用を受けて元の集落中の大部分の菌体からははや再発育が起らず, ごく一部少数の菌体のみから再発育がみられるような場合にはその模様を比較的容易に観察しえた。すなわち元の集落中配列の先端部の明らかに変化を受けた菌体中, 配列の少しく基部に位置した菌体から再発育が起る場合が多かつた。またこのような場合にはまず相接した2 コの発芽を生ずるの



図 1 スメグマ菌 SM10 $\gamma$ 作用 2 日後 SM 除去, さらに 20 時間培養, ( $\uparrow$ ) は再発育, 相接した 2 コの発芽

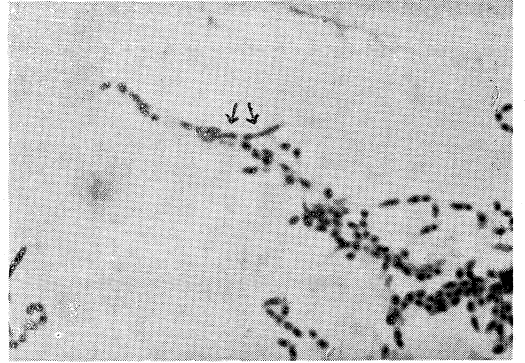


図 3 A-1 株 I NH10 $\gamma$ 作用 2 日後 I NH 除去, さらに 18 時間培養, ( $\uparrow$ ) は再発育, 相接した 2 コの発芽

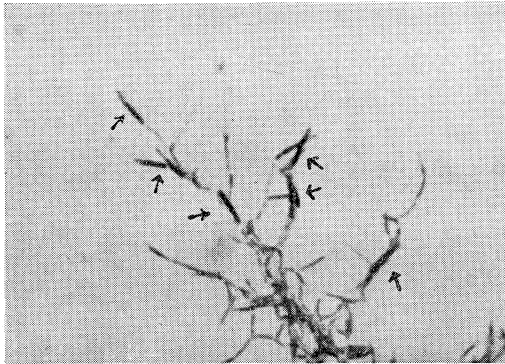


図 2 スメグマ菌 SM10 $\gamma$ 作用 16 時間後 SM 除去, さらに 20 時間培養, ( $\uparrow$ ) は再発育した菌体

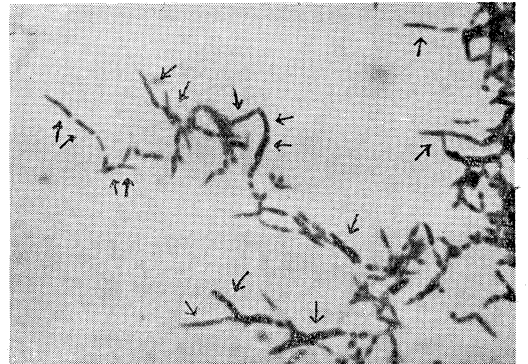


図 4 A-1 株 I NH10 $\gamma$ 16 時間作用後 I NH 除去, さらに 20 時間培養, ( $\uparrow$ ) は再発育した菌体

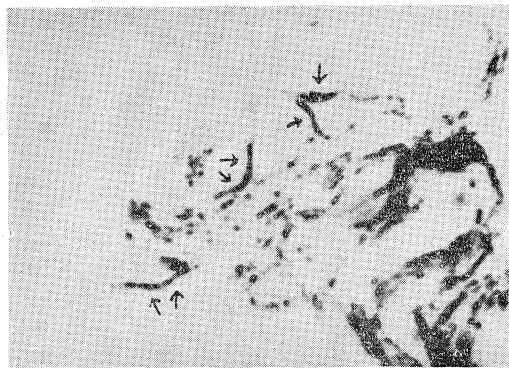


図 5 H<sub>37</sub>Rv 株 SM1,000 $\gamma$ 作用 3 日後 SM 除去, さらに 6 日培養, ( $\uparrow$ ) は再発育, 相接した 2 コの発芽

