

電子顕微鏡観察で可視化される結核菌の素顔

Visualization and Characterization of Tubercle Bacilli through Electron Microscopy

山田 博之

Hiroyuki Yamada

公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

要旨 結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、かつて世界で最も高い死亡率を記録した感染症である結核の原因菌である。1882年、Robert Koch により発見された。幅約 0.5 μm 、長さ約 3 μm のやや湾曲した普通の桿菌であるが、結核菌を含む抗酸菌属の細菌は carbol fuchsin (石炭酸フクシン) や auramine O を用いる染色で、塩酸アルコールによる脱色に耐える「抗酸性 (acid-fastness)」を示す。また、結核菌のコロニーはコード形成と呼ばれる特異的な形態を呈し、感染宿主細胞内では phagosome-lysosome fusion (P-L fusion) を阻害して殺菌プロセスから逃れるなど極めて特徴的な性質を示すが、その発現機序は未だ不明な部分が多い。本講座では結核菌が示すこれらの形態学的な特徴を電子顕微鏡観察を用いて検討した結果を紹介する。

キーワード：病原性細菌、結核菌、抗酸性、コード形成、phagosome-lysosome fusion

1. はじめに

エジプトのミイラの骨に骨カリエスと類似した病変が見つかり、さらにその病変部からは抗酸性を示す桿菌が検出されている。また、同じくエジプトから出土した別のミイラの骨病変からは DNA の抽出が行われ、PCR で結核菌特異的な DNA であることが証明されている¹⁾。一方、米国ワイオミング州にある Natural trap cave で見つかった絶滅したバイソンの 17,000 年前の骨化石からは結核菌特異的な DNA 配列に加え、毒力因子である脂質の存在が HPLC 分析により明らかにされている^{2,3)}。これらの報告は、結核菌が既に少なくとも 17,000 年前から哺乳類を宿主として感染症を惹起し、2000 年～5000 年前には既に人類に脅威を及ぼす感染症であったことを示している。

結核菌を発見した Robert Koch はその業績により 1905 年にノーベル賞を受賞したが、受賞式での講演で、当時ドイツ国内には排菌のため入院を要する結核患者が約 200,000 人存在すると推定している⁴⁾。一方、日本ではその約 40 年後、1943 年に年間 17 万人を超える結核死が記録され、その年の結核による死亡順位は 1 位であった⁵⁾。現在に目を向けてみると、WHO の統計によれば 2011 年に全世界で年間約 1200 万人の結核患者が存在し、約 140 万人が死亡している⁶⁾。一方、日本国内では 2011 年の統計で年末登録者が約 55,000 例で、約 2,200 人が死亡しており、死亡順位は 25 位になっ

ている⁷⁾。これら統計的データを見ると、世界的に結核が高蔓延であった長い時代の後、ストレプトマイシンやイソニアジドなどの抗生物質による化学療法が患者の減少に大きく寄与してきたことがうかがえる。しかし、他の感染症と同様に抗生物質が効かない耐性菌が出現し、現在は一次薬であるイソニアジドとリファンピシンの両剤に耐性を示す多剤耐性 (MDR) 菌に加え (全患者の 0.7～0.8%)、二次薬のフルオロキノロンと注射薬にも耐性を示す超多剤耐性菌 (MDR の約 10%) も出現し、今なお死に至る感染症としての脅威を維持している⁸⁾。

本講座では、バイオセーフティーレベル 3 領域での取扱を義務付けられた病原性結核菌の特徴を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いた観察で紹介させて頂きたい。

2. 結核菌の形態学的基礎データ

結核菌は、原核生物の真正細菌ドメイン、放線菌門、放線菌綱、放線菌目、コリネバクテリウム亜目のマイコバクテリア科、マイコバクテリア属に属するグラム陽性桿菌である。抗酸菌属には 100 種以上の抗酸菌が含まれ、ヒトに対して病原性を有する種は結核菌を含めて 50 種以上ある⁹⁾。ハンセン病の原因菌である *M. leprae* は現時点でも培養不可能であるが、これまでに同定された他の抗酸菌は液体培地、寒天培地の他に、全卵を用いる小川培地、Löwenstein-Jensen 培地などを用いて培養できる (図 1a)。

光学顕微鏡観察では抗酸菌は一般的な細菌の鑑別染色であるグラム染色陽性で、更に抗酸菌を鑑別するための抗酸菌染色で陽性を示す。グラム染色では他のグラム陽性菌の様に明瞭な陽性所見を示さない (塗抹標本中の抗酸菌が均一に明瞭

〒204-8533 東京都清瀬市松山 3-1-24
TEL: 042-493-5072; FAX: 042-492-4600
E-mail: hyamada@jata.or.jp
2012 年 11 月 28 日受付

