真菌のプロトプラストの再生過程における グラム反応に関する研究

徳島大学医学部細菌学教室 (主任：吉田長之教授)

九州歯科大学口腔細菌学教室 (主任：内山長司教授)

中 野 長 幸

(本論文要旨は昭和46年4月，第44回日本細菌学会総会 (東京) に発表済)

Studies on the Gram Reaction in association with Regeneration of Fungal Protoplasts

By

Nagayuki Nakano

Department of Bacteriology, School of Medicine, The University
of Tokushima, Tokushima 770, Japan (Director : Prof. Nagayuki Yoshida) and

Department of Oral Bacteriology, Kyushu Dental College, Kokura,
Kita-Kyushu, Japan (Director : Prof. Choji Uchiyama)

Protoplasts of *Geotrichum candidum* were cultivated in agar layers and changes in their morphology and Gram reactions during cultivation were examined. The procedures used were the thin-layer-agar plating method of Fukui et al. (1969) for the former and a simplified Gram stain for the latter.

The protoplasts, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were embedded together and treated with 6 % glutaraldehyde containing 0.75 M NaCl for 1-24 hr. Then, the material was treated successively with 0.2% crystal violet, Lugol solution, dehydrating solution and safranin for 60, 60, 60-90 and 20-30 sec, respectively. The extent of the Gram positive reaction in protoplasts was measured by comparison with that in the other representative bacteria embedded close to the protoplasts.

Studies were also made on the Gram reactions of regenerating protoplasts with the following results.

1. Protoplasts were completely gram-negative before cultivation.
2. A gram-positive substance first appeared on the growing point of protoplasts, but the mother cell remained gram-negative. Thus, when the regenerating cell became septate, the daughter cell was gram-positive whereas the parent cell was still gram-negative. This agrees well with the finding (Fukui and Ota, 1973) that the osmoresistant glucan layer is not involved in the Gram reaction.
3. The gram-positive substance was also seen in the center of the regenerating protoplasts. This fact suggests that both the outer layer and the physiological state of the bacteria may influence the Gram reaction.

4. The Gram reaction could not be observed by electron microscopy because the dye was lost in the embedded medium. This does not agree with the report of Tchan in 1963 of intracellular dye in cells of gram-positive bacteria under an electron microscope.

1884年 Gram は組織内の細菌を識別する目的で染色方法を考案した。その後、細菌の塗抹標本の同染色で病原細菌が2群に染め分けられることがわかり、その診断的価値が認められて、いわゆるグラム染色法として、今日では細菌の同定に、日常用いられる重要な染色法となった。しかし、その染色機序に関して、決定的な結論はまだえられていない (Bartholomew and Mittwer, 1952)¹⁾。その機序に関して、3つの学説がある。その第1は等電点説といわれ Stearn and Stearn (1924)²⁾ にはじまる。この学説はグラム陽性菌の細胞質は陰性菌のそれより酸性側にあり等電点が低く、一方陰性菌の等電点が高いことから、グラム陽性菌および陰性菌の細胞質と塩基性色素との親和性の差にその機序の焦点をもとめている。第2は透過説といわれ、Kaplan and Kaplan (1933)³⁾ はその機序を2つの面から説明しようとした。その1つはグラム染色により細胞質内に形成された色素ヨード複合体のアルコール脱色に対する溶解速度が、グラム陽性菌の方が遅いということ、および他の1つはこの複合体の細胞質膜透過性に、グラム陽性菌と陰性菌との間に差があるという2面である。第3は細胞表層にグラム染色機序に関係する物質が存在すると考える、いわゆる外表説で Churchman (1927, 1929)^{4, 5)} にはじまる。最近ではその物質は magnesium ribonucleate であると考える者 (Bartholomew and Umbreit, 1944⁶⁾ ; Normore and Umbreit, 1965)⁷⁾ が多い。真菌は一般にグラム陽性である。本実験で用いた *Geotrichum candidum* からは純粋なプロトプラストが得られ、しかもこのプロトプラストについて Fukui ら (1969)⁸⁾ により薄層寒天内における再生過程に関する多くの知見がえられている。グラム陽性菌はプロトプラスト状態ではグラム陰性であることは知られている (Salton, 1963⁹⁾ ; Scherrer, 1963)¹⁰⁾。そこでこの再生過程の形態的、生理的变化と細胞がグラム陽性になる時期を比較して観察すれば、グラム染色機序の本質に少しでも近づくことができると考え、本実験を計画した。そのためには、まず薄層寒天内におけるプロトプラストのグラム染色法を考案した。ついでプロトプラストの再生過程におけるグラム反応の変化を観察し、興味ある知見をえたので報告する。

