

光学顕微鏡所見と電子顕微鏡所見との対比からする

ミコバクテリウムの抗酸性の所在に関する研究

京都大学結核研究所細菌血清学部（主任 植田 三郎教授）

大 岩 弘 治

緒 言

ミコバクテリウムの抗酸性は菌体に多量に含まれる脂質が関与する^{1~4)}ことは多くの研究者によつて報告されているが、また他方菌体構造との関係も無視出来ない³⁾⁴⁾。電子顕微鏡の発達は、ミコバクテリウムをも含めた一般微生物の菌体の微細構造を次第に明らかにしつつある^{5~8)}。ミコバクテリウムの抗酸性の所在の研究は当然光学顕微鏡の領域に属するものであつて、電子顕微鏡の対象とはなり難いが、著者は光学顕微鏡所見と電顕所見とを対比しつつこの抗酸性の問題特に抗酸性は果して菌体のいずれの部分が主として保持する特性であるかを検討することを企図し且つ考察した。

因みに下記の観察を試みるに当つては、著者は植田⁹⁾のミコバクテリウムの発育様式に関する研究に準拠した。氏の研究によればミコバクテリウムは一般バクテリアのように横分裂の繰返えしによる増殖の様式を決してとることなく、菌体からの発芽——発芽は発育、伸長してやゝ長大な菌糸形を作り——菌糸形の後半分はやがて分断（分節）して桿状形を生じる——菌糸形の前半分及び桿状形の端部からやがて生じる発芽は、ともに発育、伸長して1ヶの菌糸形となり上記の発育様式を繰返えす。即ち氏の観察からすれば、ミコバクテリウムの発育様式は当然バクテリアよりは菌類のそれに近似する。自然このような見地からすれば、或る一定の培養日数のマイクロ・コロニーを取り上げた場合にも、それを一般バクテリアの場合の如くは

ゞ均一な集団とは見ないで、それぞれ発育、成熟の程度、段階を異にし、しかも系統立つた配列をする菌体の集団であるとする。尚氏の研究に於ては、抗酸性、非抗酸性の問題もまた発育様式に添つて考察せられた。即ち上記のような系統立つた配列中に非抗酸性の菌体が出現するとすれば、それは常に配列の先端の菌体即ち幼弱な菌体に於てであり、しかもそのような事が起るのは一般に当該菌の発育の速さに関係する。発育が特に促進せられた際には自然そのような菌の配列中には非抗酸性の菌体を見易い。即ち氏は発育様式に添つて、しかも時間と云う因子を加味してこの問題を巧妙に考察した。

実験1 micro-colony に於ける各 cell の抗酸性は一様でない

さきに植田⁹⁾は上記の如く同一 clone に属する micro-colony 中に混在する抗酸性、非抗酸性の菌体を当該菌の発育様式に添い、しかもその時の発育の速さ即ち時間的因子を加味して考察した。著者はこのような考え方を更に発展せしめ、且つ実際にそれぞれの菌体の抗酸性は配列即ち発育順序に従つて連続的に推移するものであることを立証したいと考え、次の如き実験を試みた。

使用菌株：抗酸性、非抗酸性の区別が比較的明確で且つ抗酸性の出現の程度が中等度と思われる鳥型獣調株を選んだ。

培養方法並びに標本作成法：鳥型結核菌は液体培地表面では孤立した micro-colony を作り難いので、やゝ複雑な手技であるが、Knaysi(10)の電顕標本作成

法になった。融解した4%グリセリン寒天に collodion 膜を作り、寒天の凝固をまって、菌液一滴を置き、これを培養する。4, 5日後 collodion 膜と共に寒天を切り取り、蒸溜水に collodion 膜のみを浮かべ、これを cover glass ですくい上げて、乾燥、固定する。

