

結核菌およびその他のミコバクテリウムの形態および発育様式に関する研究補遺

1. 塩基好性の菌体と異染性顆粒

植 田 三 郎

京都大学結核研究所細菌血清学部

受 付 昭 和 31 年 10 月 9 日

結核菌ないし一般ミコバクテリウムの発育様式と、発育に伴う形態、染色性の変化、推移に関する所見、およびそれについての著者¹⁾の判断は、すでに繰返し公にした。すなわち発育極初期の集落の貼付標本の染色所見から判断できることは、鎖状の配列およびそれから出た多数の側枝、これらの配列の先端に常に位置を占める易染性の菌体……非抗酸性であることもあり、また場合によつては易染性であると同時に多少とも抗酸性であることもある……こそは発育に直接関与する細胞として重要視せなければならないということである。

もちろんこのような判断を下すためには、配列の様式に注意したことは因よりであるが、同時にまた、そのような位置の細胞のグラム染色性、ハイデンハイン染色性、新鮮標本中での染色性、テルール酸還元性等を斟酌したことは言うまでもない。これだけでも上述のような判断が充分可能であると考えるが、しかしながらこのような判断に更に一層確かな拠りどころを附加することができたならばと考えて、表題のような観察を試みた。

結核菌ないしミコバクテリウムの菌体内顆粒については、種々な染色法による、あるいはまた位相差顕微鏡、電子顕微鏡による観察が少なくないが、その中では異染性顆粒に関する最近の Wintersheid a. Mudd²⁾³⁾の観察がまず注意を引く。氏はさきに位相差顕微鏡で見出しミトコンドリアではなからうかと推察した菌体内顆粒を、さらに染色の方法で検討した。すなわち T.T.C. および N.T.C. を還元してそれぞれ特異の色調に染め出される顆粒を観察し、これらの顆粒がまたよく熟した Löffler メチレン青の稀釈液によつても異染性を示すことから、ミトコンドリアであることの確信を強めた。

下記の成績は、氏らの染色法を多少変化せしめ、しかもそれを上述の如く著者が従来慣用してきた発育極初期集落の貼付標本に適用して得たものであるが、それによれば、配列中の多数の菌体は塩基好性の顕著なものとするのでないものと明らかに区別でき、しかも異染性顆粒はほとんどこのような塩基好性の菌体の内部にのみ存在した。しかもこのような菌体は、発育に直接関与する菌体として著者が従来重要視してきたところの菌体、すな

わち配列の先端に常に位置を占める易染性の菌体そのものであることを知った。

I 材料および方法

菌株。人型菌としては H₃₇Rv および F 株、鳥型菌としては鳥京株、非病原性のミコバクテリウムとしてはスメグマ菌を供試した。

N.T.C.による染色。上記の各菌株の稀薄な菌液の1滴をキルヒナー培養基に混じて37°Cに置き、肉眼で辛じて認めうる程度の初期菌膜が発育した時に、0.1%のN.T.C.液を培養基中に%の割合に成るように静かに加えた。37°C 2時間放置の後、型の如く小型の白金スパーテルで初期菌膜を掬いとり、予め載物硝子上に置いた1滴の蒸溜水中に静かに浮かせた。孵卵器内で乾燥せしめ、初期菌膜が載物硝子の面に固着、貼付せられてから、純アルコールで固定した。多くの場合このままで油浸検鏡したが、菌体の輪廓が不鮮明な時は、1%サフラニンで数秒間染色後検鏡した。

稀釈 Löffler メチレン青液による染色。まず発育初期菌膜を上記同様にして載物硝子に固着、貼付してエタノールで固定した。Löffler メチレン青のよく熟したものを用意し、蒸溜水で100×に稀釈した液でまず1分間染色し、次で1%エオジン水溶液(pH 3.5)で1分間処置した。

ヤーヌス緑による染色。上記と比較するため念のために試みたのであるが、1,000×液を用いてN.T.C.の場合と同様に実施した。

II 成 績

1. N.T.C.による染色

言うまでもなく、菌型、菌株によつて配列に粗密の差があり、したがつて観察に多少の難易はあつたが、いずれの菌型、菌株を問わず、N.T.C.に染まる顆粒は、概して配列の先端に位置する菌体の内部にのみ観察でき、配列の基部に連る菌体内には見ることはできなかつた。最も観察が容易であつたスメグマ菌の場合を示せば図1の如くであつた。

