

電子顕微鏡的考察を加えた 結核菌の細胞学的研究

国立神奈川療養所

伊 藤 忠 雄

(昭和 28 年 5 月 23 日受付)

緒 言

電子顕微鏡による結核菌の形態についてはすでに Mudd et al (1942), Lurie et al (1942), Rosenblatt et al (1942), Seanga (1948), Knaysi et al (1950) の研究が知られている。すなわち Mudd, Polevitzky 及び Anderson¹⁾ は結核菌には極めて緻細な細胞膜があり、原形質内顆粒の密在していることを観察し、Lurie, Knaysi 及び Mudd²⁾ は人・牛及び鳥型結核菌において原形質は等質で、半透明であるが常に 1 乃至 2 個の不透明顆粒を有し、薄い細胞壁でとり囲まれていることを述べ、Rosenblatt, Fullam 及び Gessler³⁾ は末梢端或いは菌体の長軸にそつて核物質の存在することを記載し、Seanga⁴⁾ は原形質内小体は二種類あつて、一つは不透明で均密であり、他は半透明で緻細不透明な線で囲まれていることを示した。Knaysi, Hillier 及び Fabricant⁵⁾ は鳥型結核菌を用い詳細な研究を行い、多くの知見を加えた。Knaysi 等は(1)細胞膜は非常に薄く 230 Å の厚さを有し伸展性を持つ。(2) 原形質には 2 種の小体があつてかりにこれを A 小体及び C 小体と命名している。(3) A 小体の性質は極めて緻密で球形または楕円形、数は多く、通常 1 乃至 5 個、大きさは 790~7,330×830~8,630 Å で、若い培養に特に多く分裂の証拠である。(4) C 小体の性質は細胞質よりも透明であり、薄い緻密な膜で分離されており、大きさは 500~3,000 Å、数は少数のものから 20 個迄で、時に対をなしているものもある。若い培養に見られ、均一透明で恐らく液状の濃い物質の沈着を示すものである。(5) C 小体の周囲に桿状ミセルが多く集積して Tonoplast となる。(6) 小体のない中央部に Cell Plate ができ、娘細胞の求心的な分離が見られる。(7) A 小体の生化学的成分は蛋白、リポイド、DNA であること等を紹介した。

私も人型結核菌について細胞学的研究を行つていたのでその成績を報告する。本研究に当つては多くの標本は私の考案したスライド・コロジオン・カルチュア (以下「S.Co.C.」と略記す)⁶⁾ により用意され、そして主に人型結核菌青山 B 株につき Knaysi の分類命名に準拠して構造が調べられた他その生化学的組成を考えるに当つては培養時間を異にせる菌に種々の溶媒を作用せしめ、さらに核酸・蛋白・リポイド等菌体構成物質をそれぞれ除

去した後の構造につき検討を加え、同時にこれ等の試料につき各種染色法及び Feulgen 反応等種々の呈色反応を実施し、光学顕微鏡所見と対比検討が試みられた。

実験方法

A 供試菌株

国立神奈川療養所細菌研究室保存の人型結核菌青山 B 株・同 Frankfurt 株・鳥型結核菌抗研株等を供試した。

B 染色法及び呈色反応

i) 抗酸性は Ziehl-Neelsen 氏法 (Günther 変法)⁷⁾ を用い判定した。

ii) Gram 染色は Hucker⁸⁾ の変法⁹⁾ によつた。

iii) Much 氏顆粒染色法はメチル・ヴィオレットの酒精飽和溶液 1cc と 2% 石炭酸水 90cc との新鮮混和液に室温で 1~2 日浸し或いは加温染色を行い Lugol 氏液を注いで 5~10 分間放置、5% 硝酸水で 1 分間、次いで 3% 塩酸水で 10 秒間脱色、さらにアセトン・アルコール等分液で無色になる迄脱色水洗後 1% サフラニン水溶液で復染色を行つた。

iv) ピロニン・メチル緑染色¹⁰⁾

0.3% 精製メチル緑 2 容に対しピロニン 1 容を加え、液色が青紫乃至紫色になるように調製し 25 分染色後軽く水洗し、ブタノールで分別した。

v) Feulgen 反応^{11) 12)}

60°C で N 塩酸に 4 分間作用せしめ、亜硫酸フクシンに 1~1.5 時間つけ、亜硫酸水で洗つて脱水。要に応じて後染色を行つた。

vi) リポイドは 75% アルコールのズダン III 飽和溶液で検査した。

vii) 蛋白質はニンヒドリン及びビュレット反応により証明した。

viii) 多糖類は Hotchkiss の多糖類染色法によつた。

C 電子顕微鏡

電子顕微鏡による観察は日本電子光学 J.E.M.I. 型によつてなされ、同顕微鏡に附属するカメラにより富士プロセス乾板に記録した。

D 電子顕微鏡試料作製法

I 「S.Co.C.」による試料の作製法

「S.Co.C.」についてはすでに報告せるも⁶⁾略記すると

縦に半切せるスライド・グラスに無菌的にコロチオン膜をはり、そのコロチオン膜面上に菌液を塗抹し、乾燥の上 Kirchner-Sy.-Ser. 培地に投入培養して試料を作製するのであつて、本法は比較的操作が簡単で外力の影響を受けること少なく、電子顕微鏡並びに光学顕微鏡下に菌の形態的变化と増殖過程の相関々係を自然な姿で観察することができる。私は Sauton 培地に 1 カ月培養の人型結核菌青山 B 株の「S.Co.S.」30, 60, 90, 120, 150, 180 及び 210 時間につき無処理標本並びにフォルマリン固定を行つた標本を用意しクローム・シャドー及びシャドーを施さない試料を作つた。