実験 I 薄層寒天内におけるグラム染色法について

グラム陽性菌が、その細胞壁を失ってスフェロプラストまたはプロトプラストの状態になったとき、グラム陰性となり (Salton, 1963⁹⁾ ; Scherrer, 1963¹⁰⁾)、たとえば全菌でも細胞壁が破壊されるとグラム陰性となる (Benians, 1912¹¹⁾ ; Benians, 1920¹²⁾)。このことから考えると、プロトプラストの固定前の取扱いに充分の注意が払われなければならない。すなわちプロトプラストは浸透圧変化に対し鋭敏であり、低浸透圧下で容易に破壊される。しかもプロトプラストは細胞壁がないので、たとえ固定してからスライドに塗抹したとしても、乾燥につづく染色操作の間に細胞膜の一部が破壊され、細胞はグラム陰性となることもあると考えられる。したがってプロトプラストがグラム陰性であるということをしめすためには、プロトプラストを破壊せず、しかも再生させることができるような状態で染色法をおこなうのが、最良と考えられる。そこで Fukui (1969)⁸⁾ の考案したプロトプラストの再生を定量的に観察できる薄層寒天法により、グラム染色をおこなうことを試みた。

実験方法

使用菌株：教室保存の *Geotrichum candidum* IFO 6454 を用いた。グラム染色の対照として *Staphylococcus aureus* 209P および *Escherichia coli* を使用した。

プロトプラスト作成法：Fukui ら (1969)⁸⁾ の方法に準じた。すなわち、0.5% 酵母エキスカサブロー・ブドウ糖ブイヨンに約3～3.5時間、30°C で振盪培養した本菌を蒸留水で3回遠沈洗浄し、0.75M 食塩加 0.005M citrate phosphate buffer (CPB) に10%の割合にカタツムリ腸管酵素 (Suc d'Helix pomatia l'Industrie, Français) を溶解した液に浮遊させた。ついで30°C でゆっくり振盪し、3～4時間処理した。産生したプロトプラストを0.75M 食塩加 CPB で遠沈洗浄し、ガラスフィルター (平均孔直径、20 μ m ; Hario-F34型, Shibata Chemical Co., 東京) で未消化菌や ghost を除いて純化した。

プロトプラストの再生のための薄層寒天法：薄層寒天

法は Fukui ら (1969)⁸⁾の方法に準じた。すなわち、*G. candidum* のプロトプラスト、*S. aureus* および *E. coli* の混合菌液 0.1ml を、プラスチックシャーレに入れて、約 45°C の恒温槽に浮遊させる。ついでこれにあらかじめ約 50°C に保った 0.75M 食塩加 CPB の 2% 寒天液を約 0.2ml 入れ、手早く滅菌ガラス棒で混和し薄層とし、取出して寒天が凝固してから試料を固定した。なおプラスチックシャーレは、同一単個細胞の追跡に便利のように、その底にあらかじめマークをほどこして用いた。

実験結果

1. 固定法の検討：プロトプラストを安定させるための安定剤には高濃度の食塩および硫酸マグネシウムなどが使用される。しかし固定液の種類によっては、安定剤に充分溶解せず、ときに白濁を生じる。オスミウム、重クロム酸カリ、アルコール、ホルマリンなど種々試みたが、結局 6% の割合にグルタルアルデヒドを溶解した 0.75M 食塩加 CPB が優れていた。これを用いると固定時間にも幅があり、1～24 時間固定しても光顕的に差はみられなかった。

2. 染色法の検討：固定後の試料は 0.2% クリスタル紫液で 60 秒染色し、ついでルゴールで数回液を交換しながら 60 秒処理し、さらにサフラニンを 20～30 秒作用させると良く染色された。

3. 脱色条件の検討：脱色に影響するのは寒天の厚さで、少し厚くなると脱色は困難となった。結局、脱色液は 95% エチルアルコール 7 容と、100% アセトン 3 容の混合物とし、シャーレに充分量入れて、シャーレをやや強く振盪しながら、約 60～90 秒間、脱色をおこなった。

4. その他染色法におよぼす条件の検討：染色に最も大きい影響を与えるのは脱色処理前の寒天の乾燥状態である。寒天が乾燥すると、ほとんどクリスタル紫の脱色は不可能となる。もし実験途上で乾燥することがあれば、再び流水に浸してから脱色すれば、脱色可能なことがわかった。

5. 判定法：薄層寒天法の項でのべたように、プラスチックシャーレのマークの近くにあるプロトプラストを位相差顕微鏡(倒立)で観察し、充分輝度を保った細胞をあらかじめ確かめた。固定染色後同一プロトプラストのグラム反応を判定した。それには油浸油を直接試料面において、100 倍の対物レンズを使用し *S. aureus* が陽性に *E. coli* が陰性に染色されている視野の、しかも上記のようにあらかじめ輝度をチェックされたプロトプ

