Gram 染色性に関する研究

(附) それと Fontès (Much) 染色性との異同

大 岩 弘 治

京都大學結核研究所 細菌血清學部 (指導: 植田教授)

受付: 11 月 12 日, 1949 年

Gram 染色の本能に関しては種々の解釋があるが, その中最近發表せられた Henry & Stacy (1943), Bartholomew & Umbreit (1944) 等のリボ核酸説は一段と進歩した, 問題の核心に觸れた説として注目をひいた⁽¹⁾。一方 Tulasne & Verdrel⁽²⁾ (1947) 等は細菌の核の證明法として鹽酸或はリボヌクレアーゼによつて前處置して後, 核染色を行う方法を發表しているが, これらは共に菌體のリボ核酸をデゾキシ核酸よりも容易に分解せしめる性質を利用したものである。私はこれらの業績に多大の興味を感じ, 酸, 鹽基及び有機溶媒による前處置が Gram 染色性に及ぼす影響を検討し, 少しく本染色の本態を究明せんと企てた。

實驗方法

スライドガラス上に菌を固定し, 酸, 鹽基及び有機溶媒により菌體成分の一部を分解, 溶出せしめた後, 染色を行い, 前處置が染色性に及ぼす影響を調べる方法によつた。

(I) 供試菌は次のものを用いた。

St. aureus (寺島株), ブイヨン培養 20 時間。

B. subtilis, 同

M. tuberculosis (人型 F 株), Kirchner 培地 4 乃至 7 日培養の初期菌膜。

Streptomyces A-422⁽³⁾, 葡萄糖ブイヨン培養 1 週前後。

(II) 固定液は Chaubaud's mixture⁽²⁾ を用い, 30 分間行つた。

アルコール (80 %)	60 ml
石炭酸	15 gm
ホルマリン	5 ml
醋酸	2 ml

(III) 前處置としてはリボ核酸を加水分解せしめる目的で 1 規定鹽酸 (60°C), 5 % 重曹水 (60°C), 5 % 苛性曹達水を用い, 又脂質を溶出せしめる目的で 1 %

鹽酸加エーテル・アルコール等量液, クロロフォルム, アセトンを用いた。

(IV) 染色は 4 種類行つたが, 實驗の目的上よりして次に示すが如く總て後染色或は對比染色は省いた。

Gram 染色法

5 % 石炭酸メチール紫	1 分
Lugol 氏液	1 分
純アルコールにて脱色	約 20 秒
水洗, 乾燥, 鏡檢	

Fontès 染色法

5 % 石炭酸メチール紫	微温 2 分
Lugol 氏液	1 分
アセトン・アルコール等量液にて脱色	約 20 秒
水洗, 乾燥, 鏡檢。	

Much 染色法

2 % 石炭酸メチール紫	24 時間
Lugol 氏液	10 分
5 % 硝酸	1 分
3 % 鹽酸	10 秒
アセトン・アルコール等量液にて脱色	約 20 秒
水洗, 乾燥, 鏡檢。	

Ziehl 石炭酸フクシン染色法

5 % 石炭酸フクシン	加温 2 分
3 % 鹽酸アルコールにて脱色	約 20 秒
水洗, 乾燥, 鏡檢。	

實驗成績

(I) Gram 及び Fontès (Much) 染色性に對する弱酸の影響。60°C に温めた N-HCl の作用時間と染色性との關係をしらべると, *St. aureus* 以外は 30 分

Koji OYIWA: Studies on the Gram stain: Its difference from the Fontès (Much) stain. Japan. J. Bact., 5(1): 19-22, 1950.

