走査電子顕微鏡の真菌学への応用 —— 特に試料調製法について ——

徳永 純一 原 田 薫 松 本 英 嗣

九州歯科大学細菌学教室

緒 言

現在の真菌学領域では、その菌種の分類、同定の基準は依然として古典的形態学がその中心をなしていることは周知のことである。すなわち、真菌類が造生する種々の胞子のでき方、胞子造生器官の数や排列形態など、比較的細胞の外形的特徴が分類同定の基準となつている場合が多く、超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察して、その内部微細構造のちがいが分類同定の基準として用いられていることはほとんどない。

実体顕微鏡で見えるような実体像を、そのまま拡大して光学顕微鏡の解像力の壁を破ることは、われわれ形態学にたずさわるものの昔からの夢であつた。近年開発された走査型電子顕微鏡（以下走査電顕と略す）はこの目的を充たしてくれるものといえる。

走査電顕はごく細く絞つた電子ビームで試料表面を走査し、そこから出てくる電子情報を受けて、これを電流情報に変えた後、その電気信号に同調してブラウン管上の走査線の輝度を変調して像を得るものである。この場合、われわれの研究の目的に用いる電子情報は二次電子による方法がもつとも利用価値がある。真菌細胞のような生物試料は電子線で照射されてもごくわずかの二次電子情報しか得られないが、この表面にうすく金属を蒸着（300～400 Å）して二次電子情報量を増加させると鮮明な表面構造を得ることができ、カビ類細胞やそれらが造生する諸器官の立体的構造を容易に観察することができる。

走査電顕では標本の作製、観察がともに光学顕微鏡より容易といえるくらいで、しかも胞子造生過程の標本もその作製手技によつては変形されないままの姿をとどめうることは非常な強みである。皮膚科領域で取り扱われ

る真菌類はその胞子の形態学的特徴によつて分類されているものが多いので、これら胞子類の立体的観察と表面構造の研究にも多大の利用価値があるものと考えられる。この走査電顕を真菌類細胞の観察に応用した報告は数少なく、Williams & Davies¹⁾、飯塚²⁾、赤井ら³⁾のものが散見される程度である。これらの報告ではいずれも未固定の細胞を試料としているので、詳細に観察すると真空処理による変形、ひずみが認められ、このような試料による観察成績は多くの問題を含むものと考えられる。

そこで真菌類を走査電顕で観察するためには、その構造をいかに生鮮時の細胞形態に近い状態に保持するかということが最大の問題となる。われわれはこの目的のため、脱水、乾燥により必然的に起る収縮変形を固定により、どの程度防ぎ得るかを検討した結果、固定状態のちがいが表面微細構造の変化をかなり修飾することがわかつたので、その成績を報告し、これに対する考察を加えてみた。

実験材料ならびに実験方法

供試菌株：*Candida albicans* ATCC 1012株、教室分離の *Candida albicans* KC 8—3株、及び *Aspergillus niger* NI株、*Aspergillus oryzae* NI株を用いた。

使用培地：*Candida albicans* では、厚膜胞子及び仮性菌糸形成用培地（starch, cornmeal-extract, liver-extract, Tween 80加）と、培養温度37℃で通常仮性菌糸とよばれているものとは形態学的、生物学的に多少異なる菌糸（filamentous form cell）を形成させる培地（peptone, Tween 80加）を用い、*Aspergillus niger* *Aspergillus oryzae* では、Sabouraud 培地を用いた。

培養方法：約10mm平方に切断したスライドガラスを化学洗滌した後、高圧滅菌したものをペトリ皿に入れ、このスライドガラスの上に前記の培養基が薄層となるように流した平板培地上にそれぞれの菌株の蒸留水懸濁液を滴下し、厚膜胞子形成培地では25℃、3～6日間、菌糸（filamentous form cell）形成培地では37℃、17～

Junichi TOKUNAGA, Kaoru HARADA and Hidetsugu MATSUMOTO: The Preparation of Fungus Cell for Scanning Electron Microscopy. From the Department of Bacteriology Kyushu Dental College

20時間、サブロー培地では30°C、2～5日間培養した種々の菌細胞を供試試料として用いた。

走査電顕試料作製方法：光学顕微鏡下で適宜菌細胞の発育した状態のスライドガラスをマークし、その周囲をメスで切り出し、取り出したスライドガラスをそれぞれ次のように処理した。