II 陳旧培養における試料の作製法

人型結核菌青山 B 株の Sauton 培地 3 カ月及び 5 カ月培養せる菌膜を手振法にて磨砕し、蒸溜水による菌浮游液を作り、コロチオン膜面に塗抹し試料を作製した。

III 除核酸を施した試料の作製法¹³⁾

i) リボ核酸及びデスオキシリボ核酸除去

Pollister¹⁴⁾¹⁵⁾の三塩素醋酸並びに Mirsky¹⁶⁾¹⁷⁾の 1M 食塩水により、リボ核酸（以下 RNA と略記す）及びデスオキシリボ核酸（以下 DNA と略記す）の除去を行つた。

(a) 人型結核菌青山 B 株「S.Co.C.」210 時間培養の管底集落を純アルコールにて固定後 10 %三塩素醋酸 90°C, 40 分処理を行つた。

(b) 同「S.Co.C.」150 時間につき 1M 食塩水 37°C, 3 時間処理を行つた。

ii) RNA 除去

RNA 除去はリボ核酸酵素による RNA の消化¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾と Erickson²¹⁾による過塩素酸処理、N 塩酸加水分解²²⁾²³⁾及び 0.14M 食塩水処理²⁵⁾によつて行つた。

(a) 上記「S.Co.C.」210 時間につき純アルコール固定後 0.03 %リボ核酸酵素 60°C, 40 分処理を行つた。なおリボ核酸酵素はミノファージェン製薬研究部市川収博士より分譲されたものであり、緩衝液に用いる塩類溶液の核酸に対する影響を考慮し特に酵素の蒸溜水溶液を使用した²⁰⁾²⁶⁾。

(b) 人型結核菌青山 B 株の 1mg/cc 菌浮游液 0.1cc を Kirchner-Sy.-Ser. 培地に植え、210 時間培養の管底集落を純アルコールにて固定後 10 %過塩素酸 5°C, 5 時間処理を行つた²¹⁾。

(c) 同「S.Co.C.」150 時間につき N 塩酸 60°C, 4 分及び 10 分間処理を行つた²²⁾²³⁾²⁴⁾。

(d) 同「S.Co.C.」150 時間につき 0.14M 食塩水 37°C, 3 時間処理を行つた²⁵⁾。

IV 除蛋白を行える試料の作製法

i) パンクレアチンによる除蛋白

1 %パンクレアチン水溶液を作り、炭酸曹達にて pH9.0 に修正の上、シャンペラン細菌濾過器にて濾過して調製

したパンクレアチン溶液を用い、「S.Co.C.」150 時間のものにつき 37°C, 48 時間処理を実施した。

ii) アウトリーゼによる除蛋白²⁷⁾

「S.Co.C.」150 時間のものにつき滅菌蒸溜水を分注せる試験管内に投入、37°C 孵卵器に 12 及び 24 時間入れ試料を作製した。

iii) 40%三塩素醋酸による除蛋白

Sauton 培地に 1 カ月培養の菌膜に 40 %三塩素醋酸を加え、手振法にて磨砕し 90°C, 30 分加熱して試料を作製した。

V 人型結核菌 Frankfurt 株の 4 %グリセリン・ブイオン及び Sauton 培地 50 乃至 60 日培養の菌膜を手振法にて磨砕しクローム・シャドーを施した試料を作製した。

E 光学顕微鏡標本作製法

i) 上記人型結核菌青山 B 株の「S.Co.C.」及びこれの三塩素醋酸・1M 食塩水・リボ核酸酵素・過塩素酸・N 塩酸及び 0.14M 食塩水処理等による除核酸標本については Ziehl-Neelsen, Gram, Giemsa, Much 及びビロニン・メチル緑染色を行い、さらに Feulgen 反応等呈色反応を実施した。

ii) 陳旧培養の試料についても同様各種染色法及び呈色反応を行つた。

iii) 除蛋白を行える標本に対しては Ziehl-Neelsen, Gram, ビロニン・メチル緑染色並びに Feulgen 反応を行い、要に応じてニンヒドリン及びビュレット反応を実施した。

実験成績

I 「S.Co.C.」の無処理及びフォルマリン固定

「S.Co.C.」120 時間の無処理(第 1 図)及び同 8 日の 10 %フォルマリン固定(第 2 図)では²⁸⁾細胞は薄い透明な細胞膜で囲まれており、その内側の原形質は等質ではないがかなり透過性の部分があつてその殆んど両端に大型で球形時に楕円形の電子不透過性小体がある。これは Knaysi⁵⁾の A 小体に相当するもので中間部にはこれより小型ではあるが 1 乃至数個の電子不透過性小体が見られ、原形質の外側に規則正しく対をなしている如く排列しているものも見られる。そして諸処に大小不同の原形質より透過性の小体が不規則に連続し、その数は数個から多きは 20 個に及ぶものも見られ、これは Knaysi⁵⁾の C 小体に相当するものである。原形質には桿状ミセルがあり、しばしば密在せる Tonoplast が見られる。A 小体と C 小体とが接触する部分では C 小体の輪廓に一致して A 小体の変形が見られる(第 1 図)。幼若な伸び行く細胞においては A 小体は延長軸に一致する楕円の形を示す(第 2 図)。クローム・シャドーでは両端または一端にふくれた部分が見られ、この部分は A 小体の位置に一致し、中間部には不規則な凹凸が見られる(第 3 図)。

Ziehl-Neelsen, Gram, Much 及び Giemsa 染色を行うに各染色において顆粒が1乃至数個明瞭に認められ、透過性小体は Ziehl-Neelsen, Gram, Much 及び Giemsa 染色において染色された背景に諸処不染性の小体として認められる。菌体はそれぞれ染色され、集落周辺部の菌体の中には抗酸性の減弱, Gram 陰性化の傾向を示すものも見られる。菌体はピロニン好性で Hotchkiss 多糖類染色は淡赤色で陽性を示した。