間作用せしめてもなお Gram 染色性はたもたれた。また Gram 染色性は残存するにかかわらず、より強固であると思われる Fontès 或は Much 染色性が消失した事は意外であつた。——(第1表参照)

更に Fontès 染色性が消失した。弱酸、弱鹽基を重ねて作用させた場合 Gram 染色性が初めて無くなつた。アセトン 20 時間の処理では酸性エーテル・アルコールとは反對に抗酸性が残存するにかかわらず、Fontès 染

第1表 Gram 及び Fontès (Much) 染色性に対する弱酸の影響

60°C N-HCl 作用時間 (分)		5	10	15	20	30	對 照
菌 種	染 色 方 法						
St. aureus	Gram	+	+	±	±	-	+
	Fontès	+	±	-	-	-	+
B. Subtilis	Gram		+	+	+	+	+
	Fontès		+	+	±	±	+
M. tuberculosis	Ziehl	+	-	-	-	-	+
	Gram	+	+	+	+	+	+
	Fontès	+	-	-	-	-	+
	Much	.	-				+
Streptomyces	Gram		+	+	+	+	+
	Fontès		±	±	-	-	+

(Ⅱ) M. tuberculosis の染色性に対する弱酸、弱鹽基其他の影響。M. tuberculosis の抗酸性が弱酸の僅か 10 分間の處理により消失することを知つたので、弱鹽基の外に抗酸性脱却の目的で酸性エーテル・アルコール、有機溶媒としてアセトン、クロロフォルムを M. tuberculosis に作用させて染色性に対する影響をしらべてみた。

酸性エーテル・アルコールの 30 分間處理で抗酸性は無くなつたが Gram 及び Fontès 染色性はなお残つた。弱鹽基では抗酸性、Gram 及び Fontès 染色性は殆ど影響せられなかつた。しかし豫め酸性エーテル・アルコールで處理した後弱鹽基を作用させた場合は

色性は陰性となつた。酸性エーテル・アルコールとアセトンとを重ねて作用させた場合にも、なお Gram 染色性は無くならなかつた。クロロフォルム 20 時間の處理では抗酸性及び Fontès 染色性は共に殆ど消失したが Gram 染色性のみは依然變らなかつた(第2表参照)。

(Ⅲ) B. subtilis 及び streptomyces の染色性に対する弱酸、弱鹽基其他の影響。同じ處理を B. subtilis 及び streptomyces に行つてみたところ、弱鹽基による處理では兩菌ともに Gram 及び Fontès 染色性が残存した。さらに弱酸、弱鹽基を重ねて作用せしめた場合にも、なお Gram 染色性が残つた。アセトン、クロロフォルムは Gram 及び Fontès 染色性を無くす

第2表 M. tuberculosis の染色性に対する弱酸、弱鹽基其他の影響

前 處 置	Ziehl	Gram	Fontes
acid-ether-alcohol (30 分)	-	+	+
N-HCl (60°C 10 分)	-	+	-
5% NaHCO ₃ (60°C 10 分)	+	+	+
acid-ether alcohol (30 分)+5% NaHCO ₃	-	+	-
5% NaHCO ₃ (60°C 10 分)+NHCl (60°C 10 分)	-	-	-
acetone (20 時間)	+	+	-
acid-ether alcohol (30 分)+acetone (20 時間)	-	+	-
chloroform (20 時間)	±	+	±
對 照	+	+	+

第3表 *B. subtilis*, *Streptomyces* の染色性に對する弱酸, 弱鹽基其他の影響

菌 種	前 處 置	Gram	Fontes
<i>B. subtilis</i>	N-HCl (60°C 10 分)	卅	卅
	5 % NaOH (1 時間)	卅	卅
	acid-ether-alcohol (20 時間)	卅	—
	acetone (20 時間)	卅	卅
	對 照	卅	卅
<i>Streptomyces</i>	N-HCl (60°C 10 分)	卅	±
	5 % NaHCO ₃ (60°C 10 分)	卅	卅
	N-HCl (60°C 10 分)+NaHCO ₃ (60°C 10 分)	卅	—
	acid-ether-alcohol (20 時間)	卅	—
	acetone (20 時間)	卅	卅
	chloroform (20 時間)	卅	卅
	對 照	卅	卅

