電子顯微鏡によるスピロヘータの研究

その三 鼠咬症病原体について

朝 倉 善 作

京都大学医学部微生物学教室 (主任 木村康教授)

鼠咬症病原体は本邦に於てはその形態学的特徴及び性狀からして一般にスピロヘータの一つとして取扱われているが、異論があり *Spirillum* に属すと主張する研究者 (Adachi,¹⁾ Ch. Ruys,²⁾ Robertson,³⁾ Topley and Wilson,⁴⁾ Breed et al.⁵⁾ も少なくなく、又論議の余地ありとする人々 (Bayne-Jones,⁶⁾ Noguchi,⁷⁾ Mühlens⁸⁾) もあり、分類学上決定的な結論が出されていない。

Spirillum 説を唱うる人々は *Spirillum* には鞭毛が存在する、細胞体が硬固である、彎曲が平面的屈曲であつて螺旋でない等の点が *Spirochaeta* との差異であると述べ、之を論拠とし本微生物は之に該当するが故に *Spirillum* であるとしている。しかしながら、最近スピロヘータにも鞭毛を有するものが認められて来た故 *Spirillum* と *Spirochaeta* との区別は甚だ困難となつて来ている。(木村康著 細菌学及び免疫学 7 版 4 頁昭和 26. 参照)

著者は第一報⁹⁾ に於てスピロヘータの電子顯微鏡的研究の文献を紹介すると共に *Borrelia duttonii* について、第二報¹⁰⁾ に於ては *Leptospira* 5 株について電子鏡檢し観察せる所を報告した。今回は本邦に於ける一般慣例と著者自身の見解により本微生物をスピロヘータの電子顯微鏡的研究の中に暫定的に包括し、之によつて得られる知見が分類学上にも何か資料を與えるのではないかと考え採り上げた次第である。

本微生物の電子顯微鏡的研究は著者の調べた範囲では未だ報告されていないようである。なお本微生物の分類学的方面は他日別稿にて論述する予定である。

実 験

供試スタムは当教室に於てマウスに接種、継代保存しある人系長谷川株と鼠系京大微生物株の 2 株である。

試料調製方法 上記スタムをマウスに接種しその腹腔液を材料とした。本微生物は感染マウスの血液中には勿論腹腔液中にも多数出現することは研究初期より知られていたが、西沢・鯛瀬¹¹⁾ は本現象について緻密な観察を行い、腹腔液中には血液中よりも恒常多数出現すると報

告している。

スピロヘータの電子顯微鏡試料の調製にあたり被検体を生体材料に求める場合には精製を必要とすることは著者の第一報⁹⁾ に於て詳しく述べた所である。それ故精製の容易なることからして夾雑物が少く、又被検体の豊富な腹腔液を用いることは血液を材料とするよりも遙かに賢明である。

さて、西沢・鯛瀬は本微生物が感染マウスの血液中よりも腹腔液中に多数出現すると報告したのは前述の如くであるが、著者の体験では毎常必ずしもそうではなく、又稀に多数出現することがあつても決して精製時の損耗に耐える程の著明なものでないことが屢々あつた。かかる場合には福島氏法¹²⁾ による増菌を試みた。即ち、マウスに接種後 7~10 日して感染を確認し、毎日若しくは隔日に非働性家兔血清 (クエン酸で pH 6.0 に修正せるもの) 0.2~0.3 cc 宛腹腔内に注入すること数回、然る時には本微生物は該マウス腹腔液中に無数に増加出現する。之を毛細管ピペットで穿刺採取し、分割遠沈、集菌洗滌して精製した。一回の試料調製には 30~50 匹のマウスを使用した。それは一匹のマウスから無理をせず採取し得る腹腔液の量は 0.1~0.2 cc であり、精製過程に於て相当の損耗を招来する故多数のマウスを使用することが望ましいからである。

マウスは本微生物を終生保菌すると雖も、一度使用したマウスに再度上記増菌法を試みても失敗に終ることが多かつた故試料調製には恒常新に感染せしめたマウスを使用しなければならなかつた。

