

総 説

抗酸菌のL相をめぐって

2. 乾酪巣内の結核菌の生存についての考察

高 橋 昭 三

結核予防会結核研究所

受付 昭和 53 年 10 月 23 日

L-PHASE GROWTH OF MYCOBACTERIA

2. Consideration on the Survival of Tubercle

Bacillus in Caseous Lesion

Shozo TAKAHASHI*

(Received for publication October 23, 1978)

Tubercle bacilli in caseous lesion seem to be non-acid-fast, Gram-negative granules which may revert into acid-fast rods, spread and produce new lesions when the caseous lesion begins to liquefy and form tuberculous cavity. The granular form is estimated morphologically to be L-form of tubercle bacilli. The survival mode of the bacilli in caseous lesion will be discussed.

1) Tuberculin sensitivity of the host having caseous lesion lasts positive nearly throughout whole life. On the other hand, tuberculin sensitivity terminates after certain period of time when the host is immunized with a homogenate of tubercle bacilli or living BCG, unless the infection with tubercle bacilli occurs thereafter. Above described facts indicate that the existence of metabolizing tubercle bacilli in caseous lesion is a necessary condition to maintain the tuberculin sensitivity by continuous stimulation with tuberculous antigens or their metabolites.

2) Massive acid-fast rods appear just beneath the surface of caseous mass when it begins to liquefy as the initial stage of cavity formation during the course of pulmonary tuberculosis. This indicates the reappearance of acid-fast rods from tubercle bacilli of non-acid-fast, non-rod form, which were multiplied actively and were distributed rather evenly in caseous mass.

3) Though most of anti-tuberculous drugs show antibacterial activity when they were applied to multiplying tubercle bacilli, they seem to be inactive against non-multiplying phase except rifampicin. Short course chemotherapy has become possible when rifampicin was applied in combination with isoniazid which has strong activity against the multiplying classical form of tubercle bacilli.

Above described evidences suggest that the tubercle bacilli in caseous mass are multiplying cell-wall-deficient-form, namely the L-form of tubercle bacilli. It is mandatory to study the survival status of tubercle bacilli in caseous lesion, probably of L-form, for further studies on the chemotherapy for tuberculosis.

* From the Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1 Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

一般に、L相の菌の大部分は、滲透圧が高い所でのみ生存できるので、正常な細胞で占められる正常組織、多くの炎症組織内では生存できず、溶菌してしまうと考えられる。しかし、最小生存単位である顆粒型、あるいはそれがある程度まで生長したものなどは、比較的安定であつて、機械的刺激に対しても比較的強く、血清に浮遊することができる。結核症においては、乾酪巣が極めて蛋白質にとみ、嫌気的な部位であり、L相の菌を保存しうる条件をそなえていると考えられる。このように、特殊な条件下でしか生存しえないL相の菌が、結核症においてどのような役割を果たしているかは、まだ明確でない。しかし乾酪巣は、生菌を保存している部位であつて、グラム陰性で顆粒状となつた結核菌が生存しており、再感染にさいしては、ここから多量の抗酸菌が生じてくることが認められている。したがつて、まだ分離されてはいないが、乾酪巣内の結核菌は、細胞壁欠損型(CWDF)として生存すると考えられる。その生態について、またCWDFと考える根拠について考察する。

1. 乾酪巣内の顆粒の染色性 (写真1, 2, 3)

乾酪巣の切片を、ヘマトキシリン・エオジン法で染めると、乾酪物質はほぼ均等にエオジンで染まり、チール・ネルゼン法で染めたときも、中に細菌のようなものは染め出せないが、ギムザ法で染めると、径3~10 μ の円型顆粒が常に染色され、アズール好性を示す。培養した結核菌に対応する染色性を示すものは、抗酸性、非抗酸性の桿菌としては認められない。L相の結核菌は、Dienes法²⁾でアズール好性に染まり、細胞壁をもつた親株は染まらない。ギムザ法では、アズール好性の球状体がL相の結核菌で、親は淡染するか、染まらない。空洞内の乾酪性物質には、非抗酸性で、エオジン好性の、またはヘマトキシリンに淡染する顆粒をみることもある

