電子顕微鏡的方法による *Aspergillus* 属の conidia の分類について*

飯 塚 広 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 29 年 11 月 6 日 受 理

The Electron Microscopic Investigation on Classification of
Conidia of the Genus *Aspergilli*.

by Hiroshi IIZUKA (Dept. Agr. Chem., Univ. of Tokyo)

緒 言

糸状菌の形態及び分類の研究に電子顕微鏡的方法を応用する事は従来試みられなかつたが、坂口等 (1948, 1952)⁽¹⁾⁽²⁾ は麹菌 *Aspergillus sojae* 及び *Asp. oryzae* の分類上重要な性質とされている conidia 及び conidio-phores の表面の性質の研究、並びに Black *Aspergilli* の分類 (1952, 1953)⁽³⁾⁽⁴⁾ における conidia の性質の研究に電子顕微鏡的方法がきわめて有効であることを認めた。

さて従来 *Aspergillus* 属糸状菌の形態及び分類の研究において、その conidia の色調、大きさ、形状及び表面の性質は特に重要なものの一つとされ、しばしば分類の基準とされている⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾。しかるにこの形態は光学顕微鏡的方法の対象としては微細に過ぎるためか、記載用語の選択に迷う事があり、更には同一菌種に対してすらも研究者によつてその認識或いは表現が異なる場合がある。そこでこれらの不一致の原因を追究すべく電子顕微鏡的方法とも併用して各種 *Aspergillus* の conidia を検討し、同時にその結果に基づいて、従来使用されている多様多様なその表現用語の整理を試みた。

実 験

1. 供試菌株の選出及び光学顕微鏡的研究 東京大学農芸化学科、財団法人長尾研究所、米国 Northern Regional Research Laboratory (現在の Northern Utilization Research Branch) 等より学名及び来歴の明瞭なもの合計 143 株を入手し、改めて diagnosis を行い、各 species の記載と一致する菌株を標準株として選出した。これらの中から標準株の得られなかつた種については著者が穀類其の他農畜水産物或いは土壌等の試料から分離した菌株を充当し、その結果標準株として 60 株を選出し供試した。供試菌株名は Table 1 と重複するので省略する。

Table 1. Classification of the Nature of the Conidial Walls of *Aspergilli*.

Shape of conidia		1. globose	2. subglobose	2. elliptical
Nature of conidial walls				
1. aculeate		<i>A. japonicus</i> Fig. 5.	-----	<i>A. aculeatus</i> Fig. 6.
		<i>A. carbonarius</i> Fig. 7		
		<i>A. tamaris</i> Fig. 1.		
		<i>A. niger</i> Fig. 8.		
2. conspicuously echinulate		<i>A. phoenicis</i> Fig. 9.	-----	-----
		<i>A. pulverulentus</i>		
		<i>A. parasiticus</i> Fig. 10.		
		<i>A. variegatus</i> Fig. 11.		
		<i>A. niger</i> mut. <i>schimmani</i> Fig. 28.		
		<i>A. terricola</i> Fig. 12.	<i>A. itaconicus</i> Fig. 14.	<i>A. ostianus</i> Fig. 15.
		<i>A. fumigatus</i> Fig. 13.		
3. echinulate		<i>A. ustus</i> Fig. 16.		
		<i>A. sojae</i> Fig. 17.		
		<i>A. aureus</i>		
		<i>A. ochraceus</i> Fig. 18.	<i>A. awamori</i> Fig. 23.	<i>A. gracillis</i>
		<i>A. nivalans</i> Fig. 19.	<i>A. wentii</i> Fig. 24.	
		<i>A. rugulosus</i> Fig. 20.	<i>A. elegans</i> Fig. 25.	
4. delicately echinulate		<i>A. oryzae</i> Fig. 21.	<i>A. medius</i> Fig. 26.	
		<i>A. flavus</i> Fig. 22.	<i>A. restrictus</i> Fig. 27.	
			<i>A. cellulosa</i>	

* 本研究の一部は 1951 年 4 月 8 日、日本植物学会大会において発表した。

5. loosely rough	{ <i>A. usarii</i> Fig. 4. <i>A. melleus</i> Fig. 30.	
	{ <i>A. inuii</i>	
	{ <i>A. niger</i> mut. <i>cinnamomeus</i> Fig. 29.	
6. spinulose	{ <i>A. sydowi</i> Fig. 31. <i>A. repens</i> Fig. 33.	
	{ <i>A. versicolor</i> Fig. 32.	
7. smooth	{ <i>A. candidus</i> Fig. 34. <i>A. sulphureus</i> Fig. 35. { <i>A. clavatus</i> Fig. 38.	
	{ <i>A. terreus</i> Fig. 37. { <i>A. flavipes</i> Fig. 36. { <i>A. giganteus</i> Fig. 39.	
	{ <i>A. terreus</i> Fig. 37. { <i>A. terreus</i> Fig. 37. { <i>A. alliaceus</i> Fig. 40.	