Candida albicans の試料

(1) 未固定の試料は、直接 5×10^{-3} mmHg 位の真空度で2～3時間脱水、乾燥を行つた後、後述のようにカーボン、金の二重蒸着を行つた。

(2) 2.5% glutaraldehyde (pH 7.2の磷酸緩衝液で調製し、蔗糖を全体の7.5%になるように加えた。以下すべて glutaraldehyde 固定液は同様に調製した。) で4°C、18～20時間固定した。

(3) 2.5% glutaraldehyde で前述のとおり固定した後、再蒸留水で数回水洗し、更に2% KMnO_4 水溶液で4°C、48時間固定した。

Aspergillus niger 及び *Aspergillus oryzae* の試料

(1) 6% glutaraldehyde で4°C、18～20時間固定を行つた。

(2) 6% glutaraldehyde で前述の如く固定した後、再蒸留水で数回水洗し、更に2% KMnO_4 水溶液で4°C、48時間後固定を行つた。

(3) 最終濃度が glutaraldehyde 6%, formaldehyde 10%になるように調製した固定液で4°C、18～20時間固定後、再蒸留水で数回水洗し、更に2% KMnO_4 水溶液で4°C、48時間後固定を行つた。

固定処理が完了した試料についてはその後再蒸留水で数回水洗し、アセトンシリーズ(50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%で約10分間づつ)で脱水後、 5×10^{-5} mmHg の比較的高真空度中でカーボン、 5×10^{-4} mmHgの比較的低真空度中で金の二重蒸着を行つた。

以上の方法により作製した試料を JSM-2 型走査電顕にて観察、撮影を行つた。

実験成績

Candida 属菌細胞

1. 仮性菌糸と厚膜胞子

未固定の試料では Fig. 1 のように水平方向から観察を行なうとよくわかるが、培地表面より気中に向つて伸長した仮性菌糸がみられる。この気中に伸長した仮性菌糸は培地表面、或いは培地に半分埋もれて発育しているものに比較して、脱水、乾燥による収縮変形は比較的少なく、またこの気中に伸長した仮性菌糸においても、全

体一様に変形を生じているわけではなく、伸長発育の末端、すなわち、厚膜胞子に近い細胞より起始部の細胞の方が収縮扁平化が強く現われている (Fig. 2)。仮性菌糸の先端に形成された厚膜胞子は Fig. 2 にみられるように比較的陥凹の小さいものもみられたが、多数のものに大きな陥凹、すなわち“つぶれ”がみられた。

2.5% glutaraldehyde 単独固定の試料では先端に厚膜胞子を形成した仮性菌糸では厚膜胞子に最も近い菌細胞は表面に大きな陥凹をもっているものもあるが、その辺縁部はかなり膨隆している部分が認められ、厚膜胞子より遠ざかる、すなわち、発育起始部に近い菌細胞ほど乾燥収縮によると思われる圧平化が強く認められる (Fig. 3)。また圧平されて扁平化した仮性菌糸も全体一様に変化をうけたわけではなく、Fig. 4 にみられるもののように部分的(矢印)に圧平がほとんどみられない部や、同一菌糸内でも非常に強く圧平されているところなど、種々の菌細胞の成熟度、すなわち、菌細胞の細胞充実度を現わしていると思われるような所見が得られている。仮性菌糸の末端に形成される厚膜胞子には Fig. 3 にみられるように大きな陥凹が細胞表面に現われたもの、またその表面に微細な皺の出現したもの、或いは Fig. 4 にみられるように表面平滑でほとんど収縮変形が起こらなかつたと考えられるようなものまで、種々の段階のものが観察される。

glutaraldehyde と KMnO_4 の二重固定を行つた試料では仮性菌糸は未固定、或いは glutaraldehyde 単独固定の試料にみられるような収縮変形はほとんどみられず、いかなる位置にある菌細胞も円く、豊かなふくらみをもつて培地表面に横たわつている (Fig. 5, 6)。しかし Fig. 6 でよくわかるように、連続していた仮性菌糸の各々の細胞間に離断がみられ、また未固定、或いは glutaraldehyde 単独固定の試料では認めにくかつた細胞表面の汚れがはつきりとみられる。厚膜胞子も成熟過程のいかんを問わず(多数の試料について観察をくり返した成績による)、前述の試料にみられるような大きな陥凹はもちろん、部分的な陥凹変形すら認めることができなかった。