II 陳旧培養

Sauton 培養5カ月の無処理では一端時に両端に極めて大型のA小体があつて、この末梢端は輪廓ははつきりしており、中間部に面する部はぼけているものが見られる。A小体は大部分が単で大型の楕円形又は西洋梨形を呈しており、菌体の大部分を占拠しているように見えるものが多数観察される。C小体は不明であるが桿状ミセルが見られ、周囲には細胞膜が認められる。A小体は幼若菌に較べるとその大きさを増大しているが、これに反しC小体は古い培養においては消失することを示す。これに各種染色を行うに明瞭にそれぞれ大型顆粒が認められ、C小体は不明であり、菌体は Ziehl-Neelsen 染色では輪廓明瞭で短いものも長いものも見られるが、Gram 染色では輪廓やや不明瞭となり、Much 染色では顆粒のみ著明に認められ、菌体の染色性は低下する。顆粒の Feulgen 反応は陽性であるがピロニン・メチル緑染色においてはメチル緑好性顆粒とピロニン好性顆粒が認められ、菌体は淡紫赤色を示した。

III 除核酸

i) RNA 及び DNA 除去

(a) Pollister 法による RNA 及び DNA 除去¹⁴⁾¹⁵⁾

「S.Co.C.」150時間の純アルコール固定後三塩素醋酸処理では、A小体は著明に透過性を増し、その輪廓がぼけるものも消失するものも見られる。C小体は不明で桿状ミセルは不明となり、菌体の萎縮変形が見られる。A小体消失の事実は後述のリボ核酸酵素及び過塩素酸処理においてA小体が依然として認められるのに対比し特記さるべきものである。これに各種染色を行うに顆粒は不明となり、Feulgen 陰性となる。菌体は Ziehl-Neelsen 染色で淡紫赤色, Gram 陰性となり、ピロニン好性を失う傾向が見られ、Much 染色において顆粒、菌体ともに不明となる。ここにおいてA小体にDNAの存在することが理解されるとともに不透過性小体と各種染色において認められる顆粒とは本態的に同一のものであることが予想されるのである。

(b) Mirsky 法による RNA 及び DNA 除去¹⁶⁾¹⁷⁾

「S.Co.C.」150時間につき1M食塩水、3時間処理ではA小体は著しく透過性を増しその大部分は消失する。C小体は不明瞭でかすかに濃淡を示す。菌

体は萎縮変形し、周辺は不規則である。各種染色において顆粒は小型化乃至消失の傾向を示し Feulgen 反応は概ね陰性である。菌体は Gram 陰性でピロニン好性を失う傾向が見られる。これのニンヒドリン反応は概ね陰性であるが僅かに紫青色顆粒として見られるところもある。

ii) RNA 除去

(a) リボ核酸酵素による RNA の消化¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾

「S.Co.C.」210時間の純アルコール固定後リボ核酸酵素処理ではA小体の輪廓は不明瞭になるものもあるが大部分は明瞭に不透過性小体として見られる。C小体は縮小消失し、ミセルは減少消失の傾向を示す。菌体は全体として細くなりやや不透過性を増すとともにその周囲にかなり厚い透過性の層が一樣に見られる(第4図)。

Ziehl-Neelsen, Gram, Much 及び Giemsa の各種染色において顆粒はそれぞれ染色される。C小体不明で、菌体は Ziehl-Neelsen 法で赤色, Gram 染色でその陰性化が見られ、Much 染色で淡紫赤色を呈する。顆粒は Feulgen 陽性, メチル緑好性を示し、菌体はピロニン好性を失う傾向が見られる。A小体はリボ核酸酵素で消化されないのに反し、菌体は非常にほつそりしてきて同時にピロニン好性を失うことは菌体にRNAの分布することを予想せしめる。ミセルは減少消失の傾向を示すことも同様に興味がある。なお純アルコール固定ではA小体は若干透過性を増し、やや不整形を示すものも見られる。C小体は縮小、菌体は濃縮し原形質分離の像の見られるものもある。原形質分離の形状は軽度凹形(Konkave Plasmolyse)を示し、これは原形質外層の粘性を示すものである。

(b) 過塩素酸による RNA 除去²¹⁾

210時間培養せる集落の純アルコール固定後過塩素酸処理ではA小体の輪廓は、はつきりしているものもあるが、かなりその透過性を増している。菌体には破壊溶出の像が見られる。各種染色を行うに顆粒はそれぞれ染色されるも減少小型化が見られ、そのピロニン・メチル緑染色ではピロニン好性を示した。C小体は不明、菌体は輪廓やや不明瞭となるも Gram 染色において淡紫赤色、Much 染色において淡赤で、ピロニン好性を失う傾向が見られる。

(c) 塩酸加水分解による RNA 除去²²⁾²³⁾²⁴⁾

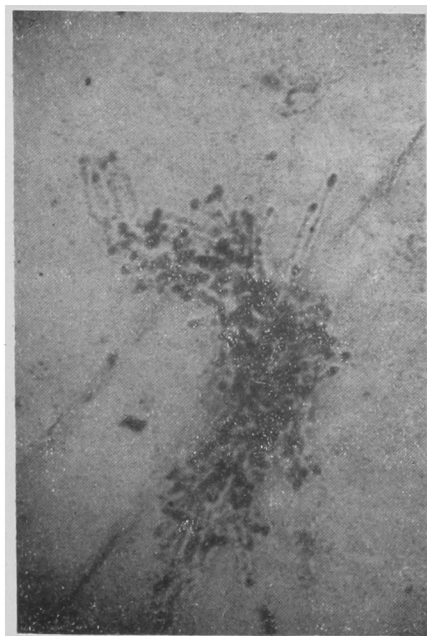
「S.Co.C.」150時間のN塩酸60°C、4分では(第5図)A小体は透過性を増し概ね消失する。C小体は縮小不規則となるもところどころに見られ、菌体は萎縮変形し、その周囲にかなり厚い透過性の層が見えて来、原形質分離の像も見られる。顆粒は Feulgen 陽性、ピロニン・メチル緑染色ではピロニン

