

ジフテリア菌の生存機構

II. Restphase (ovalgranule) の細胞化学的及び電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部細菌学教室(主任: 西田尚紀教授)

寺 本 友 一

(昭和38年1月31日受付)

前報¹⁾で著者はジフテリア菌の孢子形成菌に必敵する強い生存能は、この菌が桿状の vegetative phase からいちやく rest phase を作り得ることによるものであろうと推定した。そして、この rest phase の細胞体制として培養の過程と共に現われ、残存する Gram 陽性の「oval granule」がこれに相当すると述べた。生存力の最もよい環境でこの形が最もよく作られ、したがって主として chocolate 寒天培地上のジフテリア菌を本論文の検索の対象とした。

著者は前報で生存という重要な職能をにない且つ metabolic dormancy をもつと推定されたこの顆粒構造を、従来の細胞化学上の顆粒と区別して特に顆粒体と名付けたが、果して vegetative phase の細胞と異なる特異な体制をもつものかどうかを細胞化学的及び電子顕微鏡的に検討した。

実 験 方 法

使用菌株: 前報で使用した諸菌株を使用した。主として使用された株は金谷株及び RT-17 株であつた。

使用培地: 生存力の強い培地はまた顆粒体を形成するのに好適であつたが、このような培地としては血球寒天培地、chocolate 寒天培地を用いた。また生存力の弱い培地は club-shape 或いは「oval granule」を作る傾向が弱く、その限りでは新鮮菌の形のままで止る傾向があるが、このような培地としては Löffler 培地を用いた。(前報¹⁾参照)。

顆粒体の定義: 判定を容易にするために「新鮮菌の示す Gram 陽性度におとらぬ顆粒構造」とした。したがって大きさは種々の形のものが含まれたが、

(1) 異染小体の数培の大きさに及ぶものは大きければ大きい程 Gram 染色性を失うか或いはマダラ状を呈し、新鮮菌の示す Gram 陽性を基準とすれば区別し得るものであり、これは involution form とし

て除外した。位相差顕微鏡の上では縁辺がみだれ、内容が流出した如く見え、電子顕微鏡所見もこれを裏づけた。

(2) 前報の生存試験の結果、これらの顆粒構造の内、小さなものの方が生存にあずかることが予想された。その大きさはほぼ $0.9 \times 1.2 \mu$ 前後のものをつて細胞化学的分析の対象とした。

染色法:

① Gram 染色

② 異染小体染色 Wachstein-Pisano 染色法²⁾を行つた。

(3) RNA 染色 RNA-ase 消化法³⁾を用いた。同一材料の被検塗抹標本を2個作り、1つを 57°C に保つた 0.1% RNA-ase 液に他の1つを 57°C に保つた生食水に90分浸し 1% Pylonin, 或いは 1% Methyl violet で染色し明らかに脱色のある場合 RNA-染色陽性とした。(RNA-ase 液は pH 6.78 のペロナール緩衝液に溶かした)。

(4) DNA 染色法 2% Methyl green⁴⁾ 法を始め行つた(クロロホルムで methyl violet を抽出して用いた)が、本報では DéLamater⁵⁾ によつて行つた成績について述べる。即ち、純アルコールで20分または OsO_4 vapour で4分以内固定し、 1N HCl で 60°C 、 $6 \sim 7$ 分水解の後 1% ホルムアルデヒドで $2 \sim 4$ 分処理して、 0.3% 塩基性フクシン液で $15 \sim 30$ 秒染色した。前処理の塩酸水解は時として30分、60分、90分と行い、また更に3時間半の場合もあつた。RNAase 処理(前述)後 DéLamater 法を行う方法をも併せ行つた。

(5) Neotetrazolium 塩による生存細胞の同定。

近時細菌細胞の酵素活性をしらべるため Neotetrazolium chloride⁶⁾ が用いられており、本物質環元陽性菌は生菌と見なされている。

On a Mechanism of Survival of *C. Diphtheriae*. II. Light-and Electron-Microscopic Studies on a Rest Phase of *C. Diphtheriae*. Yuichi Teramoto, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, University of Kanazawa.

著者は次の諸種の培地(液体培地及び固型平板培地)に *Neotetrazolium chloride* を加えて、ここに色々の期間培養したジフテリア菌を充分量塗抹し 37°C に保存した。色素の環元は菌塗抹後24時間まで1時間毎に1白金耳ずつ取つて顕微鏡下で観察した、その諸種の培地は

(イ) 1% Glucose 加 Pope 消化ブイオン培地に 0.025% に *Neotetrazolium chloride* を加えたもの、

(ロ) 1% Glucose 加 Pope 消化寒天平板(寒天濃度1.5%)培地に 0.005% に *Neotetrazolium chloride* を加えたもの、

(ハ) pH 7.2 の Sørensen 磷酸緩衝液(M/15)に食塩 0.85%, glucose 1%, *Neotetrazolium chloride* 0.005% に加えて寒天1.5%で固めたもの。

なお後染色としての Ziehl の Carbol fuchsin の30倍稀釈液が最も良好であつた。

(6) 孢子染色法 Wirtz 氏染色法⁸⁾, Conklin 氏染色法⁹⁾, Möller 氏染色法¹⁰⁾, Modified Ziehl-Neelsen 法¹¹⁾を行つた。

熱耐性試験: 約5白金耳の菌を生理食塩水 0.5ml に浮遊し、100°C 5分、58°C、10分、58°C 30分の加熱後 0.3% 炭末加 Pope 消化寒天平板に全量を拡げ、37°C に3日間培養して集落の有無を検した。

