Leptospira の電子顕微鏡による形態学的研究 (第2報)

川 田 十 三 夫

鳥取大学医学部細菌学教室 (主任 高木篤教授)

青 井 浩

鳥取大学医学部皮膚泌尿器科学教室 (主任 吉田重春教授)

〔受付: 3月26日1959年〕

Leptospiraの培養中に顆粒構造が存在することは光学顕微鏡によつて古くから認められ、又、若干の電顕像も得られているが、その生物学的意義は必ずしも解明されていない。Leptospiraの生活環に顆粒構造がある役割を果たしていることを示唆する人は¹⁾²⁾³⁾、これが細菌の芽胞の様に休止期に相当する形態と考えている。吾々はLeptospiraの比較的陳旧培養中に顆粒形態を、又比較的幼若培養中に囊胞形態を電顕像で得たのでその意義について考察した。Leptospiraを蒸留水、胆汁酸塩、特異免疫血清などで処理、その細胞構造を究明することは以前から行われている。近時Bradfield & Cater⁴⁾はトリプシンによる解体処理をなし、スピロヘータ科の形態学的特徴は線維束であると述べている。吾々は前報⁵⁾においてLeptospiraの比較的幼若培養中に出現する正常形態を庇護的にあつめ、オスミウム酸固定を行つた試料の電顕像から、Leptospira細胞が1本の線維構造即ち軸糸とこれを螺旋状に取り巻く原形質並びにこの両者を包む薄い被膜から構成されることを述べたが、今回は更に各細胞成分の差異を究め、且、細胞構成の位置的關係を明らかにする為、二、三の物理的処理及びデソキシコール酸ソーダによる解体処理を行つて得た知見について述べる。

実験方法

供試株はL. icterohaemorrhagiae及びL. canicolaで九大第一内科ウイルス研究室より分譲されたものである。顆粒乃至囊胞形態の研究においてはKorthof培地に30°Cで培養したものを前報の場合と同様に庇護的にあつめ、磷酸塩緩衝液(pH 7.2)で洗滌後オスミウム酸で固定したものを電顕試料とした。

各種処理による細胞の形態学的変化の実験にはL. canicolaを使用し、Korthof培地1—2週間培養のものを遠沈洗滌して、夫々の処理を行つた後、凡て前報の様

にオスミウム酸固定をなし、蒸留水で洗滌後、再び蒸留水に再浮遊したものをコロジオン膜上にとり、クロミウムでShadowして鏡検に供した。

実験成績

1. 顆粒及び囊胞形態

L. icterohaemorrhagiaeを30°C30日間培養したものでFig. 1に示す様な末端顆粒を呈するものが比較的しばしば出現する。これは螺旋体の末端が膨大し、その内部は不規則な顆粒状をなし、又、時には軸糸を構成していたと思われる線維が突出しているが、周囲を取り巻く膜様構造は明らかでない。Mölberty⁶⁾はLeptospiraを高速遠沈で処置すると人工的に顆粒形態を呈することを示し、かゝる像の解釈に慎重な態度をとつている。Fig. 1に示した像についても、この点が考慮されねばならないが、この様な顆粒形態が陳旧培養に比較的多く出現することは単なる人工産物とはみなし難い。

Fig. 2はFig. 1と同様にL. icterohaemorrhagiaeの陳旧培養中に時に出現する遊離顆粒で、その内部は粗大な顆粒状を呈し、外層を形成していた膜の一部が剥離したと思われる像を示している。Czekalowski & Eaves⁷⁾もこの様な遊離顆粒の電顕像を得、休止期に相当する形態であると推定している。適当な環境下でかゝる顆粒から正常形態が発育しうるものであるか否か尚若干の疑問があるが、単に人工的に生じた形態とは考え難い。

Fig. 3, 4はL. canicolaの比較的若い培養中に時に

KAWATA Tomio, and AOI Hiroshi, : Morphology of Leptospirae revealed by electron microscope. (Part 2). Department of Bacteriology and Department of Dermatology and Urology, School of Medicine, Tottori University. Jap. J. of Bact., 11(8), 731-736, 1956.