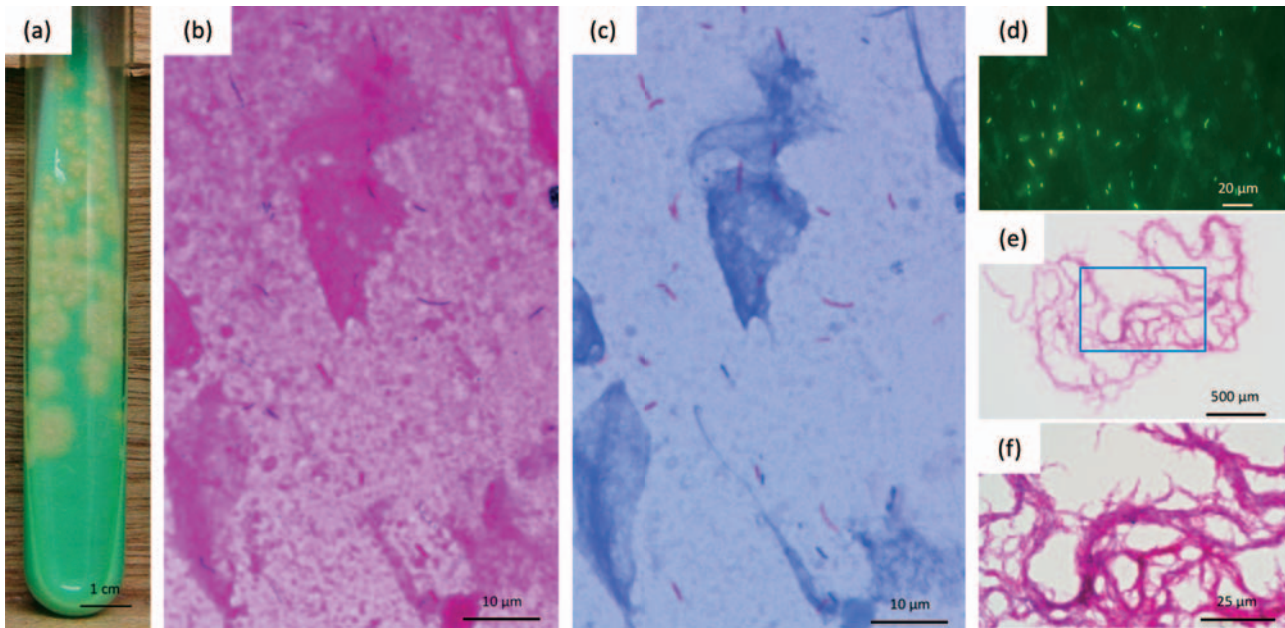


図1 結核菌の肉眼及び光学顕微鏡像. (a) 1%小川培地に接種後4週間目の結核菌コロニー. (b) 結核菌の人工痰の塗抹標本のGram染色像. (c) (b)と同じ視野を脱色後抗酸菌(Ziehl-Neelsen)染色した光顕像. (b)で青く染色され(Gram陽性), (c)で赤く染色されている桿菌が結核菌(抗酸菌染色陽性). (d) auramine 0を用いた蛍光抗酸菌染色. (e) detergentを含まない液体培地で長期間培養した結核菌に見られたコード形成像. (f) (e)の青い長方形部分を拡大した像. 結核菌が集合してコード状の塊を形成している.

化学固定(GA-OsO₄)

急速凍結法(サンドイッチ法)

