

原 著

## 抗結核剤耐性結核菌の走査電子顕微鏡的観察

荒 明 美奈子・須子田 キ ヨ

東京女子医科大学微生物学教室

受付 昭和 54 年 1 月 24 日

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF DRUG RESISTANT  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Minako ARAAKE\* and Kiyō SUSHIDA

(Received for publication January 24, 1979)

Morphological examinations of drug resistant colonies of mycobacterium tuberculosis were performed with the scanning electron microscope (SEM).

Three strains (246, 55 & 69) of *M. tuberculosis* isolated from three patients were subjected to the study. The drug resistant colonies of these strains of *M. tuberculosis*, in vitro, were obtained either 1) through a series of subcultures on a gradually increased concentration of drugs, or 2) treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NG). By these methods, colonies grown on egg-medium (Ogawa) monoresistant to either of Streptomycin (1,000 $\mu$ g/ml), Kanamycin (1,000 $\mu$ g/ml), Para-aminosalicylic acid (100 $\mu$ g/ml) or Isoniazid (50 $\mu$ g/ml) were obtained, and they were abbreviated as SM 1000-R, KM 1000-R, PAS 100-R and INH 50-R. These single-drug resistant colonies were all rough in appearance on the egg-medium. Three-drug-resistant colonies, (SM-PAS-INH) 10-R, were obtained by the same method mentioned-above.

The surface of these drug resistant colonies of tubercule bacilli were observed with the SEM and it differed from the colonies of each parent sensitive strain in morphological features. The surface of the drug resistant colonies were more sticky than their parent strains; the filaments and granules were more prevalent in the drug resistant colonies. Occasionally, these drug resistant colonies were trapped with a net-like substance over the surface of the colonies. The morphological changes related to the kind of drugs, i. e., KM 1000-R colonies showed most marked changes, next PAS 100-R and INH 50-R, and least SM 1000-R colonies. A slight difference was found between monodrug resistant strains obtained by methods No. 1 and 2. The surface of the (SM-PAS-INH) 10-R colonies obtained by method No. 1 showed some changes from the parent colonies, while those obtained by method No. 2 showed marked variation.

It seems that these morphological changes of in vitro produced drug-resistant *M. tuberculosis* related to the emergence of drug resistance.

走査電子顕微鏡による観察はすでに種々の細菌で試みられている。Whittaker ら<sup>1)</sup>は連鎖球菌, ブドウ球菌等の集落を観察している。結核菌についても Markel ら<sup>2)</sup>

の報告がある。それによると, 培養日数により集落の形態が異なるとしている。薬剤耐性結核菌の微細構造については Menyshkov ら<sup>3)</sup>の報告があるが, その集落表面

\* From the Department of Microbiology, Tokyo women's Medical college, Kawada-cho, Shinju-ku, Tokyo 162 Japan.

の形態についての報告はされていない。須子田ら<sup>4)</sup>は薬剤耐性結核菌のフェージ感受性は薬剤感受性菌と異なると報告している。われわれは、これらから薬剤耐性となることにより、菌体表面の構造が変化するのではないかと考え、試験管内で薬剤耐性とした結核菌を用いて、その集落表面の菌の形態を走査電子顕微鏡で観察し、薬剤感受性菌と比較検討した。

### 材料と方法

1. 使用菌株: 患者より分離したヒト型結核菌 246, 55, 69の3株を用いた。耐性菌は、246は試験管内で増量継代法<sup>4)</sup>により streptomycin 1,000 $\mu$ g/ml 耐性(SM-R), para-aminosalicylic acid 100 $\mu$ g/ml 耐性(PAS-R), kanamycin 1,000 $\mu$ g/ml 耐性(KM-R), isoniazid 50 $\mu$ g/ml 耐性(INH-R)とした単剤耐性菌4株と、SM, PAS, INH各10 $\mu$ g/mlの3剤に耐性とした菌株(3R)およびニトロソグアニジン(NG)処理により、同様に薬剤耐性とした菌株を用いた。55, 69はNG処理によりSM 1,000 $\mu$ g/ml 耐性(NG-SMR)とした菌株を用いた。

