Malachitegreen-fuchsin 法による E. coli 分別染色の 生物学的意義

II. 菌液保存に伴う Viability の推移と分別染色性との関係

室 橋 豊 穂 吉 田 幸 之 助

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

[受付: 10月16日, 1958年]

緒 言

前報告¹⁾において, E. coli が malachitegreen-fuchsin 法で緑と赤とに分別染色されること, その染色性と菌の Viability とが一定の関連を持ち, 緑に染まる菌の多少は Viability の多少を示す如く思われることなどから, Mycobacteria におけると同様に, この分別染色によって, 自然状態に在る菌の生, 死を判別しうるのではなからうかと述べた。その後, 菌液を種々の条件で保存した場合における Viability の推移と菌体の染色性との関係をしらべたので, その成績を報告する。

実験材料, 方法並びに成績

1. E. coli 蒸留水菌液保存に伴う染色性の推移と Viability との関係:

方法: E. coli の普通寒天斜面 18 時間培養菌を蒸留水に浮游させ, Coleman Junior Type photometer, $\lambda = 470\text{m}\mu$ で一定濃度の菌液とし, ampoule に封入(実験 I, II) 或は試験管に分注(実験 III)して, 37°C 及び 0~5°C に保存。24 時間毎に 1 本宛とり出して 1 白金耳宛を一定範囲の円形に塗抹し, Malachitegreen-fuchsin (M—F) 染色を施して, 50 視野菌数を数え, 1 視野平均菌数を定め, 菌液 0.1ml 中の菌数を計算した¹⁾²⁾。一方その同一菌液を 10 倍段階稀釈し, 各 0.1ml を普通寒天平板に表面及び混釈培養して, 18~24 時間後の集落数を数え, 菌液 0.1ml 中の Viability を定めた。

菌液 0.1ml 中の推定総菌数及び同緑染菌数は, 我々の推定式 $N_t = 2 \cdot 10^5 \cdot n_1$ に従って, n_1 に n_1 (1 視野平均菌数) 或は n_0 (1 視野平均緑染菌数) を与えて算出した。

実験 I. 菌液を 10ml 用(実容量 14 ml)の ampoule に分注, 熔封保存の場合。

1) 菌液 10ml 宛を分注して 37°C に保存した場合の成

績は, 図 1 の如くである。

37°C 保存では, 緑に染まる菌数が 4 日目には略々 5% となり, 以後急速に減少する。0~5°C 保存では, 緑に染まる菌数の減少は之よりやや遅れて 5 日目頃約 50% となり, 以後著明に減少する。Viability は緑に染まる菌数の減少に伴って減少し, 計算によって得られた緑染菌数の推定値と Viability とは, 殆んど一致して推移する。

図 1 菌液保存に伴う E. coli 菌体の
分別染色性と viability の推移
(ampoule 10ml 分注, 37°C)

2) ampoule 内空気量を減ずる為に 13ml 宛分注した場合, 37°C 保存では, 10ml 分注の場合よりやや早く, 3 日目以後緑染菌数が著しく減少する。0~5°C 保存では, 10ml 分注の場合の 0~5°C 保存と 略々同様の経過

MUROHASHI Toyoho & YOSHIDA Konosuke:
Biological meaning of the differential stainability
of E. coli to the malachitegreen-fuchsin staining.
II. Tuberculosis Division, National Institute of
Health, Tokyo.—Jap. J. of Bact., 14 (5), 379-382,
1959.

図 2 菌液保存に伴う *E. coli* 菌体の
分別染色性と viability の推移
(ampoule 真空溶機, 37°C)

をとり、5日目頃から明かに緑染菌数を減ずる。Viability 減少曲線は、37°C, 0~5°C 保存共に、緑染菌数の減少曲線と殆んど一致している。

実験Ⅱ. ampoule 分注後、真空中に熔封した場合: ampoule 分注後 10^{-1} ~ 10^{-2} mmHg で熔封し、37°C に保存した場合をしらべた。成績は図2の如くである。