2. 分芽胞子

glutaraldehyde 単独固定の試料では Fig. 3, 7 にみられるように、同様の試料処理で仮性菌糸や厚膜胞子にみられた圧平、陥凹などの大きな変形はほとんど認められないが、高倍率で観察すると表面にはやはり脱水、乾燥時の収縮と考えられる多数の微細な皺がみられる

(Fig. 8). また出芽痕のみられる菌細胞では、出芽痕の周囲には小さな陥凹、或いは皺がみられるが、出芽痕自体は他の部分より特に厚い細胞壁で構成されているので、その表面には皺がでにくいと考えられる所見も認められる。

glutaraldehyde と KMnO_4 の二重固定を行つた試料では比較的高倍率の写真においても表面は非常に滑沢で、glutaraldehyde 単独固定の試料でみられた微細な皺はまったくみられなかつた (Fig. 9)。

3. 菌糸 (filamentous form cell)

37°Cで発育するこの菌糸は、25°Cで発育する通常仮性菌糸とよばれているものより伸長速度が速く、培地表面より気中に向つて立ちやすい。また形態的に細長いだけでなく、細胞化学的染色所見からも仮性菌糸とは生物学的にも異つた性格を有する細胞であろうと推察している菌糸細胞である。

未固定の試料では気中に伸長した菌糸の発育末端の菌細胞は比較的収縮扁平化が少い (矢印) が、発育起始部に近い細胞ほど収縮扁平などの変形が著しく、リボン状を呈している (Fig. 10)。また前述の仮性菌糸の未固定の試料の所見と同様に、気中に伸長した菌糸は培地に半分埋もれたものや、培地表面に横たわつているものに比較して、扁平化が少ないことが認められる。

glutaraldehyde 単独固定では同一菌糸内でも非常に強く圧平されている部分や、圧平がほとんどみられないところなど、細胞質の充実度を現わしていると思われる所見が得られ、これは前述の仮性菌糸の所見とほとんど一致している (Fig. 11)。また培地表面近く非常に浅く埋もれている菌糸では、培地がその部分だけもりあがつたようにみえるものも認められる。

glutaraldehyde と KMnO_4 の二重固定を行つた試料では未固定や、glutaraldehyde 単独固定の試料にみられるような扁平化はまったく認められず、またこの菌糸においても仮性菌糸の場合と同様に、連続した菌糸細胞の細胞間に離断がみられる (Fig. 12)。

Aspergillus 属菌細胞

1. 菌糸

glutaraldehyde 単独固定を行つた試料では栄養菌糸の表面全体にわたつて小さな凹みが多数観察され、また菌糸の長軸方向に数条の細い皺の存在するのが同時に観察される。しかし分生子柄 (空中に伸長し、将来この末端に分生子を形成するための生殖菌糸) には栄養菌糸にみられるような凹みはほとんどみられず、ただ比較的大

きな皺が観察される程度である (Fig. 13)。しかし分生子柄も分生子が形成されてしまつた。すなわち、老朽化した時期のものでは著しく圧平され、リボン状に変形したものが数多く観察された。このような凹み、皺、著しい圧平は試料の固定が不十分であつたため、脱水時或いは真空処理中に起つた変形であると考えられる。

これに対し、glutaraldehyde, formaldehyde の同時固定後、後固定として KMnO_4 を用いた試料では前述のような収縮変形はまったく認められず、細胞質がなくなつて細胞壁のみとなつたような分生子柄においても変形することなく円筒形のまま保持されている (Fig. 14)。また栄養菌糸においても同様にまるく、生きていた状態の細胞形態に近く保持されているのが観察された (Fig. 15)。

2. 頂囊

glutaraldehyde 単独固定の試料では発育時期により頂囊の表面構造がかなり異なつて観察される。すなわち、梗子及び分生子が形成されてしまい老朽化した時期の頂囊とこれらがまだ形成される前の未熟な時期のものとを比較すると、前者は後者より著しく収縮変形していることが認められた。

glutaraldehyde と KMnO_4 の二重固定を行なつた試料においては、このような現象はみられず、前述の glutaraldehyde, formaldehyde の混合固定後 KMnO_4 による後固定で得られた成績と同様にまるく固定され、表面は非常に平滑である (Fig. 16)。

3. 梗子

glutaraldehyde 単独固定の試料で得られた梗子の表面構造は栄養菌糸のそれに比較的類似しており、表面全体にわたり小さな凹みが認められる (Fig. 17)。また第一梗子と第二梗子の間の隔壁に相当する部分であると考えられるところは“竹の節”状に梗子細胞壁より突出しているのがはつきりと認められる (Fig. 17, 18)。このような所見は他の固定による試料においてはまったくみられないもので、これは細胞の収縮に伴つて現われた所見であろうと思われる。なぜならば隔壁を構成する細胞壁の構築は通常の梗子壁より強固な構造であることは超薄切片の所見より明らかである。