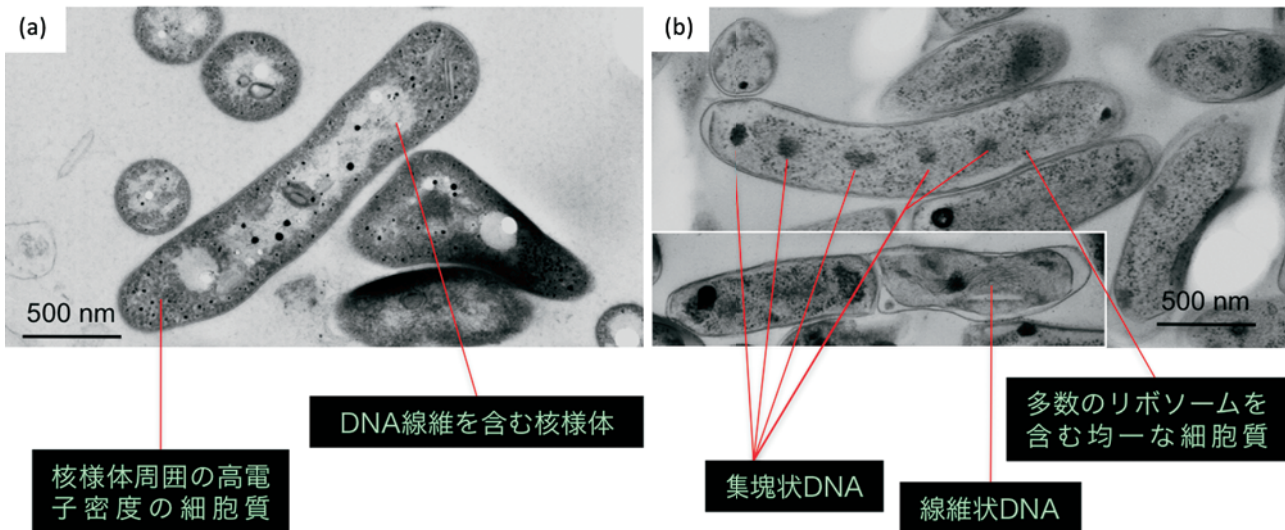


図2 化学固定(a)と急速凍結置換固定法(b)で調製した結核菌超薄切片の透過電子顕微鏡像. 化学固定では菌体周辺領域と中心部で電子密度が異なり、いわゆる核様体にDNAと思われる線維状構造が見られる. 一方、急速凍結置換固定法で調節した標本では、菌体内は均一で多数のリボソームが一様に分布し、DNAと思われる線維状構造がその中に埋め込まれたように見える.

な陽性を示さない)ため「不定性」と記されることもあるが、標本中に陽性菌が少なからず存在するため、グラム陽性菌として扱われる。「抗酸菌(acid-fast bacilli)」という名称は、抗酸菌染色の染色過程で carbol fuchsin や auramine O による主染色の後、3%塩酸アルコールによる脱色に耐えて、主染色色素が菌体内に残るため、明視野観察では fuchsin の赤、

蛍光観察では auramine O の蛍光により検出できることが所以である. 図(1b~d)は著者らが開発したポリアクリルアミドを基材とした人工痰の塗抹標本である¹⁰.

また、結核菌の光学顕微鏡所見におけるもう一つの重要な特徴としてコロニーのコード形成が挙げられる(図1e, f). コード形成は結核菌を発見した Koch の論文にもその形跡が

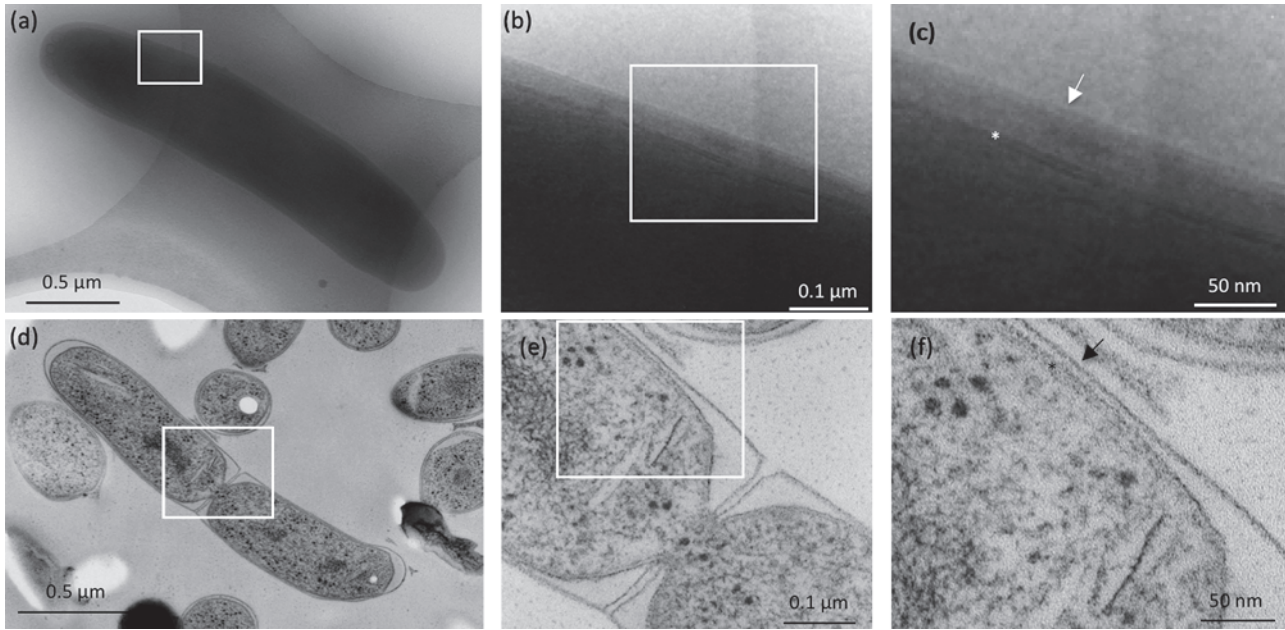


図3 氷包埋 (a-c) と急速凍結置換固定法 (d-f) で調製した結核菌標本での細胞壁外膜の観察. (c) と (f) で細胞膜 (*) の外側に明瞭な細胞壁外膜 (矢印) が観察出来る. 特に (c) では, 細胞壁外膜が2重層として観察できる.

