



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結核菌の電子線不透過小体(A body)の生物学的意義に関する研究
Author(s)	高橋, 義夫; TAKAHASHI, Y.; 山下, テイ子(リッシンベンに貞) 他
Citation	結核の研究, 8, 23-32
Issue Date	1958-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26640
Type	departmental bulletin paper
File Information	8_P23-32.pdf



結核菌の電子線不透過小体 (A body) の 生物学的意義に関する研究

高橋義夫・山下慎子
月居典夫・高橋昭一郎
(北海道大学結核研究所予防部)

(昭和33年1月18日受付)

緒 言

結核菌の電子顕微鏡像に見られる電子線不透過小体(以下 A body と略す)に就いては、従来多数の研究者による報告があるが、その説くところは夫々異つて居り未だ定説はない。すなわち或いは核であるとし(Knaysi, 1, 2; Yuasa, 3)あるいは Volutin (Werner, 4; Brieger, 5; Kölbel, 6; Ruska, 7), Mitochondria または Reducing body (Mudd, 8, 9, 10), Metaphosphate body (Takeya, 11) であるとする等である。更に Winkler (12), König & Winkler (13) 等のように Volutin か Metachromatic body であろうと説く者もあり、その研究方法もまた種々である。

我々も従来よりこの問題を追求して来たのであるが、今回は種々の染色を行つた菌について光学顕微鏡的観察、次いで電子顕微鏡的観察を行うという、所謂同一菌対応法により観察し、A body と染色顆粒との関係から A body の本質を追求して来たのでその結果を報告する。

実験材料及び方法

実験材料：使用菌株は鳥型結核菌竹尾株で、これを Sauton 培地に4日間、37°C で培養して得た菌膜を水晶球入りコルペンで磨砕し、後蒸溜水で3回遠沈洗滌した。得た菌液を次に述べる前処理の材料に供した。またこの菌を前処理に用いた菌の control とした。

実験方法：

I) 前処理：I)-1) 上記の方法で作つた菌液を、蒸溜水、磷酸緩衝液 (M/15, pH 7.2), グリセリン (6% 水溶液)、及び磷酸緩衝液+グリセリンに夫々懸濁し、37°C で6日間培養後蒸溜水で遠沈洗滌して染色材料に供した。

I)-2) アセトン処理——必要な場合には、I)-1) の処理後、又は control の菌をアセトンに懸濁し24時

間後水洗して染色に用いた。

I)-3) 塩酸処理——必要に応じて、I)-1) 処理後、又は control の菌を5% 塩酸に懸濁して、24~40時間後水洗して染色に用いた。

II) 染色

II)-1) Janus green B 染色——Janus green B の0.04% 水溶液に菌を懸濁し、37°C で12~24時間染色した。

II)-2) Toluidine blue 染色——0.01~0.05% 水溶液に菌を懸濁し、室温又は37°C で12~24時間染色した。

II)-3) Feulgen 染色——アセトン、アルコール等量液中に室温で20~24時間懸濁した菌を蒸溜水で数回遠沈洗滌した。次に1Nの塩酸で2分間、60°C で加水分解し、冷蒸溜水で数回遠沈洗滌後、2% 異性重亜硫酸カリ水溶液(塩酸性)で数回遠沈洗滌した。この菌を還元重亜硫酸フクシン液に懸濁して室温で24~48時間染色、染色した菌を更に異性重亜硫酸カリ水溶液(塩酸性)で数回遠沈洗滌、後水洗した。

II)-4) Lead sulfide 染色——Wachstein & Pisano (14) の方法を用いた。Lead nitrate 水溶液に菌を懸濁して室温に数時間放置し、十分に水洗して後、菌の蒸溜水懸濁液に約1%の割に Ammonium sulfide を滴下、1時間後に水洗した。

II)-5) K-tellurate 染色——Sauton 培地中に K-tellurate を終末濃度0.05% になるように加え、これに菌を培養(37°C)、数日後菌膜を水晶球入りコルペンで磨砕、蒸溜水で遠沈洗滌した。

II)-6) Sudan black B 染色——Sudan black B のアルコール飽和溶液を0.5~1%の割で菌懸濁液に加え、数時間37°C で染色、後水洗した。

II)-7) Polysaccharide 染色——Lillie (15) の方法を用いた。KMnO₄ 0.5~1% 水溶液に菌を懸濁し、30

分～1時間後に遠沈，5% 酢酸で脱色，数回遠沈洗滌後，2% 重亜硫酸カリ水溶液（塩酸性）で洗滌，還元亜硫酸フクシン液で24時間染色した（室温）。後再び異性重亜硫酸カリ水溶液で数回遠沈洗滌し，その後水洗した。

