

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

2. 核小体

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

前回の報告¹⁾で、発育極初期の集落の貼付標本について観察した結果は、常に配列の先端に位置する細胞のみが、塩基好性を示し、かつ同時に異染性顆粒を持つところから、これらの細胞は、それらの後に連る多数の細胞……塩基好性でなく、異染性顆粒もまた持たない……とは明らかに区別せられねばならないことを指摘した。しかもこれらの塩基好性の細胞は、著者²⁾が従来発育に直接関与する細胞として重要視せなければならぬことを主張してきたところの、配列の先端の易染性の細胞によく一致することを知り、これら易染性の細胞を立脚点とする発育様式の考え方に、さらに一つの新しいよりどころを附加することができた。

今回はさらに進んで、細胞の生活、発育上より一層基本的な不可欠の要素であるところの、核物質ないし核小体の所在を明らかにして、発育様式の考察に資したいと考えて、下記のような観察を試みた。

ミコバクテリウムないし結核菌の核物質の観察にも、一般細菌の場合とほぼ類似の方法が利用されている。すなわち染色法、および位相差顕微鏡、電子顕微鏡による観察の方法がそれであつて、すでに多数の研究者によつて、種々考案、工夫を加えつつ活用せられている。それはいうまでもなく、Feinberg(1900)、Nakanishi(1901)、Minder(1916)、Kirchenstein(1922)、Knaysi(1929)、Roman(1930)、Hollande(1932)、Lindergren a. Mellon(1932)、Lewis(1941)ら多くの先進研究者の流れを汲むものであるが、染色法としては、Piekarskiの方法すなわち塩酸加水分解後に Feulgen 反応を試みる方法、また Robinowの方法すなわち加水分解後にギムザ液で染色する方法、および Lewisの方法すなわち塩酸処理後に Löffler のメチレン青液で染色する方法等、従来一般細菌でよい結果を与えた方法が、ミコバクテリウムにもしばしば利用せられている。しかも最近はいくつかの染色法で得た所見を、位相差顕微鏡、電子顕微鏡の所見と対比して検討することか試みられ^{3)~7)}、またさらには、在来の各種染色法例えばメチレン青単染色法、グラム法、ムツフ法、チール・ネールゼン法で観察できる各種の顆粒との異同が論議せられている^{8~11)}。

このような観察、吟味の結果は、一応の結論に近付きつつあるやにも思われるが、ミコバクテリウムに関する限りは、残念ながら、染色法においても、またその他の方法においても、未だ的確に核物質ないし核小体を捕捉できたというところまでは行っていないように思われる。核染色法の考案、吟味そのものは、この研究の直接の目的ではないが、Chance¹²⁾が四連菌の核および Cell wall の染色のために考案した方法から多少暗示をえて、少し違つた立場から染色法に多少考案を加えたところ、たまたま下記のような鮮明な所見を与える染色法を得たので、この染色法を前回の報告と同様にして、発育極初期の集落の貼付標本に適用した結果は、核物質は配列中の多数の菌体のすべての内部に常に見るものではなく、配列中一定の位置、すなわち配列の先端に在る少数の細胞内のみ限つて存在するを知つた。このような事実およびその際の核物質の状態、数等に関する所見は、著者の従来からの発育様式の考え方を支持するように思われた。

I 材料および方法

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

発育極初期菌膜の貼付標本。前回の報告と同様、上記各菌株の菌液の 1 滴をキルヒナー培養基に加えて 37°C に置き、それぞれ適当な日数の後、肉眼で辛じて認めうる程度の初期菌膜が発育を始めたとき、小型の白金スパークルで掬いとり、予め載物硝子上に置いた 1 滴の蒸溜水中に静かに浮べ、そのまま孵卵器内に静置、乾燥せしめて初期菌膜を硝子面に固着せしめ、貼付した。純アルコールで固定後染色に供した。

核染色法。(a) 60°C の 1 規定塩酸中に 10 分間放置して後、流水中で 5 分間水洗。1% クリスタル紫水溶液 (pH 3.5) で染色……非病原菌は 3 分間内外、鳥型菌は 5 分間内外、人型菌は 10 分間内外。水洗。1% コンゴレッド水溶液 (pH 3.5) で 1 分間内外処理。水洗。

(注) 色素(結晶)を乳鉢中でよく磨砕しつ、適量量の pH 3.5 の

蒸留水を滴下して溶解せしめ、一旦濾紙で濾過したものを染色液として使用した。

(b) 塩酸による処理は(a)と同じ、1%クリスタル紫水溶液(pH 7.0)で30秒間染色。軽く水洗。1%コンゴレッド水溶液(pH 3.5)で1分間内外処理。水洗。

