原 著

真 菌 の 核 分 裂 に 関 す る 研 究

1. 核 染 色 法 に つ い て

Cytological Studies on the Nuclear Division of Yeasts

1. Comparative Studies on the Cytological Procedures

高 橋 満 *
Mitsuru TAKAHASHI

緒 言

微生物の核染色は組織切片の場合と異り、細胞表面に存在する物質による Masking effect の為、通常の Giemsa 染色, Wright 染色, Haematoxylin-Eosin 染色等では良い結果が得られない。最も普遍的に用いられるのは、Piekarski, Robinow 等によつて始められた Feulgen 反応の変法で本邦でも広く用いられている (1-8)。

これは塩酸又は過塩素酸⁹⁾ 処理によつて、表在性の Masking substance を除いてから、塩基性色素で染める方法であり、用いる色素には多少の差異があつても、方法としては先ず同一の範疇に属するものである。又この場合の Masking substance は RNA であるというのが通念となつている。

併しながら、真菌においては、この染色法では必ずしも良好な結果が得られるとは限らない。その理由は明らかでないが、一般的な酸処理だけでは不十分な場合もあり、先人の記載でも真菌の核染色には、多少の修飾を加えた方法が行われている^{10) 11) 12)}。

更に染色においては、標本作製から固定、染色、封入に至る迄の全操作の一つ一つが検討されなければならないが、組織切片の染色法が細かい点まで検討されているのに反し、微生物の染色では、充分検討されているとは言難い。

著者は真菌の核分裂に関する研究の一環として、先ず、染色法の検討を行つたので、ここに報告する。

実験材料及び実験法

使用菌株は *Saccharomyces cerevisiae* 3株, *S. fragilis*, *S. rouxii*, *Hansenula anomala*, *H. saturnus*, *H. schneeggii*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Candida albicans* 各1株, 及び *C. robusta* 2株合計12株で、その由来は表1に示す。使用培地は主として Wickerham

Vegetation Medium を用い、各菌株とも、斜面培地に18~20時間培養したものを平板培地に植え、5~20時間培養後標本作製に供した。標本作製は impression⁹⁾ 又は塗抹により、impression の場合は直ちに固定に移り、塗抹の場合はふらん器中で乾燥してから固定した。

固定剤は99% Alcohol, Bouin 液¹³⁾, Carnoy 液¹³⁾, Schaudinn 液¹⁴⁾, Zenker 液¹³⁾, Stieve 液¹³⁾, Helly 液¹⁴⁾, Carnoy's acetie alcohol¹³⁾ の8種を用い、表2の様に操作した。いずれも組織標本の場合に、核染色又は核酸の染色に用いられるものの中から選んだものである。

効果の判定は各固定剤による固定標本に、酸フクシン単染色及び DeLamater 染色を施し、1) 細胞の変形、2) 被染性、3) 核所見の諸点を比較して行つた。

核染色には、次の諸法を用いた。

A. DeLamater¹²⁾ の記載に準じたもの。

1. 固定 Alcohol 単独の場合は10分間処理後流水で約10分間水洗し、ふらん器内で乾燥し、Schaudinn 液又は Bouin 液の場合には、10分間処理した後更に Alcohol に移して、10分放置し、流水で10分間水洗して乾燥した。
2. 加水分解 NHCl (60°C) 又は HClO_4 (4°C) を用い、処理時間は表3に示す。
3. 媒染 2% Formalin 4分。
4. 染色 水洗してから 0.5% Fuchsin 水溶液 (0.04N になる様に HCl を加える) で30分間染色 (室温)。
5. 水洗 流水で約5分。