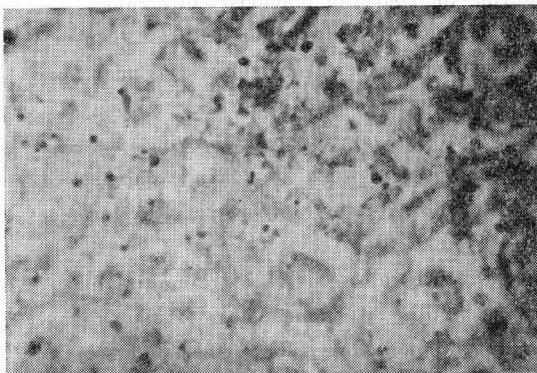


写真1 乾酪巣のギムザ染色所見(1)。肺結核患者の切除材料、パラフィン切片。ギムザ染色後、40 \times 、接眼10 \times で観察。円型アズール好性顆粒が散在する。

が、アズール好性の顆粒はより深部に、または融解の始まらない部分に多い。乾酪巣には抗酸菌のみられない場所にも、一部融解が始まり、結核性空洞となつたものであれば、結核菌が確実に生存しており、融解面には抗酸菌が集団として認められ、時には顆粒と桿菌が混在してみられる。未融解部にみられる顆粒は、染色性において、結核菌のL相と共通する特性をもっている。

2. 宿主のツベルクリン活性と乾酪巣内の結核菌

乾酪巣内に抗酸菌は認められないが、ほとんど宿主の生涯にわたつて結核菌が生存していると考えられる。また空洞となるときは、乾酪巣の融解に伴い抗酸菌が出現し、結核菌の集団がその表面に現れる。同時に、この乾酪巣を有する宿主のツベルクリン反応は、空洞化するしないにかかわらず、陽性である。

動物に、増殖しない結核菌を接種しても抗菌免疫は成

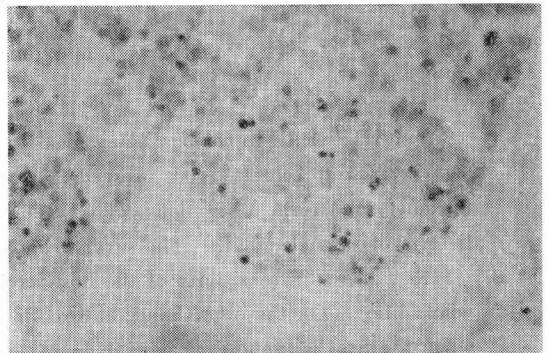


写真2 乾酪巣のギムザ染色所見(2)。ウサギの乾酪巣。結核菌接種後約4カ月後のもので、パラフィン切片をギムザ染色で染め、40 \times 、接眼10 \times で観察。ヒト乾酪巣と同様、アズール好性顆粒が散在する。

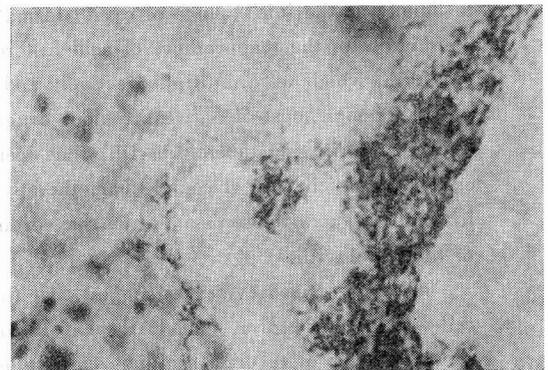


写真3 空洞壁の抗酸菌染色所見。ウサギの実験的肺結核の空洞壁。結核菌接種後約4カ月のもので、パラフィン切片を、チール・ネルゼン法で染め、油浸100 \times 、接眼10 \times で観察。結核菌の集団が認められる。

立せず³⁾、その菌が増殖するとき成立する。菌体ホモジネートを注射してもツベルクリン反応は陽転し、抗菌免疫が成立するが、ウサギ、モルモットでは、約6カ月後にツベルクリン反応も抗菌免疫もほぼ消失する。ヒトにおいても、BCG接種後ツベルクリン反応は陽転するが、何年か経つと、結核菌の自然感染がない限り陰転する。動物でも同様である。また乳幼児において、ツベルクリン反応が陽転した際に、INHの予防内服をさせると、ツベルクリン反応が陰転することがある。これらの事実は、結核菌の菌体成分によってツベルクリン反応を陽転させることはできるが、その反応性の維持には、菌体成分、代謝産物の供給、すなわち生きて代謝する結核菌の存在が必要であり、それらがなくなると、やがて陰性となることを示している。他に病変がなく、小さな乾酪巢のみがある場合、いわゆる健康なツベルクリン反応陽性者であり、その反応性が維持されているのは、乾酪巢内に結核菌が保存されているだけでなく、代謝していることによると考えられる。すなわち乾酪巢内の結核菌は、代謝していなければならない。