染色並びに脱色手技：Ziehl 氏石炭酸フクシンで加温染色後、先ず70%アルコールのみで脱色、水洗後検鏡し、適当な colony を選んで写真撮影を行う。次で順次、0.3, 1, 3, 10, 30% HCl を含んだ70%アルコールで脱色し、その都度、同一 colony の写真を撮影し、最後にこれらの写真を比較対照して検討した。尚ツエーデル油、キシロールの影響を避ける為に、標本は cover glass の裏面から鏡検した。

実験結果：Fig. 1 並びに 2 に示した。塩酸濃度が0.3, 1%では殆んど脱色されず、殆んど全ての菌が抗酸性を保っているが、3%塩酸アルコールで非抗酸性となり始め、更に10, 30%塩酸アルコールと塩酸濃度が高まるにつれて、大多数の菌体が脱色せられ非抗酸性化して行くことが観察された。この事は配列中の mycobacteria 各菌体の抗酸性、非抗酸性の区別が stable なものではなく、連続的なものである事を示している。又1個の micro-colony 中の各 cell も均一ではなく、抗酸性の程度に相当な開きのある事が確かめられた。因みに培養日数が長くなれば脱色され難い cell の数が増加する傾向があった。

実験 2. micro-colony 中の各 cell 間の electron density も亦一様でない、

上記同様の micro-colony を電子顕微鏡で観察し、このような colony 中に配列する各 cell の間に果して electron density 其他構造上何等かの差異が見出せるか否かを検討した。

使用菌株：スメグマ菌並びに鳥型結核菌。

培養方法：グリセリン寒天膜面培養、並びに Sauton 培地液面培養。

固定はオスミウム酸の蒸気固定を行い、日立 50Kv 電子顕微鏡で観察した。

実験成績：スメグマ菌の発育初期の colony の配列の先端部分の電顕像を Fig. 3 a, b, c, に示す。各 cell は樹枝状に配列し、内部構造は未分化で明瞭ではないが各 cell には2乃至4個の

ほぼ同じ大きさの electron dense な顆粒が見られる。菌体の electron density は各 cell の間で必ずしも同じではない。樹枝状配列を示す colony の先端部は density が低く 根部は高い傾向にある。

内部構造の明瞭さに於ては、鳥型結核菌が遙かに優れている。

Fig. 4 a は培養16時間の若い micro-colony であり、菌体は2つに分かれたばかりであると推定される。下方の cell の内部は未分化であり、構造は明らかではないが、上部の cell にはやゝ構造が見られる。electron dense な Knaysi⁵⁾ の A 顆粒と思われるもの、electron transparent な C 顆粒 (Sap vacuole) 並びにその間隙をうめるやゝ density の高い顆粒間質が見られる。

Fig. 4 b は培養5日の micro-colony である。菌は樹枝状に配列、発育しており、内部の分化も明瞭に見られる。各 cell は充分成熟した cell wall に包まれ、殆んど両端に近く存在する A 顆粒、ほぼ一列に並んだ Sap vacuole, その間をうめる顆粒間質が観察せられる。この microcolony に於ても各 cell の electron density が高い傾向にある。しかもこの場合 Sap vacuole が縮少し、反対に顆粒間質が増加することによつて density が高まると思われる。

Fig. 4 c は培養7日の micro-colony の中央部の電顕像である。colony はよく発育しており、各 cell は集合している。各 cell の electron density も高くなり、A 顆粒が電子線で燃える程長時間露出せねば内部構造は判らない。Sap vacuole は縮少し、反対に顆粒間質は増大している。density の高まりはこの顆粒間質の為であることが判る。

Fig. 4 d は非常に古い培養(2ヶ月)の菌膜である。Sauton 液体培地に菌膜が出来、それが一旦沈み、新たに薄い菌膜が僅かに出来る。かゝる陳旧培養の菌膜の電顕像であるが、明らかに ghost cell となつたものも見られる。electron dense な cell も今迄述べて来た cell との関連性が見出せない程変化している。Sap vacuole はも早見られず、こゝにみる大きな electron dense な顆粒も A 顆粒ではない事は確実である(電子