III) 観察

上記の方法で染色した菌を十分に遠沈水洗して後，適当な濃度の蒸溜水懸濁液とし，その1滴を電子顕微鏡観察用メッシュに載せてデシケーター又は37°C 孵卵器内で乾燥した。これを先づ光学顕微鏡で観察，撮影した後，同一菌を電子顕微鏡で観察，撮影した。

III)-1) 光学顕微鏡による観察——顕微鏡は zeiss, 写真器はオリムパス 35, これに同社の顕微鏡写真撮影装置をつけて使用した。又同一標本を後に電子顕微鏡観察に使用するために，油浸用にはアニゾールを用いた。

III)-2) 電子顕微鏡による観察——日本電子光学製 JEM-5L 型電子顕微鏡を使用した。加速電圧 80 KV, ビーム電流 20～25 μ A である。

実 験

I 前処理について

蒸溜水，燐酸緩衝液 (M/15, pH 7.2), グリセリン (6% 水溶液) 及び燐酸緩衝液 + グリセリンで前処理した菌を電子顕微鏡で見ると，蒸溜水に懸濁したもの（以下 D 処理と記す）は無処理のもの (Fig. 1) に比べて著しい変化を示さなかつたが，燐酸緩衝液に懸濁したもの（以下 P 処理と記す）では，菌の両端部が膨潤してその部位は電子線の透過度が低下していた。しかし A body は大きくなり，その膨潤部に散在しているのが見られた (Fig. 2)。又グリセリンで前処理した菌（以下 G 処理と記す）は菌体様に電子線透過度の低下しているのが見られたが，A body には変化は見られなかつた (Fig. 3)。燐酸緩衝液 + グリセリンで前処理した菌 (PG 処理) は，P 処理，G 処理を単独に行つた場合のような形態的变化を示さなかつた。

アセトン-アルコールで24時間前処理すると，菌の電顕像は著しくそこなわれる。すなわち A body に部分的な消失が見られ，細胞質は菌体内数個所に凝集しているかに見える (Fig. 4)。

また5% 塩酸で24～40時間前処理した菌では，A body は略々消失して居り，菌体は様に電子線透過度が低下し，菌が溶解しつつあるかに見える (Fig. 5)。

II 核染色について

Feulgen 染色——アセトン-アルコール処理並びに塩酸による加水分解のために，電顕像で A body の認められるものは少く，細胞内容物を失つて皺の寄つた菌

が屢々見られた。例外的に A body の明瞭に認められた菌では，染色顆粒は全く見られず (Fig. 6) 細胞質が凝集し，皺のよつた菌でこの凝集個所に対応するように2～数個の染色顆粒が見られた (Fig. 7)。尚，Feulgen 染色では，P 処理，G 処理の間に差異は認められなかつた。

III Mitochondria の存在を示すものと考えられる染色について

III)-1) Janus green B 染色——前処理した菌を2, 3回水洗して染色した。P 処理をした菌で電顕像に膨潤の見られる両端部は，著しく大きい顆粒状に染色された (Fig. 8)。その他何れの場合にも菌1個当り2乃至数個の染色顆粒が認められたが，之は電顕像の A body とは必ずしも一致せず，細胞質中電子線透過度が低下している部分（細胞質が凝集している様に思われる）にも対応する染色顆粒が認められた。

アセトン-アルコール処理によつて A body の部分的消失，細胞質の凝集，ghost 化の認められる菌でも，染色顆粒は処理しない場合と同様に，寧ろより明瞭に認められた。細胞質が偏つていると思われる場合は，染色顆粒はその細胞質凝集部分に対応して居り，又消失しなかつた A body は細胞質塊の内部にあつた (Fig. 9)。

5% 塩酸で24～40時間処理した菌で，電顕像では，A body は殆んど完全に消失しているが，染色顆粒は無処理のものと同様に認められた (Fig. 10)。

III)-2) K-tellurate の還元——終末濃度 0.05% に K-tellurate を加えた Sauton 培地に生育した菌は還元された金属テルルのために黒く着色していた。この菌を水洗して電顕像を見ると，a) A body は著しく大きく明瞭になつて居た。b) A body 以外の場所に金属テルルの針状結晶の集りが見られる。c) 細胞質内に様に散在する針状結晶が見られる (Fig. 11)。

IV Metaphosphate の存在を示すものと考えられる染色について

IV)-1) Toluidine blue 染色について——菌体内に2乃至数個の顆粒が染色された。この顆粒は A body の部位と略対応するようであるが，A body の全く存在しない部分にも染色顆粒は見られた (Fig. 12)。

アセトン-アルコール処理菌の染色性は無処理のものと同様，この場合も Janus green B 染色の場合と同様，A body は染色顆粒と必ずしも一致せず，凝集した細胞質塊と対応する部分にも染色顆粒は認められ，又細胞内容物を失つた皺の寄つている様な菌にも2乃至数個の染色顆粒が見られた (Fig. 13)。