B. HCl -Giemsa 法。

Schaudinn 固定標本について上記 A と同様に処理し、染色を5倍稀釈 Giemsa 液で行つた。(Formalin 処理を除く)。

C. HCl -Wright 法。

同上。但し、Wright 液は2~3の成書の記載に従つて調製しても、収量極めて少く、実用に供し

* 順天堂大学医学部細菌学教室
1958年2月10日受付

表 1

菌 名	株 名	由 来
<i>S. cerevisiae</i> Hansen	IFO, 0209	Wehmer, 1941
<i>S. cerevisiae</i> Hansen	IFO, 0635	Lindegren, 14854 α , 1954
<i>S. cerevisiae</i> Hansen	IFO, 0637	Lindegren, 8256a, 1954
<i>S. fragilis</i> Jörgensen	IFO, 0541	LM, 1941
<i>S. rouxii</i> Boutroux	IFO, 0494	GIB, 1946
<i>H. anomala</i> (Hansen) H. et P. Sydow	IFO, 0122	FAT, 1942
<i>H. saturnus</i> (Klöcker) H. et P. Sydow	IFO, 0117	CL (Java 708-z), 1941
<i>H. schneeggii</i> (Weber) Dekker	IFO, 0135	LM, 1946
<i>Sc. ludwigii</i> Hansen	IFO, 0339	IFG, 1946
<i>C. albicans</i> (Robin) Berkhaut	ATCC, 10259	Harvard University
<i>C. robusta</i> Diddens et Lodder	IFO, 20718	IBL, 1955
<i>C. robusta</i> Diddens et Lodder	IFO, 20735	LM, 1955

註 LM : Laboratorium voor Microbiologie, Delft.
 GIB : Brewing Experimental Station, Tax Administration Agency, Tokyo.
 FAT: Faculty of Agriculture, Tokyo University.
 CL : Carlsberg Laboratorium, Copenhagen.
 IFG : Institut für Gärungsgewerbe, Berlin.
 IBL : Instituto Botanico, Faculdade de ciencias de Lisboa.
 IFO : Institute for Fermentation, Osaka.

表 2

	固 定 剤	固 定 時 間	後 処 理	水 洗
I	Alcohol	15 分		
	Bouin 液	15 分	70% アルコール 40 分	over night
	Carnay 液	15 分		
	Schaudinn 液	over night	70% アルコール 30 分	over night
	Zenker 液	over night		over night
II	Alcohol	10 分		
	Bouin 液	10 分	70% アルコール 10 分	10 分
	Carnoy 液	10 分		10 分
	Schaudinn 液	10 分	70% アルコール 10 分	10 分
	Zenker 液	10 分		10 分
	Stieve 液	10 分	95% アルコール 10 分	10 分
	Helly 液	10 分		10 分
	Acetic Alcohol	10 分		

難いので、次の方法で調製し、対照として市販品を用いた。

Wright 液製法

1. Methylen blue 1.0g
水 100cc
2. Na₂CO₃ (無水) 0.5g
水 100cc

3. Eosin 0.5g
水 300cc

1, 2, 3. をこの順序で加えて混和し、暫時放置後、炭末を0.5%に加えてよく振盪し、しばらくして濾紙 (Toyo No. 2) で濾し、デシケーターで乾燥後沈澱を集めて CH₃OH に溶かす。CH₃OH は総量 150cc を2~3 回にかけて用いる方

表 3

菌 株	N HCl (60°C)	10% HClO ₄ (4~6°C)
<i>S. cerevisiae</i> 0209	4 ~ 6 分	24 時 間
<i>S. cerevisiae</i> 0635	30分以上(不定)	72 時 間 以 上
<i>S. cerevisiae</i> 0637	30分以上(不定)	72 時 間 以 上
<i>S. fragilis</i> 0541	4 ~ 6 分	24 時 間
<i>S. rouxii</i> 0494	6 ~ 8 分	
<i>H. anomala</i> 0122	6 ~ 8 分	
<i>H. saturnus</i> 0117	8 分	
<i>H. schneeggii</i> 0135	4 分	
<i>Sc. ludwigii</i> 0339	15分前後(不定)	48時間(不定)
<i>C. albicans</i> 10259	3 ~ 4 分	24 時 間
<i>C. robusta</i> 0718	15分前後(不定)	
<i>C. rabusta</i> 0735	15分前後(不定)	

が良い。これを原液とし、使用に際し原液の1/2~1/3量にグリセリンを加えて使用した。

染色にはグリセリン加 Wright 液で5分間染め、そのまゝ水を加えて蛍光を発せしめ、15分間おいて水洗した。

D. Wright 液単独染色

上記グリセリン混液で、HCl 又は HClO₄ 前処置を行わずに染めた。染色法は C に用じ。

E. Pyronin-Methylgreen 染色

吸湿ピロニン約 0.2g をブタノールにより精製¹²⁾し、乾燥全量に水 50cc を加えて Pyronin 液を作り、30分染色し、更に 0.3% Methylgreen 水溶液(クロロホルムで不純色素を除去したもの)で30分染め、ブタノールで分別した。尚固定には Schaudinn 液を用いた。

