

抗酸性菌の発育形態および染色性の研究：

とくに Agarfixierungsmethode による Mycobacterium 607 の集落の観察

広 谷 文 雄

慶応義塾大学医学部細菌学教室 (主任 牛場大蔵教授)

受付 昭和 34 年 4 月 8 日

固形培地に発育した Mycobacterium 607 (以下 M. 607) を Ziehl-Neelsen 法で染色すると、形態ならびに染色性を異にする種々の菌群を認める。それら相互の関係を観察する目的で下記の諸実験を試みた。また Agarfixierungsmethode^{3)~5)} (以下 A FM) を援用して、Kirchner 寒天平板培養 24 時間後の集落にストレプトマイシン (以下 SM) および イソニコチン酸ヒドラジド (以下 INH) を作用させた場合の形態染色性を観察し、それが石炭酸水、低温等の影響による変化とどう違うか等の点につき検討した。

実験方法

1) 使用菌液

M. 607 の 0.1 % Tween 80 含有 Kirchner 培液隔日継代培養菌液を東洋濾紙 No. 131 で濾過し原液とした。

2) A FM⁴⁾ による集落の観察

原液を滅菌蒸留水で 2 倍稀釈しその 0.1 cc を 1.5 % 寒天含有 Kirchner 平板に硝子棒で塗抹しふらん器 (36.6°C) に入れ、2, 4, 6, 8, 17, 24 時間目ごとに A FM を実施した。すなわち寒天平板をほぼ 7 mm 間隔の縦横の割線で切り、この直方形寒天片の菌塗抹面を下にして静かに清浄なスライド上に密着させる。この寒天片が浸る程度に Picro-formal (Bouin) [Picric acid, saturated aqueous solution 75 parts, Formol 25 parts, Glacial acetic acid 5 parts] を注ぎ約 30 分放置後寒天片を取り、スライドは流水中で水洗する。染色は Ziehl-Neelsen 原法¹⁾ (以下原法と略。すなわち、Ziehl 液で 10 分加温染色後 4 倍稀釈硫酸水で 30 秒、さらに純酒精で 5 分脱色、水洗後メチレン青後染色 60 秒) および変法 (60°C に加温した Ziehl 液で染色 2 分後 3 % 塩酸酒精脱色 15 秒、水洗後 Löffler のメチレン青後染色 2 分) とし、Zeiss 製双眼顕微鏡 (接眼鏡 8×, 対物鏡 100×) で観察した。人工光源は Osram H 152 6V, 15W (電源 2 A 前後、絞り全開) を用いた。

3) 肉眼でみえる集落の観察

原液を 10⁵~10⁶ 倍稀釈しその 0.1 cc を Kirchner 寒天平板に硝子棒で塗抹し 36.6°C のふらん器に保ち 2, 4, 7 日目ごとに集落 30 コ (小集落はその全部、大集落はその一部をスライドに塗抹し Picro-formal (Bouin) で固定) 宛原法および変法で染色観察した。

4) グリセリン含有濃度を異にした培地に発育した M. 607 の観察

Kirchner 培液の組成中グリセリン含有量のみを 0, 0.2, 2, 5 % に変えた 4 種類の培地で M. 607 を 2 日目ごとに継代し約 30 日後に原法および変法で染色観察した。

5) "Beaded form"^{7) 8)} の観察

ことに "Beaded form" (以下 BF) と使用した塩基性フクシンとの関係を知るため、M. 607 の Kirchner 寒天斜面隔日継代菌苔を用いて下記の実験を行った。菌苔は硝子玉入りコルベン手振法で蒸留水菌液としこれを

