



Title	結核菌の形態学的研究：第1報 紫外線照射の結核菌形態に及ぼす影響
Author(s)	月居, 典夫; TSUKIORI, Norio
Description	
Citation	結核の研究, 3, 31-38
Issue Date	1956-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26577
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_P31-38.pdf



結核菌の形態学的研究

第 1 報

紫外線照射の結核菌形態に及ぼす影響

月 居 典 夫

北海道大学結核研究所予防部 (主任 高橋義夫教授)

国立札幌療養所 (所長 宮城行雄博士)

(受付 昭和 30 年 11 月 30 日)

緒 言

電子顕微鏡による結核菌の形態学的研究としては、*Ruska*¹⁾ 以来 *Lembke*, *Knaysiet al.*²⁾ *Mudd et al.*³⁾ *Werner*⁴⁾ 戸田・武谷⁵⁾ 武谷・篠原⁷⁾ 谷野¹⁰⁾ 等の業績がある。その多くは結核菌の菌体構造特に顆粒あるいは空胞に関するものであるが、特にこれらのうち電子顕微鏡像によくみられる電子不透過性の所謂大顆粒の性状及びその意義については所論区々で未だ定説は得られていない例えば *Knaysi* はこれを核と考え、*Mudd* はミトコンドリアを示唆し、*Werner* は異染小体顆粒であろうとしている。また *Ruska* に始まるドイツ学派はこの顆粒を *Kern equivalent Phosphat körper* と考えている。日本では武谷等はこの小体は菌の代謝に関係の深い所謂“貯蔵物質”(Reservestoff) であろうと論じている。ともあれ結核菌の顆粒は電子顕微鏡出現以前より多くの細菌学著の興味をひき、特に結核患者または結核感染動物からの材料の中には、菌の形態的变化に伴い染色像に顆粒が多く現われることは古くから観察され、その生物学的意義は論議の中心となつてゐる。そこでこのような染色像上の顆粒即ち主として所謂 *Much granula* と電子顕微鏡像上の *granula* 即ち吾々が電子不透過小体と称する顆粒との関係を明らかにすることは、さし当つて重要なことと考えられる。電子顕微鏡像上の顆粒が所謂 *Much* 顆粒と異なることが判れば、従来光学顕微鏡によつて顆粒と見做したものの意味は別に考えなければならぬわけ、あるいはそれは染色操作過程に生ずる 1 人工産物と考えることになるかも知れない。若し両者が等しいものであれば、染色法と電子顕微鏡を併用して所謂結核菌顆粒の意義をますます深く追及することが出来るであろう。このような観点から私は両者の関係を明かにする方法として、結核菌に物理的あるいは化学的刺戟を与え、その影響が菌体内の顆粒にどう現われるかを光

学顕微鏡像と電子顕微鏡像とを比較して研究したのである。結核菌に与える諸種の実験条件の中、紫外線照射に関してはすでに私と同じ研究室の内藤・高橋¹¹⁾ 等が *BCG* について電子顕微鏡のみによる研究を行い興味ある所見を示しているが、私は更に詳細に実験を繰した。

実験材料及び実験方法

使用菌株：鳥型予研一 F 株 (結核予防会研究所より分与され、1%小川培地に継代せるもの) *BCG* (予防衛生研究所保管の菌株で 5%グリセリン馬鈴薯培地に継代せるもの) 人型結核菌向井株 (1952 年患者から分離されたもので毒力菌である。)

使用培地：膜面培地に用いた培養は、変法キルヒナー寒天培地である。その組成を記すと、基礎培地として

アスパラギン	15.0 g	硫酸マグネシア	1.8 g
第 1 磷酸カリ	12.0 g	クエン酸鉄アンモン	0.15 g
第 2 磷酸ナトリウム	9.0 g	グリセリン	60 ml
クエン酸ナトリウム	7.5 g	蒸溜水	1000 ml

別に濾紙で濾過した 3%寒天を準備し上液 1 に対して寒天 2 の割合に混ぜ、高圧滅菌後 50°C に保温し、これに全量の 10%の割合に滅菌した牛血清を加えた後 9~10 ml 宛膜面培養用容器¹²⁾ 中に分注した。此培地上に 1.5%コロジオン醋酸アルミ溶液を滴下して薄膜を張つた。

