

結核菌チール・ニールゼン染色法と浜崎ケト エノル顆粒染色法との関係

(ミノフアーゲン製薬本論研究部)

市川 収・武田 スミ・小森 博武

(昭和 27 年 7 月 28 日受付)

浜崎¹⁾によると、浜崎ケトエノル顆粒 (KEG) を含有する生物は哺乳類・鳥類・両棲類・爬虫類・魚類・酵母・細菌の一部・植物などあつて、おそらく核酸と同様に生物である以上ウィールスにいたるまでケトエノル顆粒をもっているであろうと推定している。浜崎が細菌の一部にケトエノル顆粒を認めているので、結核菌においても当然ケトエノル顆粒の存在が予想できる。

これに加えて、石炭酸フクシン・ヨード法によるケトエノル顆粒染色法が結核菌のチール・ニールゼン氏染色法に極めて近似する点に興味を感じ研究に着手した。

ケトエノル顆粒染色の化学は、チール・ニールゼン法とちがつているところは、浜崎クロム固定による酸化であり、 $(-CH_2-HOCH-)$ の構造をもっている核酸構造中の五炭糖であるデゾキシリボース、或いは脂肪酸、或いは胆汁酸は脱水素されてケトンとなり、のちエノル化によつて水素移動を生じ、新たに OH を生じ、隣接する C の間に 2 重結合の $(-OH \cdot C=C \cdot H-)$ を作る点である。又かかる OH はヨードによつてヨード化されさらにヨードが塩基性フクシンと置き換わつてヨード水素酸フクシンを作るといわれている。要約するとチール・ニールゼンとちがつて、浜崎ケトエノル顆粒染色法はクロム固定の上、ヨード化する点に特徴がある。

カルノア固定、フォルマリン固定、クロム固定の上チール・ニールゼン結核染色したものと、カルノア固定、フォルマリン固定、クロム固定の上浜崎ケトエノル顆粒染色したものとを比較してみた。

その結果チール・ニールゼン法と浜崎ケトエノル顆粒染色法とは極めて近似の成績にあり特にクロム固定の場合にいずれも最も強度に染まることを知り得た。浜崎¹⁾が主張し、われわれ²⁾によつて追試され明らかになつたところの浜崎ケトエノル顆粒の実態すなわちデゾキシリボヌクレオチド或いはリポイドの性状を明らかにした。そのためには切片に対して、アルカリ性および酸性ヌクレオチダーゼ、リパーゼ消化或いはバリット処理を行つてその可染物質を同定したのである。

これらの研究を通してリポイドを主とする結核菌成分がチール・ニールゼン法及び浜崎ケトエノル顆粒染色に大きな役割を演じていることを知り得たのでここに報

告することにした。

研究 方 法

材料は小川培地上にはえた人型結核菌 (H-2 株) の 6 週間培養された菌集落のパラフィン切片を用いた。材料は Carnoy 第 2 液 (純アルコール 6, クロロホルム 3, 氷醋酸 1), ホルマリン緩衝液 (フォルマリン 10cc, 溜水 90cc, 第 1 磷酸ソーダ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.4g, 第 2 磷酸ソーダ Na_2HPO_4 0.56g, の混液で, PH 7.0), 浜崎クロム KEG 固定液 (重クロム酸加里 2.5g, 硫酸ソーダ 1g, 水 100cc, 氷醋酸 6cc) に固定した。Carnoy 第 2 液 3 時間固定後、水洗せず、70%アルコール、純アルコールを経てパラフィン包埋。フォルマリン緩衝液固定では 3 日固定後、水洗・脱水パラフィン包埋する。クロム固定液では 2—3 日固定して、水洗のち包埋する。チール・ニールゼン染色は従前の通り。

浜崎ケトエノル顆粒染色法は次のようにして行う。切片は石炭酸フクシン液 (塩基性フクシン 0.5g, 純アルコール 5cc, 3% 石炭酸水 95cc) で 1 時間染色する。水洗 5 分のち 1% 塩酸水で分別 10 分、水洗 3 分のち、ルゴール液に 30 分浸し、1% 次亜硫酸ソーダ 5 分、水洗臨時、3% 塩酸水分別 15 分、水洗 10 分、脱水、封入する。

浜崎ケトエノル顆粒の化学的性状を明らかにするためには、切片を酸性及びアルカリ性ヌクレオチダーゼ或いはリパーゼによる消化及びバリット処理を行つてのち石炭酸フクシン・ヨード法で染色する。その結果ヌクレオチダーゼで消化され不染色とならばヌクレオチドの存在を、リパーゼにて消化され不染色なればリポイドの存在を、バリット処理で可染性なればリポイドの存在を同定することができる。

