

【症状】

皮膚と末梢神経が主病変である(表 31・2)。PB の皮疹は左右非対称性で、指頭大から手掌大、辺縁やや隆起性の境界明瞭な環状斑などを少数個認める(図 31・1)。乾いた感じがし、鱗屑を伴うことも多い。皮疹には痒みはない。皮疹部に知覚の障害、発汗障害、脱毛、色素脱失などを認め、運動麻痺が起こることもある。皮疹部に一致した末梢神経の肥厚は著明である。MB の皮疹は多彩で、一般に左右対称性の紅斑や環状斑、多数の小形の黄褐色から淡紅色の丘疹や結節、板状の結節や硬結などが多数出現する(図 31・2, 31・3)。皮疹の表面は光沢をもって平滑であることが多い。皮疹の知覚は軽度低下ないし正常。神経肥厚は認められるが、神経障害は徐々に現れる。眼症状を伴うことがある。

ハンセン病には慢性の経過中に出現する急性の激しい病状(らい反応)がときに出現する。らい反応はらい性結節性紅斑(ENL)と、境界反応に分類される。

【病理】

PB は真皮にらい菌を貪食した類上皮細胞の浸潤巣があり、巨細胞やリンパ球も混在する。神経への細胞浸潤もみられる。乾酪壊死を認めることはまれである。MB は真皮内にらい菌の増殖したマクロファージが集まって、レプローマ(らい腫)とよばれる肉芽腫を形成する。

【検査・診断】

病変皮膚からメスで組織液を採取し、抗酸菌染色してらい菌を検出する(皮膚スミア検査)。また



図 31・3 ハンセン病(多菌型, MB)

病理組織標本を抗酸菌染色してらい菌を検出する。PB では組織切片や末梢血液を用いて PCR 検査を行う。診断は知覚障害を伴う皮疹、神経肥厚や知覚・運動障害、らい菌の証明、病理組織像を総合して行う。

【経過と治療】

早期に治療を行えば後遺症を残さず治癒する。治療は WHO が推奨する多剤併用療法(MDT 療法: DDS, リファンピシン, クロファジミン)で、6 か月間(PB)ないし 1~数年間(MB)服用する。フルオロキノロン系抗菌薬も有効である。

II. 皮膚結核 cutaneous tuberculosis

ポイント

- 1) 皮膚結核は、ヒト型結核菌(*M. tuberculosis*) およびウシ型結核菌(*M. bovis*)により生ずる皮膚病変の総称
- 2) 結核菌の存在が明らかな真正(性)皮膚結核 true cutaneous tuberculosis と、結核菌ないしその代謝物に対するアレルギー反応である結核疹 tuberculid に分類される(表 31・3)。
- 3) 検査はツベルクリン反応、塗抹染色法、分離培養法(MGIT 培養, 小川培地等)のほか、PCR 法などがある。
- 4) 治療はイソニアジドとリファンピシンにエタンブトールを併用し、単剤治療を行わない。

1 尋常性狼瘡 lupus vulgaris (図 31・4=口絵 198)

【本態】

結核に免疫のある人で、肺結核などの原病巣か

表 31・3 皮膚結核の分類

真正皮膚結核 病巣部結核菌(+)	結核疹 病巣部結核菌(-)
尋常性狼瘡	バザン硬結性紅斑
皮膚腺病	丘疹壊疽性結核疹
皮膚疣状結核	陰茎結核疹
皮膚初感染徴候	腺病性苔癬
皮膚粟粒結核	結節性結核性静脈炎
潰瘍性皮膚結核	



図 31・4 尋常性狼瘡(口絵 198 参照)
女性に多く、好発部位は顔面である。自覚症状に乏しい。表面には鱗屑、痂皮を付着する局面を形成していた。



図 31・5 皮膚腺病(口絵 199 参照)
AIDS 患者。両側頸部に表面淡紅色の皮下冷膿瘍を認める。膿汁の塗抹検査、培養で結核菌を確認。肺結核があり、多剤耐性結核菌であった。

ら血行性に皮膚転移や、外部からの結核菌皮膚接種で生じた病巣である。

【統計】

皮膚結核は毎年約 100 例登録されているが、内容(皮膚結核の分類)は不明である。

【症状】

好発部位は顔面であるが(図 31・4=口絵 198)、その他全身のどこにでも発症しうる。皮疹は初期には帯黄赤褐色、粟粒大丘疹であるが、徐々に融合、拡大して、局面、結節、潰瘍などになる。

【病理】

真皮は乾酪変性、類上皮細胞、ラングハンス Langhans 型巨細胞などからなる結核結節である。

【検査・診断】

組織内菌要素は検出困難なことが多い。培養で結核菌が分離可能である。サルコイドーシスの局面型皮疹との鑑別が重要である。

【経過と治療】

抗結核薬としてイソニアジド(INH)、リファンピシン(RFP)にエタンブトール(EB)を1年以上多剤併用する。

2 皮膚腺病 scrofuloderma

(図 31・5=口絵 199)

【本態】

本症はリンパ節、骨、関節、筋肉、腱などの結核病巣から直接連続性に皮膚に波及して病変を形成するか、冷膿瘍を介して皮膚に病巣をつくる。

【症状】

皮下の結節ないし膿瘍で始まり、軟化して、皮膚は淡紅色から蒼紅色、暗紅色に変色するとともに瘻孔を形成して排膿し、潰瘍、瘢痕なども混在するようになる。好発部位は頸部である。

3 バザン硬結性紅斑

erythema induratum Bazin (図 31・6)

【症状】

結核疹の中でもっとも頻度が高い。個疹は結節性紅斑に類似した皮下の結節であるが自発痛を欠く。やがてびまん性の紅斑を伴う硬結となり、1～数か月で自然に吸収される。しかし潰瘍化することもある。

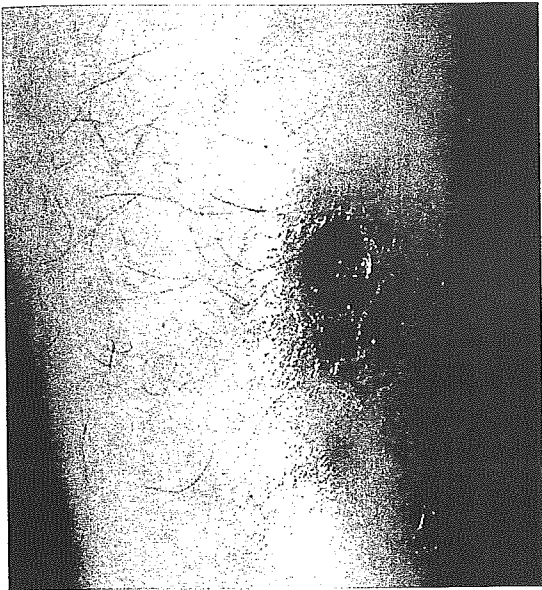


図 31.6 バザン硬結性紅斑

【病 理】

真皮下層より皮下組織における血管炎を伴った肉芽腫性病変である。

【検 査】

ツベルクリン反応は強陽性。結核菌を病巣から分離することはむずかしい。

III. 非結核性(非定型)抗酸菌症

non-tuberculous mycobacteriosis

(図 31.7=口絵 200)

ポイント

- 1) 室温で培養が可能な場合がある。
- 2) 日常生活(仕事, 趣味等)で感染する機会がある。

1 *Mycobacterium marinum* 感染症

【本 態】

魚を扱う職業の人や, 趣味で(熱帯)魚を扱う人が経皮的に感染・発症することが多い。

【症 状】

外傷を受けやすく, 比較的湿度が低い手ないし

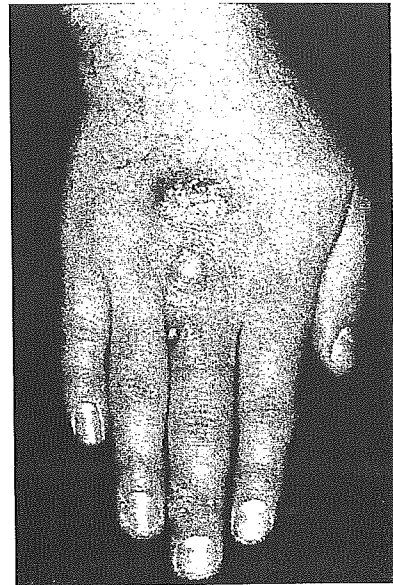


図 31.7 非結核性抗酸菌症(口絵 200 参照)

魚飼育を趣味とする患者。中指から手背部に表面痂皮を伴う結節を認める。痂皮, 生検皮膚の塗抹検査, 培養検査で *Mycobacterium marinum* を検出。