ラストを選んで観察した。

小 括

1. 薄層寒天法によるグラム染色法

プロトプラストの再生過程を定量的に観察できる薄層寒天法を応用し、このグラム染色法を考案した。染色手技はつぎの通りである。

1) プロトプラスト、*S. aureus* および *E. coli* を混合しプラスチックシャーレを用いて、薄層寒天法により包埋。

2) 6% グルタルアルデヒドを含む 0.75M 食塩加 CPB で固定、1～24 時間。

3) 流水中で水洗、1～2 時間。

4) 0.2% クリスタル紫、60 秒。

5) 流水中で水洗。

6) ルゴール媒染処理、60 秒。シャーレを振盪しながら、数回液を交換する。

7) 流水中で水洗。

8) アルコール、アセトン混合液による脱色、60～90 秒。シャーレをよく振盪する。

9) 流水中で水洗。

10) サフラニン後染色、20～30 秒。

11) 水洗。

12) 自然乾燥。

2. プロトプラストのグラム反応

上記方法により、*S. aureus* はグラム陽性に、*E. coli* は陰性にみえる視野で *G. candidum* のプロトプラストは明瞭なグラム陰性をしめした。

実験Ⅱ プロトプラストの再生過程における形態とグラム反応の変化

薄層寒天培地でのグラム染色法が可能となり、プロトプラストは明確にグラム陰性であることがわかった。そこでつぎにプロトプラストが再生のどの段階でグラム陽性となるかを観察した。Fukui ら (1969)⁸⁾ および Ota (1972)¹³⁾ は薄層寒天法でプロトプラストの再生過程を 3 相に分けて考えている。すなわち第 1 は浸透圧変動に感受性のある相であり、第 2 は低浸透圧下に抵抗する相であり、第 3 はそれ以後細胞が細胞壁を完成しながら集落を形成する相である。このことを考慮において経時的に試料を固定し、グラム染色をおこなって観察した。

実験方法

プロトプラスト作成法および薄層寒天におけるグラム

染色法は上記実験Ⅰに述べた通りである。

プロトプラストの再生のための薄層寒天法：福井・太田 (1973)¹⁴⁾の方法では、プロトプラストを薄層寒天に包埋したのち第1回培養は *stabilizing medium* を用いている。この *stabilizer* は0.75Mの食塩とし、これを液体培地に加え、培地にはつぎの3種類を用いている。その1つは天然培地で、3%酵母エキス、1%ペプトン、2%心臓浸出液、4%ブドウ糖が含まれている。他の2つは合成培地であり、Czapek-Dox のミネラルに1%ブドウ糖およびリボ酸を加えたもの(SCDG)と、さらにこれに0.4%アスパラギン(SCDGA)を加えたものである。

このプロトプラストの再生のための培地を検討した福井、太田 (1973)¹⁴⁾の報告にもとづいて、本実験でもこれら3種類の培地を使用した。*Stabilizing medium* による第1回培養後、培地を蒸留水におきかえて、浸透圧変動に感受性のある細胞を破壊し、ついで *stabilizer* を含まない培地におきかえて、浸透圧変動に抵抗した細胞の第2回目の培養をおこなった。

第1回培養の *stabilizing medium* 中における再生細胞のグラム反応の観察のために、培養9時間までの試料を経時的に取出し、蒸留水による未再生細胞の破壊処理をおこなった上で、試料を固定し、グラム染色をほどこした。ついで第2回培養時間中における再生細胞の観察のためには、第1回培養が3.5および5時間の試料を、蒸留水による未再生細胞破壊処理をおこなった上で、*stabilizer* を含まない培地で培養した。ついで試料を経時

的に取出し、固定し、グラム染色をほどこした。また、試料を固定した後、位相差顕微鏡(倒立)下で観察し、輝度を充分保った細胞をあらかじめマークした。染色後はその同一細胞について観察し、グラム反応の判定をおこなった。したがって、本実験で観察した細胞は、すべて蒸留水処理に抵抗し、位相差顕微鏡下で充分輝度を保った再生細胞である。

また、*G. candidum* の全菌を、カタツムリ腸管酵素で約1時間処理し、薄層寒天法で包埋し、*stabilizing medium* を用いて培養した。ついで試料を経時的に取出し、蒸留水による破壊処理をおこない、固定し、ついでグラム染色をほどこした。この細胞には位相差顕微鏡下で、一見 *intact* に見える細胞壁が存在し、細胞質は細胞全体に充満しており、浸透圧変動に対し感受性のある細胞とそうでないものとがあった。

実 験 結 果

1. グラム染色された再生中の細胞に観察される細胞形態とグラム反応

Stabilizing medium および *stabilizer* を含まない培地、さらに人工培地を用いて培養した再生細胞のしめす形態とグラム反応は図1の通りである。それらについて以下の実験成績の説明に便利のように a, b, c …… と名称を附した。黒い部分はクリスタル紫に染まるグラム陽性部分をあらわし、白はサフラニンで染まるグラム陰性部分を現わしている。a は再生して浸透圧変動に抵