2. 培地および培養: 薬剤感受性菌、耐性菌とも薬剤を加えない小川培地に増殖した菌を生理食塩水で10mg/ml菌浮遊液とした。この0.2mlを1%小川平板培地上にコンラージ棒で塗布し、37 $^{\circ}$ Cで2週間培養した。この際、培地の乾燥を防ぐため、培養3日目に平板をセロハンテープでシールした。

3. 電子顕微鏡の観察法: 培地上の集落を培地とともに切り出し、3%グルタルアルデヒドで前固定、1%オスミウム酸で4 $^{\circ}$ C、1時間、後固定し、その後エタノール系列で脱水、酢酸アミルで置換、臨界点乾燥後、金蒸着を施し、日立HHS-2X型走査電子顕微鏡で観察した。

### 成 績

1. 薬剤感受性菌: 246株(写真1), 55株(写真2),

69株(写真3)の3株いずれも菌体表面は滑らかで、菌の太さはほぼ一様、先端は丸味を帯びていた。個々の菌体ははつきりして、融合、粘性化は少なかった。網目状構造物がわずかにみられる場合もあった。3株の間には著明な差は認められなかった。

2. 増量継代法による耐性菌(246株): SM-R(写真4)が最も変化が少なく、親株(写真1)に比べ、集落表面に菌の融合や変形がわずかにみられ、やや粘性化していると思われる。INH-R(写真5,6), KM-R(写真7)はSM-Rより形態的変化が顕著で、融合、変形がみられるばかりでなく、網目状になった糸状物、顆粒が多くみられ、明らかに菌体表面の粘性化が認められた。KM-Rでは10 $\mu$ g/ml耐性(写真8,9,10)でも上記変化が顕著に観察された。すなわち、網目状の部分、連鎖状球状体がみられた。更にPAS-R(写真11)は多数の菌が互いに融合し、個々の菌形の不明瞭な部分があり、球状、不正桿菌、小顆粒様物質が多くみられた。これら高度の単剤耐性菌に比べ、3R(写真12)は変化が少なく、個々の菌体が明瞭に認められ、表面の粘性化による融合、変形、糸状物、顆粒等はほとんど認められなかった。

3. NG処理による耐性菌(246株): 増量継代法による場合と同様、SM耐性菌(NG-SMR)(写真13)が最も変化が少なかったが、親株(写真1)よりも菌表面の粘性化が増し、更に増量継代法による耐性菌(写真4)より糸状物がわずかにみられた。NG-INHR(写真14), NG-PASR(写真15)はNG-SMRとほとんど差がないが、菌表面の粘性化や線維状、顆粒状物質等がやや多くみられた。NG-KMR(写真16,17)では菌体融合、菌塊などの粘性化、線維状、網目状の変化が著明であり、網目状の中には小顆粒が多数認められた。NG-3R(写真18,19,20)は増量継代法に比べ、表面構造は粘性化が著しく、著明な網目状および連鎖状球状体ばかりでなく、大きな融合塊、多数の顆粒等、親株ではみられない構造物がみられた。

### 【写真説明】

写真1~3. 薬剤感受性株

1. *M. tuberculosis* 246
2. *M. tuberculosis* 55
3. *M. tuberculosis* 69

写真4~12. *M. tuberculosis* 246の増量継代法による薬剤耐性株

4. SM 1,000 $\mu$ g/ml 耐性株
5. INH 50 $\mu$ g/ml 耐性株
6. 同上
7. KM 1,000 $\mu$ g/ml 耐性株
8. KM 10 $\mu$ g/ml 耐性株
9. 同上
10. 同上
11. PAS 100 $\mu$ g/ml 耐性株
12. 3剤(SM·PAS·INH) 10 $\mu$ g/ml 耐性株

写真13~20. *M. tuberculosis* 246のNG処理法による薬剤耐性株

13. SM 1,000 $\mu$ g/ml 耐性株
14. INH 50 $\mu$ g/ml 耐性株
15. PAS 100 $\mu$ g/ml 耐性株
16. KM 1,000 $\mu$ g/ml 耐性株
17. 同上
18. 3剤(SM·PAS·INH) 10 $\mu$ g/ml 耐性株
19. 同上
20. 同上