出現する形態で、螺旋原形質が渦巻状を呈し、それを囊状の被膜が包んでより、その形態から囊胞型と呼称してよいであろう。Fig. 3 では囊胞は *Leptospira* 螺旋体の一端に生じている様だが、Fig. 4 では遊離して存在する。渦巻状を呈する原形質を取り巻いている density の低い包体が膜であることは、その density が正常形態の被膜と等しく、又、その表面に皺襞形成を示す像から明らかである。囊胞形態は顆粒形態の前段階的過程に相当するものと推定している。

2. 各種処理による *Leptospira* 細胞の変化

1) 加熱の影響

6日培養の *L. canicola* を洗滌後、0.05M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) に浮遊し、その 0.5ml を試験管に分注し、60°C水浴中で10分間加熱した後、オスミウム酸固定した試料では Fig. 5 に示す様に原形質は部分的に凝縮し、濃淡の縞模様をつくる。これは細菌細胞の加熱に際して生じる原形質の顆粒化と類似の現象であろう。原形質の density の低い部分の像は原形質の境界をなす膜の存在を示唆し、吾々は原形質膜と考えている。Fig. 6 は80°C10分間同様に加熱したもので原形質の断裂が認められるが、被膜は60°C加熱の場合と同様に犯されずに残っている。尚、前報において終末糸の形成機構の一つとして被膜の延長によるものがあることを指摘したが、この像においても被膜が延長して終末糸が形成されることを示している。

2) 蒸留水処理の影響

Leptospira を蒸留水で2回遠沈洗滌を繰り返し、再び蒸留水に浮遊し、冷室 (4°C) 中に96時間放置した後、オスミウム酸固定をなして鏡検した。Fig. 7 に示す様に多くのものでは低滲透圧のため被膜が破裂し、包まれていた原形質及び軸糸が露出し、原形質の一部、時には全ての部分において density が減少したものが認められるが、かかる処理で尚その形態及び density に余り変化がみられないものも少数混在している。

3) 紫外線長時間照射の影響

Leptospira を0.05 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) に浮遊し、15W マツダ殺菌灯で室温 (15~20°C) において液層2—3 mm 照射距離15 cm の条件で24時間紫外線照射すると Fig. 8 に示す様な変化が認められる。即ち、原形質はあるものでは著しく破壊され、被膜と共に無定形の集塊となっているが、比較的犯されずに残存しているものである。原形質が比較的犯されていない部分では被膜は伸展し扁平となっている。他方、軸糸は紫外線照射により殆ど認められなくなっている。

4) デソキシコール酸ソーダ処理による変化

Leptospira が胆汁酸塩により容易に溶解されることは周知の事実である。*Leptospira* の濁濁浮遊液に胆汁酸塩の一種であるデソキシコール酸ソーダを数%の割合に加えると直ちに透明化する。*L. canicola* を洗滌後、2.5% デソキシコール酸ソーダ含有磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) を加え、数分間放置して遠沈洗滌し、オスミウム酸で固定した試料では、Fig. 9 に示す様に被膜が完全に溶解消失し、包まれていた軸糸がほぐれて逸出するが、軸糸自身は殆ど犯されていない。尚、被膜に包まれている原形質も同時に露出し、部分的に凝縮して数珠玉状を呈している。Fig. 10, 11 は10% デソキシコール酸ソーダで同様に処理したもので、Fig. 10 においては原形質の density は減少し、部分的に溶解消失したものが認められる。Fig. 11 では矢印に示す部位、即ち露出した原形質の末端の近傍において軸糸が原形質に穿通して固着していることを明らかに示している。尚、軸糸の原形質穿通部は幾分膨隆している。