F. Pepsin 消化法

Alcohol 固定標本を水洗後、直ちに Pepsin 消化液に入れ、37°C 30分及び60分間消化し、水洗後酸フクシン(Aに同じ)で30分染めた。Pepsin 液は 0.01M phosphate buffer (pH 7.6) 180cc に NHCl 20cc を加え、これに粉末 Pepsin (ミク=化学 1:5000 濃ペプシン) 0.2g を溶かして作製した¹³⁾。

結果及び考案

1. 固定剤の効果

組織切片については、固定剤の適否は、その後の染色法と関連して良く知られており、成書の記載も多い。しかし微生物学の分野では、火焰固定が一般に行われる以外、どの染色にはどの固定法をという問題は余り検討されていない。この報告では、核染色に対する種々の固定液

の効果を比較したのであるが、*Saccharomyces fragilis* 及び *Hansenula schneeggii* では、どの固定剤でも細胞の変形は或程度避け難く、一般に細胞の収縮をきたす。この現象は殊に細胞の集団における個々の細胞の境界でよく見られる(写真1)。

次に被染性はどの固定液でも良く保持され、適度に染まっているが、Helly 液は、細胞の内外に微細な沈澱物を伴い易く(写真2)、標本が汚れる傾向がある。しかし同じく重金属塩を含有していても Schaudinn 液、Zenker 液、Stieve 液では、このような現象は見られなかつた。核染色像の上では、Bouin, Carnoy, Schaudinn 及び Zenker の各固定液が、安定した成績を示し、細部の観察にも満足すべき結果を得た(写真3~6)。Alcohol, Acetic alcohol, Stieve は細部の観察には稍不適當であり、Helly は沈澱を伴う為結果が悪い。又各固定剤の処理時間は、表2に従つて検討した結果、いづれも大差なく、固定剤 10分, Alcohol 10分(Schaudinn, Bouin 及び Stieve の場合)水洗 10分で充分効果がある。

2. 各種核染色法の比較

DeLamater 染色では、常に安定した標本が得られ、真菌類の核染色として優れた方法である事を認めたが、2% Formalin による媒染処置は、省略しても結果は全く同一であり、特に必要なものとは認め難い。又加水分解は、塩酸、過塩素酸の何れを用いても同じ結果が得られるが、*Saccharomycodes ludwigii* その他 2, 3 の菌株では所謂 Masking substance の除去が困難で、核所見の観察が充分に出来なかつたものがある。

HCl-Giemsa, HCl-Wright 染色は DeLamater 染色と略同様の結果が得られたが、HCl-Wright 染色は標本の色調が稍淡すぎる感がある。Wright 単染色も同様であつたが、上記 Masking substance の除去不完全な試料における核所見の観察に便利であつた。

Pyronin-Methylgreen 染色は一般細菌の場合と同様 Methylgreen の着染が極めて悪く、routine work に用いるのには不適である。著者は特に Masking substance の検討に用いたのであるが、上記 DeLamater 染色その他において Masking substance の除去し難い菌株(*S. cerev.* 0635, 0637, *C. rob.* 718 A, 735 B, 及び *Sc. ludwigii*) に本染色法を行うと、加水分解後は Pyronin に対する被染性は全く失われ、Fuchsin, Giemsa 等には染るが Pyronin に染らないものが、Masking effect を持っているという結果になつた。従つて、これらの菌株では普通微生物の場合に考えられているように RNA だけが核構造を被っているのではな

く、RNA 以外に未知の物質が細胞膜又は細胞質中に存在し、酸処理では RNA は除かれるが、この未知の Masking substance は除去されず、結果として核構造の観察に支障を来すことになる。

この未知の物質を追究する為に、更に Pepsin 消化法を試みたわけであるが、30 分消化標本では著明な変化はみられず、細胞内に顆粒構造が現れる程度で、核所見は依然不明瞭である。60 分消化標本では、細胞質も核も染らなくなり、僅かに細胞膜だけが淡染し、2 重構造が認められた。従つてこれら諸菌のもつ RNA 以外の Masking substance は蛋白質である事が推定される。

