

# 抗酸菌の顆粒についての知見補遺

久留米大学医学部細菌学教室 (中川 洋教授)

中村 昌弘・新宮 正久

(昭和 27 年 2 月 7 日受付)

## 序

われわれの 1 人中村は抗酸菌の発育形式について研究を続行中であり、その成績<sup>1)2)</sup>を公にしてきたが、抗酸菌の発育形式を観察するに抗酸菌体内に存する顆粒がその発育に際して多くの重大な役割を演ずるとき結果を生体染色抗酸菌についてえたのである。

従つて今回はその顆粒の化学的本質をいくらかでも解明せんとして近時特に問題視されてきた核酸及び核蛋白を中心として Feulgen<sup>4)</sup>法並びに Robinow 法により検討、Robinow 法については Robinow<sup>5)</sup>、及び鶴見<sup>6)</sup>の報告を参考にして実験を行つたのでここに報告したいと思ふ。

## 実験方法並びに成績

### I 予備実験

予備実験においては、核酸の証明として用いられる Feulgen 及び Robinow 法が抗酸菌の顆粒について行つて果して妥当であるか否かを検討した。

#### (1) 第 1 予備実験

この予備実験においては Robinow 染色法が抗酸菌の顆粒染色に施して意義があるか否かをみたのである。

a) 供試菌株：教室保存のチモテ菌を用いた。

b) 実験方法：岡・片倉培地に 3 日間培養したチモテ菌を生塩水で適量の浮游液として塗抹標本を作製し、乾燥し、次の染色を施した。

- i) 1N-HCl 60°C 中で 20 分前処置
- ii) 水洗
- iii) Giemsa 染色 15 分→水洗→乾燥
- iv) 鏡検

なお、対照として標本に直ちに Giemsa 染色 15 分を施したものをを用いた。

#### o) 実験成績：

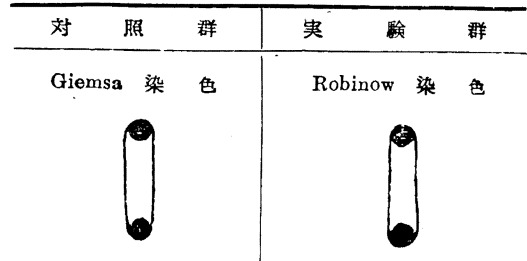
第 1 図の如く、この方法によれば Giemsa 染色そのもので抗酸菌の顆粒を染めだして、単に Giemsa 染色による顆粒と Robinow 染色法による顆粒とを区別することができない。従つて Robinow 染色法は抗酸菌の核酸染色として適当でないことになる。

#### (2) 第 2 予備実験

第 1 予備実験で Robinow 染色が不適当のことが判つたため他の核蛋白の染色として用いられている Feulgen 染色法の検討をこの予備実験では行つた。

a) 供試菌株：前実験に同じ。

第 1 図



b) 実験方法：岡・片倉培地に 3 日間培養したチモテ菌の約 2mg を約 5cc の滅菌生塩水に浮游させ、それより塗抹標本を作製し、次の 4 群に分けて 60°C に加温した 1N-HCl による前処置を行つた。

- i) I 群…1N-HCl による加水分解時間 3 分間
- ii) II 群… ” 6 分間
- iii) III 群… ” 12 分間
- iv) IV 群…対照群として HCl による加水分解を行わない。

以上 4 群ともすべて、前処置後、対照では無処置のうち、Feulgen 染色を行い、さらに後染色として Pfeiffer 液を用いて 2 分間染色を施した。

#### o) 実験成績：

第 1 表の如くである。

第 1 表

		群 I	群 II	群 III	群 IV
成 績	1N-HCl 前処置時間	3分	6分	12分	対照
	所 見	+	卅	卅	-

註：-；菌体に顆粒の全く認められない所見

＋；顆粒のうすく認められる所見

卅；顆粒はやや淡染するが境界不明瞭のもの

卅；顆粒は濃染し、境界明瞭のもの

すなわち以上の所見にみえる如く、1N-HCl による菌体の加水分解時間は 6 分間が最も適当であるという成績をえた。

#### (3) 第 3 予備実験

第 1 予備実験によつて Feulgen 顆粒の証明にもつともよき条件を決定しえたが、前実験では後染色が不適当で、顆粒と菌体との関係すなわち菌体内における顆粒の

位置が明瞭でないためにこの予備実験では後染色の検討を行った。

- a) 供試菌株：第1予備実験に同じ。  
b) 実験方法：前実験と同様にして菌塗抹標本を作製し、60°C に加温した 1N-HCl 中で6分間前処置した標本について次の染色液を用いて染色を行った。