考 察

Leptospira の原形質内に時に *volutin* 顆粒乃至他の代謝顆粒と思われる density の高い顆粒が出現することは既に述べたが、この様な内部顆粒とはその性状が異なる顆粒構造の存在は既に *Noguchi*¹⁾ の当時より光顕で認められていた。この種の顆粒の径は正常の螺旋原形質のそれよりかなり大きく、螺旋体の諸所に単一又は数個生じ^{11) 3) 6) 8)}、時には遊離顆粒⁴⁾として存在する。吾々は *L. icterohaemorrhagiae* の30日培養において所謂末端顆粒及び遊離顆粒の像を得た。勿論この様な顆粒形態の他に変性破壊した細胞もみられ、又、変化が全く認められない正常形態も混在している。之等顆粒が変性又は死滅した細胞の破壊産物又は試料作成中に生じた人工産物であるという考慮が一応なされねばならない。*Mölberty*⁶⁾ は高速遠沈により生じたと考えられる人工産物の像を示しているが、吾々の得た像とは異なっている。他方、この様な顆粒形態がスピロヘータの生活環において一つの役割を演じていることが考えられている。*Hamp*⁹⁾ は *Oral Treponema* の31ヶ月培養中に暗視野で屈折性顆粒を認め、これを新しい培地に移植すると正常発育をなすことを示し、この顆粒が細菌の芽胞に相当する“*germinative unit*”であると述べ、その後 *Hamp*¹⁰⁾ らは諸種の *Treponema* でこの様な顆粒を電顕像で示した。*DeLamater*^{11) 12)} らは *Treponema pallidum* を *thioglycollate* 培地に培養し、位相差顕微鏡及び染色鏡検により月余にわたり観察をつづけ、*Treponema* の増殖は

普通横分裂で行われるが、一部のものは *gemma* を形成し、それが発芽し正常形態となると述べ、Hampp の再生発芽単位説に有力な支持を与えている。*Leptospira* においてもこの様な生活環の存在は古くから推察されていたが、Jakov¹⁾, Czekalowski ら³⁾, 吉井ら¹³⁾ は電顕像でみられる顆粒形態を休止期に相当する形態と考え、又、Woratz²⁾ は位相差顕微鏡で4—7ヶ月に及び陳旧培養中に多数の小球体を観察し、これを新培地に移植すると正常形態が発育することから、この小球体は *Leptospira* の休止型であると述べている。Fig. 1, 2 に示した顆粒形態は単に変性産物乃至人工産物とみなすよりも寧ろ *Leptospira* の生活環に何等かの役割を果すものであると考えられるが、今後その出現過程並びにその後の発育過程が追及されて確認されるべきである。

Fig. 3, 4 に示した嚢胞形態に関しては *Leptospira* では記載が少ない。Swain¹⁴⁾ は *L. icterohaemorrhagiae* において cystic form を示し、これが5日培養でもあらわれるが、7—10日培養でよりしばしば出現すると述べ、又吉井ら¹³⁾ も渦巻状の形態を電顕像で認め、両者は共にこれらが休止期に相当するものであろうと述べている。他方 Babudieri¹⁵⁾ はかかる形態は低滲透圧溶液にさらした結果生じたものであると記載しているが、吾々は蒸留水処理によりこの様な形態が増加する事実は得ていないので人工産物とは考え難く、比較的若い培養中に出現する故、顆粒形態の前段階的な形態と推察している。

Heden ら¹⁶⁾ Salton ら¹⁷⁾ 川田¹⁸⁾ は細菌細胞を加熱すると原形質が顆粒化することを電顕像で観察している。*Leptospira* を60°C及び80°C10分間加熱した場合も同様に原形質は部分的に濃縮し顆粒化がみられ、又一部では原形質が断裂している。軸糸も加熱により犯されるが、被膜は安定で、外部に対して障壁の役割をなしていると考えられる。

吉井ら¹³⁾ は *Leptospira* を蒸留水で洗滌すると氏等の呼称する粘液層が脱落し、又3日間蒸留水で処理したものは原形質吐出のため細胞体が扁平化し、細胞壁と軸糸が残ると述べている。吾々は *Leptospira* を蒸留水で洗滌する程度では最外層を形成する被膜は殆ど犯されないが、長時間処理すると多くのものでは被膜が破れ、原形質もあるものでは density を減じることを示した。被膜については前報で述べた様に一定の形態をもった薄膜である。*Leptospira* においては一定の形態をもたず、又脱落しやすい粘液層と名付くべき構造は認めなかったが、他方 *Borrelia duttoni* においては最外層として粘液層

