

電子顕微鏡によるスピロヘータの形態学的研究

第4報 鼠咬症病原体及び病原スピロヘータの 運動器官及び核様構造について

金沢大学医学部微生物学教室(主任：谷教授)

専攻生 渡 慶 次 賀 学

(昭和30年11月16日受附)

(本論文要旨は第9回北陸医学会において報告した)

Electron Microscope Studies of the Spirochaetes.

IV. Locomotive Organs and Nucleoid Substances in Spirillum minus and the Pathogenic Spirochaetes Gagaku Tokeshi

*Department of Microbiology, School of Medicine,
Kanazawa University
(Director : Prof. Tomoji Tani)*

第1章 緒 言

近年電子顕微鏡による研究の知見としてスピロヘータにも鞭毛或いは鞭毛様構造が報告され、スピロヘータと *Spirillum* (鼠咬症病原体) の区別が極めて困難であると考えられていたようである^{11) 14)}。しかし乍ら鼠咬症病原体の瞬時にして視野内を逸走し去る迅速な Vibro 様運動とスピロヘータにおける極めて柔軟な運動を対比考察する時、両病原体の基本構造における著しい相違が推定される。

鼠咬症病原体の電顕的研究は極めて少なく、朝倉 (1952)¹¹⁾ が体部の螺旋及び屈曲に関する

見解について、菌体周囲の slime layer 様構造、内部顆粒の存在、数本の細線維より成る鞭毛を確認し報告しているのみのようである。

著者は各種病原スピロヘータの電顕的研究^{17) 18) 19)}において、従来報告されている鞭毛或いは鞭毛様構造はスピロヘータに柔軟な運動性を与えていると考えられる線維束の断裂分散像であろうと報告して来たが、その後鼠咬症病原体とスピロヘータの運動器官及びその起始部と関連性の推考される核様構造について対比検討したのでここに報告する。

第2章 実験材料及び実験方法

供試病原体は新潟大学細菌学教室から分与して頂いた *Spirillum minus* 及び当教室保存の *Treponema pallidum* (nichols 株)、*Borrelia duttonii* 及び *Leptospira icterohaemorrhagiae* である。

鼠咬症病原体はマウス接種後10~14日頃の血液中に最多数に出現する時期においても暗視野鏡的に1視野数条を見る程度であり、これから電顕試料を調製することは不可能に近い。それで次に記載の方法によつ

て集菌した。

(1) 本病原体は多数出現するとの報告(西沢及び錫瀬)²⁰⁾があるので、約30匹の感染極期(接種後約2週間)のマウス腹腔液から慎重に生理食塩水で分割遠沈洗滌により精製集菌を行った。この場合は精製過程において消耗し、電子鏡検は失敗に終ることが多かつた。

(2) 接種後5日~1週間を経過し、暗視野鏡検的

に感染の確認された約30匹のマウスに福島氏法¹⁶⁾により腹腔内増菌を行い、接種後約2週間に1%クエン酸ナトリウム加生理食塩水で凝固を防止しつつ腋窩動脈を切斷採血し、分割遠沈によつて赤血球を分離、その上清に毛細管ピペットにより腹腔液を採集して加え、再び生理食塩水により2~3回遠沈洗滌して集菌及び精製した。この場合は試料の $\frac{1}{3}$ において鏡検の目的を達することが出来た。

他のスピロヘータは感染動物及び korthoff 培地から既報の方法^{17) 18) 19)}により試料を精製した。

スピロヘータの固定は予想に反し、初めに固定して試料調製をするよりも、試料を充分精製してから固定した方が菌体の障害は少ないようである。これは固定後異物を除去するために頻回の遠沈洗滌を行う時は、菌体が極めて細長の螺旋体であるスピロヘータは菌体の柔軟性が失われ、崩壊が起り易いためであると考え