Fig. 16のように glutaraldehyde, KMnO_4 二重固定を行なつたものでは Fig. 17でみられる glutaraldehyde 単独固定による梗子の表面構造とは異なり収縮によると思われる凹みや皺はまったく認められず表面は非常に平滑である。Fig. 15は glutaraldehyde, formaldehyde

の混合固定後 KMnO_4 固定によるもので頂囊から第一梗子が形成される初期の姿を示したものである。Fig. 19も同じ固定による試料であるが、これは発育の先端方向から観察した像で、ここには第二梗子が形成されてゆく状態や分生子が形成されている状態などが観察され、Fig. 15と、ともにその立体構造は走査電顕の威力を示している。

4. 分生子

glutaraldehyde 単独固定では分生子の最外側を構成する孢子殻上に12~15, 6条の長い畝状の構造が分生子の発育軸方向に平行的に形成されているのが観察される。またこのような構造をもつ分生子においては発育軸方向の両端に強い陥凹(矢印)の認められるものが多い。また分生子の成熟度の進んだもの、或いは多数集合している比較的未熟な分生子集団の中でも十分固定液と接触していたものは比較的短い畝状の隆起、或いは棘状の構造として同時に観察される (Fig. 20)。二重固定の方では長い隆起はまったく認められず、棘のみが観察される (Fig. 21)。またここにみられる棘は glutaraldehyde 単独固定でみられた棘に比較してかなり短く観察される。

分生子の表面構造の最大の特徴である棘は菌種によりかなり異なつた構造として観察される。Fig. 21のように *Aspergillus niger* の棘は円錐状の簡単な構造をしているが、*Aspergillus oryzae* ではその形態も比較的複雑である (Fig. 22)。Fig. 23は最先端に形成された *Aspergillus oryzae* 分生子の強拡大像である。

総括ならびに考察

不完全菌類に属する酵母様真菌の中で、人及び動物に病原性を示し、内因感染の原因菌として一般に知られているものに *Candida albicans* がある。また最もありふれた真菌の一つとして *Aspergillus* 属がある。これは食品に腐生し、また実験室内でもしばしば雑菌として認められるカビであり、最近特に増加しているアスペルギルス症の原因菌として重要な存在である。これら二種の真菌を実験材料として、近年新しく開発され、特に物体の表面の微細構造の観察にすぐれた効果を発揮してきた走査電顕を真菌学領域へ応用するための基礎的実験として、走査電顕用試料作製の基準方法を確立するのが本研究の目的である。

現在なお、真菌類の分類及び同定には形態学が大きな役割を果たしていることは否定できない。すなわち、*Candida albicans* を他の *Candida* 菌種より鑑別するには生物学的、免疫学的諸性状による鑑別法も一般的にかなり用

いられているが、最終的には形態学的特徴である厚膜孢子形成の有無が同定のきめてとなる場合が多い。また *Aspergillus* 属においてもほとんどその分類同定の基準は形態学的根拠におかれている。すなわち、分生子の形態や大きさ、或いは梗子のでき方や数により菌種の同定が行なわれている。

ところで真菌細胞の形態的观察は広く光顕的、或いは透過電顕的に追求されてきた。位相差顕微鏡による観察は生きたままの細胞形態を把握するには最良の方法であるが、その解像力は低く、しかも焦点深度が浅い欠点をもっているために、真菌類の形成する多種多様な孢子類の造生過程などを写真に記録することは非常に困難である。また透過電顕は試料作製法の面で大きな技術的困難性と試料調製のために長期の時間を要する欠点がある。また、表面構造を高倍率で観察する方法としては、古くから透過電顕試料としてのレプリカ法も行なわれているが、この方法も技術的面で非常に困難性があり、また得られた像の解読にも熟練を要する。これに対し、走査電顕は生物試料においても $200\text{\AA}$ に近い解像力を有し、最大の特徴として深い焦点深度 (1,000倍の倍率で $30\sim 60\mu$) をもっている。故に培地表面で発育している菌細胞も空気中に発育している気中菌糸も同一写真上に明確にとらえることができる。また物体の表面構造を観察するために、走査電顕の中には比較的大きな試料をそのまま挿入して、光顕レベルの低倍率で広い視野を観察することも容易である。その上、試料調製は実験方法で述べたように比較的簡単で、短時間内に調製できることである。