試料作製法と紫外線照射法：鳥型菌の場合には、小川培地上培養 7 日目の菌集落より型の如く水晶玉入りコルベンをういて手振法によつて 1 ml 中 2 mg 含有の蒸溜水浮游菌液を作り、これを 3000 r pm 10 分間遠心沈澱し、その上清を膜面培養用浮游菌液として用いた。*BCG* 及び人型菌向井株の場合には共に *Dubos* 培地培養 12 日目の浮游菌液を 3000 r pm 10 分間遠心沈澱後鳥型菌の場合と同様な遠心沈澱法によつて蒸溜水をもつて 3 回洗滌し、その上清を膜面培養用菌液とした。上記の方法で調製した菌液

を滅菌カピラールピペットで1滴宛膜面培地上に滴下した。尚この際、菌移植部位を容器の裏面からマークして置くと培養後その部位を容易に知ることが出来て試料を作る上に好都合である。液滴の余剰量をカピラールピペットで吸取つた後、直ちに膜面上5 cmの距離から殺菌灯(100 V 19 W, 波長 2535 Å)で紫外線照射を行い 37°C の孵卵器中に入れた。照射時間は鳥型菌及び人型菌の場合は10秒, 30秒, 1分及び2分とし、BCGの場合は10秒, 30秒及び1分とした。培養後鳥型菌では6時間目、BCGでは4日目、人型菌では5日目容器を取出し、菌移植部位をスパーテルをもつて寒天ごと切り取り蒸溜水中に浮かせ、その時蒸溜水の表面に浮んだコロシオン膜を電子顕微鏡用試料支持台の上に載せ、約40°Cで数分間乾燥した後、電子顕微鏡用試料とした。また同時に光学顕微鏡検査用として上記の方法で得た膜を載物硝子に張り火焰固定を行つた。尚使用した電子顕微鏡は日本電子光学製 JEM 4型で撮影条件は加速電子 50 KV, 電子電流 10 NA, 直接倍率 2000倍乃至4100倍である。また実施した染色法は Ziehl-Neelsen 法と Fontes 法であり、前者により菌体の抗酸性及び破壊度と菌の増殖の度合を観察し、後者は所謂 Much 顆粒の状態を観察するために用いた。

実験成績

1. 鳥型菌における成績 (Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6)

紫外線照射時間の延長に伴い、菌体の抗酸性は次第に減弱した。照射2分における大半の菌はその発育が抑制され、抗酸性は弱いあるいは脱落した。電子顕微鏡像(以下 EM 像と略す)上の菌体内構造の変化を観察すると、原形質は照射時間の延長に伴い、電子線の透過性が多少増加して、一部の菌体では所謂 ghost 化した状態あるいは原形質が菌体外に流出したような状態が観察された。このような原形質の変化は、染色像にみられる菌体の破壊度と略々平衡していた。電子不透過小体(以下 NT 小体と略す)については、紫外線照射30秒までの菌には、対照と同じく直径約 1000 Å の小体を2乃至数ヶ認めたが、照射1分及び2分の菌には直径約 3000 Å の小体1~3ヶがみられた。光学顕微鏡像(以下 LM 像)上の Much 顆粒については、対照及び照射10秒の菌には、4~5ヶづつの顆粒が菌体内に均等な間隔で配列していたが、照射30秒乃至2分では大半の菌は2~3ヶの顆粒が両極に1ヶづつあるいは両極と菌体中央部に1ヶづつ観察された。EM 像上にみられる電子透過小体(以下 T 小体)は、照射30秒及び1分の若干の菌に出現していた。以上の所見から紫外線照射による鳥型菌の変化は、原形質の変質とそれに伴う抗酸性の減弱がその主たるものであつた。又 EM 像の顆

粒と LM 像の Much 顆粒との関係については、両者の菌体内における位置及び数の消長等の点から、必ずしも明らかな平衡関係が見られなかつた。

2. BCG における成績 (Fig. 7, 8, 9, 10, 11)

照射時間の延長に伴い、菌の抗酸性は次第に減弱する傾向が見られた。EM 像に見られる所見としては、紫外線量の増すにつれて菌体原形質が凝縮し、遂には断裂化し、更に ghost 化して行くことであつた。また NT 小体は、極めて少数の紫外線照射菌に直径約 1000 Å の小体を1乃至数ヶ認められた。これに反して LM 像での Much 顆粒は、照射10秒までは対照と同様に大部分の菌の両極に1ヶづつあるいは両極と菌体中央部に1ヶ宛計2~3ヶ見られたが、照射30秒以後のものには全く認められなかつた。EM 像上の T 小体は対照及び照射10秒の菌に若干見出されたが、照射30秒以後では認められなかつた。以上の成績から紫外線照射により BCG には鳥型菌と略々同様な原形質の変化が現われ、また EM 像での顆粒と LM 像でのそれとの間には必ずしも平衡関係が成立しないことが判つた。