3. 空洞での抗酸菌の出現

空洞が成立するとき、乾酪巢の融解とともに、融解面にそつて出現する抗酸菌の量は、極めて多数である。

結核菌の培養を、好氣的にでも嫌氣的にでも保存すると、培地によって差はあるが、長期間経た後は、生菌数が著しく減少する。空洞に出現する結核菌は、時には乾酪巢成立後10年以上そこに生存してきたものであることさえある。空洞成立時に出現する結核菌の菌量は、宿主が抗菌免疫があることを考えあわせると、小さな乾酪巢の中に、ごく少数生き残つた結核菌から増殖したものとは考えられないほどの量である。実際に乾酪巢の中にみられるグラム陰性球菌状の顆粒から化成したものであろうと隈部⁴⁾は述べている。この考え方は一般に受け入れられていると思われる。乾酪巢から結核菌が抗酸菌として出現するとき、乾酪巢の融解面のすぐ下に、抗酸菌が島状に集団として出現し、そこから増殖が始まる⁴⁾。そのためには、乾酪巢の中で、結核菌は極めて長期間、増殖しながら生存し、乾酪巢内に広く分布していなければならない。これは染色性から考えても、細胞壁のない状態での増殖がそこにあることを示唆する。

4. 乾酪巢内の結核菌に対する抗結核剤の効果についての考察

抗結核剤の抗菌効果は、多くの場合、抗酸菌として分裂するときを発現するものであつて、桿菌以外の発育相では認められないといわれる。著者はSM, INH, PAS, EB, エチオナミドの親株に対しての最小発育阻止濃度の10~100倍の濃度で、その株のL相の発育を阻害しない

ことを観察した⁵⁾、Mattman⁶⁾らは極めて高濃度のINHが、L変異株の発育を阻害するのみであると述べている。結核の化学療法を考えると、抗酸菌以外の生活相があり、そのとき抗酸菌相とは違つた抗結核剤感受性を示すことは重要である。

INHは優れた抗結核剤であり、増殖する結核菌に取り込まれ、次の分裂のときにその菌の死を来す⁷⁾ので、殺菌的であるといわれるが、増殖しない菌に対しては、*in vivo*でも生菌単位数を減少させないといわれる⁸⁾。RFPは0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、すなわちINHと同程度の濃度で結核菌の発育を阻止するが、経口投与により吸収されると間もなく、約半量がDesacetyl体となり、抗菌力は低下する。菌の耐性上昇も速やかであるため、単独療法はさけるべきであるが、他剤と併用すると、耐性上昇は著しくおくれ、同時にINHに勝る抗菌力を*in vivo*で示す。またINHと併用するとき、臨床効果は殺菌的であるとさえいわれ、他の薬剤の組合せにはみられない速やかな効果発現を示し、抗結核療法の期間を大幅に短縮することを可能とした。ここでINHと併用したときの抗菌力の増強を、肺結核について考察する。INHの作用は、抗酸菌型の分裂のときに殺菌としてあらわれる。RFPの作用は、DNA依存性のRNA polymeraseの阻害⁹⁾であり、細胞分裂にかかわりなく、代謝する菌の上に現れる。また乾酪巢への浸透は、INHにもRFPにもみられるが、INHは水溶性であり、空洞内への到達をみると、それほど高いものではないように思われる。RFPは細胞親和性が高く、血中濃度よりも高濃度に肺組織に認められ、脂溶性である。乾酪巢内には、血中濃度と同じ位またはそれよりやや高い濃度に達する¹⁰⁾と考えられる。以上のことから、INHは抗酸菌相に、RFPは乾酪巢内外のCWDFないし非桿菌性増殖相に作用するため、強い協同作用があらわれ、これが他の薬剤の組合せにみられない強い殺菌ないし抗菌作用のうまれる理由と考えることができる。経験的に、RFPとEBにも、かなり強い臨床的併用効果が認められ、SMとRFPの併用も同様であるが、SMとINH、エチオナミドとEBの組合せからは、RFPとINHのような、短期間での除菌効果は期待できないと思われ、従来とも、RFPを含まない治療を行なつてきた例からは、再排菌がかなり後になつても認められている。またINH以外の抗結核剤は、*in vitro*では発育阻止的な作用を示すので、RFPとの組合せによる治療効果は、上に述べたINHとRFPの組合せよりも低いであろうと思われる。ちなみにツ反強陽性の幼児にINH予防内服を行なわせても、ツベルクリン反応が陰転することはないであろうし、現在までに多くの化学療法剤の組合せはあつたが、ツベルクリン反応を陰転させるものはないようである。これは結核菌の強い免疫学的活性によるかもしれないが、乾酪