事ができなかったが、酸性エーテル・アルコールは兩菌種の Fontès 染色性を消失せしめた。

なお、これらの染色性は培養が古くなるほど、酸、鹽基、有機溶媒に對して抵抗を増す傾向にあつた。

總 括 と 考 案

リボ核酸を分解するといわれる弱酸、弱鹽基の作用によつて Gram 染色性の消失を計つたのであるが、結果は豫期に反し、*St. aureus* が弱酸により、また *M. tuberculosis* が弱酸、弱鹽基を重ねて作用させた場合に Gram 染色性を失つたのみで、一般に Gram 染色性は弱酸、弱鹽基に非常に抵抗する事を知つた。有機溶媒はもちろんに長時間作用させても何等影響を與えなかつた。はたして 30 分間の鹽酸処理により細菌のリボ核酸が消失するや否やはなお検討の要があるが、H. Stefaro⁽⁴⁾ (1948) が Carnoy の醋酸アルコール液で固定せる動物細胞について行つた實驗では 24分間の鹽酸処理によつて細胞中のリボ核酸はもちろん、より酸に抵抗の強いデオキシ核酸までも殆んど完全に消失する事を發表している。この點を併せて考えるならば、Gram 染色性のリボ核酸説はなお大いに検討の餘地があるようである。

Gram 染色性の安定なのに反し、Fontès 及び Much 染色性は僅かの影響によつて消失する。すなわち上記の4種の菌の Fontès 及び Much 染色性は 30 分間の鹽酸処理により殆ど無くなり、弱鹽基では影響される所は少いが、それでも *M. tuberculosis* では酸性エーテル・アルコールで処理せる後に弱鹽基を作用させれば消失する。また核酸には殆ど影響を與えないと考え

られる有機溶媒、ことに酸性エーテル・アルコールで長時間処理すれば、Fontès 及び Much 染色性が殆ど消失するのは注目すべき事である。ただし *M. tuberculosis* については少しく異り、さらにセトンを重ねて作用させる事が必要である。

H. Much⁽⁵⁾ (1907) が *M. tuberculosis* の Gram 染色法として Gram 第2法 (現今の Much 染色法) を發表して以來、Fontès 其他多くの改良法をうんだのであるが、脱色劑としてアセトン・アルコールを使用する Much, Fontès 等の Gram 變法と、アルコールを使用する Gram 法との異同に關しては從來殆ど本質的な批判が試みられなかつた。この點さきに植田⁽⁶⁾ (1949) は *M. tuberculosis* の非抗酸性形及び抗酸性形の Gram 及び Much 染色所見に立つて兩種染色性の相違を暗示した。本實驗の結果から見れば、Gram 染色性と Fontès (Much) 染色性とは必ずしも一致しない事は明らかである。Gram 染色性がなお残るにかかわらず Fontès (Much) 染色性が消失する場合がある (その反對の場合は見られなかつた)。しかも Fontès (Much) 染色性は弱酸、弱鹽基或は有機溶媒の処理によつて比較的容易に消失する事より考へて、Gram 染色性とは明らかに異なるものである。おそらくは Gram 陽性物質にある種の脂質が結合した結果として初めて Fontès (Much) 染色性を表わすのではないかと考えられる。すなわち沃度パラロズアニリンと Gram 陽性物質との結合がアセトンアルコールの処理に抵抗するのためには、豫め Gram 陽性物質に或種の脂質の結合する事が必要であるのではないかと考えられる。

結 論

St. aureus, *B. subtilis*, *M. tuberculosis*, *Streptomyces* の4種の菌について Gram, Fontès, Much 染色性に對する弱酸, 弱鹽基及び有機溶媒処理の影響をしらべたところ次の如く結論をえた。

(1) Gram 染色性は弱酸, 弱鹽基及び有機溶媒処理に抵抗する。

(2) Fontès (Much) 染色性は弱酸, 弱鹽基及び有機溶媒処理により比較的容易に消失する。

(3) Fontès (Much) 染色性は Gram 染色性とは異つたものであり, おそらくは Gram 陽性物質にあ

る種の脂質が結合することにより初めて成立すると考えられる。

文 献

- 1) 醫學のあゆみ, 3: 324, 昭 22 (1947)
- 2) Tulasne, R. & Vendrely, R.: *Nature*, 4057: 225, 1947.
- 3) 上坂一郎: 第 22 回日本細菌學會 1949
- 4) Stefano, H.: *Proc. Nat. Acad. Sciences*, 34:75, 1948.
- 5) Much, H.: *Beitr. Klinik. Tbc.*, 8:85, 1907.
- 6) 植田三郎: 東京醫事新誌, 66: 11, 1949.