しかし、生物試料においては最終的に真空中で脱水、乾燥状態において、観察するために、必然的に収縮という現象が伴ってくる。生物試料を生きたままの (水をもっている) 状態にいかに近く、固定、脱水、乾燥という過程を経過させるか否かが得られた成績の学問的価値を決めると言つても過言ではない。

近年、生きたままの細胞形態の微細構造観察の一方法として freeze etching method が脚光をあびており、細胞の凍結乾燥による脱水方法が細胞内小器官の構造及びその存在場所を化学的に修飾することなく保持することができるので、走査電顕試料の脱水、乾燥にもこの方法を用いて、化学的固定剤によらない細胞の固定、脱水及び乾燥には学問的に大きな興味ももたれる。しかしこの方法にも生物試料凍結のための温度勾配や真空乾燥の時間的影響も大きく、装置も大がかりになり、走査電顕

試料調製のメリットの一つである迅速性が失われる。

そこでわれわれは脱水乾燥方法を Barber & Boyde⁴⁾により提唱され、生物試料作製にかなり有効な方法として賞用されているアセトンシリーズ脱水、空气中急速乾燥という方法を基盤として、これに対する種々の固定条件のちがいがどのように実験成績に反映するかを検討した。

そこでわれわれは実験方法で述べたような各種固定方法を *Candida albicans* 及び *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* の形成する種々の菌細胞について比較検討した成績について考察を加えてみると

1. 未固定の試料について

走査電顕を微生物試料の観察に応用した報告は数少なく、真菌類では Williams らの *Actinomycetes* に関する報告、飯塚²⁾による *Aspergillus* 属分生子の形態的観察、赤井³⁾の植物病原性菌類などについての報告が散見されるが、細菌類に関するものとしては Pease & Hayes⁵⁾の *Staphylococcus* に関する短報や、Murphy ら⁶⁾の *Bacillus polymyxa* の spore の観察に関するものなどがみられるが、いずれの報告においても微生物細胞を未固定のまま走査電顕試料として観察を行なっている。たしかに生物細胞の中で、これら微生物細胞はかなり強靱な細胞壁を有するので、ある程度の乾燥、真空処理に耐えて本来の細胞形態の一部を保持しているのは事実である。しかしながら前述のいずれの報告においても詳細に観察すると、特にカビ類細胞の真空処理による変形、ひずみがみとめられる。われわれも *Candida albicans* の種々の形態の細胞について未固定のまま乾燥、真空処理による変化を観察したが、その成績は実験成績の項で述べたように、特に 300～500 μ の厚い細胞壁を有する厚膜胞子においてさえ、かなりの試料形態の変形を認めた。ましてこれより細胞壁の菲薄な菌糸や酵母様細胞などについては細胞変形の増大は当然のことで、未固定のままこれら細胞を走査電顕試料として用いることは正常な表面構造を把握するためには無意味なことである。

2. glutaraldehyde 単独固定の試料について

最近、Sabatini ら⁷⁾ (1963) 及び Yasuzumi ら⁸⁾ (1964) は、formaldehyde、或いは glutaraldehyde 等の aldehyde 系の薬剤で前固定し、オスミウム酸による後固定が細胞質の保存はもちろんのこと、核の固定にも最適であることを明らかにして以来、動物細胞の観察にはいろいろな知見が加えられてきた。真菌類細胞では glutaraldehyde の前固定の後、KMnO₄ による後固定

によつて *Botrytis cinerea* の分生子の観察をした Buckley ら⁹⁾ (1966) の報告に始まり、われわれも同様の固定法を種々のカビ類細胞に用いて良好な成績を得ていることはすでに報告している^{10) 11) 12)}。