すなわち、Neutral-rot, Löffler, Pfeiffer, Ziehl, Eosin, Malachitgreen, Brilliant green, Pierin acid, Bismark brown, 及び Congo-rot 液を用いた（ライト緑は入手できず実験に供し得なかつた）。

- c) 実験成績：  
第2表の如くである。

第 2 表

染 色 液	染色時間	染色状況
1% neutral-rot 水溶液	2分	+
Löffler 氏 液	2分	+
Pfeiffer 氏 液	2分	+
Ziehl 氏 液	30秒	+
1% Eosin 水溶液	2分	+
1% Malachitgreen 水溶液	2分	+
0.1% Brilliantgreen 水溶液	2分	+
1% Pierin acid 水溶液	2分	+
Bismark brown 原液	2分	+
1% Congo-rot 水溶液	2分	+

註：+；菌体が不明瞭にして顆粒との対比困難なるもの

++；菌体はやや明瞭に認めうるも顆粒との対比困難なるもの

+++；菌体が明瞭に認められ、しかも顆粒との対比明瞭なるもの

すなわちこの成績によればビスマルク・ブラウンによる2分間染色がもつともよく菌体と顆粒とをともに明瞭に染色しうる結果をえた。

#### (4) 第4予備実験

この実験においては生体染色により証明される顆粒が化学的に如何なる性質の成分を有しているかを検討する目的で行う実験のために生体染色により染色された顆粒の消滅の方法を検討した。

- a) 供試菌株：前実験に同じ。  
b) 実験方法：岡・片倉培地に培養したチモテー菌を適量白金耳で鈎菌し滅菌1%メチレン青液にて菌液を作製、15分間静置ののち、その液から塗抹標本を作製し乾燥・観察その所見をスケッチしたのち、その部をマークし、その標本を

- i) 1N-HCl 60°C 中に6分間浸漬する群  
ii) 3%塩酸アルコールに30秒浸漬→水洗する群  
とに分けて実験を行った。

#### c) 実験成績：

1%メチレン青液による生体染色所見は嘗て報告<sup>3)</sup>したものと同様の所見で、菌体に明瞭にメチレン青で好染する顆粒を認めえた。さてこれを消褪せしめんとして二つの方法を用いたが、前者すなわち 1N-HCl 処理では思わしき成績をえず、顆粒は完全に消褪せしめることができなかった。しかし後者の実験すなわち3%塩酸アルコールを用いての方法によれば完全にメチレン青好染顆粒を消褪することができた。

以上の予備実験の成績からして次の本実験を行ったのである。

## II 本 実 験

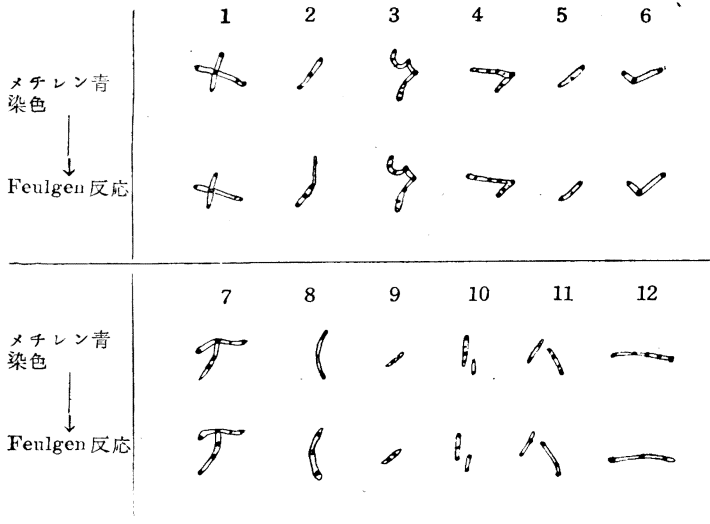
まず生体染色を行い、次に顆粒消滅処理を施して、さらに Feulgen 反応を行つて顆粒と菌体との相互の關係を見たのであるがその方法の細目は次のようなものである。

- a) 供試菌株：予備実験に同じ

#### b) 実験方法：

- i) 菌液を塗抹、自然乾燥  
ii) 1%メチレン青染色3分間——いわゆる、生体染色  
iii) 水洗  
iv) 検鏡（標本の上に水道水をおき、その上にカバーガラスをのせ、その上より油浸を使用して観察、スケッチ、部位にマークしておく）  
v) カバーガラスを除去  
vi) 3%塩酸アルコール30秒処理——メチレン青顆粒消褪  
vii) 水洗  
viii) 検鏡（顆粒消褪をたしかめる）  
ix) カバーガラスを除去  
x) 冷 1N-HCl 1分間浸漬  
xi) 60°C 1N-HCl 6分間浸漬後加水分解  
xii) 冷 1N-HCl 1分間浸漬  
xiii) 亜硫酸フクシンで2時間染色  
xiv) 水洗せずに、亜硫酸水第1液3分間洗浄  
xv)       "               第2液3分間洗浄  
xvi)       "               第3液3分間洗浄  
xvii) 水道水で3分間洗浄  
xviii) 蒸溜水で洗浄  
xix) ビスマルク・ブラウン原液、2分間後染色  
xx) 水洗・乾燥・鏡檢  
c) 実験成績：  
実験成績を図示すれば第2図の如くである。  
すなわち、メチレン青で染出された顆粒は Feulgen