第 1 図



人型結核菌青山B株「S. Co. C.」120 時間無処理

第 2 図



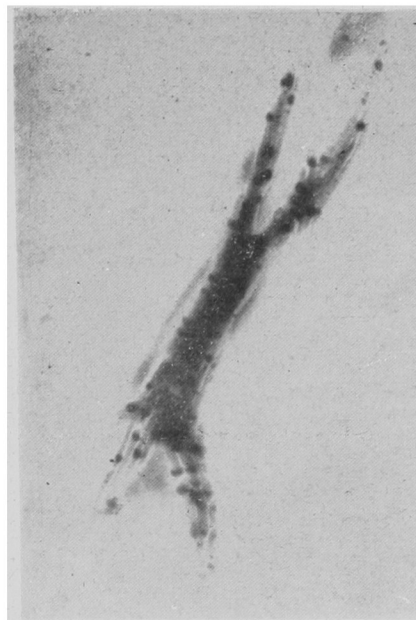
人型結核菌青山B株「S. Co. C.」8 日フォルマリン固定

第 3 図



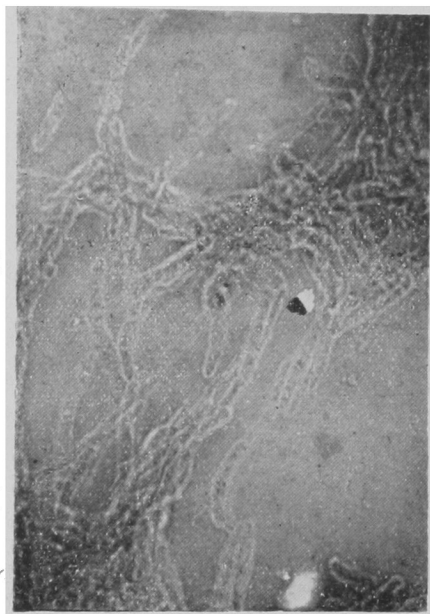
人型結核菌青山B株「S. Co. C.」5 日フォルマリン固定後クローム・シヤドーム

第 4 図



人型結核菌青山B株 Kirchner-Sy-Ser. 培養 210時間
純アルコール固定後リボ核酸酵素処理

第 7 図



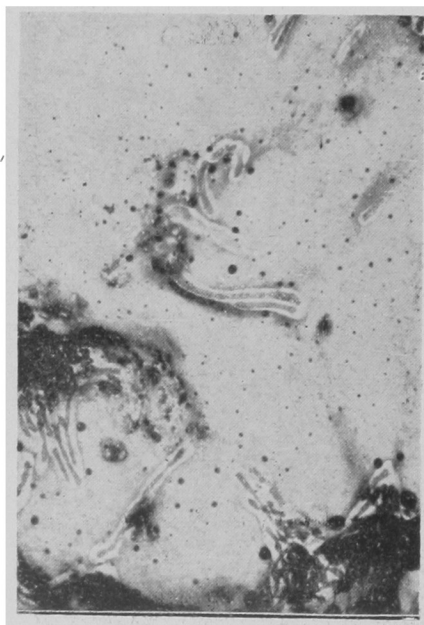
人型結核菌青山B株「S.C.C.」150時間アクトリノーゼ
24時間

第 8 図



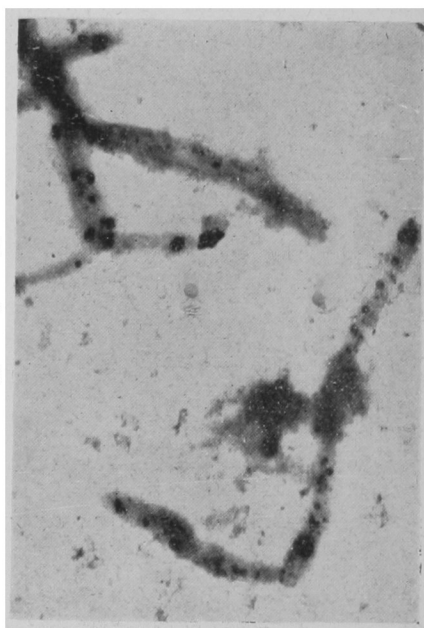
人型結核菌 Frankfurt 株 50~60 日培養 無処理
クローム・シヤード

第 5 図



人型結核菌青山B株「S.C.C.」150時間N塩酸 60°C
4分処理

第 6 図



人型結核菌青山B株「S.C.C.」150時間1%バンク
レアチン 37°C 48時間処理

好性顆粒として見られ、DNA の低分子化が観察され、ここにA小体における高分子 DNA の存在が確認されるのである。C小体は不染色で菌体は淡紫赤色を示した。Gram 染色では菌体は陽性又は陰性のものが見られ、さらに塩酸加水分解後の低分子 DNA を確めるためにリボ核酸酵素処理後ピロニン・メチル緑染色を行うに顆粒は依然ピロニン好性であつて低分子 DNA の存在が確認される。すなわち塩酸加水分解により DNA の低分子化が見られるとともに低分子 DNA は電子透過性であることが理解されるとき同時に RNA の消失乃至稀薄化又は多糖類メタクロマジアが考えられる。