記されており, 初期の研究では細胞壁成分の trehalose dimycolate (TDM) が結核菌の病原性と特有のコード形成を誘導する細胞壁成分と考えられたが, 後に, 結核菌や病原性抗酸菌以外の非病原性, 非結核性抗酸菌の細胞壁にも TDM が存在することが明らかになり, コード形成と TDM の直接の関連については否定されている. なぜこのような構造が形成されるのか未だ不明な点が多いが, 結核菌体表面にミコール酸を主成分とする多量の脂質が存在するため, 隣接する菌体が密着したまま増殖することが原因と考えられ, 現時点では細胞壁構造を決定する複数の遺伝子により支配されていると考えるのが妥当であろう¹¹⁾.

以上が光学顕微鏡観察により得られる結核菌の形態学的特徴であるが, 以下に電子顕微鏡観察で得られる基礎的データと上記の「抗酸性」と「コード形成」及び実験動物を用いた感染実験で得られたサンプルで電子顕微鏡を用いて観察したデータを紹介する.

3. 結核菌の透過電子顕微鏡による基礎的所見

結核菌の透過電子顕微鏡観察は, 一般的なグルタルアルデヒドと四酸化オスmiumによる化学固定とエポキシ樹脂包埋により調製されたサンプルの超薄切片で行われてきた (図2a). 近年, 急速凍結法や氷包埋および CEMOVIS (cryo-electron microscopy of vitreous section) を用いた観察も行われるようになった^{12~18)}. これらの報告では従来の化学固定サンプルでは観察されなかったいくつかの特徴が明らかにされた. 研究者により細かな見解の違いはあるが, 共通した観察結果の一つは, 従来, 膜構造による境界が存在しないため不明瞭ではあるが遺伝情報 DNA が存在する「核様体」とし

て一つの区画された細胞質内の領域が想定されていたが (図2a), 急速凍結法や氷包埋, CEMOVIS による観察では細胞質内は極めて均一で, 多数のリボソームとゲノム DNA と思われる線維が観察されるだけであった (図2b). また, これらの手法で調製された標本の観察で得られたもう一つの重要な知見は, 結核菌の細胞壁に外膜が存在することを証明したことである (図3a, b). グラム陰性菌には細胞壁外膜が存在することは既に明らかにされていたが, 急速凍結法, 氷包埋や CEMOVIS で観察するとグラム陰性菌と結核菌の両者には極めて類似した細胞壁外膜が存在することが明らかにされた^{15,16,19)}.

4. 抗酸性発現の機序に関する電子顕微鏡による検討

既に述べたように結核菌を含む抗酸菌の極めて特異的な特徴の一つが「抗酸性」である. 抗酸性の発現の基になる詳細な機序は未だ不明であるが, 抗酸菌の主要かつ特異的な細胞壁構成成分であるミコール酸 (mycolic acid) の存在が重要な役割を果たしていることは確かである. 抗酸菌の脂肪酸・ミコール酸の合成経路の一つである FAS-II (type II fatty acid synthases) 酵素群には2つの β -ketoacyl-AcpM synthase, KasA, KasB が存在する. 両酵素は連携してミコール酸 β 鎖の伸長を行うが, KasA は伸長の開始とその後の β 鎖の伸長, KasB は β 鎖伸長の後半過程に関与するとされている. KasA をコードする遺伝子 *kasA* を欠損した株は, 溶菌を起こし増殖できないため実験材料としては使用できないが, KasB をコードする遺伝子 *kasB* をトランスポゾン導入により knock-out した変異株は動物感染実験における毒力の低下と抗酸性を失うことが明らかになった (図4)^{20~22)}. 著者は, この

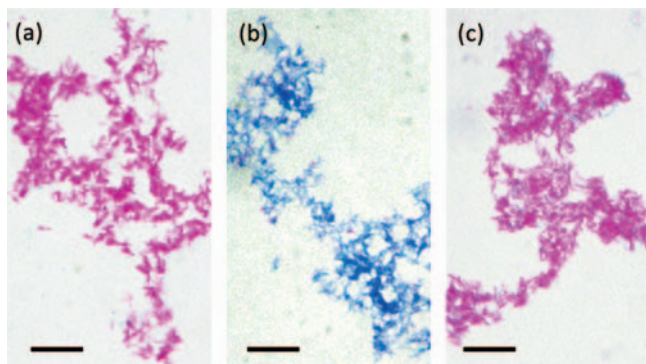


図4 結核菌の細胞壁ミコール酸合成に関わる *kasB* 遺伝子を欠損させた *kasB* knockout 株 (b) と親株 (a) および *kasB* 遺伝子を補完した株 (c) の Ziehl-Neelsen 染色像. (b) の *kasB* knockout 株は細胞壁のミコール酸合成が正常に行われなかったため、抗酸性を消失して、フクシン色素が3%塩酸アルコールによる脱色で流出し、後染色のメチレンブルーにより青く染まっている. bar = 10 μm.