われわれの用いた酵素抽出法は浜崎のそれとちがうが、酸フォスファターゼすなわち酸ヌクレオチダーゼは浜崎は Schmidt³⁾ 法、われわれは Contardi⁴⁾ 法であつて、アルカリ性フォスファターゼすなわちアルカリ性ヌクレオチダーゼは浜崎は Deutsh⁵⁾ 法、われわれは Klein⁶⁾ 法を用いた。浜崎が行つていないがわれわれが行つたリパーゼの抽出法は Willstätter⁷⁾ 法によつた。これらについては既報告にゆずる。酸性ヌクレオチダーゼ消化には

切片を醋酸・醋酸ソーダ緩衝液にて PH 5.5 とした酵素液に入れ 24 時間 37°C で作用させる。アルカリ性ヌクレオチダーゼ消化には切片を塩化アンモン・アンモニア緩衝液で PH 9.0 とした酵素液に入れ 24 時間 37°C で作用させる。リパーゼ消化には切片を塩化アンモン・アンモニア緩衝液で PH 8.2 とした酵素液に入れ 12 時間作用させる。消化至適時間は基礎実験を行われわれ

によつて明らかになつたデータに基づいて行つたものである。

得た結果のあらまし

菌集落は中心部と周囲にある皮質部とでは菌の性状がちがつている。結核菌集落を固定法・染色法の差異によつてしらべ、或いは酵素消化法で物質同定を試みた場合の成績をのぶれば次のようになる。

チール・ニールゼン法と浜崎ケトエノル顆粒染色法

		チール・ニールゼン法	浜崎ケトエノル顆粒染色法					
			ケトエノル法 無消化	アルカリ性ヌクレオチダーゼ消化法	酸性ヌクレオチダーゼ消化法	リパーゼ消化法	バリット処理法	
結核菌集落	皮質部	カルノア固定 フォルマリン固定 クロム固定	卅(赤) 卅(赤紫) 卅(赤)	+(赤) 卅(赤) 卅(赤)				+(赤) 卅(赤) 卅(赤)
	中心部	カルノア固定 フォルマリン固定 クロム固定	+(青) +(赤)卅(青) 卅(赤)卅(青)	+(赤) +(赤) 卅(赤)				±(赤) +(赤) 卅(赤)
	アサリ上皮下	クロム固定 (酵素液) クロム固定 (非酵素液)		卅(赤)	-	-	卅(赤)	-
			卅(赤)	卅(赤) (グリセリン)	卅(赤) (水)	卅(赤) (グリセリン)	卅(赤) (水)	

結核菌集落ではリパーゼに消化されヌクレオチダーゼで消化されない浜崎ケトエノル顆粒がみられ、アサリ中毒時⁸⁾腎上皮細胞にはヌクレオチダーゼで消化されリパーゼで消化されない浜崎ケトエノル顆粒が認められる。対照として実施してみたが、24 時間消化さす場合酵素液の溶媒であるグリセリン或いは水によつての影響は大してなく、酵素消化法の意味があることもわかる。チール・ニールゼン法ではその染色度はクロム固定>フォルマリン固定>カルノア固定の順でクロム固定が最も強い。チール・ニールゼン陽性物質はアルコール溶性のものであり、クロム固定によつて難溶性となる物質であろうことが想像せられる。フォルマリン固定によつては比較的に可染物質が残ることをも示している。部位的には皮質部に抗酸性のもの多く、中心部に非抗酸性のものが多い。この場合、カルノア固定では抗酸性のもの全く見られず、クロム固定>フォルマリン固定の順序で多く見られるのと概きをことにしている。非抗酸性のものもクロム固定、フォルマリン固定は多いが、カルノア固定では少い。いずれにしてもアルコール溶性のものがカルノア固定では失われ、チール・ニールゼン法陽性物質が少いし、中心部とはいへクロム固定、フォルマリン固定ではアルコール溶性物質を保つため、チール・ニールゼン陽性物質を多く見ているのでなからうか。カルノア固定、フォルマリン固定、クロム固定の上浜崎ケトエノル顆粒染色すると、結核菌はクロム固定>フォルマリン固定>カルノア固定の順に強く証明される。しかしクロム固定以外の固定による可染物は浜崎のいうケトエノル物質であるとは、その染