腹腔液中の粗大有形成分 (主に白血球) の分離には 1000 回轉 5 分間遠心沈澱するか、又は腹腔液を入れた遠沈管をそのまま数時間乃至十数時間氷室内に静置することに

ASAKURA Zensaku: Studies of the Spirochaetes as revealed by the Electron Microscope. III. Microorganisms of Rat-bite fever. Microbiological Institute, Medical Faculty of Kyoto University. Director: Prof. Kimura Ren M. D. — Jap. J. of Bact., 7(6): 567-570, 1952.

することにより行つた。集菌、洗滌は4,000回転30分間遠心沈澱する事により洗滌液としては通常生理的食塩水を使用した。しかし乍ら、夾雑物を完全に除去することは甚だ困難であつて、而も本微生物の損耗も相当大である故余程慎重を期さねば精製は失敗に終ることが多い。

著者の体験では毎回かくして調製した数十コの試料のうち実際鏡検に耐えるのはそのうち $\frac{1}{10}$ 位に過ぎない程であつた。かくして精製終了後適宜の浮游液をつくり、コロジオン膜上に載せて乾燥し電子鏡検した。之には島津 SM-I 型及び京大案型電子顕微鏡、加速電圧40~50KVを使用した。

所見と考察

本微生物の形態学的特徴は光学顕微鏡によつて相当緻密に観察されている。之等によれば、本微生物は体部とその両端にある鞭毛より成立つてゐる。そして他のスピロヘータに比し甚だしく太短い体部は螺旋乃至屈曲を示し、太い鞭毛はゆるやかな彎曲を示し体部より長い場合が多いと。特に Ch. Ruys¹³⁾ や McDermott¹⁴⁾ は本微生物の回旋はコルク栓状の螺旋ではなくて平面的な屈曲であると見做した。しかし乍ら、之等は主として染色標本における観察であつて、吾々は暗視野鏡検により明かに螺旋状態として認めることが出来る。このことは *Borrelia* や *Leptospira* に於ても同様で、生きている——活潑に運動している場合明白に認められる螺旋形態が、衰弱——運動停止するにつれてその螺旋が積み、又固定染色すること及び外界の影響等により死の状態になつた場合螺旋がのびて單なる平面的な彎曲乃至屈曲となることを示すものであろう。

換言すれば、被検体をメディウムの中に浮游せしめることゝガラス面に固定せしめる標本調製方法の差異が被検体の新鮮陳旧さと組合されて、夫々螺旋か或は彎曲乃至屈曲であるとの結論に導くのであろう。

著者の電子像に於ては螺旋形態が推測出来る場合 (Fig. I, II, IV) と彎曲乃至屈曲形態を示す場合 (Fig. III, V, VI, VII, VIII) の二様がみられるが、之は恐らく前述の理由と精製過程の差異の如何によるのであろう。そして電子顕微鏡の分解能が大であることも関與しているのであろう。螺旋形態がのびて長くなることは Mudd 等¹⁵⁾ Lofgren 等¹⁶⁾ Hampp 等¹⁷⁾ も *Treponema* や *Borrelia* で認めている。

以上のことからして本微生物の体部は螺旋状態でなく平面的な屈曲であるとの Ch. Ruys¹³⁾ や MacDermott¹⁴⁾ の如き断定は適當でないと思われる。

Fig. I, III の電子像をよく観察すると体部周縁に電子

線透過性のよい薄層がみられる。

之は細胞体の周縁に slime-layer 様構造のあることを示しているのかも知れない。

Fig. I~VII では細胞体は何れも電子線の透過性がよくないことを示しているが、Fig. VIII では透過性がかなり良好で内部に1箇の顆粒の像が認められる。第一報に於て *Borrelia duttonii* の細胞体内部が必ずしも均一でなく多様の像を示し顆粒も存在し、恐らく之等は *Borrelia* に life-cycle があることを示しているのではなからうかと述べたが、Fig. VIII の像からして本微生物に於ても同様のことが云い得るのではなからうかと考えられる。