指の背面, 関節突出部に好発する(図 31.7)。皮疹は初期には中央部に膿疱, 痂皮などを伴う発赤, 腫脹性局面であるが, 漸次鱗屑, 痂皮を伴う紅色浸潤局面ないし結節となり, また膿瘍, 潰瘍となる。皮疹は単発のことが多いが多発することもある。皮疹は自覚症状を欠くことが多い。

【病 理】

化膿性炎症反応と類肉芽腫性反応の混在で, その程度は症例によりさまざまである。

【検査・診断】

膿汁を抗酸菌染色して鏡検する。また膿汁やホモジェネートした生検組織を培養すると, 室温で約 2 週間で生えてくる。また魚槽水などの感染源の培養からも菌を検出できる。

鑑別診断としては, スポロトリコーシス, クロモミコーシスなどの皮膚真菌症, 尋常性狼瘡, 皮膚疣状結核, 異物肉芽腫, 慢性膿皮症などがある。

【治 療】

テトラサイクリン系抗菌薬, リファンピシンなどを併用する。菌は 37°C ではほとんど発育しないので, 使い捨て化学カイロによる局所温熱療法も有効である。

2) その他の非結核性抗酸菌症

M. ulcerans によるブルーリ潰瘍 (Buruli

ulcer) は結核, ハンセン病に次いで患者の多い抗酸菌感染症で, 四肢などに潰瘍を起こす。アフリカ, オーストラリアなどで発症している。

B 一般細菌感染症 bacterial infections

オリエンテーション

- 1) 皮膚から分離される細菌は, 常在菌と通過菌に分けられ, 常在菌による皮膚変化と通過菌による一般細菌感染症がある。
- 2) グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌とレンサ球菌を原因菌とする膿皮症が, 代表的な皮膚感染症である。
- 3) 膿皮症は感染経路により毛嚢性, 汗腺性, 非付属器性の3種類に分けられる。
- 4) グラム陽性桿菌, グラム陰性桿菌による感染症は, 常在菌による皮膚変化と考えられるものが多く, 宿主の側の要因が発症に関与する。
- 5) 治療は原因菌に感受性のある抗菌薬の選択投与と, 消毒, 切開, デブリドマン débridement などの局所処置を行う。

I. 皮膚の細菌学

bacteriology of the human skin

皮膚から分離される細菌は, 常在菌 resident flora と通過菌 transient flora あるいは一時的な停留菌とに分けられるが, 両者の区別は明瞭なものではなく, 常在菌による皮膚変化と通過菌による皮膚変化が起こりうる。通過菌による皮膚変化が一般的な感染症となるが, 宿主側の条件次第で常在菌による感染症も発症する。常在菌による皮膚変化の中には尋常性痤瘡, 紅色陰癬, 腋臭, 黄菌毛, pitted keratolysis, 脂漏, フケ dandruff などがあるが, これらの症状あるいは疾患は感染性はほとんど有していない。しかしその発症においてはいずれも細菌がなんらかの形で関与しており, 治療における抗菌薬の投与が有効である。

正常な皮膚から分離される細菌を表 31・4 にまとめた。 *Malassezia furfur* は酵母であるが, 脂漏部位, 頭部の皮表, 毛嚢内から分離される。糸状菌 (*Trichophytes*) も皮膚の湿潤部位から分離される。この二者は皮膚の菌叢 skin flora のメンバーとして欠かすことはできない存在であるため右端に加えた。下段に症状あるいは疾患名を入れ

た。

皮膚の菌叢は腸内, 口腔内, 腔内と比較すると単純であり, 部位により分離される菌種はさらに限定される。分離される部位と菌種を表 31・5 に示した。前額, 鼻前庭, 腋窩, 会陰, 第4趾間の5か所は, それぞれ人体の菌叢を特徴的に表す部位である。前額部は代表的な脂漏部位であり, 鼻前庭部は気道, 口腔と外界との接点であって湿潤部位である。腋窩は有毛部位であり, 汗腺が多く存在し, 擦過部位であり湿潤部位でもある。会陰部は腔内, 腸内, 尿道内の菌叢の影響を受ける湿潤部である。第4趾間は通常趾間の中ではもっとも間隔が狭く, 密着しており, 湿潤部位である。

II. グラム陽性球菌感染症

皮膚の細菌感染症の多くはグラム陽性球菌であるブドウ球菌属 *Staphylococcus* と溶血性連鎖球菌属 *Streptococcus* を原因菌としており, これらの菌によって生じる疾患が膿皮症である。これら以外では近年, *Micrococcus sedentarius* が pitted keratolysis の原因菌であることが確認されている (表 31・6)。

す。血液中にあるHIV-1の蛋白に反応する特異的抗体、およびHIV-1抗原自体を検出することによって判定します。

血清学的診断の問題点は、感染してから特異的抗体が検出されるまでおよそ1カ月かかることです。このため、感染急性期には血清学的診断では判定できないことがあります。この空白の1カ月をウィンドウピリオドと呼んでいます。ウィンドウピリオドの問題は急性感染が見落とされるだけでなく、輸血用血液の汚染の危険性を高めるなど、多くの問題をはらんでいます。

最近ではこのウィンドウピリオドを短くするために、従来の血清学的診断だけではなく、HIV-1のRNA（リボ核酸）を増幅検出する方法も併せて利用されています。

治療の方法

HIV感染症の治療薬剤は現在17種類あります。逆転写酵素阻害薬と呼ばれる

ばれるものが7種類あります。これらの薬剤を3剤以上組み合わせた多剤併用療法が、標準的な治療法として行われています。

多剤併用療法は著しい効果をあげており、この治療方法が始まってから、エイズで亡くなる患者さんの数は大幅に減りました。それでも、多剤併用療法でHIV感染症を根治することはできないため、患者さんは生涯薬をのみ続けなければなりません。

病気に気づいたらどうする

もしHIV-1に感染したのではないかと心配になったら、もよりの保健所あるいは病院に相談してください。保健所では匿名で無料の検査を受けることができます。検査は通常の採血（5ml程度）により行われます。

なお、献血はHIV-1検査の代わりにほならないので、注意してください。

細菌・ウイルスなどによる感染症／皮膚

ハンセン病	石井則久	2689
帯状疱疹	本田まりこ	2690
単純疱疹（ヘルペス）	〃	2692
尋常性疣贅（いぼ）	〃	2693
伝染性軟属腫（みずいぼ）	〃	2693
皮膚真菌症（白癬）	〃	2694

ハンセン病

どんな感染症か

らい菌による慢性感染症で、主に皮膚と末梢神経に病変が生じます。日本では感染源になる人はほとんどいません。たとえ感染しても、現在の日本では発症することはまずありません。もちろん遺伝はしません。

従来「らい」「癩」などの言葉が用いられてきましたが、現在は偏見・差別を助長するものとして使えません。

症状の現れ方

自覚症状のない皮疹や、知覚障害によるやけどやけがなどで気づきます。ハンセン病の皮疹はかゆみのない紅斑、丘疹、結節、環状斑などさまざまで、ハンセン病に特異な皮疹はありません。

皮疹にほぼ一致して知覚（触った感じ、痛み、熱い冷たいの感覚）が鈍くなったり麻痺を認めます。診断や治療が遅れると神経がはれたり、運動障害（手足が曲がるなど）を伴うこともあります。

検査と診断

らい菌の検出が重要です。現在のところ、らい菌の培養は不可能なので、①皮膚症状のある部位にメスを刺して組織液を採取する皮膚スメア検査、②皮膚の病理組織を抗酸菌染色する検査、③らい菌の特異的な遺伝子（DNA）を証明する検査がありますが、これらのうち複数の検査が行われています。

障害なども調べます。

日本では、①皮疹（自覚症状なし）、②神経症状（知覚障害、肥厚、運動障害）、③らい菌の検出、④病理組織検査の4項目を総合して診断します。なお、発展途上国では世界保健機関（WHO）の簡便な診断法が用いられています。

治療の方法

治療はWHOの推奨する多剤併用療法に準じて行われています。抗生物質（リファンピシン、DDS、クロファジミン）を内服します。

ハンセン病は治る病気ですが、早期診断、早期治療、確実な内服を心がけ、後遺症を残さず耐性菌をつくらないようにすることが大切です。らい菌が多い（多菌型）患者さんは1、数年間、らい菌の少ない（少菌型）患者さんは6カ月間の内服で治ります。

病気に気づいたらどうする

皮膚科で診察を受けてください。診察はまず問診と出身地、出身国、小児期の居住地、家族歴、気づいたきっかけを

やけがの既往など）を行い、その後、皮膚症状、神経の所見、らい菌の証明、病理組織学的検査などを行います。

ハンセン病の歴史

有効な治療薬がない時代には、病状が進み、顔面、手足などに皮疹および末梢神経障害などを形成しました。そのため、外見上の問題と手足の不自由による就労の困難などから、住民から疎外され、宗教上も差別され、法律でも隔離などの対策がとられました。