光学顕微鏡写真: 使用装置は前報に同じ。

電子顕微鏡写真: 日立製 HU-9 型電子顕微鏡(加圧電圧 50KV)で撮影した。ジフテリア菌は 1% OsO₄ 液に入れ直ちに遠沈洗滌してそのまま観察に供した。直接倍率3000倍で写真を取つた。

ultrathin section としては所定期間培養のジフテリア菌を 1% OsO₄ 溶液で固定した後、25~100% アルコールで順次脱水後、n-Butyl-methacrylate-methyl-methacrylate の中で包埋し JUM-5型 ultramicrotome で切片として直接倍率10,000倍で写真を取つた。

実験成績

実験 I. 顆粒体の細胞化学的検討

Löffler 培地で培養されたジフテリア菌を 25°C で長期保存すると Gram 陽性の「oval granule」を形成することについて述べた。しかし前報で述べた如くこの形の最も形成し易い条件は chocolate 寒天培地及び血球寒天培地であつた。この培地は菌を生存させる力も強く且つ菌の生存と「oval granule」の存続の消長はよく一致したから、これが保存形の最もよい形であると考え chocolate 寒天培地及び血球寒天培地上の菌もジフテリア菌の耐久形として検討することとした。

(1) Gram 染色法

陳旧な培地で且つジフテリア菌の生菌が残存している培地であるならば、殆んどの場合図 1 (図 2 に模式図で示した) のように大小不同の club-shape—その中では図 2 (a) はなお Gram 強陽性であるが、図 2 (b) は Gram 陰性化している—が存在すると共に、図 2 (c) の如く Gram 陽性強の「oval granule」をも見ることが出来る。前報で述べた如く、菌の生存力はこれらの club-shape のものより図 2 (c) の如きはるかに小さなものと関係すると推定された、この考えは更に諸種の染色法、電子顕微鏡所見、位相差顕微鏡所見より確かめられた。後述するようにこれらの所見を総合してこの異常に大きな club-shape の菌は involution form と極めて似た大きさと形をもっているから、これに至る前段階と考えられる。

図 1 はジフテリア菌が pleomorphic の形を取ることを示す最も普通の現象を示すが、これらの種々の形の消長は chocolate 寒天培地のみでなく、Löffler 培地、血球寒天培地にも見ることが出来る。その消長は次のように要約し得る。

(イ) 各培地共、25°C で保存されるより、37°C で保存される方が「oval granule」及び club-shape の形成は早く且つ involution form への変化も早い。

(ロ) Löffler 培地の「oval granule」成いは club-shape の形成は他の chocolate 寒天培地 或いは血球寒天培地に比べて早く、且つ一たん形成されると保持されずに更に膨隆化する傾向が強い。

(ハ) したがって Löffler 培地では 25°C で平均 9.7 カ月にわたつて「oval granule」を保持し得ても(この際、生存期間は平均 9.8ヶ月)、37°C では 3~7 日目までは「oval granule」及び club-shape を豊富に作りつつ、それ以後は各々膨隆を続けて20日目では遂に Gram 陽性の club-shape も「oval granule」も認めることは出来なくなる。(生存は平均カ2.5月にすぎない)。

(2) 異染小体染色法

ジフテリア菌の異染性が metaphosphate の polymer に起因するものであることは今日異論がない。Wachstein-Pisano の磷酸イオンの検出を目的とした異染小体染色法はこの意味で合理性をもっている。

図 3 に chocolate 寒天培地 37°C、20日培養の club-shape 及び「oval granule」の Wachstein-Pisano 染色像を示した。ここには全く磷酸イオンの蓄積を認めることは出来なかつた。このことは9株のジフテリア菌を用いて1日目から20日目まで観察することによつて更に確かめられた。血球寒天培地及び Löffler 培地でそれぞれ9株のジフテリア菌を使つて1~20日間に

わたつて観察したが、両培地とも20日目には磷酸イオンを検出し得なかつた。但し血球寒天培地では2日目まで、Löffler 培地ではこれよりも長く残存したが、7日目までに9株中8株が陰性染色の所見を呈するに至つた。

(3) RNA 染色法

Methyl violet 染色では菌端の顆粒体は図4に示した如く陽性に染め出され、その経過は Gram 染色の様相に殆んど一致した。Pyronin, Toluidin blue でも vegetative cell におけるよりは良好なコントラストが得られ Methyl violet での染色と同様の所見であつた。

しかも以上の諸染色陽性の顆粒は RNAase で処理すると図5に見られる如く全く消失した。

(4) DNA 染色法

図6は chocolate 寒天培地 37°C, 20日培養の陳旧菌についての DéLamater 染色像である。顆粒体は疑いもなく菌体端位にあることが判る。更に注目すべきことは 1N HCl 水解時間を7分, 12分, 30分, 60分, 90分としても依然としてこの顆粒体染色は陰性とならず、chocolate 寒天培地上のそれは3時間半の水解に耐えることが判つた。

この所見は血球寒天培地20日培養の菌についてもあてはまる(図7)。

以上の所見は Löffler 培地での club-shape 及び「oval granule」の水解像と著しい対照をなしている。Löffler 培地4日培養の菌は 1N HCl 7分の水解で(20日では club-shape 及び「oval granule」は消失している)先端部位の顆粒に vacuole を形成し、DN A-component はいちはやく vacuole の一端に寄つている(石田¹²⁾。

