電子顕微鏡による Reiter スピロヘータの 細胞構造に関する研究

川 田 十 三 夫

鳥取大学医学部細菌学教室 (主任 高木篤教授)

[受付: 6 月 17 日 1957 年]

Treponemataceae 科の細胞構造は最近電子顕微鏡により漸次明かにされつつあり、従来 *Treponema pallidum* (以下 TP と略) の非病原性培養株といわれた Reiter スピロヘータ (以下 RS と略) に関しても Schmeirold & Deubner¹⁾, Mölbert²⁾ の報告があり、彼等は RS が他の *Treponema* と同様に原形質を取り巻く細線維束を有することを明かにしている。併し、その表面構造、原形質内部構造、各細胞成分の性状並に位置的関係については知見が乏しく且曖昧である。著者ら³⁾⁻⁶⁾ は既に *Leptospira* の数種、*Borrelia duttoni*, TP について形態学的研究を発表したが、今回はこれら研究の一環として RS をとりあげ、その正常形態並に若干の処理を行ったものゝ電顕像及び超薄切片像を得知見を加えたので報告する。

実験方法

本実験に使用した RS は石坂博士 (予研) の御好意により分譲を受けたものである。培地は Gelperin⁷⁾ のものを改変して使用した。即ち、ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 5.0 g, ブドウ糖 5.0 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.0 g, チオグリコール酸ソーダ 1.5 g, L-チスチン 0.75 g を蒸留水 1000 ml に溶解し、100 °C 30 分間加熱後濾過し、試験管分注後 120 °C 15 分間滅菌し、10% の割に兔血清を添加し、60 °C 30 分加温した。接種後流動パラフィンを重畳し、37 °C に培養した。この培地で RS は 24—48 時間で速かに発育し濁濁してくる。実験には通常 2 日毎に継代したものゝ 2 日培養を遠沈し、沈渣を 0.85% 食塩添加 0.05 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.3) で 1—2 回洗滌後、0.5 % オスミウム酸磷酸塩緩衝液 (pH 7.3) で室温 15 分間固定後、蒸留水で遠沈洗滌し再び蒸留水に浮游したものをコロジオン膜を張ったメッシュにのせて乾燥後、パラジウムで shadow して電顕試料とした。尚、各種処理を加えたものも凡て処理後同様にオスミウム酸

固定を行った。

超薄切片の作成は既に発表した方法⁴⁾ にもとずいて行つた。固定は 0.5 % オスミウム酸磷酸塩緩衝液 (pH 7.3) で 5 °C 18 時間行い、洗滌後型の如くアルコール系列中で脱水し、モノマーに包埋し、日本電子光学研究所製超ミクロトームにより切片を作成し、脱包埋することなく鏡検した。

実験成績

1. 正常形態及び終末系

2 日培養の RS をオスミウム酸で固定したものは Fig. 1 に示す様に細胞体は一般に TP の病原株に比して回転がゆるやかで且不規則に蛇行する。かゝる像は暗視野顕微鏡下での生活時の所見と一致する。原形質は一樣に密度が高く内部構造を示さないが、矢印に示す様に細胞の外部を包む平滑な膜状構造が認められる。Fig. 2 は一部拡大したもので外部を包む膜状構造は *Leptospira*⁸⁾ に観察された様に鮮明ではないが、*Borrelia*⁹⁾ における表面不規則で容易に剥脱される層状構造 (粘液層) とは異なる。これは *Leptospira* と *Borrelia* の表面構造との中間的性状を示す様で、形態学的により膜状構造に近いと考えられるので被膜と名付たが、これは後述する様に細胞膜とは別箇のものである。尚、矢印は横分裂が行われることを示唆する像である。又、細菌細胞でみられる様な隔壁の形成も観察された。

RS の終末系は Fig. 3 に示す様に時に観察され、この場合矢印は終末系の表層が剥脱し、その内部を構成している細線維が露出しているのを示す。この細線維は後述の細線維束の延長したものと考える。Fig. 4 に示す様

KAWATA Tomio: Electron microscopic studies on the cellular structure of Reiter spirochete. Department of Bacteriology, Tottori University School of Medicine. — Jap. J. of Bact., 12 (8), 657-662, 1957.