第 2 図



染色を行えばデソキシリボ核酸としての性格を有するものようである。ただし、図中3及び12のようにメチレン青で染出された顆粒が菌体内に多く認められたにかかわらず、後の Feulgen 染色によつて、そのメチレン青染色顆粒中、きわめて小さい顆粒が Feulgen 顆粒として証明されないものもあつたが、この場合この小顆粒が果して顆粒や否やの決定ができないためその点多少の疑義がある。

#### 総括並びに考按

われわれは抗酸菌の形態並びに発育形式に関する研究を続行しているうち、とくにフィルム培養法を用いて、抗酸菌の発育に際しての抗酸菌の顆粒の意義を一方ではテルール酸カリ還元顆粒について<sup>2)</sup>、他方ではメチレン青による生体染色菌の顆粒について<sup>3)</sup>実験をすすめ、概ねこれら顆粒が抗酸菌の発育にとつて重大なる意義をもち、とくにこれら顆粒が分裂分枝増殖に際しての生命源とさえ思われる所見に到達した。

なお顆粒についてはすでに各種の染色法を施して比較染色を試みて、次の所見りをえている。すなわち、テルール酸カリ還元する黒色顆粒は Löffler 染色、Ziehl-Neelsen 染色、Giemsa 染色により検出される顆粒とすべて同一であり、これら顆粒と一部同一、一部不同の顆粒としては Fontés 染色により検出される顆粒であり、Gram 染色によれば前者 Ziehl-Neelsen 染色等により検出される顆粒の外にさらに無数の小顆粒を証明しうる成績をえた。

そこで今回は Löffler 染色顆粒の生物学的意義がたしかめられている関係上、とりあえず Löffler 染色顆粒の本態にふれんとしてこの顆粒の化学的成分の検討をいささか行つた次第である。この実験に際してはたまたま近

時、Knaysi<sup>7)</sup>、Dubos<sup>8)</sup>、Bisset<sup>9)</sup>、Eisenstark<sup>10)</sup>等、本邦においては鶴見<sup>6)</sup>等の研究によつて、細菌を Feulgen 及び Robinow 法により染色することによつて細菌の内部構造を光学顕微鏡のもとでみとめることができるという報告に示唆をえた。ただこの方法を援用する場合、抗酸菌は他の細菌と異り、すでに菌体内に顆粒を有しているために、これら方法の検討を予め行う必要があつた。従つてこの予備実験の成績によると抗酸菌の場合には Robinow 染色は妥当でなかつた。そのために Feulgen 染色によつて研究をすすめた結果、メチレン青により検出される顆粒はデソキシリボ核酸で

ある成績をえた。もつとも、これら実験方法については実験方法の選択そのものに多少の疑問はあるが、抗酸菌の顆粒のみをとりだして集め、これについて化学分析を行えない現在、かかる間接的方法を用いた訳である。生物学的重大なる意義をもつと思われるメチレン青染色顆粒がデソキシリボ核酸であることは多くの示唆を含有するものと考えられる。

#### 結 論

抗酸菌の菌体成分の検討を組織化学の方法を援用して行つたが、その結果、生物学的意義をもつと思われるメチレン青染色顆粒はデソキシリボ核酸であろうという成績をえた。

(中川教授の御指導を深謝す)

#### 文 献

- 1) 中村・安元；抗酸菌病研究雑誌，6，169，1950.
- 2) 中村；抗酸菌病研究雑誌，未刊行.
- 3) 中村・赤司；抗酸菌病研究雑誌，未刊行.
- 4) B. Romeis; Taschenbuch der Mikroskopischen Technik. 1932 による.
- 5) Robinow, C, F; Proc. Roy. Soc. 130, 299, 1942.
- 6) 鶴見；東京医誌，66. 528. 1949.
- 7) Knaysi, G.: Elements of bacterial cytology, 1944.
- 8) Dubos, R.J.; The bacterial cell. 1945.
- 9) Bisset, K.A.; J. Hyg.; 46, 173, 1948.
- 10) A. Eisenstark, K.J. Mc Mahon and Roma Eisenstark; J. Bact., 59. 1950.