また5% 塩酸処理をした菌では A body の殆んど

完全な消失にも拘らず、染色顆粒は認められた (Fig. 14)。但しこの場合、塩酸処理をしない菌に較べて染色性、metachromasy は共に幾分弱められているようである。

IV-2) Lead-sulfide 染色——Lead nitrate, Ammonium sulfide で染色した菌は、光学顕微鏡像では黒色の顆粒が菌体 1 個当り 2~数個認められた。電顕像では A body は甚だしく損われていたが、A body 及び凝集した細胞質塊の見られる菌ではこの両者が共に光学顕微鏡像の黒色顆粒と対応する様である (Fig. 15)。

V 脂肪染色について

Sudan black B 染色——光顕像では数個の黒色の顆粒が見られる。電顕像では、a) 大きく明瞭な A body が見られる。—この A body は染色顆粒と可成良く対応する (Fig. 16)。b) A body はあまり見られず、大きい顆粒が菌体の一部から宛も出芽、分岐するように突出しているのが見られ、この顆粒はきわめて電子線不透過である。この顆粒は光学顕微鏡像でも明瞭で大きい黒色顆粒として見え、この場合菌体の染色顆粒は淡くかすかである。

VI Polysaccharide 染色について

Carmine による染色では満足な結果が得られなかつたので、酸化剤で処理した後 Schiff's reagent を用いた。やや紫色がかつた赤色の顆粒が菌 1 個当りに数個宛認められた。電顕像では明らかな A body は見られなかつたが、電子線透過度の低い数個の円形の部分、或いは細胞質の凝集したものと思われる部分(アセトン—アルコール処理のものとは異なる)が染色顆粒と対応して認められた (Fig. 17)。

考 按

A body の本質をきわめようとして多くの実験がなされているが、実験方法の上から見て凡そ二つの群に分けることが出来よう。

第 1 は電顕像のみを対象としたもので、Ruska (7), Werner (4), Wessel (16) 等は菌の生育時における電顕像の変化を観察して居り、Arima 等 (17) は薬剤添加、培地成分の欠乏時に見られる電顕像の変化を観察している。又 Ruska (18), König & Winkler (13), Belozersky (19, 20) は適当な溶媒によつて A body が溶出することを見、更にその抽出液を分析している。

第 2 は種々の色素による染色像を電顕像と対比することによつて A body の本質に近附こうとするもので、染色顆粒と A body との数、大きさ、位置等について或いは統計的な処理により、あるいは同一菌体において両者を比較する方法によつて Knaysi (1, 2), Mudd (8,

9, 21, 22, 23) Brieger (15), Takeya (11) 等による多くの成果が知られている。また更に Mudd (24), König & Winkler (13) 等は phage infection, 有機溶媒による処理等の条件下で両顆粒の比較を行つている。我々もこのような方法で実験を行つて来たが、実験結果とは別にこの方法自体に存在するいくつかの問題点について述べてみよう。

1) 第 1 の点は色素の基質特異性や、染色のメカニズムについて現在までに知られている事実のあまり少な過ぎることである。この方面の知識がより豊富により確実になれば、細胞化学的方法は我々の問題を解決する為の有力な手段になるであろう。しかし、高等動植物の細胞に比して甚だしく小さい結核菌の場合、たとえば Janus green B 染色顆粒と Feulgen 顆粒とは形態的には全く区別が出来ない。従つて、Janus green B が Mitochondria に特有の如何なる物質とどのような結合をするのか、またどのようなメカニズムで還元されるのか明らかになる迄は、我々は Janus green B 染色顆粒を Mitochondria であるとは断言出来ないことになる。

2) この事は結核菌の、従つて菌体内顆粒の大きさに関係している。菌体内顆粒の直径は光学顕微鏡の分解能の殆ど限界に近い。写真撮影のために長波長側のフィルターを使用する時には、分解能は更に低下しているから、ごく近く並ぶ 2 個の染色顆粒を識別することは不可能であり、染色顆粒の大きさを問題にすることは無意味である。従つて同一菌について観察を行つても電顕像とあらゆる場合に対応が正しくつけられているとは考えられない。

3) 染色の操作は菌体を著しく損うことが多い。従つて色素と結合する以前に A body の消失したことが明らかになつている場合以外には、たとえ染色後の電顕像で A body が見られなくても、直ちにその染色と関係がないと云うことは出来ない。更に著しく損われて時には gohst 化している菌の方が明瞭に染色される例を多くの色素について我々は経験している。

以上のような点を考慮しながら、次に我々の得た結果について検討してみよう。

I 前処理について

磷酸緩衝液、グリセリン等で前処理することによつて、菌は形態的にも生理的にも可成りの変化を生ずる。このような変化が染色性とどのような関係をもつかを観察して、A body の本質を推定する手がかりの 1 つにしようとした。この意味では PG 処理は、P 処理の場合のように菌の両端が著しく膨潤することもなく、又 G