に時に2個の細胞が終末糸様構造で連絡したものがみられ、終末糸が細胞分裂の際出現する異常形態であることを示唆する。終末糸は細胞の被膜の延長により包まれているが、この部分では表面粗で寧ろ層状構造を呈している様である。

2. 各種処理による細胞の解体像

1) サポニンによる処理

RSは蒸留水で洗滌した程度では *Borrelia* における外層の剥脱に伴う様な変化はおこらず、その内部構造をうかがうには不都合であった。サポニンは一般に *Treponema* を溶解する故、洗滌したRSに1%サポニン含有磷酸塩緩衝液を加え室温30分間処理した。Fig. 5, 6に示す様に外部の膜状構造が殆ど溶解し、包まれていた構造が明かになる。Fig. 5において矢印に示す様に細線維束が螺旋原形質を右巻に螺旋状に取り巻き、又それはFig. 6の矢印に示す様にそれらは個々の線維が別々に細胞末端近傍で原形質に穿入固着し、その基部は幾分膨隆し小体を形成している様である。尚、細線維束は通常5—6本、時に8本の細線維からなる。この処理により原形質も扁平化し、その密度を減じるが、螺旋形状は保持する故、これが比較的強固な膜—細胞膜—で包まれていることを示唆する。TPの病原株はサポニンのこの程度の処理では変化を受けない。

2) デンキソール酸ソーダによる処理

デンキソール酸ソーダによるスピロヘータの解体像は既にしばしば報告したが^{9)・10)}、これは可成強く細胞に作用する。RSはその0.05%の濃度でも作用を受け、TP病原株よりも抵抗が弱い。Fig. 7, 8は0.1%デンキソール酸ソーダ含有磷酸塩緩衝液で室温15分間処理したもので、表面の被膜は溶解し、細線維束及びghost化した原形質が露出する。細線維束は細胞両末端近傍で原形質に穿入固着し、原形質は扁平化すると共に密度を減じ殆どghost化し、諸所に小顆粒形成がみられるが、尚その螺旋形状をとどめ、これが抵抗の強い膜で包まれていることを示唆し、これは超薄切片像でみられる原形質自体を包む膜に該当し、細胞膜と考える。

3) 自家融解による処理

RSを洗滌後、0.85%食塩含有磷酸塩緩衝液に浮游し、その5mlを試験管に分注し、トルオール0.2mlを加え37°Cにおくと時間の経過と共に浮游液の濁濁度が減じる。Fig. 9は2時間経過したもので被膜が膨化して一部崩壊し、細線維束も露出し、又原形質も密度を減じている。Fig. 10は流動パラフィンを除去した培養液にトルオールを添加し37°C 24時間おいたもので、被膜は溶解

し、細線維が露出し、矢印に示す様にそれらが個々に原形質末端近傍に穿入固着している。かゝる像はRSの自家融解による解体像で、陳旧培養中には類似の像がみられる。RSの自家融解は電解質をふくまぬ蒸留水中ではおこり難いが、その詳細は改めて報告する。

3. 超薄切片像

スピロヘータの原形質内部構造に関しては知見が極めて乏しいが、著者ら⁴⁾は *Borrelia* において可成り良好な超薄切片を得、その内部構造が細菌のそれに類似することを示した。Fig. 11, 12, 13はRSの超薄切片像で、原形質はFig. 11にみる様に点刻状構造を示し、その周囲を境界鮮明な膜—細胞膜—が包む。原形質の内部には細菌の切片像^{8)・10)}における所謂 *nuclear site* に相当して密度の低い部位があり、その中に線維状乃至網状構造がみられる。これらのあるものは形態学的に細菌細胞にみられる核様装置に相当するものに擬せられるが、その同定は今後の研究にまたねばならない。尚、外側の被膜はFig. 11において細胞膜の外側に不鮮明な境界として示される。細線維束は切片像中に確認し得なかつた。