(d) 0.14M 食塩水による RNA 除去²⁵⁾

「S.Co.C.」150 時間の 0.14M 食塩水 37°C, 3 時間処理ではA小体は一部透過性を増しその輪廓のぼけるものも消失するものも見られる。C小体はかなり不明瞭となる。菌体は濃縮され一般に透過性を減じ変形を示すものも見られ、原形質分離の像を示すものが見られる。各種染色において顆粒は認められるも小型化乃至消失の傾向があり、Feulgen 反応陽性で、ピロニン好性を示し、C小体は概ね不明である。菌体は萎縮変形が認められ、Ziehl-Neelsen 染色で赤色、Gram 陰性化並びにピロニン好性消失の傾向が認められる。すなわち DNA の一部低分子化と RNA の稀薄化乃至消失が見られる。

IV 蛋白除去

i) 「S.Co.C.」150 時間の 1%パンクレアチン処理ではA小体は輪廓明瞭であるが、中に変形の見られるものがある。C小体不鮮明で菌体の輪廓はぼけてくる(第6図)。このニンヒドリン及びビュールレット反応は陰性で顆粒は Feulgen 陽性、メチル緑好性で、さらにN塩酸加水分解後ピロニン・メチル緑染色を行うに顆粒はピロニン好性で、A小体の陰影は主に高分子 DNA の投影であることが理解される。

ii) 「S.Co.C.」150 時間のアウトリーゼ 24 時間による除蛋白²⁷⁾ではA小体はかなり透過性を増し僅かに不透過性の小顆粒として見えるところもある。C小体は不規則ではあるが見られ、菌体の外殻には厚い不整形透過層が見られる(第7図)。

なお顆粒は Feulgen 陽性、ピロニン好性の小顆粒として僅かに見られるところもあり、菌体は全般にピロニン好性を失う傾向が見られ、Gram 陰性である。すなわち DNA の溶解、低分子化と RNA の稀薄化乃至消失の像を示す。

iii) Sauton 培地に1ヵ月培養せる集結の40%三塩素醋酸処理による除蛋白では、A小体は不明で菌体は萎縮変形する。各種染色においてそれぞれ顆粒が認められるが小型化の傾向の見られるものもあり、Feulgen 陽性、ピ

ロニン・メチル緑染色で紫赤色顆粒として見えるところもあり、そのニンヒドリン反応は概ね陰性である。ズダンⅢ染色において赤褐色顆粒の認められるものもある。菌体は萎縮変形を示しピロニン好性を示す。

V 鞭毛について

人型結核菌 Frankfurt 株の4%グリセリン・ブイヨン及び Sauton 培地 50 乃至 60 日培養のものにおいて大約半数に鞭毛を有する菌体が見出された(第8図)。鞭毛は極毛で数は1本時に2本で、その長さは5~10 μ 、柔軟に屈曲してはほぼ等間隔にふくらみ²⁹⁾が見られる。普通寒天・ブイヨン・血液寒天・嫌気培養等による雑菌試験はすべて陰性で、集落の性状・発育状況・染色所見は勿論結核菌を否定しうる事実を認めず、抗酸性・抗アルカリ性を示し、Preis³⁰⁾の抗煮沸性試験を行うにKf.7分、そのカタラーゼ試験は泡沫発生20秒、Honsell 法赤染保持であつた。ツベルクリン反応陰性の雄性海狸による動物試験においては極めて毒力弱きもツベルクリン・アレルギーの発現、淋巴腺腫脹を認め、結核結節を発生せしめうるものの如くである。各種抗酸性菌について鞭毛の存在を検討しているが人型結核菌青山B株、牛型結核菌については未だに見出しえない。鳥型結核菌抗研株に同様鞭毛を見出した。

考 按

I 不透過小体

1) A小体は球形時に橢円形を示し、その両端に見られるものは大型のもの多く、中間部には小型ではあるが数個に及んで見られるものがある。A小体とC小体とが接触する部分ではC小体の輪廓に一致してA小体の変形が見られ、又、幼若な伸び行く細胞においてはA小体は延長軸に一致する橢円の形を示すことよりA小体はその条件に適応する如くその形態を変えうる物質からできていることを示す。Knaysi 等⁵⁾はA小体の態度とその構造に関してA小体は外層と中心とが構造上区別され、中心の性状は不詳であるがGiemsa液で赤染され、電子分離に対しては外層より遙かに抵抗が少ないことを述べているが細胞分裂並びに Chromatin 形成機序より考えて核小体如きものの存在を考える外にはA小体の内外兩層構成物質の生化学的組成については著しい相違はないものと思考される。