kasB 欠損変異株と親株、*kasB* 遺伝子を補完した株を入手し、Cryo-TEMで観察した. 当初、ミコール酸伸長に関わる酵素活性を欠いた変異株は細胞壁構成成分であるミコール酸の長さが短くなるため、細胞壁の厚さが親株や補完株と比較して薄くなるだろうという仮説を立てた. しかし、実際に氷包埋サンプルで3株の細胞壁の厚さを測定したところ、株間に有意な差は見られなかった. 菌体長、菌体幅、菌体全体の電子密度等のパラメータを比較したがいずれも *kasB* 欠損株の抗酸性消失と相関するものはずぐには見つからなかった. 様々なパラメータの比較検討を試行錯誤した末、ミコール

酸が存在すると思われる細胞壁の細胞膜と細胞壁外膜に挟まれた領域の電子密度が、*kasB* 欠損株で有意に低下していることが明らかになった. このことは、KasBの機能が欠損しているため、全体としてミコール酸合成が低下し、その密度が減少すると同時にβ鎖の伸長が不完全に終わるため、抗酸性が消失するが、相方のKasAが正常に機能しているために細胞壁の厚さに影響を及ぼさないと結論づけ、新たな細胞壁モデルを提唱した (図5)²³⁾.

今回の検討は、直接ミコール酸の局在部位を定量性を持って電子顕微鏡的に証明したものではないので、今後、ミコール酸を特異的に標識し電子顕微鏡で特定する手法の検討を試みたい.

5. コード形成

抗酸性と並んで結核菌のもう一つの形態学的特徴がコロニーのコード形成 (cord formation) である. Tween 80 等の detergent を含まない液体培地や固形培地で培養された結核菌のコロニーを顕微鏡観察するとコード形成という極めて特徴的な形態を示す (図1e, f). 図6はLöwenstein-Jensen培地で4週間培養した結核菌コロニーを走査電子顕微鏡で観察したものである. 倍率を上げて行くにつれて、個々の桿菌が長軸方向に並んで菌塊の束を形成し、それが重層して複雑なコロニー形態を形成しているのがわかる. コードは直線的に伸長することは稀で、束として湾曲することが多い. これは個々の菌が必ずしも完全な直線ではなく、やや湾曲した桿菌の形態を示すためと推察されるが、確固とした裏付けはない. また、隣接するコードがお互いに同調して湾曲しており、隣