考 察

RSは形態学的研究でTPの非病原性培養株として漠然と取り扱われていることが多いが^{11)・12)}、最近 *Schmerold*¹⁴⁾も指摘する様に種々の観点(運動様式の差、病原性の有無、形態学的免疫学的差等)からTPに属せしめるより *Treponema* 属の別の *species* を設定するのが妥当と考える。即ちRSの運動はTPに比して緩慢で非系統的である。又、形態学的にはTPに比して回転がゆるやかで不規則なこと及び細胞がより柔軟で表面活性剤などの作用を受け易い。免疫学的にも両者の差が認められ¹⁵⁾¹⁶⁾、著者もRSの免疫家兎血清について梅毒血清反応が凡て陰性なることを確めた。尚このRS免疫血清はRSを強く凝集した。

RSの電顕による形態学的研究はTPのそれと共に行われ、古くは *Mudd* ら¹¹⁾、*Morton* ら¹²⁾の報告があるが、彼等はTPにおけると同様に細線維束のほぐれたものを鞭毛と記載した。最近 *Schmerold* ら¹⁴⁾、*Mölb-bergt*¹⁵⁾はRSの電顕像を発表しているが、その細胞成分について系統的には述べていない。TPの文献的考察は協同研究者青井の論文⁶⁾に詳しいので省略し、RSの各細胞構成成分について他のスピロヘータとも比較して考察を試みる。

1) 表面構造並に細胞膜

Leptospira において著者ら¹⁾はオスミウム酸固定によ

りその外表面に明かな膜状構造を認め、これを被膜と呼び細胞膜に相当するものではないかと示唆し、その後 Swain¹⁷⁾も同様所見を得てこれを *cell wall* と名付けているが、この構造が各種の処理で比較的容易に溶解し、又細胞の形態保持に関与しない点などから武谷ら¹⁸⁾も指摘する様に細胞膜乃至細胞壁とは考えられない。併し、それは *Borrelia* の表面を包む層状構造 (粘液層)⁴⁾とは明に異り、サポニンでは影響されないし、又、細菌の莢膜乃至粘液層においてはオスミウム酸固定をおこなつてもかゝる明かな膜状構造は呈しない。以上の諸点からこれは膜状構造を呈する細胞成分と考える故、この表面構造を粘液層^{19) 19)} (*slime-like layer*) と呼ぶのは妥当でなく、又著者の呼称した被膜 (*outer membrane*) も細胞膜と紛らわしい点で他に適当な名称が検討さるべきである。R S の表面構造は *Leptospira* の様な鮮明な被膜ではないが、*Borrelia* の外層とは異なり、表面平滑で蒸溜水洗滌処理では脱落し難い膜状構造を呈する故、一応被膜と名付けた。T P においてもこの被膜の存在がたしかめられたが^{20) 20)}、*Treponema* 属においてそれは *Leptospira* と *Borrelia* との中間的段階の形態学的構造であろう。渡慶次²¹⁾は T P において被膜の外側に線維束が存在すると述べているが、これは位置的には後述する細胞膜に相当するもので、著者のこの膜状構造については記述がない。吉井²¹⁾は凡てのスピロヘータの表面を粘液層が包み、T P でも同様であると述べているがその像は明かでない。古くは Mudd ら¹¹⁾が *Treponema* の *cell wall* 乃至 *periplast* の存在に言及し、又 Hampp ら²²⁾は明かな細胞膜は認めないと述べていが、それらの電顕像において表面構造の同定は困難である。Schmerold ら^{11) 14)}、Mölberr²³⁾もこれら表面構造に関して明確に記述せず、又、Swain²³⁾は T P では細胞膜が細線維束を包んでいると述べ、著者の被膜を細胞膜と見なしている。R S の被膜は表面活性剤及び自家融解などで比較的容易に溶解し、それが包んでいた細線維束を露出するが、細胞の形状は尚保持されている故、この膜状構造を細胞膜とは考えられない。細胞膜は超薄切片で示された原形質を境する単一な膜として示され、各種の処理後にも残存し細胞の螺旋形状を保持している。*Borrelia* の切片像で示した原形質を包む単一な膜も細胞膜であろう。

2) 細線維束

Bradfield & Cater²⁴⁾がスピロヘータの形態学的特徴は原形質を取り巻く線維乃至細線維束であると述べて以来 *Treponema* でもこの点が多く研究者により確められ^{1) 2) 5) 6) 20) 21) 23)}、恐らくそれは運動器官であろうと云