顆粒には大小、濃淡があり、かつ配列のそれぞれの位置の菌体内のその数もまた必ずしも一定ではなかつたが、概して言えば、配列の最も先端に位置する菌糸形内には通常2コ、続く桿状形内には多くの場合その両極に1コあて計2コ、さらに続いて連つた桿状形内では、上記桿状形と同様であるか、あるいは一端にただ1コであつた。因みに短小な発芽の内部には通常顆粒を見なかつた。これらの細胞の後に連つた多数の桿状形内には通常顆粒を見ることはできなかつた。

2. 稀釈 Löffler メチレン青液による染色

a. 塩基好性の菌体

上記のような染色法を用いてまず注意を引いたことは、配列中の多数の菌体が青染するものと淡く赤染するものとに劇然と2種類に分れたことであつた。くわしく言えば、配列の先端に位置する菌糸形、続いて連る1ないし2コの桿状形およびそれからでた発芽は青染して塩基好性を示したにもかかわらず、これらの形態の後に連つた多数の桿状の形態はすべてエオジンによつて淡赤色に染まつた。多少観察に難易の別はあつたが、上記の所見は供試したいずれの菌型、菌株にも共通したものであつて、従来著者が易染性の菌体として重要視してきたものは、ここに見た塩基好性の菌体に該当することを知つた。因みにこの塩基好性は0.05% RNase 55°C 30分間および N-HCl 60°C 10分間の処理後にはほとんど消失した。

b. 異染性顆粒

上記の染色法によつて、図2, 3, 4に示した如く、配列の先端に在る細胞内に異染性で赤紫色に染まつた円形顆粒が明瞭に出現した。その位置および数は上記N.T.C.還元性の顆粒とほぼ一致した。すなわち配列の最先端の菌糸形においては、その前端に近く1コ、その後端に近く1コ計2コを見、続いて連つた1ないし2コの桿状形においては、その両極にそれぞれ1コあて計2コを見た。続いて連つた桿状形すなわち通常発芽を完了した桿状形においては、その一端すなわち発芽のでた方の端部にただ1コの顆粒を見たにすぎない。しかしてこれらの後に連つた多数の桿状形は上記の如く後染色のエオジンによつて淡赤色に染まつて塩基好性を示すことなく、また異染性の顆粒をも示さなかつた。因みに短小な発芽の内部には異染性顆粒を見ることはできなかつたが、そのやや発育伸長したものでは、上記菌糸形におけると同様に2コの異染性顆粒を示した。因みにこのような異染性顆粒は細胞質の塩基好性と同様に、0.05% RNase 55°C 30分間 および N-HCl 60°C 10分間の処理後には、上記の染色法によつては出現しなかつた。

なおヤーヌス緑によつては、顆粒状の染色はほとんど起らず、むしろ菌体の染色が起つた。

III 総括ならびに考案

通常の塗抹の方法で作られた標本中に分散する個々の菌体について、その形態、染色性ないしはその内部微細構造を観察、検討することにも因り興味があると思ふが、このような方法においては、それぞれ個々の菌体について観察できた所見は、当該菌体についてのみ云々できるものであつて、標本中に散在する多数の菌体の多少ずつ違つた所見を結び合せて考察を加え、一貫した系統立つた理解をうることは到底困難である。これを敢てしようとしたことが、今日見るように結核菌の形態、染色性、発育様式の理解に混乱を招いた因ではないかと考える。著者はこの点を特に顧慮し、従来専ら発育極初期の集落の貼付標本を作つて、発育してできたままの配列中のそれぞれの位置の菌体を順を追つて観察することから、結核菌ないし一般ミコバクテリウムの発育様式を、また同時に発育に伴うそれぞれの菌体の形態、染色性の変化、推移を考察、理解しようとした。その結果は、鎖状に連り、さらにまた鎖状に配列したそれぞれの菌体から側枝状の配列を出す。この特異な配列こそは、結核菌ないし一般ミコバクテリウムの特殊な発育様式を端的に示すものであつて、しかもこのような配列の先端に常に位置を占める菌体は、それらの後に連る多数の菌体とは、その形、染色性が顕著に相違するところから、このような易染性の菌体こそ、発育に直接関与するものとして重要視すべきことを強調した。