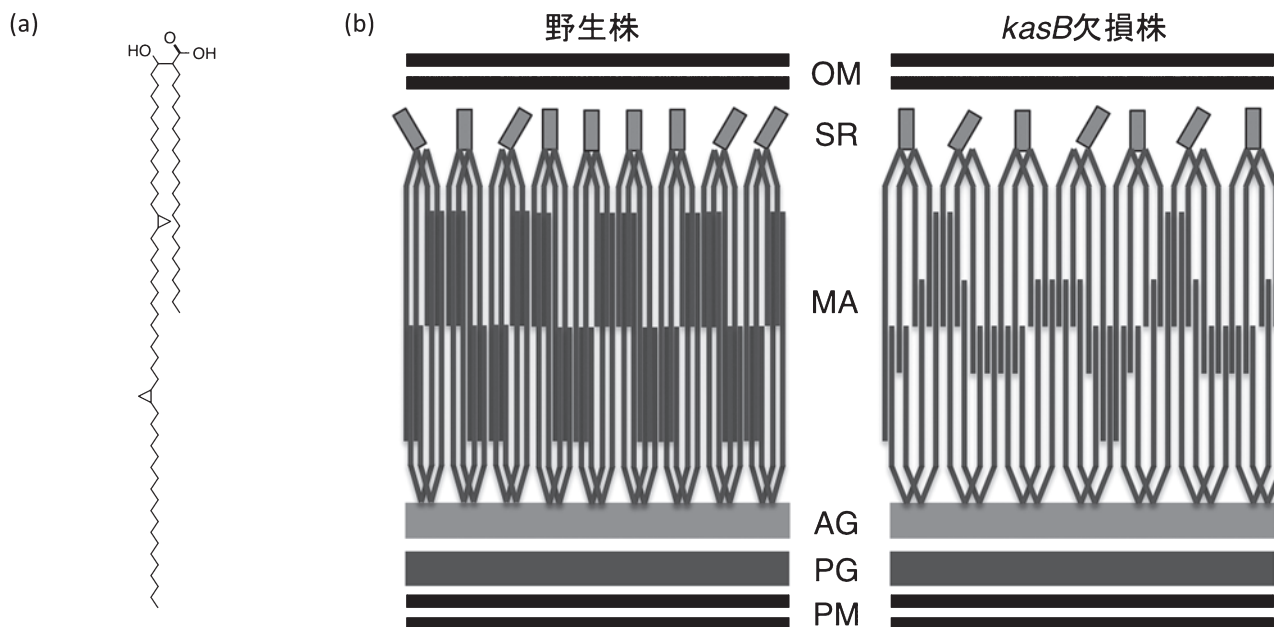


図5 結核菌の細胞壁ミコール酸の化学構造式 (a) および結核菌野生株と *kasB* knockout 株の細胞壁のモデル (b). 変異株ではKasB酵素が欠損しているためミコール酸合成の総量が減少するとともに、β鎖 (長い方の鎖) の伸長が正常に行われず、ミコール酸の密度が低下し、細胞壁の透過性が亢進して脱色されやすくなっている可能性が示唆された. OM: 細胞壁外膜, SR: 糖鎖, MA: ミコール酸, AG: アラビノガラクトサン, PG: ペプチドグリカン, PM: 細胞膜.

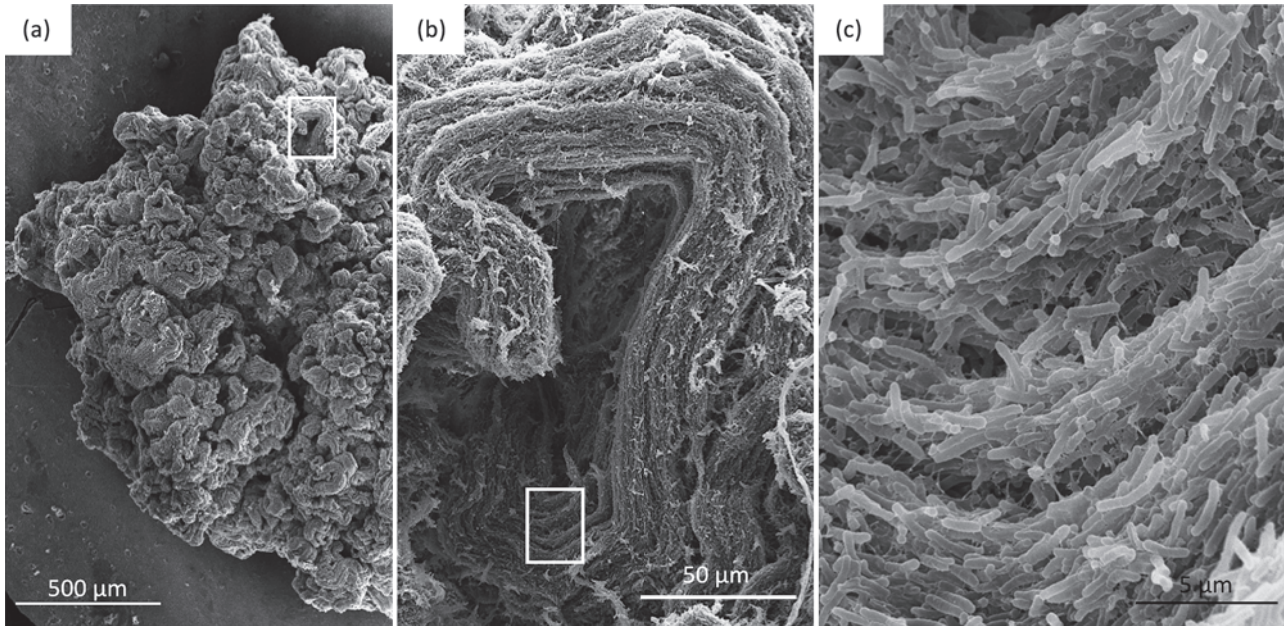


図6 Löwenstein-Jensen 培地で4週間培養した結核菌のコード形成を走査型電顕で観察した像。低倍率では明らかではないが (a, b), 倍率を上げるに従って (b, c), 個々の菌が隣接した菌と方向性を共有して並び、コードを形成しているのがわかる。また、隣接するコードが同調して方向性を示し、高次のコードを形成している。