線を強くしてもA顆粒の如く燃えない)。

スメグマ菌、鳥型結核菌を micro-colony の状態で電顕によつて観察して得た結果は次の如く要約出来る。同一 micro-colony 中の各 cell の内部構造並に electron density には差異があり、樹枝状に cell の配列している場合には先端に位置する cell 程 less dense である。培養日数が増せば density も増大し、それは主として顆粒間質の増大と関連がある。又余りにも陳旧な菌膜では ghost cell が見られる。

実験3 同一 micro-colony の染色像と電顕像との比較

実験1と実験2とを結びつける目的で、同一 micro-colony の Ziehl-Neelsen 染色像とその電顕像との比較検討を行つた。

使用菌株：鳥型結核菌調株を使用した。培養初期(5日)の比較的非抗酸性菌体の検出しやすい2ヶ月培養の colony を対象に選んだ。

標本作成法：同一標本の染色像と電顕像とを比較する方法は既に Takeya 等⁶⁾ Glauert & Brieger¹²⁾ によって発表されているが、著者は別の方法を試みた。

即ち汚れを除いた cover glass 上に collodion 膜をはり、そこに蒸溜水一滴を置く。一方 Sauton 培養の micro-colony を蒸溜水に浮かし、それを更に collodion 膜上の蒸溜水に移し、乾燥させる。乾燥後オスミウム酸蒸気で固定し染色に移るのであるが、この時、膜がはがれぬ様に scotch tape で周囲を覆っておく。染色は型通り Ziehl-Neelsen 染色を行う。乾燥後 scotch tape を取り去り、不要の collodion 膜の部分を削り取り、5mm²内外を残す。cover glass の裏面から検鏡、写真撮影を行う。その後、cover glass を蒸溜水に静かに入れ collodion 膜を浮かせ、これを mesh ですくい上げる。直ちに光学顕微鏡の弱拡大で検鏡し心要箇所が、mesh の hole に無ければ、再び水に浮かばせて、目的を達する迄繰返す。mesh を乾燥後所定の場所を電顕で探し出し撮影する。本操作は同一標本の光顕像と電顕像とを対比する方法としては、比較的失敗の少ない方法として推奨出来る。

実験成績：5日培養の鳥型結核菌の micro-colony の抗酸性染色の像が Fig. 5 (LM) である。蛇行形となつた micro-colony の先端部の非抗酸性の cell は電顕的にも low density であ

る。内部構造は染色操作の為に無処置の cell 程判然とはしないが、Fig. 4d の如き ghost cell ではなく、Fig. 4a の cell に似ている。

mycobacteria の陳旧培養に於ては、屢々1個の cell 全体が抗酸性を示さず、cell 内に数個の抗酸性顆粒が生ずる。このように抗酸性顆粒を菌体内に持つ cell からなる micro-colony を電顕的に検討した。Fig. 6 (LM) は2ヶ月培養の old micro-colony の抗酸性染色像である。cell は ring 状に配列しているが、菌体内には数個の抗酸性顆粒が見られる。Fig. 6 (EM) は同一標本の同一拡大の電顕像である。抗酸性顆粒の箇所に殆んど一致して electron dense な部分が見られる。これは Fig. 4d の electron dense な顆粒と似ている。

以上の所見を要約すれば、非抗酸性を示す cell は抗酸性を示す cell よりも electron less dense であり、菌体内に抗酸性顆粒を有する場合は、その場所に一致して electron dense な顆粒が見られる。

総括並びに考按

実験1, 2, 3 を通じて colony の先端に近い cell 程幼弱で抗酸性の程度も弱く electron density も低いと云うことは、先ず疑問の余地は無いものと思われる。Glauert¹²⁾, Knaysi¹³⁾ 等も培養日数或は菌の life-cycle を考慮しながら mycobacteria の電顕像を検討し、古くなるにつれて cell の density が増大し、Sap vacuole が縮少して行くことを報告している。本実験に於ては、培養日数の増加によつて同様の事が起るばかりでなく、同一培養日数の single micro-colony 中でも colony の先端と基部との間に於て同様の傾向のある事が確かめられた。