写真21. *M. tuberculosis* 55のNG処理法によるSM 1,000 $\mu$ g/ml 耐性株

写真22. *M. tuberculosis* 69のNG処理法によるSM 1,000 $\mu$ g/ml 耐性株

写真23. *M. tuberculosis* P 15

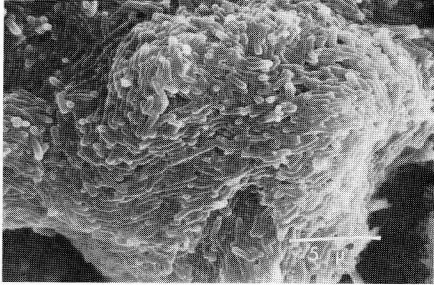


写真 1

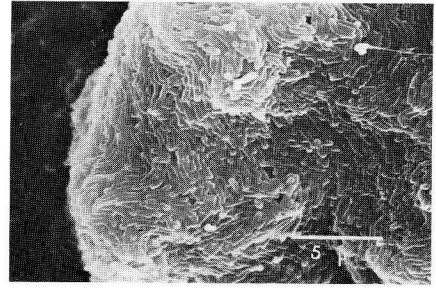


写真 2

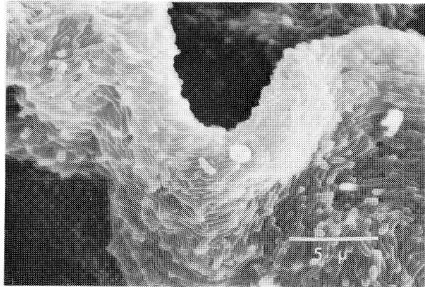


写真 3

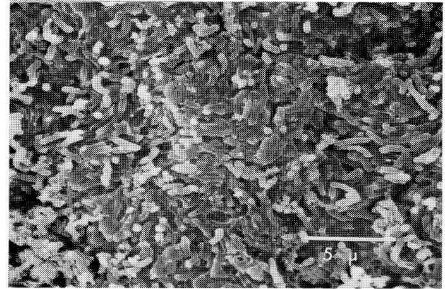


写真 4

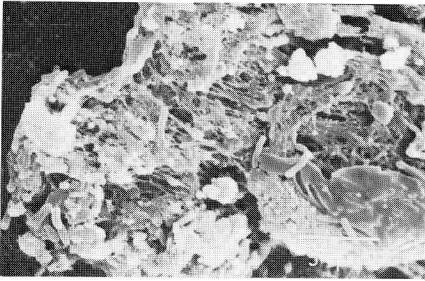


写真 5

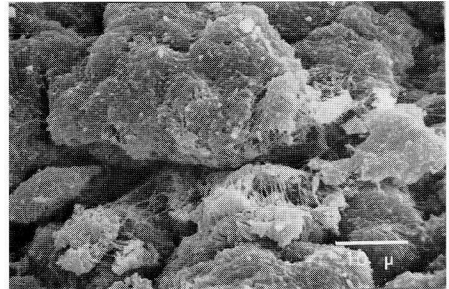


写真 6

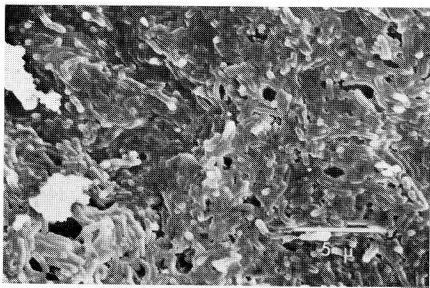


写真 7

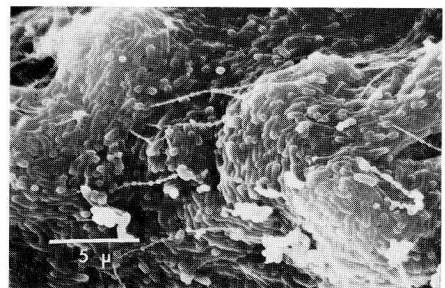


写真 8

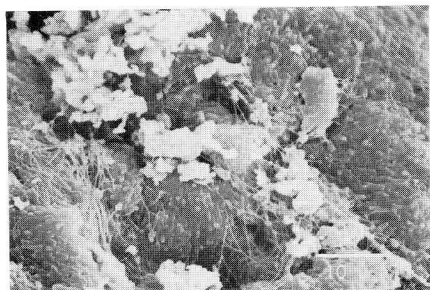


写真 9

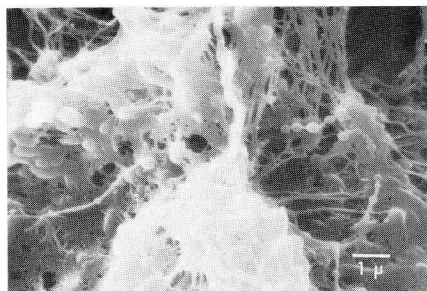


写真 10

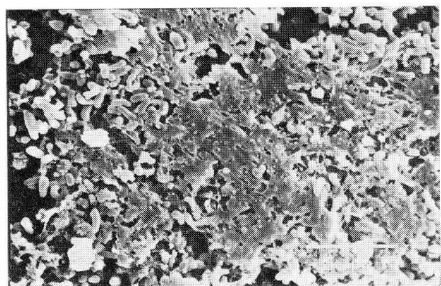


写真 11

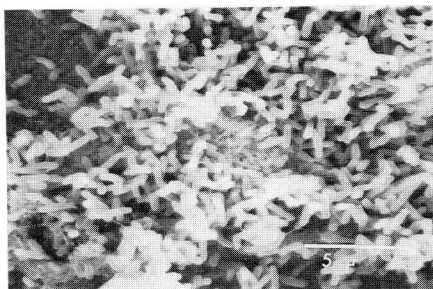


写真 12

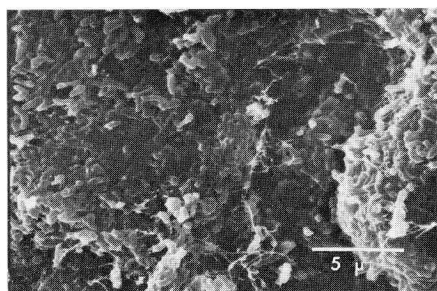


写真 13

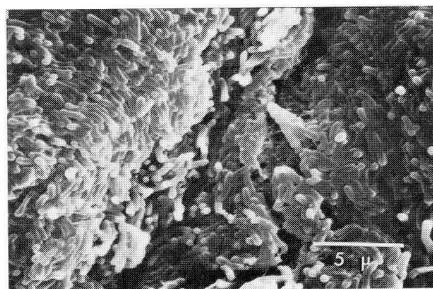


写真 14

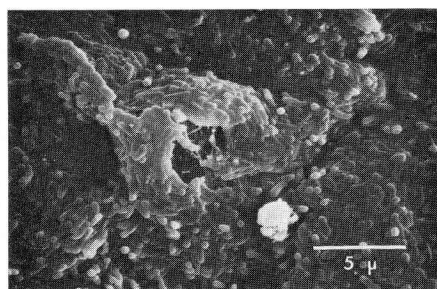


写真 15

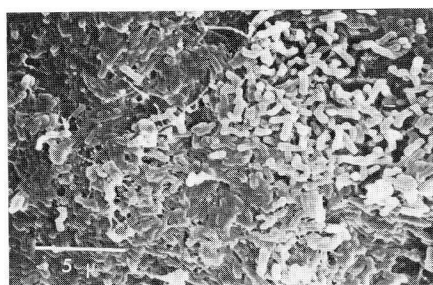