生存との関係を併せ考える時、chocolate 寒天培地及び血球寒天培地の顆粒体が 1N HCl に強い抵抗性を有することは興味深い。

更に RNAase で処理した後 DéLamater 染色を行うと図8の如く、塩酸水解したものより更に明瞭に菌体端位に顆粒体が見られた。

(5) Neotetrazolium 塩による生存細胞の同定

club-shape 及び「oval granule」が生存にあらずから耐久型であることを証明するためには著者の用いた 37°C, 20日培養の陳旧培地から得られた個々の菌——vegetative phase に似た桿状の菌(尤もこの時期ではこの形のものも殆んど Gram 陰性となつている)と club-shape 或いは「oval granule」の菌——を取りあげて single cell culture をしてどれが生存しているかないかを見ることが最も望ましく考えられるが、

種々の制約が入り¹³⁾、且つまたこのような古い培地からの菌は single cell culture の条件下では増殖させることが極めて困難であつたため、著者は Neotetrazolium 塩を用いて酵素活性をよく維持している菌を求めることによつて前報での生存実験の際の生存の職能を果す細胞を求めようとした。

図9, 10は chocolate 寒天培地20日培養の菌を実験方法の項で述べた培(ロ)の中で真先きに色素を還元して来る菌を示した[(イ)の培地, 図略]。即ち、3時間(図9)及び9時間(図10)で還元して来るものは決して vegetative phase に似た桿状菌(この時期では Gram 陰性)ではなくて club-shape または「oval granule」の菌であることが判る。図9, 10の菌は増殖しているは見えないが、なお増殖し得る環境であるから、一切これらのものを抜いた環境下〔即ち、実験方法の項で述べた培地(ハ)〕で行つたのが図11で chocolate 寒天培地20日培養の菌である。同一条件下で行つた血球寒天培地20日培養の菌の還元顆粒は chocolate 寒天培地のものよりやや小さい(図12)。ここでも決して桿状の菌は還元力をもたなかつた。且つまた Gram 染色陽性の顆粒よりやや小さくほぼ $\frac{1}{2}$ であつた。更に club-shape の大きなものは決して陽性とならなかつた。

(6) 胞子染色法

ジフテリア菌が胞子染色陽性顆粒をもつことはいまだかつて報告されたことがないことであるが、図13に見られる如く(血球寒天培地20日培養の菌)、その菌体先端に Wirtz 及び Conklin 法(Malachite green)によつて陽性に染まる胞子様構造体が見られた。この胞子様構造体は Löffler 培地で 37°C, 3~7日間に極めて数多く見ることが出来る。但し7日目頃より漸次染まらなくなり20日目では殆んどなくなつてしまつた。また chocolate 寒天培地では図14(37°C, 20日培養菌)の如し全く始めより陰性であつた。Löffler 培地並びに chocolate 寒天培地の所見は磷酸の消長と一致しているように見えたが、但し血球寒天培地ではやや異なるように見えた。

但し Möller 法, Modified Ziehl-Neelsen 法は全く陰性であつた。

実験Ⅱ. 新鮮菌の細胞化的検討

以上 chocolate 寒天培地並びに Löffler 培地上の耐久型について述べたが、このような特異な形に対して新鮮な菌はどうであろうか。血球寒天培地及び chocolate 寒天培地上の1~2日目の菌は Löffler 培地36時間培養の菌を塗抹するのであるが、ここではいずれも、もとの定型的なジフテリア菌の形を取らず、いち

はやく耐久型へ移動するように見える。そこでこの培地に塗抹する前の Löffler 培地上の典型的ジフテリア菌の顆粒(所謂異染小体)が Löffler 陳旧培地, 血球寒天陳旧培地及び chocolate 寒天陳旧培地上の顆粒と異なるものであることを明らかにするため, Löffler 培地上の新鮮菌(36時間培養)について実験を行った。

(1) Gram 染色法

菌体全体が Gram 陽性に染まり, その菌端顆粒部も Gram 陽性であるが同部が特に濃染することはない(図略)。

(2) 異染小体染色法

Wachstein-Pisano 染色では図15の如く細端顆粒部時としては菌体内に明瞭な陽性顆粒が見られた。Neisser 染色も図16の如く全く同様であった。

(3) RNA 染色法

Methyl violet で染色すると図17の如く主として菌端部に明瞭な陽性顆粒が見られた。その陽性顆粒の存在部位は殆んど異染小体陽性部位と一致した。

Pyronin, Toluidine blue 染色はややコントラストが弱いが Methyl violet と同様の所見であった。

(4) DNA 染色法

DéLamater 法では図18の如く Methyl green 染色よりはるかに明瞭にその様相を見得た。核物質は菌端や内側に多く, また多くは寧ろ菌体中央部に見られる。ごく少数の菌では菌端にやや濃く染まる陽性顆粒を見るが, この時期にすでに, やや大きな顆粒が菌端に見られることは注目に値する。なぜならこの菌端に見られる顆粒は培養が古くなると次第に増加するからである。しかしその大部を占める菌端やや内側及び菌体中央に見られる核物質は Wachstein-Pisano 染色或いは Neisser 染色陽性顆粒とは明らかに異なる位置に存在する。

(5) Neotetrazolium 塩による生存細胞の同定

主として実験方法の項の培地(ハ)を使用した。2日培養の菌は還元は著明でないが, 3日, 5日, 7日と培養が古くなるにしたがい図19, 20, 21の如く菌端膨大部に限局して著明な陽性顆粒が見られた。

(6) 孢子染色法

Wirtz, Conklin 法では多数の菌が陽性であるが, 菌端顆粒部は陽性であつたり, 陰性であつたり不定であつた。

かくて著者はジフテリア菌の最も生存力の強い環境で形成する「oval granule」が従来新鮮菌(主として Löffler 培地)で得られた顆粒と性質を異にするものであることを証明した。これを図表にすれば表 I の如くである。