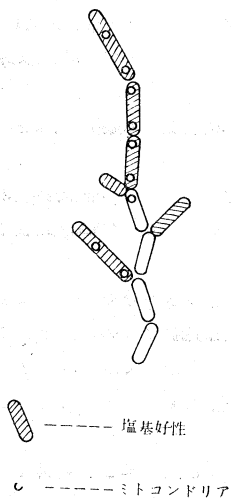
今回もまた従来とほぼ同様な観察方法を用い、しかもそれに上記のような染色法を組合せて検討したのであるが、その結果は、従来易染性の菌体として注意してきたものは、上記のような染色法によつてもまた、それらの菌体の後に連る多数の菌体とは顕著に染色性を異にし、その細胞質は塩基好性であつて、異染性顆粒もまた概してこのような細胞の内部にのみ観察した。すなわちこのようにして、配列の先端に常に位置を占める易染性の細胞こそは発育に直接関与する細胞であろうとする考え方に、さらに一つの有力なよりどころが与えられた。

それぞれの所見を今少しく詳しく吟味したい。Winterscheid a. Mudd は結核菌菌体内に還元能の強い、異染性の顆粒を見出して、これこそはミトコンドリアに相違ないと判断した。著者は氏らの方法を変化せしめ、上述のように高度に稀釈した Löffler メチレン青液による染色に、さらにエオジン(あるいはコンゴレッド)による後処置を加えることを試みた。しかもこのような染色法を配列の正しい発育極初期の集落の貼付標本に適用した結果は、異染性顆粒の染色像を鮮明にすることができただけでなく、配列の先端に位置する細胞は塩基好性であるにもかかわらず、それらの細胞の後に連る多数の細胞はほとんどないしは全く塩基好性を欠くことを知るこ

とができた。しかも異染性顆粒はほとんど常にこれら塩基好性の細胞の内部にのみ観察することができた。すなわちこのような塩基好性の細胞質内に還元能の強い、酵素活性の顕著な顆粒……恐らくはミトコンドリアであろう……を持つ細胞が、それらのいずれをも欠除するところの配列の基部の多数の細胞と同列には論ぜられない重要なものであることは容易に理解せられる。

このような細胞の内部における異染性顆粒の態度、消長を追跡することはさらに興味深い。図5は鳥型菌の場合を横型図として示したものであるが、配列の最先端の菌糸形では、顆粒は通常中央部やや前端寄りに1コと後端よりに1コ計2コを見る。続いて連る1ないし2コの桿状形では、顆粒は両端に1コあて計2コを見る。続いて連る桿状形すなわちこの位置の桿状形から通常発芽しつつあるが、顆粒は発芽には移行せないで、発芽を出した側の桿状形の端部にただ1コ残存する場合が往々ある。以下に連る多数の桿状形の内部には顆粒を見出すことはできない。因みに発育して上記菌糸形と同様に伸長した発芽では、上記菌糸形と同様の位置に2コの顆粒を見るのが通常である。

図 5



よく熟した Löffler メチレン青液の稀釈液を用いた場合に、このように異染性を示しつつ染め出される顆粒が、T.T.C. あるいは N.T.C. を用いた場合に染め出される顆粒と完全に一致するかどうか、また稀釈 Löffler メチレン青液では果して異染性顆粒のみが選択的に染め出されているかどうか、あるいはまたこれらの方法による染色像とヤーマス緑によるそれとが全く異なるのは何故か等々なお検討の余地が残されているが、いずれにしても、上述の所見からすれば、菌糸形は、異染性顆粒を欠くところのその前半分よりは、それを持つところの後半分の方がより成熟した部分であると見做すことができよう。次に連る桿状形は菌糸形の後半分と全く同一の染

色像を呈するところからみても、菌糸形の後半分が分節してできたものということは考え易い。この桿状形はやがてさらに成熟して後発芽する。しかしてこれらの塩基好性、易染性の細胞の後に連るところの多数の細胞、すなわち既に発芽を完了した細胞は、その配列中の位置から判断しても、またそれらの細胞がほとんどないしは全く塩基好性をも欠き、また酵素活性が強いと見られる上記のような異染性顆粒をも欠除することから見ても、これらの細胞は発育に直接関与する細胞であるというよりは、むしろ既に生活物質……核物質については次編に譲るが……を失った細胞と見做さざるをえない。