(c) 塩酸による処理は(a)と同じ、20×ギムザ液で30秒間染色。1%コンゴレッド水溶液(pH 3.5)で1分間内外処理。水洗。

上記3種の染色法中(a)が最も鮮明な像を与えたが、(b)(c)もまた劣らず興味があつた。このような簡単な考案によつて、鮮明な染色像をえたところから見ると、在来の染色法で今一步分明的な像を得難かつたのは、ギムザ染色液にしても、また他の染色液にしても、pH7.0内外の一般にやや濃厚な染色液を比較的長時間作用せしめ、しかも酸性色素液による後処理を試みなかつたことにあるいは原因したのではないかが疑われる。非病原性ミコバクテリウムが多くは、そのような方法によつても、核を辛じて認めえないことはないが、病原性のミコバクテリウムでは、細胞質が濃染するため、核の観察を困難ないし不可能にする……特にpH 7.0前後の染色液を用いるときにこのことが顕著である。塩酸処理時間を短縮すれば、その傾向はいよいよ強くなる。逆に処理時間を延長すれば、細胞質の染色性が消失する時核の染色性もまたほぼ同時に失われる。このところにミコバクテリウム特に病原性のミコバクテリウムの核染色の困難があるようであるが、上記3種の染色法はこのような困難を或程度回避しえた。

II 成 績

スメグマ菌。

上記の染色法のいずれによつても、他の菌型よりも分明的な所見を与えた。これは一つには、その配列が本来やや粗であつて、一般に観察が容易なためであるとも思われたが、図1にも明らかのように、配列の最も先端に常に位置を占める菌糸形は、よく發育、伸長したものである。その前端に近く1コ、後端に近く1コ計2コの濃染した一般に円形の核小体を見るのが通常であつた。後端に近い核はほとんど常によく濃染したが、前端に近いものは往々引伸ばされたような形であつたり、あるいは淡染するにすぎないような場合もあつた。また前端の核は、菌糸形の前端部が分節した時には、相接する2コの核として出現した。菌糸形に続いて連る1ないし2コの桿状形では、それぞれその中央部よりは前、後端のいずれかに偏つて、濃染した1コの核を見た。さらに続いて連つた桿状形内には、もはや核を見ることはできず、その前、後端のいずれかから出た発芽のうちには、必ずといってよいように、相接した濃染した2コの核を観察した。以下に連る多数の桿状形の内部には、もはや核小

体を見ることはできなかつた。ただしそれらの桿状形からでた発芽は、やや發育、伸長したものでは、2コの核がその前、後端に分れて存在したことは、上記菌糸形におけると全く同じであつた。また比較的長い側枝を出した場合は……その中の配列は上記主幹の配列と全く同様であつたが……その先端部の菌糸形、続く1ないし2コの桿状形内に、上記と同様な数および配置の核を見た。

因みにこの染色性は、0.05% RNase 55°C 30分間の処理によつても著しくは影響せられなかつた。

鳥型菌。

(a)の染色法で比較的分明な所見をえた。配列がスメグマ菌に比較して本来やや密であるために、また上記の如き塩酸処理後にもなお、配列先端部の細胞の塩基好性が多少とも残つたために、観察は必ずしも常に容易ではなかつたが、配列の比較的粗な集落の部分を選んで観察した結果は、図2の如くであつて、所見は概して上記のスメグマ菌に近似であつた。

すなわち配列の先端の菌糸形内には通常その前、後端にそれぞれ1コあて計2コの核を見、前端部が分節したものである、その部の核は相接した2核として現われた。菌糸形に続いて連つた1ないし2コの桿状形内には通常1コの核を見たが、これらの後に続いて連つた多数の桿状形内には、核を見出すことはできなかつた。因みに発芽は菌糸形の前端部の分節したものと同様であつて、常に濃染した相接した2コの核を示した。集落全体として見たとき、發育極初期の集落であつたにもかかわらず、核を持たない細胞が大多数を占め、一部少数の細胞すなわち上記の如くそれぞれ配列の先端に位置した細胞のみが核を示したことは注意を引いた。

人型菌。

菌体が一般に短小であり、しかも發育初期集落中でもすでに徐々にコードを形成しつつ出現する傾向が顕著であつたために、配列中の菌体を順を追つて観察することが、上記鳥型菌よりもさらに一段困難であつたが、初期集落ないしコードの固縁部の配列の比較的粗な部分を選んで観察した結果は図3の如くであつた。