処理菌のように菌体の電子線透過度が低下するようなことも見られず、その他の形態的変化も認められなかつた。今後の実験では PG 処理はしなくてもよいと思われる。尚之等の処理によつて生理的にも種々の差異が認められるようであるが (Vitality, 呼吸, 各種の酸化酵素の活性等), これに就いては別の機会に述べる。

A body を溶解, 消失させる為に, Ruska (18), König & Winkler (13), Bassermann (25) 等の方法により, 種々の有機溶媒, 酸, アルカリ等で処理を行つてみた。アセトン-アルコール, 5% 塩酸はその 1 例である。これ等によつて A body の一部又は殆ど全部が消失するところから, A body を構成している物質的裏づけを得る方向に近づきたいと希望しているが, 現在の段階では染色と平行的に事実を述べ得るに過ぎない。

II A body について

II-1) A body と核について

Knaysi (1) は *M. avium* について, 光学並びに電子顕微鏡による観察を行い, A body を核であると結論している。すなわち, 殊に培養日数の若い菌で A body の分裂が見られること, Giemsa, Meyer's Methylene blue, Feulgen reagent, Haematoxylin 等で染色される顆粒が存在することから, この A body を Nucleus であると結論しているのであるが, A body とこれ等の染色顆粒が同一物である事については何の証明も見られない。一方 Mudd 等は (24) 同一菌に N. T. C. 還元と核染色 (Feulgen, Azure A) を同時に行つてその染色個数が異なること, 核染色は前処理として加水分解を必要とするが, 所謂 mitochondrial staining は加水分解を必要とせず, むしろ加水分解の時間が長ければ染らなくなること, Electron scattering body はむしろ Mitochondria の性質をもつことを見て, Knaysi 等の説に反対している。又我々も A body と Feulgen 染色顆粒の大きさ及び菌体当りの数を, 紫外線照射の場合, 培地成分を変化させた場合, 培養日数の各段階等について統計的に観察して, A body は Feulgen 染色顆粒とは異なるものであると考えて来た (Tsukiori, 26)。今回の実験結果についても同様に結論できると思われる。すなわち, アセトン-アルコール処理後, 1N 塩酸による加水分解によつて A body は殆ど認められなくなるが, Feulgen 染色顆粒は極めて明瞭であり, 例外的に A body の存在する菌で Feulgen 反応が陰性であつたのは, 加水分解の不足であろうと思われる。すなわち, A body が消失する程度まで加水分解することによつて, Feulgen 染色顆粒が認められるのであるから, A body は Feulgen 染色顆粒と同じものではない。

II-2) A body と Mitochondria について

Mudd 等 (18) は mitochondrial staining と云われている Janus green B 染色, N. T. C. 還元, Nadi reagent 等によつて, *M. thamnopheos*, *E. coli* などに Mitochondria 或いは Mitochondrial substance が存在することを見, この染色顆粒が Electron scattering body (A body) と一致するとしている。すなわち, その菌体内における位置, 数から, 又 *E. coli* においては, 染色顆粒も A body も phage infection に対して変化を受けず, もとの位置, 数を保つこと等からこの両者の一致を述べている (24)。

我々も以前の実験において, 培地組成の変化などによる A body の菌体 1 個当りの数の変化は種々の染色顆粒 (Fontes, Ziehl-Neelsen, Feulgen, Janus green B, Haematoxylin 等) 中, Janus green B 染色顆粒の数に現われる変化と可成りよく一致していることを統計的に観察して居り (Tsukiori, 26), また培養のごく初期において A body は小さく, 菌体内に分散して居り, 成長曲線が log-phase にかかる頃から一定の位置, 大きさ, 数を示すが, Janus green B 染色顆粒についても略同様な経過をとることを見ている。これ等の事実から, 我々も A body を Mitochondrial substance, Chondrioid と考えて来た。しかし今回の実験結果は必ずしも之と一致しなかつた。すなわち

a) P 処理菌は菌体の両端が膨潤し, Janus green B 染色ではこの膨潤部が著しく大きい顆粒状に染つたが, A body は大きくはならず, この膨潤部分に散在しているのが見られる。但しこの場合, 膨潤部分に散在する A body の各々が染色されていたとしても, 我々の光学顕微鏡の分解能では全体が 1 個の染色顆粒として見えるだろうと思われる。

b) アセトン-アルコール処理によつて A body は部分的に, 或いは殆ど完全に消失したが, Janus green B 染色顆粒は無処理のものと同様, 若くはより明瞭に認められた。

c) 5% 塩酸処理によつて, A body は殆ど完全に消失したが, Janus green B 染色像には変化は認められなかつた。

d) K-tellurate を含む培地中で培養した菌の電顕像では, A body の部分に還元された金属テルルの針状結晶及び, 無構造の黒色体が見られたが, A body 以外の部分にも針状結晶の集りは見られたし, 更に結晶が細胞内に散在する場合も屢々観察した。還元されたテルルが A body の部分にも附着して存在することは, 対照に較べて A body が非常に大きくなつて居り, 且この