られる。

本実験では充分に精製した試料をその儘、或いは15°C以下においてpH 7.2 緩衝オスミウム酸溶液(1%)及び中性ホルマリン溶液(4%)で2~3分固定し、核様構造を検討する目的で ribonuclease (200mg/cc), trypsin (0.01mg/cc), desoxiribonuclease (10 mg. cc) の pH 7.2 磷酸緩衝溶液で 37°C, 1~12時間処理し、2回蒸溜水で遠沈洗滌後、充分に乾燥せるコロジオン膜上に載せ、適当に乾燥し、蒸溜水で膜面を靜かに洗滌した。これを低圧にて充分に乾燥し、その儘又は Cr-shadowing を施して日立製 H-U 9 型及び日立製 H-S 2 型電子顕微鏡により加速電圧 50 KV, 直接倍率 4,000~5,000 倍を使用し、鏡検及び撮影した。又光顯的に Feulgen 反応, チオニン染色を行い対照し検討した。

第3章 実験成績及び考察

鼠咬症病原体は処理を施さない試料においては一般に2~3の回転或いは波状形を示す短厚形の electron dense の菌体と両端から約8~9本の細線維から成る鞭毛束が發生しているのが確認される。その詳細は後述する。菌体は時には原形質内顆粒を認める時があるが、多くは一様に濃映され、被膜, Blepharoplast 等の微細構造は認め難い (Fig. 1, Fig. 2)。

従つて鼠咬症病原体の硬直性の螺旋状菌体は電顕像においてはスピロヘータの柔軟な菌体と区別することが困難であり、菌体の回転或いは波状形はスピロヘータの電顕像に類似している。しかし鼠咬症病原体の短厚形の菌体に比較して後者は極めて細長形であり、又スピロヘータは既報^{17) 18) 19)}の如く処理しない試料においては鞭毛様像は認められず、単一線維としての端糸が確認されるに對し鼠咬症病原体は一般に複合線維としての長い鞭毛像が確認されることは両病原体の一般形態における著しい相違と思われる。

電顕像における平面的波状形は Ruys (1912)⁵⁾が本微生物を染色標本において平面的屈曲であると見なした知見と一致するが、これはスピ

ロヘータにおいてもしばしば認められる知見で試料調製、乾燥の影響と推定される。鼠咬症病原体が螺旋形態であることは暗視野像及び多くの電顕像から疑う余地はない。

第2節 鞭 毛

鼠咬症病原体の鞭毛について二木 (1927)²⁾は長さ各々 2~3 μ の鞭毛が体の両端に1本宛あり緩波状形を示していると報告し、両端に数本ずつの鞭毛を認めたと述べているものがあるが承認し難く、恐らく人工産物の誤認であろうと結論している。又 Adachi (1921)⁴⁾, Zuelzer (1921)⁹⁾等は両端から鞭毛束を以て数本宛の鞭毛が發生していることを述べている。朝倉 (1952)¹¹⁾はスピロヘータ (特に本微生物) の鞭毛は光学顕微鏡では通常単一線維として認められるけれども、実はより細い数本の線維により出来ていて外から加わる影響により容易に分条し、又本微生物の life. History に伴い自然に数本の細線維に分岐分条する場合がある。而も試料調製及び染色方法及び観察条件の相違等が鞭毛分条像の異なつた状態を示し、光学顕微鏡と電子顕微鏡の解像力の差が又これに関与するところ大であると主張している。

著者は菌体末端から単一線維として発生している鞭毛様像 (Fig. 6), 菌体末端から鞭毛束を以て複合線維として発生している鞭毛像 (Fig. 2) 及びかかる複合線維としての鞭毛を有するものでは時に菌体側面から発生しているのではないかと思われる鞭毛像を認めた。

しかし単一線維としての鞭毛様像及び菌体側面から発生しているが如き鞭毛像が正常形態を示すものであるか又如何なる生物学上の意義を表現しているかについては不明の点が多い。不幸にして本病原体の電子鏡検は集菌、精製が極めて困難で、この点について充分検討することが出来なかつたが、鼠咬症病原体が凡そ8—9本の幅約 100\AA の細線維より成る複合線維としての鞭毛を菌体両端に有することは明らかである。

