

結核菌における多糖類の細胞化学

(ミノファーゲン製薬本舗研究部)

市川 収・小森 博武・武田 スミ

(昭和 27 年 8 月 7 日受付)

結核菌は病変内で Hotchkiss 過ヨード酸 Schiff 反応陽性となること市川¹⁾、大野²⁾らによつて報告された。市川は結核結節内容の周辺部、類上皮細胞内に多糖類陽性の桿菌を認めた。Mudd³⁾の発表した細菌核空胞の電子顕微鏡的証明に対して行つた。Mac Manus の質疑追加細菌には過ヨード酸法陽性の多糖類があり、アセチル化後の同法では認められないという所説を引用し、過ヨード酸法陽性の菌塊様ものは細菌であり、この場合結核菌ではなからうかとのべた。大野は同じく病変中の結核菌を Mac Manus 法で染めているが、単球の細胞質に含まれる多糖類は果して寄生する結核菌が生産したかどうかを吟味し、この多糖類を結核菌に由来するものと主張した。われわれは小川培地に生えた人型結核菌 H-2 株の 6 週間培養した結核菌集落をパラフィン切片として、結核菌における多糖類の存在を明らかにしようとした。

結核菌体成分を詳しくしらべた Anderson⁴⁾の成績を見ると、H-37 株の磷脂体区分には Mannose-glycerol-2 磷酸と Manninose 磷酸の 2 種の含磷多糖類が含まれ、また Wax の部分にも同種炭水化合物が含まれている。さらに Renfren らは脱脂菌体の蛋白分割にも Arabinase を含む多糖類があるという。いずれにしても菌体成分からいつて、結核菌の細胞化学的形態は興味を呼ぶもので、どの部分かに多糖類反応陽性のところが見出されてよいわけである。

細菌 Chitin に対する多糖類反応 (Lillie 1951)

	Casella 1% KMnO ₄ 20' Schiff	Bauer 5% CrO ₃ , 60' Schiff	Mc Manus HIO ₄ , 10' Schiff	Lillie HIO ₄ , 10' Schiff 1H+Pierio	Diast HIO ₄ Schiff
炭疽菌, 連鎖状 球菌, 腸内細菌 (桿菌)	—~PR	—~PR	PK~RP	PK~RP	PK~RP
腸内桿菌	—	—	RP	RP	RP
デフテリア菌	—~PPK	PPK	PR	PR	PR
結核菌	—	—	—	—	—

註: Pは紫, Rは赤, PKベラ色, —は陰性を示す

しかるに Lillie⁵⁾は細菌キチンに対する多糖類をしらべているが、次のような成績を出している(下表)。

Lillie の成績からいうと外被膜は多糖類でそまらぬという結果である。

われわれは結核菌集落の切片に対し各種の多糖類染色を施し、多くの知見をあげることができた。

研究方法

多糖類の細胞化学的術式としては、Hotchkiss の HIO₄-Schiff 反応⁶⁾、Lillie の (Na₂IO₃+HNO₃)-Schiff 反応^{5,7)}、唾液消化後の同法、Lillie の Picro-methyl Bloe HIO₄-Schiff 反応、Bauer の CrO₃-Schiff 反応⁸⁾ Casella の KMnO₄-Schiff 反応⁹⁾、Hale の酸性多糖類反応¹⁰⁾、大野の PH を異にするトルイジン青メタクロマジア法¹¹⁾、Brachet のピロニン・メチル緑染色によるピロニンのメタクロマジア法¹²⁾などを試みた。

その術式を簡単に紹介すると、小川培地に生えた人型結核菌 H-2 株 6 週間培養のものをカルノア第 2 液(純アルコール 6 : クロロホルム 3 : 氷醋酸 1)に 6~12 時間固定の上、水洗せず、70% アルコールを経て脱水、透明、パラフィン包埋し切片とする。

Hotchkiss の HIO₄ の多糖類染色は、過ヨード酸 (HIO₄+2H₂O) によつて糖の OH 基に作用し、アルデヒド基を遊離させて、Schiff の無色亜硫酸フクシンと結び発色させる。広義の多糖類は全て反応する。植物では澱粉、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、動物で