さらに日本では、有効な治療薬の出現後も1996年まで「らい予防法」が存在し、偏見・差別、人権無視の長い歴史が続きました。

帯状疱疹

どんな感染症か

体の左右どちらかの片側に、帯のように水ぶくれ（水疱）の集まりができる疹を伴う病気で、水痘・帯状疱疹ウイルスの感染によるものです。

● 皮膚の痛み, 知覚異常

skin pain, and disorders of sensory nerve

□ 概念・分類・診断

皮膚感覚のなかで患者の愁訴として多いものはかゆみである。そのほか痛み, 知覚異常(おもに触覚, 痛覚, 温覚, 冷覚などの低下)など

がある。

分類・診断

◆皮膚の痛み◆

まず痛みを伴う疾患については, 帯状疱疹,

表1 痛みを伴う皮膚疾患の鑑別

疾患名	痛みの程度	痛みの種類	痒 痒	皮 疹	原 因	好発患者
帯状疱疹	中～高度	灼熱感, 疼痛	なし	水疱が帯状に集簇	水痘・帯状疱疹ウイルス	成人～老人
丹毒 毒蛾皮膚炎	中程度 中程度	圧痛 ピリピリする痛み	なし あり	浮腫性紅斑 紅色小丘疹の集簇	化膿連鎖球菌 毒蛾の毒毛	中高年 全年齢
医動物刺咬症	中～高度	激痛	なし	紅斑, 蕁麻疹	クラゲ, ハチ, アリ, クモ, ムカデなど	海水浴客など
線状皮膚炎	中程度	灼熱感, 疼痛	なし	線状の発赤と腫脹	アオバアリガタハネカクシの体液	全年齢
顎口虫病	軽度	圧痛, 自発痛	あり	遊走性限局性蕁麻疹様紅斑	有棘顎口虫	生食愛好家
熱傷 放射線皮膚炎	種々 種々	種々 種々	なし なし	紅斑, びらん, 潰瘍 紅斑, びらん, 潰瘍	種々 種々	全年齢 放射線治療者
アフタ Raynaud 症候群	中～高度 高度	疼痛 疼痛	なし なし	口腔粘膜の潰瘍 指趾の白紫紅色変化	種々 種々	女性に多い 女性に多い
結節性紅斑 Sweet 病	中程度 種々	圧痛, 自発痛 自発痛, 圧痛	なし なし	潮紅を伴う皮下結節 滲出性紅斑	多病因性 種々	女性に多い 中年女性に多い
痛風 Buerger 病 Osler 結節	高度 高度 中程度	激痛 反復性疼痛 疼痛	なし なし なし	関節腫脹 患肢末端壊死 紅斑	高尿酸 閉塞性血管炎 亜急性細菌性心内膜炎	中年男性 中年男性 成人
Mondor 病 皮膚紅痛症	軽度 種々	牽引痛 灼熱痛, 触痛	なし なし	索状皮下硬結 潮紅腫脹	血管炎 血行障害など	女性に多い 成人

表2 知覚異常を伴う皮膚疾患の鑑別

疾患名	皮疹	触覚	痛覚	温覚	冷覚	瘙癢	好発年齢
Hansen病(少菌型： I, TT, BT)	環状の紅斑など	低下	低下	低下	低下	なし	成人～老人
Hansen病(多菌型： LL, BL, BB, BT)	紅斑局面など多彩	やや低下	やや低下	やや低下	やや低下	なし	成人～老人
皮膚結核	種々	正常	正常	正常	正常	なし	中年～老人
梅毒	種々	正常	正常	正常	正常	なし	青年～成人
糖尿病による皮疹	種々	低下	低下	低下	低下	なし	成人～老人
尋常性白斑	境界鮮明な白斑	正常	正常	正常	正常	なし	全年齢
サルコイドーシス	種々	正常	正常	正常	正常	なし	成人～老人

丹毒、毒蛾皮膚炎、熱傷、結節性紅斑などがある。多くの場合は、皮疹の状態や既往歴、問診などから容易に診断できる。痛みの種類には、刺痛、灼熱痛、疼痛の3種が区別される。刺痛は針で刺すような痛みで、刺激が加わるとただちに感じるため fast pain と呼ばれるが、刺激を取り除くとただちに感じなくなる。灼熱痛は痛みを感じるまでに時間を要する slow pain で、刺激を取り除いても数秒間は残る。疼痛は身体の深部などがズキズキしたり、うずく痛みで、痛い場所を決めかねることもあり、また関連痛を伴うこともある。刺痛は A δ 線維に、灼熱痛は無髄の C 線維に属する線維によるとされている。皮膚の痛みのおもなものを表1に示した。

◆知覚異常◆

知覚神経終末は触覚、痛覚、温覚、冷覚を感じ、知覚神経→脊髄→脳幹→視床→大脳皮質へと伝わる。

皮疹を伴う知覚低下はまれで、表2に示した。触覚検査はしばしば圧痛覚と混同するので、綿球を少しばらして数本の綿にしたもの、または柔らかい筆の先などで軽くなでる。閉眼させ皮疹部と、反対側の正常部を交互に軽く触知し、

正常(たとえば10として)に比較して、どの程度低下しているかを数値で患者に答えさせる(5, 0などと)。

痛覚低下の検査は針の先で軽くはねるか突いて調べる。つよすぎると圧覚と混同する場合がある。所見は触覚と同様に記載する。

② 治療・看護の指針

痛みの治療

治療は原因を取り除くことである。帯状疱疹の疼痛について述べると、発症初期には抗ウイルス剤と鎮痛剤の内服を行う。また温めたり(温浴など)、気分転換をはかると痛みは緩和する。

知覚低下の治療

知覚低下があると、外傷や熱傷などがあっても気づかず、治療も遅れがちで、その場合には変形が残ったり切断することもある。とくに足部では注意が必要で、患者には毎日足底を眼で見、手で触って異物や外傷の有無を検査するよう指導する。また疾患治癒後にも知覚低下は改善しないことが多いので、引き続き外傷に注意させる。(石井 則久)

4. 結核・ハンセン病

結核は、20世紀最大の脅威であった細菌感染症であり、ハンセン病は末梢神経障害に伴う著しい変形のため、長い間差別と偏見の対象となってきた疾患である。結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染により、ハンセン病はらい菌 (*Mycobacterium leprae*) の感染により発症する。結核菌もらい菌も共に抗酸菌に分類される。抗酸菌は、現在では100種類以上が知られ、これらのなかにはヒトに病気を発症させる病原性抗酸菌と、ヒトに対しては病気を誘導しない非病原性抗酸菌が存在する。

結核菌も、らい菌も代表的な病原性菌である。両者は一旦感染するとヒトの体内に長く宿り、たとえ病気を発症させなくても潜伏感染する特徴をもっている。多くの場合、マクロファージなどの細胞内に寄生虫のように潜んでいるため、細胞内寄生菌ともよばれている。このことが、結核およびハンセン病を理解するうえで重要である。

1) 結核

(1) 概要

全世界のおよそ3分の1の人が結核菌に感染している。結核の発病率は、結核菌感染者の約10%であり、初回感染者は感染後2年以内であることが多い。感染しても発病しない、いわゆる潜伏感染時には、結核菌はマクロファージなど抗原提示細胞内に留まっている。

結核菌に対する生体防御反応は、インターフェロンガンマー (IFN- γ) を産生するCD4陽性T細胞およびキラー活性を獲得したCD8陽性T細胞などの細胞性免疫が中心となって営まれている。結核菌はヒトからヒトへ感染し、主に咳やくしゃみによる飛沫感染による。結核菌は、大きさ数ミクロンの桿状の菌であり、酸・アルカリ・乾燥に対し抵抗性である。

結核の確定診断は、患者体内から結核菌を同定することであり、喀痰の塗抹検査あるいは培養検査を行うか、菌の核酸 (DNA) を抽出し、核酸増幅法 (PCR)

で検索して菌を証明する。結核菌が酸に対して抵抗性であることを利用して、抗酸菌染色（Ziehl-Neelsen 染色）を行う。結核は全身病であるが、肺を主病巣とする肺結核がもっとも多く、2週間以上続く咳・痰・発熱あるいは胸痛・血痰が観察される場合は、結核を疑う必要性が高い。