従つて従来記載されている単一線維としての鞭毛の知見は暗視野像における鞭毛の動的形態から推考して運動時における鞭毛の一定の状態像を分解能の低い光顕で観察したためではないかと思われる。

捉てかかる眞性鞭毛を有する鼠咬症病原体に対比しスピロヘータは既報^{17) 18) 19)}の如くその属に特有な数の細線維により集成されている線維束或いは1本の線維が菌体の主軸に沿うて巻き付き、或いは眞直で軸線維様外観を示して存在している。而も運動器官と判断される。スピロヘータにおける線維束は物理化学的処理により解離分散して眞性鞭毛を髣髴せしめる場合があるが、これは人工産物であり、眞の鞭毛とは考えられない。

かくの如くスピロヘータと鼠咬症病原体の運動器官には著しい相違を確認することが出来る。

第3節 核様構造及び所謂 Blepharoplast.

電子顕微鏡によるスピロヘータ及び鼠咬症病原体の核様構造については報告が認められないようである。

鼠咬症病原体において緩衝オスミウム酸溶液

固定後 ribonuclease で処理することにより、又その儘乾板の露出時間を延長することにより細胞質内に分散し存在して、或いは菌体の両端に Blepharoplast を形成している小粒子状体或いは類球状体を確認することが出来た (Fig. 3, Fig. 4)。

かかる構造は desoxiribonuclease 処理の試料においては確認されないこと (Fig. 5), 本病原体における Feulgen 反応の瀰漫性発現, ribonuclease 処理後の α (アルファ) 色調を呈するチオエン染色像等から核様物質は原形質内に分散して存在し、その一部は菌体末端において集積し、鞭毛の起始部である Blepharoplast を形成しているのではないかと推考されるが、分化した核様構造は確認されない。又この実験結果は光顕的に Fuhrmann (1910)¹²⁾ が *Spirillum Volturnans* の Geisselzopf の基部の小体が染色質様の性質があることを示した知見と類似している。

次に ribonuclease 処理の各種病原スピロヘータは予想に反し、菌体の変化は軽く原形質内の特殊構造は確認し難い (Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11)。Feulgen 反応も瀰漫性に発現することがあるが不定である。又線維束起始部において核様物質が集積し、Blepharoplast を形成している所見は確認することが出来ない (Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9)。

しかし trypsin 及び ribonuclease の併用処理により細胞質内に分散して存在する electron dense の小粒子状体類似構造の認められること (Fig. 14), ribonuclease 及び desoxiribonuclease 併用処理によりかかる構造は確認されないこと (Fig. 13), desoxiribonuclease 処理により菌体の瀰漫性の消化を想像させる像 (Fig. 12) が得られることから、恐らくスピロヘータにおいても核様物質は細胞質内に分散して存在するものではないかと推測される。これは Neumann (1930)²⁰⁾ が核反応を与える物質がスピロヘータに存在し、多少 diffuse に分散しているので分化した核は認められないと述べている光顕的知見を想起せしめる。

かくの如く鼠咬症病原体の鞭毛の起始部とスピロヘータの線維束の起始部との間には著しい相違が認められ、両病原体は別種のものとして区別することが可能である。

従つて鼠咬症病原体は形態学的特徴にその分類学上の基準を求めるならばスピロヘータではなく螺旋菌に属するもので Noguchi⁹⁾ は決定的

に結論してないが、従来の谷¹³⁾、Topley & Wilson⁷⁾、Breed et al⁸⁾、Smith & Martin¹⁰⁾ 等の記載に一致する。又スピロヘータの線維束の解離分散像は極めて細菌の眞性鞭毛の電顕像に類似しているが、上述の知見からこれを鞭毛として判断することは不合理であると結論される。

第3章 要 約

鼠咬症病原体及び病原スピロヘータ (*Treponema pallidum*, Nichols 株, *Borrelia duttoni*; *Leptospira icterohalmorrhagiae*) について、その儘又は中性ホルマリン(4%)及び7.2緩衝オスミウム酸溶液(1%)固定後、ribonuclease, trypsin 並びに desoxiribonuclease 処理を施し、電子鏡検及び撮影し、次の所見を認めた。

