



Title	結核菌の形態学的研究：第2報 電子不透過性小体の生物学的意義
Author(s)	月居, 典夫; TSUKIORI, Norio
Description	
Citation	結核の研究, 6, 17-35
Issue Date	1957-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26615">https://hdl.handle.net/2115/26615</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	6_P17-35.pdf



# 結核菌の形態学的研究

## 第 2 報

### 電子不透過性小体の生物学的意義

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)

(昭和 32 年 2 月 5 日受付)

#### 緒 言

さきに著者は第 1 報に於て結核菌に紫外線を照射しそれによる菌体構造及び抗酸性の変化について報告した。その際、主として電子顕微鏡像に見られる電子不透過性小体と、染色像に現われる所謂 Much 顆粒との相関関係を比較検討し、両者はその菌体に於ける位置的及び数的分布状態の点から同一性質のものでないとの結論に到達した。

そこで今回の実験では、この電子不透過性小体の細胞化学的意義を更に追求する為に、培養基中の組成、特に主なる炭素源並びに窒素源と血清の量を種々と増減して、夫々の培養した菌について電子顕微鏡的検査と同時に種々の染色を行い、電子不透過性小体と各種染色顆粒との関係を比較検討した。又上述した培養基成分が菌の抗酸性、発育増殖並びに内部構造に及ぼす影響に就いても、電子顕微鏡的及び光学顕微鏡的に観察した。

#### 実験材料及び実験方法

使用菌株：人型結核菌岡井株（患者から分離した毒力菌である。）

使用培地：膜面培養用として変法 Kirchner 寒天培地を用いた。今回の実験は、本培地中の組成を種々変化させて行つたので、その基本的組成を第 1 図に示した。

第 1 図の培地上に 1.5% コロシオン醋酸アミル溶液を滴下して薄膜を張つた。

試料作製法：Dubos 培地 4~10 日間培養の菌浮游液を、最初 3000 r. p. m. 10 分間遠心沈澱して上清を捨て、その沈澱を蒸溜水に軽く浮游させ、同様に遠心沈澱して洗滌、これを 2 回繰返した。最後に得た上清中では、菌が大體 1 個宛に分散していたが、この菌液をカピラールピペットで膜面培地上に 1 滴宛滴下して後、3 乃至 5 日間孵卵器

第 1 図 膜面培養用変法ヒルナー  
培地の基本処方

アスパラギン	15.0 g
第一磷酸カリ	12.0 g
第二磷酸ナトリウム	9.0 g
クエン酸ナトリウム	7.5 g
硫酸マグネシア	1.8 g
クエン酸鉄アンモン	0.15 g
グリセリン	60 ml
蒸溜水	1000 ml

別に濾紙で濾過した 3% 寒天を上記の基汁 1 に対し 2 の割合に混ぜ、高圧滅菌後 50°C に保温し之に全量の 10% の割合に滅菌した牛血清を加えた後 9~10ml 宛試験管に分注する。

中で培養し、得られた菌集落を電子顕微鏡及び光学顕微鏡試験の材料に供した。

電子顕微鏡撮影条件及び染色法：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、加速電圧 50KV 電子電流 10  $\mu$ A、直接倍率 2700 倍である。

又今回行つた染色法は次の 5 種類である。

Ziehl-Neelsen 染色法……抗酸性、菌体の発育及び増殖程度を見るのを目的とし、それらの判定は、膜面培養 3~5 日培養の凡そ 10~100 個の強い抗酸性を示す菌からなる microcolony を standard として行つた。(Fig. 1)

Feulgen 反応……細胞の核の染色法で、特に核中の DNA を呈色させる方法であるが、この反応では菌体は薄い桃色に、顆粒は赤紫色に染つて見える。(Fig. 2)

Delafield Haematoxylin 染色法……これは Feulgen 反応と同様に核染色の目的で行つた。本法によれば

核中の磷酸が呈色すると言われ、菌体は薄紫色に、核に相当する部分は濃紫色の顆粒として染る。(Fig. 3)

**Janus-Green B染色法**……本法はミトコンドリアの染色法であり、この方法では、菌体は薄い紫色に、ミトコンドリアに相当する部分は濃い紫色の顆粒として染る。

(Fig. 4)

**Fontés 染色法**……本法は所謂 Much 顆粒の染色法で、Gram 染色法の変法であるが、従来リボ核蛋白の証明にも用いられている。本法によれば、菌体は薄桃色に、顆粒は濃紫色に染る。(Fig. 5)

尚今回行った染色法の中、特殊な染色法の2、3に就いてその方法を略述する。

**Feulgen 反応**……試薬→第1液：亜硫酸フクシン液、これは塩基性フクシン1gを煮沸水200ccに溶かし、50°C迄冷却する。そこで濾紙で濾過して1N塩酸20ccを加え25°C迄冷却する。無水重亜硫酸ソーダ1gを加え24時間冷暗所におく。第2液：亜硫酸水、これは蒸留水200ccに10%無水重亜硫酸ソーダ10cc、1N塩酸10ccを加えたもの。染色法→①標本を1N塩酸中で60°C2分間加水分解。②水洗。③第1液を6時間乃至24時間作用。④第2液で2~3回洗滌した後5分間水洗。⑤フクシンで後染色(室温)。

**Delafield Haematoxylin 染色法**……試薬→ヘマトキシリン結晶4gを無水アルコール又は95%アルコール25ccに溶かし、これにアムモニア明礬飽和水溶液を少量加え、次でglycerin 100cc及びメチルアルコール100ccを加える。方法→上記染色液中に標本を6~12時間室温で浸して後、水洗する。

**Janus-Green B染色液**……試薬→Janus-Greenの0.04%水溶液。方法→標本をこの染色液の中に38°Cで24時間浸して後、水洗する。

以上の染色法を行うに際し、前処理として標本をアセトンアルコール(アセトンと無水アルコールを当量に混ぜたもの)中で2~10時間室温で処理し、次でエーテルアルコール(無水アルコール2に対してエーテル1の割合に混ぜたもの)中で60°C1分間処理すると、鮮明な結核菌の染色標本が得られる。

尚今回の実験で対象とした電子不透過性小体は、直径約1000~3500Åの小体でKnaysiの言う所謂A bodyである。又A bodyと各種染色顆粒の比較は、電子顕微鏡像及び染色像上で夫々100~500個の菌体に就いて各々の顆粒の数的関係を調べ、その度数分布に就いて行つた。

実験成績

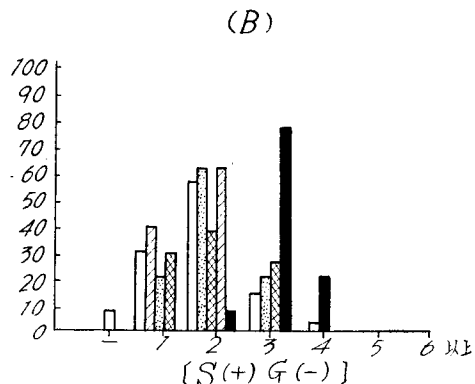
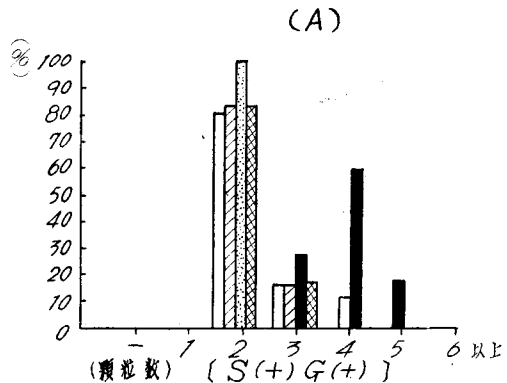
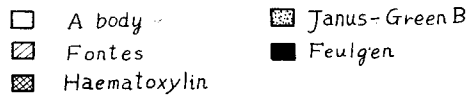
実験 I 培養基中のグリセリン及び血清を加減せる場合