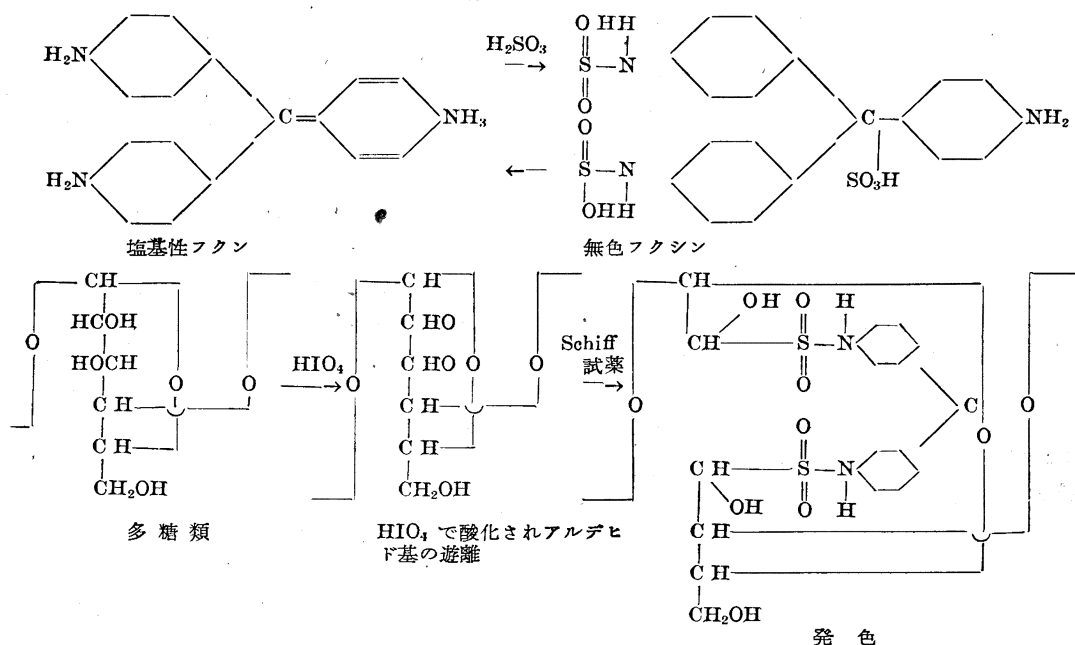
はグリコーゲン、ムチン、糖蛋白、コンドロイチン硫酸おそらくヒアルロン酸、キチンも反応するであろうという。核酸の糖は置換されて反応しない。

切片を過ヨード酸 B 液(過ヨード酸 400 mg, 溜水 45 cc, M/5 醋酸ソーダ 5 cc)に 5 分間おき、70% アルコールにて洗い、ヨードチオ硫酸液(ヨード加里 1 g, チオ硫酸ソーダ 1 g, 溜水 20 cc, 2N 塩酸 0.5 cc を加

えたアルコール 30 cc) に 5 分間移して、再び 70% アルコールで洗う。その後 Schiff 試薬に 15~45 分間入れ、亜硫酸水(濃塩酸 0.5cc, 10% 異性重亜硫酸加里 2cc, 溜水 50 cc) で洗つて、脱水封入する。多糖類は紫のフ

クシン色をとる。

De Lamater¹³⁾ による染色反応機構は多糖類 Schiff 反応を理解するため必要と思うので紹介しておく。



Lillie の $(Na_2IO_3 + HNO_3)$ -Schiff 反応は Lillie 液 (KIO_4 又は Na_2IO_3 0.8 g, 70% 硝酸 0.3 cc 水 100cc) に 10 分入れ酸化させ、水洗後 Schiff 試薬に 15~45 分間反応のち、亜硫酸水で分別、脱水、封入する。Lillie の方法は Me Manus 法よりよく染まる。