Shinohara 等¹³⁾ は抗酸性と electron density とが或る程度相関的であり、非抗酸性菌体は low density であり、抗酸性菌体も脱脂すれば、抗酸性を失うと共に electron density も減少することを述べている。然し非抗酸性菌体がその内部が無構造に近い故を以て ghost cell と判断した点には同意出来ない。成程確かに陳旧培養の非抗酸性菌体は殆んど cell wall のみからなり明らかな ghost cell である。然し若い培養のし

かも colony の先端に位置する 非抗酸性菌体は、その内部が無構造に近くはあるが、それは cell が若か過ぎ構造の分化が進んでいない為であり cytoplasm が脱出したとは考えられない。殊に実験 1 で明らかになった如く抗酸性菌体と云い非抗酸性菌体と云つても、HCl-alcohol の濃度によつて、どちらにでも表現されるとすれば尚更である。

染色操作によつて electron density の増すことは Glauert¹¹⁾, Shinohara¹⁴⁾ 等が記載している。この操作による electron density の増加と共に内部構造の変化が認められた。

最後に顆粒間質が抗酸性と非常に密接な関係にあることについて考察したい。

オスミウム酸は原子量が大い為固定と同時に或る種の electron staining をも兼ねており、結合部は電子線を散乱し強いコントラストを作る。又オスミウム酸は in vitro で $-C=C-$ と反応し易く、したがつて不飽和脂酸を含有する lipid とは強く反応すると云われている¹⁵⁾。一方 mycobacteria は他の bacteria に比し脂質が多く、抗酸性も菌体内の脂質殊に mycolic acid と密接な関係にあるとされている^{3,4)}。以上の事柄は、抗酸性と顆粒間質との関係を説明する上に非常に都合がよい。若し顆粒間質に不飽和脂酸が多いとするならば、それは当然 O_2 と結合し、電子線に対し強いコントラストを作り出す筈であり、又同時に抗酸性を示す部分でもある筈であるから。

又 Robinow & Cosslett¹⁶⁾ は nuclear chromatin の場所は electron を通過させて、lesser density の部分として表現されると述べている。更に Spitznagel¹⁷⁾ によれば nuclear stains と電顕像との比較により、Sap vacuole は核であると推定している。そうだとすれば顆粒間質は cytoplasm と云うべきであり、抗酸性も核に関係すると考えるよりも、cytoplasm に保持されていると考える方がより自然な考え方である。

然し植田¹⁸⁾は以前に抗酸性が、菌体に加えられた物理的影響により比較的容易に消失すること、抗酸性の菌体からの発芽が単に非抗酸性であること、及び nocardia の菌糸の如き長大なも

のではその後半分が弱抗酸性であるのに前半分は非抗酸性である事等より次の如き suggestion を行つた。即ち抗酸性は菌体内部の機構に関係するよりは、むしろ cell wall 或は cytoplasmic membrane と関係ある特性ではないかと述べた。cell wall との関係は今回は吟味しなかつたが、充分研究すべき問題であり、今後検討をつづけたい。

以上を総括し mycobacteria の 1 つの cell の時間的経過に伴う内部構造の変化と抗酸性との関係を模式図として示したのが Fig. 7 である。核分裂直後の若い時期の cell は核質と cytoplasm が分化しておらず、lipid も少く、それ故非抗酸で electron transparent である。その内 Sap vacuole として核質が集合し、cytoplasm と区別され cytoplasm 中には lipid が多くなりやゝ acid-fast となる。時間の経過と共に cytoplasm は増々充実し acid-fast も強くなり electron を通し難くなつて行く。しかし古くなれば dense になつた cytoplasm が acid fast granules として一部に留るのみで Sap vacuole も次第に消失し、ついには cell wall のみの ghost cell となり非抗酸性となる。