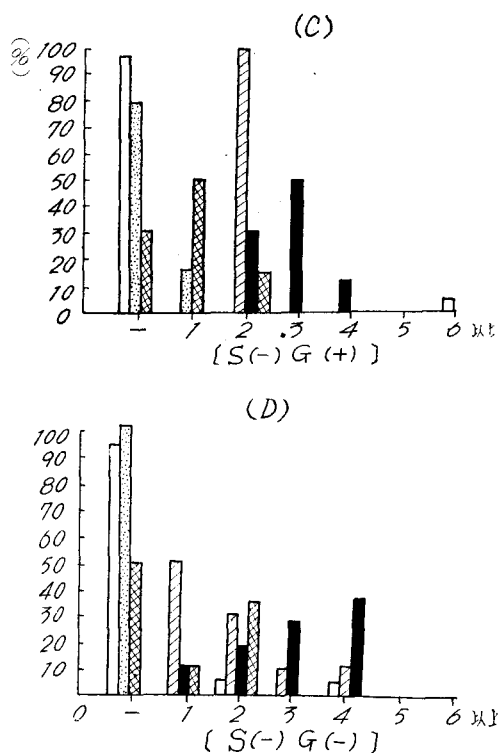
培地中に加えるグリセリンと血清を種々加減し、それ等の培地上に発育した菌に就いて、菌体内顆粒の推移を電子顕微鏡(以下EMと略す)及び光学顕微鏡(以下LMと略す)で観察し、併せてグリセリン(以下Gと略す)及び血清(以下Sと略す)の菌の抗酸性、発育増殖及び内部構造に及ぼす影響をも検討した。

使用した培地の種類は、基本処方量を含んだ培地を対照とし、これからSのみを除いたもの、Gのみを除いたもの及びSとGを共に除いたものの計4種類である。菌体内のA bodyと各染色顆粒の関係は、菌体内のそれらの数と位置の上から比較検討した。

A body及び各種染色顆粒の数の度数分布は第2図に示す通りである。

第2図 A body と染色顆粒の度数分布





第2図に就いて検討すると、(A. の対照 (S(+))G(+)) に於ては、Feulgen 顆粒 (以下 FI 顆粒) を除いた他の顆

粒、即ち A body, Janus-Green B 顆粒 (以下 J-G 顆粒), Haematoxylin 顆粒 (以下 H 顆粒) 及び Fontés 顆粒 (以下 Ft 顆粒) は殆んど同様な分布状態を示し、且つ大部分の菌体に於てそれらの顆粒は菌体 1 個あたり 2 個見られた。又之等は決して菌の両極に見出された。FI 顆粒の分布を見ると、これに反して、菌体 1 個あたり 3, 4, 5 個のものが多く、数的分布状態は上記の他の顆粒とは全く異つていた。(B. の S(-))G(-) 培地では、A body は 1 個乃至 3 個の菌が大部分を占め、これと平行的な分布を示しているのが J-G 顆粒、H 顆粒並びに Ft 顆粒であつた。(C) の S(-))G(+) 培地及び (D) の S(-))G(-) 培地では、FI 顆粒を除く他の顆粒の分布はまちまちであつたが、その中で A body と J-G 顆粒の分布が比較的平行しているといえよう。

以上 A body と各種染色顆粒の菌体内の 数的分布を比較すると、A body に最も近い平行関係を示したのは全条件を通じて J-G 顆粒であると言える。その他の染色顆粒の分布状態は A body のそれとの類似性は余り認められなかつた。然し乍ら対照の様に培養の好条件の下で A body が 1 個ずつ菌の両極に見出される様な場合には、総ての染色顆粒も同じく両極に 1 個ずつ見られるのが常であつた。

次に抗酸性及び 発育増殖等についての EM 的並びに LM 的所見を第 1 表に示した。

第 1 表 光学並びに電子顕微鏡所見

	光学顕微鏡所見 (ザール・ネルゼン法)			電子顕微鏡所見					
	抗酸性	菌体発育	菌増殖	長さ	太さ	不透過性小体 (A body)	細胞質	透過小体	ミセル
S (+) G (+)	+++	+++	+++	長	太	大半は 2 及び 3 個	均等に分布	(-)	(-)
S (+) G (-)	++	++	++	短	細	約 50% が 2 個 50% は 1 個 (-)	同上	(-)	(-)
S (-) G (+)	+	+	+	長	細	大半は (-)	凝縮し不均等	(-)	(-)
S (-) G (-)	+	+	-	短	細	同上	凝縮強まる	(-)	(-)

註 S: 血清 G: グリセリン

+++ { 抗酸性 → 濃い赤色を呈するもの  
 { 発育及び増殖 → 高度の発育増殖を呈するもの  
 ++ { 抗酸性 → 桃色を呈するもの  
 { 発育及び増殖 → 中等度のもの  
 + { 抗酸性 → 薄い桃色を呈するもの  
 { 発育及び増殖 → 軽度のもの

- { 抗酸性 → 辛うじて菌体の判別の出来る程度  
 { 発育及び増殖 → 全く発育増殖せぬもの

此表に示されているように、抗酸性には、各培養条件で著明な変化は見られなかつたが、S (-) 培地上の菌においては多少減弱する傾向が見られた。菌体の発育程度もGのみを除いた培地では対照との差は全く認められなかつたが、S (-) 培地及びS (-) G (-) 培地上に発育した菌は、対照に較べて小さく発育の低下が見られた。特にS (-) G (-) 培地では菌の発育は殆んど停止している様に見受けられた。これに平行して菌の増殖程度もS (-) 及びS (-) G (-) 培地では非常に低下していたが、特に後者の培地では菌の増殖は全く見られず、菌は接種した儘の状態を観察された。

次にEM所見を第1表及びFig. 6 (a~d) に示した。之等の表及び図に見られるように、個々の菌体の大きさは、G (-) 培地では一般に短くなる傾向が見られた。細胞質は、対照及びG (-) 培地では一様な電子不透過性をもつて均等に分布していたが、S (-) 及びS (-) G (-) 培地では部分的に凝縮し、電子線透過度も不均等となり、中にはGohst化した様な菌も見られた。又Sを除いた培地上の菌体のcell wallは輪廓が不鮮明に観察された。以上のEM像では、培地から血清を除く事により菌の細胞質は凝縮し、cell wallの輪廓がくずれ、A bodyが消失する等、菌体に可成りの変化が認められた。この事はLM像で見られる血清(-)培地の菌の抗酸性の減弱、菌体発育及び菌増殖の低下と平行関係があるように思われる。