図1 *Geotrichum candidum* のプロトプラストの再生過程にみられる形態とグラム反応の変化の模式図

抗するようになった細胞, **b**はそれが芽を出した状態, **c**は芽の中心にグラム陽性顆粒が存在する状態である. **d**は芽がグラム陽性物質で充満されており, しかもそれが母細胞にまで達しない状態のものである. **e**は隔壁が形成され娘細胞はグラム陽性, 母細胞は陰性のものであり, **f**は第2番目の芽を出した細胞である. **g**は**a**の中心にグラム陽性物質が存在し, **h**はその物質が充満した細胞である. **i**は芽を出した細胞で, 母細胞および芽を含めてグラム陽性物質で充満されている. **j**は芽が伸長しグラム陽性物質が移行しつつあるように見え, 母細胞にグラム陽性物質が多少とも存在する状態のものである. **k**は芽に隔壁が形成され, しかも母細胞に多少ともグラム陽性物質が存在する. **l**は第2番目の芽にグラム陽性物質が多量に存在し, 母細胞にも多少移行してみえるものである. なお**f**および**l**以降はいわゆるプロトプラストの再生と関係なく, 全菌の集落形成の過程と同じである. なお**f**および**l**以後になっても母細胞はすべてグラム陰性をしめした.

また, 図1のような各細胞の分布度の計算にあたっては, 各培養条件について, 300~500個の細胞を観察し, 実験成績としてまとめた.

2. Stabilizing medium 中のプロトプラストの再生過程にみられる形態変化とグラム反応

(1) 0.75M食塩加天然培地を用いた場合

図2にみられるように, 培養0時間のプロトプラスト

図2 0.75M食塩加天然培地で再生中のプロトプラストにみられる形態およびグラム反応の経時的変化

○: グラム陰性野 ●: グラム陽性野

は100%グラム陰性であった. **a**型の細胞は培養時間がすすむにつれて次第に少くなり, 培養9時間で約20%になった. 培養4時間頃には**b**型が30%, **c**および**d**の型が25%となった. **b**の型はその後数が減少したが, **c**および**d**のものは数を増し9時間では70%近くになった. 一方**g**, **h**および**i**などの型の細胞は, 培養0時間には全く存在しなかった. その後この細胞は各培養時間において少しずつ現われたが, いずれも数%に過ぎなかった. 従って0.75M食塩加天然培地中では, 細胞は主に**a**, **b**, **c**, **d**の再生過程とグラム反応をしめすと考えられた.

(2) 0.75M食塩加人工培地を用いた場合

福井, 太田ら(1973)¹⁴⁾によれば, プロトプラストの初期の再生には培地にアミノ酸を加える必要はなく, 糖質を加えることが重要であると報告している. この知見にもとづいて, アミノ酸を加えたものと加えない培地における再生細胞のグラム反応をみた. 図3にしめすよう

図3 0.75M食塩加人工培地で再生中のプロトプラストにみられる形態およびグラム反応の経時の変化

□: 0.75M食塩加1%ブドウ糖ツアベックミネラル培地 (リポ酸を含む)

▨: 上記培地に0.4%アスパラギン添加培地

○: グラム陰性野 ●: グラム陽性野

に, SCDGおよびSCDGA培地中における再生細胞は, 6時間目までは, SCDGにあっては100%**a**型の細胞である. SCDGAでは**c**および**d**型のグラム陽性物質をもった細胞がごく少数含まれる. しかし14時間目になっても, この型の細胞は10%にすぎない. また, **g**, **h**および**i**型の細胞も数%にすぎずこの型のものはSCDGの中にも少数みられた. 結局, 培地にアミノ酸を加えても加

えなくても、再生細胞のしめすグラム反応に差はなく、アミノ酸のグラム染色に及ぼす影響はみられなかった。

3. 浸透圧変動に抵抗した再生細胞の第2回目の培養中にみられる形態変化とグラム反応

0.75M食塩加天然培地に3.5および5時間培養した試料を、蒸留水による処理後、0.75M食塩を除いた培地におきかえて経時的に観察した。

図4にしめすように、第1回培養3.5時間のものでは、

図4 第1回培養3.5時間後 蒸留水処理し、第2回培養中にしめす再生細胞の形態およびグラム反応の経時的変化

○：グラム陰性野 ●：グラム陽性野

a型は75%存在したが、つぎの2時間目には急激に減少し15%になった。そしてcおよびd型の細胞は0時間で約7%に過ぎなかったが、2時間後には約35%現われた。g型の細胞は0および2時間目にも数%しかみられなかったが、h型は2時間後12%となり、さらに同時間にiおよびj型が25%をしめ、4時間目にはkおよびl型が65%を占めた。つぎにeとfおよびkとlは、すでに隔壁を形成しさらに第2番目の芽を出していることもある。しかもこれ以後の再生は全菌の集落形成と変らずプロトプラストの再生にはほとんど関係がない。プロトプラストの再生は、初期段階が興味になるので、e, f, kにおよびlを除いた他の細胞についてその分布度をみた。図5に見るようにhおよびiの細胞が培養2および4時間目にbおよびcと同率かまたはそれ以上に出現している。また図2および3と比べても、hおよびiは多く出現している。このことから0時間のa型細胞の相当数は食塩を除いた培地になると、g, hの方に移行