写真 16



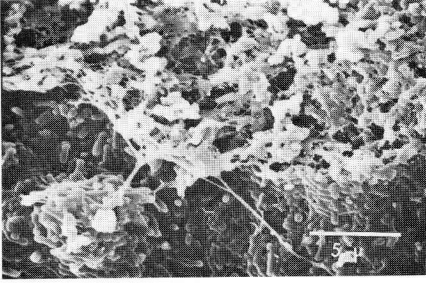


写真 17

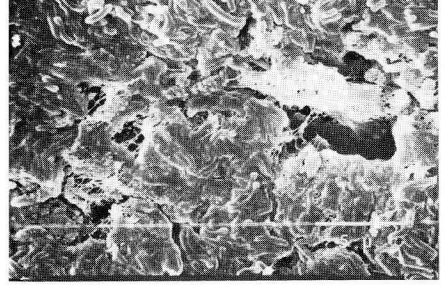


写真 18

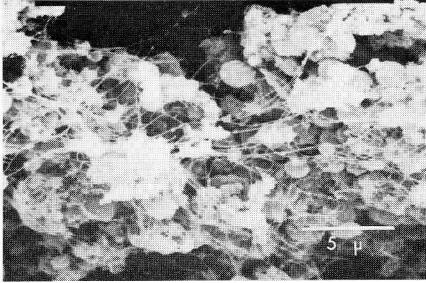


写真 19

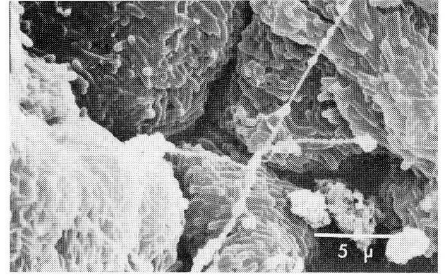


写真 20

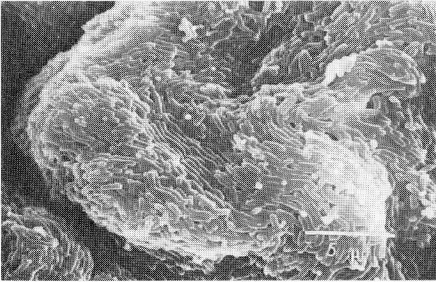


写真 21

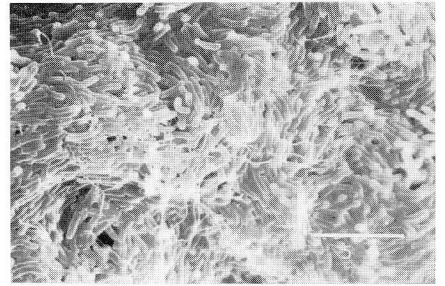


写真 22

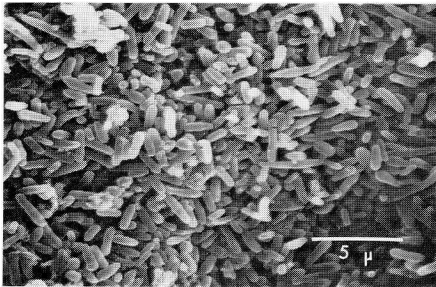


写真 23

4. NG 処理による SM 耐性菌 (55, 69株): 両株とも 246 株とほぼ同様に, 菌体表面の粘性化, 線維状構造物, 顆粒等が認められた(写真 21, 22)。

## 考 察

試験管内で薬剤耐性とした結核菌集落を走査電子顕微鏡で観察した。単剤耐性菌は, 増量継代法, NG 処理法いずれの方法による耐性株も, 菌の表面構造はその親株である薬剤感受性菌との間に, 変化を示した。すなわち, その菌表面の粘性化, 菌体の融合, 親株にはみられなかつた線維状, 連鎖球状体および顆粒等が多く認められた。岡田<sup>9)</sup>は鼠ライ菌について, 岩井<sup>8)</sup>は結核菌について, 水口<sup>7)</sup>は種々の抗酸菌について, R型とS型の集落では, その表面構造に差があるとしている。著者らの使用した菌株はいずれも肉眼的にはR型の集落であつたので, 比較のため, S型集落を示す結核菌 P15 (写真 23) を同様に観察したが, R型集落を示す 246 株薬剤感受性菌との差異は認められなかつた。Markel<sup>2)</sup>は種々の抗酸菌を走査電子顕微鏡で観察し, 表面構造は, 培地, 培養時間により異なり, 培養の長い菌ほど, 線維状構造物が多くみられると報告している。