表 I ジフテリア菌新鮮菌の顆粒部と耐久型の顆粒(顆粒体)の細胞化学的諸性質の比較

細胞化学的性質	菌	新鮮菌顆粒部	耐久型顆粒
	培養法	Löffler 培地 37°C 36時間培養の菌	左記の菌を血球チョコレート寒天上 37°C, 20日間培養の菌*
Gram 染色		+	+
磷酸染色		+	-
RNA 染色		+	+
DNA 染色		-	+
酵素活性		?	+
塩酸水解に対する抵抗性		-	+

* Löffler 培地ならば 25°C で保存されたものが望ましい。

実験 III. 顆粒体並びに新鮮菌の熱耐性

前記実験 I, II に使用した顆粒体並びに新鮮菌の熱耐性を検討した。用いられた 2 株共, 対照菌は著明な増殖を示したにかかわらず, 加熱菌は顆粒体, 新鮮菌共に用いられたすべての条件下では熱耐性が見られなかった。

実験 IV. 電子顕微鏡所見

chocolate 寒天培地上の菌を日を追つて取り, 電子顕微鏡で観察した。Löffler 培地より chocolate 寒天培地に移植し 40 日間 37°C に保存した。(この状態で, この菌はほぼ 9 カ月生存することが出来る)。その所見は次の如くである。

1) 2 日目の菌は菌体長がそれぞれ延長し且つ菌端にむかつて膨隆する傾向がある(図22)。

2) 4 日目(図23)ではこの膨隆したものが更に大きくなり, 横径で元の桿菌体の 3 倍前後にまで達する。「oval granule」を作るが, 菌体とは明瞭な septum を形成していない。この大きさのものは電子密度が弱くなるものが殆んどで図23(a)の顆粒体には更に電子密度の低い馬蹄形の核物質を見ることが出来る。4 日目のこの培地上の菌の Gram 染色所見では, Gram 陰性或いは弱化した顆粒或いは club-shape は殆んどないからこのものは未だ Gram 陽性の顆粒或いは club-shape として「顆粒体」の中に入るものである。但し, 生存試験, Neotetrazolium 塩による生菌同定試験, 孢子染色法所見から生存に関係する club-shape 或いは「oval granule」はむしろ図23(b)の如きものと思われる。

同じく 4 日目の所見を示す図24では(c)の如く菌体から今正に遊離しようとする典型的「oval granule」を見ることが出来る。また一方には図24に見られる如

く、絶えず一方に膨隆しようとする菌体をも見ることが出来る。Gram 染色所見ではなお強陽性の club-shape として染まるものである。

3) この一方的な膨隆は間断なく起り、もとの桿菌横径の3倍をも越えるものとなる。10日目の菌の所見にはこのような形〔図25 (a), (b)〕を数多く見ることが出来たが、これらの細胞は殆んど Gram 染色弱陽性か陰性であった。

4) 40日目の所見(図26)ではこの膨隆は一層不規則のものとなり、Gram 陰性となり。完全に involution form となる。しかし、chocolate 寒天培地ではなお執拗に図26 (a), (b) のような club-shape (Gram 染色では尾部陰性となり「ovale granule」となることが多い) が存在する。

超薄切片標本では、chocolate 寒天培養20日の菌を観察した(図27, 28)。ここでは極めて数多くの図27 (a), (b), 図28 (c), (d) のような通常のジフテリア桿菌の横径を越える「oval granule」が見られた。これらのものの個々について見る時図27 (a) 及び図28 (c) 顆粒には明らかに cell wall, cytoplasmic membrane が完全に出来ていて integral entity であることが判る。その内部構造は明確ではないが、core と cortex があるように見える。更に両者とも、殊に図27 (a) が菌体から離れようとする時、菌体側の方に隔壁がなく「oval granule」を放出したあとでは外界に細胞質が露出するのが見られた。図27 (b), 図28 (d) は恐らくは近接する桿菌体〔図27 (b'), 図28 (d')〕から放出されたものであろう。以上の関係は Spore に対する Sporangia の関係に酷似する。

この関係は次の血球寒天培地上の20日培養菌の超薄切片でも明確である。この培地上の「oval granule」は先述の如く、他のどの培地上の「oval granule」よりも小さいが、図29でも見られるように (a), (b) は、その中殊に図29 (a) はそれに近接する Sporangia〔図29 (a')〕からとび出つつあることが判る。これらの「oval granule」の中には或いは ultra-thin-section の際菌体から切り離されたものもあると思われ、club-shape として存在したものであるかも知れない。

考 索

ジフテリア菌が pleomorphic なことは広く知られたことではあるが、この多形性はその殆んど細胞が一端が膨隆する傾向にそつて起つている。換言すれば club-shape formation の過程で起つているといつても過言ではない。この club-shape formation は 37°C に保存すれば大多数の場合は間断なく膨隆して明ら

かに involution form と思われるものになる。

したがつてこの方向が degeneration への過程と見なされがちであるが、著者の研究では明らかにこの傾向こそが——club-shape を脱離から止めて一定の形に保持する環境——更にまた「oval granule」を作り得る環境に保つことこそがこの菌の生存に決定的によいことは疑うべくもない。したがつて生物学上の原則から見てこの形の形成こそがむしろこの菌の physiological process と考えられる。この生理的過程の結果生成する club-shape, 更にすすんで「oval granule」の細胞化学的所見が vegetative phase の細胞の細胞化学的所見と異なつても異とするに足りない。