鞭毛は太いのが一本宛細胞体の両端に存在することは周知の事実であり吾々は暗視野鏡検により容易にみる事が出来る。ところが、Zuelzer,¹⁸⁾ Adachi,¹⁹⁾ Robertson²⁰⁾ 等は両端に数本の鞭毛が存在し、それ等が束状になつてゐると記載している。特に Adachi¹⁹⁾ は氏独自の染色法にて鞭毛を観察し、demonstrable flagella の数は標本作製手技により変るようであり、又鞭毛は細いものが数本末端に発生し1本の太いものに融合し、或は太い鞭毛が数本の細いものに分岐すると述べている。

二木¹⁹⁾ は之を否定してかゝる像は人工産物であると結論した。

著者の電子像 (Fig. II, III, IV, V, VI) では本微生物の太い1本の鞭毛は実はより細い数本の纖維から出来てゐることが解つた。之等の細纖維を夫々1本の鞭毛と見做すべきか、或は束状に集合した太いものを1本の鞭毛と考えるかにより多毛説と1本説とに分かれる。

なお Hampp 等¹⁷⁾ の研究によれば *Borrelia vincenti* や *Treponema pallidum* の鞭毛は数本の細纖維から出来て束状となつてゐると、著者も *Borrelia duttonii* で同様の所見を得ている。又近く Leifson²⁰⁾ は *Borrelia novyi* の染色標本に於て甚だ太い鞭毛の像を得ている。それ故著者は二木や Adachi の見解を併せ鑑み次の如く主張したい。

『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單一纖維として認められるけれども、実はより細い数本の纖維より出来ていて外から加わる影響により容易に分條し、又本微生物の life-history に伴ひ自然に数本の細纖維に分岐分條する場合がある。而も試料調製及び染色方法と観察条件の相違等が鞭毛分條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之に関與する所大である』と。

本微生物の鞭毛とスピロヘータの終末系とは附着部位

が何れも terminal である故よく似た感を抱かしめるが、本微生物の鞭毛が数本の細繊維から出来ていることと Hampp 等¹⁾が報告した *Borrelia vincentii* の電子像で終末系が数本の細繊維から出来ていることは共通した興味深い点である。今後之等について更に追求してみたい。

要 約

鼠咬症病原体 2 株を電子鏡検し、得た電子像と従来の光学顕微鏡による記載とを対比しつつ論述した。即ち、体部の螺旋——屈曲に関する見解を述べ、体周縁に slime-layer 様構造、内部顆粒の存在する場合のあることを記載し、鞭毛は数本の細繊維よりなることを確認した。なお試料調製方法について詳述した。

拙筆にあたり御懇篤なる御指導と御校閲を賜りたる恩師木村廉教授に感謝の誠を捧ぐ。本論文の写真はすべて長友尾崎良克学士の撮影によるもので、島津製作所研究部長島津新一博士及び研究部御一同は温き御同情を以て同研究部の SM-I 型電子顕微鏡の使用を許された。茲に満腔の感謝の意を表したい。なお滞米中の東昇助教より絶えざる激励と助言を戴いた。深謝の意を表す。

文 献

- 1) Adachi, K.: Flagellum of the Microorganisms of Rat-bite fever, J. Exp. Med., 33, 647-651, 1921.
- 2) Ch. Ruys.: Klassifikation des Erregers der Rattenbisskrankheit, Zbl. f. Bakt., I. Orig., 103, S. 258, 1927.
- 3) Robertson, A.: Chapter VIII Rat-bite fever or Sodoku. from A System of Bacteriology, by Bulloch et al 1931.
- 4) Topley and Wilson.: Chapter 36. The Spirochaetes, The Principles of Bacteriology and Immunity. 1946.
- 5) Breed, R. S., et al.: Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 6th Ed. 212-216. 1948.
- 6) Bayne-Jones, S.: N. York State J. M., 27, 1113, 1927. cited from Zinsser's Textbook of Bacteriology, 9th Ed. 636, 1948, by Smith and Martin.
- 7) Noguchi, H.: Chapter 36. The Spirochetes.

from the newer knowledge of bacteriology and immunology, by Jordan and Falk. 1928.