色機構からしていえない。この場合にもアルコールをさけた固定液の方が可染物質の多いことから、アルコールにて溶出する性質のものであろうということはいえると思う。

クロム固定の結核菌をアルカリ性及び酸性ヌクレオチダーゼで消化さすと消化しないが、リパーゼでは完全消化するので、結核菌のケトエノル顆粒染色陽性物質はリポイドであろうということがいえる。対照に用いたアサリ中毒腎上皮細胞に多いケトエノル顆粒が、これと全くちがつて両ヌクレオチダーゼで完全消化され、リポイドに消化されないので、デゾキシリボヌクレオチドを主とするものであると考えられるが、結核菌に対しては非常に比較対照材料と思える。酵素以外のケトエノル顆粒化学的性質の証明法としていろいろあるが、その内バリット処理が重要である。0.25% バリット水、10°C、15時間作用によつて結核菌のケトエノル顆粒は完全抽出されるが、アサリ中毒時のケトエノル顆粒は不完全で抽出されない。

バリット以外の薬品によるケトエノル顆粒の除去の状態を結核菌とアサリ中毒のものとして比較してみよう。冷過クロール酸では RNA、熱過クロール酸では RNA、DNA 冷トリクロール酢酸では酸可溶性部すなわちヌクレオチッド、熱トリクロール酢酸では DNA、RNA が除去せられる。過クロール酸・トリクロール酸処理では熱のためリポイドが失われるはずである。結核菌とアサリ中毒腎の材料では同じような態度で区別しにくい、やや結核菌の方が温過クロール酸・温トリクロール酢酸で抽出さ

	10% 過クロール酸 5°C, 18h.	10% 過クロール酸 70°C, 20'	10% トリクロール醋酸 0°C, 20'	10% トリクロール醋酸 90°C, 15'
結核菌	卍 (赤)	卍(赤)~+(淡赤)	卍 (赤)	卍 ~ 卍
アサリ中毒腎	卍	-	卍	-

れないからリポイドの存在を思わせる。

3種固定の上チール・ニールゼン法及びケトエノル顆粒染色法によつた場合、強拡大して見ると、菌体内の顆粒はいずれも類似したフクシン好性を示している。

われわれは既に別論文で結核菌の磷脂体とリパーゼの細胞化学⁹⁾結核菌顆粒とミトコンドリア¹⁰⁾について発表している。結核菌顆粒には磷脂体をもち、Sudan 好性で脂肪をもち、リパーゼの位置を確め、基質に用いた tween 80, 60, 40, からしてオレイン酸>パルミチン酸~ステアリン酸をもつものであり、ミトコンドリア染色陽性であることを知り得た。

これらのことからして結核菌に対するケトエノル顆粒染色はリポイドを主体として把み得たものであり、チール・ニールゼン法は何らかの意味においてリポイドに関係ある物質を染めているのでなからうかとの考えを抱くにいたつた。

さらに検討すべきものがあるが、取敢えず得た成績を発表し、チール・ニールゼン法研究上浜崎ケトエノル顆粒染色法が極めて興味ある関係を持つべきことをのべたいのである。

稿を終るにのぞみ、終始一貫基礎研究を奨励せられた

る社長宇都宮徳馬氏に深甚の謝意をささげたい。作業上援助された東大医学部微生物学教室高橋昭三、東京農工大学上田幹雄の諸兄に感謝する。

引用文献

- 1) 浜崎幸雄：細胞核の生理と病理，永井書店・昭27.
- 2) 市川 収・武田スミ：医学と生物学，24；昭 27，掲載予定，伝研集談会にて講演(昭 27，7，24)。
- 3) Schmidt, G.: J. Biol. Chem., 127:251, 1939.
- 4) Contardi, A., Ravazoni, C.; Arch. Ital. Biol., 92:64, 1935, 下村道夫：核酸及び核蛋白，上巻：335，昭 26 (共立出版社)。
- 5) Deutch, W.: Hoppe Seyer Ztschr., 186:1, 1929.
- 6) Klein, W.: Hoppe Seyer Ztschr., 207:125, 1932.
- 7) 兎玉桂三・伊藤良三：化学実験学，2(12):525, 昭18 (河出書房)。
- 8) 市川 収・武田スミ・小倉幸子・小森博武：東京医事新誌，昭 27，掲載予定。
- 9) 市川 収・小倉幸子・小森博武：科学，22：昭 27，掲載予定。
- 10) 市川 収・小森博武・小倉幸子：日新医学，39：昭 27，掲載予定。