と考えられる構造を認めている²⁰⁾。吉井ら¹³⁾ の呼称する細胞壁に対して吾々は寧ろ原形質膜と考えているが、その妥当性は今後究明するべきである。

Bartholomew ら²¹⁾ は細菌細胞を紫外線で長時間照射すると、細胞は透過性をまし、不規則となり、細胞膜は伸展し扁平化することを観察し、この現象を photolysis と云っている。*Leptospira* を紫外線で長時間照射すると被膜が細菌細胞膜における様に伸展し扁平となつた像がみられる。あるものでは被膜及び原形質が破壊し塊状を呈している。軸糸は加熱の場合と同様に認め難くなっているが、恐らくこの処理で断裂し破壊されたのである。

Schneider²²⁾ は *Leptospira* をデソキシコール酸ソーダ溶液で処理し、その融解液より補体結合性物質を分割抽出し、それがDNAをふくむことを明らかにしている。Czekalowski & Eaves²³⁾ は0.01—0.1%のデソキシコール酸ソーダで *Leptospira* を解体した場合、最初に細胞質が溶解すると述べ、又軸糸は細胞質を包む膜の外側に密接して存在するといひ、吾々の記載した被膜の像は示していない。彼等は試料作成の際、固定前に蒸留水で頻回洗滌している故、被膜が剝離脱落したのではないかと思う。*Leptospira* の試料作成は庇護的に行われねばならない。吾々はデソキシコール酸ソーダ処理により先ず被膜が溶解消失し、包まれていた原形質及び軸糸が露出し、軸糸は犯されないが、原形質は部分的に凝縮し、遂には一部溶解することを示した。又、Fig. 11 に示す様に軸糸は原形質の末端近傍において原形質に穿入しているが、恐らく軸糸の他端も同様に原形質に穿入し固着していると考えられる。Czekalowski ら²³⁾ も同様な所見を得、彼等は軸糸の末端は end-knob として終ることを示しそれが blepharoplast に擬せらるべきものであろうと述べている。吾々も多くの人と⁴⁾ 19) 23) 同様に軸糸が運動器官としての機能をもっていると推察しているが、その証明は今後の研究に俟たい。

上述の様に各種の物理的・化学的処理を *Leptospira* に行うことにより、前報で述べた *Leptospira* 細胞の基本的要素である被膜、原形質、軸糸の性状の差違並びに細胞構築の位置的關係の若干を明らかにすることが出来た。

結 論

1. *L. icterohaemorrhagiae* の陳旧培養中に末端顆粒及び遊離顆粒を、又、*L. canicola* の比較的幼若培養中に嚢胞形態を電顕像で認め、夫々の生物学的意義に検討を加えた。

2. *L. canicola* の正常形態に各種の物理的・化学的処理を行い、その形態学的変化より各細胞成分の差異並びに細胞構築の位置的關係を明らかに示した。即ち、

1) 60°C及び80°C10分加熱により原形質は部分的に凝縮し、軸糸は認め難くなるが、被膜は犯されずに残存する。

2) 蒸留水中に長時間放置すると被膜が破れ、包まれている軸糸及び原形質が露出する。軸糸は犯されないが原形質はあるものでは *density* の減少がみられる。

3) 紫外線長時間照射により軸糸は認められなくなるが、被膜は扁平化し、原形質と共に残存する。あるものでは原形質及び被膜が破壊され塊状となる。

4) デソキシコール酸ソーダで処理すると先ず被膜が溶解消失し、包まれている原形質及び軸糸が露出する。軸糸は犯され難いが、原形質は数珠玉状に顆粒化し、遂には部分的に溶解消失する。尚、この処理により軸糸が螺旋原形質の末端近傍で原形質内に穿入固着していることを示した。