結 論

鳥型結核菌、スメグマ菌の micro-colony を対象とし、それ等の抗酸性に関して検討し、次の如き結論を得た。

1. micro-colony 中の各 cell の抗酸性は、脱色剤に対して stable なものではなく、gradual なものであつて、HCl 濃度を増せば抗酸性を示す菌は減少する。
2. micro-colony 中の各 cell の electron density も gradual であつて colony の先端部に位置する cell 程 density が低い。
3. 同一標本の抗酸性染色像と電顕像とを比較した場合、非抗酸性菌体は electron density が低く、抗酸性菌体並びに抗酸性顆粒はそれが高い。
4. mycobacteria の抗酸性は、cytoplasm によつて表現されるものと推察される。

文 献

- 1) Long, E. R., and Finner, L. L.: Am. Rev. Tuberc., 16, 523, 1927.
- 2) Anderson, R. J.: J. Biol. Chem., 83, 505, 1929.
- 3) Wells, H. G. and Long, E. R.: The chemistry of tuberculosis. Baltimore, p. 61, 1932.
- 4) Dubos, R. J.: The bacterial cell. Harvard University, p. 85. 1949.
- 5) Knaysi, G. Hiller, J. and Fabricant, C.: J. Bact., 60, 423, 1950.
- 6) Takeya, K. et al.: J. elect. microsc., 2, 29, 1954.
- 7) Mudd, S., Takeya, K. and Henderson, H. J.: J. Bact., 72, 767, 1956.
- 8) Shinohara C. et al.: J. Bact. 74, 413, 1957.
- 9) Uyeda, S.: Rev. de la Tuberc., 19, 834, 1955; 21, 95, 1957.
- 10) Hiller, J., Knaysi, G. and Balser, R.: J. Bact., 569, 1948.
- 11) Glauert, A. M. and Brieger, E. M.: J. Gen. Microbiol., 13, 310, 1956.
- 12) Brieger, E. M., Cosslett, V. E. and Glauert, A. M.: J. Gen. Microbiol., 10, 294, 1954.
- 13) Shinohara, C. et al.: Japan. J. Tuberc., 4, 79, 1956.
- 14) Ebina, T. E. et al.: Nature, 180, 42, 1957.
- 15) Porter, K. R. and Kallmann, F.: Exp. Cell Res., 4, 127, 1953.
- 16) Robinow, C. F. and. Cosslett, V. E.: J. Appl. Phys., 19, 124, 1948.
- 17) Spitznagel, J. K. and Sharp, D. G.: J. Bact., 78, 453, 1959.
- 18) Uyeda. S.: Japan. J. Tuberc., 3, 119, 1955.