すると考えられる。

図5 第1回培養3.5時間後 蒸留水処理し、第2回培養中にしめす再生細胞の形態およびグラム反応の経時的変化

(図4のe, f, kおよびl細胞をのぞいて)

○：グラム陰性野 ●：グラム陽性野

図6は0.75M食塩加培地中で5時間培養され、その後食塩を含まない培地で第2回目の培養をされた再生細胞である。a型細胞はこの時間では35%しかなく、むしろ

図6 第1回培養5時間後、蒸留水処理し、第2回培養中に再生細胞のしめす形態およびグラム反応の経時的変化

○：グラム陰性野 ●：グラム陽性野

図7 第1回培養5時間後、蒸留水処理し、第2回培養中にしめす再生細胞の形態およびグラム反応の経時的変化

(図6のe, f, kおよびlを除いている)
○: グラム陰性野 ●: グラム陽性野

c, d, e, f および i, j の細胞が多くみられる。しかも2時間目には c, d および e, f が多くなっている。これらのことから考えるとこの条件ではこのような再生方法とグラム反応が主流となっている。図7は図5と同様にして e, f, k および l 型のものを除いて、分布度を計算したものである。この培養のはじめには a 型は38%, d 型は30%みられ、2時間後は d 型が50%に達している。また c 型もはじめから 7% みられる。一方 g, h, i および j も少数ながらみられる。図5では0時間で全く見られず、むしろ b および c がみられたが、図7では d は0時間で30%存在した。また図5では h および i が2および4時間で増加し、さらに j が d より多くなっている。結局、stabilizing medium 中での培養3.5および5時間のものとくらべると、stabilizing medium に長くおいた細胞ほどグラム陽性物質の出現が遅れ、早期に食塩をのぞくとグラム陽性物質がより早く現われるように思われた。

4. カタツムリ腸管酵素処理菌のグラム反応

短時間、カタツムリ腸管酵素処理した菌には、位相差顕微鏡下一見 intact な細胞壁がみられる。このような部分的消化処理菌は、細胞壁に囲まれており細胞壁はすぐ修復可能と考えられる。この状態のものが再生途上でどのようなグラム反応をしめすかは興味深いと考え実

験した。図8にみるように0時間では、BおよびD型の細胞ばかりであった。Bは細胞の両端がグラム陰性であり、Dは細胞全体がグラム陽性である。これらは同じような時間的経過をたどり、減少し、4時間目には両方とも5~10%になり、その後次第に数を増した。一方、A型(グラム陰性)およびC型(グラム陽性顆粒のあるもの)は0時間ではみられないが、2時間目に出現し、4時間目で最高の40~50%に達し、6時間目には減少し、8時間以後は全くみられなかった。このことからすべての細胞は1度グラム陰性となり、再び陽性となると考えられる。

小 括

プロトプラストの再生過程における形態とグラム反応の変化を観察し、つぎの結果をえた。

1. プロトプラストはグラム陰性のまま芽を出し、芽の中心部にグラム陽性物質が出現する。それは次第に芽に充満し、芽に隔壁が形成されると、母細胞はグラム陰性、娘細胞はグラム陽性となった。このような形態とグラム反応をしめす再生細胞が主流を占めていた。一方、少数の再生細胞においては、その中心部にまずグラム陽性物質が出現し、次第に充満した後に芽を出した。その芽の伸長にともない、グラム陽性物質が芽に移行し、隔壁形成後は娘細胞はグラム陽性で、母細胞はグラム陰性の部分が多いが、グラム陽性物質が多少なりとも存在していた。しかしこの母細胞のグラム陽性物質は、第2番目の芽の伸長にともなって移行し、結局母細胞は陰性となった。しかも、第1回培養の0.75M食塩加培地における培養時間が短いものほど、後者の再生過程とグラム反応をしめすものが多いように思われた。

2. プロトプラストの再生の初期には、培地に糖を加えることが重要で、アミノ酸は加えなくてもよいという知見(福井・太田1973)¹⁴⁾から、これらの培地を用いて再生細胞のグラム反応を観察した。その結果、培地にアミノ酸を加えても、加えなくても、再生細胞のしめす形態およびグラム反応に差はみられなかった。