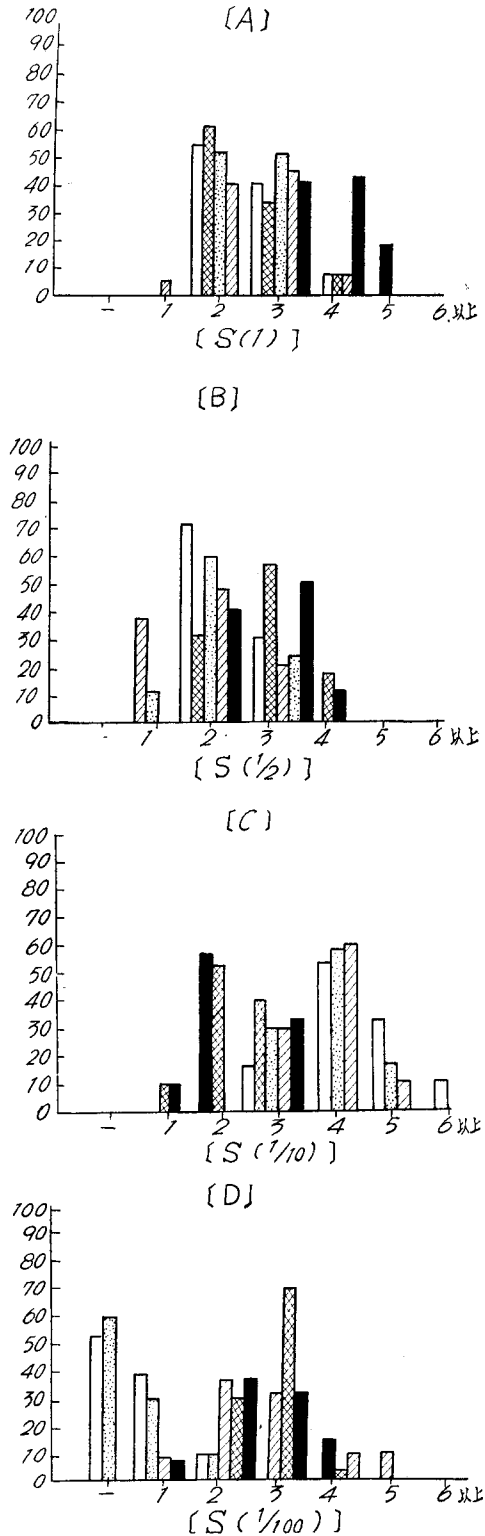
実験 II 培養基中の血清量を加減せる場合

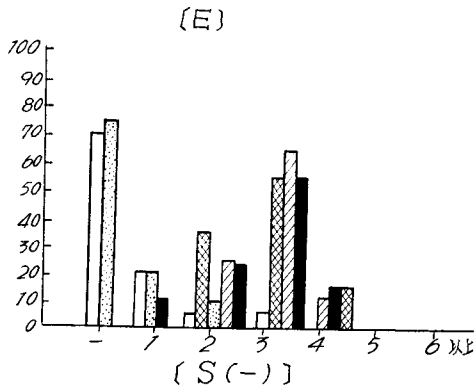
実験Iに於て、培地から血清を除去すれば、菌体内のA bodyは消失し又菌の発育増殖は悪化し、菌体内部構造にも相当な変化が現われる事が判つた。そこで今回は培地中の血清の影響を更に詳細に検討して菌の発育増殖に必要な最少量を決める為に、培地中に加える血清量を種々の濃度にし、前回同様の方法で実験を繰返した。尚血清の効果をもより正確に把握する為に本実験では培地中の主なる炭素源及び窒素源であるグリセリンとアスパランを除去した。

血清の濃度は、前述した基本処方量を1とし、この量の各1/2, 1/10, 1/100量及び(-)の種類とした。夫々の培地上に発育した菌のA bodyと各種染色顆粒の数の度数分布を第3図に示した。

第3図に示したように、対照(S1)に於てはA bodyとJ-G顆粒、H顆粒及びFt顆粒が凡そ一致した分布を示し、F1顆粒のみが異つた分布を示した。〔B〕の1/2量培地の菌では、A body 2個の菌が約70%、3個の菌が約30%であり、之に比較的類似した分布を示すのはJ-G顆粒であつた。Ft顆粒は2個の菌が50%、3個の菌が20%

第3図 A body と染色顆粒の度数分布





でも之も稍々平行していた。〔C〕の 1/10 量培地では、〔B〕と同様に J-G 顆粒と Ft 顆粒が A body と比較的類似した分布を示し、H 顆粒及び Fl 顆粒は異つた分布を示した。〔D〕及び〔E〕では、A body と J-G 顆粒のみが平行的分布を示し、他の染色顆粒は殆んど全く異つた分布状態であつた。

以上の実験に於ても実験 I と同様に、發育環境の変化に伴う A body と各染色顆粒の数的変化の關係は、J-G 顆粒のそれが A body と最も類似していた。次に A body と染色顆粒の菌体内に於ける位置的關係に就いては、A body が 1 個ずつ菌の兩極に見出される様な条件下では、他の染色顆粒も同じく兩極に 1 個ずつ見られた。

実験 I 及び実験 II の成績を通覽してみると、一般に好条件の培地に發育した菌では、J-G 顆粒、H 顆粒及び Ft 顆粒は A body と殆んど同じ数的分布を示し、条件の悪い培地においては、A body と J-G 顆粒のみが類似した度数分布を示し、他の染色顆粒は之と異つた分布を示す事が觀察された。

次に培地中の血清量の変化による菌の形態及び染色性

等の変化を EM 並びに LM 的に觀察し、その成績を第 2 表に表示した。

第 2 表に示されているように、菌体の抗酸性は S 1/10 量以下の培地の菌において対照に較べて多少減弱の傾向を示して居り、菌体發育の程度も S 1/10 量培地では多少低下し S 1/100 量培地では全く發育が停止している様であつた。一方菌の増殖度も同様に S 1/10 量培地から低下し、S (-) 培地では全く菌の増殖は認められなかつた。次に EM 所見を見ると Fig. 7 (a~f) 並びに第 2 表の如くであるが、個々の菌体の大きさは、S 1/2 量以下の培地の菌は対照に較べて短く且つ細くなつていた。菌体内部構造の変化としては、対照、S 1/2 量及び 1/10 量培地では菌体内に均等に分布し充實した像を示していたが、1/100 量培地と (-) 培地の菌では部分的に凝縮を起し又菌体の萎縮が見られた。次に A body は、その度数分布に就いては前述したが、更に詳細に觀察すると対照及び 1/2 量培地では、直径約 3000 Å のものが兩極に 1 個宛計 2 個或は菌体中央部に更に 1 個計 3 個の菌が大部分であり、1/10 量培地では A body はその大きさが対照の約半分位となり、その数は寧ろ増加して菌体内に 4 乃至 5 個存在するのが認められた。S 1/100 及び S (-) 培地では視野の約半数程度の菌には A body は見られず、残りの約半数には 1 乃至 2 個が見られたが、これらは直径 2000~3000 Å 程度であつた。電子透過性小体 (所謂 cell sap vacuole は対照及び S 1/2 量培地に認められたが、他の条件の培地上の菌には認められなかつた。又 Knaysi のいう micell は何れの菌にも認められなかつた。

以上 EM 及び LM 所見より、培地中にグリセリン及びアスパラギンが全く欠除していても、血清が充分に含まれていれば、菌は相當に良好な發育及び増殖を行う事、又反対に同様な条件下で血清の量が或限度以下に減ずると、