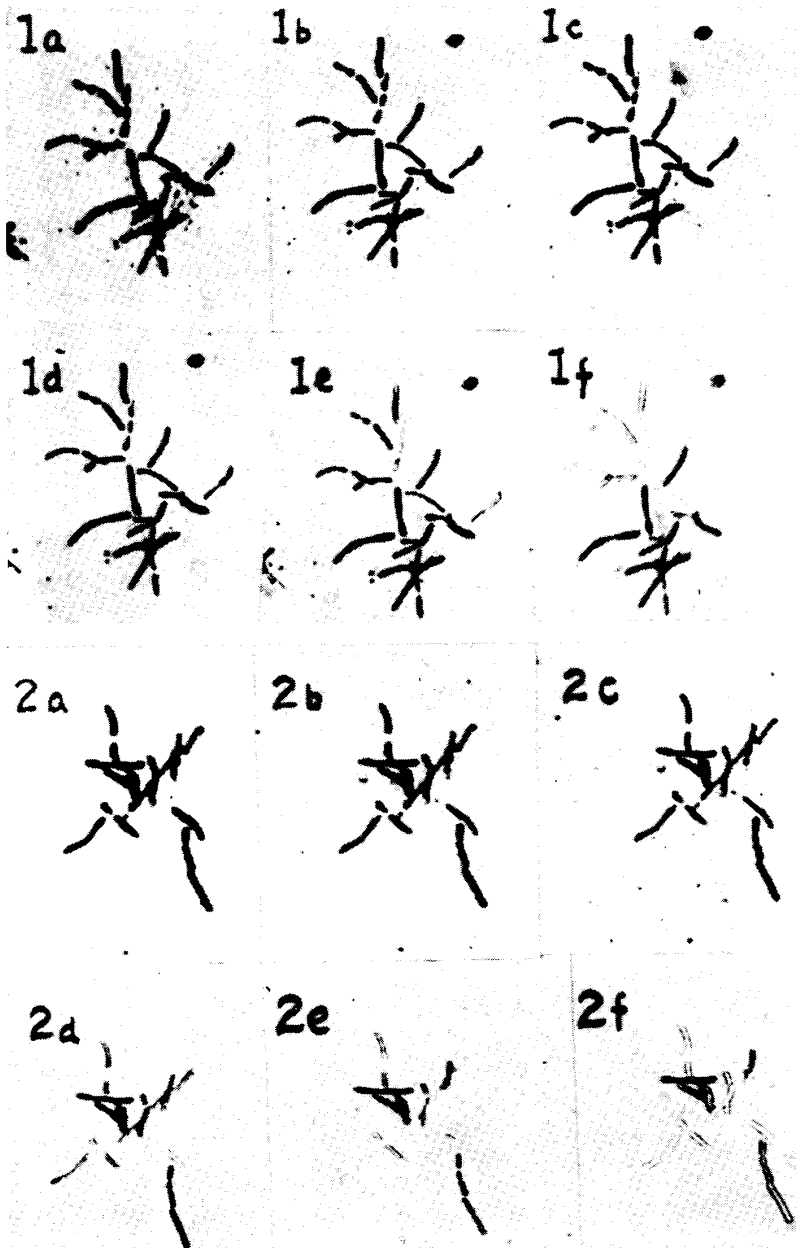


Fig. 1. 2. 石炭酸フクシン加温染色後
70%アルコール (a), 0.3% (b), 1% (c), 3% (d), 10% (e),
30% (f) HCl アルコールで脱色した鳥型結核菌の microcolony.