ジフテリア菌の生存体制として上述の過程を認識することが、ジフテリア菌の細胞化学にとつて極めて重要なことである。かくして陳旧菌を検討した Bringmann⁴⁾, 中田¹⁴⁾はジフテリア菌の顆粒が DNA, RNA を含むと述べ、Bringmann より更に古い菌を使用した中田は更に蛋白質等が含まれると述べ、これを condensed plasma と呼んでいる。これに対して顆粒が DNA-RNA の composite organelle であるという論に真向から反対した Mudd, Davis⁶⁾, Tronnier¹⁵⁾等はいずれも新鮮な菌を使用している。著者の成績でもまた彼らの条件(新鮮菌を用いるという)にしたがえば彼らの如くなることが認められた。

「oval granule」の菌体から離れる様式は著しく sporangia 対 spore の関係に似ている。このような形が今だに認識されないのは、Löffler 培地という或る特定の培地にたよつてこのような生存力の強い培地をさがすことがなかつたことにあると思われる。孢子形成菌の中で Cl. welchii のように殆んど孢子を見ることが出来ぬものに対して、色々の培地を考案するように、理想的条件を吟味して形態学が検討されるべきである。

結 論

1. ジフテリア菌の培養の過程で形成される club-shape の先端或いは遊離して存在する「oval granule」は 1N HCl 水解 60°C, 3時間半に至るものなお依然として DNA 染色 (Délamater 染色) 陽性に染まる。ここには RNA は共存するが 燐酸は証明されなかつた。

2. 陳旧培地 (20日培養) ではこの顆粒のみが Neotetrazolium 塩を環元する能力を保持していた。

3. 電顕的にはこの「oval granule」が細胞から生成する過程は spore が sporangia から生成する際のそれに著しく似ている。

4. 新鮮菌の顆粒は DNA 染色陰性であり, RNA 染色, 磷酸染色は陽性で異染小体にあたる. ここが特に Neotetrazolium 塩環元に陽性を呈するとはいえない.

5. かくしてジフテリア菌においては培養の過程と共にその顆粒は著しく細胞化学の様相を変えるが, この rest phase は vegetative phase と著しく細胞化学的に異なることに留意せねばならない.

最後に, 御指導と御校閲下さいました西田尚紀教授に深く感謝致します. また熱心に御鞭撻下さいました谷友次名誉教授に深く感謝致します. 電顕写真に関して種々御援助いただいた金大医学部高橋堯博士に心からの謝意を表すると共に, 菌株の分与をたまわった伝研佐藤和男博士に感謝します.

文 献

- 1) 寺本友一 : 十全医会誌, 印刷中. 2) Wachstein, M. & Pisano, M. : J. Bact. 59, 357 (1950). 3) 市川 収 : 細胞化学, 第1版, 321頁, 東京, 本田書店, 1953. 4) Bringmann, G. : Zbt. Bakt., Abt. 1. Orig. 156, 493 (1951). 5) DeLamater, E. P. : Staintechology., 26, 199 (1951). 6) Davis, J. C. & Mudd, S. : J. Bact., 69, 372 (1955). 7) Eidus, L., Diena, B. B. & Greenberg, L. : Can. J. Microbiol., 5, 245 (1959). 8) Wirtz, K. : Zbt. Bakt., Abt. 1. Orig. 46, 727 (1908). 9) Conklin, M. E. : J. Bact., 27, 30 (1934). 10) 谷 友次 : 医学微生物学, 第4版, 301頁, 東京, 南山堂, 1954. 11) Cruickshank, R. : Mackie & MacCartney's Handbook of Bacteriology, 10th ed., p. 121, Edinburgh & London, E. & S. Living stone LTD., 1960. 12) 石田宗治 : 未発表. 13) 栗原孝子 : 日本細菌学雑誌, 12, 739 (1957). 14) 中田嘉則 : 米子医学雑誌, 7, 93 (1956). 15) Tronnier, E. A. : Zbt. Bakt., Abt. 1. Orig. 159, 213 (1953).

Abstract

Light and electron-microscopic studies were carried out of the oval-formed cells and of the oval granules in the club-shaped cells of *C. diphtheriae* which were described as a rest phase of this organism in the preceding paper. They differed cytochemically from the so-called metachromatic granules in young cells in some aspects. DNA components formed a composite organelle with RNA together with other components within the organelle, from which even a drastic treatment of hydrolysis with 1N HCl at 60°C for 3 hrs could not remove the DNA components.

Electron-microscopic studies revealed that the oval granule formation was similar to spore formation in bacterial sporangia, although the internal structure was not alike that of bacterial spore. It was deduced from a taxonomical viewpoint that the rest phase of this organism stands intermediately between bacterial spore and fungal spore.

写 真 説 明

図1: Gram 染色, ×4000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図2: 図1模式図, 説明は本文参照.

図3: Wachstein-Pisano 染色, ×4000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図4: RNA 染色 (Methyl violet 染色), ×4000, RT-17株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図5: RNAase 処理後 RNA 染色, ×4000, RT-17株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図6: DNA 染色 (DeLamater 法), ×4000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図7: DNA 染色 (DeLamater 法), ×4000, 金谷株, 血球寒天培地, 37°C, 20日培養.

図8: RNAase 処理後 DeLamater 染色, ×4000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図9: Neotetrazolium 塩による生菌同定 (培地(口)一本文参照, 37°C, 3時間保存), ×4000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図10: Neotetrazolium 塩による生菌同定 (培地(口)一本文参照, 37°C, 9時間保存), ×4000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図11: Neotetrazolium 塩による生菌同定 (培地(ハ)一本文参照 37°C, 19時間保存), ×4000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図12: Neotetrazolium 塩による生菌同定 (培地(ハ)一本文参照, 37°C, 19時間保存), ×4000, 金谷株, 血球寒天培地, 37°C, 20日培養.