結核に対する治療は、発病初期に4剤（イソニコチン酸ヒドラジド[INH]、リファンピシン[RFP]、ピラジナミド[PZA]とストレプトマイシン[SM]またはエタンブトール[EB]）を用いて徹底的に行うことが大切である。現在では、薬剤に対して抵抗性を示す薬剤耐性菌が出現していて、臨床上大きな問題となっている。結核に対するワクチンは、BCGが長い間用いられてきたが、高齢者に対しては無効であることが多く、新しい抗結核ワクチンの開発が強く求められている。

（2）結核菌と感染経路

結核菌は、長さ1～4ミクロン、幅0.3～0.6ミクロンの桿菌である。その表面は脂質に富んで、他の菌種にはみられない厚い外壁により覆われている。そのため粘着性が高く、いくつもの菌が房状に寄り集まることが多い。酸・アルカリ・乾燥に強い反面、紫外線・熱に弱い性質がある。

結核菌の感染は、ほぼ100%気道を介した吸入感染である。排菌者の咳・くしゃみ・痰に結核菌が含まれていると周囲の人に容易に感染する。空气中に放出された結核菌はその周囲の粘液性水分を急速に失い、非常に軽くなって長時間空气中に漂っているためである。

換気が悪い場所、あるいはオフィスなど気密度が高い所では、多数の人間に感染させ、集団感染をもたらす原因となる。結核は全身症であって、腎臓・関節・骨・腹膜などにも病変をもたらすが、これらの患者は空气中に結核菌を放出する可能性は低く、結核菌の感染源の大部分は肺結核患者である。

（3）疫学

全世界人口の約3分の1が結核菌に感染していて、毎年800万人が発病、200万人が死亡している。とくに、発展途上国は濃厚流行国でもある。結核死亡の99%は、アフリカ・中南米・東南アジアの人々である。

発病は、感染後2年以内が多く、結核菌に感染しても健常者の多くは発病しないで生涯を経過する（不顕性感染）。感染後に明らかな結核を発病するのは生涯を通じて約10%で、これに初感染結核など軽症の自然治癒する病気を加えても発症するリスクは最大30%である。

不顕性感染した人では、免疫が作動して結核菌の体内拡散を防いでいる。この免疫反応は生体防御反応とよばれ、細胞性免疫すなわちIFN- γ を産生するCD4陽性T細胞、あるいはIFN- γ を産生すると同時に病原体に感染した細胞を殺滅することができるCD8陽性T細胞、または活性化したマクロファージが重要な働きをしている。

結核菌は一旦感染すると、多くはマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞

などのなかに寄生虫のように長時間留まる。そのため、抗菌的に働いている細胞性免疫が何らかの要因で低下すると、結核菌の活動性は急速に高まり結核が発症する。

乳幼児期では、免疫力が十分備わっていないため、その発病率は成人に比べ著しく高い。また、免疫力の低下を伴う疾患、たとえばHIV-1感染・糖尿病・悪性腫瘍・慢性腎不全を患う患者、免疫力が低下した高齢者・低栄養状態者では発病率が増加する。抗がん剤・免疫抑制剤・副腎皮質ホルモンによる治療を受けている患者でも同様に発病率が高い。とくに、HIV-1と結核菌が重複感染した場合は重篤な病変が観察され、現在50万人以上が死亡している。

(4) 結核の診断

結核に特異的な症状はなく、とくに肺結核の初期は無症状であるともいわれる。しかし、肺結核の80%は自覚症状の出現により発見される。咳・痰・発熱または寝汗・血痰・胸痛・体重減少の6症状のいずれかが2週間以上続く場合は肺結核を疑わなければならない。咳はもっとも多い症状であるが、咳によって結核菌の感染が広がるので、2次感染を防ぐためにも、咳が2週間以上続く場合は早期受診を勧めたい。

結核の確定診断は、結核菌が生体内に存在することを証明することである。その方法として、①喀痰塗抹検査、②喀痰培養法、③DNA検査などがある。

喀痰塗抹検査では、患者から採取された喀痰から塗抹標本を作製してZiehl-Neelsen染色または蛍光染色をした後、顕微鏡で観察する。通常30視野を観察して、明らかな桿菌のみを陽性として判定する。陽性と判定された菌が一定の視野中に何個あるかによってガフキーの号数*を決める。採取された喀痰の検査で、結核菌が1個でも認められる場合には、喀痰1 ml中に結核菌が7,000個以上存在することを示している。こうした状態では、すでに肺のなかには空洞が形成され感染源となり得るため、2次感染を防ぐ意味でも直ちに入院治療を行うことが重要である。喀痰中の結核菌が数千個以下の場合には、喀痰培養を行わないと結核菌の同定はできない。

小川培地を用いた培養が通常行われるが、結核菌は増殖が遅いため、診断を確定するためには4～8週間が必要となる。感度を高いまま維持し、結核菌検出までの時間を短縮する目的で開発されたのがMGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 法である。約2.5週間で菌の検出が可能となった。また、結核菌の核酸(DNAなど)を抽出し人工的に増幅して、結核菌固有の塩基配列が存在すること(結核菌陽性)を証明するPCR法も開発されている。DNAを用いた方法は、薬剤耐性菌の検出、結核菌の感染経路を分子疫学的に追跡する際に有効なRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 分析にも応用できる。

結核の補助診断として有効な検査法が、胸部X線写真・胸部CT検査などの画像診断法とツベルクリン反応検査である。肺結核では肺尖部や上肺野が好発部位であるが、特定の陰影はなく種々の陰影を呈するため、異常影を認めた時は菌検査あるいは肺生検など病理学的検査を勧めたい。

ガフキーの号数 Gaffky table
ガフキーの号数とは、Gaffkyによって提唱された、喀痰の塗抹染色標本中の結核菌の量を示した数字である。菌数の少ない方から多い方へ1号～10号に分けられている。標本中の菌数は、材料の採取部位や塗抹の厚薄により変動するので、最近では段階の簡便な記載法に変わって居る。

ツベルクリン反応は、生体内に結核菌に反応するメモリーT細胞が存在するかを検索する方法である。ツベルクリンは、液体培地で数週間培養した結核菌を加熱・濾過^ろ処理したものである。ツベルクリン反応陽性とは、結核と同じ病原性をもつものが過去に生体内に入り、T細胞によって認識された経歴があることを示している。従って、「陽性」イコール「結核菌の感染あり」ということはできない。弱毒化牛型結核菌であるBCG接種者も陽性を示すことが多い。

(5) 結核の治療と予防

「不治の病」といわれた結核も、早期発見・早期治療の原則が守られれば6カ月で治る病気となっている。厚生労働省で認可されている薬剤は10種類以上を数えている。

基本的な治療法は、初期2カ月の強化療法とこれに続く4カ月の継続期治療の6カ月間治療である。強化療法とは、4剤（106頁参照）の併用療法であり、菌量を減少させることを目的としている。4カ月間の継続療法は、2～3剤（INH、RFPとEB）の併用療法である。日本では、1996（平成8）年厚生省の「結核治療基準」によって適用された。菌量の早期減少を図るとともに、耐性菌の出現を防ぐことを念頭において確定された治療法であるが、近年では耐性菌の数が次第に増加しており大きな問題となっている。複数の薬剤を長期服用するため、副作用の出現にも十分留意する必要がある。

予防法は、未だに確立されていない。ワクチンとしてBCGが使われてきたが、小児または青年成人の発症を防ぐうえでは有効であるが、高齢者など免疫機能が低下した人々に対しては無効である。BCGに代わる新しいワクチンの開発が切望されている。

排菌者と接触し、ツベルクリン反応検査から感染が強く疑われる場合には、「化学予防法」としてINH単剤を朝1回6カ月間の服用が有効である。

2) ハンセン病

(1) 概要

ハンセン病は、皮膚および末梢神経が主に侵される慢性感染症である。らい菌感染により発症するが、らい菌は末梢神経障害をもたらす唯一の抗酸菌である。病変部位に存在するらい菌の数により少菌型と多菌型に分類される。らい菌に対する生体防御反応（細胞性免疫が中心）の強弱によりその病型が決定され、細胞性免疫が働かない多菌型では、全身・左右対称性に病変が出現する。多菌型では、らい菌に特異的である抗PGL-I（Phenolicglycolipid-I）抗体の検出が補助診断法として有効である。

WHOによる多剤併用療法が有効であり、近年では新規発症患者数も徐々に低下していて、日本国内での発症例は毎年20以下である。ハンセン病に対する有効なワクチンは存在せず、多剤耐性を示すらい菌も徐々に増加している。今後の課題が多い疾患である。