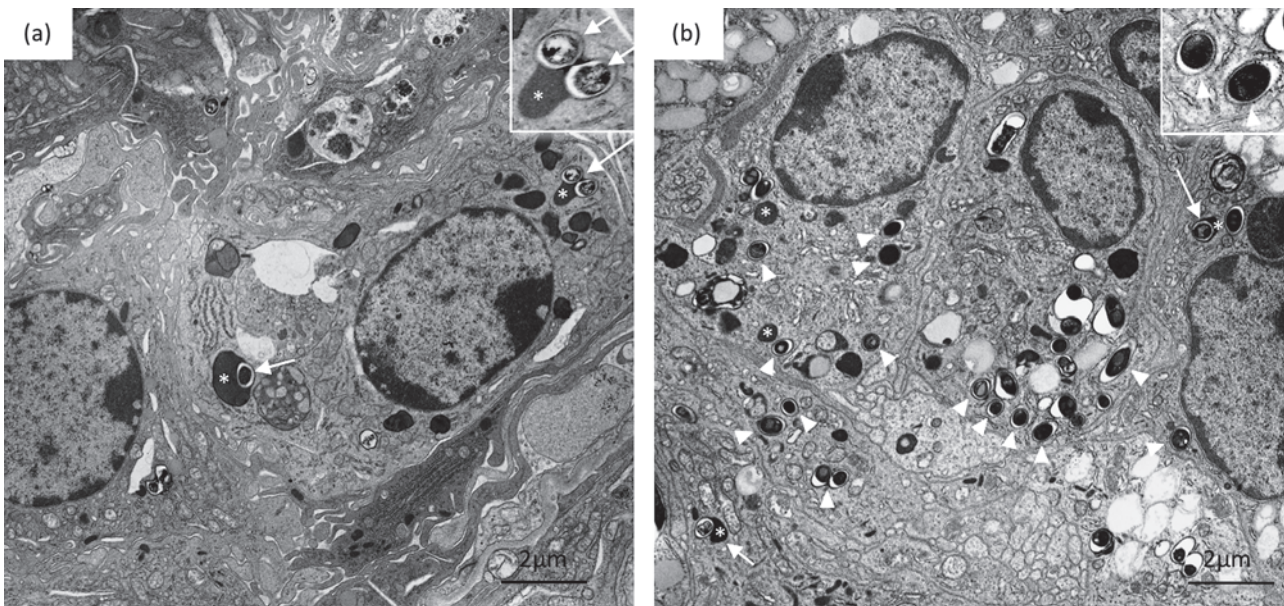


図7 結核菌を吸入感染したマウス肺病変の透過電子顕微鏡像。(a) 野生型マウスの肺病変。菌(白矢印)の数が少なく、phagosomeがlysosome(*)と融合(P-L fusion)している像が見られる。一方、(b)はサイトカンの転写発現に関わる転写因子NF-κB p50サブユニットをknockoutしたマウスの肺病変。細胞内に多数の菌を取り込んだphagosome(白矢頭)が存在するが、lysosome(*)は遊離のものが多く、P-L fusionの像は数少ない(白矢印と*)。

接したコードの空間的な配置をどのように感知し、同調するための機序がどのように発現されるのかはコード形成自体の発現とともに、今後の研究の成果が期待される。

6. Phagosome-lysosome fusion

最後に紹介するのは感染宿主と結核菌の相互作用として最も重要な phagosome-lysosome fusion (P-L fusion) の透過電

子顕微鏡観察像である。結核菌が感染しても実際に活動性の疾患として発病するのは感染者の10%以下であり、感染から発病までの潜伏期間が非常に長い。その潜伏期間における結核菌の局在と潜伏方法については不明な点が多いが、生存手段の1つとして、感染した貪食細胞内の phagosome 内部の酸性化を阻害して P-L fusion から巧みに逃れていることが想定されている。図7(a)はC57BL/6野生型マウスに結核

菌を吸入感染させ、5週間後の肺病変を透過電子顕微鏡で観察したものである。白矢印で示したものは菌を取り込んだ phagosome と lysosome (白アスタリスク) が融合した P-L fusion 像である。一方、図 7 (b) は転写因子 NF- κ B の p50 サブユニットを knockout したマウスの感染 5 週目の肺病変の透過電顕像であるが、白矢印で示したように結核菌を取り込んだ遊離の phagosome が (a) と比較して多数存在するのに対し、遊離の lysosome と P-L fusion 像が少ないのがわかる。転写因子 NF- κ B は IFN- γ や TNF- α など多くの type I サイトカイン遺伝子の転写・発現に必須であり、NF- κ B p50 サブユニットの欠損によりこれらのサイトカイン発現が大きく減少して、殺菌作用が低下したためと考えられる²⁴⁾。