表 1 塩基性フクシン (国産化学) による "Beaded form" の消長

1) Yegian, Baisden の染色法

形別	NaCl		Distilled water	
	Beaded form	その他	Beaded form	その他
%	62.2	38.8	41.4	58.6

2) Ziehl-Neelsen 原法

形別	NaCl		Distilled water	
	Beaded form	その他	Beaded form	その他
%	61.5	38.5	45.5	54.5

3) Ziehl-Neelsen 変法

形別	NaCl		Distilled water	
	Beaded form	その他	Beaded form	その他
%	40.0	60.0	45.0	57.0

注：NaCl……B 染色液で染色した場合
Distilled water……A 染色液で染色した場合

東洋濾紙 No. 131 で濾過、濾液をスライドに塗抹、乾燥後火焔固定し原法、変法、Yegian and Baisden 法⁷⁾

①. 塩基性フクシン (国産化学) 11 g を磁製乳鉢で磨碎し純エタノール 100 cc を加え原液とする。2. 原液 10 cc, エタノール 10 cc, 5% 石炭酸水 180 cc を混和 (以下 Carbol fuchsin)。3. A : 95 cc Carbol fuchsin + 5 cc Distilled water, B : 95 cc Carbol fuchsin + 5 cc 10% 食塩水。4. A または B 色素液で染色する。このさい 90°C に保った蒸し器の中で 20 分染色し脱色は 3% 塩酸酒精 30 秒⁸⁾ で染色する。観察菌 200 中の BF を百分率で示した (表 1)。

6) SM, INH, 5% 石炭酸水、低温等の影響下における M. 607 の形態染色性観察

① 2 倍稀釈の原液 0.1 cc を 1.5% の Kirchner 寒天平板に硝子棒で塗抹し血温ふらん器に保つ。② 24 時間後各平板ごとに AFM を実施しこれを対照とする。その後あらかじめ滅菌生理的食塩水で所定濃度に調整しておいた SM (硫酸デヒドロストレプトマイシン 明治の 10, 20, 500 γ /cc) および INH (イソニコチン酸ヒドラジド中外の 50, 100, 500 γ /cc) ならびに 5% 石炭酸水のおおの 15 cc 宛を各平板に注加してふらん器に入れ 1, 3, 7 日目ごとに AFM を実施した。1 群の平板は 5°C の電気冷蔵庫に放置し, 1, 3, 7 日目ごとに AFM を実施した。③ 各標本は変法で染色し観察に供した。

実験成績

1) AFM による早期集落の逐時的観察では、4 時間目まではまだ単在菌が 70~80% を占めその多くは赤染した桿状形であるが他に赤染した "Granular form" (以下 GF), 青染した桿状形あるいは GF, 青赤染した桿状形あるいは GF もみられた。6, 8 時間目には複数個の菌群よりなる初発集落と思われるものが認められた。それらの多くは淡青染した桿部とそれよりやや濃青染した顆粒状部をもつた GF の菌群で構成されたものであった。そのほかに少数の青染桿状菌群のみあるいは赤染菌群のみで構成された集落も認められた。単個の菌には赤青染した GF が目立った。17 時間目にはかなり増大した集落が認められるようになり観察も容易となった。すなわち集落はおおむね不整網眼状をして増大し、しかも GF 菌群で構成されたものが目立った。そうしてそれらのあるものは淡青染桿部とそれよりやや濃青染した顆粒状部をもつた GF 菌群のみで、また他のものは集落全体の菌が一様に淡青赤染 (集落によつて青色調の強い場合と赤色調の方が強い場合とがあるが一般に培養時間が長くなると赤色調の強い集落が多くなりまた染色性も増してくる) した GF 菌群で構成されていた (写真 1)。以上のほかに全体が青染桿状菌群で

構成されているようにみえるもの、その中に数々の赤染桿状菌が認められるもの (写真 2)、あるいはすでに赤染菌群のみで構成されているもの等がみられた。24 時間後では一般に集落の染色性が増してくるがことに既述した青染桿状菌群のみで構成された集落は減少しその中に赤染桿状菌ないしは GF の混在数が増してくる。これらの赤染菌群は集落を形成している菌密度の大なる部分でしかも培地に接した方の側に多く認められた。以上の所見は変法の場合におけるほど明らかに原法で観察できなかつた。原法では一般に赤色調が強くとくに変法で赤青染したような場合に原法ではそれが赤色調の濃淡の差として現われることが多かつた。しかしながら赤と青との対比という点では原法が勝っていた。

2) 培地面に肉眼で認められるような集落は AFM に不適である。この集落はスライドに塗抹して観察した。培養後 2 日目ではなお青染菌を認めるが 4 日目ではほとんど青染菌群を認めず。7 日目には濃赤ないし赤青染顆粒が密集しているようにみえる部分にしばしば遭遇する。この場合詳細にみると比較的染色性の弱い短細な桿状部を認めることができる。これがいわゆる BF として観察される。また同色調で乳棒状を呈したのも認められる。多数の孤立集落を観察したが青染菌群のみで構成されている集落は認めえなかつた。

