口腔の一嫌気性線状菌の細胞質内沃度可染性 多糖質に関する研究

近 藤 亘 桶 谷 修 三 佐 藤 ミ チ 子
こん どう わたる おけ たに しゅう そう さとう み ち こ

新潟大学歯学部 口腔細菌学教室*

小 沢 英 浩
お ざわ ひで ひろ

新潟大学歯学部 口腔解剖学教室*

〔受付：昭和46年10月4日〕

THEILADE, GILMOUR (1961)¹⁾, HOFSTAD (1967)²⁾ は人の口腔から嫌気性の一線状菌を分離した。われわれ³⁾ はこれと同一の生物学的性状をもつ線状菌を人の歯垢から分離し、この菌が醗酵可能な糖類の存在下で発育した場合、沃度で赤紫色に染まる性質のあることと、この沃度可染性が培養の若い細胞 (24~48 時間培養菌) に現われ、培養が古くなると消失するものであることを観察した。またこの沃度可染性が細胞外からのアミラーゼの作用では消失せず、菌体の音波破壊液をアミラーゼで消化することによって沃度による呈色反応が消失すること、および沃度可染性を示す培養の若い細胞の超薄切片を電顕的に観察すると細胞内に無数の顆粒が観察され、培養が古くなって沃度可染性を消失した細胞ではこの顆粒が認められなくなることから、本菌の沃度可染性物質が菌体内に合成された glycogen-amylopectin 型の多糖体で、それが細胞質内に顆粒として存在しているものであると推定した。

この報告は、本菌の若い細胞に出現する細胞質内の顆粒が、沃度可染性の多糖体であることを直接証明し、前回の報告における推定を確めたものである。

研究 方 法

菌株：使用した菌株は教室で分離した沃度可染菌 OM 株である。

培地：培地は清水・森田⁴⁾ の培地から馬鈴薯エキスを除き、1%の割にグルコースを加えたものを基礎培地とし、10%の割に家兎血液を加えた血液寒天平板を使用し、嫌気性培養には燐燃式嫌気性装置を用いた。

超薄切片の作製および染色：上記寒天平板24時間培養の菌体を 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.4で緩衝した 2.5% glutaraldehyde で 0°C, 18 時間固定した後、同じ buffer solution で緩衝した 2% OsO₄ で 2 時間室温で後固定を行った。ついで冷エタノールで脱水し、Epon 樹脂に包埋した後、LKB Ultratome III を用い、ダイヤモンドナイフ (Du Pond) で薄切を行なった。薄切片は Mil-lonig 法⁵⁾ による水酸化鉛 (pH 12.0) で単染色を施し日立 HU-11 DS, 加速電圧 75 Kv で観察した。

切片上での消化実験のためには、今井ら⁶⁾ の方法にしたがい、薄切片を KOH-エタノール混合液で脱エポキシ樹脂を行ない、耳下腺唾液と PBS (燐酸食塩緩衝液, pH 7.0) の 4 : 1 混合液で 37°

Studies on intracellular iodophilic polysaccharide synthesized by an anaerobic oral filamentous organism
W. KONDO, S. OKETANI, M. SATO (Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Niigata University, Niigata) and H. OZAWA (Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Niigata University, Niigata)

* 新潟市旭町通 1 (〒951)

Jap. J. Oral Biol. 14(1) : 9-15, 1972.

C, 5分間消化し、水洗後、水酸化鉛で染色を施して観察した。消化試験のコントロールには加熱唾液を用いた。

光顕的に細胞内顆粒を観察する目的で、電顕用に樹脂包埋した試料の1 μ 切片を用い、脱エポキシ樹脂を行なった後、PAS染色ならびに沃度染色を施した。また消化試験は電顕切片と同様の方法で行い、PAS染色あるいは沃度染色を施した。

実験結果

1. 超薄切片の光顕的観察

図1はOM株の24時間培養菌体の超薄切片にPAS染色を施した標本である。縦断あるいは斜断された菌体では細胞質内の大部分がPAS陽性物質で満たされており、中にはところどころがPAS陰性の部分で区切られながら分節状あるいは顆粒状にPAS陽性の部分が一方にレンサをなして配列している細胞もみられる。横断された細胞のほとんどはPASで陽性に染まっている。