われている。R S において Schmerold ら¹¹⁾はこれが 4—6 本、Mölberr²³⁾は 5—12 本の細線維よりなることを観察した。細線維束は被膜が除去されると明かに示され、その際これが細胞両末端近傍で原形質に個々の線維に分離して穿入固着し、その基部でやゝ膨隆したものがみられる。この所見は細菌の鞭毛基部でみられる基粒 (*blepharoplast*)^{25) 26)}、又は *Leptospira* で Czekałowski ら²⁷⁾が軸糸の基部で観察した *end-knob* に類似し興味深い。尚、細線維は表面活性剤による処理及び自家融解にも抵抗する。

3) 原形質

幼若培養の R S では原形質は一様に密度が高く無構造にみえる。陳旧培養では他の研究者^{11) 20) 22)}の認めた様な原形質の老變変性によると思われる顆粒像乃至断裂像、又は膨隆体を認めたが、これらについては改めて報告する。原形質は各種の処理で密度を減じ扁平化し、又ある場合には小顆粒化が著明である。一般に T P に比し原形質は柔軟で脆弱である。

スピロヘータの超薄切片像は Mölberr²⁸⁾、著者ら⁴⁾が *Borrelia* で観察しているが、R S も *Borrelia* のそれによく類似する構造を示した。即ち、海綿様構造を示す原形質は明確な膜—細胞膜—で境され、その内部に細菌の所謂 *nuclear site* に類似した密度の低い領域があり、その中に核様装置を示唆する様な線維状構造を認めたが、勿論その同定は顕微化学的方法と共に行われねばならない。

4) 終末糸

著者ら^{4) 4)}は *Leptospira*, *Borrelia* で夫々終末糸を認め、その形成機構を考察し、それが細胞成分の種々の組合せてなることを示唆した。*Treponema* の終末糸について Mudd ら¹¹⁾はそれは *cell wall* の延長により形成されると述べているが、その電顕像からの構成に言及するのは無理であつた。Mölberr²³⁾は膜で包まれた細線維が突出して終末糸をなしていると述べているが、表面の粗糙なことからこれは寧ろ層状構造であろう。著者も R S において時に終末糸を観察し、それが細線維束及びそれを包む外層からなるものがあることを示し、又その形成機転を示唆する像を得、これが細胞の横分裂に際し異常形態として出現することを明かにした。

結 論

Treponema pallidum の所謂培養株と云われた Reiter スピロヘータの正常形態及び各種の処理を加えたもの並に超薄切片の電顕像からその細胞構造に関して次の

知見を得た。

1) RSは通常5—8本の細線維よりなる細線維束が比較的回転の不規則でゆるやかな螺旋原形質を右巻に螺旋状に取り巻き、この両者を膜状構造—被膜—が包む。原形質自体は境界明かな細胞膜で包まれ、その内部に密度の低い領域が宛も細菌細胞の所謂 *nuclear site* に相当して存在し、その中に線維状乃至網状構造を超薄切片像で認めた。

2) 1%サボン及び0.05%—0.1%デソキシコール酸ソーダによる処理又は自家融解により被膜は溶解し、原形質も密度を減じ扁平化し、遂には細胞膜を残して殆ど *ghost* 化するが、細線維は犯されない。尚かゝる処理で細線維束は細線維が個々に細胞両末端近傍で原形質に穿入固着し、しかもその基部で幾分膨隆していることを示した。