2. 電子顕微鏡試料 供試菌株は CZAPEK's agar に 30°, 21 日間斜面培養し、その conidia を dry のまま供試した。培養日数を 21 日としたのはこの時期には conidia が充分成熟し且つそれぞれ一定の形態に達したものと認められるからで、勿論形成初期の conidia は成熟時とは殊にその表壁の形態が異なる。この点については予かじめ数菌種について conidia 形成の過程を追究したので、その 1 例として *Asp. usarii* の場合について Fig. 3 及び 4 に示した（実験結果の項を参照されたい）。又 conidia は dry のままでは光学顕微鏡的にも明らかなことであるが、内側に凹んだりして種種な形状を示すことが多いから、電子顕微鏡写真の場合にも常に dry の conidia の映像である点に留意する必要がある。

試料支持膜としては 3 種類を比較し、(1) 常法⁹⁾による collodion 膜、(2) Formvar (vinyl acetate formaldehyde polymer) 膜、(3) collodion 膜に SiO₂ (水晶) を真空蒸着させた collodion-silica 膜を使用した。 (1) では鏡検中に膜が破ける事があり、その点は (2) 及び (3)、特に (3) が丈夫でよい。しかし (1) は或る限度以上の電子線照射を受けると試料が形態の影響（主として収縮）を受ける以前に支持膜に変化が認められるので、生体試料にとつて過剰な電子線照射を避ける為には実験上かえつて都合がよい。結局本実験に於ては (1) 又は (2) を使用した。

鏡検試料作成法としては ④ 支持膜に conidia をそのままのせる直接法、⑤ collodion 膜をメッシュに張る時に同時に conidia を混入させる collodion 埋没法、及び ⑥ Replica 法を行つたが、⑥ は conidia 表面の突起が比較的大きい場合にその形状を観察するのによく、⑤ は conidia の周囲の contrast がおちるのみで本実験の目的には不適當であつた。従つて全菌株について ④ の方法を行つた。

3. 鏡検及び撮影 使用電子顕微鏡は東京電子科学研究所製 D-A-5 型及び東京大学電子顕微鏡室所属の日立製作所製 HU-4 型で加速電圧は 60 kV。鏡検の際には、conidia も他の生体試料や低沸点物質におけると同様に真空の影響及び電子線照射による試料の変形に特に留意しなければならない。そこで変形に対する予備実験を行つた 1 例を示す。即ち試料としては表面の突起の著しい *A. tamarii* の conidia を、試料支持膜として丈夫な collodion-silica 膜にのせ、直接倍率をなるべく低く 3000 とし、condenser lens は $I_c < 20$ mA にとどめ、従つてかなり暗い視野で観察すると Fig. 1 のような像を得る。これを $I_c = 20$ mA にすると僅かに収縮があり、 $I_c = 30$ mA では Fig. 2 のように明らかに収縮が認められる。これらの場合に支持膜として collodion 膜を使用すると $I_c = 20$ mA でも観察中に支持膜が破けはじめる。しかし以上のいずれの条件の試料も鏡検後光学顕微鏡的観察を行つても何ら変形は認められない。以上により本実験では直接倍率 2000~3000、condenser lens は $I_c < 20$ mA とし、比較的暗い視野で鏡検し撮影した。

実験結果及び考察

実験の結果得られた電子顕微鏡写真は Fig. 1~40 に示したが、これらの知見から次の諸点が考察される。

1. 形成初期の conidia はあたかも薄膜の細長い袋の中に一列に並んだように順次に形成され (Fig. 3)、培養経過と共にそれぞれ特有の表面の性質を現わす (Fig. 4)。又同時に conidia と conidia との間の膜は四方から接近し、この conidia 間の距離の大きな種類では (Fig. 4) 従来光学的に connection と云われ⁽⁶⁾た部分を形成する。

2. “Conidia には外壁と内壁とがあつてその間に色素の粒や塊が分布する” という THOM 等の説⁽⁶⁾⁽⁸⁾は本実験の結果からも肯定される。

3. 成熟した conidia の表面の性質即ち表面の突起の形状、高さ、及び conidia の全形について供試菌株を分類し、従来使用されている種種の表現用語を整理して、Table 1 のような記載方法を試みた。

4. Conidial wall の性質について従来の光学的観察と異なる点は次の通りである。

a. *A. candidus* も *A. niger* mut. *cinnamomeus* (= *A. cinnamomeus*) も全形は globose で表面は

Fig. 1. *A. tamarii* ($I_c < 20_{mA}$) Fig. 2. *A. tamarii* ($I_c = 30_{mA}$) Fig. 3. *A. usamii* (young stage) Fig. 4. *A. usamii* (mature) Fig. 7. *A. carbonarius* Fig. 5. *A. japonicus* Fig. 8. *A. niger* Fig. 6. *A. aculeatus* Fig. 9. *A. phoenicis*