図13: Wirtz 染色, ×4000, 金谷株, 血球寒天培地, 37°C, 20日培養.

図14: Wirtz 染色, ×4000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図15: Wachstein-Pisano 染色, ×4000, 金谷株, Löffler 培地, 37°C, 36時間培養.

図16: Neisser 染色, ×4000, 金谷株, Löffler 培地, 37°C, 36時間培養.

図17: RNA 染色 (Methyl violet 染色), ×4000, RT-17 株, Löffler 培地, 37°C, 36時間培養.

図18: DNA 染色, (DéLamater 染色), ×6000, 金谷株, Löffler 培地, 37°C, 36時間培養.

図19: Neotetrazolium 塩による生菌同定 (培地(ハ)一本文参照, 37°C, 13~15時間保存), ×4000, 金谷株, Löffler 培地, 37°C, 3日培養.

図20: Neotetrazolium 塩による生菌同定 (培地(ハ)

一本文参照, 37°C, 13~15時間保存), ×4000, 金谷株, Löffler 培地, 37°C, 5日培養.

図21: Neotetrazolium 塩による生菌同定 (培地(ハ)一本文参照, 37°C, 13~15時間保存), ×4000, 金谷株, Löffler 培地, 37°C, 7日培養.

図22: 電子顕微鏡, ×9000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 2日培養.

図23: 電子顕微鏡, ×9000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 4日培養.

図24: 同上.

図25: 電子顕微鏡, ×9000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 10日培養.

図26: 電子顕微鏡, ×9000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 40日培養.

図27: 超薄切片法, ×33000, 金谷株, Chocolate 寒天培地, 37°C, 20日培養.

図28: 同上.

図29: 超薄切片法, ×33000, 金谷株, 血球寒天培地, 37°C, 20日培養.