われわれの上記実験観察は 1% 小川培地 2 週間培養という一定条件下で, 集落の性状もほぼ同様であつたが, 耐性株とその親株とは明らかに表面構造が異なり, これらの変化は薬剤耐性に伴う変化と考えられる。増量継代法による場合には, KM 単剤耐性菌, PAS 単剤耐性菌が最も顕著な変化を示し, SM 単剤耐性菌は変化が少なかつた。NG 処理法による場合でも, KM 単剤耐性菌は顕著な形態的变化を示し, SM 単剤耐性菌は変化が少なかつた。Menyshkov<sup>3)</sup>によれば cycloserin, PAS 等の薬剤に耐性の菌株による微細構造の差異は顕著でないとしている。岡田<sup>9)</sup>は結核菌に抗結核剤を作用させると内部構造が変化するとしている。われわれの成績では菌体表面の形態についてのみ走査電子顕微鏡で観察を行なつたが, 増量継代法と NG 処理法のいずれの方法を用いた耐性菌でも薬剤により変化の程度が異なることが観察され, SM 耐性菌が最も変化が少なく, KM 耐性菌は最も強く, PAS 耐性菌, INH 耐性菌はその中間であつた。3 剤耐性菌において, 増量継代法では親株と比べてほとんど変化がなかつたが, これは 3 薬剤の耐性度が低いためであろう。しかし NG 処理菌では同濃度の 3 薬剤加培

地に増殖する耐性菌が著しい菌体表面の変化を示した。われわれの上記実験では増量継代法と対比させるため, 各 3 剤 10 $\mu$ g/ml 宛含む耐性培地に発育した菌について観察を行なつたが, おそらくこの NG-3R は NG 処理により, もつと高度の耐性菌になつた可能性もあると考えられる。

須子田<sup>4)</sup>は薬剤耐性結核菌では, 結核菌 ファージ (MTPH9) の感染性が低下すると報告している。すなわち, 試験管内で耐性とした単剤耐性菌は低濃度ファージで溶菌しなくなり, 薬剤間における差もわずかながら認められた。しかし, 増量継代法による 3 剤耐性菌では高濃度ファージに対しても感受性を全く失うという。