1. 鼠咬症病原体は菌体の両端に8—9本の複合線維より成る眞性鞭毛を有する短厚形の螺旋菌であるが、スピロヘータは単一線維としての端糸を持つている細長形の螺旋体であり鞭毛は認められない。

2. 鼠咬症病原体は菌体の両端において核様物質と思われる electron dense の物質が集積し Blepharoplast を形成している。これより鞭毛束を以て鞭毛が発生している。

スピロヘータは被膜外側に存在し、菌体に柔

軟な運動性を与えていると考えられる線維束を有する。線維束の起始部は表層原形質内に存在するが、細胞質内に分散して存在すると推定される核様物質との関連性は認め難い。

3. 鼠咬症病原体の基本構造は被膜、原形質、Blepharoplast、鞭毛の4構成要素を、スピロヘータは被膜、原形質、菌体の主軸に沿うて巻き付いている線維束或いは1本の線維の3要素を区別することが出来、両病原体の間には特に運動器官の著しい相違が認められる。

4. 中性ホルマリン溶液固定と緩衝オスミウム酸溶液固定の電顕像に著明の相違は認め難いが、中性ホルマリン溶液固定の場合は回転の延長が稍々著明のようである。

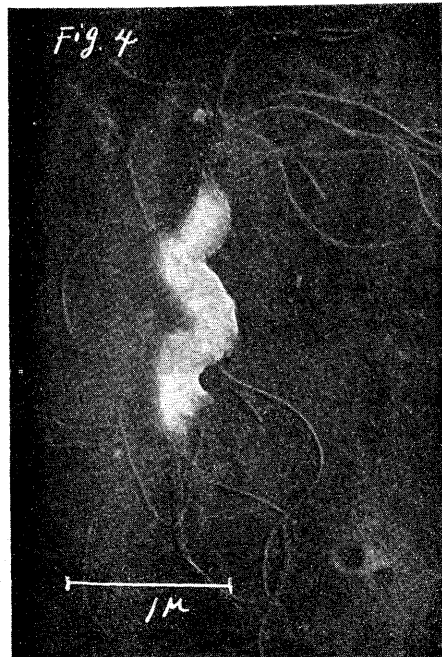
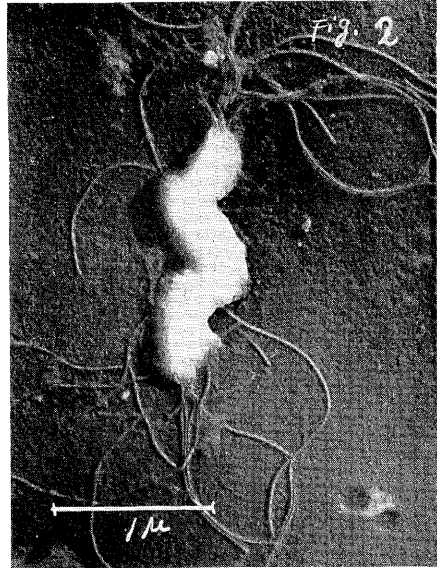
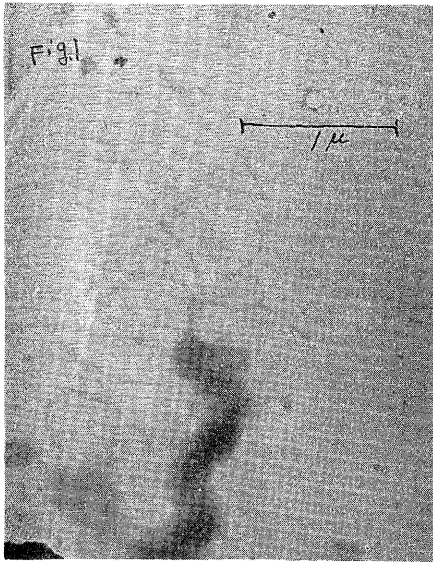
稿を終えるに臨み御懇篤なる御指導と御校閲を賜りし恩師谷教授に謹みて謝意を捧げ、電顕撮影に助力の労をとられた野田・西村の両氏に厚く感謝致します。