(2) らい菌と感染経路

らい菌は、長さ2ミクロン、幅0.3ミクロンの桿菌^{かん}であり、結核菌と同じ抗酸菌に分類される。抗酸菌を増殖のスピードから分類すると発育の早い菌と遅い遅発菌に分類されるが、らい菌はすべての細菌のなかでもっとも増殖が遅く、1回の分裂に約12日を要する（ちなみに大腸菌は20分）。らい菌を試験管のなかで人工的に増やすことはできず、アルマジロやヌードマウスを用いなければならない。らい菌の細胞壁は、結核菌と同様きわめて厚く脂質に富んだ構造をしている。このなかにらい菌に特異的な抗原であるPGL-Iが存在し、抗PGL-I抗体はハンセン病の血清診断に利用される。しかし、少菌型患者では、抗PGL-I抗体陰性の例が多い。

感染は鼻粘膜を介した飛沫感染である。従来損傷部位を介した経皮感染も考えられたが、感染には多数の菌が必要なため現在では否定的である。ヒトからヒトへの感染は、濃厚流行国の排菌患者周辺のみで起こる。

(3) 疫学

ハンセン病の濃厚流行国は、東南アジア・南米・アフリカである。1982-50（昭和57）年、WHOはハンセン病の制圧を目指し、3薬剤を同時に服用する多剤併用療法を開始した。本療法はきわめて有効であり、現在では登録患者数は44万人に、新規患者数は年間50万人にまで激減した。WHOはハンセン病の制圧を人口10万人対1以下と定義したが、現在このレベルに到達していないのは、ブラジル・インドなど数カ国のみである。しかし、濃厚流行国では、国全体としては制圧はされているものの、スポットとよばれる地域で未だに新規患者が多数発生している。

らい菌に対する生体防御反応は、結核と同じ細胞性免疫が主体であるが、結核とは異なりHIV-1感染者・高齢者など免疫状態が低下した患者に感染しても急性増悪することはない。HIV-1とらい菌の重複感染も臨床上問題とはならない。

(4) 臨床

らい菌は、マクロファージ・末梢神経のシュワン細胞および血管内皮細胞に主に感染する。そのためハンセン病は皮膚および末梢神経が主な病変部位となる。少菌型では、1個ないし少数の皮疹が左右非対称性に出現する。一方、多菌型では自覚症状は少なく、神経症状も徐々^{じゆじゆ}に出現する。多彩な皮疹が多数左右対称性に出現する。

ハンセン病の診断は、皮疹・らい菌の検出・末梢神経の肥厚・末梢神経の機能障害・病理組織学的検査・抗PGL-I抗体を用いた血清診断法が有効である。皮膚の病変部位をメスの刃で小さく切開し、組織液を取り、塗抹標本作製する。Ziehl-Neelsen染色法で菌を同定する。菌が少数のみ存在し病理学的に同定しにくい場合は、病変部位を生検して組織を採取し、その組織よりDNAを抽出し、PCR法で診断する。この方法は感度のうえで優れている。病理学的検査では、少菌型は類上皮細胞性肉芽腫が観察されるが、多菌型では肉芽腫は形成されにくく、

泡沫状のマクロファージとらい菌が観察される。

末梢神経症状としては、皮疹に一致した知覚障害，とくに表在性感覚の低下が認められる。また，発汗障害・血管運動障害など自律神経系の異常を伴いやすい。これら末梢神経障害および皮疹の出現をみた場合，ハンセン病を疑って菌の検索を勧めたい。

治療は，抗菌活性の強い3剤（ダブソン[DDS]，クロファジミン[CLF：B663]，リファンピシン[RFP]）を同時に使用する多剤併用療法が基本である。ハンセン病に対する有効なワクチンは存在しない。

ハンセン病の治療中に突然“らい反応”とよばれる急性増悪がしばしば観察される。タイプ1とタイプ2の2型に分類され，タイプ1反応はらい菌抗原に対する強いアレルギー反応であり，タイプ2反応は免疫複合体が関与する。いずれも免疫抑制剤が有効である。

3) 結核・ハンセン病の撲滅

結核およびハンセン病は古くから知られる慢性感染症である。ともに細胞内に寄生性に感染する病原体により発症するため，その撲滅はきわめて難しい。耐性菌が出現し，その数が増加する傾向にある現在，有効なワクチンの開発が，両疾患に共通する最大の課題である。

Comparative Studies of the Cell Structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* Using the Electron Microscopy Freeze-Substitution Technique

Akemi Takade^{*1}, Akiko Umeda², Masanori Matsuoka³, Shin-ichi Yoshida¹, Masahiro Nakamura^{4,†}, and Kazunobu Amako¹

¹Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Fukuoka 812–8582, Japan, ²Department of Health Science, School of Medicine, Yamaguchi University, Ube, Yamaguchi 755–8554, Japan, ³National Institute of Infectious Diseases, Leprosy Research Center, Higashimurayama, Tokyo 189–0002, Japan, and ⁴Kurume University, School of Medicine, Kurume, Fukuoka 830–0011, Japan

Received July 25, 2002; in revised form, January 16, 2003. Accepted January 22, 2003

Abstract: The cell envelope and cytoplasmic architecture of the *Mycobacterium leprae* Thai-53 strain were examined using the freeze-substitution technique of electron microscopy and compared with those of the *M. tuberculosis* H37Rv strain. Both strains had similarly multilayered envelope architectures composed of an electron-translucent layer, a peptidoglycan layer and the plasma membrane, from outside to inside. A comparison of the structures of these two mycobacteria revealed that the *M. leprae* cell was smaller in size and had a thinner peptidoglycan layer than the *M. tuberculosis* cell. The cell widths measured on electron micrographs were 0.44 μm for *M. tuberculosis* and 0.38 μm for *M. leprae*. The peptidoglycan layer of *M. leprae* was 4–5 nm, while the corresponding layer of *M. tuberculosis* was 10–15 nm.

Key words: *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, Electron microscopy, Freeze-substitution, Cell wall

Mycobacterium leprae is one of the important pathogens in the genus *Mycobacteria*, in which multitudinous species, many of which are also pathogenic, are listed. In contrast to other pathogens of this genus, *M. leprae* is unique because of its uncultivable nature on artificial culture media. After the discovery of this bacterium in 1878, many attempts to culture it *in vitro* have been made over the years, but no successful results have yet been reported.

Using *M. leprae* Thai-53 strain cells harvested from nude mouse footpads, Nakamura and Matsuoka (13) reported that the ATP level and cell number slightly increased when cultured on artificial culture media, suggesting the *in vitro* growth of this bacteria and that continuous growth in fresh media could not be successfully attained. Electron microscopy of *M. leprae* cells in thin

sections prepared from infected mouse or skin lesions of leprosy patients revealed that most cells appeared to be in a degenerative state (9, 16). The results of whole genomic DNA sequence analyses showed the defect of a number of genes as compared to *M. tuberculosis* genomic DNA (4). From this viewpoint, one cannot exclude the possibility that the cell envelope morphology of *M. leprae* is different from that of *M. tuberculosis*. However, the difference, even if it exists, is expected to be very small. Therefore, electron microscopic examination should be carried out by a special method that can well preserve the intrinsic morphology of the bacteria.

The freeze-substitution technique has been successfully applied to the electron microscopy of many bacteria including mycobacteria (1, 5, 7, 11). Using this technique, we examined the morphologies of *M. leprae* and *M. tuberculosis* in special reference to their envelopes.

*Address correspondence to Dr. Akemi Takade, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, 3–1–1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812–8582, Japan. Fax: 092–642–6133. E-mail: takade@bact.med.kyushu-u.ac.jp

† Deceased on 9 February 2002.

Abbreviations: ETL, electron-translucent layer; OL, electron-dense outer layer; PBS, phosphate-buffered saline; PG, peptidoglycan layer.

Materials and Methods

Bacterial strains. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and *M. leprae* Thai-53 were used throughout the study. *M. tuberculosis* H37Rv was maintained and cultured at 37 C in an Ogawa egg yolk medium (1% KH₂PO₄, Eiken Kagaku, Tokyo). *M. leprae* Thai-55 was grown in the footpads of nude mice.

Electron microscopy. *M. tuberculosis* cells were collected from the medium surface (three-week culturing) by scraping off the colonies with a wire loop, and then they were suspended in 0.2 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). After centrifugation at 1,500×*g* for 15 min, the pellet was subjected to freeze fixation for electron microscopy.

M. leprae cells were collected from two footpads as previously described by Nakamura and Matsuoka (14). Briefly, approximately 10⁶ cells/ml were inoculated in both footpads of nude mice, and 13 months later the infected mice were sacrificed. The footpads (two from each mouse) were minced with scissors and then homogenized in a glass homogenizer with sterile 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0). After removing the coarse tissue debris by low-speed centrifugation (10×*g*, for 20 sec), the suspension was centrifuged at 2,500×*g* for 30 min, and the pellet was used for morphological examinations.