- 8) Mühlens, P.: Verschiedene als pathogen angesehene Spirochaeten. G. Die Spirochaeten bzw. Spirillen beim Rattenbissfieber (japanisch: Sodoku), von Handbuch der pathogene Mikroorganismen (Koolle und Wassermann). Bd. 7, Tl. 2, 800-807, 1931.
- 9) 朝倉善作: 電子顕微鏡によるスピロヘータの研究。その一緒言並に *Borrelia duttonii* について, 最新医学, 6 卷, 10 号, 71-77, 昭 26. (1951).
- 10) 朝倉善作: 電子顕微鏡によるスピロヘータの研究。その二 *Leptospira* について, 日本細菌学雑誌, 7, 335-337, 昭 27. (1952).
- 11) 西沢行藏, 飼瀬國一: 南京鼠腹腔液中に出現する鼠咬症スピロヘータの研究(其の一), 実験医学雑誌, 15, 967-992, 昭 6. (1931).
- 12) 福島伴次: 木村廉著 細菌学及び免疫学. 4 版. 第 4 章 VI 鼠咬症スピロヘータ, 346. 昭 23. (1948) より引用.
- 13) Ch. Ruys.: Der Erreger der Rattenbisskrankheit, A. f. Schiffs u. Trop. Hyg., Bd. 30, S. 112, 1926.
- 14) McDermott.: Rat-bite fever, Quarterl. J. Med., Bd. 21, S. 433, 1928.
- 15) Mudd, S. et al.: Bacterial Morphology as shown by the Electron Microscope. V. *Treponema pallidum*, *T. macrodentium* and *T. microdentium*. J. Bact., 46, 15-24, 1943.
- 16) Lofgren, R. and Soule, M. H.: The Structure of *Spirochaeta movyi* as revealed by the Electron Microscope, J. Bact., 56, 679-690, 1945.
- 17) Hampp, E. G. et al.: Morphologic Characteristics of Certain Cultured Strains of Oral Spirochetes and *Treponema pallidum* as revealed by the Electron Microscope, J. Bact., 56, 755-769, 1948.
- 18) Zuelzer, M.: Biologische und systematische Spirochaetenuntersuchungen, Zbl. f. Bakt., I Orig, Bd. 85, S. 154, 1921.
- 19) 二本謙三: 鼠咬症, 東西医学大観, 2 号, 15-21, 昭 2. (1927).
- 20) Leifson, E.: The flagellation of Spirochetes, J. Bact., 60, 678-679, 1950.

附 図 説 明

Fig. I-III は人系長谷川株の電子像

Fig. I 体部螺旋状、周縁に電子線の透過性のよい薄層がみられる。両端に太い鞭毛が一本宛あり。

Fig. II 一端の鞭毛は太く先端で二つに分岐している。他の鞭毛は数本の細繊維に分岐し絡みあっている。

Fig. III 周辺に薄層をみとめ、鞭毛は分岐し細胞体からみついている。

Fig. IV-VIII は人系京大微生物株の電子像

Fig. IV 一端の鞭毛は太く体部に近い所で二群に分れ

一群は細繊維が二本密着し、他群は三本に分れている。他端は細繊維一本のみである。

Fig. V 体部は平面的彎曲を示し、両端の鞭毛は各々数本の細繊維に分散している。

Fig. VI 同上

Fig. VII 体部に多数の微細顆粒が附着している。顆粒の意義不明。

Fig. VIII 細胞体の電子線の透過性はかなり良好で、原形質の分布は均一でなく、内部顆粒の像(A)がみられる。