2) 陳旧培養のものにおいては、A小体は幼若菌に比しその大きさを増大し、大部分は単在であつて菌体の大部分を占拠しているものが見られる。

3) A小体は蛋白に対するニンヒドリン及びビュールレット反応においても、また、ズダンⅢによるリポイド試験においても強陽性を示した。

4) リボ核酸酵素処理では、A小体は消化されず明らかに認められ、菌体はピロニン好性を失い RNA が除かれたものと考えられる。

- 5) A小体はメチル緑好性, Feulgen 反応陽性で, 三塩素醋酸及び1M食塩水にて消失しDNAの存在が立証される。
 - 6) N塩酸加水分解ではA小体は透過性となるも Feulgen 陽性, ピロニン好性顆粒として認められ, DNA の低分子化が観察される。すなわち塩酸加水分解を通じてA小体に存在するDNAは高分子DNAであることが確認されるとともに高分子DNAは明らかに電子不透過性であり, 低分子DNAは電子透過性であることが理解される。
 - 7) 0.14M食塩水ではDNAの一部低分子化とRNAの稀薄化乃至消失が見られる。
 - 8) 1%パンクレアチンではA小体は明瞭に見られ, 菌体の輪廓はぼけてくる。顆粒は Feulgen 陽性, メチル緑好性でA小体の不透過像は主として高分子DNAの投影像であることが解る。
 - 9) いわゆる Ziehl-Neelsen, Gram 及び Much 氏顆粒なるものの本態はともに同一のものでDNAを含むA小体すなわち Chromatin と考えたい。それは次に述べる理由から納得されるであろう。
 - i) 陳旧培養の菌体においてはA小体が菌体の大部分を占拠しているものを多数見るが, これについて上記各種染色を行うに顆粒がそれぞれ明瞭に染色され, その Feulgen 反応は陽性である。
 - ii) C小体は塩基性色素に対し不染色性である。
 - iii) 菌体にリボ核酸酵素処理を実施した後各種染色を行うに顆粒は明らかに認められ Feulgen 陽性, メチル緑好性を示す。
 - iv) 三塩素醋酸処理後各種染色を行うに顆粒は不明となる。
 - v) パンクレアチン処理後各種染色を行うにそれぞれ顆粒が認められ, リボイドを除去した後も同様に顆粒が認められる。
 - vi) 高分子DNAは電子不透過性であり, 低分子DNAは電子透過性である。
 - vii) 不透過性小体と各種染色標本における顆粒とは, 必ずしもその数において一致しない場合がある。すなわち電子顕微鏡所見上のA小体の数が染色標本における顆粒より少ない場合が認められるが塩酸加水分解の例でも解るように低分子DNAは電子透過性であるがこれに対し各種染色を行つて見るとそれぞれ顆粒が認められ, 細胞の増殖過程においても核酸の合成機序と関連して類似の現象は考えられるところである。
- ここにおいて鮮明なる生活環の欠除にもかかわらず今迄に確認しえた種々の知見から, そしてDNAの細胞全体に対する関連性と動的な現象においても細菌細胞の細胞学的意味づけができそうに思われる。すなわち陳旧培養で観察した単在する大型A小体は安定せる静止核であつて, 幼若で分裂の盛んな時期はこれに反してC小体も明らかに, しかも多く認められ, 分裂前期から後期を通

じ核質の原形質内分散が著明に認められ (Hyperchromatose), 次いで分裂終期に入り両極性細胞分体が行われるものと信ぜられる。

II 透過性小体

- 1) C小体は原形質中最も電子透過性であり, その数は数個から20個迄で, 大小不同であり, 原形質中に不規則に連続して存在し, 幼若菌に多く陳旧培養では消失の傾向が見られる。このことは細胞の分裂並びに増殖と密接な関係があることを示すものである。
- 2) A小体との接触部より考える時, C小体は強い内圧を有することが容易に考えられる。
- 3) C小体は化学的及び物理的操作で容易に破壊消失する傾向を有しているようであり, その出現条件について色々いわれている⁵⁾が表層並びに管底培養においても形成されう。
- 4) C小体は塩基性及び中性色素に対し不染色で各種染色において染色された背景を対照として不染色顆粒として認められる。
- 5) 現在迄の微量化学反応を通じC小体には蛋白及びリボイドを証明することはできなかったが多糖類の存在する可能性は大きい。

III ミセル

ミセルは原形質に撒布されているように思われる。Knaysi 及び Baker³¹⁾は *Bac. Mycoides* の原形質膜中に桿状顆粒を, Hillier, Mudd 及び Smith³²⁾は *E. Coli* において原形質そのものの中に存在しているものと考えた。また, Knaysi¹⁵⁾は形態学的に類似の桿状顆粒は原形質膜及び原形質中に撒布されているように見え, これ等の顆粒は大きい複雑な大型粒子であるかも知れぬし, 乾燥によつてもたらされたやや小さい分子の凝集の結果であるかも知れぬが高度の表面活性を示し, 空胞の周囲に集積し Tonoplast を形成すること等を述べているがさきに示した如くリボ核酸酵素処理でミセルは減少消失の傾向を示すことは注目すべきで化学的成分はRNA及びこれに関連する蛋白と密接な関係が考えられ, 抗酸菌の染色性に関する問題とも関連しているように考えられる。すなわち私は菌体の Gram 染色性に関し検討を進めてきたがリボ核酸酵素, アウトリーゼ, 1M食塩水及び0.14M食塩水処理を行い, 電子顕微鏡並びに光学顕微鏡により検討を加えた結果これ等の処理によりRNAの消失乃至稀薄化が見られると同時に Gram 陰性化乃至その傾向が観察され, 且つその電子顕微鏡所見はいずれも形態学的に近似性多く, Gram 染色にはRNAの存在が必要であるように考えられる。なおパンクレアチン並びに40%三塩素醋酸による除蛋白において Gram 陰性化は見られなかった。

IV 細胞膜及び原形質膜

細胞膜の存在については諸家の意見が大体一致してい

るように思われるも、Knaysi等⁵⁾は抗酸菌の細胞膜は粘着性で伸展性に富むことを述べている。私も細胞膜の存在を認めると共に現在迄観察された多くの原形質分離の像等から細胞膜は伸展性に富みしかも原形質の粘性は高いものと考えている。なお原形質膜について言及するならば原形質が好水性膠質を基礎とし種々の表面活性物質を含有することから、その表面に被膜を生ずることは当然でTonoplastもほぼ同様の性質のものと考えられる。

V 鞭毛

人型結核菌 Frankfurt 株、鳥型結核菌抗研株に鞭毛を有する菌体を認めた。この Frankfurt 株の鞭毛においては手振法による試料作製過程より考え、著しく強靱であることは想像に難くない。若い培養では見出されないで 50 乃至 60 日の古い培養のものに多数認められたことは、成熟して Ectoplasma が発達しこの時代には特に補助運動器官としての鞭毛の存在が生活の適応と分化の上に必要なのではなからうか。