図2は、図1の標本をPASで染色する前に沃度で染めた標本で、図1と図2は同一の視野を撮影してある。この場合にも縦断あるいは斜断された細胞では沃度で赤紫色に染まる部分が長桿状、分節状、顆粒状に存在し、また横断された細胞の大部分が沃度で球状に染まっていて、PAS染色を行った場合と全く同じ染まり方をしていることがわかる。

このことから本菌の細胞質内にあるPAS陽性物質は沃度で赤紫色に呈色する多糖体であることが確かめられた。

つぎに本菌の超薄切片を耳下腺唾液で37°C, 5分間消化してみた。図3は耳下腺唾液で消化した後、PAS染色を施した標本である。図1でみられた細胞質内のPAS陽性物質は殆んど消失している。

図4は同様に耳下腺唾液で消化した後、沃度で染色した標本であるが、図2でみられた沃度呈色反応はほとんど消失している。

つぎにこの実験の対照として本菌の超薄切片を熱で不活化(100°C, 5分)した耳下腺唾液で37°C, 5分間消化してみた。図5は加熱した耳下腺

唾液で処理した標本にPAS染色を施したものであるが、細胞質内のPAS陽性物質は少しも減少していない。また、図6は加熱唾液で処理した標本に沃度染色を行ったものであるが、同じく沃度による呈色反応は変化していない。

以上のことから本菌の細胞質内にあるPAS陽性物質は沃度で赤紫色に呈色し、唾液で消化される多糖体であることがわかる。

2. 超薄切片の電顕的観察

図7は本菌の超薄切片を水酸化鉛で染色した標本の電顕像である。図の細胞内には幅約3000Å, 長さ約4000Åの長方形の多糖質顆粒が1000~2000Åの間隔で分節状に縦に並んでいる。これらの細胞質内顆粒は、光顕的には縦断された細胞でPAS陽性顆粒あるいは沃度可染顆粒のレンサとして観察されるものと思われる。図8の細胞質内には径400~3500Åに達する大小様々な球状~多角状の多糖質顆粒が細胞質内を密に満たしている。また図9の左側の細胞は径400~1300Åの多糖質顆粒で満たされている。光顕的に、長桿状の沃度可染部分はこのような多糖質顆粒の密な集団であると推定される。図9の右側の細胞には径約400Å程度の小さい顆粒がまばらに散在している。図10は横断された細胞であるが、細胞質は径400~2000Åの球状の多糖質顆粒で満たされている。光顕的に横断された菌体の細胞質が一様にPASあるいは沃度で球状に染って見える部分がこれに相当するであろう。図11は菌体の超薄切片を耳下腺唾液で37°C, 5分消化したものである。細胞質内の多糖質は消失して、その跡が明るいholeとして観察される。図12は100°C, 5分、熱で不活化した耳下腺唾液で37°C, 5分消化した標本であって、細胞質内の多糖質顆粒はそのまま残っている。

以上のことからPAS染色あるいは沃度染色を施した超薄切片を光顕的に観察した場合、長桿状、分節状あるいは球状の様な染まり方をする細胞質部分は電顕的には径400~4000Åに達する大小様々な多糖質顆粒の集団であり、この多糖質顆粒は唾液で消化されるものであることが証明された。

Explanation of Figures

- Fig. 1 PAS stained, de-eponized section of 24 hr glucose-grown cells fixed in glutaraldehyde and osmium. Cytoplasm is field with PAS positive substances. 1750×
- Fig. 2 Iodine stained, de-eponized section. The same field as Fig. 1. PAS positive portions shown in Fig. 1 are stained similarly with iodine. 1750×
- Fig. 3 De-eponized section digested with parotid saliva for 5 min prior to PAS staining. PAS positive substances are almost disappeared. 1750×
- Fig. 4 De-eponized section digested with parotid saliva for 5 min prior to iodine staining. Iodine staining substances shown in Fig. 2 are almost disappeared. 1750×
- Fig. 5 De-eponized section treated with heat inactivated (for 5 min, at 100°C) parotid saliva for 5 min prior to PAS staining, showing the remaining PAS positive substances. 1750×
- Fig. 6 De-eponized section treated with heat inactivated parotid saliva for 5 min prior to iodine staining, showing the remaining iodine staining substances. 1750×
- Fig. 7-10 Longitudinal and cross sections of 24 hr glucose-grown cells fixed in glutaraldehyde and osmium. Sections are stained with lead hydroxide, showing the typical pattern of electron dense granules of intracellular polysaccharide with a diameter 400-4000 Å. 75,000×
- Fig. 11 De-eponized section incubated for 5 min with parotid saliva prior to the lead hydroxide staining, showing numerous empty, electron-lucent holes, of which spaces were formerly occupied by the intracellular polysaccharide. 75,000×
- Fig. 12 De-eponized section incubated for 5 min with heat inactivated parotid saliva prior to the lead hydroxide staining, showing the remaining polysaccharide granules. 75,000×