(a)の染色法がやはりこの場合もまたよい成績を与えた。所見は概して上記の鳥型菌に類似し、菌体は仮令短小ではあつても、配列の最先端の菌糸形内には通常2コの核を見た。続く1ないし2コの桿状形内に1コの核を見た。また発芽の内部には相接した2核を見た。これらの細胞の後に連つた多数の細胞内には核を染め出すことはできなかつた。集落全体として見た場合、核を持つた細胞に比較してそれを持たない細胞の数が意外に多いことが注意を引いた。

III 総括ならびに考案

上記のような染色法で種々の時期の核物質が剥すとこ

ろなく染め出されているかどうか、なお多少疑問の余地がある。しかも他方、このようにして染め出された小体が確かに核であると断定するためには、DNaseによる処理に際してこの小体がどのような態度をとるかを確かめる必要があることはいままでのない。この点はまた後程報告したいと思うが、ミコバクテリウムに関する限りは、このような小体のDNase処理に対する態度は、他の一般細菌、細胞の核とは大いに趣を異にすることだけを附記するに留めたい。

いずれにしても、このような小体はその染色性、形、配置等から見て、核と見做してまずまず大過ないものではないかと思う。特に下記において吟味するように、発育様式の考察からしても、この小体を核と判断して著しい不都合がないというよりも、むしろそのように判断するのが自然なように考えられる。

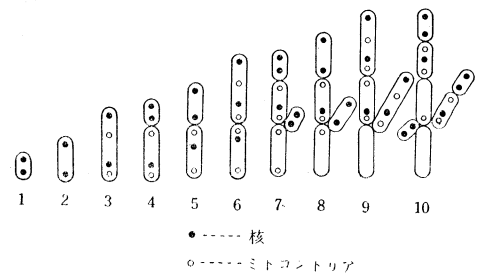
発育初期集落の配列中のすべての菌体がこのような核小体を示すのではなく、それは必ず配列の先端に常に位置を占める細胞の内部にのみ見られる。すなわちこのような細胞は従来著者が易染性の形態として重要視してきた細胞であり、また前回の報告で塩基好性の細胞質を持つことを指摘した細胞である。すなわちこれらの易染性、塩基好性の細胞内には、このようにして核を見ることができるともかかわらず、これらの細胞の後に連る多数の細胞の内部には核を染め出すことができないということは、興味ある所見といわねばならない。かくてこれらの易染性、塩基好性の細胞のみがミコバクテリウムの生活、発育に直接関与する細胞であるとする著者の従来からの判断に、動かすことのできない一つの新しいよりどころが追加せられたことになる。

次にこのようにして見出した核物質の態度と発育様式との関係を眺めることは、極めて興味深い。すなわち主幹の連鎖状の配列にしても、またそれから分れて出た多数の側枝様の配列にしても、そこに配列する多数の細胞のうちで、常に配列の先端部に位置を占めるのはやや長い形の菌糸形であるが、この菌糸形の内部では、前端に近く1コと後端に近く1コと計2コの核を見るのが通常である。後端に近い1コの核はほとんど毎常濃染して分明に観察できるが、前端に近い核は濃染する場合ももちろんあるが、また淡染して観察のやや困難な場合もある。このように菌糸形の前端に近く存在する核の態度は興味があつて、菌糸形の前端部が分節、分離する際には、その部分は全体として濃染するか、ないしは濃染した相接した2コの核を示す。菌糸形に続いて連る1ないし2コの桿状形では、核は常に1コであつて、桿状形の前、後端のいずれかに偏つて存在する……核が偏在することは発芽の様式と関連して眺めると興味がある。更に後に続いて連る桿状形、通常この位置の桿状形から小さい発芽が出るが、桿状形の内部にはすでに核を見ないで、小さ

い発芽の内部に濃染した相接した2核を見る。続いて連る桿状形内にも核は存在せずして、それから出たやや発育、伸長した発芽内では2コの核はそれぞれ前、後端に分れて位置しようとする傾向を示す。以下にさらに連る多数の桿状形はいずれも核を示さず、それぞれから出た側枝様の配列中では、上記の主幹の配列中におけると全く同様に、やはり配列の先端部の細胞すなわち菌糸形それに続く1ないし2コの桿状形および発芽のみが核を保持する。