菌にプロム水等の酸化剤を作用させると、A body 以外の部分の針状結晶が消失すると同時に A body も小さく不明瞭になることから明らかであろうと思われる。尚同様な事実を *C. diphtheriae* について Morton (27) も観察している。又我々の行つた実験で、乳酸脱水素酵素の活性の高い菌では、細胞質内に散在する針状結晶が多く、リンゴ酸脱水素酵素の活性の高い菌では A body の膨大なものが多く見られた。従つて K-tellurate の還元部位は Mitochondria の存在よりもむしろ脱水素酵素の localization を示していると考えた方が妥当であるように思われる。

以上の事実から、A body を Mitochondrial substance とすることには種々問題が存在するように思われる。Janus green B 染色(今回の実験では固定或いは前処理をした菌を多く用いたが、之は還元酵素による褪色を防ぐためであつて、生体染色で見られる顆粒と固定後染色した菌に見られる顆粒とは異なるものではない)は高等動物細胞では mitochondrial staining として特徴づけられているが、結核菌の Janus green B 顆粒が果して細胞学的に高等動物の Mitochondria と同種のものであるかどうか今のところ断定は出来ない。それにすべての酸化還元酵素が Mitochondria にのみ存在することは、動物細胞の場合でも見られないことであり、現に Yamamura 等 (28) は *M. avium* において乳酸、クエン酸等の酸化酵素がむしろ soluble fraction に存在することを見ているし、上記の K-tellurate についての我々の実験もそれを裏書きするものであろう。しかしながら、Mudd その他の人々の行つた多くの細胞化学的な実験から見て、また最近 Schinohara 等 (29) によつて示された Ultra thin section の結果から見ても、結核菌が高等動物の Mitochondria に似た構造物をもつことについては問題はないものとして、次にこの Mitochondrial substance と A body との異同である。前記の我々の実験結果から見ても、A body の存在しない個処にも Janus green B 染色顆粒、還元テルルの局在は非常に屢見された。Weibull (30) は *B. megaterium* の終末酸化酵素の多くが細胞質膜に存在すると述べているが、若し結核菌の場合にも同様の事実があるとするれば、細胞質に埋つているように見える A body は Mitochondrial substance とは当然全く異つたものと云うことになる。いずれにせよ現在迄我々が行つて来た実験は、A body をもつて直ちに Mitochondria 乃至は Mitochondrial substance とする考え方に確実な根拠を与えてくれなかつた。

II)-3) A body と Metaphosphate body について

カビ、酵母、細菌等がその細胞内に Voltin と称される Metachromatic body を有することは良く知られて居り、Wiame (31)、Schmidt、Thaunhauser 等はその本質が RNA と結合した Metaphosphate であることを明らかにした。又 Ebel (32) は酵母におけるそれが polyphosphate であると述べている。A body をこの Volutin であるとする説は多くの人々が唱えている。König & Winkler (13) は *C. diphtheriae* を適当な条件で有機酸で処理すると、本菌の電子線不透過小体(電顕的には結核菌の A body に匹敵する)は溶解消失し、一方菌は metachromasy を失うこと、更に同一菌についてこの不透過小体と Metachromatic body が対応すると述べて居り、又 Werner (4) は H37Rv 及び BCG を用いて、培養日数や培養条件による変化の状態から、A body は Volutin であろうとしている。更に Ruska (18) は A body が酸で抽出され、その抽出液が metaphosphate を含むことを明らかにして A body は Voltin であるとし、Takeya は結核菌を用いて、同一菌において A body が Methylene blue に染まる Metachromatic body と対応すると述べ、これを Metaphosphate body であるとしている。しかし我々の実験結果から見れば、必ずしも同一であるとは云い難い。すなわち Janus green B 染色の場合と同様に、Toluidine blue 染色顆粒は A body に対応する位置に大抵見られるが、A body の認められない個所にも明らかに染色顆粒として見られることが多いのである。又塩酸処理を行つて、A body が殆ど消失したような菌でも Toluidine blue 染色性、その metachromasy が無処理の菌に比して稍弱くなつてはいるが、染色顆粒は明らかに認められるのである。アセトン-アルコール処理菌では無処理の菌と全く変らない染色性をもっている。Wachstein & Pisano (14) によれば、Lead-nitrate を染色に用いた場合、 Pb^{++} イオンは glycerophosphate を基質とした場合は、それから遊離した free の orthophosphate と、又基質を与えない場合にも細胞内に存在する orthophosphate と結合して Lead-phosphate を作るという。更に Wiame (31) は細胞内で或る種の phosphatase によつて polyphosphate と orthophosphate との転換が起ること、この polyphosphate は energy rich phosphate bond であろうと述べて居り、Ebel (32) も之を認めて、Lead-nitrate で染色される顆粒は polyphosphate であろうとしている。Mudd、Takeya 等 (10) もこの方法を Metaphosphate body の検出に利用して居り、且この染色顆粒の菌体内における量的分布(顆粒の数及び大きさの点から)