3) グリセリンの濃度差はそこに発育した菌の形態染色性に著変を与えなかつた。グリセリン含有 0 ないし 0.2% では全体に混濁して発育し管底に絮状沈澱物を認めた。2 ないし 5% では培地表面に厚い苔を作つて発育し液層はあまり混濁しない。これらの菌群を染色観察するとグリセリン含有濃度の少ない場合ほど青染菌が多い。また 0 および 0.2% では菌配列に定方向なく、塗抹にさいしてバラバラになりやすいが 2 および 5% では束状配列をし単個になりにくかつた。

4) 表 1 に示すように食塩の存否、染色法の差異等で BF の消長に著しい影響をみず。

5) SM 影響下の M. 607 早期集落の観察

SM 10 および 20 γ /cc を作用させた場合、注加薬液層に絮状浮游物ないしは集落形成を認めず。その AFM 標本を変法で染色観察した場合、対照では淡青赤染 (青色調がやや強い) した GF 菌群で構成された集落が主として認められた。薬剤作用 1 日後の標本では淡赤ないしは赤染した GF で構成された集落が目立った。3 および 7 日を経過したものでは GF の桿部に相当する部分 (以下桿部) の染色性が低下しはなはだしい場合にはほとんど識別できぬくらいわずかに赤色調を保っているような菌群からなる集落が多くみられた。このような GF の顆粒状部分 (以下顆粒) の染色性も一般に低下したものが多くが中にきわめて濃染した顆粒も認められる。ことに 7 日目の標本では赤黒色の比較的

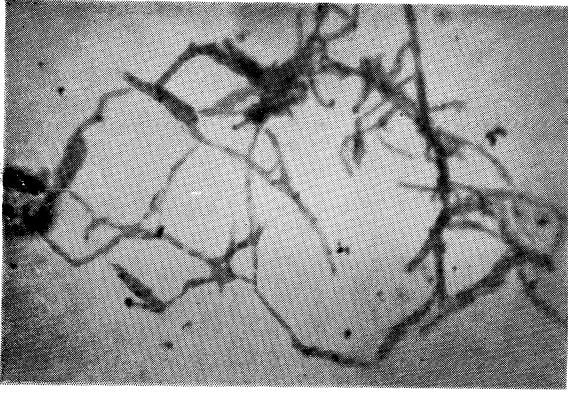


写真 1.2 M. 607 の Kirchner 寒天平板培養 24 時間後の AFM

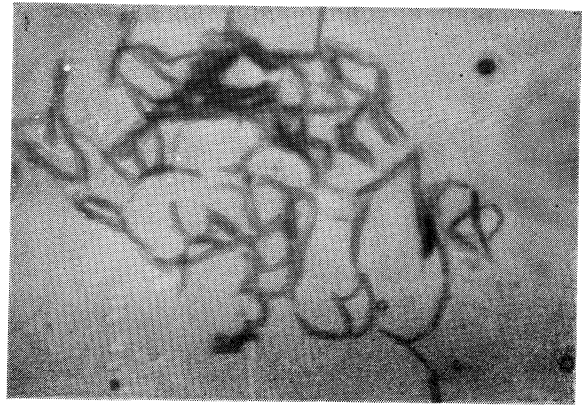


写真 2 「棒状形」の菌群で構成されている。淡黒色にみえる部分は青染部、黒色にみえる部分は赤染部に相当する。

写真 1 「Granular form」の菌群で構成されている。棒状部はやや淡青赤染し、顆粒状部はそれよりやや濃青赤染している。

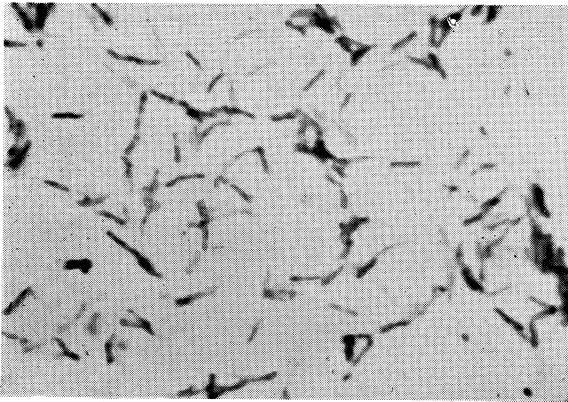


写真 3 SM 10 γ /cc 影響下 7 日目における AFM。淡赤染した棒状部と赤染 (ときに濃赤染) した顆粒状部よりなる "Granular form", "Beaded form" をみる。顆粒化は INH の場合ほど迅速かつ著明に現われない。