7. おわりに

今回、結核菌に関する形態学的特徴を光学顕微鏡、電子顕微鏡観察で得られたデータをもとに紹介させて頂いた。病原性が高い細菌ではあるがごく専門的な研究者により狭く深く調べられているため、一般には馴染みが薄い細菌ではないかと思う。昨今の可視化技術の進歩により、生命現象が視覚的に研究されることが多くなってきていることは喜ばしいが、それらの多くは真核細胞の観察を目的とされて開発されている。微生物分野、特に原核細胞を対象とした場合、光学顕微鏡観察により微生物の存在の有無 (定量) や種類の鑑別 (定性) の分析は可能である。しかし真核細胞のオルガネラに相当するサイズの微生物や細菌の細胞壁、細胞質の詳細な研究には電子顕微鏡を用いた観察が必須である。

細菌の細胞壁や細胞質の詳細な構造の解明、抗生物質やワクチンの実際の作用機序や作用部位の特定、未知の病原体の発見など、微生物学、細菌学の分野で電子顕微鏡が担う役割はますます大きくなると考えられる。今後、生化学的手法、分子生物学的手法と新旧の電子顕微鏡手法、装置との融合が期待される。この分野における本学会の役割も極めて重要であることは間違いない。

文 献

- Iwai, K., Maeda, S. and Murase, Y.: *Kekkaku*, **85**, 465–475 (2010)
- Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G.K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M. and Brittain, D.: *Clin. Infect. Dis.*, **33**, 305–311 (2001)
- Lee, O.Y., Wu, H.H., Donoghue, H.D., Spigelman, M., Greenblatt, C.L., Bull, I.D., Rothschild, B.M., Martin, L.D., Minnikin, D.E. and Besra, G.S.: *PLoS ONE*, **7**, e41923 (2012)
- Koch, R.: Nobel Prize Lecture, Dec. 12, 1905. (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/koch-lecture.html)
- 結核研究所疫学情報センター:「結核の統計」資料編 (<http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/adddata/>)
- World Health Organization: Global tuberculosis control 2012. (http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html)
- 結核研究所疫学情報センター: 結核の統計一年報 (<http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/nenpou/>)
- Mori, T., Mitarai, S. and Yoshiyama, T.: *Kekkaku*, **87**, 565–575 (2012)
- 抗酸菌検査法検討委員会 (編): 結核菌検査指針 2007, 日本結核病学会, 東京, 52 (2007)
- Yamada, H., Mitarai, S., Wahyunitisari, M.R., Mertaniasih, N.M., Sugamoto, T., Chikamatsu, K., Aono, A., Matsumoto, H. and Fujiki, A.: *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 3604–3609 (2011)
- Glickman, M.S.: in Daffé, M. and Reyrat, J.-M. (Eds.) *The mycobacterial cell envelope*, ASM Press, Washington, DC, 63–73 (2008)
- Paul, T.R. and Beveridge, T.J.: *J. Bacteriol.*, **174**, 6508–6517 (1992)
- Paul, T.R. and Beveridge, T.J.: *Infect. Immun.*, **62**, 1542–1550 (1994)
- Amako, K., Takade, A., Umeda, A., Matsuoka, M., Yoshida, S. and Nakamura, M.: *Microbiol. Immunol.*, **47**, 387–394 (2003)
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M. and Engelhardt, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3963–3967 (2008)
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G. and Daffé, M.: *J. Bacteriol.*, **190**, 5672–5680 (2008)
- Sani, M., Houben, E.N., Geurtsen, J., Pierson, J., de Punder, K., van Zon, M., Wever, B., Piersma, S.R., Jimenez, C.R., Daffé, M., Appelmelk, B.J., Bitter, W., van der Wel, N. and Peters, P.J.: *PLoS Pathog.*, **6**, e1000794 (2010)
- Yamada, H., Mitarai, S., Chikamatsu, K., Mizuno, K. and Yamaguchi, M.: *J. Microbiol. Methods*, **80**, 14–18 (2010)
- Yamaguchi, K., Suzuki, K. and Tanaka, K.: *J. Electron. Microsc.*, **59**, 113–118 (2010)
- Bhatt, A., Kremer, L., Dai, A.Z., Sacchettini, J.C. and Jacobs, W.R., Jr.: *J. Bacteriol.*, **187**, 7596–7606 (2005)
- Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurcha S.S., Kremer, L., Chen, B., Chan, J., Porcelli, S.A., Kobayashi, K., Besra, G.S. and Jacobs, W.R., Jr.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5157–5162 (2007)
- Bhatt, A., Molle, V., Besra, G.S., Jacobs, W.R., Jr. and Kremer, L.: *Mol. Microbiol.*, **64**, 1442–1454 (2007)
- Yamada, H., Bhatt, A., Danev, R., Fujiwara, N., Maeda, S., Mitarai, S., Chikamatsu, K., Aono, A., Nitta, K., Jacobs, W.R., Jr. and Nagayama, K.: *Tuberculosis*, **92**, 351–357 (2012)
- Yamada, H., Mizuno, S., Reza-Gholizadeh, M. and Sugawara, I.: *Infect. Immun.*, **69**, 7100–7105 (2001)