3. 人型菌における成績 (Fig. 12, 13, 14, 15, 16)

紫外線照射時間の延長に伴い、若干の菌体は多少長かつ細くなつた。更に EM 像上での特異な現象としては、10秒以上照射の場合に若干の菌体が異常に長くなり、Y 字状あるいは T 字状の分枝状態を示したことであつた。これ等の菌では原形質が紫外線の照射により著明に断裂化あるいは Ghost 化した。菌体の抗酸性は、照射時間の延長に従つて次第に減弱した。EM 像に見られる NT 小体は紫外線照射10秒以後の分枝状菌においては、対照に見られる NT 小体(直径約 3000 Å)が減少して極めて多数の micell が出現したものあるいは対照に見られた小体の半分位の大きさのものが2~3ヶ増えたもの等を認めた。LM 像上の Much 顆粒は 対照では菌体に5~7ヶが均等な間隔でならんでいたが、分枝状菌では6~12ヶに増加していた。併しこの顆粒の数は、EM 像上での異常分枝菌の micell の数よりは遙かに少かつ NT 小体よりは著明に増加していた。従つて LM 像と EM 像との顆粒の数は一致していなかつた。LM 像上の分枝状部の周囲には、菌体の破壊産物と見做される物質が円形に集合している像が観察された。以上の所見から、紫外線照射後人型菌に見られる主なる変化は、菌体が異常に長くなり分枝乃至出芽した菌の出現である。尚 NT 小体と Much 顆粒との間には、位置的にも数的にも一定の関係を認めることは出来なかつた。

考 按

電子顕微鏡下に見られる結核菌の電子不透過性小体については、Knaysi 等⁷⁾は鳥型菌を用いて、Gimsa, Wright 染色あるいは Feulgen 反応等による菌体内構造の染色性と電子顕微鏡像とを比較した結果、この小体が核の性質を有しているものと結論し、Mudd 等¹⁰⁾は EM 像で菌体の両極に見られる小体は、核染色では染色されず、これに反して Janus-Green B 染色、acid-Hematin 染色 TTC 及び NTC 還元反応が陽性であることから、これをミトコンドリアと推定している。武谷等^{7b)}は同一菌体を電子及び光学顕微鏡下で観察し、菌体の両極あるいは中央部に限局して見られる不透過小体は、核でもミトコンドリアでもなく代謝に関係の深い物質の集積したものであろうと論述している。最近 Werner⁹⁾はこの小体が電子顕微鏡下にみられるツプテリア菌の顆粒と位置的にまた大きさ等の点で非常に類似しているの、異染小体であろうと推論している。私の今回の実験は、この不透過小体の細胞学的性質を究める前段階として、この小体と Fontes 法で見られる所謂 Much 顆粒との相関関係を追求することを主目的とした。この関係を確めるためには、種々の方法が考えられるが、今回の実験では紫外線照射という物理的操作を加えて、その結果現われる両者の数及位置的变化を動的に追求した。筆者の観察では、EM 像に見られる 2000~3500 Å の不透過小体即ち Knaysi 等のいう A body は鳥型菌、BCG 及び人型菌の夫々の実験において、その菌体内における位置及び数的消長から、Much 顆粒とは一致しないように思われる。次に紫外線照射による結核菌の形態的变化については、Lembke¹³⁾は結核菌の浮游菌液に紫外線を照射すると、照射量の少い時は菌の代謝が促進され、照射量が多いと菌体内の顆粒は完全に消失し、核酸は均等に分布されると報告している。またすでに内藤・高橋¹¹⁾が BCG 及び鳥型菌の観察から、菌体は細長くなり、菌の一端が常に tapered end を示し、また菌体内に 1000 Å 前後の NT 小体が多数在り、原形質の透過性が増すことを報告している。筆者の観察では、鳥型菌及び BCG 共に紫外線の照射による余り顕著な菌体の伸長は見られなかった。この点内藤等とは異なる成績が得られた。これは内藤等が用いた菌が、休止菌に紫外線を照射しており、筆者の方法とは異なるためではなからうか。併し今回の実験でも人型菌の場合には、極めて顕著な菌の伸長現象が見られた。

次に菌体原形質は鳥型菌、BCG 及び人型菌共に紫外線により明かな変質状態が認められた。即ち照射 30 秒ですでに原形質の Ghost 化が認められ、染色像ではこの現象が抗酸性の減弱として現われた。更に原形質の菌体内に