がA body のそれと一致することを統計的な data を示して述べている。しかし我々が同一菌について対応して得た結果は、やはり Toluidine blue の場合と同様で、A body と対応しない位置にも、又菌体内に全く A body のない菌にも Lead sulfide の黒色顆粒が認められた。勿論 Lead nitrate が A body に吸着乃至は結合してから後に、或いはその結合のために A body の或るものが変化して消失することも有り得るかも知れないが、上記 Toluidine blue 染色の成績を合せ考えれば、直ちに A body をもつて Metaphosphate body と断定するわけには行かないであろう。

II)-4) A body と貯蔵物質について

A body が一種の貯蔵物質であろうという説は Wessel (16), Lembke (22) 等によつて唱えられている。すなわち前者は之を貯蔵物質に満ちた vacuole でその本質は殆ど lipidic なものであると云い、後者は 2537Å に s. a. をもち、アセトン、エーテル等に部分的に溶ける物質、恐らくアセトン溶性の wax を含む phosphatides と核酸の結合物であろうとしている。

この点についての我々の実験は始められたばかりで、未だ実験的な結論を出す迄にも到っていない。が、Sudan black B による染色顆粒は比較的良好に A body と対応し、殊にこの場合に見られる A body はあたかも脂肪球を見るような様相を呈している。一方 polysaccharide 染色は酸化剤、異性重亜硫酸カリ、Schiff's reagent 等の為に可成り菌を損い、A body の認められない場合が多い。しかし電顕像には染色顆粒と略対応して電子線透過度の低い円形の部分が見られこの部分はアセトン等で細胞質が凝集したような場合とは異つて、そこに A body の存在していたことを想像せしめる。今後、脂質の抽出、糖の加水分解等の操作とこれ等の染色を重ねて行うことによつて、或いは興味ある結果が得られるのではないかと思う。

以上の諸事実を考え合わせる時、A body を従来の細胞学的概念で、核、Mitochondria、Metaphosphate body 等の何れかと直ちに結びつけようとすることは、我々の実験成績から見ると甚だ無理であると思われる。

最後に A body はアセトン、稀塩酸で部分的に、あるいは大部分消失する事、同一菌について対応した結果、Feulgen 染色顆粒とは全く一致せず、Janus green B 染色顆粒、K-tellurate 還元部位、Toluidine blue 染色顆粒、Lead sulfide 染色顆粒とも部分的にしか一致しない事、Sudan black B 染色顆粒及び Polysaccharide 染色顆粒とは比較的良好に一致するように思われる事などを総合して、我々は現在のところ、問題の結核菌の電子

線不透過顆粒は、従来の細胞学的意味において重要な細胞要素ではなく、単にリポイド及び多糖体を主成分とする貯蔵物質ではないかと考えている。このものは菌の分裂増殖の盛な時には酸化還元の旺盛な Mitochondria 様物質、含 phosphate 物質等の附近に蓄積され、菌の環境が悪化して分裂増殖が出来なくなるにつれて——或は老化につれて——消費されるのではないだろうか。log phase の初期の分裂増殖の盛な菌においては、A body も、Janus green B 染色顆粒も、Toluidine blue 染色顆粒も又 Methylene blue 顆粒も殆ど sub-polar に見られるが、(我々は本小体の mitotic division の像に接した事はない) stationary phase に入るか、又は SM, INAH の作用をうけて分裂増殖が出来なくなると、A body は後者の顆粒に先んじて菌体内から姿を消す事実は (17)、我々の考えの正しさを裏書きするものではなからうか。とまれ、なお確証を得る為には可成りの研究が残されている。