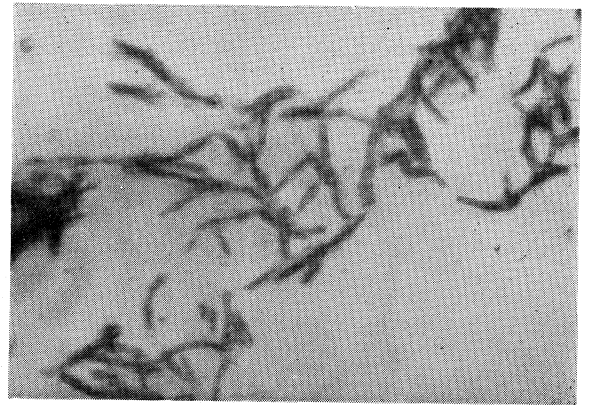


写真 4 SM 500 γ /cc 影響下 1 日目における AFM。SM 低濃度では作用後も抗酸酒精性、染色性の増強が認められるが、高濃度では目立たない。顆粒化は低濃度の場合より早い。

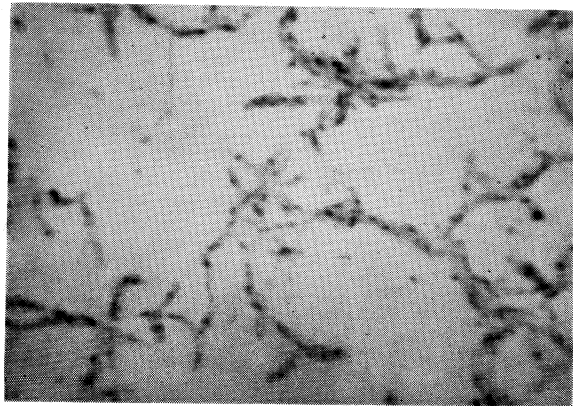


写真 5 INH 500 γ /cc 影響下 1 日目における AFM。顆粒状部は青赤染し、棒状部はきわめてうすく青赤染している。すなわち作用後ただちに顆粒化しはじめ、SM の場合にもみられたような抗酸酒精性、染色性の増強がみられない。

大きな顆粒や同色調の乳棒状ないし短桿菌状を呈したものがしばしば認められ詳細にみると淡赤染桿部を観察できる。1 集落中の顆粒数が著増していると思われる所見はなかった。SM 500 γ/cc の場合も薬液層の絮状浮游物ないし集落形成を認めず。作用後 1 日目では低濃度におけるような色調の変化が目立たずかえって GF の桿部に強い染色性の低下を認めた。3 および 7 日目の所見は低濃度の場合と類似していた。なお SM 0.5 γ/cc では注加薬液層に絮状浮游物を認めこれをスライドにぬって Bouin 液で処理し変法で染色観察すると比較的染色されやすい赤染桿状形および GF を中心にその他のあらゆる形態染色性の菌群を認めたがこの場合に特異な所見はなかった。

6) INH 影響下 M. 607 早期集落の観察

INH 50 および 100 γ/cc を作用させた場合注加薬液層に僅少の絮状浮游物発生をみた。AFM 実施にさいしてはこれらが寒天面に付着しないようにした。対照では淡赤青染(赤色調がやや強い)した桿部と、同色調でやや濃染した顆粒よりなる GF 菌群で構成された集落が主にみられた。薬剤作用 1 日後にはすでに桿部の強い染色性低下と顆粒出現による短縮がみられ場合によっては青赤色顆粒のみが密集しているようにみえた。3 日目では顆粒の染色性もまた低下していた。7 日目では染色性の弱い顆粒に混つて紫黒色の顆粒や短桿状菌(ときに紡錘状あるいはまゆ形を呈す)も認められた。INH 500 γ/cc では絮状浮游物を認めず。AFM 標本は対照では淡青赤染(赤色調がやや強い)した GF 菌群で構成された集落が多かった。薬剤作用 1 日目では低濃度におけるよりやや強い色調の変化(ことに染色性の低下)があり目とともに著しくなった。7 日目における紫黒色顆粒ないし短桿菌の出現は低濃度におけるほど著しくなかった。低濃度における絮状浮游物は SM の場合と同法で観察したが一般に SM の場合に比較して桿部の染色性の弱い GF が目立つたほかに SM のそれと著しい所見上の差異はみられなかった。