上述のことをスメグマ菌について模型図として示せば図4の如きものとなる。なお前回報告の異染性顆粒を同時に附記した。

図4 核、ミトコンドリアと発育様式



1. 今仮りに1コの発芽から発育が始まつたとすると、
2. 発芽の細胞が発育、伸長するに伴って、2コの核はそれぞれ前、後端に分れて位置する。
3. 充分発育、伸長して菌糸形となれば、その傾向はいよいよ顕著になり、かつ異染性顆粒が図の位置に現われる。
4. 概ねこの位置で分節する。菌糸形の前端に在つた核は分裂して、新しく生じた先端の小細胞内に移行し、菌糸形の後半は1コの核および2コの異染性顆粒を持つまま新しく1コの桿状形を形造る。
5. 先端の小細胞は1と同様に発育、伸長する。それに伴って核はそれぞれ前、後端に分れて位置する傾向を示す。
6. 小細胞は今や1コの菌糸形に発育して、5と同様2コの核と2コの異染性顆粒とを示す。
7. 充分に発育した菌糸形は4と同様にして、分節して先端の小細胞と1コの桿状形とを作る。概ねこの時期に基部の桿状形の核は分裂して発芽に移行する。
8. 先端の小細胞は2、5と同様に発育、伸長する。基部の桿状形から出た発芽もまた発育、伸長する。
9. 先端の小細胞は今や菌糸形に発育し、基部の桿状形から発芽して出た小細胞もまた、すでに菌糸形に発育している。
10. 先端の菌糸形は分節し、先端の小細胞の後にすでに3コの桿状形が連つて配列し、未だ発芽していない最初の桿状形の内部には1コの核と2コの異染性顆粒を見、続いて連る桿状形の核は分裂して発芽に移行し、基部の桿状形から出た菌糸形は、すでに分節して、1コの小細胞と1コの桿状形とを生じる。発芽を完了した桿状形では異染性顆粒は次第に姿を消す。

核、異染性顆粒と発育様式との間にはほぼ図4のような関係が成立つようであるが、ここでまず興味のあることは、1コの核を持つ細胞と2コの核を持つ細胞との区別である。発芽、それが発育、伸長しつつある菌糸形、このような発育に直接関係し、分節を繰り返えすと考えられる細胞が2核であるのに対して、発育しないと考えられる細胞、すなわち菌糸形に続く1ないし2コの桿状形……これはむしろ成熟した細胞であつて、菌本来の機能を営みつつあるものと考えられる……は常に1核であ

る。ただしこのような桿状形内の1核も、やがて発芽するが、その際は2核に分裂する。このように見て行くと、発芽内部の2核は、前端に在るものと後端に在るものとは、その後の発育過程において、核分裂を繰り返えず速さが違うということが注意を引く。詳しくいえば、前端に在る核は、図4でおよそ1から4までの週期で比較的速かに分裂を繰り返えし、しかも核の一半は常に配列先端の分節内に留まるにもかかわらず、後端の核は一旦桿状形内に移行し、図4でおよそ4から7までの週期で比較的遅れて分裂を繰り返えして発芽に移行する。このように発芽内部の2核がそれぞれ違ったフェースで分裂を繰り返えずということにどのような意味があるのか、言い換えるとこのことは結核菌ないし一般ミコバクテリウムのどのような特性として表現せられているか、興味のあることであるが、この点については後日の報告で検討したい。

従来とも、細菌核の分裂が有糸分裂であるかそれとも無糸分裂であるかについて多少論議せられているが、上記において観察したミコバクテリウムの核分裂……例えば菌糸形の前端部が分節するときおよび桿状形から発芽するときに観たところの核分裂は、上記の染色法、観察法では、それが果して有糸分裂であるか、それとも無糸分裂であるか、その判断は到底でき難い。

要するに、図4からも分るように、核は専ら配列の先端に常に位置する細胞内のみ存在し、かつ消長する。このようにして核を持つ細胞は、とりも直さず易染性、塩基好性の細胞に該当する。すなわち配列の先端に常に位置する易染性、塩基好性の細胞こそは、ミコバクテリウムの発育に直接関与する細胞であるとして重要視すべきことを強調してきた著者の従来からの主張は、今やこのような一つの新しい具体的な所見によつて強固に支持せられたと同時に、それに立脚する発育様式の解釈もまた、今や確固とした基礎の上に立つことができたといえる。

結 論

1. ミコバクテリウム(結核菌)の核染色法に考案を加え、簡単な方法で鮮明な所見を得た。
2. 発育極初期集落の貼付標本に上記の如き核染色法

を適用した結果は、配列の先端に位置する少数の細胞内部にのみ核を染め出すことができた。これらの細胞の後に連る多数の細胞には、核を染め出すことはできなかった。

3. 菌糸形の前端部が分節し、また桿状形から発芽する際、そこに在った核は2核に分裂して移行した。
4. 2核の細胞と1核の細胞とを区別することができた。前者は発芽、菌糸形等直接発育に関与し、分節を繰り返えず細胞であつた。後者はやや遅れて発芽を生じる細胞であつた。
5. 発芽、菌糸形内の2コの核は、それぞれ違ったフェースで核分裂を繰り返えした。
6. 核を持つ細胞は配列の先端に常に位置を占める易染性、塩基好性の細胞に該当した。すなわちこの種細胞こそ発育に直接関与するものとして重要視せなければならぬ。と同時に、発育様式はこの種細胞に立脚してのみ初めて理解が可能である。