保存3日目頃から緑にそまる菌は明かに減少し始め、5日以後の減少は著しい。Viability は、実験Ⅰの場合よりも遙かに減少し、7日目には実験開始時より2~3 order 低い値を示すに至る。即ち、実験Ⅰでは緑にそまる菌数の減少曲線と Viability の減少曲線とが略々一致して推移したのに対して、本実験では、Viability 減少曲線は、緑にそまる菌数のそれよりも可成り急速な減少傾向を示している。このことは、ampoule に封入された蒸留水菌液においては、空気量の減少が緑にそまる菌からの recoverability をも著しく低下せしめるような、菌の生存に対して極めて不利な環境条件を形造ることを示していると思う。

実験Ⅲ. 試験管分注菌液に Toluene 或は流動パラフィンを重ねて37°C に保存した場合: 成績は図3, 4に示す如くである。対照として、試験管分注後何も重ねせずに37°C に保存したものゝ成績は、略々流動パラフィン重層の場合と同様なので省略した。

流動パラフィン重層の場合も Toluene 重層の場合も、48時間以後緑にそまる菌数を明かに減じ、72時間以後からは、緑にそまる菌数は10%以下となる。Viability の推移は Toluene 重層と流動パラフィン重層とでは異なり、後者では略々実験Ⅰと相似た経過を示すが、前者では72時間以後 Viability を極度に減じて、実験Ⅱの真空

図 3 菌液保存に伴う *E. coli* 菌体の
分別染色性と Viability の推移
(Liq. paraffin 重層, 37°C)

図 4 菌液保存に伴う *E. coli* 菌体の
分別染色性と Viability の推移
(Toluene 重層, 37°C)

熔封の場合よりも一層 Viability と緑にそまる菌数との開きが大きく示されるようになる。このことは、Toluene 重層の場合、単なる空気遮断のみではなく、菌自体に何等かの障碍を及ぼしてその recoverability を著しく低めていることを示唆する。Toluene が chloroform と共に強力な lipid 抽出剤であり、一方 *E. coli* の細胞壁が lipid に富むことを考えると、之は当然のことのように思われる。

2, *E. coli* 加熱死菌々液の保存条件と之に伴う染色性の変化:

E. coli 18時間培養から蒸留水菌液を作り、60°C, 30分加熱殺菌し、M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2), 10倍

表 1 *E. coli* 60°C, 30 分加熱死菌の保存に伴う染色性の変化

菌液条件		$\sum_{1}^{50} n_1$	$\sum_{1}^{50} n_0$	α (%)
加熱直前		270	221	81.9
加熱直後		274	135	49.1
P-Buffer (pH 7.2)	2 日	205	61	23.7
	4 "	182	26	14.2
	7 "	191	5	2.6
0.5 % carbol	2 "	162	70	43.2
	4 "	133	46	34.5
	7 "	134	53	39.5
10 倍 formalin	2 "	204	99	43.9
	4 "	183	89	48.6
	7 "	226	82	36.2
1,000倍 昇 汞	2 "	147	56	38.0
	4 "	146	33	26.0
	7 "	150	21	14.0

註: $\sum_{1}^{50} n_1$: 50 視野菌数

$\sum_{1}^{50} n_0$: " 緑 "

α : 緑にそまる菌の割合

formalin 水, 0.5% Carbol 水及び 1,000 倍昇汞水中に夫々浮遊させて 37°C に保存, 日を追って菌の染色性をしらべた。前報告で述べたように, 90°C 加熱では Malachitegreen 染色性は著しく減ずるので, 60°C, 30 分加熱菌を用いたが, それでも, 加熱直後において既に或る程度 Malachitegreen 染色性が失われている。

保存後の染色性の推移は表 1 の如くである。

磷酸緩衝液に保存した場合, 既に 2 日以後 Malachitegreen 染色性を明かに減じ, 7 日目には数%となる。然し, 加熱死菌を Formalin や Carbol などの中に保存すると, 多少の変動はあるにしても, 2~7 日の保存期間中, Malachitegreen 染色性は著しい減少なしに保存されている。1,000 倍昇汞水では然しその減少が少々強かつた。

総括・考按

Malachitegreen-fuchsin 法による分別染色は *E. coli* の生, 死判別に資しうる如く推察されると前報告で述べた。この点を確認するには, 菌を自然死せしめる状態において, 染色性の経時的な推移と, Viability の推移と