7) 5% 石炭酸の影響下においては薬液層に絮状浮游物を認めず。AFM では 7 日後と対照との間に著しい差異を認めず。わずかに 7 日目の標本で色調の変化(染色性と抗酸酒精性の低下)がみられた程度で菌の顆粒化も著明でない。また 7 日目に黒赤染桿状菌を認めた。

8) 5°C 電気冷蔵庫中に放置した場合、1 日目までは対照の所見とほとんど差はない。3 日目になると桿部の染色性の低下したものが多くなり顆粒数の増加がみられた。7 日目には大部分のものはさらに染色性低下し観察困難になるがしばしば赤染顆粒と淡赤染桿部をもつた GF が認められた。

総括ならびに考察

AFM を援用することにより発育途上の早期集落の形態染色性をできるだけ本来の配列を乱さない状態で観察し、非抗酸酒精性で比較的染色されにくい桿部と比較的染色されやすい顆粒状部をもつたいわゆる GF の菌群で構成されている集落のほか、非抗酸酒精性あるいは抗酸酒精性で比較的染色されやすい菌群で構成されている集落を認めた。やや時間を経過すると GF 菌群で構成された集落は増大するとともに全体が同程度に染色性と抗酸酒精性を増した状態の集落が多くなり中にはその培地に接した方の側に抗酸酒精性で染まりやすい桿状形を認めるものもある。また非抗酸酒精性で染まりやすい桿状形菌群で構成された集落の中にも抗酸酒精性の桿状形を認めるようになる。かくて培養継続とともに染色性ならびに抗酸酒精性の増強した菌がふえてゆくが一方次第に顆粒が密集しているようにみえるものも目立つてくる。

非抗酸酒精性菌株を分離する目的で多数の孤立集落を観察しまたその分離培養のため 2, 3 の実験を行つたが成功せず。

結核菌の形態染色性ならびに発育様式に関する報告はすでに多い。その集落を組織学的方法で観察し Substance cyanophile を発育の始まりとした Bezancon, Philibert²⁾ らの報告は AFM における比較的染色されやすかつ非抗酸酒精性の集落の迎る過程に相当しているように思われる。ただしこの様式のもの多くない。Kahn, Nodienz⁹⁾ らは結核菌集落の切片標本で最表層(抗酸性菌、非抗酸性菌および顆粒からなる)、中間層(弱抗酸性菌よりなる)、最下層(培地に接した所で主として抗酸性菌よりなる)を分けその結果非抗酸酒精性でメチレン青に染まりやすい顆粒から、非抗酸酒精性でメチレン青に染まりやすい桿状形、ついで抗酸酒精性桿状形へと発育すると報告した。また植田²⁾ は結核菌初期集落をスライドにとり、Ziehl-Neelsen の植田変法で観察した結果、発芽とそれが発育伸長した糸状形(非抗酸酒精性で易染性)、糸状形の基部が成熟して生じた顆粒および糸状形の基部が分離して生じた桿状形(抗酸酒精性)という形式を述べ、これらのうちいわゆる抗酸酒精性形態は発育能力のない変性過程のものとした。両説ともに早期のものをいわゆる GF としておりかつそれが非抗酸酒精性でメチレン青で良染するとしている。この形態染色性を示すものは AFM の場合比較的遅い時期に現われ、ごく早期においては一般に染色性が弱いことは既述した。すなわち発育過程を考える場合、非抗酸酒精性より抗酸酒精性への過程のほかに、染色されやすくなるという点を考慮する必要がある。

形態的には桿状形、GF、顆粒および BF (およびその類似形) が認められた。後の 2 者は晩期集落でしばしば遭遇した。M. 607 の形態ならびに染色性の複雑

さは上述した3要素の種々な組合せに由来する。しかし抗酸酒精性の強弱は原法によつて、染色性の難易は変法によつて観察することが望ましい。なお早期すでに抗酸酒精性菌群で構成された微小集落を認めたことは興味ある所見と思われる。

BF について Yegian, Baisden⁶⁾⁷⁾らはこれは人工産物でとくに使用したフクシンとその濃度に影響され、また使用したフクシンの製品別に関係なく溶媒の中に一定量の NaCl を加えることにより著増すると報告した。国産化学製塩基性フクシン使用にさいしこの点を検討した。その結果食塩の存在により僅少なからBFの増加を示したと思われたのは Yegian らの法に従つて染色した場合と原法の場合とで、変法では認めなかつた。いずれにしても Yegian らが報告したような成績はえられなかつた。BF が晩期集落においてしばしば観察されたことはむしろ M. 607 の形態変化中の一過程と考えたい。