結 論

- 1) 人型結核菌には細胞膜と多くのミセルを含有する原形質と電子不透過性小体及び透過性小体とが存在する。
- 2) 不透過性小体は 1 乃至数個で、DNA、蛋白及びリポイドが証明され Chromatin と考えられ、分裂期には原形質内分散が見られる。不透過性陰影は主として高分子 DNA の投影である。
- 3) 透過性小体は若い培養では明瞭に多数認められ、強い内圧を有し、塩基性並びに中性色素に不染色で、蛋白及びリポイドを証明することはできないが、細胞の分裂、増殖と密接な関係を有するもののようである。
- 4) 菌体には RNA 及び多糖類の分布が認められる。
- 5) いわゆる Ziehl-Neelsen, Gram 及び Much 氏顆粒なるものの本態はともに同一のもので Chromatin に由来するものである。
- 7) Gram 染色性は菌体に分布された RNA の介在と密接な関係があるものと考えられる。
- 6) 人型結核菌 Frankfurt 株、鳥型結核菌抗研株に鞭毛を有する菌体を見出した。
(本研究に御懇篤なる御指導と御校閲を賜った慶大石田二郎教授、同牛場大蔵教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、旧ミノファージェン製薬研究部長市川収博士の御好意ある御教示を深謝し又、電子顕微鏡使用の便を供された日本専売公社秦野たばこ試験場病虫部長日高醇博士の御厚情を謝し併せて増井準治学士並びに杉山育男弟兄の御助力に謝意を表す。

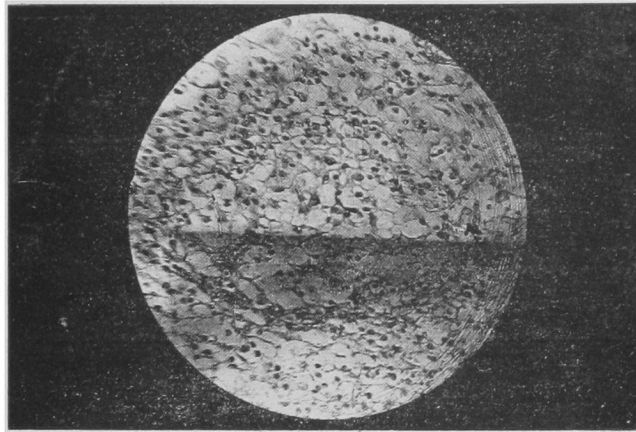
本論文の一部は第 26 回日本結核病学会総会において口述した。なお本研究に対しては厚生省より研究費の補助を受けたことを附記しここに感謝の意を表す)

文 献

- 1) Mudd, S., Polevitzky, K., and Anderson, T.F. : Arch. Path., 34 : 199—207. 1942.
- 2) Lurie, M., Knaysi, G., and Mudd, S. : Unpublished, 1942.
- 3) Rosenblatt, M.B., Fullam, E.F., and Gessler, A. E. : Am. Rev. Tuberc., 46 : 587—599. 1942.
- 4) Scanga, F. : Rend. Ist. Super. Sanità, 11 : 970—979. 1948.
- 5) Knaysi, G., Hillier, J. and Fabricant, C. : J. Bact., 60(4) : 423—447. 1950.
- 6) 伊藤・増井 : 医療, 5(2) : 47—48. 1950.
- 7) Günther : D.M.W., 1887 : 471.
- 8) Hucker : Agric. Exp. Stain Technol., 128 : 1—34. 1927.
- 9) 伝染病研究所学会編 : 細菌学実習提要, 143. 1951.
- 10) Brachet, J. : Compt. Rend. Soc. Biol., 133 : 88. 1940.
- 11) Feulgen, R., Rossenbeck, H. : Z. Physiol. Chem., 135 : 203. 1924.
- 12) Stowell, R.E. : Stain Technol., 20 : 45. 1945.
- 13) 江上不二夫編 : 核酸及び核蛋白質
- 14) Pollister, A.W., Ris, H. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12 : 147. 1947.
- 15) Schneider, W.C. : J. Biol. Chem., 161 : 293. 1945.
- 16) Mirsky, A.E., Pollister, A.W. : Proc. Acad. Sci. 28 : 344. 1942.
- 17) Mirsky, A.E., Ris, H. : J. Gen. Physiol., 30 : 117. 1946.
- 18) Kunitz, M. : J. Gen. Physiol., 24 : 15. 1940.
- 19) Brachet, J., Shaver, J. : Stain Technol., 23 : 177. 1948.
- 20) Boivin, A., Tulasne, R., Vendrely, R., Mineck, R. : Arch. Sci. Physiol., 1 : 307. 1947.
- 21) Erickson, R.O., Sax, K.B., Ogur, M. : Science, 110 : 472. 1949.
- 22) Vendrely, C. : Compt. Rend., 228 : 606. 1949.
- 23) Pouyet, J. : Compt. Rend., 228 : 608. 1949.
- 24) 柴谷 : 動物雑誌, 58 : 199, 1949.
- 25) Kerr, S.E., Seraidarian, K. : J. Biol. Chem., 180 : 1203. 1949.
- 26) Stowell, R.E., Zorzoli, A. : Stain Technol., 22 : 51. 1947.
- 27) 市川 : 畜産の研究, 4(9) : 513—516. 1950, 4(11) : 735—739. 1950.
- 28) 伊藤・増井・杉山外 : 結核, 26(9, 10, 11) : 475—476. 1951.
- 29) Weibull, C. : Acta Chem. Scand., 4 : 268—276. 1950.
- 30) Preis, W. K.L. Wschr., 43 : 1922.
- 31) Knaysi, G., and Baker, R.F. : J. Bact., 53 : 539—553. 1947.
- 32) Hillier, J., Mudd, S. and Smith, A. G. : J. Bact., 57 : 319—338. 1949.