これら aldehyde 系統の固定剤のなかで、glutaraldehyde は蛋白質をよく固定できるが、脂質、特に磷脂質の固定には不十分であることは周知のことである。しかし、真菌類細胞の特徴である細胞壁に対する透過性においてもかなりすぐれた成績を示すので、この glutaraldehyde の単独固定を行なつて供試菌細胞の細胞形態の保持の状況を観察したわけであるが、いずれの試料においても glutaraldehyde の濃度、固定時間のちがいによる差異はほとんど認められず、いずれの場合でも細胞表面には小さな凹みや細胞表面に長軸的に大きな皺が形成されたり、細胞質がほとんど消失した老朽細胞などは強く圧平されてリボン状の形態すら認められるものもある。これらの現象は *Candida* や *Aspergillus* の菌糸形細胞に共通してみられた成績である。菌糸形細胞に比べて細胞壁の肥厚の著しい厚膜胞子、分生子柄及び頂囊などはやはり細胞壁の剛性が高いため、前記のものほど著しい圧平変化は認められないが、やはり大きな皺や局部的陥凹が認められた。これらの現象は glutaraldehyde 単独固定だけでは細胞質を構成する一部の組成に対する固定作用が不十分であるために起こつた現象であると考えられる。

glutaraldehyde 単独固定で *Aspergillus* の分生子にみられた成績にはかなり特徴があり、実験成績の項で詳述したように分生子が未熟なものや、成熟していてもそれらが多数集合していたため固定剤との接触が悪く、固定不十分であつた分生子では、分生子表面にその發育軸方向に平行に形成されている十数条の畝状の構造が認められる。これは胞子殻(spore hull)と胞子細胞壁との間に存在する電子透過性の高い領域の部分 (Fig. 24→印) の化学組成が glutaraldehyde によつては十分に固定されなかつたためであらうと考えている。この現象を逆用すれば、この固定方法によつて分生子の成熟度やその分生子外皮 (spore coat) 構築の脆弱部位なども推測することができる。

分生子の形態については飯塚¹³⁾による分類学的研究があるが、分生子の成熟度により表壁の形態が異なり、分生子の外壁と内壁との間に色素の粒や塊が存在すると報告している。この内壁と外壁の間にある層が先に電子密度の低い部分として指摘したところに一致すると考えら

れる。またそのなかには、分生子表面のレプリカによる観察成績も述べられ、表面の突起の形状によつて *Aspergillus* の分類を行なっている。しかし前述のとおり、固定条件のちがひにより *Aspergillus* 分生子表面の構造も著しく異なつた形態を示すことから考えると、なおいろいろの問題を含んでいる。

3. 二重固定の試料について

前述の glutaraldehyde の他に還元系の固定剤には formaldehyde, acrolein などがある。一個のアルデヒド基をもつ formaldehyde [$\text{H} \cdot \text{CHO}$] は固定能力の点では 2 個のアルデヒド基をもつ glutaraldehyde [$(\text{CH}_2)_3 \cdot (\text{CHO})_2$] に劣るが、細胞内への浸透性はより高いことが知られている。そこで実験方法で述べたように、この 2 種の aldehyde 系固定剤を併用して *Aspergillus* 菌細胞に対する固定効果を検討したが、glutaraldehyde の単独固定と比較してそれほど特記すべき効果は認められなかつた。この他、ビニール基をもつ aldehyde として acrolein [$\text{CH}_2=\text{CH} \cdot \text{CHO}$] があり、種々の物質に対する固定能力が強く、かつ真菌細胞に対する浸透力も強力であるが、本固定剤の効果についての成績は別稿に譲る。

一方、Luft¹⁴⁾ (1956)、ついで Mollenhauer¹⁵⁾ (1959) によつて KMnO_4 が細胞内の膜系構造をよく保持することが明らかにされて以来、植物細胞、真菌細胞に賞用されている。そこでわれわれは真菌類細胞に対して比較的浸透性の良い glutaraldehyde で前固定した後、 KMnO_4 水溶液で十分な時間をかけて後固定を行なう方法を用いた。この二重固定を行なつた試料では、前述の glutaraldehyde 単独固定で種々の真菌細胞にみられた大きな変形、収縮はほとんどみられず、生きている細胞と同様のふくらみをもつて固定されているのが観察される。

真菌類細胞の微細構造的特徴として、vacuole の存在が古くから知られている。菌糸の発育先端にある菌細胞は細胞質により充実され、その先端より遠い菌細胞ほど vacuole の存在が著しくなり、ついには細胞質のほとんどの容積を“スポンジ様空間”により占められる構造を呈することはよく知られていることである。

Zalokar¹⁶⁾ (1965) もふれているように、気中菌糸の剛性はその細胞壁の剛性により細胞形態が保持されていると考えるより、むしろ細胞内小器官である vacuole の膨満、緊張により維持されていると考える方が説明が容易である。このことは、*Candida* や *Aspergillus* の菌糸