おける凝縮現象は、染色像には赤染した菌体の部分的断裂像として示された。これらの所見から結核菌の抗酸性は、菌体原形質の状態と一連の関係を持つているように思われる。人型菌について興味あることは、紫外線照射により若干の菌が異常に長くなり、Y 字状あるいは T 字状の分枝を示したことであった。結核菌の分裂増殖に関しては、従来横分裂 (transversal fission) が正常の形式であるとされているところから、上記のような出芽乃至分枝形式の分裂は、紫外線照射によつて生じた異常分裂と考えるのが妥当と思われる。

結 論

膜面培地上に接種した鳥型菌、BCG 及び人型菌に対して紫外線を照射し、これを培養後、電子及び光学顕微鏡を用いて電顕像に見られる電子不透過小体と染色像に見られる Much 顆粒との関係について追求した。同時に紫外線照射による菌体の形態学的変化について観察し、次の結果を得た。

- 1) 染色像に見られる所謂 Much 顆粒と電子不透過小体の間には、菌体内における位置及び数の上から一定の関係が認められなかった。
- 2) 菌体原形質は紫外線照射により変質して電子線に対する透過度が増強し、菌体は所謂 ghost 化した。また透過度の増強と共に抗酸性が減弱した。

文 献

- 1) Lambke, A. u. Ruska, H: Klin. Wschr. 19, 217, 1940.
- 2) Knaysi, G., Hillier G., and Fabricant, C.: J. Bact. 60, 423, 1950.
- 3) Mudd, S., Winterschied, L. C., Edward, D., De Lamater and Heuderson, H.J.: J. Bact. 62, 459, 1951.
- 4) Winterschied, L. C. and Mudd, S.: Am. Rev. Tbc. 67, 59, 1953.
- 5) Werner, G. H.: Advances in Tuberculosis Research IV
- 6) 戸田・武谷: 第 25 回日本細菌学会演説抄録, 42 頁, 1952 年
- 7) 武谷・小池・内田: J. Electromicroscopy 2, 29, 1954.
- 8) 武谷: 電子顕微鏡, 3, 207, 1954.
- 9) 篠原: 抗研雑誌, 9, 243, 1954.
- 10) 谷野: 第 25 回細菌学会演説抄録, 12 頁, 1952 年
- 11) 内藤・高橋: 結核の研究, 2, 60, 1954.
- 12) 有馬・内藤: 電子顕微鏡, 3, 92, 1953.

13) Lembke, A.: Zbl. Baktr., 152, 239, 1947.