(御指導御校閲をいただいた高木教授に深謝し、又御鞭撻をいただいた吉田教授並びに電顕撮影に協力された勝本哲央氏に感謝します。

文 献

- 1) Jakob, A.: Klin. Wochschr., 27, 364-366, 1949.
- 2) Woratz, H.: Zbl. Bakt., I. Orig., 160, 613-628, 1953/54.
- 3) Czekalowski, J. W. & Eaves, G.: J. Bact., 67, 619-627, 1954.
- 4) Bradfield, J. R. G. & Cater, D. B.: Nature, 169, 944-946, 1952.
- 5) 川田十三夫, 青井浩: 日本細菌学雑誌 11, 471, 1956.
- 6) Mölbert, E.: Z. f. Hyg. Infek., 141, 82-90, 1955.
- 7) Noguchi, H.: Jordan & Falk's "The newer Knowledge of Bacteriology and Immunology", 452-497, 1928.
- 8) 朝倉善作: 日本細菌学雑誌, 7, 335-338, 1952.
- 9) Hampp, E. G.: J. Am. Dental Assoc., 32, 201-206, 1946.
- 10) Hampp, E. G., Scott, D. B. & Wyckoff, R. W. G.: J. Bact., 56, 755-765, 1948.
- 11) DeLamater, E. D., Wiggall, R. H. & Haanes, M.: J. Exp. Med., 92, 239-246, 1950.

- 12) DeLamater, E. D., Wiggall, R. H. & Haanes, M.: J. Exp. Med., 92, 247-250, 1950.
- 13) 吉井善作, 小野栄一: 第7回日本細菌学会中, 四国地方支部総会演説要旨, 1954.
- 14) Swain, R. H. A.: J. Path. Bact., 69, 117-128, 1955.
- 15) Babudieri, B.: J. Hyg., 47, 390-392, 1949.
- 16) Heden, C. G. & Wyckoff, R. W. G.: J. Bact., 58, 153-160, 1949.
- 17) Salton, M. R. J. & Horne, R. W.: Bioch. Bioph. Acta, 7, 19-42, 1951.
- 18) 川田十三夫: 日本細菌学雑誌, 9, 875-880, 1954.
- 19) 吉井善作, 小野栄一: 東京医事新誌, 72, 449-450, 1955.
- 20) 川田十三夫, 青井浩: 第29回日本細菌学会総会, 1956.
- 21) Bartholomew, J. W. & Mittwer, T.: J. Bact., 64, 1-8, 1952.
- 22) Schneider, M. D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82, 655-659, 1953.
- 23) Czekalowski, J. W. & Eaves, G.: J. Path. Bact., 69, 129-132, 1955.

写真説明

- Fig. 1) *L. icterohaemorrhagiae* 30日培養中にみられる末端顆粒を示す。×35,000
- Fig. 2) *L. icterohaemorrhagiae* 30日培養中にみられる遊離顆粒を示す。×35,000
- Fig. 3) 及び Fig. 4) *L. canicola* 12日培養中にみられる囊胞形態を示す。×28,000
- Fig. 5) *L. canicola* (6日培養) 60°C 10分加熱したもの。×32,000
- Fig. 6) *L. canicola* (6日培養) 80°C 10分加熱したもの。×32,000
- Fig. 7) *L. canicola* (10日培養) 蒸留水中に96時間(4°C)放置したもの。×32,000
- Fig. 8) *L. canicola* (12日培養) 紫外線24時間照射による変化を示す。×28,000
- Fig. 9) *L. canicola* (10日培養) 2.5% デソキシコール酸ソーダ処置により被膜消失し、原形質及び軸糸が露出し、原形質が数珠玉状に凝縮している。×32,000
- Fig. 10) *L. canicola* (10日培養) 10% デソキシコール酸ソーダ処理により原形質の一部溶解したものを示す。×32,000
- Fig. 11) *L. canicola* (10日培養) 10% デソキシコール酸ソーダ処理したもので、矢印は軸糸の原形質穿通部を示す。×48,000