AFM に適した M. 607 の発育時間は24時間前後までであるが一方この時期の大部分の菌は薬剤の影響を受けやすい状態にあると考えられる。この時期に SM を作用させた場合に認められた所見から推定されることは、発育阻止濃度の SM によつて菌の分裂増殖は停止するがすでに発育している菌に対してはINHほど強い影響を与えない。そうしてそれらの菌は自然の過程をへて顆粒化する。SM濃度が大なる場合にはすでに発育増殖している菌に対しても多少の影響を与える。石炭酸の影響下における変化が SM の場合とやや似ているが、顆粒化は石炭酸の場合の方が遅く現われる。氷室中においては一時変化が停止するが間もなく INH でみられるような変化が個々の菌に現われてくる。INH の影響下においては比較的短時間のうちに既存の全菌に対し著明な影響を与え、その状態で速やかな顆粒化をきたす。これらの所見をスライドカルチュア法を援用して Ziehl-Neelsen 法で観察した H₃₇Rv の抗結核剤による形態変化¹⁰⁾と比較検討すると、次のような共通点が認められる。すなわち抗結核剤の種類に関係なく、その影響下で発育増殖した菌の形態は薬剤の影響下でない場合のそれと共通していること。抗結核剤の影響で示す形態変化と変性過程としてのそれとの間に特異な所見上の差異がみられないこと等である。

結 論

1) Kirchner 寒天平板に発育した M. 607 の早期集落を Agarfixierungsmethode, Ziehl-Neelsen 染色法で観察し、①桿状形(均等に染まっている)あるいは Granular form_g(不均等に染まつており濃染部が顆粒の

ようにみえる)の顆粒化、②非抗酸酒精性から移行形をへて抗酸酒精性へ(ただし早期すでに抗酸酒精性のものがある)、③染色されにくい形から染色されやすい形へ(ただし早期すでに染色されやすい形が存在する)の変化を認めた。M. 607 菌体の種々な形態ならびに染色性はこの3因子の複雑な組合せに起因する。

2) 非抗酸酒精性 M. 607 菌株の分離は成功しなかつた。

3) 塩基性フクシン(国産化学)は“Beaded form”形成に著しい影響を与えなかつた。“Beaded form”を人工産物とすることにはなお検討の余地がある。

4) M. 607 の Kirchner 寒天平板培養24時間後に SM, INH (いずれも発育阻止濃度)、5% 石炭酸水、低温(5°C)を作用させてから1, 3, 7日目ごとに Agarfixierungsmethode, Ziehl-Neelsen 染色法でその形態染色性の変化を観察した。その結果ある原因によつて起つたと思われるような特有な所見はなかつた。すなわちいずれの場合にも共通して顆粒化がみられ、INH では他の場合に比較してそれが早期に認められた。また薬剤中で発育増殖したと思われる菌の形態染色性は普通培地でのそれと著しい差異はみられなかつた。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜つた牛場大蔵教授に深甚の謝意を表し、あわせて種々御助力、御助言戴いた教室員各位ことに氏家、深沢両学士に厚く御礼申上げます。

参 考 文 献

- 1) Hauduroy, P. (植田三郎訳): 結核菌の特異な染色性とその性質, 結核新書 14, 医学書院, 昭28.
- 2) 植田三郎: 結核菌の研究 1 形態及び発育様式, 南江堂, 昭26.
- 3) Klienberger, E.: J. Path. Bakt., 39: 409, 1934.
- 4) 佐々木正吾・荒井秀雄: 未発表.
- 5) Kahn, P., & Sternberg, K.: Zbl. Bakt. Parasit. Infek., 121: 113, 1931.
- 6) Yegian, D., & Kurung, J.: Amer. Rev. Tbc., 56: 36, 1947.
- 7) Yegian, D., & Baisden, L.: J. Bakt., 44: 667, 1942.
- 8) Baisden, L., & Yegian, D.: J. Bakt., 45: 163, 1943.
- 9) Kahn, M.C. & Nonidez, J.F.: Amer. Rev. Tbc., 34: 361, 1936.
- 10) 広谷文雄: 結核, 33: 363, 昭33.