巢がある場合、結核菌を根絶しえなかつたためか、または乾酪巢内の結核菌の代謝を停止させることができなかつたためであろうと考えられる。おそらく乾酪巢内の顆粒型は増殖するが、RFP 以外の抗結核剤の作用を受けがたいものと考えられる。*In vitro* の薬剤耐性と臨床効果の両成績の不一致は、乾酪巢内の結核菌の処理の状況によるのではないかと考えられる。すなわち、従来行なわれてきた RFP を含まない抗結核剤の組合せと、RFP を含む化学療法との相違点は、乾酪巢への薬剤の到達の差、分裂する桿菌以外の生活相にも有効な薬剤を含まないものと含むものの差ではないかと考えるのである。

5. 結核菌のL相の病原性

乾酪巢での結核菌のL相発育¹¹⁾¹²⁾があると考えられる根拠を上述べたが、これは結核菌が食細胞に取り込まれ、そのまま凝固蛋白につつまれ、抗酸菌としては増殖できない状態におかれた場合の生存様式を考えているわけである。この生存型の病原性発現の可能性は、乾酪巢を動物に接種して発病させることで認められるし、乾酪巢を結核培地に接種すると、定型的な抗酸菌として培養することができる。Koch が結核菌を分離した方法であるが、このような方法では不可視的な結核菌が、可視的な抗酸菌となり、病原性をあらわし、また集落をつくっている。このように、抗酸菌型に容易に移行するのは乾酪物質のあるためであろうが、それが無い場合、L相の菌の直接的病原性発現があるかどうかは疑問である。滲透圧が高いので生存しやすいと思われる腎への、他の菌のL型の接種では、上に述べたような、親株の出現がない場合には、病巣をつくることはなく¹³⁾、親株への復帰がある場合にみに病変が成立することがある。Ratnum¹⁴⁾は H₃₇Rv のスフェロプラスト（本論文の定義ではL相発育である）を皮下、静脈内に接種したが、病変をつくることはできなかつたという。ブドウ球菌¹⁵⁾、肺炎球菌¹⁶⁾のL型によるヒトの感染も、はじめ親株の菌が病変をつくり、その組織学的変化をL相の菌がひきつぎ、L相の菌に無効な親株に対する化学療法を行なっている間に悪化し、または好転しなかつた¹⁶⁾ものであり、完治にいたつた例では、L相の菌に対して有効な薬剤¹⁵⁾が投与された場合であつた。結核菌の場合は、乾酪巢からのL型の分離は行なわれておらず、もつぱら抗酸菌の分離、すなわち親株への復帰を観察してきたため、抗酸菌の生育だけが論じられてきた。ところで LeBar¹⁷⁾らは、関節腔から結核菌のCWDFを分離したと報告しているが、その根拠は、彼らの研究室が検討してきた⁹⁾①抗 H₃₇Ra 血清による蛍光抗体法により陽性であること、②L相の抗酸菌では、強化 Kinyon 法によつて抗酸性を示すが、この方法で抗酸性であつた、③INH により発育が増強され、高濃度の INH でのみ発育阻止がみられた、とい