The method for freeze-substitution fixation was essentially the same as that described previously (1, 22). The bacterial pellet was mixed with a small amount of melted 3% noble agar (48 C) and spread on a clean slide glass after mixing. After solidification on the glass slide, the agar layer containing bacterial cells was cut into small blocks (2–3 mm cubic) and then applied to the end of a plunger of a freezing device, model KF-80, Reichert-Jung Optische Werk (Austria), to undergo impact freezing at liquid nitrogen temperature (−196 C). Substitution fixation was carried out in acetone containing 0.5% OsO₄ at −80 C for more than 20 hr. After raising the temperature gradually to room temperature, the specimens were then dehydrated in a series of graded acetone and embedded in an Epon mixture of Spurr. Thin sections were cut with a diamond knife set on a Sorval Ultramicrotome MT2 (Ivan Sorval), stained doubly with uranyl acetate and lead citrate solutions, and then examined in an electron microscope, JEM 2000EX, JEOL at 100 kV.

Measurement of cell size. The width of the bacterial cell was measured on electron micrographs taken at a magnification of 30,000 to 50,000× with an ordinary millimeter-scale ruler. Since the cell width was not constant along its length, we measured the maximum and minimum width of each cell image and determined the

Table 1. Measurement of the cell size of *M. leprae* and *M. tuberculosis* on electron micrographs

	No. of cells measured	Cell width (μm)	
		Maximum/minimum	Average
<i>M. leprae</i>	11	0.44/0.30	0.38
<i>M. tuberculosis</i>	10	0.53/0.35	0.44

average cell width. To measure the exact width, we selected thin sectioned cells where the cell walls show a distinct layered structure, because such structures show that the cells were cut perpendicularly.

Results and Discussion

The cell size (width) was measured on 10 and 11 different cell profiles of *M. leprae* and *M. tuberculosis*, respectively. As shown in Table 1, the width of *M. tuberculosis* cells was 0.44 μm, while that of *M. leprae* cells was 0.38 μm. The width of *M. leprae* cells was 86% that of *M. tuberculosis* cells.

Examination using the freeze-substitution method revealed different cell architectures for mycobacteria (15) than those obtained by the conventional chemical fixation technique (6, 10, 19, 21). For example, it has been reported that mycobacterial cells had well-dispersed nucleoid, ribosomes, and highly condensed plasma membrane tightly apposed to the peptidoglycan layer when prepared by freeze-substitution methods (15). Thin sectioned profiles of whole bacterial cells of *M. tuberculosis* and *M. leprae* are presented in Fig. 1, A and B, respectively. The cytoplasm was characterized by the presence of widely distributed, clearly identifiable ribosome particles. The nucleoid was not concentrated in the middle of the cytoplasm as has been reported in chemical fixation, but DNA fibers were widely distributed in the cytoplasm in a manner similar to that observed in other freeze-substituted bacteria (2, 8). The cell had various sizes of round electron-dense granules of polyphosphate (20).

Both species possessed a multilayered cell envelope which basically consisted of, from inner to outer layer, a plasma membrane (PM), a peptidoglycan layer (PG), an electron-translucent layer (ETL) and an irregular electron-dense outer layer (OL) (Fig. 2) as demonstrated in other mycobacteria by Paul and Beveridge (15) using the same technique.

When aldehyde fixatives were used, mycobacterial plasma membrane (PM) showed a wavy bilayered structure of uniform width and staining intensity (20). This feature is called the symmetrical form of PM, and it is thought to be due to the effect of aldehyde fixation. The freeze-substitution method, however, revealed that

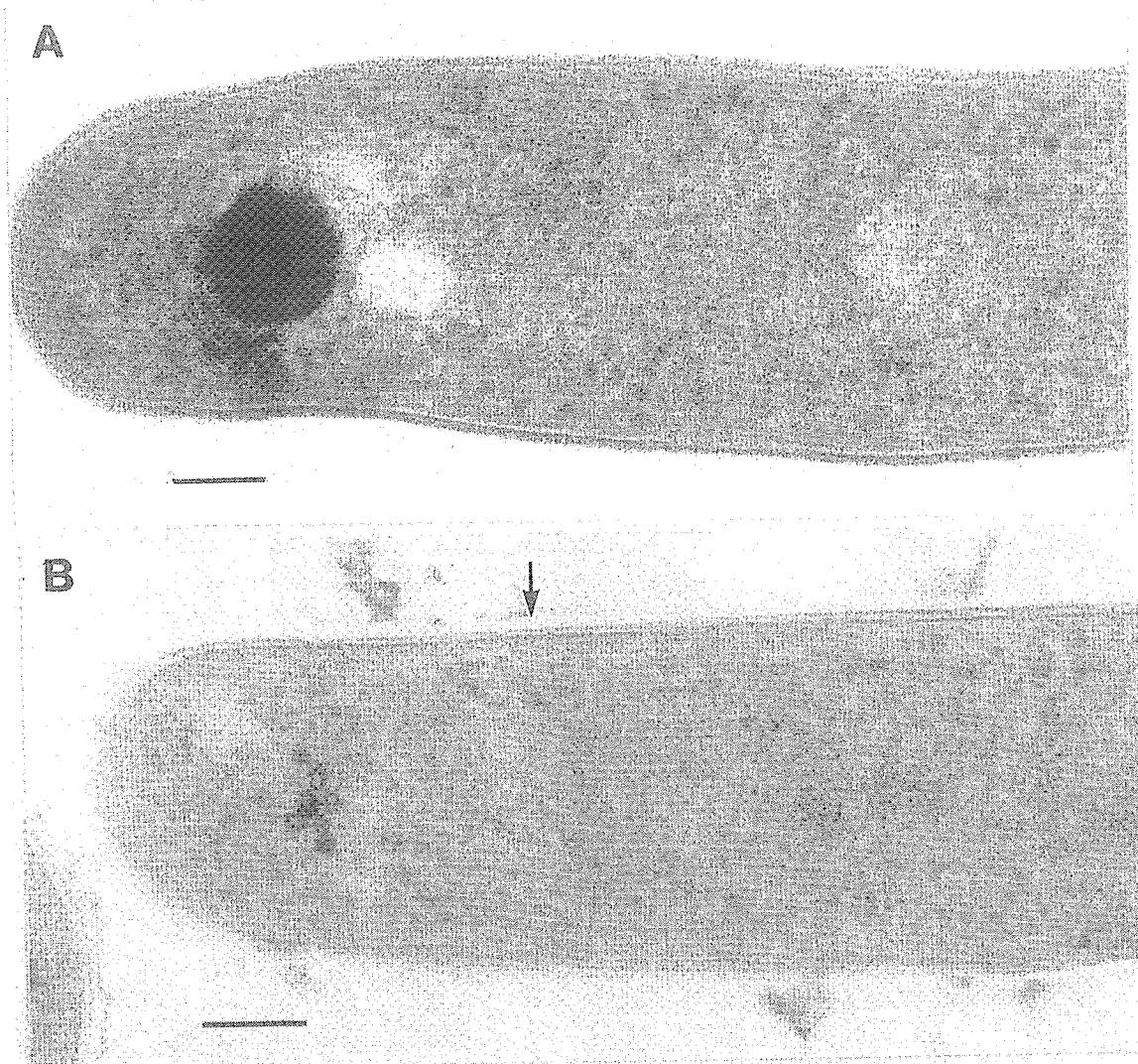


Fig. 1. Thin sectioned electron micrographs of *M. tuberculosis* strain H37Rv (A) and *M. leprae* Thai-53 isolated from the footpad of a nude mouse (B). The arrowhead in (B) indicates the electron-translucent layer (ETL). Scale bar is 100 nm.

mycobacterial PM is composed of a thicker outer leaflet and a thinner inner leaflet. This form is called the asymmetrical form of PM, and it is thought that normal live cells have asymmetrical PM. When cell degeneration starts, PM changes from asymmetrical (normal) to symmetrical (typical of lysed cells) form (18). In our study, PM was observed to be a smooth, asymmetrically stained structure closely associated with the PG layer, with a narrow constant space between them (Fig. 2). The outer leaflet of PM possessed more heavy-metal stains than the inner leaflet, which is difficult to observe. This feature of the PM was in sharp contrast to the images obtained by the conventional chemical fixation method, which showed all PMs to be a typically wavy bilayered structure of uniform width and staining intensity (20). However, our results also show that a few *M. leprae* cells possess a symmetrically stained PM among normal cells with

asymmetrically stained PM (Fig. 3). In such cells, the space between the PM and the PG layer increased, thus suggesting that such cells might be in a degenerating stage, and therefore unlike normal cell structures, as discussed by Silva (18).