3. カタツムリ腸管酵素で細胞壁を部分消化された菌は、0.75M食塩加培地中での培養にともなって、グラム陽性から陰性となり、ついで次第に菌体中にグラム陽性物質が現れて、再びすべての菌はグラム陽性となった。この現象はプロトプラストの再生過程にみられた。グラム陽性物質が顆粒状に現れて時間的経過をたどって細胞に充満されてゆくという現象が、全菌でも同様であることをしめすと考えられた。

図8 カタツムリ腸管酵素処理菌の再生中にみられるグラム反応の経時的变化

■ : グラム陽性野 □ : グラム陽性顆粒を有するもの
 □ : グラム陰性野

実験Ⅲ グラム染色された *G. candidum* の電顕的観察

Tchan (1963)¹⁵⁾ は、グラム陽性菌にグラム染色をほどこしてエポキシ樹脂で包埋し、電顕的に観察した。それによるとグラム染色により、菌の細胞質内は一様にそまると報告している。著者も本菌について上記同様の実験を試みた。

実験方法および実験結果

G. candidum は 30°C、3.5 時間振盪培養し、*S. aureus* は 37°C で 1 時間培養して実験に用いた。固定はケ

レンベルガー緩衝液に 6% の割合にグルタルアルデヒドを加えて、約 1 時間行なった。ついで、クリスタル紫染色、およびルゴール媒染し、純アルコールで脱色した。これらの処理はすべて遠沈による集菌でおこなった。電顕試料作製には型のごとく脱水、樹脂包埋した。しかし、この脱水および樹脂包埋の各処理で菌は脱色され、重合した時点で細菌中には色素は全く存在しなかった。そこでいろいろ工夫したが、ほとんど失敗に終わった。ただ、次の操作は脱色されにくいことがわかった。すなわち、脱色後の菌を、濾紙の上に広げ熱風で乾燥、ついでこの菌をあらかじめ半重合させたメサクリレート樹脂に入れて、2～3 時間で急速に包埋した。結局脱水処理は

しなかった。このようにして出来たのが図9に示す電顕像である。細胞壁の存在は明らかであるが、細胞内部構造はほとんど電顕的に無価値である。しかし、細胞壁(CW)および隔壁(S)にそった矢印の部分、および細胞壁外側の矢印の部分には、色素顆粒らしきものが多く存在している。この顆粒の存在はかりうじて光顕でもみとめられた。しかし、*S. aureus*はこの操作によって、完全に脱色され、不成功に終わった。

図9 グラム染色された *Geotrichum candidum* の電顕像
矢印：クリスタル紫の色素らしき物質
CW：細胞壁
S：隔壁

小 括

電顕的にグラム染色で細胞が染色されている状態を観察しようとして、種々試みたが、ほとんど失敗に終わった。ただ脱水処理せず、脱色後直ちに乾燥させ、半重合のメサクリレートで短時間で重合させた *G. candidum* においては、その細胞質に色素顆粒らしきものがみられた。その顆粒は細胞壁の内外および隔壁にそって存在し

た。

考 察

真菌のプロトプラストは再生の早期に、低浸透圧に抵抗する osmoresistant barrier を作ると Fukuiら(1969)⁸⁾、Ota(1972)³⁾は報告した。真菌の細胞壁成分はグルカン、マンナン、ガラクトン、セルロースおよびキチン、さらに蛋白質および脂質などからなり、これが菌種により種々の割合に含まれている(Rogers and Parkins, 1968)¹⁶⁾。福井、太田(1973)¹⁴⁾は本菌の細胞壁の主な構築はキチン(松岡(1969)¹⁷⁾であり、osmoresistant barrier はグルカンと考えている。本実験では osmoresistant barrier を作った細胞はグラム陰性であり、芽を出した細胞も、ほとんどがグラム陰性であった。このことから考えると、この osmoresistant barrier は、グラム染色機序に関与しないと考えられる。グラム染色機序を説明する3つの学説の中、最も有力と考えられているものに、外表説がある。それによると細菌の細胞壁そのものはグラム染色によって染色されない(Bartholomew and Finkelstein, 1958)¹⁸⁾が、細胞壁に染色機序に関与する物質があると考えている。その物質のうち、最も有力視されているのは、magnesium ribonucleate(Bartholomew and Umbreit, 1944)⁶⁾である。グラム陽性菌を蛋白分解酵素 ficin、リゾチーム、sodium hypochlorite および塩酸などで処理し、細胞壁構成成分を部分的に溶解すると、菌はグラム陰性となる、しかし、sodium ribonucleate および magnesium chloride で菌を処理し magnesium ribonucleate を作らせると、グラム陰性のものが、再びグラム陽性となることを Normore and Umbreit(1965)⁷⁾は報告した。また、Neisseria も magnesium ribonucleate により陽性となり(Bartholomew, 1946)¹⁹⁾、さらに *E. coli* も DNA を与えるとグラム陽性となる(Baker and Bloom, 1946)²⁰⁾という報告もある。しかしこれらの現象は果してグラム染色機序の本質であろうか。本実験でグラム陽性の *G. candidum* をプロトプラストにしたとき、グラム陰性となり、再生したときグラム陽性となった。本菌が細胞壁を失なったことによってグラム陰性となることは、その機序が細胞壁に存在することを強く示唆すると考えられる。しかし、これらグラム陽性菌が細胞壁またはその成分の欠損によりグラム陰性となる現象や、グラム陽性菌と陰性菌の細胞壁成分に差があること(Salton, 1963)⁹⁾などを直ちにグラム染色機序に結びつけられるほど、その機序は簡単ではない。本実験では