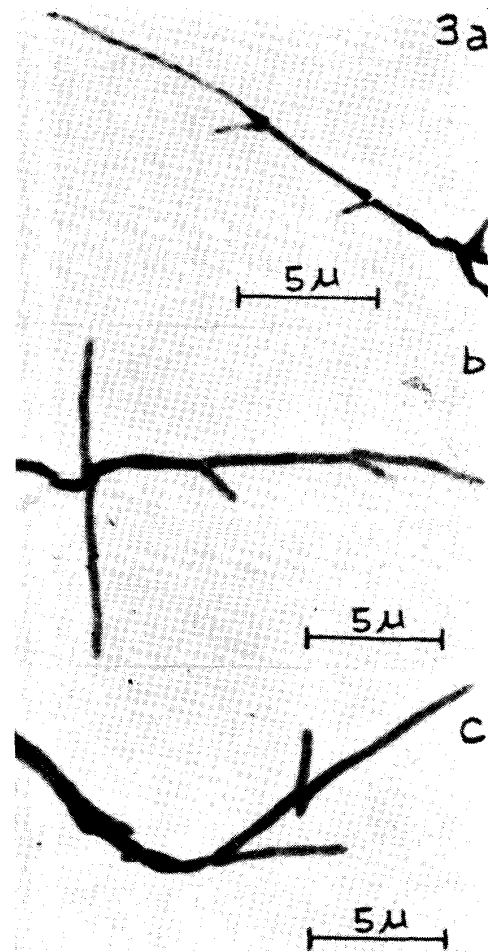


Fig. 3. a, b, c. 培養5日のスメグマ菌の電顕写真。樹枝状発育を示す。

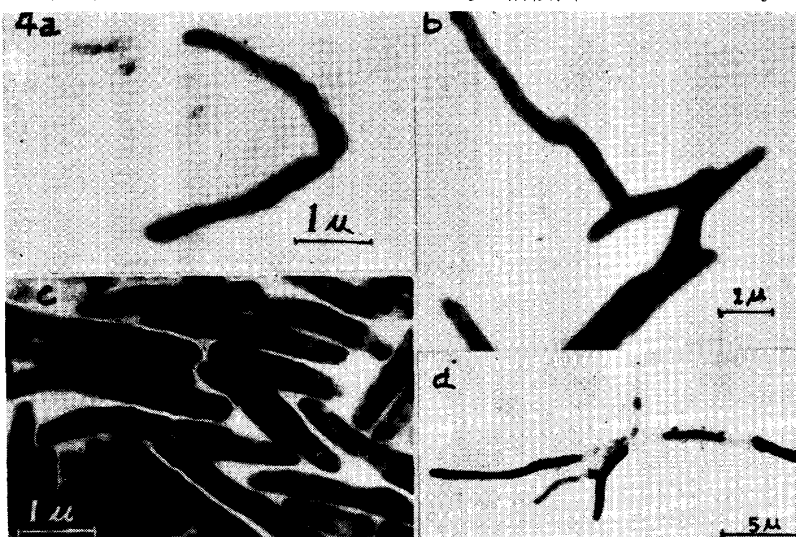


Fig. 4. 鳥型結核菌の microcolony の電顕写真

- a. 培養16時間
- b. 培養5日
- c. 培養7日
- d. 培養2カ月

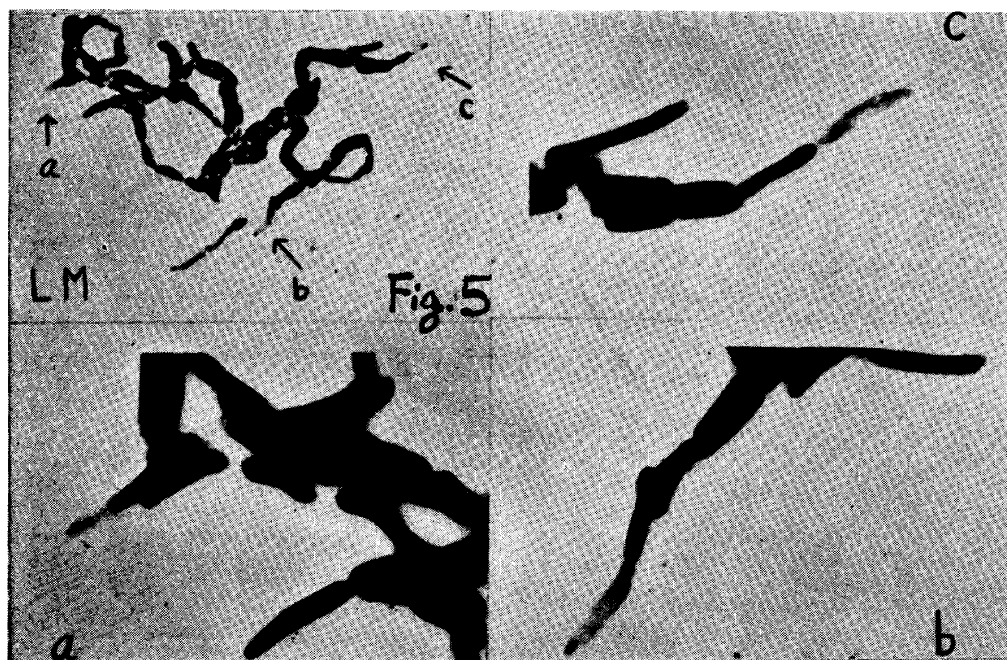


Fig. 5. 鳥型結核菌の初期培養のmicrocolonyの染色像並びに電顕像
LM. Ziehl-Neelsen
染色光学顕微鏡写真
a. b. c. 同電顕写真