PG was observed as an electron-dense layer associated with the PM (Fig. 2). The width of the PG of *M. leprae* was measured to be approximately 4–5 nm, whereas the corresponding layer of *M. tuberculosis* was 10–15 nm. Hence, *M. tuberculosis* seemed to possess a thicker PG layer than *M. leprae*. However, the thickness of the PG layer of *M. tuberculosis* varied from cell to cell (Fig. 2, A and B). In some cells, the thick PG layer of *M. tuberculosis* exhibited a bilayered profile (Fig. 2B). The chemical model for the mycobacterial cell envelope delineated by Rastogi (17) suggested the presence of an arabinogalactan layer on the PG. This compound is

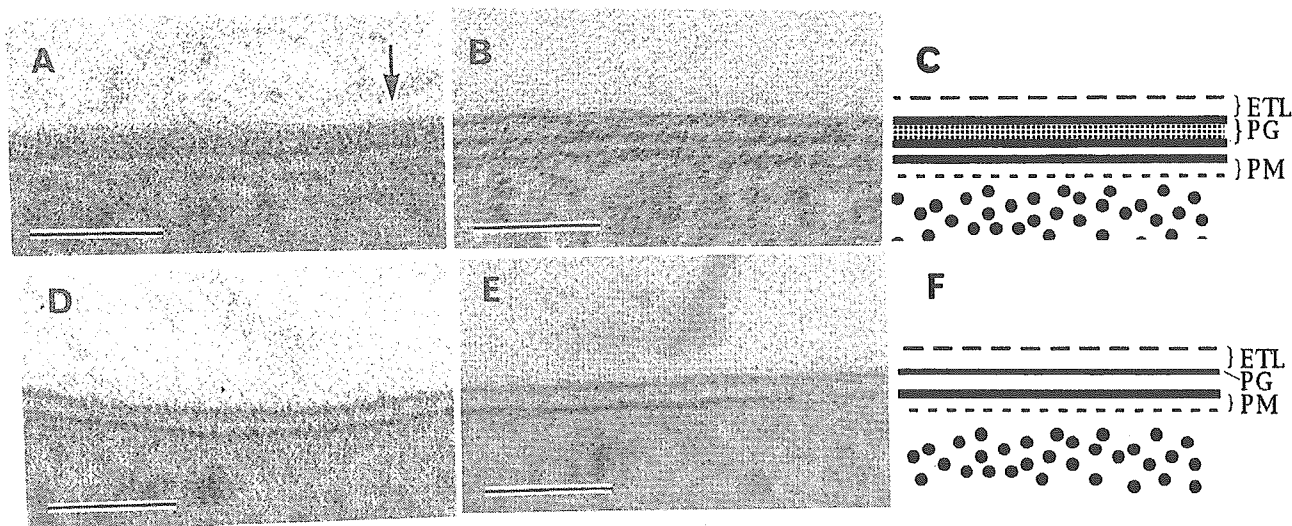


Fig. 2. Cell envelopes of *M. tuberculosis* (A and B) and *M. leprae* (D and E) at higher magnification. *M. tuberculosis* has a thicker peptidoglycan (PG) layer than *M. leprae*. The PG layer frequently exhibited a bilayered structure in *M. tuberculosis* (A and B) but not in *M. leprae* (D and E). The plasma membranes (PM) of most cells were seen as an asymmetrical layer. The ETL was seen between an irregular electron-dense outer layer and the PG layer. The difference in cell envelope structure between *M. tuberculosis* (C) and *M. leprae* (F) is shown in schematic figures. Scale bar is 50 nm.

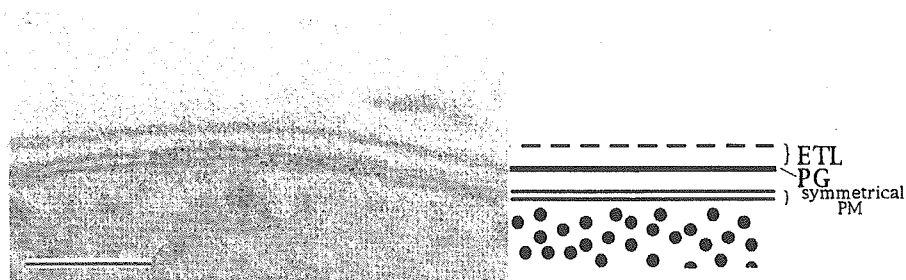


Fig. 3. A symmetrical plasma membrane observed in *M. leprae* cells. Scale bar is 50 nm.

supposed to be rich in the cell wall of *M. tuberculosis* and to be responsible for the thick cell wall image of this bacterium. *M. leprae* cell, on the other hand, may have lost or have smaller amounts of this wall component.

ETL was seen as an electron-translucent layer measuring 5 to 10 nm in thickness outside the PG layer (Figs. 1B and 2A, arrows). However, the presence of ETL was not conspicuous in every cell profile. OL, which is located outside the ETL, was thus not readily visualized in these bacteria by this method. Only in some sections of *M. leprae* cells could OL be visualized on a portion of the cell envelope outside of the ETL.

Cell division septa were clearly found in both *M. tuberculosis* and *M. leprae* cells. The architectures of the division septa were similar in both species (Fig. 4, A and B). PG layer tangentially intruded into the cytoplasm and formed a septal wall together with the PM. The presence of an electron translucent space between two septal walls indicated the presence of some layer, possibly corresponding to the ETL, on the PG layer.

A chemical analysis of the cell fractions and morphological examinations of the mycobacteria have provided information on the fundamental features of the cell wall (3, 10, 12, 15). The cell wall of mycobacteria is composed of three covalently associated macromolecules, such as peptidoglycan, arabinogalactan and mycolic acid. The relationship between these macromolecules and the morphological features of thin sectioned cells obtained by the chemical fixation method have also been elucidated (17). The chemical model showed the layered structures of the cell wall from inside the cell to the outer surface: plasma membrane, peptidoglycan, arabinogalactan and mycolic acid or glycolipids. A morphological model showed a three-layered structure for the cell wall (15). The layers included a PM, a PG, an ETL and an irregular electron-dense OL from inside to outside. Taking these two models into consideration, it can be assumed that the ETL corresponds to a layer consisting of mycolic acid and glycolipids.

Based on our observations obtained using the freeze-

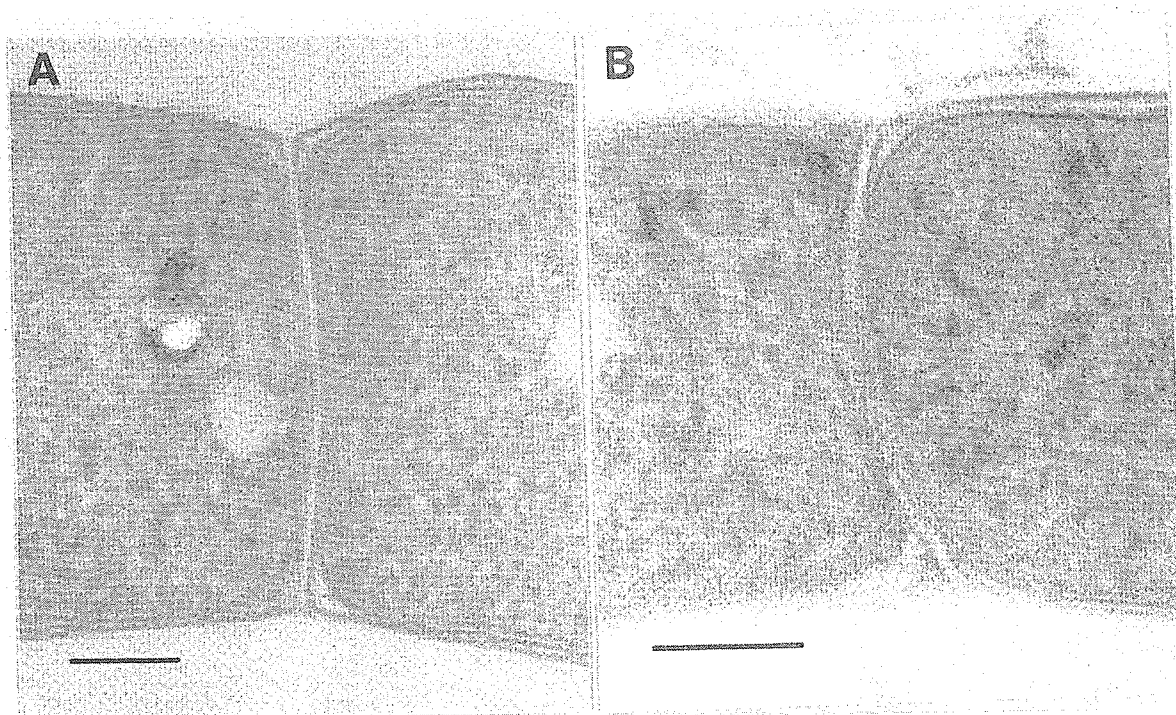


Fig. 4. Thin sectioned profiles of division septa of *M. tuberculosis* H37Rv (A) and *M. leprae* Thai-53 strain (B). The structures of the division septa were essentially the same in both species. The PG layer tangentially intruded into the cytoplasm and formed septa together with the plasma membrane. An ETL was seen between the two septal walls. Scale bar is 100 nm.