う3点による。結核菌に復帰させることには成功していないので、解釈は難しいが、L変異株かもしれない。現在結核菌のL相であるとして分離されたものはこの1例のみであるが、分離法から考えて、ミコプラズマまたはL変異株であろう。L相細菌の通性から推定して、不連続性の組織学的変化、すなわち散布は結核菌(抗酸菌型)によるものと考えられ、L相のままの形で健康動物に感染し、病変をつくることはないと考えられる。実際に、現在まで、垂直感染があつたという信頼すべき報告はない。

6. 乾酪巢内の結核菌とL相

乾酪巢内の結核菌は、以上考えてきたように、代謝し、増殖しており、充分な酸素の供給があるとき、はじめて抗酸菌に復帰するものと考えられる⁵⁾¹¹⁾。あるいはその他に「ひきがね」となる要因が必要かもしれない。形態学的にも、より正確には、生存の持続から考えられる点からも、他の菌種のL相に相当する。増殖するCWDFである。

L相の結核菌は、グラム陰性で、大小の油滴状ないし多形態性を示し、アズール好性であり、ヤヌスグリーンで青く染まる⁹⁾。親よりも嫌氣的な条件で、無限に、機械的構築、例えば寒天ゲルの間にもぐつて増殖する。親の発育に必要な条件が満たされれば、親株に戻つて増殖し、その生物学的性状をあらわすが、そのとき発現する性状は、親株からL相に移行した直前のそれと同じである。しかし、L相の時期には親と薬剤感受性に共通点は少ない¹⁸⁾。

ここにあげた各性状は、乾酪巢内に生存する結核菌のそれに、そのまま当てはまるものが多い。結核菌は偏性好気性菌であつて、分子状酸素のない所で増殖せず、各種抗結核剤に高い感受性を示す。乾酪巢内の結核菌は、嫌氣的条件で増殖し、多くの抗結核剤の投与によつて根絶できないと推定される。抗酸菌に復帰したものは、乾酪巢が成立したときの薬剤耐性を示すであろう。実際に、初回治療例においては、時にINH耐性がみられることはあるが、多くの場合、抗結核剤の大部分のものに対して感受性である。他の感染症においてみられるような、著しい耐性菌の増加はここではみられない。また排菌が続いているのに、投与薬剤に感性的菌のみがみられることもある。これらのことから、乾酪巢内の結核菌と、抗酸菌型の薬剤に対する態度の違いが推定される。

乾酪巢内の結核菌の生存様式のSimulationの一つとして、対数増殖期初期の結核菌を嫌氣的条件で高滲透圧の培地に培養した実験⁵⁾¹¹⁾において、比較的小さい球状体(3~5 μ)の集合が得られたことはすでに述べた。この集団を空気に接触させることで、表面直下から48時間後に抗酸菌の集団が生ずるのを観察した。この所見は、乾

酪巣内にとじこめられた結核菌が、抗酸菌に化成する様相に類似点を求めることができよう。このように、結核菌のL相発育は、乾酪巣内の結核菌の生存様式を *in vitro* で再現しているようにみえる。

7. 結核菌L相の問題点

本論文ではL相の定義を、増殖するCWDFであるとした。乾酪巣内の結核菌は、以上に述べてきたように、増殖するCWDFと考えられる。ヒトの結核症の難治である原因の一つは、乾酪巣内に結核菌が抗酸菌でない型で生存しており、その処理が困難なことである。

従来、抗結核剤はもつばら抗酸菌型の結核菌に対する抗菌力を尺度として検討されてきた。そのため、乾酪巣内への薬剤の到達の問題も含めて考えると、乾酪巣内の菌に対して有効性を示す薬剤は限られる。小河はウサギの結核性空洞を作った¹⁹⁾。それを用いて実験したところ、乾酪巣内にカナマイシンは、事実上到達しえなかつたという。また腎結核において腎組織は、薬剤濃度の著しく高くなる部位であるにもかかわらず、KM, SMは乾酪巣に血中濃度よりもはるかに低い濃度にみられるのみであつたが、RFPは血中濃度程度に到達したという¹⁰⁾。このことは、除菌効果に直接反映するが、一方分裂する抗酸菌に関する実験でも差があるということである。