文 献

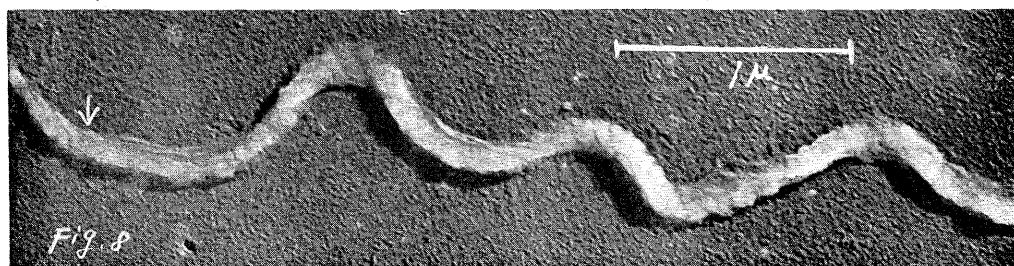
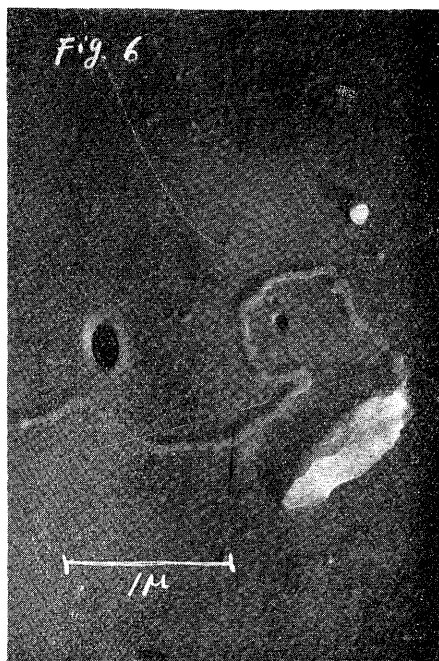
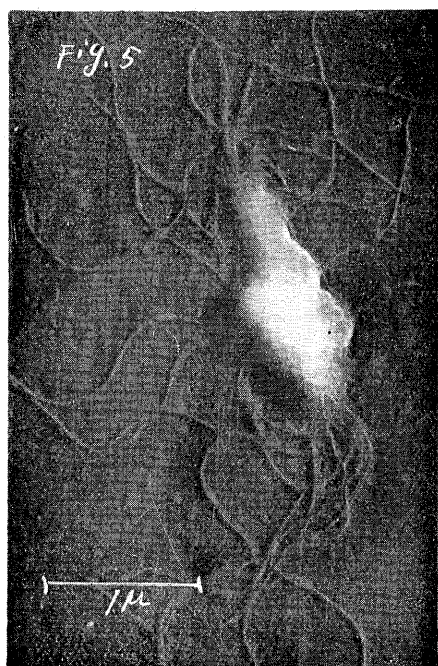
- 1) K. Futaki, I. Takaki, T. Taniguchi, S. Osumi : Jour. Exp. medicine, 25: 33—44. (1917). 2) 二木謙三 : 東西医学大観, 1: 1—7, (昭. 2). 3) 西沢・鯛瀬 : 実験医学雑誌, 15, 967—992, (昭. 6). 4) Adachi K. : Jour. Exp. medicine, 33: 647—651, (1921). 5) A. Charlotte Ruys : Zbl. f. Bakt. I, orig. 103: 268—269 (1912). 6) Zeulzer, M. : Zbl. f. Bakt. I, orig, 85: 154—167. (1921). 7) Topley and Wilson : The principles of Bacteriology and Immunity. 3th Ed. I: 729—731, (1946).