第 2 表 光学並びに電子顕微鏡所見

	光学顕微鏡所見 (チール・ネルゼン法)			電子顕微鏡所見						
	抗酸性	菌体發育	菌増殖	菌長さ	菌太さ	細胞質	不透過小体 (A body)	透過小体	ミセル	
S (1)	-	+	+	長	太	均等に分布	大半は 2~3 個	(+)	(-)	
S (1/2)	+	+	+	短	稍々細	同上	同上	(+)	(-)	
S (1/10)	+	+	+	短	稍々細	同上	小さくなり 4~5 個	(-)	(-)	
S (1/100)	+	+	+	短	細	凝縮し 不均等	50%が (-) 50%が 1~2 個	(-)	(-)	
S (-)	+	-	-	短	細	同上	同上	(-)	(-)	

菌の発育増殖が低下し、菌体内部構造に変化が生ずる事が認められた。又菌が良好な発育増殖を起すのに必要な血清の最少量は基本処方<sup>1</sup>の1/100~1/10量である事が形態学的観察から認められた。

**実験 III 培養基中の血清、グリセリン及びアスパラギンを加減せる場合**

実験 I 及び II に於て、血清が菌の発育増殖に極めて重要な因子である事が判り、之を除くと他の培地成分が全部含まれていても菌の発育増殖が殆んど見られない事、而して菌の発育増殖に必要な血清の最少量は、基本培地組成のそれの凡そ 1/100 である事が明らかにされた。そこで今回は血清の最少必要量を加えた状態に於て、培養基中に加える主要栄養源であるアスパラギンとグリセリンの量を種々と加減しその事が菌の抗酸性、発育等に及ぼす影響を前回同様な観点から検討した。又発育環境の変化に伴う A body の変化と染色顆粒の変化とを比較した。

実験に供した培地の条件は次の如くである。

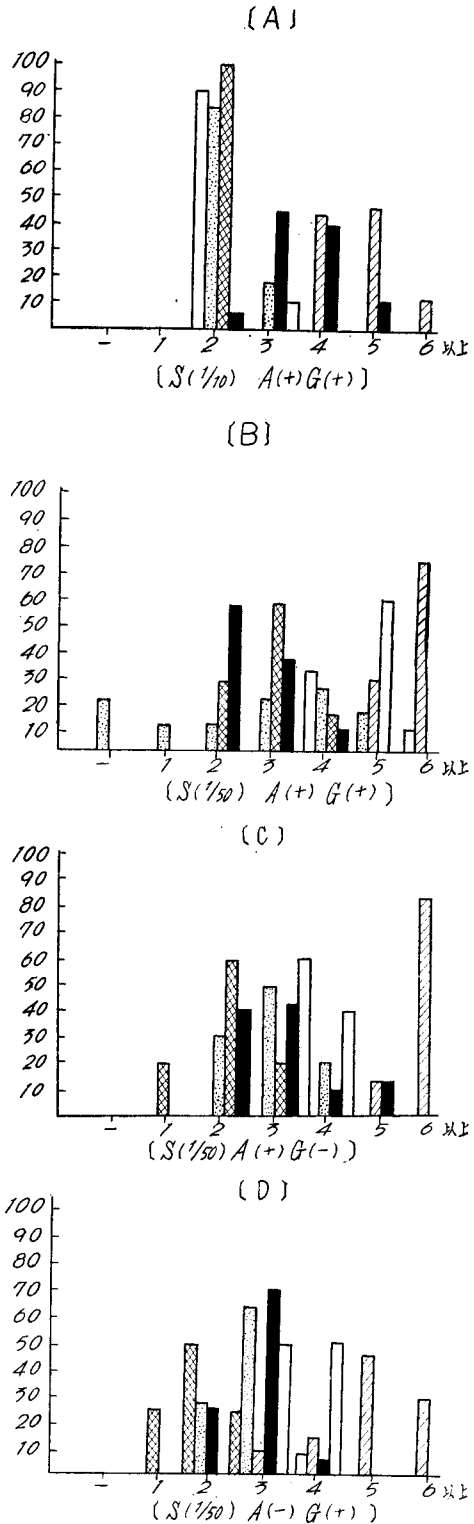
(I)	血清	(1/10)	アスパラギン	(+)	グリセリン	(+)
(II)	"	(1/50)	"	(+)	"	(+)
(III)	"	(")	"	(+)	"	(-)
(IV)	"	(")	"	(-)	"	(+)
(V)	"	(")	"	(-)	"	(-)
(VI)	"	(1/100)	"	(+)	"	(+)
(VII)	"	(")	"	(+)	"	(-)
(VIII)	"	(")	"	(-)	"	(+)

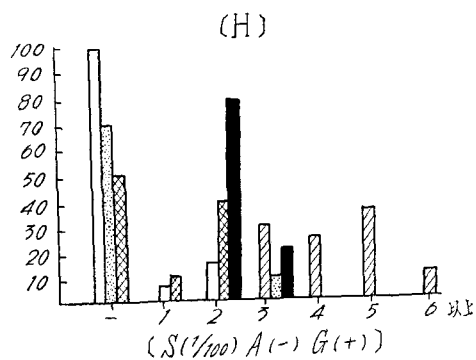
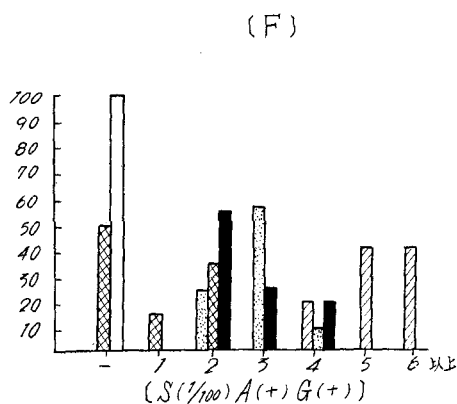
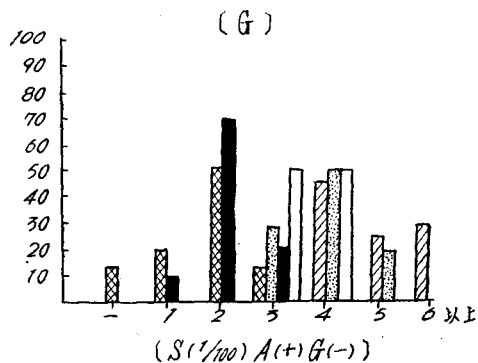
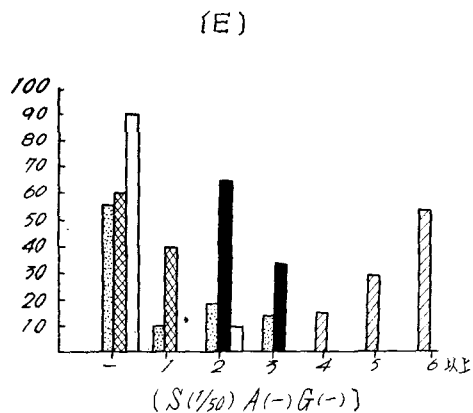
尚血清量は、基本処方の量を 1 として計算した事は前回の実験と同じである。