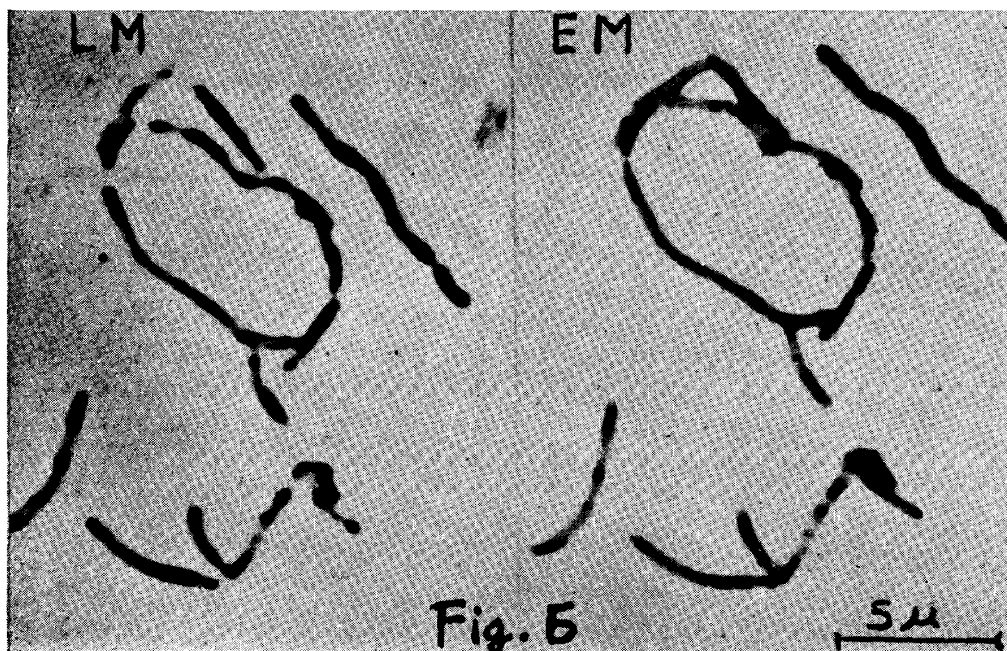


Fig. 6. 鳥型結核菌の陳旧培養のmicrocolonyの染色像並びに電顕像
LM. Ziehl-Neelsen
染色光学顕微鏡写真
EM. 同電顕写真

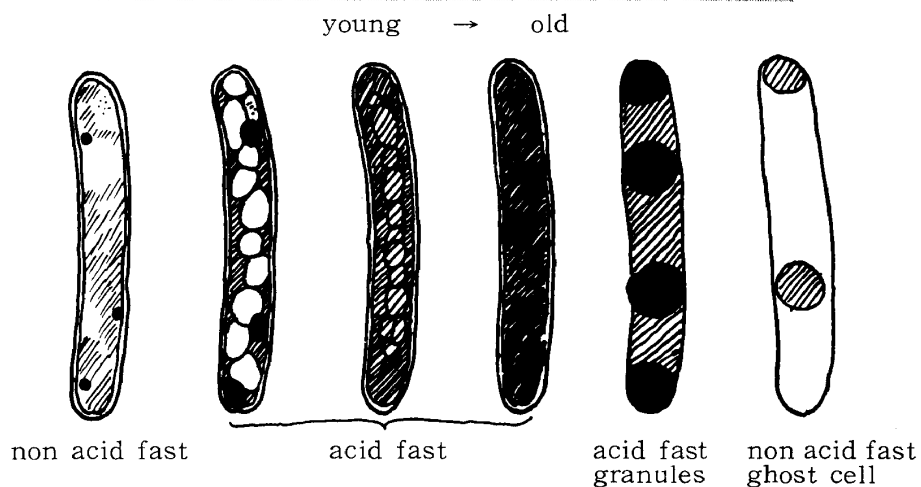


Fig. 7 A schematic diagram showing changes of cell structure of mycobacteria with the lapse of time.