文 献

- 1) 植田：結核，32：181，1957。
- 2) 植田：結核菌の研究 1. 形態及発育様式(昭和28年，南江堂)。Rev. Tuberc., T. 19, N° 8~9, 984~1001, 1955。
- 3) Knaysi, G., Hiller, J. a. Fabricant, C. : J. Bact., 60 : 423, 1950。
- 4) Bassermann, F.J. : Zbl. Bakt., 1. Org., 158 : H 1/2, 104, 1952。
- 5) Winterscheid, L.C.a. Mudd, S. : Amer. Rev. Tuberc., 67 : No. 1, 59, 1953。
- 6) Xalabarder, C. : El origen del bacilo de Koch, 1954, Barcelona。
- 7) 篠原：抗酸菌病研究雑誌，9：4，243，1954。
- 8) 中村・新宮：結核，27：8，402，1952。
- 9) 安元：レプラ，22：1，12，1953。
- 10) 戸田・武谷・小池・内田：日本細菌学雑誌，28：10，117，1953。
- 11) 伊藤：結核，28：8，400，1953。
- 12) Chance, H.L. : J. Bact., 65 : 593, 1953 a.

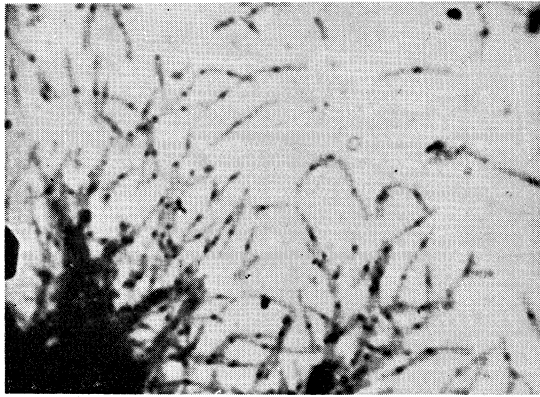


Fig. 1. スメグマ菌発育極初期菌膜の貼付標本, 塩酸60°C10分間処理後, 1%クリスタル紫水溶液(pH 3.5)3分間, 1%コンゴレッド水溶液(pH 3.5)1分間染色, 1,500×

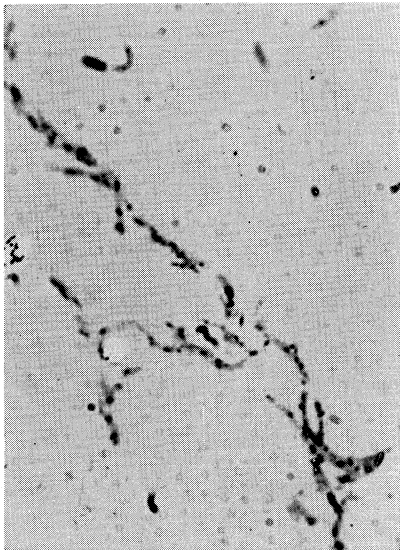


Fig. 2. 鳥型鳥京株の発育極初期菌膜の貼付標本, 塩酸60°C10分間処理後, 1%クリスタル紫水溶液(pH 3.5)5分間, 1%コンゴレッド水溶液(pH 3.5)1分間染色, 1,500×

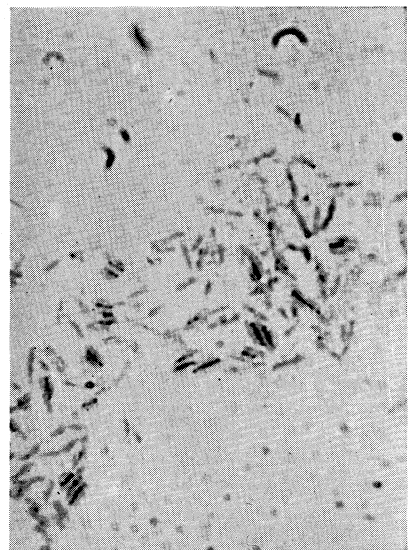


Fig. 3. 人型H₃₇Rvの発育極初期菌膜の貼付標本, 塩酸60°C10分間処理後, 1%クリスタル紫水溶液(pH 3.5)10分間, 1%コンゴレッド水溶液(pH 3.5)1分間染色, 1,500×