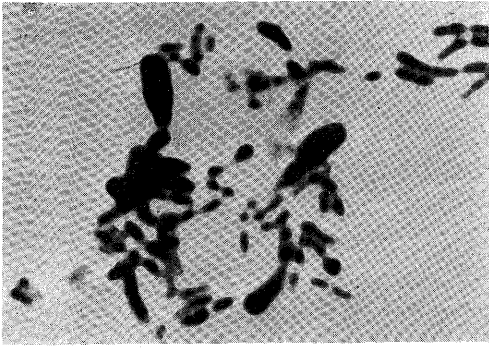


図 1

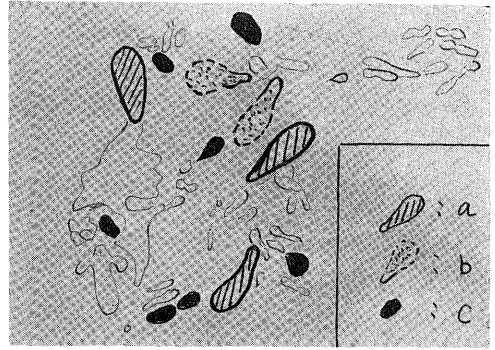


図 2



図 3

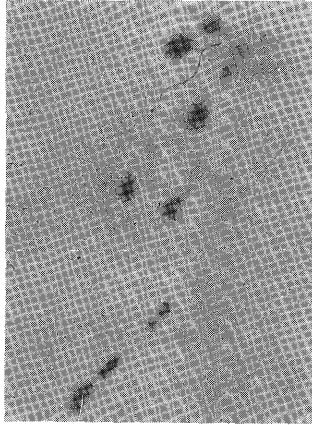


図 4

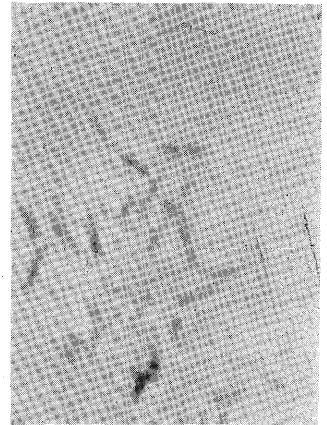


図 5

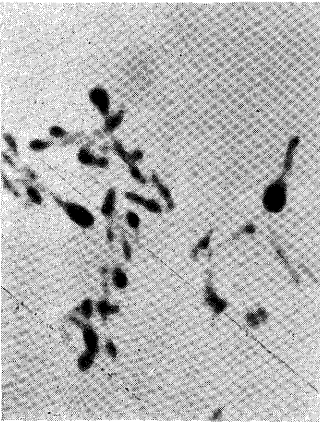


図 6

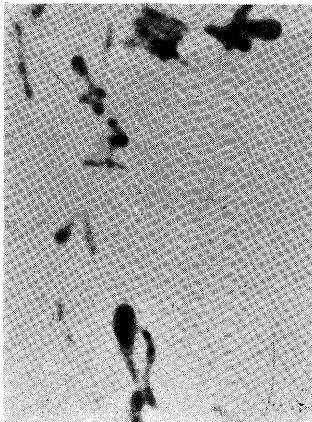


図 7

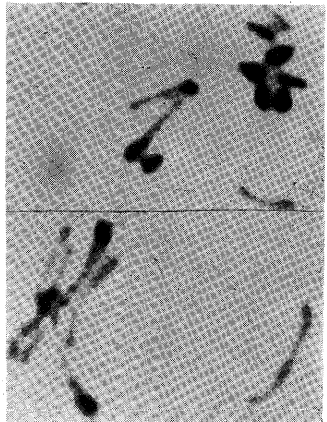


図 8



图 9



图 10

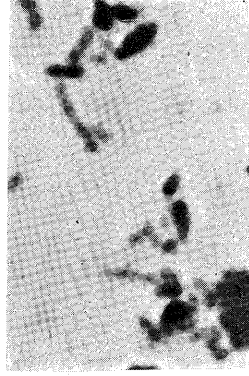


图 11

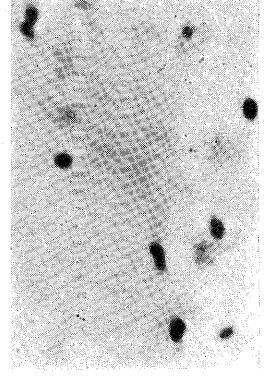


图 12

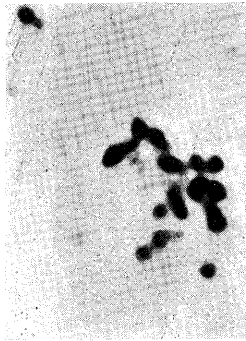


图 13

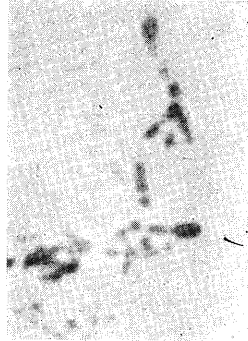


图 14

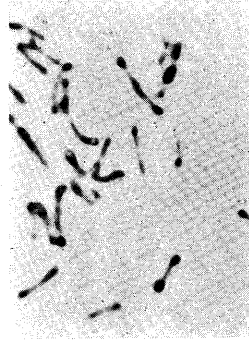


图 15

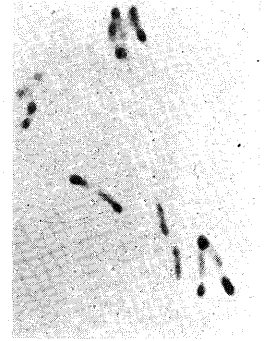