Fig. 10. *A. parasiticus* Fig. 12. *A. terricola* Fig. 13. *A. fumigatus* Fig. 11. *A. varicolor* Fig. 14. *A. itaconicus* Fig. 15. *A. ostianus* Fig. 16. *A. ustus* Fig. 17. *A. sojae*

Fig. 18. *A. ochraceus*Fig. 20. *A. rugulosus* Fig. 22. *A. flavus* Fig. 19. *A. nidulans* Fig. 21. *A. oryzae* Fig. 23. *A. awamori* Fig. 24. *A. wentii* Fig. 25. *A. clegans* Fig. 26. *A. medius* Fig. 27. *A. restrictus* Fig. 28. *A. niger* mut. *schiemanii*

Fig. 29. *A. niger* mut. *cinnamomeus* Fig. 30. *A. melleus* Fig. 31. *A. sydowi* Fig. 32. *A. versicolor* Fig. 33. *A. repens* Fig. 34. *A. candidus* Fig. 35. *A. sulphureus* Fig. 36. *A. flavipes* Fig. 37. *A. terreus* Fig. 38. *A. clavatus* Fig. 39. *A. giganteus* Fig. 40. *A. alliaceus*

smooth といわれていたが、前者は全く smooth (Fig. 34) であるが、後者は smooth ではない (Fig. 29)。

b. 分類学上従来 *A. melleus* は conidial wall smooth と云う点でこれが rough な *A. ochraceus* (Fig. 18) と区別されていたが⁽⁶⁾, *A. melleus* にも明かに突起或いは隆起がある (Fig. 30)。しかしその形状及び高さによつて光学的には突起の効果を示さないものと思われる。

c. 従来 *A. fumigatus* (Fig. 13) も *A. japonicus* (Fig. 5) も表面は echinulate と表現されているが、其の突起の形状は全く異り、後者はむしろ aculeate と認めるべきであろう。

d. Conidia の全形については従来 globose と表現されていたものの中にも多少異形のものがあることが判つた。例えば *A. terreus* (Fig. 37) は角ばつており、*A. alliaceus* (Fig. 40) は厚い円盤状のものが多い。

結 語

Aspergillus 属の分類上重要な性質である conidia の特長を電子顕微鏡的方法によつて研究し、その結果に基づき従来 conidia の性質の表現に用いられていた多種多様な光学顕微鏡的表現用語の整理を試みた。

終りに、本研究について御教示を頂いた東京大学農学部長坂口謹一郎教授に厚く感謝し、又実験に協力された黒田徹氏、坂田茂雄氏に厚く謝意を表する。

(1) 坂口謹一郎, 飯塚 広, 黒田 徹: 農化, 23, 100 (1949).	<i>Aspergilli</i> (1926).
(2) 坂口謹一郎, 飯塚広: 農化, 27, 402 (1953).	(7) A. BLOCHWITZ <i>Ann. Mycol.</i> , 27, 229 (1929).
(3) 坂口謹一郎, 飯塚広: 農化, 27, 524 (1953).	(8) C. THOM and K. B. RAPER; <i>A Manual of the Aspergilli</i> (1945).
(4) 飯塚 広: 農化, 27, 801, 806 (1953).	(9) R. W. G. WYCKOFF <i>Electron Microscopy</i> , Chapt. 4 (1949).
(5) C. WEHMER <i>Die Pilzgattung Aspergillus in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung</i> . (1901).	(10) A. H. R. BULLER: <i>Researches on Fungi</i> , V, Chapt. 2 (1933).
(6) C. THOM and B. M. CHURCH <i>The</i>	

Summary

As it is well known, the nature of the nature of conidial walls of *Aspergilli* differ among the species, and it is one of the essential characters in taxonomy of this genus as well as the size, shape and colore of conidia.

But in some cases it is so fine that we waver in choice of the suitable descriptive term, or that the researchers use the various terms even for same species, when observed with an optical microscope.

The author succeeded to show the electron micrographs of conidia of many species of *Aspergilli* (Fig. 1~40), and to make clear the micro-morphological characters especially the nature of conidial walls.

For the purpose of arranging the descriptive terms for the conidial walls, the author classified the micro-morphological characters of the conidia as shown in the Table 1; i. e. the nature of conidial walls are (1) aculeate (Fig. 5 and 6), (2) conspicuously echinulate (Fig. 1, 7, 8, 9, 10, 11, and 28), (3) echinulate (Fig. 12, 13, 14, 15, 16 and 17), (4) delicately echinulate (Fig. 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, and 27), (5) loosely rough (Fig. 4, 29 and 30), (6) spinulose (Fig. 31, 32 and 33) and (7) smooth (Fig. 34, 35, 36, 37, 38, 39 and 40), and the shape of conidia are (I) globose (II) subglobose and (III) elliptical.

Young stage of conidial chains is shown in Fig. 3 (*Asp. usarii* as an example). Conidia are formed within a thin cell wall of a previously existing cell. When became matured as shown in Fig. 4, the so-called "connectives" are formed between conidia in chain, and conidia assumed the size and shape characteristic for the species.