上記の培地に発育した菌に見られる A body と各種染色顆粒の数の度数分布を第 4 図に示した。

第 4 図の〔A〕で明らかな様に、対照培地上の菌では、A body 2 個の菌が大半を占め、之と類似した分布を示したのが、J-G 顆粒及び H 顆粒である。〔B〕では A body はその直径が短縮し、その数が 4、5 及び 6 個の菌が夫々 30%、60% 及び 10% に認められたが、これと平行した分布を示す染色顆粒は殆んど無く、〔C〕に於ては J-G 顆粒が比較的類似した分布を示していた。〔D〕では、A body は 3 個及び 4 個の菌が約 50% 宛に分布していたが、その数が 3 個の場合には J-G 顆粒及び F1 顆粒も略々等しい度数を示したが、総じて各顆粒の度数分布はばらばらで平行関係は見られなかつた。〔E〕では A body、J-G 顆粒及び H 顆粒が比較的類似分布を示し、〔F〕では A body と染色顆粒との間に殆んど平行関係は見られなかつた。〔G〕及

第 4 図 A body と染色顆粒の度数分布





第3表 光学並びに電子顕微鏡所見

S (1/10) A(-) G(+)	光学顕微鏡所見 (チール・ネルゼン法)			電子顕微鏡所見			不透過小体 (A body)	透過小体	ミセル
	抗酸性	菌体発育	菌増殖	菌体 長さ	菌体 太さ	細胞質			
S (1/10) A(-) G(+)	-	-	-	長	稍々細	均等に分布	大半が2個 一部3個	(-)	(-)
S (1/50) A(+) G(+)	-	+	+	長	太	大半が均等に分布	4, 5, 6個	(-)	(-)
S (〃) A(+) G(-)	-	+	-	短	細	均等に分布	3, 4個	(-)	(-)
S (〃) A(-) G(+)	+	-	+	長	細	同上	3, 4個	(-)	(-)
S (〃) A(-) G(-)	+	-	-	長	細	同上	大半が(-)	(-)	(-)
S (1/100) A(+) G(+)	+	+	+	長	太	大半が均等に分布	(-)	(-)	(-)
S (〃) A(-) G(+)	-	+	+	長	細	均等に分布	3及び4個	(-)	(-)
S (〃) A(-) G(-)	+	-	-	長	細	大半が均等に分布	(-)	(-)	(-)

註A: アスパラギン

び〔H〕では、J-G 顆粒のみが A body と類似した分布を示した。

今回の実験では、全条件を通じて完全に A body と平行する分布を示す染色顆粒は無かったが、すべての染色顆粒の中では J-G 顆粒が比較的類似した度数分布を示した。この点実験 I, II に略一致する成績であつた。

各条件の培地に発育した菌の染色性、発育増殖その他形態学的な検査成績を第 3 表に示した。先ず抗酸性には、S の量を 1/10 量にした場合以外は多少の減弱が見られ、特にかかる条件の下でアスパラギンを除くと、抗酸性は非常に減弱して弱抗酸性となり、中には非抗酸性菌も見られた。菌の発育増殖はこれと並行し、アスパラギン(一)培地上では発育も増殖も悪く、特にアスパラギン、グリセリン共に(一)培地で S が 1/100~1/50 量のものにおいては殆んど全く発育増殖が認められなかつた。

之等の条件下で発育した菌の EM 所見は、Fig. 8 (a~h) 及び第 3 表の如くである。之等の所見を一括してみると、菌体の大きさの点では、血清、アスパラギン及びグリセリンの濃度の変化に伴う規則的な傾向は認められなかつた。菌体内部構造の点でも、上記 3 成分の変化に伴う一貫した変化は見られず、殊に細胞質は何れの条件下においても略々均等な分布を示した。A body の変動も区々であり、対照培地上の菌体内では、菌体の両極に夫々 1 個宛認められ、大きさは約 3000 Å であつたが、血清濃度を稀薄にした培地上の菌では、大きさは直径 1000~2000 Å 位となり、数は 3~5 個宛に増加したり或は菌体内に全く認められない場合もあつた。

以上の様に、今回の実験条件では培地組成の変化に伴う菌体内部構造の変化は明確には証明し得なかつたが、LM 所見から見ると、アスパラギンは菌体に可成りの影響を及ぼす事が窺われた。即ち血清を低濃度に入れた培地では、アスパラギンの欠乏に伴つて菌の発育増殖が低下し、抗酸性も之と平行して減弱する事が認められた。之等の事実は、菌の好適な発育には窒素源として血清アルブミン及びアスパラギンが重要な役割を演じている事を示し、又同時にこれらの窒素源が菌の抗酸性に密接な関係をもっている事が窺い知られる。

## 考 按

今回の実験の主要目的は、結核菌の電子顕微鏡に現われる電子不透過性小体 (A body) の細胞化学的意義の追求にあつた。扱て現在我々が EM によつて観察し得る結核菌の菌体内部構造の要素としては、細胞壁、細胞質膜、細胞質、電子不透過性小体、電子透過性小体及びミセル等であるが、之等数種類の要素の中、特に数的位置的に著明

な変化を示すのが所謂 A body であつて、この小体は菌に物理的乃至化学的刺戟を与えると、その大きさも数も又菌体内に於ける位置も容易に変化する。之等の事実は、この小体が結核菌体を構成する最も重要な因子の 1 つであり菌の発育増殖に主要な役割を果している事を示唆する様に思われる。

従つてこの小体に関する EM 的研究は内外の研究者達の大きな研究テーマとなつて来た。EM 出現以前に於ても既に Ziehl-Neelsen 法或は Gram 染色法等をほどこした場合に見られる結核菌の顆粒に就いて多くの説が唱えられていた。即ち菌体中の非抗酸性黒色顆粒は Spore であるとする説、菌の分裂に重要な関係を有するという説、菌の life cycle の一段階とする説或は菌の Degenerative Form という説等様々な推論が述べられていたが、何れも一致した見解は得られなかつた。<sup>10-9)</sup>

その後 EM の発達に伴い、A body の追求が特に注目される様になり、最初に Ruska 及び Lembke<sup>10)</sup> 等独逸学派がこの問題を取り上げ、次で Rosenblatt<sup>11)</sup> 等及び Knaysi<sup>12)</sup> は、EM 並びに LM 対観察を行つた結果、此小体は核様物質であろうと述べ、これに対して Mudd<sup>13)14)</sup> は EM 検査及び Tetratorium 反応等の結果ミトコンドリアを示唆し、Werner<sup>15)16)</sup> はこの小体は異染小体であろうと推論した。最近に至つて Basserman<sup>17)</sup> は、此は Phosphate-körper で Kernequivalente であるとし、Rosenthal<sup>18)</sup> 等は、この小体が菌体外に分離して成熟菌になつた事実を観察し、これは、菌の life cycle の初期段階に現われるものであろうと結論している。

吾国に於ては伊藤<sup>19)</sup> はこの小体は DNA、蛋白質及び Lipoid を含有すると述べ、武谷等<sup>20)21)</sup> は代謝に関係深い物質の集積したものであろうと報告しているが、最近彼は Mudd と共に、本小体は Metaphosphate body であるとの見解をもっている。篠原<sup>22)~25)</sup> はこの小体は旺盛に発育する菌に多く現われ、分裂に関係なく、菌の増殖力を示すシンボルであろうと推論している。

A body の生物学的意義を追求する方法には、Rosenthal<sup>18)</sup> の如く培養日数を追いつら同じ条件の菌を EM 及び LM 的に観察する方法、伊藤<sup>19)</sup> の如く菌の除核酸或は除蛋白を行つた後、細胞化学的及び EM 的検査を行う方法或は小池<sup>20)</sup> の如く菌体の超薄切片に就いての検査等種々の方法が行われている。著者は物理的乃至化学的操作を菌に与え、それに伴う菌体内顆粒の変化を EM 並びに LM で動的に追求し、A body と染色顆粒の関係を明らかにし様とした。即ち第 1 報<sup>27)</sup> では、菌に紫外線を照射して後培養し、培地上に発育した菌体の変化に伴う A body の推移を、この小体の細胞化学的検討を行う前段階として、