Bauer の CrO_3 -Schiff 反応は 5% クロム酸にて 60 分酸化させ、水洗後 Schiff 試薬に 15~45 分間反応させ亜硫酸水で分別、脱水、封入する。従来 Bauer のグリコーゲン染色といわれていたが、われわれのしらべたところでは Me Manus より反応の弱い多糖類染色と解した方がよいようである。

Casella の $KMnO_4$ -Schiff 反応は 0.5~1% 過マンガン酸加里液に 20 分間おいて酸化後同じように Schiff 試薬の中に入れて反応させる。

多糖類染色の強さからいうと、Lillie 法 > Me Manus 法 > Bauer 法 > Casella 法の順序であつて、組織の種類によつてそれぞれの方法で陽性陰性の区別をみることもあるから、多糖類の種類がちがいはあるものと思われる。

Hale の酸性多糖類染色法をのべる。切片を醋酸鉄液(水酸化鉄 1M に対し醋酸 3M の比にとかしたもの)に 10 分つけ、溜水でよく洗う。黄血塩液 (0.14M 塩酸に 0.02M 黄血塩をとかしたもの) に 10 分つけて水洗の上、フクシンで共染、脱水、透明、バルサム封入すると、酸性多糖類は青色或いはインジゴ色に反応する。

Lillie の HIO_4 -Schiff-Picro-methyl blue 反応は Lil-

lie の HIO_4 -Schiff 反応のちピクロ・メチル青液(飽和ピクリン酸 100 cc, メチル青 50 mg) に 6 分間染め、95%, 100% アルコールに 2 回脱水、分別し、アルコール、キシロール等分液に入れキシロールを経て、バルサムに封入する。染め上りは HIO_4 -Schiff 反応陽性部位がピクリン酸及びメチレン青によつて染色度をこにし、allochromatic な色調をとる。

大野の PH を異にするメタクロマジア反応は次のような染色機構による。高分子の酸性基は塩基性色素と結合してメタクロマジアをおこすが、 $-SO_4$ 、 $-COOH$ の順に強く、 $-PO_4$ は最も弱い。従つて、 $-SO_4$ をもつコンドロイチン硫酸の方が、 $-COOH$ しかもないヒアルロン酸よりも強い反応を示し、又核酸よりもヒアルロン酸ははるかに明らかな反応をおこす。 $-COOH$ の如き弱酸は塩基性溶液では完全に解離するが、強い酸性溶液では全く酸としての働きを示さない。又モデル実験によつても明らかで、PH 2.5 以下では、ヒアルロン酸は全く、トルイジン青を結合しないし、PH 4.1 ではリボ核酸の等電点に相当するので核酸のメタクロマジアが見られない。しかしコンドロイチン硫酸とヒアルロン酸とのメタクロマジアは良く判る。

染色するには 0.05% トルイジン青 PH 2.5, 4.1, 7.0 の緩衝液を作るには次のようにするが、それによつて染色した場合のメタクロマジア反応の結果を表示してみる。

緩衝液			メタクロマジア反応				
PH	25%醋酸の2.5倍液		核 酸		多 糖 類		
	M/100クエン酸	M/52磷酸ソーダ	デゾキシリボ 高分子	リボ 低分子	ヒアルロン酸	コンドロイチン硫酸	
						+	+
7.0	4.0	16.0	+	+	+	+	+
4.1	12.0	8.0	-	+	-	+	+
2.5	20.0	0	-	+	-	-	+

脱パラフィンした切片を3枚とり、それぞれPHをことにする0.05% トルイジン青液に5~10分間染色する。90%アルコールで分別、純アルコールで脱水の上、手早く純アルコール・キシロール等分液、キシロールを経て、透明バルサム封入。

ピロニン・メチル緑染色によるリボ核酸、デゾキシリボ核酸の染色を行うと、リボ核酸はピロニンにより真紅色を示すが、多糖類はオレンジ色のメタクロマジアを起すので、一見区別がつく。リボヌクレアーゼ消化のち同染色するとリボ核酸は消化されるが、多糖類のメタクロマジアは残る。