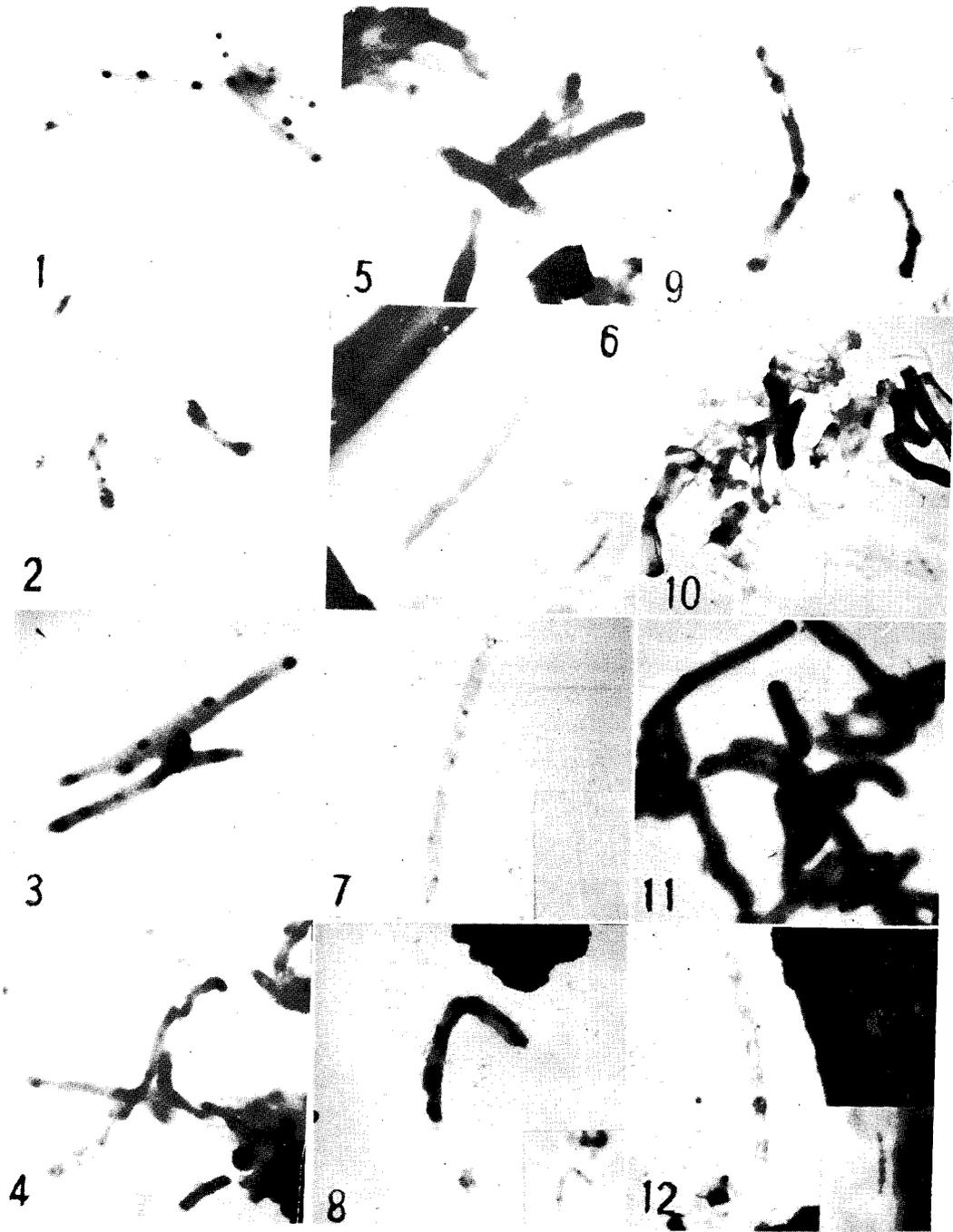
結 語

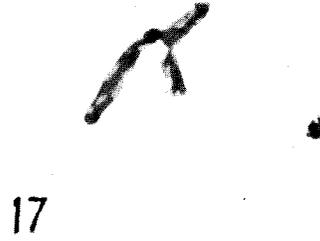
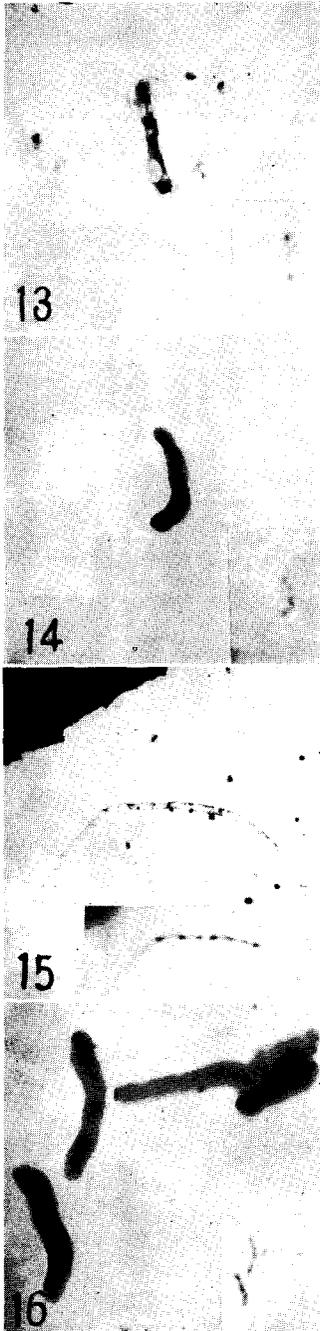
我々は結核菌の電子線不透過小体の生物学的意義を闡明する目的で、鳥型菌を用い、同一菌体について各種細胞化学的染色像と電顕像を比較研究したが、本小体を核、Mitochondria Phosphate body 乃至は Volutin とする従来の学説のいづれをも支持する結果が得られなかつた。現在のところ我々は、本小体のアセトン、塩酸に対する態度及び Sudan black B 顆粒及び Polysaccharide 顆粒と本小体との比較的同位性にかんがみ、本小体は細胞学的に重要な要素でなくて、リポイド及び多糖体を主成分とする reserve material と考えたい。