それに加えて、非桿菌型、すなわち細胞分裂のない菌に作用する薬剤濃度も不明である。他の多くの菌種については、親の菌種の感受性と関係なく、マクロライドがCWDFに有効性を示すとされているが¹⁵⁾¹⁸⁾、この点も明らかにされていない。RFPの場合は、乾酪巣に透過しやすいことと、マクロライド化合物に類似した性質をもっていることにより、乾酪巣内の結核菌に有効性を示すものと考えられる。

抗酸菌とは全く違った性質をもつCWDFの検討が可能となれば、化学療法の新しい展開が期待され、そのときに、CWDFはもう一つの結核菌の生存型として、乾酪巣内の結核菌のモデルとなりうるであろう。

ここで、現在の結核菌L相についてもう一つの問題が生ずる。それは実験法である。

結核菌の実験法において、長い間卵培地が用いられてきており、結核菌の発育は遅いが、信頼性が高かつた。そのことは、同時に実験法における無菌操作の変化となつてあらわれている。現在提示されているL相のための培地は、器具の清浄度、無菌操作の要求度が著しく高く、培地の保存性も悪い。そのため、これらの要求を満たす実験法が採用されなければならない。培地の点に関して考えると、MattmanらはL相の分離にSchanockの培地¹⁷⁾を用い、その他種々の培地が利用できるとしている⁶⁾し、Ratnum¹⁴⁾はマグネシウムイオン濃度を高めた

キルヒナー寒天を用いており、著者はトリプト・ソイ培地を基礎とした培地¹¹⁾が最良であると述べている。どの培地でも、実験法の再現性についてはまだ問題があり、この点から考えても、実験法が確立されているとはいえない。

それに加えて、L相の菌は他の菌種でもそうであるが、発育が遅く、小さい集落しかつからない。もつともMattman⁶⁾のいうように、3~4日で発育する結核菌のL型があるかもしれないが、著者にそのような経験はない。またMattman, Ratnum, その他の研究者の実験法を追試しても、そのような成績は得られなかつた。いずれにしても、CWDFに関する実験法の確立が先決であろう。

いままでもそうであつたが、結核症の研究は、臨床的な観察で得られた所見を、細菌学的に確認することで問題を解決してきた。結核菌が乾酪巣でどのような生態を示しているか、化学療法の効果がどのようにあらわれるかについて、われわれはもう一度結核菌を直視する必要がある。それによつて、化学療法のみでなく、結核病学の新しい分野があらわれるであろう。

参考文献

- 1) Klieneberger-Nobel, E.: The Bacteria. I., Academic Press, New York, p. 361, 1960.
- 2) 高橋昭三: メディヤサークル, 99号, 1, 1965.
- 3) 金井興美: 医学と生物学, 65: 18, 1962.
- 4) 隈部英雄: 人体内における結核菌の生態, 保健同人社, 1949.
- 5) 高橋昭三: 日細誌, 18: 302, 1963.
- 6) Mattman, L.: Cell Wall Deficient Forms, CRC Press, Cleaveland, p. 171, 1974.
- 7) Barclay, W. R., Ebert, R. H. and Koch-Weser, D.: Am. Rev. Tuberc., 67: 490, 1953.
- 8) 金井興美: 医学と生物学, 65: 70, 1962.
- 9) Umezawa, H., Mizuno, S., Yamazaki, H. and Nitta, K.: J. Antibiotics, 21: 234, 1968.
- 10) 長崎泉吉・古賀秀雄・稲葉美代志: 西日本泌尿器科, 35: 396, 1973.
- 11) 高橋昭三: 医学と生物学, 58: 16, 1961.
- 12) Mattman, L. H., Tunstall, L. H., Mathews, W. W. and Gordon, D. L.: Am. Rev. Resp. Dis., 82: 202, 1960.
- 13) 清水喜八郎: 最新医学, 29: 2412, 1974.
- 14) Ratnum, S. and Chandrasekhar, S.: Am. Rev. Resp. Dis., 114: 549, 1976.
- 15) Rosner, R.: Am. J. Clin. Path., 50: 385, 1968.
- 16) Brem, A. M. and Reidt, W.: Chest, 61: 200, 1972.
- 17) LeBar, W. D., Mattman, L. H. and Ross, L.: Henry Ford Hosp. Med. J., 23: 17, 1975.
- 18) Feingold, D. S.: New England J. Med., 281: 1159, 1969.
- 19) 小河秀正: 日本獣医学会誌, 22: 123, 1960.