において、不十分な単独固定や未固定の試料においても発育先端部では表面構造が平滑で、比較的まろく保持できるのに対し、この先端より遠ざかる細胞ほど強く圧平されている所見からも考察できる。これに対して、glutaraldehyde, KMnO_4 の二重固定では、いかなる位置にある菌糸細胞もまろくふくらみをもつて固定され、また、もちろん厚い細胞壁を有する厚膜孢子や分生子柄、頂囊などもその成熟過程のいかんを問わず、前にみられたような部分的陥凹、変形すら認めることができなかつた。ただ *Candida albicans* の菌糸形の細胞には細胞間の離断が認められるが、これは細胞壁がよく固定されたため前述の膨満緊張状態のまま細胞壁が固定されて剛体となつたため、短軸方向に変形収縮できず、収縮の方向が長軸方向にのみに現われたため、菌糸形細胞の細胞壁の物理的脆弱部位で離断されたものと考えられる。

また、分生子においても前述した特徴ある畝状隆起はまったく認められず、分生子自体は球状を呈し、その外側に比較的短い突起、或いは棘が観察される程度である。これは孢子殻、孢子壁、孢子質の固定が十分に行なわれた結果であり、真菌類細胞の走査電顕試料としての調製方法に所期の目的が達せられたものと思う。

この KMnO_4 固定で注意すべき点は、特に固定液の量が不十分な場合に細胞表面に存在する種々の代謝産物や培地の有機性成分が KMnO_4 と反応を起こして沈澱した物質が菌細胞表面に付着して、菌細胞の表面構造観察に重大な悪影響を及ぼすことをしばしば経験する。これを防止する方法としては glutaraldehyde 前固定後、数回蒸留水でよく洗滌した後に新鮮な KMnO_4 水溶液を十分な量加えて固定し、固定時間が長くなる場合は途中でまた新鮮な KMnO_4 水溶液と取り換えてやることであり、 KMnO_4 固定終了後も注意深く蒸留水で洗滌をくり返した後、脱水操作に移ることである。

結 論

真菌類の走査電顕用試料作製に種々の固定法を検討し、これが細胞表面の微細構造に及ぼす影響を調べた。

1. 未固定の試料においては著しい収縮変形がみられ、走査電顕試料として無価値な成績を示した。

2. glutaraldehyde 単独固定を行なつた試料においては、固定能力が不十分なため、なお収縮変形が起こり、真菌類細胞の表面微細構造を探索するのに不適当な方法であるが、その収縮程度から細胞質の充実度及び胞子の成熟度などがある程度推測できる。

3. glutaraldehyde, KMnO_4 による二重固定の試料

では、表面構造的にはほとんど変形はみられず、よい成績を得た。すなわち、目的とする生鮮標本の細胞形態に最も近似した成績が得られる試料作製方法である。

写真説明

略語 C S : 厚膜胞子 (Chlamydospore), P H : 仮性菌糸 (Pseudohypha), Y C : 分芽胞子 (Yeast form Cell), B S : 出芽痕 (Budding Scar), F : 菌糸 (Filamentous form Cell), v H : 栄養菌糸 (vegetative Hypha), V : 頂囊 (Vesicle), C P : 分生子柄 (Conidiophore), St : 梗子 (Sterigmata), C : 分生子 (Conidium), Sp : 棘 (Spicule), ap : 先端 (apex), S H : 胞子殻 (Spore Hull), S W : 胞子壁 (Spore Wall)

写真1 : 未固定, 氣中に伸長した仮性菌糸とその先端に形成された厚膜胞子 (水平方向から観察, 撮影したもの). 2,400倍

写真2 : 未固定, 氣中に伸長した仮性菌糸と厚膜胞子及び培地表面に横たわっている仮性菌糸. 2,200倍

写真3 : glutaraldehyde 固定, 厚膜胞子より遠ざかる仮性菌糸程扁平化が著しい. 3,100倍

写真4 : glutaraldehyde 固定, 同一菌糸内においても部分的に圧平度が異なる. 菌糸の扁平化されていない部分 (矢印). 3,400倍

写真5 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, どの菌細胞もまったく収縮変形がみられない. 3,400倍

写真6 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, 連続していた仮性菌糸の各々の細胞間に離断がみられる. 1,300倍

写真7 : glutaraldehyde 固定, 分芽胞子では変形が少ない. 3,100倍

写真8 : glutaraldehyde 固定, 強拡大観察すると分芽胞子にも皺がみられる. なかには出芽痕 (矢印) もみられる. 7,300倍

写真9 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, 非常に滑沢な表面を呈している分芽胞子. 5,200倍