文 献

1. Knaysi, G., Hillier, J. and Fabricant, C. 1950. J. Bact., **60** 423-447.
2. Knaysi, G. 1952. J. Bact., **64** 859-864.
3. Yuasa, A. 1955. Cytologia, **20** 96-99.
4. Werner, G.H. 1951. Advances in Tbc. Research, 53-90.
5. Glauert, A.M. and Brieger, E. M. 1955. J. Gen. Microbiol., **13** 310-317.
6. Kölbel, H. 1955. Z. Naturforsch., **106** 433-436.
7. Lembke, A. and Ruska, H. 1940. Klin. Wochenschr., **19** 217-220.
8. Mudd, S. 1951. b. J. Bact., **62** 459-475.
9. Mudd, S. 1953. J. Histochem. Cytochem., **1** 248-253.
10. Mudd, S., Takeya, K., and Henderson, H. S. 1956. J. Bact., **72** 767-783.
11. Takeya, K., Koike, M., Uchida T., Inoue, S., and Nomiyama, K. 1954. J. Electronmicroscopy

- (Japan), **2** 29-33.
12. Winkler, A. 1953. In Symposium: Bacterial Cytology, 6th Intern. Cong. Microbiol., Rome, Italy.
 13. König, H., and Winkler, A. 1948. Naturwiss., **35** 136-144.
 14. Wachstein, M., and Pisano, M. 1950. J. Bact., **59** 357-360.
 15. Langeron, M. 1949. *Precis demicroscopie*, Masson, Paris, p. 1380.
 16. Wessel, E. 1942. Z. Tuberk., **88** 22-26.
 17. Arima, J. 1957. inpress.
 18. Ruska, H., Bringmann, G., Neckel, I., and Schuster, G. 1952. z. wiss. Mikroskop., **60** 425-447.
 19. Belozersky, A.N. 1941. Mikrobiologiya, **10** 185.
 20. Belozersky, A.N. 1945. Mikrobiologiya, **14** 29.
 21. Mudd, S. 1950. J. Bact., **60** 635.
 22. Lembke, A. 1947. Zbl. f. Bakt. I Orig. 152-239.
 23. Mudd, S. 1954. Ann. Rev. Microbiol., **8** 1-22.
 24. Mudd, S., Brodie, A.F., Winterscheid, L.C., Hartman, P.E., Beutner, E.H., and McLean, R.A. 1951. a. J. Bact., **62** 729-739.
 25. Bassermann, F.J. 1953. Probleme der Morphologie, Cytochemie and Wuchsform des Tuberculose-erregers. G.Thime Verlag, Stuttgart.
 26. Tsukiori, N. 1956. Tuberculosis Research, **6** 17.
 27. Morton, E.H. and Anderson, T.F. 1941. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **46** 272-276.
 28. Yamamura, Y. et al 1955. Med. J. Osaka Univ., **6** 489-499.
 29. Schinohara, C. 1957. J. Electronmicroscopy, **6** 78.
 30. Weibull, C. 1953. J. Bact., **66** 137-139.
 31. Wiame, 1946. C.R. Soc. Biol., **140** s 897-899.
 32. Ebel, J.P. 1952. Bull. ste. chem. Biol., **34** 498.





- Fig. 1. 対照 (Sauton 4日培養)
- Fig. 2. 磷酸緩衝液 (M/15, pH 7.2) 処理
- Fig. 3. グリセリン (6% 水溶液) 処理
- Fig. 4. アセトン-アルコール処理
- Fig. 5. 5% 塩酸処理
- Fig. 6. Feulgen 染色
- Fig. 7. Feulgen 染色
- Fig. 8. Janus green B 染色 (磷酸処理後)
- Fig. 9. Janus green B 染色 (アセトン-アルコール処理後)
- Fig. 10. Janus green B 染色 (塩酸処理後)
- Fig. 11. K-tellurate 還元
- Fig. 12. Toluidine blue 染色
- Fig. 13. Toluidine blue 染色 (アセトン-アルコール処理後)
- Fig. 14. Toluidine blue 染色 (塩酸処理後)
- Fig. 15. Lead-sulfide 染色
- Fig. 16. Sudan black B 染色
- Fig. 17. Polysaccharide 染色