Tokunaga<sup>9)</sup>は, D4, D29, Y10 と B1 ファージに対する *Mycobacterium smegmatis* のレセプターは脂質であり, 脂質抽出前と抽出後の細胞壁には形態的な差異があると報告している。われわれの上記実験成績から, 薬剤耐性結核菌の菌体表面の変化がファージの吸着に何らかの影響を与えているのではないかと考えられる。更にそれより以前に, 須子田<sup>10)</sup>は患者より分離した多剤耐性菌もファージ感染性がないとしている。今後は患者より分離される薬剤耐性結核菌の形態も含め, これら菌表面の形態的变化と, 化学的变化の関係, 更にファージ感受性との関係等が問題点となるであろう。

## 文 献

- 1) Whittaker, D. K. and Drucker, D. B.: J. Bacteriol., 104: 902, 1970.
- 2) Markel, R. S., Rhoades, K. R., Gallagher, J. E. and Ritchie, A. E.: Am. Rev. Resp. Dis., 108: 381, 1973.
- 3) Menyshkov, D. D., Dykhno, M. M. et al.: Probl. Tuberk., 49: 64, 1971.
- 4) 須子田キヨ・弥吉真澄・河野雅子: 結核, 51: 94, 1976.
- 5) Okada, S., Nishiura, M., Ogawa, T. and Mori, T.: Internat. J. Leprosy, 46: 364, 1978.
- 6) 岩井和郎・塚越兼吉・工藤祐是: 結核, 53: 207, 1978.
- 7) 水口康雄・武谷健二: 結核, 53: 76, 1978.
- 8) 岡捨己・山口淳二・有路文雄他: 抗酸菌病研究雑誌, 23: 146, 1971.
- 9) Tokunaga, T., Kataoka, T. and Suga, K.: Am. Rev. Resp. Dis., 101: 309, 1970.
- 10) 須子田キヨ・長田富香: 結核, 51: 13, 1976.