グラム陽性物質は、osmoresistant の細胞の中心からか、芽の中心から現われ、次第に経時的に増加してゆくのが観察された（図 2, 3, 4, 5, 6, 7）。また部分的に細胞壁を消化処理した全菌は、全体がグラム陽性のもので、および尖端だけが陰性化したものとの 2 種類がみられた（図 8）。しかし 0.75M 食塩加培地中の再生において、これら 2 つの型の細胞は、すべて陰性化し、ついで菌体内にグラム陽性顆粒が出現し、次第に菌全体がグラム陽性となった。この 2 つの型のうち、最初菌全体がグラム陽性であったものまでが、一旦陰性化する現象は、何を意味するのであろうか。この菌は細胞壁がカタツムリ腸管酵素で処理されても、菌全体がグラム陽性に染色されている。したがって細胞壁にグラム染色機序に関係する物質が存在すると仮定しても、この菌はその機序に参与する物質は失なわれていないことになる。それにもかかわらず、これらの菌はすべて一旦陰性化して、再び経時的に陽性となった。これはグラム反応の機序を考える上で、メタボリズムまたは菌の生理的狀態を充分考慮にいれなければならぬことを示唆すると考えられる。真菌は細菌にくらべて大型であり、しかも細胞内に複雑なオルガネレが存在するので、細菌とはその機序を同一視できないかもしれない。しかし、デフテリア菌（Christensen, 1949）²¹⁾ およびその他抗酸菌（Knaysi, Hillier, Fabricant, 1950）²²⁾ などでもグラム強陽性の部分や顆粒が報告されている。いずれにしても、本実験結果から考えると、グラム染色機序の解明には、菌の生理條件を充分考慮する必要があると思われる。つぎに細胞のどの部分が、クリスタル紫によって染まるかも問題である。Bartholomew and Mittwer (1952)¹⁾ および Bartholomew and Finkelstein (1958)¹⁸⁾ はグラム染色により細胞壁は染色されず、細胞質内が染色されると報告している。Tchan (1963)¹⁵⁾ はグラム染色された細胞を電顕的に観察した報告で、細胞質内が一様に染まっているとのべているが、その電顕写真はしめされていない。著者の実験では、脱水処理および樹脂包埋で *S. aureus* は完全に脱色された。しかし *G. candidum* はかろうじて、図 9 にみるような細胞壁近くに色素顆粒らしきものの集合した像をみた。この切片の立体構造を考えると、細胞壁近くに色素が集合していれば菌全体が一様に染まらないでも、グラム陽性にみえるのではないかと考えた。位相差顕微鏡下ではこの包埋された試料はグラム陽性である。このことから真菌のような大型のものは、複雑なオルガネレも存在するので、染色される部位についても、染色機序を解明する上で、考慮されなけれ

ばならない。

結 論

Geotrichum candidum のプロトプラストの再生過程における形態的变化およびグラム反応を観察した。そのためには、まずプロトプラスト再生のための薄層寒天法（Fukui ら, 1969）⁸⁾ を用い、そのグラム染色法を考案した。すなわちプロトプラストを寒天に包埋するさい、*S. aureus* および *E. coli* とともに包埋し、これらをグラム反応の対照菌とした。ついで 0.75M NaCl 加 6% グルタルアルデヒドで 1~24 時間固定した後、グラム染色をほどこした。このグラム染色法は 0.2% クリスタル紫 60 秒、ルゴール 60 秒、脱色 60~90 秒、サフラニン 20~30 秒の処理である。その観察にはグラム陽性をしめす *S. aureus* およびグラム陰性をしめす *E. coli* が存在する場所で、プロトプラストのグラム反応を判定した。結果はつぎの通りである。