Fontes 染色法を行つて染め出される Much 顆粒の消長と比較し、両者は同一性質のものではないと結論に到達した。

今回の実験では、更に A body の本態を明らかにする為に種々の細胞化学的染色法により実験を進めた。今回行つた染色法の中、Feulgen 反応は核中の DNA と結合して呈色する者であると考えられて居り、<sup>28)29)30)</sup> Haematoxylin 染色は核酸中の特に磷酸と結合して呈色する者<sup>28)</sup>と言われている。又 Janus-Green B 染色はミトコンドリア中の磷脂質に Janus-Green B が吸着して呈色する反応であつて、Janus-Green B 染色陽性の顆粒はミトコンドリアと断定し得ると言われている。<sup>29)~30)</sup>最後の Fontes 染色法は一種の Gram 染色であり、之は細胞表面に存在する特殊なリボ核蛋白に反応して陽性反応を呈する<sup>28)</sup>と言われている。

今回は A body と上記 4 染色法で染出される顆粒とを夫々の数の度数分布の上から、又菌体内に占むる位置的關係から比較検討したのである。数的分布の点では、実験 I から実験 III を通じて A body と最も酷似した分布状態を示したのは Janus-Green B 陽性顆粒であつた。従つて A body は一応ミトコンドリアであろうと推定される。さてこの仮定に立つて考えると次の様な現象は比較的説明し易い様に思われる。即ち好条件下で発育した菌では、直径約 3000 Å の body が菌体両極に 1 個ずつみられるが、培養条件が悪化するにつれて、この小体は径が小さくなり(約 1000~2000 Å)又その数も多くなり菌体中に一様に分散して来る傾向が認められ、培養条件が更に悪化すると菌体細胞質は凝縮し A body が全く消失する事であつた。この様な現象を A body をミトコンドリアと仮定して細胞化学的な見地から説明してみると、菌が旺盛な発育増殖を行つている時には、菌体の両極或は中央部に比較的大きな円形或は楕円形の物質として局在しているが、培養条件が悪化すると、菌は生存を続けるのに必要なエネルギーを最大限に吸収する為、自己体内の酵素を菌体中に分散せしめ、その現象が形態的には 1000~2000 Å の直径の小体が菌体中に分散している像として認められるのではないかと思われる。培養条件が更に悪化すると、菌の発育は遂に停止し、ミトコンドリアも形態的観察では把握出来ない状態となり、細胞質も凝縮像を呈する様になる。以上の様な推察は、一般動物細胞のミトコンドリアの示す態度と或る意味に於て一致している様である。然し乍ら現在 EM の研究により認められている一般動物細胞のミトコンドリアと A body を比較すると、大きさが極めて小さい事、内部構造が未だはつきり判つていない事及び結核菌の発育増殖が盛んな時には A body の位置に一致して J-G 顆粒

ばかりでなく、H 染色、Ft 染色等も陽性に出て来るし、又 F1 顆粒も往々にしてこの位置に見られる事からして、今直ちに A body をミトコンドリアと断定する事は出来ない。従つて著者は、現在のところ A body を「ミトコンドリア様小体(chondrioid)」と考えておきたいのである。今述べたように菌の発育増殖が盛んで A body が菌体の両極に夫々 1 個ずつ存在する様な条件では、4 種の染色顆粒は大体同じ位置に認められる事が多いのであるが、これはこの様な発育増殖の旺盛な時期に於ては、A body (chondrioid) で DNA, RNA 及び其他菌体成分の生合成が盛んに行われ、従つてその部分が各染色法により顆粒として染め出されるのであろうと考えられる。この事は、植物学における近年の研究ではミトコンドリアの 1 つの特徴として考えられるようになって来た。<sup>32)</sup>

以上の考察から著者は A body を「chondrioid」と結論したのであるが、これと関連した報告を篠原<sup>22)~25)</sup>が行つている。即ち彼は BCG について顆粒の本態を詳細に追求し、この電子線不透過性顆粒は発育旺盛な菌の両極に 1 個宛認められ、これは Fontés 顆粒や核とは異り、Heidenhain-haematoxylin 法による mitochondria のみはその形、細胞内に於ける位置及び培養に於ける態度の点から類似していたと報告している。この事は著者の実験成績と類似している。

次に今回の実験では、培養組成の変化に伴う菌の発育増殖、抗酸性及び細胞質の変化を観察したのである。今回対象とした培地成分は、主なる炭素源としてのグリセリン窒素源としてのアスパラギン及び血清の 3 者であつたが、著者は特にこの 3 者に就いて比較的詳細に之等成分の菌体に及ぼす効果を検討すべく実験を行つた。抗酸菌は、一般的に適当な炭素源と窒素源を培地に与えるとビタミン等の発育素の添加なしに充分に発育出来、その代表的な培地はグリセリンを炭素源にグルタミン酸或はアスパラギンを窒素源とし、その他金属塩としてマグネシウムや磷酸、硫黄等を含んでいると言われている。又血清に就いては、Boissevain<sup>33)</sup>は合成培地中に 0.1% の割に馬血清アルブミンを加えると  $10^{-7}$  mg の人型結核菌の発育が可能となる事から発育素としての血清アルブミンの価値を強調し、Dubos<sup>34)</sup>も亦培地中に加えたアルブミンが菌に発育阻力的に作用する脂肪酸と結合してこれを除去する事を述べ、アルブミンの重要性を述べている。何れにせよ培地中に加える血清の中で、菌の発育増殖に好適な要素となるものは窒素源としての血清アルブミンである事は論をまたぬ事である。

グリセリンに就いて山村<sup>35)</sup>は、培地内に加えられたグリセリンは殆んど完全に消費され、一部はエネルギー源と

して解糖と同様な経路を経て酸化分解され、又一部分は菌体の生合成における炭素源として使用されるであろうと考え、又抗酸菌の中でも病原性の強い結核菌は特にグリセリンを炭素源として要求すると述べている。

今回の実験では、血清を全く除去すると菌の発育増殖が停止した為、血清を培地中から除いてグリセリン単独の菌に及ぼす影響を検討し得なかつたが、実験Ⅰに於てグリセリンを含んだ培地の菌は、含まぬ培地の菌よりも菌体が長くなつて居た。然し乍ら細胞質或は A body には特別な相違は認められなかつた。アスパラギンの菌形態に及ぼす影響に就いての今回の実験では、実験Ⅲに於て興味ある所見が得られた。即ち血清量を極めて少量にすると、アスパラギンの欠乏した培地の菌は、抗酸性が一様に減弱し、同時に菌の発育増殖が殆んど停止して居た事であつた。この事実は、窒素源が抗酸性及び発育増殖に対して相当な役割を演じている事を示唆している。最後に最も興味深く且つ詳細に検討したのが血清の菌に及ぼす影響であつた。全実験成績を通じて血清を培地から除去すると菌体の発育は全く停止し遂には自己溶解を惹起する事が EM 並びに LM 所見から観察され、これと反対に培地中に十分な血清が存在すれば、グリセリン及びアスパラギンが全く無くとも菌は良好な発育を行う事を知つた。之等の事実は、血清中には結核菌の発育増殖を促すに十分な窒素源及び炭素源の存在する事を示唆し、この点は、Dubos 等の説の妥当性を裏付けている様に思われる。