上記においては、抗酸性との関連については触れなかつた。それは次のような理由からである。すなわち従来繰返し論じたように、抗酸性なる染色性は本来細胞の一次的な基本的な染色性というよりは、むしろ細胞の変性に伴って出現する二次的な染色性とも見做すことができるだけになしに、後編にもまた吟味するように、この染色性の所在が問題視せられ、果して細胞質そのものの染色性であるかどうか疑われるからである。

結 論

発育極初期の集落に N.T.C. を添加して、還元能の強い顆粒を配列の先端に位する菌体内にのみ観察した。高度に稀釈した Löffler メチレン青液で短時間染色し、エオジン水溶液で後処置する方法によつてもまた、異染性顆粒を鮮明に染め出すことができた。

しかもこれらの方法によれば、配列の先端に位置した菌体は常に塩基好性であつて、その内部に異染性顆粒を蔵したにもかかわらず、これらの菌体の後に連つた多数の菌体はほとんど塩基好性を示さず、異染性顆粒をもまた持たなかつた。

これらの所見は、配列の先端に位置する易染性、塩基好性の菌体こそは、発育に直接関与するものとして重要視すべきことを示すと同時に、これらの菌体に立脚してこそ初めて結核菌(ミコバクテリウム)の発育様式が理解できることを示すものと考えられる。

文 献

- 1) 植田：結核菌の研究 1. 形態及び発育様式(昭和28年. 南江堂)
Rev. Tuberc., T. 19, N^o 8~9, 984~1001, 1955.
- 2) Mudd, S., Winterscheid, L.C., DeLamater, E.D., a. Henderson, H.J.: J. Bact., 62, No. 4, 459, 1951.
- 3) Winterscheid, L.C. a. Mudd, S.: Am. Rev. Tuberc., 67: No. 1, 59, 1953.

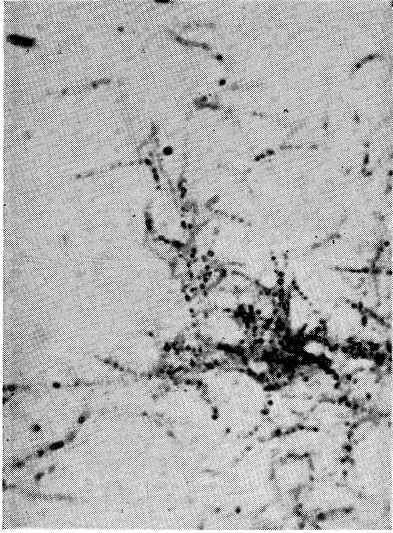


Fig. 1 スメグマ菌発育極初期菌膜, N.T.C.添加2時間後貼付, 固定, 1,500×

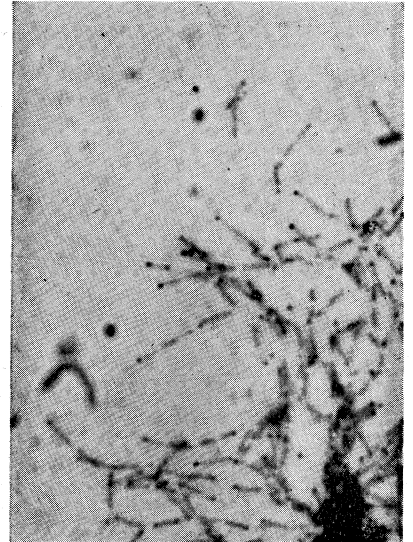


Fig. 2 スメグマ菌発育極初期菌膜, 貼付, 固定後, 100×レフレル, メチレン青液1分間, 1%エオジン液 (pH 3.5) 1分間染色, 1,500×

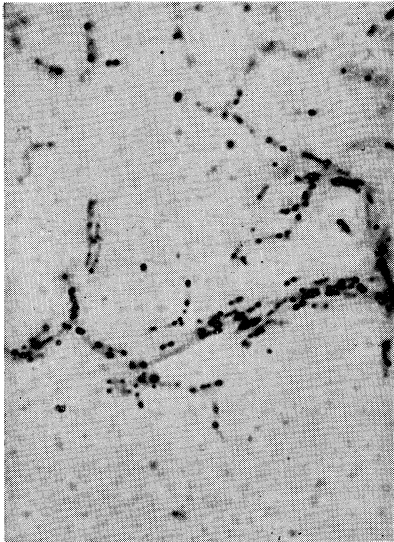


Fig. 3 鳥型鳥京株発育極初期菌膜, 同上



Fig. 4 人型H₃₇Rv発育極初期菌膜, 同上