写真10 : 未固定, 氣中に伸長した菌糸でその先端は比較的扁平化が少ない (矢印). 培地表面に横たわっている菌糸もみられる. 1,500倍

写真11 : glutaraldehyde 固定, 同一菌糸内でも部分的に圧平度が異なる. 2,300倍

写真12 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, 細胞の扁平化はみられないが, 菌糸細胞間に離断がみられる. 2,300倍

写真13 : glutaraldehyde 固定, *A. niger*, 培地上の栄養菌糸及び分生子柄と, その先端に形成された頂囊. 1,500倍

写真14 : glutaraldehyde, formaldehyde, KMnO₄ 固定, *A. niger*, 内容の消失した分生子柄. 5,500倍

写真15 : glutaraldehyde, formaldehyde, KMnO₄

固定, *A. niger*, 形成初期の第一梗子及び栄養菌糸, 3,600倍

写真16 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, *A. niger*, 頂囊, 梗子及び分生子には収縮変形はみられない. 3,300倍

写真17 : glutaraldehyde 固定, *A. niger*, 分生子を形成した梗子には小さな凹みがみられる. 2,000倍

写真18 : glutaraldehyde 固定, *A. niger*, 第一梗子と第二梗子との間の隔壁相当部には節状隆起がみられる. 7,800倍

写真19 : glutaraldehyde formaldehyde, KMnO₄, 固定, *A. niger*, 形成過程にある第二梗子及び分生子, 4,500倍

写真20 : glutaraldehyde 固定, *A. niger*, 収縮変形した分生子で, その發育軸方向に畝状隆起がみられる. 8,500倍

写真21 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, *A. niger*, 分生子表面には簡単な構造の棘がみられる. 8,500倍

写真22 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, *A. oryzae*, 分生子表面には比較的複雑な棘がみられる. 5,400倍

写真23 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, *A. oryzae*, 先端に形成された分生子の強拡大像, 先端部 (ap). 17,400倍

写真24 : glutaraldehyde, KMnO₄ 固定, *A. niger*, 分生子の切片像, 20,000倍

文 献

- 1) Williams, S.T. and Davies, F.L.: J. gen. Microbiol., **48**, 171—177, 1967.
- 2) 飯塚広: 日本農芸化学会43年度大会講演要旨集, 100, 1968.
- 3) 赤井重恭, 福富雅夫, 稲継芳弘, 白石雅也: 日本菌学会第12回大会講要集, 32—33, 1968.
- 4) Barber, C.V. and Boyde, A.: Zeitschrift für Zellforschung, **84**, 269—284, 1968.
- 5) Pease, R.F.W. and Hayes, T.L.: Nature, **210**, 1049, 1966.
- 6) Murphy, J.A. and Campbell, L.L.: J. Bact., **98**, 737—743, 1969.
- 7) Sabatini, D.D., Bensch, K. and Barnett, R.J.: J. Cell Biol., **17**, 19—58, 1963.
- 8) Yasuzumi, G. and Sugihara, R.: Experimental Cell Research, **33**, 578—580, 1964.
- 9) Buckley, P.M.S., Jaholl, V.E. and Someer, N.F.: J. Bact., **91**, 2037—2044, 1966.
- 10) 徳永純一, 徳永美知子, 江頭威, 原田薫: 真菌細胞の發育過程における微細構造の変化 (I) *Candida* 属の核分裂とその他の膜系の変化, 日本細菌学雑誌, 印刷中, 1969.
- 11) 徳永純一, 徳永美知子, 江頭威: 真菌細胞の発

- 育過程における微細構造の変化 (Ⅱ) 細胞壁構築過程における微細構造 (*Candida albicans* および *Candida stellatoidea* について), 日本細菌学雑誌, 印刷中, 1969.
- 12) 徳永純一, 徳永美知子, 江頭威: 真菌細胞の発育過程における微細構造の変化 (Ⅲ) (*Candida stellatoidea* 厚膜胞子の発芽能と発芽時の微細構造, 日本細菌学雑誌, 印刷中, 1969.
- 13) 飯塚広: 日本農芸化学会雑誌, 29, 325~331, 1954.
- 14) Luft, J.H.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 799—801, 1956.
- 15) Mollenhauer, H.H.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 431—436, 1959.
- 16) Zalokar, M.: The Fungi I, 403—404, Academic Press, New York, 1965.
- (昭和45年1月22日受付)
-