の関係から論議する必要があると思う。そこで菌体を蒸溜水に浮遊させて, 種々の環境条件下に漸次菌が死滅してゆく過程を検討した訳である。それによると, 保存温度及び空気量の多寡によって遅速の差はあるが, 蒸溜水中においては, 保存日数と共に菌の Malachitegreen 染色性は減少し, 之に伴って Viability の減少がみられる。このことは Viability と菌体の Malachitegreen 染色性との間に密接な関連のあることを示すが, 推定総菌数曲線 (n_1 計数による) と Viability 曲線とは全く関係がなく, 前者が略々一定の菌数 order を維持するに拘らず, 後者のみが経時的に著明な減少曲線を描いている。そして定量的に測定計数された緑染菌の推定菌数曲線は, 或る程度空気存在する環境では比較的緩やかな曲線を描いて, Viability 曲線と略々一致する。Viability の高さを菌生存の表現と一応仮定するならば, 菌体が緑にそまることゝ菌の生存とは極めて高い相関々係に在ると見做すことが出来よう。

菌によつて甚だ不利な環境条件を設けた場合には, 緑にそまる菌の減少速度は更に著しいが, それにも増して Viability の減少は一層著しく, 保存 5 日目以後には, 緑にそまる菌の総数よりも数 order 低い Viability をしか示さない。この場合, 前述したような Viability と緑にそまる菌数との間に高い相関が見られないことは一見奇異な感を与えるが, 加熱死菌を保存した場合の染色性の推移から, この点の説明は可能であろう。即ち, 60°C 30 分加熱殺菌した場合, 尚ほ相当数の Malachitegreen 染色性の菌体を認めるが, 磷酸緩衝液中に保存すると, 生菌を蒸溜水中に保存した場合と同様の経過をとつて, Malachitegreen 染色性が失われてゆく。之に対して, formalin や carbol のような所謂防腐剤を含む環境では, その変化が阻止されるのである。この所見は, *Mycobacteria* において推測したように, 菌体細胞内の構造物質が細胞の死と共に非可逆方向への化学反応によつて漸次分解されてゆく所謂 autolysis の過程が, formalin や carbol のようなものによつて阻止されるのに対して, 緩衝液中では autolysis の過程がそのまま進行してゆくことを示していると思う。malachitegreen 染色性の機序が細胞内高重合 DNA と malachitegreen との特異的結合に基づくとする我々の推測からすれば, 菌の死に伴つて起る autolysis の過程において, 高重合 DNA が低重合化されてゆく過程を, この染色性の推移は示していると考えられるのであらう。そう考えれば, malachitegreen 染色性を呈する菌体細胞の内には, 培地上で recover しうるもの, 生きてはいるが recover

しえないもの及び死後 autolysis の充分進展していないものなどを含むと考えられるのであり、真空環境や Toluene 重層の場合に見る著しい Viability の減少と malachitegreen 染色性の減少との間の大きな開きは、これによつて説明が可能となると思う。

結 論

E. coli の蒸留水菌液を種々の環境条件に保存し、経時的に viability と菌の染色性とを追求した。その結果、菌体が malachitegreen 染色性を失うことと viability の減少することはよく一致することがわかつた。又加熱死菌を保存すると、時間の経過と共に malachitegreen 染色性が失われるが、この染色性の変化は formalin その他の所謂防腐剤で阻止される。

以上の所見及び前報告の成績から、malachitegreen-fuchsin 染色によつて緑にそまる菌は、生菌及び死後間もないものを含み、赤く染まる菌は死後菌体内における autolysis が或る程度進んだものと推察される。

擧筆に臨み御校閲戴いた柳沢部長に謝意を表す。

文 献

- 1) 室橋豊穂・吉田幸之助：Malachitegreen-fuchsin 法による *E. coli* 分別染色の生物学的意義，(I) 染色方法並びに分別染色性と viability との関係，日本細菌学雑誌，14，285～289，1959.
- 2) 室橋豊穂・吉田幸之助：喀痰塗抹標本からの検出結核菌の数に基づいた培養集落数の推定法，(I)，(II)，(III)；結核，33，95～98；293～297；341～344，1958.