## 結 論

膜面培養基の組成の中、主として窒素源及び炭素源を種々と変化させ、夫々の培地上に発育した人型結核菌を、電子並びに光学顕微鏡で観察し、電顕像で見られる電子不透過性小体と、染色顆粒との相関関係を動的に比較検討し更にかかる培養条件の下に菌の抗酸性、発育増殖に現われる変化をしらべ次の結論を得た。

(1) 結核菌に於ける電子不透過性小体は、菌体内に於ける数的分布の上で Janus-Green B 顆粒と略一致した態度を示す。

(2) 菌体内に於ける位置的相関は、好適培養条件の下では、電子不透過性小体と各種染色顆粒は一様に菌の両端に夫々 1 個ずつ計 2 個認められる。併し培養条件が悪くなるとこの小体と J-G. B 顆粒のみが類似した態度を示し他の染色顆粒とは全く平行しない。

(3) Feulgen 反応陽性顆粒の態度は、終始不透過性小体と一致しない。

(4) 以上の観点から電子不透過性小体を「ミトコンドリア様小体 (chondrioid)」と考える。

(5) 培地中の炭素源は、菌形態に対して著しい影響を示さなかつたが、窒素源は、菌体内構造、菌の発育増殖及び抗酸性に可成りの影響を与え、特に血清の菌に及ぼす影響に就き論じた。

筆をおくに当り、本研究を命ぜられ、かつ御指導、御校閲を賜つた恩師高橋義夫教授、又終始直接の御指導を蒙つた有馬純助教授、御助言を戴いた山本健一講師並びに山下慎子講師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。

本論文の要旨は、第 7 回日本結核病学会北海道地方会に発表した。

## 文 献

- 1) Koch, R.,: Berl. Kl. Wschr., 19 Jg, No 15, 221, 1882.
- 2) Spengler, C. C.,: Z. Hyg. 49, 541, 1905.
- 3) Much, H.,: Beitr. Klin. T. b. K., 8, 85, 1907.
- 4) Minder, L.,: Zentr. Bakt. Parasitenk. I orig, 77,
- 5) Kahn. M. C.,: Am. Rev. Tuberc. 20, 150, 1929.
- 6) Knaysi, G.,: J. Infekt. Dis., 45, 13, 1929.
- 7) Wyckoff, R. W. G. and Smithburn, K. C.,: J. Infekt. Dis. 53, 201, 1933.
- 8) Hu, K.,: Jap. J. Exp. Med 14, 29, 1936.
- 9) Yegian, D. and Krung, J.,: Am. Rev. Tuberc. 56. 36. 1947.
- 10) Lembke, A. u. Ruska, H.,: kl. Wschr. 19 Jg, No 10, 217, 1940.
- 11) Rosenblatt, M. B., Fullam, E. F., and Gossler, A. E.,: Am. Rev. Tuberc. 46, 587, 1942.
- 12) Knaysi, G., Hillier, J., and Fabricant, C.,: J. Bact. 60, 423, 1950.
- 13) Mudd, S., Winterschied, L. C.,: Am. Rev. Tuberc. 67, 59, 1953.
- 14) Mudd, S., Winterschied, L. C., De Lamater, E. D and Henderson, H. J.,: J Bact. 62, 459, 1951.
- 15) Werner, G. H.,: Bibl. Tbc, 5, 53, 1951.
- 16) Werner, G.,: Adv. in Tuberc. Res. IV.
- 17) Bassermann, F. G.,: Z. Tbk. 103, 4~5 193,
- 18) Rosenthal, S. R., and Heagan, B.,: Ann. Inst. Past. 88, 1955.
- 19) 伊藤: 結核, 28, 400, 1953.
- 20) Takeya et al : J. Elec. Microscop. 2, 29, 1954.
- 21) 武谷: 電子顕微鏡 3, 207, 1954.
- 22) 篠原: 抗研誌, 9巻, 4号, 243頁, 昭29.
- 23) Shinohara, C.,: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku.

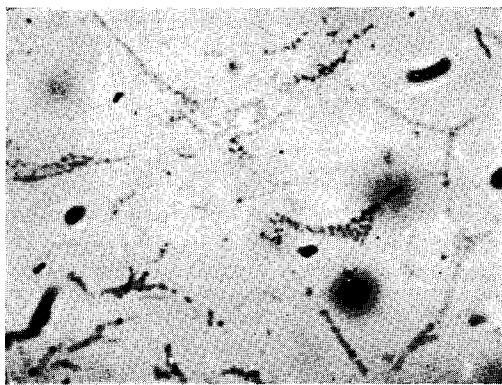
- univ. C 6, 1, 1955.
- 24) Shinohara, C.,: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. C 6, 15, 1955.
- 25) Shinohara, C.,: Jap. J. of Tbc, Vol 4, No. 1, 79, 1956.
- 26) 小池・平木: 結核, 31, 446, 1956.
- 27) 月居: 結核の研究, 3, 31, 1955.
- 28) 江上: 核酸及び核蛋白質 (上・下巻) 共立出版社, 昭28.
- 29) Lison, L: 組織化学及び細胞化学, 白水社1954.
- 30) デ・ロベルチス: 一般細胞学 昭 30.
- 31) 佐藤: 植物学会誌 69巻, 812号, 87頁, 昭 31.
- 32) 佐藤: 植物学会誌 69巻, 813号, 137頁, 昭 31.
- 33) Boissevain: Proc. Exp. Biol. Med. 44, 110, 1940.
- 34) Dubos, R. J. et al: Am. Rev. Tuberc. 56, 334, 1947.
- 35) 山村: 結核菌の生化学, 共立出版社, 1954.

## 光学顯微鏡写真

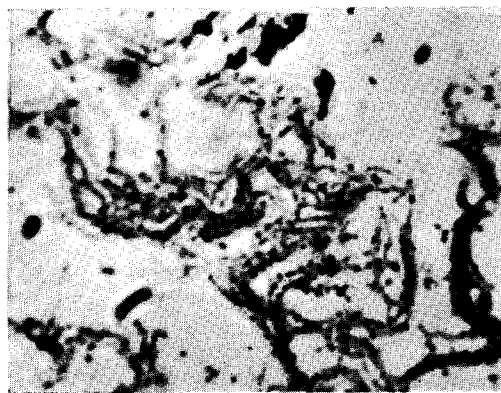
**Fig. 1.**  
Ziehl-Neelsen 染色



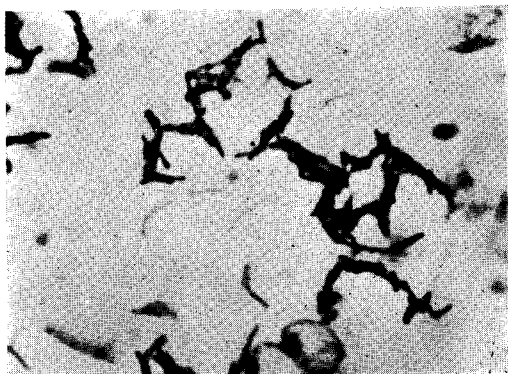
**Fig. 2.**  
Feulgen 染色



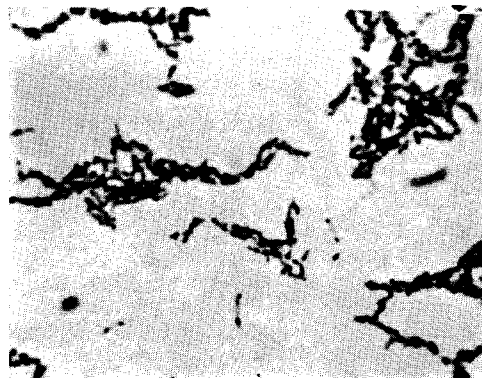
**Fig. 3.**  
Haematoxylin 染色



**Fig. 4.**  
Janus-Green B 染色



**Fig. 5.**  
Fontes 染色



電子顕微鏡写真

Fig. 6

培地中のグリセリン及び血清を加減せる実験

a.