- 8) Breed, R. S. et al : Bergeys manual of determinative Bacteriology 6th Ed. : 212—216, (1948). 9) Noguchi, H. : Cited from the newer Knowledge of Bacteriology and Immunology by Jordan and Folk. chapter 36 : 452—453, (1928). 10) Smith & Martin : Zinssers Textbook of Bacteriology 9th. Ed. 636—639, (1948). 11) 朝倉 : 日本細菌学雑誌, 7: 767—769, (1952). 12) F. Fuhrmann : Zbl. Bakt. II th abt, 25: 129, (1910). 13) 谷友次 : 医学微生物学, (大改訂4版), 頁234—235. 南山堂, 東京, (昭・

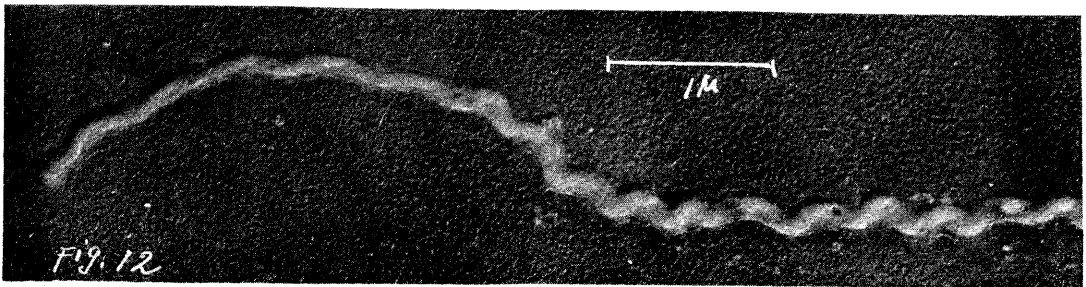
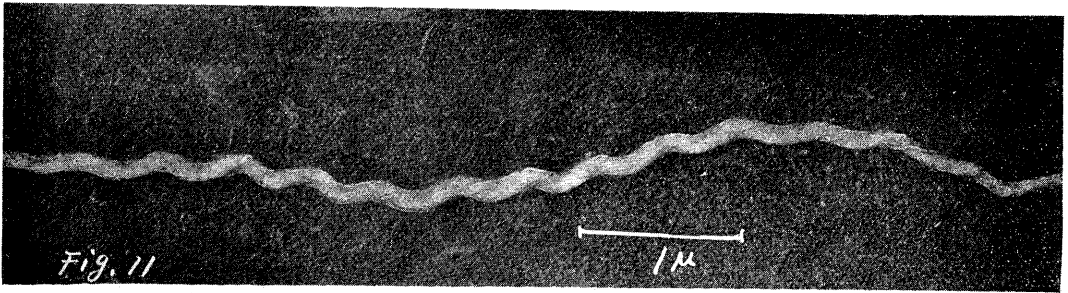
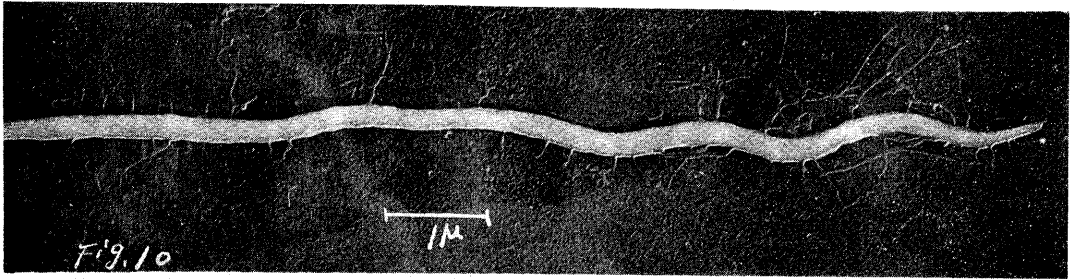
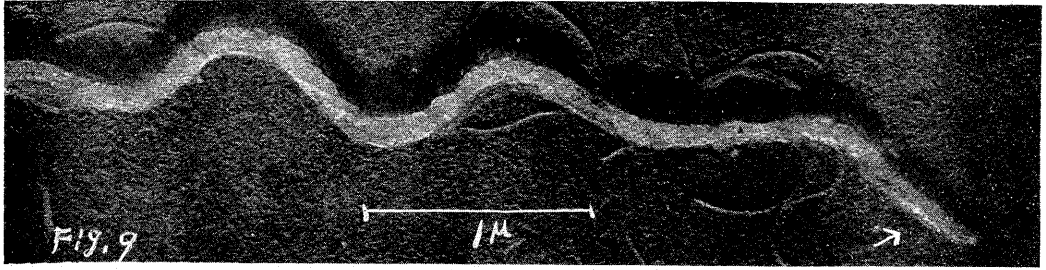
渡慶次論文附圖(1)