得たる成績のあらまし

ピロニン・メチル緑染色すると、結核菌集落の中心部はピロニン好性であるが、皮質部はオレンジ色でピロニンによる多糖類メタクロマジアをおこしている。リボヌクレアーゼ消化後中心部のピロニン好性はリボ核酸であろうが消化は不完全であり、周辺の皮質部のオレンジ色は依然として残っている。

PH 7.0 トルイジン青緩衝液染色では中心部濃青色、周辺皮質部は濃紫色メタクロマジアを起している。PH 5.4 では中心部淡青色・皮質部淡紫色、PH 2.5 では中心部濃青色、皮質部濃青色でいずれも皮質部はメタクロマジアを示している。大野の所説によるとコンドロイチン硫酸があるということになるが、これだけでは確たることはいえない。とにかく、結核菌にはPH 2.5~7.0までの緩衝液で染まる多糖類があり、PH 4.1では染まりが弱いことよりその附近に等電点をもつ物質があるかもしれないし、PH 2.5でメタクロマジアを起すことから $-SO_4$ 基をもつ多糖類も考えられる。又リボヌクレアーゼ消化後中心部にピロニン好性のところがあることよりも核酸の低分子のものか、 $-PO_4$ 基のあるものが存在するものかもしれない。Andersonの分析を参照すると含磷多糖類が含まれているようであるから、この細胞化学的研究の結果が妥当であるかどうかは今ただちに決定し難い。

Lillieの HIO_4 -Schiff反応によると、中心部弱陽性、皮質部強陽性で、多糖類は極めて多い。Hotchkissの HIO_4 -Schiff反応ではその程度やや弱い。唾液にて消化させてから HIO_4 -Schiff反応を行うと、真紅色から

バラ色に弱つてくる。ピクロ・メチル青 HIO_4 -Schiff反応を行うと中心部は青色、赤色とが混合し、培養基に近いところは全く濃青色である。皮質部は赤色が強い。詳しく見ると、中心部では赤色多糖類反応強陽性のものより陰性でメチル青好性のものが多い。Bauerの CrO_4 -Schiff反応はCasellaの $KMnO_4$ -Schiff反応より弱い、Hotchkiss又はLillieの HIO_4 -Schiff反応はBauer反応よりも強いという順序である。興味あることはBauer, Casellaの両法では、皮質部・中心部ともに同じ程度で区別がないことである。

これらの成績を表示してみると次のようになる。

	皮 質	中心部
Hotchkissの HIO_4 -Schiff	卅(R)	+(R)
Lillieの HIO_4 -Schiff	卅(R)	+~卅(R)
唾液消化後Lillie法	卅(R)	+(PR)
LillieのPicro-Methyl Blue- HIO_4 -Schiff	卅(R)	卅(R) 卅(B)
Bauerの CrO_4 -Schiff	+~卅 (RP)	+(RP)
Casellaの $KMnO_4$ -Schiff	+~卅 (PR)	+(PR)
大野のPH 7.0トルイジン青	卅(V)	卅(B)
大野のPH 5.4トルイジン青	卅(V)	+(B)
大野のPH 2.0トルイジン青	卅(V)	卅(B)

註：Rは赤，Vは紫，Pはバラ色，Bは青

これらの諸染色から見て、Lillieの HIO_4 -Schiff反応が最も強いし、どの方法でも結核菌は多糖類染色で極めて明らかに見える。

Lillieが発表している結核菌キチンは全く諸反応陰性であるということは今後多くの問題を残すであろう。

強拡大してしらべた成績では1個の細菌に焦点を合せてみると光つた透明な大顆粒のまわりに多糖類がみられるようである。大顆粒そのものにも陽性であることがある。これらのことについては後日よくしらべる必要があるので詳しいことは発表を差し控えたいが、最外層には不染帯をもっていることは事実である。Lillieのいう細菌Chitinに多糖類がないというのはこの最外層不染帯を意味するものであろうが、結核菌自体には強陽性の多糖類が存在しているのである。