3) RSは他の生物学的性状と共に形態学的にもTPの病原株とは異り、*Treponema* 属の別の *species* として取り扱うのが妥当である。

4) 時に終末糸を観察し、その形成機転を考察した。

(本論文の要旨は第30回細菌学会総会に発表した)。

御指導御校閲をいただいた高木教授に感謝する。尚、本研究は文部省科学研究助成金の援助を受けた。

文 献

- 1) Schmerold, W. & Deubner, B.: *Hautarzt*, 5, 511-513, 1954.
- 2) Mölberty, E.: *Z. Hyg.*, 142, 510-515, 1956.
- 3) 川田十三夫, 青井浩: *日本細菌学雑誌*, 11, 471-476, 1956; 11, 731-736, 1956.
- 4) 川田十三夫, 松尾仁, 青井浩: *日本細菌学雑誌*, 11, 911-916, 1956.
- 5) 川田十三夫, 松尾仁, 青井浩: 第29回日本細菌学会総会, 1956; 第12回電子顕微鏡学会, 1956.
- 6) 青井浩: *米子医学雑誌*, 7, 543-567, 1956.
- 7) Gelperin, A. & Conn, N.H.: *Am. J. Syph. Gonorr. & Ven. Dis.*, 33, 101-113, 1949.
- 8) Chapman, G. B. & Hillier, J.: *J. Bact.*, 66, 362-373, 1953.
- 9) Maaløe, O., Birch-Andersen, A. & Sjöstrand, F. S.: *Bioch. Bioph. Acta*, 15, 12-19, 1954.
- 10) Piekarski, G. & Giesbrecht, P.: *Naturw.*, 43, 89-90, 1956.
- 11) Mudd, S., Polevitzky, K. & Anderson, T. F.: *J. Bact.*, 46, 15-24, 1943.
- 12) Tung, T. & Frazier, C. N.: *Am. J. Syph. Gonorr. & Ven. Dis.*, 30, 205-210, 1946.
- 13) Morton, H. E., Rake, G. & Rose, N. R.:

Am. J. Syph. Gonorr. & Ven. Dis., 35, 503-516, 1951.

- 14) Schmerold, W.: *Zbl. Bakt.*, 166, 274-296, 1956.
- 15) Portnoy, J. & Magnuson, H. J.: *J. Immunol.*, 7, 348-355, 1955.
- 16) 石坂照子他: 第29回日本細菌学会総会, 1956.
- 17) Swain, R. H. A.: *J. Path. Bact.*, 73, 155-158, 1957.
- 18) Takeya, K., Mori, R. & Toda, T.: *Japan. J. Microb.*, 1, 99-104, 1957.
- 19) 吉井善作, 小野栄一: *東京医事新誌*, 72, 449-450, 1955.
- 20) 渡慶次賀学: *十全医学会雑誌*, 57, 2117-2125, 1955.
- 21) 吉井善作: *皮膚科紀要*, 51, 150-153, 1956.
- 22) Hampp, E. G., Scott, D. B. & Wyckoff, R. W. G.: *J. Bact.*, 56, 755-769, 1948.
- 23) Swain, R. H. A.: *J. Path. Bact.*, 69, 117-128, 1955.
- 24) Bradfield, J. R. G. & Cater, D. B.: *Nature*, 169, 944-946, 1952.
- 25) Houwink, A. L. & van Iterson, W.: *Bioch. Bioph. Acta*, 5, 10-44, 1950.
- 26) Tawara, J.: *J. Bact.*, 73, 89-91, 1957.
- 27) Czekalowski, J. W. & Eaves, G.: *J. Path. Bact.*, 69, 129-132, 1955.
- 28) Mölberty, E.: *Z. Hyg.*, 142, 203-212, 1956.

写真説明

- Fig. 1 RSの正常形態。矢印は被膜を示す。(×12,000)
- Fig. 2 末端部の拡大像で矢印は横分裂の部位。(×35,000)
- Fig. 3 終末糸で矢印は細線維の露出を示す。(×28,000)
- Fig. 4 終末糸の形成機転を示唆する像。(×30,000)
- Fig. 5 1%サボン処理像。矢印は露出した細線維束を示す。(×28,000)
- Fig. 6 1%サボン処理像。矢印は穿入固着部でやゝ基部の膨隆した細線維を示す。(×35,000)
- Fig. 7, 8 0.5%デソキシコール酸ソーダ処理像。(×12,000 及 ×30,000)
- Fig. 9 トルオール添加後 37°C 2時間経過した自家融解像。(×21,000)
- Fig. 10 トルオール添加 37°C 24時間後の自家融解像。矢印は細線維の原形質末端近傍の附着部を示す。(×25,000)
- Fig. 11, 12, 13 RSの超薄切片像。CWは細胞膜, Fは原形質内の線維状構造を示す。(×48,000)