が通常であつた。このような所見からその生残菌体の元の状態についての推測が許されるならば、元の集落中の部位から考えて、少しく成熟した段階の菌体であつたであろうことが考えられ、また2コの相接した発芽がみられることが多かつた点から、その核もある一定の状態にあつたのではないかと考えられた。すなわちこのような発育の一定の段階にある菌体が薬剤に比較的良好に抵抗しうるのではなからうか。(次報に述べられる耐性化による再発育も主としてほぼ同様な位置の菌体から起るのが観察されている。) また前報<sup>1)</sup>において SM 作用後、NTC 還元顆粒が配列のやや基部の菌体中でのみ比較的良好に残存することが観察されたが、これと上述の生残、再発育する菌体とが配列中の位置を等しくすることはきわめて興味深い。しかしこのようにして生残しえた菌体が薬剤によつて明らかに変化を受けていたことはとくに注目されなければならない。

しかしながら前報<sup>1)~3)</sup>にも述べたごとく集落中配列のごく基部には薬剤によつて変化を起さない抗酸性の菌体が存在した。従来から見方からすれば、このような菌体こそ生残し再発育する菌体であるとせられるのが通則であろうが、この点についてはとくに留意して観察を繰返したが、このような菌体からの再発育は認めがたく、一方上述のごとく変化を受けた菌体の一部のものから明らかに再発育を認めることは、このような配列基部の無変化の抗酸性の菌体が薬剤に抵抗し生残する主たる菌体であるとは認めがたい結果となつた。このことは前報の所見とともにこのような菌体は進んだ発育段階の、古い、すでに生活力を失つた変性菌体であるとする植田<sup>10)</sup>の考え方を支持するごとくである。上記観察に示されたのは SM, INH に対し抵抗を示す菌体であるが、酸、アルカリその他熱等に対しても比較的抵抗性を示すものもまた同様な位置の菌体ではないかと考えられる。このような結核菌の抵抗性あるいは発育力の保持について病巣内の結核菌の生態と関連して最近植田<sup>11)</sup>は一定の見解を公けにしたが、そこでも強調されているごとく、この種の菌の特異な抵抗性をいずれの菌型においても集団中のすべての菌体が一様にもつ性質と見なそうとする従来の考え方には再検討の要があることを上記の観察もまたこれを示している。

## 結 論

結核菌およびその他の *Mycobacterium* の発育初期集落に SM, INH を作用せしめ、一定時間後、薬剤を除去し、生残した菌体からの再発育を観察した。

1. 薬剤の影響が軽度である場合には単に一時発育が抑制されたのみで、薬剤を除けば通常の発育がそのまま再開されるか、あるいは配列中の多数の菌体から再発育が起つた。

2. 薬剤の影響がある程度以上強くなると薬剤を除いたのちも一部分の菌体からのみ再発育が起るにすぎなくなつた。この場合薬剤の作用に比較的良好に抵抗しうるものは配列先端部の変化を受けた菌体中のやや基部に位置した菌体が主であり、このような位置の菌体から多くの場合相接して2コの発芽が生じた。すなわちこのような菌体は2核の少しく成熟した菌体であると推測された。

3. 集落中の配列基部に位置し、薬剤によつて変化を受けなかつた抗酸性の菌体からは再発育の徴は認められず、前報の成績と考え併せて、このような菌体はすでに変性した菌体ではないかと考えられた。

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，(第I報) 33 (5) : 353, 昭33.
- 2) 伊藤：結核，(第II報) 33 (6) : 408, 昭33.
- 3) 伊藤：結核，(第III報) 33 (7) : 464, 昭33.
- 4) Geiger, W.B. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 61 : 187, 1946.
- 5) 高橋：最新医学, 10 (3) : 648, 昭30.
- 6) 伊藤：結核，掲載予定 (第V報)
- 7) 植田・大岩：結核, 25 (8) : 32, 昭25.
- 8) 山田：第8回結核病学会近畿地方会演説
- 9) Maruyama, Y. & Yanagita, T. : J. Bact., 71 : 542, 1956.
- 10) 植田：結核菌の研究I, 南江堂, 昭28.
- 11) 植田：病巣内の結核菌，結核選集 (第4集), 医学書院, 昭32.