結 論

数株の真菌について固定法及び核染色法の比較検討を試み、次の結論を得た。

- 1) 固定剤は Alcohol, Bouin 液, Carnoy 液, Schaudinn 液, Zenker 液, Stieve 液, Helly 液及び Carnoy の Acetic Alcohol の中 Bouin 液, Carnoy 液, Schaudinn 液が安定した固定効果を示した。固定時間は固定液 10 分、アルコール処理 10 分（固定液の種類により省略する事もある）、水洗 10 分で充分であった。
- 2) 染色には微細構造の観察の為には特に DeLamater 法が優れているが、2% formalin 処置は不要であり、又固定は必ずしも Schaudinn 液でなくてもよい。
- 3) 12 株中 5 株に 塩酸又は 過塩素酸処理で除去出来

ない、Masking substance を認めた。本物質の存在は Species には無関係で、培養条件に左右される。又本物質は明らかに RNA とは異なるが、或種の蛋白質であると思われる。

稿を終るに臨み御懇切なる御指導と御校閲を賜つた土屋教授及び上条助教授に深甚なる謝意を表す。併せて教室員各位の御助力を感謝致します。

本論文の要旨は、第 12 回日本細菌学会関東支部総会に発表した。

文 献

- 1) 上条清明：日本細菌学雑誌，8(7)，747，1953.
- 2) 上条清明：日本細菌学雑誌，8(8)，795，1953.
- 3) 上条清明：日本細菌学雑誌，9(2)，129，1954.
- 4) 上条清明：日本細菌学雑誌，9(3)，193，1954.
- 5) 上条清明：日本細菌学雑誌，9(4)，253，1954.
- 6) 上条清明：日本細菌学雑誌，9(5)，305，1954.
- 7) 秋葉朝一郎，上条清明：科学，23(9)，459，1954.
- 8) 高橋満，川北祐幸，上条清明：日本細菌学雑誌，12(4)，297，1957.
- 9) Cassel, W.A.: J. Bact., 59, 185, 1950.
- 10) 秋葉朝一郎：私信
- 11) Mundkur, B.D.: J. Bact., 68(5)，514，1954.
- 12) DeLamater, E.D.: J. Bact., 60, 321, 1950.
- 13) 市川牧：細胞化学，本田書店，東京，1953.
- 14) Lillie, R.D.: Histopathologic Technic and practical Histochemistry, Blakiston Co. Inc. N.Y., 1954.

Summary

Effects of fixation and nuclear staining methods for yeasts were studied comparatively.

Test strains were *S. cerevisiae*, *S. fragilis*, *S. rouxii*, *H. anomala*, *H. schneegii*, *H. saturnus*, *Sc. ludwigii*, *C. albicans*, and *C. robusta* shown in table 1.

Results obtained were summarized as follows.

- 1) Buin's fluid, Carnoy's fixative and Schaudinn's fixative were excellent in nuclear staining procedure. Fixation were carried out 10 minutes in each fixative and followed by 70% alcohol treatment for 10 minutes in the case of former two kinds of fixatives. Washing by tap water was found to be enough for 10 minutes. In these procedure any debris seen in the case of Helly's fixative was not found on the surface of the specimen.
- 2) For the observation of the details of nuclei, DeLamater's stain was excellent, but formaldehyde treatment was seemed to be unnecessary.
- 3) In some of the test organisms unknown masking substance, which could not be removed by HCl or HClO₄ treatment was found. For these strains over 1 hour hydrolysis by HCl gave no discernible nuclear configurations, but cells were stained diffusely red by acid-fuchsin. At the same condition, the specimen were not stained by pyronine, which stains specifically RNA.

Pepsin digestion test was carried out by Lillie's technic to these specimen and perfect digestion of the masking substance was resulted.

By the results of the cytochemical studies on the substance, its nature is not RNA and seemed to be protein-like substance.

4) The unknown masking substance was observed in *S. cerevisiae* 0635, *S. cerevisiae* 0637, *Sc. ludwigii* 0339, *C. robusta* 0718 and *C. robusta* 0735.

Department of Bacteriology, Juntendo University, School of Medicine.

写真 1 *H. schneggii*, Carnoy 固定,
acid-fuchsin 染色

写真 2 *H. schneggii*, Helly 固定,
DeLamater's stain

写真 3 *H. anomala*, Schaudinn 固定,
DeLamater's stain

写真 4 *H. saturnus*, Schaudinn 固定,
DeLamater's stain

写真 5 *H. schneggii*, Bouin 固定,
DeLamater's stain

写真 6 *H. schneggii*, Carnoy 固定,
DeLamater's stain