1. プロトプラストは確実にグラム陰性をしめた。
2. 再生中のプロトプラストは、グラム陰性のままで芽を出し、その中心部から、グラム陽性の物質が出現した。ついで隔壁が形成されると娘細胞はグラム陽性、母細胞はグラム陰性となった。このことから考えると、再生のはじめに作られる osmoresistant なグルカンの壁（福井、太田, 1973）¹⁴⁾ はグラム染色機序に関与しないと考えられた。また極めて少数であるが、円形の再生細胞の中心にグラム陽性の物質が現われ、次第に充満して、芽を出すものもみられた。しかしこの母細胞も第 2 番目の芽を出してから、グラム陰性となった。
3. カタツムリ腸管酵素で短時間処理された *G. candidum* は、菌糸型を保ち、細胞全体がグラム陽性であった。これを 0.75 M NaCl 加天然培地で培養すると、この細胞のグラム反応はつぎのようであった。すなわち、グラム陽性のはグラム陰性化し、ついでグラム陽性顆粒が現われて、再び菌全体が、グラム陽性となった。以上 2 および 3 の現象からみて、グラム染色機序の中心を細胞表層に求めるだけでなく、細胞質の生理条件およびメタボリズムを充分考慮しなければ染色機序は解明されないと考えた。
4. グラム染色された *G. candidum* を電顕的に観察しようとして、試料作製を試みた。しかし、その操作の間に色素はほとんど脱色され、普通の電顕的試料作製方法では不可能なことがわかった。

本研究について貴重なご指示およびご校閲を賜った徳島大学医学部細菌学教室吉田長之教授、福井公明および太田房雄両博士にあつく謝意を表します。

引用文献

1. Bartholomew, J. W. and Mittwer, T. : The Gram Stain, Bact. Rev. 16 : 1—29, 1952.
2. Stearn, E. W. and Stearn, A. E. : The Chemical Mechanism of Bacterial Behavior, II. A New Theory of the Gram Reaction. J. Bacteriol. 9 : 479—489, 1924.
3. Kaplan, M. L. and Kaplan, L. : The Gram Stain and Differential Staining, J. Bacteriol. 25 : 309—321, 1933.
4. Churchman, J. W. : The Structure of *B. anthracis* and the Reversal of the Gram Reaction, J. Exp. Med. 46 : 1007—1029, 1927.
5. Churchman, J. W. : Gram Structure of Cocci, J. Bacteriol. 18 : 413—430, 1929.
6. Bartholomew, J. W. and Umbreit, W. W. : Ribonucleic Acid and the Gram Stain, J. Bacteriol. 48 : 567—578, 1944.
7. Normore, W. M. and Umbreit, W. W. : Ribonucleates and the Gram Stain, J. Bacteriol., 90 : 1500, 1965.
8. Fukui, K., et al. : Analytical Studies on Regeneration of Protoplasts of *Geotrichum candidum* by Quantitative Thin-Layer-Agar Plating, J. Bacteriol. 98 : 256—263, 1969.
9. Salton, M. R. J. : The Relationship between the Nature of the Cell Wall and the Gram Stain, J. gen. Microbiol. 30 : 223—235, 1963.
10. Scherrer, R. : Cell Structure and Quantitative Gram Stain of *Bacillus megaterium*, J. gen. Microbiol. 31 : 135—145, 1963.
11. Benians, T. H. C. : Observations on the Gram Positive and Acid fast Properties of Bacteria, J. Path. Bacteriol. 17 : 199—211, 1912.
12. Benians, T. H. C. : A Further Investigation into the Principles underlying Gram's Stain, with Special Reference to the Bacterial Cell Membrane, J. Path. Bacteriol. 23 : 401—412, 1920.
13. Ota, F. : Magnesium-stimulated Resynthesis of Osmoresistant Layer by *Candida albicans* Spheroplasts, J. J. M. 16 : 359—371, 1972.
14. 福井公明, 太田房雄ら : 真菌細胞プロトプラストの再生過程からみた細胞表層の機能構造, 日細誌 28 : 258, 1973.
15. Tchan, Y. T. : Site of Gram Stain in Cells of Gram-positive Microorganisms, Nature 198 : 213—214, 1963.
16. Rogers, H. J. and Parkins, H. R. : Cell Walls and Membranes, p135—160. E. & F. N. Spon Ltd., London, 1968.
17. 松岡利郎 : *Geotrichum candidum* 細胞壁に対する Snail Enzyme の影響, 四国医誌 25 : 416—426, 1969.
18. Bartholomew, J. W. and Finkelstein, H. : Relationship of Cell Wall Staining to Gram Differentiation, J. Bacteriol. 75 : 77—84, 1958.
19. Bartholomew, J. W. : Gram Positive Characteristics of the Neisseria, J. Bacteriol. 51 : 584—585, 1946.
20. Baker, H. and Bloom, W. L. : Further Studies on the Gram Stain, J. Bacteriol. 56 : 387—390, 1948.
21. Christensen, W. B. : Observation on the Staining of *Corynebacterium diphtheriae*, Stain Technol. 24 : 165—170, 1949.
22. Knaysi, G., Hillier, J. and Fabricant, C. : The Cytology of an Avian Strain of *Mycobacterium tuberculosis* Studied with the Electron and Light Microscopes, J. Bacteriol. 60 : 423—447, 1950.