图 16

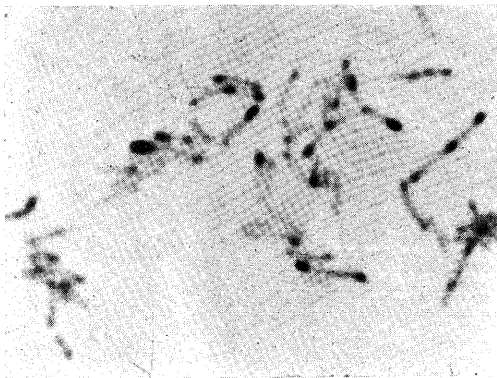


图 17

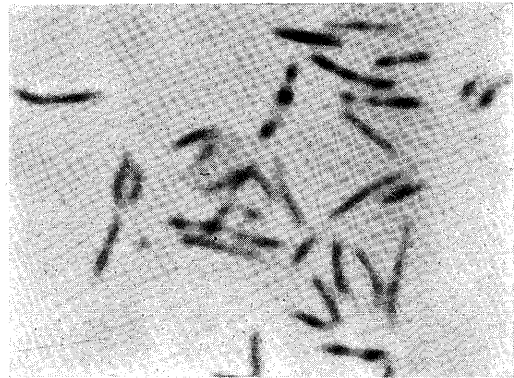


图 18

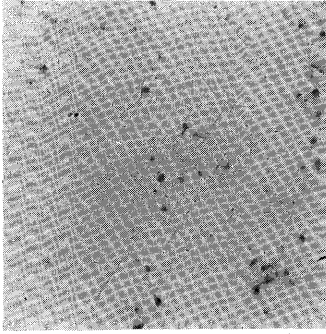


図 19

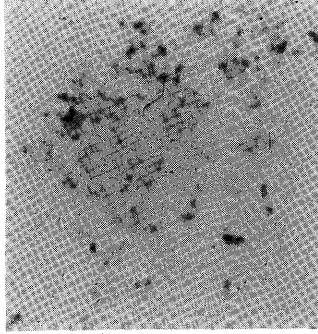


図 20

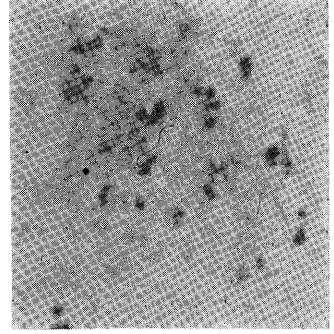


図 21

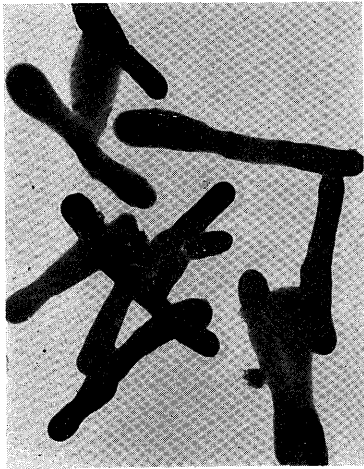


図 22

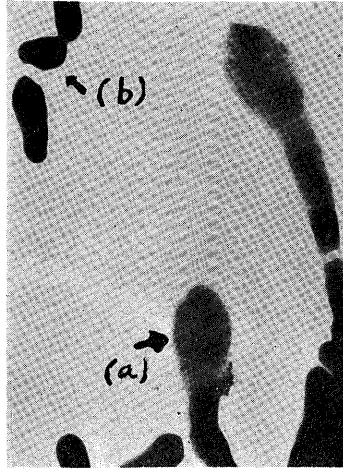


図 23

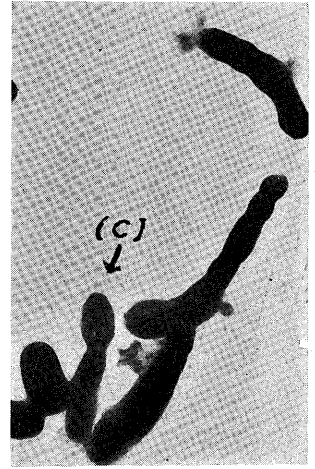


図 24

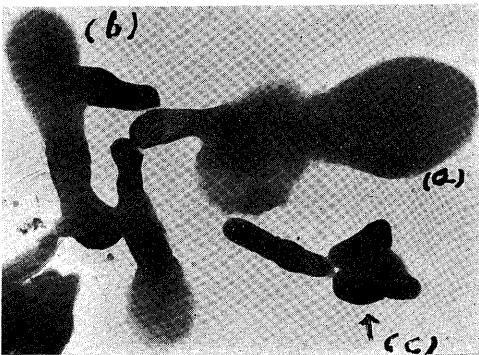


図 25

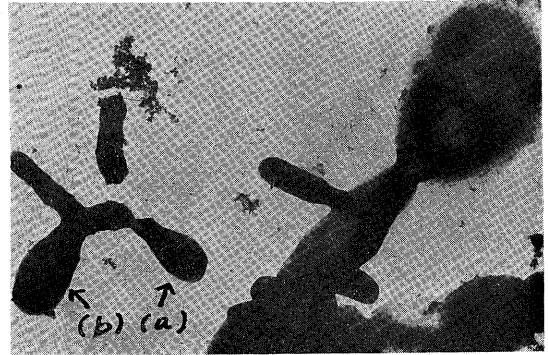


図 26

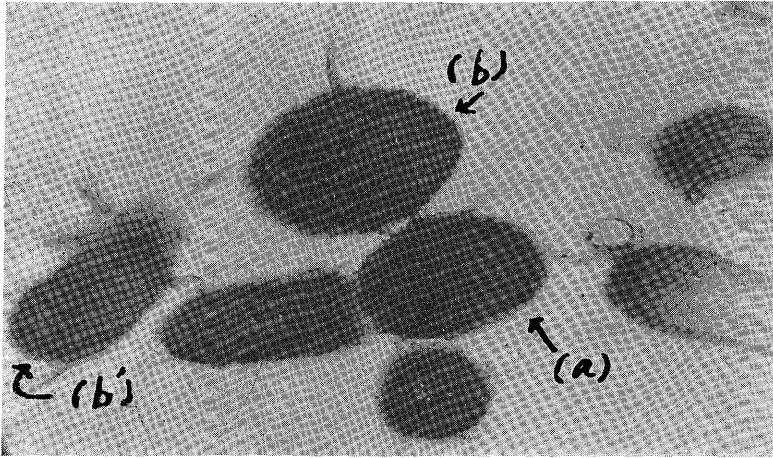


图 27

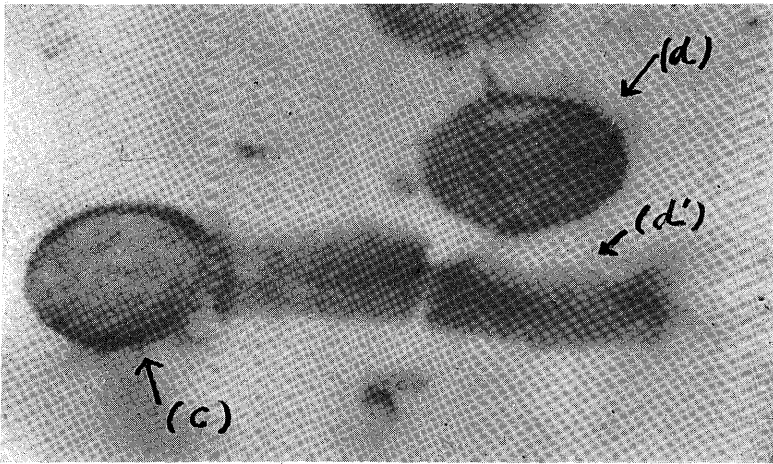


图 28

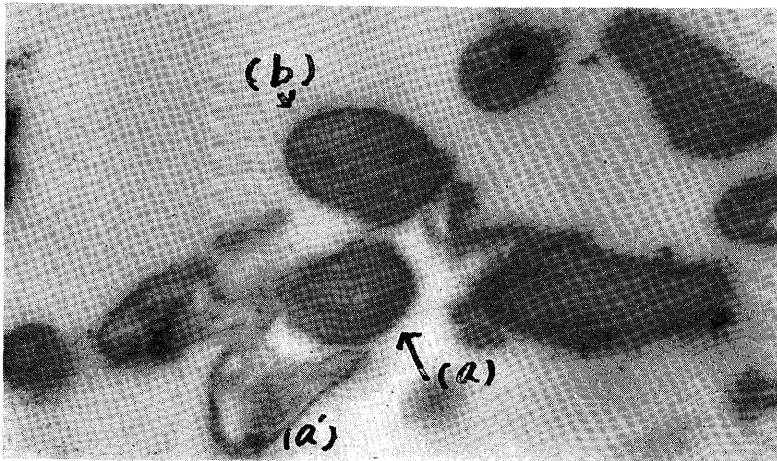


图 29