賜つた恩師高橋義夫教授, また終始指導を忝うした有馬純助教授に深厚なる謝意を表し, 研究の機会を与えて下さつた宮城行雄所長に厚く感謝する。

筆をおくに当り, 本研究を命ぜられ, かつ指導助言を

【電子顕微鏡写真説明】

- Fig. 1 : 鳥型菌を膜面培地上に接種後, 培養及び紫外線照射をせずに 40°C 15 分間乾燥して直ちに撮したもの。菌は単在して短小である。 $\times 12300$.
- Fig. 2 : 鳥型菌, 紫外線を照射せずに 37°C で6時間培養したもの。直径約 1000 \AA の顆粒(矢印)がみられる。 $\times 12300$.
- Fig. 3 : 鳥型菌, 紫外線照射 10 秒後6時間培養のもの。原形質の透過性が多少増加している。 1000 \AA の顆粒がみられる(矢印) $\times 12300$.
- Fig. 4 : 鳥型菌, 紫外線照射 30 秒後6時間培養のもの。小顆粒(矢印)は依然として観察される。 $\times 12300$.
- Fig. 5 : 鳥型菌, 紫外線照射 1 分後6時間培養のもの。小顆粒は消滅して, 直径約 3000 \AA の顆粒が出現している。(矢印) 原形質の透過性は多少増加している。 $\times 12300$.
- Fig. 6 : 鳥型菌, 紫外線照射 2 分後6時間培養のもの。殆んどが単在菌で菌体も短小である。直径 2000 \AA 前後の小体が見られる。(矢印) $\times 12300$.
- Fig. 7 : BCG. 菌を膜面培地上に接種後, 紫外線照射及び培養をせずに 40°C 15 分間乾燥して直ちに撮したもの。菌は短小で単在している。 $\times 12300$.
- Fig. 8 : BCG. 紫外線照射せずに 37°C で4日間培養したもの。原形質は多少菌体内に凝縮している。 $\times 12300$.
- Fig. 9 : BCG. 紫外線照射 10 秒後4日間培養したもの。菌体原形質は相当に透過性が増し凝縮が強くなつた。電子透過小体が数ヶ見出せる。(矢印) $\times 12300$.
- Fig. 10 : BCG. 紫外線照射 30 秒後4日間培養したもの。一部の菌に直径約 1000 \AA の顆粒が見られる。(矢印) 原形質の破壊像も認められる。 $\times 12300$.
- Fig. 11 : BCG. 紫外線照射 1 分後4日間培養したもの。直径約 1000 \AA の小顆粒数ヶが認められる。(矢印) $\times 12300$.
- Fig. 12 : 人型菌, 紫外線を照射せずに 37°C で5日間培養したもの。1 菌体に2~3ヶづつ直径約 3000 \AA の大顆粒が明瞭に認められる。(矢印) 電子透過性小体の存在を見出せる。 $\times 12300$.
- Fig. 13 : 人型菌, 紫外線照射 10 秒後5日間培養したもの。菌体は異常に成長し, Y 字状あるいは T 字状に分枝している。 $\times 12300$.
- Fig. 14 : 人型菌, 紫外線照射 30 秒後5日間培養したもの。菌体の原形質は, 非常に透過性が増し, 大顆粒は消失して直径約 1000 \AA あるいはそれ以下の所謂 micell が非常に多数出現している。(矢印) $\times 12300$.
- Fig. 15 : 人型菌, 紫外線照射 1 分後5日間培養したもの。原形質は殆んど Ghost 化し, 菌体外に菌の破壊産物と見做せる物質(矢印)が円形に集合している。 $\times 12300$.
- Fig. 16 : 人型菌, 紫外線照射 2 分後5日間培養したもの。菌体は成長が抑制されたようにみえる。小顆粒が2~3ヶ認められる。 $\times 12300$.



Fig. 1



Fig. 2

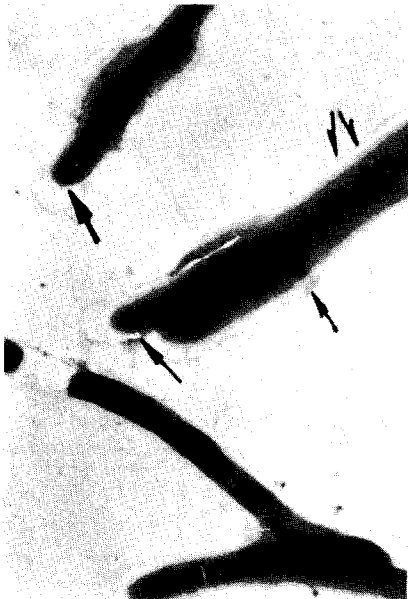


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8



Fig. 9



Fig. 10



Fig. 11



Fig. 12

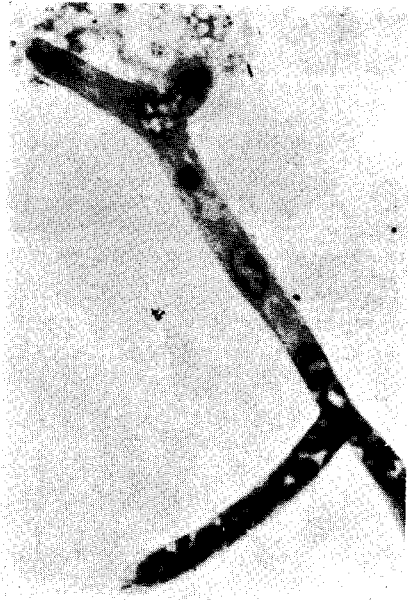


Fig. 13



Fig. 14

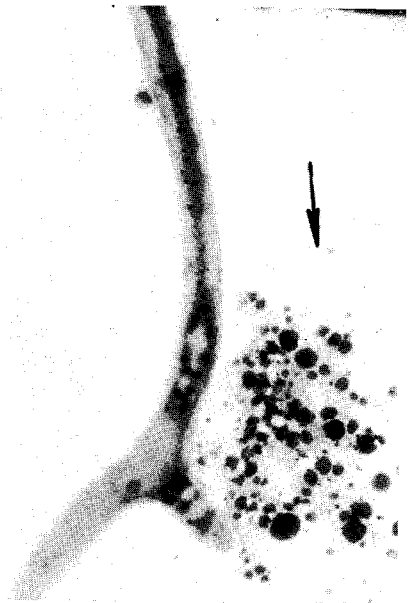


Fig. 15



Fig. 16