ま と め

われわれは培地上に生えた結核菌集落の多糖類をしらべ明らかにその存在を新しく知ることができた。市川が結核結節中にみた多糖類陽性の桿菌、大野が単球に見られる多糖類は結核菌に由来するものであろうとした所見は明らかに結核菌そのものを多糖類染色で見たものであろう。Lillieの成績は陰性であるが、キチンとしてしらべようとしたが、菌体内多糖類は厳に存在することを知り得た。

結核菌集落で知りえたことは

1) 皮質部はピロニンのメタクロマジア色であるオレンジ色, 中心部はピロニンの赤色で, リボヌクレアーゼ処理により, 皮質には多糖類多く, 中心部にはリボ核酸が多い。

2) PH をことにするメタクロマジアは PH 7.0~2.5 までいずれも皮質部はメタクロマジアを示している。

3) 結核菌の多糖類は Schiff 反応陽性で $\text{HIO}_4 > \text{CrO}_3 > \text{KMnO}_4$ の順序でいずれの酸化方法でも反応する。唾液消化では陰性である。

4) 強拡大すると菌体内では大空胞顆粒のまわりに存在するか, そのものに存在している。

5) 最外層被膜は多糖類染色に不染である。

要するに結核菌体内には HIO_4 -Schiff 反応で強陽性の多糖類をもち, Anderson の分析した Mannose-glycerol-2 磷酸, Mannose inositol 磷酸の如き含磷多糖類であるかどうかわからぬが, 極めて強い染色性を示す。これに反し, Anderson のいう Wax 部である最外層には同じような含磷多糖類が含まれているといわれているに拘らず, Lillie もわれわれも HIO_4 -Schiff 反応始め, ずれの反応でも陰性であったことは興味がある。

果して外層被膜が存在しているものかどうかを疑わしむる所見である。透明な外層は物理的な光学の人工産物であるかどうかはもつとしらべてみる必要がある。

この論文の要は昭和 27 年 7 月 24 日予研伝研集談

会席上講演発表された。

引用文献

- 1) 市川収・幸村孝・小倉幸子: 東京医事新誌, 68(6): 29, 1950.
- 2) 大野乾・青山振: 結核, 27(6): 306, 昭 27.
- 3) Mudd, S., Smith, A.G.: J. National Cancer Inst., 10(6): 1354, 1950.
- 4) Anderson, Northrop: J. Biol. Chem., 131: 533, 1939.
- 5) Lillie, R. D.: Stain Technol., 26(2): 123, 1951.
- 6) Hotchkiss, R. D.,: Arch. Biochem., 16: 131, 1948.
- 7) Lillie, R. D.: J. Lab. Clin. Med., 32; 910, 1947.
- 8) Bauer, H.: Ztsh. Mikr, Anat. Forsch., 33: 143, 1933.
- 9) Casella, C.: Anat. Anz., 93: 289, 1942.
- 10) Hale, C. W.: Nature, 157, 802, 1946.
- 11) 大野乾: 医学と生物学, 19(6): 326, 1951.
- 12) Brachet. J.: Compt. Rend. Soc. Biol., 133: 88, 1940.
- 13) De Lamater, E. D.: J. invest. Derm., 14(2): 133, 1950.

増刷出来!

東大教授 佐々貫之博士監修

診療百科医典

佐々博士外50大家が各専門部門を担当し、実地診療に重点をおいて編集された名著

上卷	}	第一分冊	内科 総論篇	(660頁) 定価500円 送費実費
		第二分冊	内科 各論篇	(1,088頁) 定価850円 送費実費
		第三分冊	小児科・精神科篇	(520頁) 定価400円 送費実費
下卷	}	第一分冊	外科・整形外科篇	(800頁) 定価650円 送費実費
		第二分冊	産婦人・皮膚性病・泌尿器・耳鼻咽喉・眼科・齒科篇	(880頁) 定価700円 送費実費

発行所 株式会社 東西医学社

東京都中央区銀座西七ノ一
電話銀座(57)2126-2129番 振替口座東京2818番