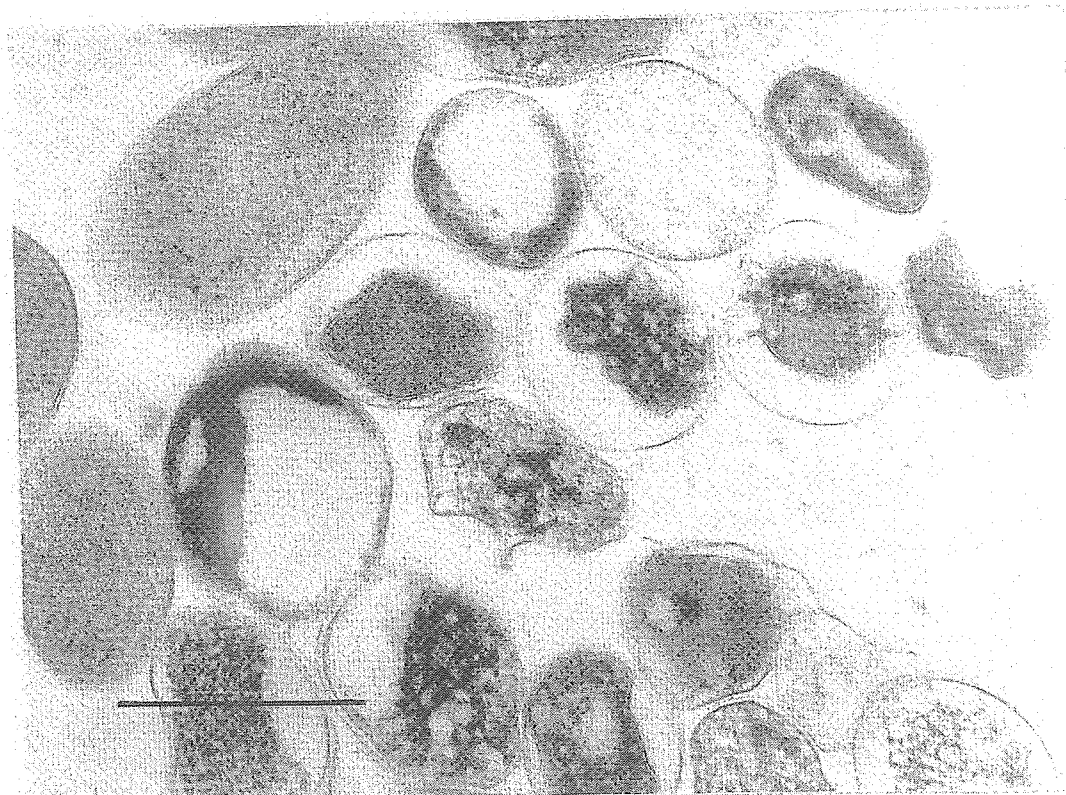


Fig. 5. *M. leprae* cells separated from a mouse footpad. The cell population consisted of numerous degraded cells and a few live cells. Note that the degraded cells still had a PG layer exhibiting its original round shape. The scale is 0.5 μ m.

substitution method, we depicted the cell wall architectures of *M. tuberculosis* and *M. leprae* schematically in Fig. 2, C and F. Major differences among these two bacteria were seen regarding the cell size and thickness of the PG layer. *M. leprae* had a smaller cell size and a thinner PG layer than *M. tuberculosis*. However, there was no evidence that the cell wall of *M. leprae* was more fragile than that of *M. tuberculosis*. The degradation of *M. leprae* cells in infected nude mice occurred with the PG layer remaining normal in appearance even after most of the intracellular materials has been lost from the cell (Fig. 5). The degradation is therefore not likely to be induced by the weakness of the cell wall in *M. leprae*, but by some other mechanisms which have yet to be elucidated.

We are grateful to Brian Quinn and Chun Chau Sze for their critical reading and comments on our manuscript.

References

- 1) Amako, K., Murata, K., and Umeda, A. 1983. Structure of the envelope of *Escherichia coli* observed by the rapid-freezing and substitution fixation method. *Microbiol. Immunol.* **27**: 95–99.
- 2) Amako, K., and Takade, A. 1985. The fine structure of *Bacillus subtilis* revealed by the rapid-freezing and substitution fixation method. *J. Electron Microsc.* **34**: 13–17.
- 3) Barksdale, L., and Kim, K.-S. 1977. *Mycobacterium*. *Bacteriol. Rev.* **42**: 217–372.
- 4) Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R., and Barrell, B.G. 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**: 1007–1011.
- 5) Graham, L.L., and Beveridge, T.J. 1990. Evaluation of freeze-substitution and conventional embedding protocols for routine electron microscopic processing of eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 2141–2149.
- 6) Hirata, T. 1978. Electron microscopic observations of cell division in *Mycobacterium leprae* by means of serial ultrathin sectioning. *Int. J. Lepr.* **46**: 160–166.
- 7) Hobot, J.A., Carlemalm, E., Villiger, W., and Kellenberger, E. 1984. Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *J. Bacteriol.* **160**: 143–152.
- 8) Hobot, J.A., Villiger, W., Escaig, J., Maeder, M., Ryter, A., and Kellenberger, E. 1985. Shape and fine structure of nucleoids observed on sections of ultrarapidly frozen and cryosubstituted bacteria. *J. Bacteriol.* **162**: 960–971.
- 9) Imaeda, T., and Convit, J. 1962. Electron microscope study of *Mycobacterium leprae* and its environment in a vesicular leprosy lesion. *J. Bacteriol.* **83**: 43–52.
- 10) Imaeda, T., Kanetsuna, F., and Galindo, B. 1968. Ultrastructure of cell wall of genus *Mycobacterium*. *J. Ultrastruct. Res.* **25**: 46–63.
- 11) Kellenberger, E. 1991. The potential of cryofixation and freeze substitution: observation and theoretical considerations. *J. Microsc.* **161**: 183–203.
- 12) McNeil, M.R., and Brennan, P.J. 1991. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res. Microbiol.* **142**: 451–463.
- 13) Nakamura, M., and Matsuoka, M. 1998. Morphological features to be considered as the growth of *Mycobacterium leprae* Thai-53 strain on a silicon coated slide in a cell-free liquid medium. *Jpn. J. Lepr.* **67**: 287–291.
- 14) Nakamura, M., and Matsuoka, M. 2000. Limited ATP generation in cells of *Mycobacterium leprae* Thai-53 strain in enriched Kirchner liquid medium containing adenosine. *Int. J. Lepr.* **69**: 13–20.
- 15) Paul, T.R., and Beveridge, T.J. 1992. Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze-substitution protocols. *J. Bacteriol.* **174**: 6508–6517.
- 16) Rastogi, N., Frehel, C., Ryter, A., and David, H.L. 1982. Comparative ultrastructure of *Mycobacterium leprae* and *M. avium* grown in experimental host. *Ann. Microbiol. (Institute Pasteur)* **133B**: 109–128.
- 17) Rastogi, N. 1991. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. *Res. Microbiol.* **142**: 464–476.
- 18) Silva, M.T. 1990. Pitfall in the ultrastructural analysis of mycobacteria, including *Mycobacterium leprae*. *Trop. Med. Parasitol.* **41**: 339–340.
- 19) Takeya, K., Koike, M., Mori, R., and Toda, T. 1961. Light and electron microscope studies of *Mycobacterium*-mycobacteriophage interactions. III. Further studies on the ultrathin sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11**: 441–447.
- 20) Toda, T., Koike, M., Hiraki, N., and Takeya, K. 1957. The intracellular structures of a mycobacterium. *J. Bacteriol.* **73**: 442–443.
- 21) Toda, T., Koike, M., and Takeya, K. 1960. Electron microscopy of ultrathin sections of mycobacterium. I. Fine structures of the cells grown *in vitro* and *in vivo*. *Proc. J. Acad.* **36**: 372–375.
- 22) Umeda, A., Ueki, Y., and Amako, K. 1987. Structure of the *Staphylococcus aureus* cell wall determined by the freeze-substitution method. *J. Bacteriol.* **169**: 2482–2487.