渡慶次論文附圖(2)



渡慶次論文附圖 (3)



渡慶次論文附圖(4)



29). 14) 木村廉 : 細菌学及び免疫学, (7版), 頁344—347. 日本医学出版株式会社, 京都, (昭. 26). 15) Zettnow : Zeit Hyg. Infekt. kr. 85 : 17—27, (1918). 16) 福島 : 木村廉著, 細菌学及び免疫学, (7版), 344—347. (昭. 26) より引用. 17)

渡慶次 : 十全医学会雑誌, 発表予定. 18) 渡慶次 : 十全医学会雑誌, 発表予定. 19) 渡慶次 : 十全医学会雑誌, 発表予定. 20) Neumann (1930) : 湯浅著, 細胞学, (初版), 7 : 頁795, 同文館, 東京, (昭. 17) より引用.

附 図 説 明

Fig. 1. *Spillium minus*, 25,000X. Unshadowing 像. 螺旋状の electron dense の菌体と分条した複合線維より成る鞭毛を認める.

Fig. 2. *Spillium minus*, 25,000X, Cr-shadowing 像. electron dense の菌体の両端及び側面より複合線維より成る鞭毛が房状に発生している.

Fig. 3. *Spillium minus*, 25,000X, 緩衝オスミウム酸固定後 ribonuclease 処理, Cr. shadowing 像. 被膜及び鞭毛起始部の Blepharoplast が確認される.

Fig. 4. *Spillium minus*, 25,000X, 緩衝オスミウム酸固定, 乾板露出時間を延長せるもの, Cr. shadowing 像. 原形質内に electron dense の小粒子状体の分散及び同様な性格の Blepharoplast を認む (Fig. 2 と同一試料).

Fig. 5. *Spirillum minus*, 25,000X 緩衝オスミウム酸固定後 desoxiribonuclease 処理, Cr-shadowing 像. 原形質内の粒子状体及び Blepharoplast は確認し難い.

Fig. 6. 25,000X, 緩衝オスミウム酸固定, ribonuclease 処理. Cr-shadowing 像. Blepharoplast 及び太い1本の鞭毛を認める.

Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, *Tr. pallidum* (Nichols 株), 各々 35,000X 緩衝オスミウム酸固定,

Cr-ribonuclease 処理, Cr-shadowing 像. 線維束の起始部に Blepharoplast を認めない.

Fig. 10. *Borrelia duttonii* 15,000X 緩衝オスミウム酸固定, ribonuclease 処理, Cr-shadowing 像. 原形質内特殊構造は認めない. 被膜及び被膜に由来する特殊の線維形態が確認される.

Fig. 11. *Lept. icterohaemorrhagiae*, 25,000X 緩衝オスミウム酸固定後 ribonuclease 処理, Cr-shadowing 像. 原形質内に分化した核様構造は確認出来ない.

Fig. 12. *Lept. icterohaemorrhagiae*, 25,000X 緩衝オスミウム酸固定後 desoxiribonuclease 処理, Cr-shadowing 像. diffuse の消化を推定せしめる.

Fig. 13. *Borrelia duttonii*, 緩衝オスミウム酸固定, ribonuclease 及び desoxiribonuclease 併用処理, Cr-shadowing 像. 原形質は極めて electron non dense である.

Fig. 14. *Borrelia duttonii*, 14,000X ribonuclease 及び trypsin 併用処理, Cr-shadowing 像. 原形質内に electron dense の小粒子状体様構造を認める.