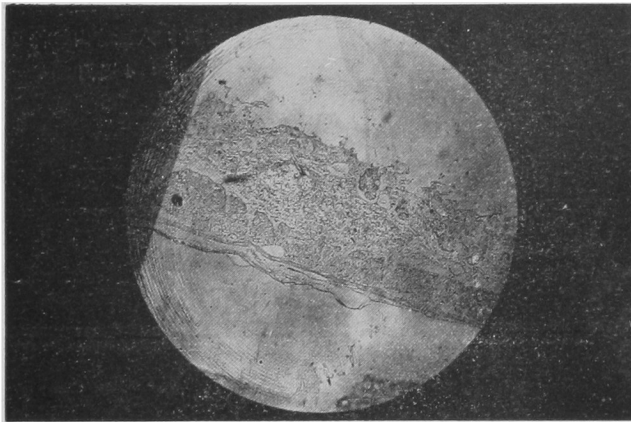
- 1) Mudd, S., Polevitzky, K., and Anderson, T.F. :

写真1 第Ⅱ群（7週 SM 群）の腸粘膜



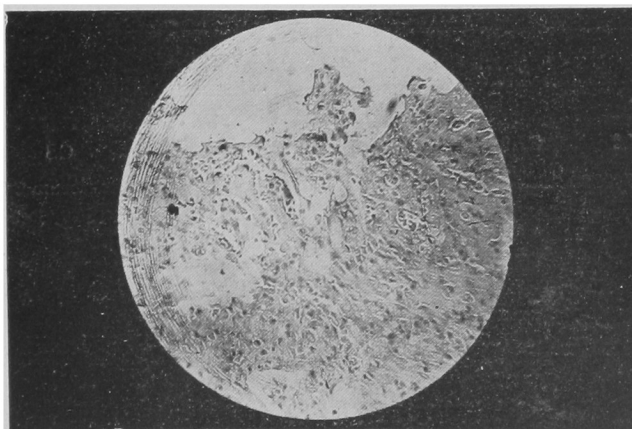
細網状類上皮細胞及び線維素様物質が疎なる網状を形成す

写真2 第Ⅱ群（7週 SM 群）の腸粘膜



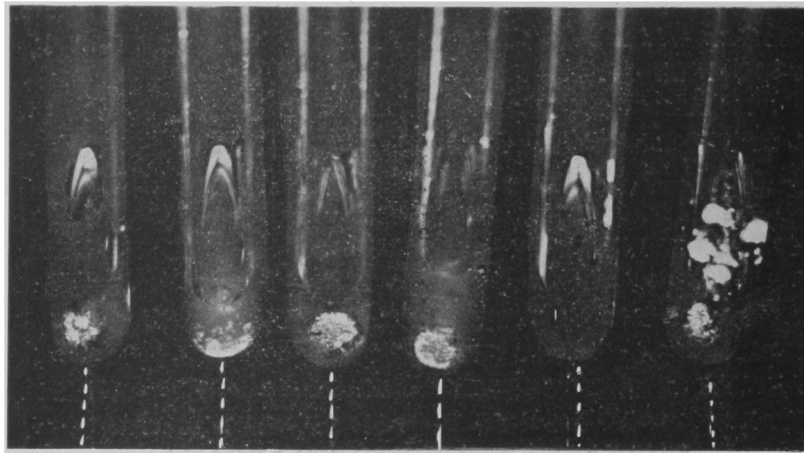
絨毛の一部剝離して粘膜面荒廃す

写真3 第Ⅳ群（15週 SM 群）の腸粘膜



粘膜の表層に結締組織芽細胞増殖し肉芽を形成す

写真Ⅰ Lecithin 加培地における結核菌の深部発育



L1

L2

PL1

PL2

L0

K

L1.....Lecithin 0.01% 加培地

L0...Kirchner 原液

L2.....Lecithin 0.02% 加培地

K...Kirchner 血清加培地

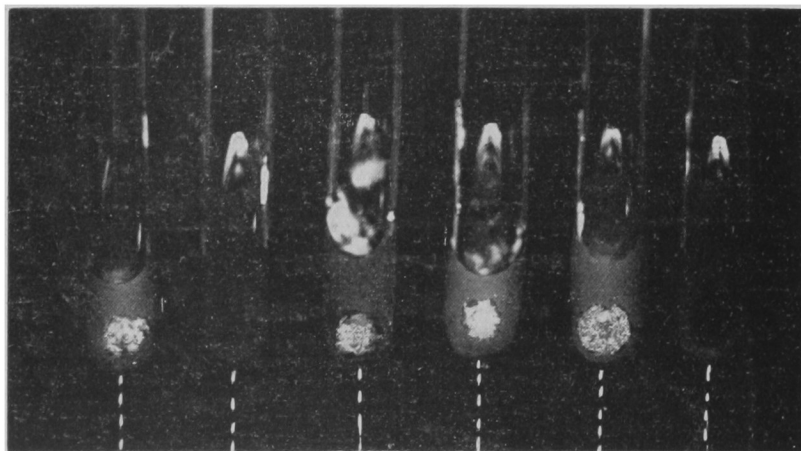
PL1.....Polytamin 及び Lecithin 0.01%加培地

接種菌：人型青山B株 $10^{-3}mg$

PL2.....Polytamin 及び Lecithin 0.02%加培地

培養：4週間

写真Ⅱ Glycogen 培地における結核菌の深部発育



GL2

GL0

GPPSL2

GSL2

GPS

GS

GL0.....Glycogen 培地

GPS...Glycogen-Pantothenate-Serum 培地

GL2.....Glycogen-Lecithin 培地

GPPSL₂...Glycogen-Pantothenate-Polytamin-
Lecithin-Serum 培地

GS.....Glycogen-Serum 培地

接種菌：人型青山B株 $10^{-3}mg$

GSL2 Glycogen-Lecithin-Serum 培地

培養：4週間