S (+) G (+)



b.

S (+) G (-)



c.

S (-) G (+)



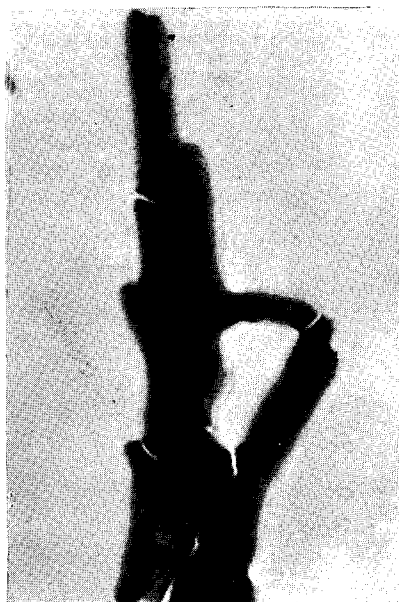
d.

S (-) G (-)



**Fig. 7.**

培地中の血清量を加減せる実験

a.  
S (1)b.  
S (1/2)c.  
S (1/10)d.  
S (1/100)

**Fig. 7.**

e.

S (-)



f.

S (-) 培地に現われた異常成長菌

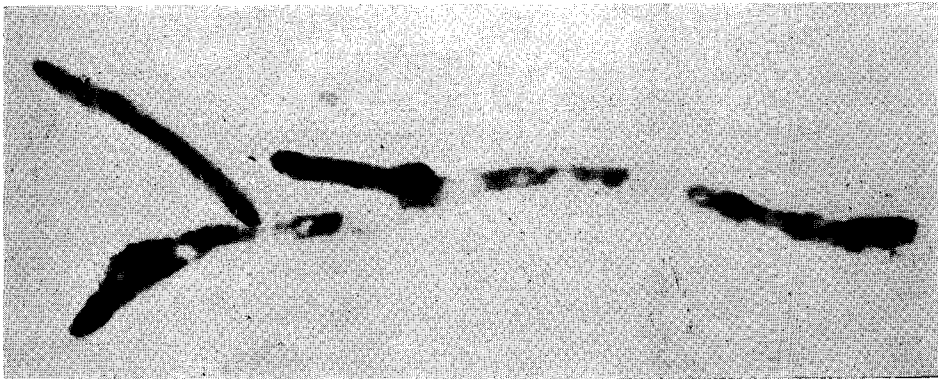


Fig. 8

培地中の血清, グリセリン及びアスパラギンを加減せる実験

a.

S (1/10) A (+) G (+)



b.

S (1/50) A (+) G (+)



c.

S (1/50) A (+) G (-)



d.

S (1/50) A (-) G (+)



Fig 8

e.

S (1/50) A(-) G(-)



f.

S (1/100) A(+) G(+)



g.

S (1/100) A(+) G(-)



h.

S (1/100) A(-) G(+)



## 写 真 説 明

- Fig 1.** Ziehl-Neelsen 染色による膜面培地上に発育せる結核菌。  
数10ヶの菌が microcolony を形成し、強い抗酸性を示している。(×1,500)
- Fig 2.** Feulgen 染色により染つた結核菌。1ヶの菌に3~4ヶの Feulgen 陽性顆粒が見られる。(×1,500)
- Fig 3.** Delafield's Haematoxylin 染色により染つた結核菌。菌体の両極に1ヶ宛顆粒が見られる。  
(×1,500)
- Fig 4.** Janus-Green B 染色により染つた結核菌。菌体の両極に1個宛顆粒が見られる。(×1,500)
- Fig 5.** Fontés 染色により染つた結核菌。菌体の両極に1個宛或は菌体中に顆粒が見られる。(×1,500)
- Fig 6.** 実験Iの電子顕微鏡写真
- S(+) $G(+)$ : A body の大きさは、直径約 3000 Å で、菌体の両極に1ヶ宛或は、菌体中央部に1個宛見られる。細胞質は菌体中に均等に分布している。(×12,000)
  - S(+) $G(-)$ : A body は a. と同様菌体中に1~3個見られ、又直径が 2000 Å 位になつた小体も見られる。(×12,000)
  - S(-) $G(+)$ : A body は消失し、細胞質の凝縮が見られる。(×12,000)
  - S(-) $G(-)$ : A body は消失し、細胞の凝縮は強まっている。(×12,000)
- Fig 7.** 実験IIの電子顕微鏡写真
- S(1): A body は直径約 2000~3000 Å のものが、1菌体中に2~3個見られる。細胞質は、菌体内に均等に分布し、又透過小体も認められる。(×12,000)
  - S(1/2): A body は a. S(1) の場合と同様、1菌体中に2~3個見られる。細胞質も均等に分布し、透過小体も1菌体中に数個乃至10数個見られる。(×12,000)
  - S(1/10): A body は、その直径が約 1000~2000 Å となり、1菌体中に数個宛見られる。細胞質は均等に分布しているが、透過小体は見られない。(×12,000)
  - S(1/100): 大半の菌には A body が見られず、若干の菌に1~2個宛認められる。細胞質は凝縮し、不均等になつている。(×12,000)
  - S(-): A body は大半の菌に見られない。細胞質は凝縮している。(×12,000)
  - S(-) 培地上に発育した異常成長菌: 菌体は、普通の菌の数倍も長くなり、細胞質は凝縮して不均等な分布像を呈し、又菌の1極に“budding”の像が見られる。(×12,000)
- Fig 8.** 実験IIIの電子顕微鏡写真
- S(1/10) A(+) $G(+)$ : 直径約 3000 Å の A body が、1菌体中2~3個見られる。細胞質は均等に分布している。(×12,000)
  - S(1/50) A(+) $G(+)$ : A body は、直径 1000~3000 Å のものが、1菌体中4~5個に増加している。(×12,000)
  - S(1/50) A(+) $G(-)$ : 菌体は短く且つ細まり、A body は、3~4個宛菌体中に分布している。(×12,000)
  - S(1/50) A(-) $G(+)$ : A body は、1菌体中3~4個見られ、細胞質は均等に分布している。(×12,000)
  - S(1/50) A(-) $G(-)$ : A body は菌体中から消失している。細胞質は均一な電子不透過性を示して菌体中に分布している。(×12,000)
  - S(1/100) A(+) $G(+)$ : A body は認められない。大半の菌の細胞質は均等に分布しているが若干の菌では凝縮像が見られる。(×12,000)
  - S(1/100) A(+) $G(-)$ : 直径約 1000 Å の A body が3~4個宛菌体中に分散している。(×12,000)
  - S(1/100) A(-) $G(+)$ : A body は認められず、少数の菌に細胞質の凝縮が見られる。