考 察

以上のごとく、沃度可染性を示す培養時期の菌体の超薄切片を光顕的に観察した結果、本菌の細胞質は長桿状、分節状あるいは顆粒状のPAS陽性物質で満たされており、しかもそのPAS陽性物質は沃度で赤紫色に呈色し、唾液アミラーゼで消化されることからglycogen-amylopectin型の多糖体であることが証明された。また、本菌の超薄切片を電顕的に観察した結果、光顕的には長桿状、分節状あるいは球状に一樣に染まってみえる細胞質部分は幅約3000Å、長さ約4000Åの長方形の多糖質顆粒が、ある間隔で細胞質内に縦に配列したものであったり、あるいは径約400~3500Åにわたる大小不同の球状顆粒の密な集団によって構成されていることが示された。

前回の報告³⁾において、本菌の細胞質のglycogen顆粒がpositiveに示されなかったのは染色に醋酸ウラニウム、鉛の2重染色を用いたことと、膜の構造維持をよくする目的でKellenberger法を固定に用い、醋酸ウラニウムでブロック染色を施したことによると思われる。というのは、glycogen顆粒はOsO₄固定、glutaraldehyde固定をとわず、醋酸ウラニウム液(pH 4.0)で染色した場合にはnegative imageを呈することが報告されており⁷⁾、電顕的にglycogen顆粒をpositiveに染め出すためには、水酸化鉛⁵⁾のようなpHの高い染色液を用いることが必要とされているからである。

以上のことから、前回の報告³⁾において本菌の細胞質内にみられた径400~2000Åの無数のholeはglycogen-amylopectin型の多糖質顆粒が存在していた部分に相当するものであることが確めら

れたわけである。

結 論

沃度可染性線状菌の超薄切片を光顕的ならびに電顕的に観察した結果、本菌の細胞質は長桿状、分節状あるいは顆粒状のPAS陽性物質で満たされており、しかもそのPAS陽性部分は沃度で赤紫色を呈し、唾液アミラーゼで消化されることから本菌の沃度可染性物質はglycogen-amylopectin型の多糖質であり、この沃度可染性物質は細胞質内で径400~4000Åの顆粒として存在していることを証明した。

文 献

- 1) THEILADE, E. and GILMOUR, M. N.: An anaerobic oral filamentous micro-organism. *J. Bacteriol.*, 81 : 661-666, 1961.
- 2) HOFSTAD, T.: An anaerobic oral filamentous organism possibly related to *Leptotrichia buccalis*. I. Morphology, some physiological and serological properties. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 69 : 543-548, 1967.
- 3) KONDO, W., SATO, N., SATO, M. and OZAWA, H.: An anaerobic oral filamentous organism synthesizing iodophilic polysaccharide. *Japan. J. Microbiol.*, 15 : 377-380, 1971.
- 4) 清水文彦, 森田秀夫: 口腔内嫌気性 *Vibrio* に就て. *口病誌*, 17 : 1-7, 1943.
- 5) MILLONIG, G.: A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. Cell Biol.*, 11 : 736-739, 1961.
- 6) 今井大, 坂本保: 脱エポキシ樹脂法. 電子顕微鏡試料技術集(日本電顕学会関東支部会編), 352頁, 誠文堂, 新光社, 1970.
- 7) REVEL, J. P., NAPOLITANO, L., and FAWCETT, D. W.: Identification of glycogen in electron micrographs of thin tissue sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 8 : 575-589, 1960.