



Title	微生物の凍結乾燥過程の電子顕微鏡的研究 II : 大腸菌の16mm映画撮影による動的観察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 20, 95-100
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17665
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p95-100.pdf



微生物の凍結乾燥過程の電子顕微鏡的研究 II*

大腸菌の 16 mm 映画撮影による動的観察

根井外喜男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 37 年 6 月受理)

I. 緒 言

従来、凍結乾燥に於ける乾燥の機序については、いろいろの方面から多くの検討がなされてきたが、形態的な立場での観察は比較的僅かであった。その少数の研究も精々光学顕微鏡を用いての観察であって、これでは微生物自身からの脱水状況を知ることは不可能であった。微生物細胞レベルでの乾燥過程を追究するためには、どうしても電子顕微鏡の力を借りねばならなかったが、従来の試料作製法では凍結したままの試料の直接観察は望めなかった。幸い最近改良された試料冷却装置を利用することによって、この種の実験も可能となった。

前回の実験¹⁾では、*Saccharomyces cerevisiae* を試料に用い、その蒸溜水浮遊液及び 5% ブドウ糖浮遊液について凍結乾燥過程を電子顕微鏡下で観察し、特に 16 mm 映画に撮影することによって、細胞内外に於ける脱水(主として真空下の氷晶の昇華)の機序を知ろうとした。

今回は更に *Escherichia coli* を用いて同様の実験を行なったので、その結果について報告する。両実験を通じて試料として酵母と大腸菌とを用いたのは、既に我々の研究室に於いて十数年来行なわれてきた微生物の凍結並びに乾燥に関する研究に於いて両菌種は常に使用されていたものであり、しかも形態的機能的検討を行なうに当って、それぞれの特徴ある性状がよく知られている上に、特に凍結や乾燥に対し両者にかなり性状の差違のあることがわかっていたからである。

II. 実験方法

試料を変えた外は、前報¹⁾と全く同一の方法によって実験を行なった。

1. 使用菌液

当研究室保存の大腸菌 *Escherichia coli* の普通寒天培地 37°C, 24 時間培養菌をかきとり、蒸溜水で 3 回洗った後の遠心沈渣を 0°~5°C の魔法瓶中に保存し、2~7 日の間に使用した。これは札幌で調製した菌材料を東京に運んで顕微鏡観察を行なったからである。使用に当り、毎

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 624 号

回蒸溜水及び5%ブドウ糖溶液で凡そ50 mg/ml くらいの濃度の菌浮遊液とした。

2. 電子顕微鏡

日本電子株式会社製 JEM-6 A 型電子顕微鏡で、試料冷却装置及び16 mm 映画撮影装置の付属したものを使用した。

3. 実験方法

方法は前報¹⁾に詳しく述べたので、簡単に記載する。上記のようにして作った試料を、Vaponefrin nebulizer にとり、冷却による contamination を防ぐよう特別に作られた試料筒のスリット・メッシュに噴霧し、液体窒素中に投入して急速に凍結させた後、速かに電子顕微鏡試料室の冷却装置中に移す。装置は予め液体窒素で冷却されているので、この中に納めてしまえば凍結したまま保持される。観察に当っては適宜試料の温度を上げて(液体窒素の貯蔵槽をホルダーから離すとよい)ある程度液滴中の氷を昇華させてから、詳しい観察に移る。

観察並びに撮影に際しては、電子顕微鏡像になるべく artifact が加わらぬように、電子線の照射電流をできるだけ弱くし、電子流密度で 5.6×10^{-4} A/cm² とした。撮影には Sakura film の fine grain, Positive Type 02, 003 を用い、フィルムの送りコマ数は 1.5 コマ/sec であった。

III. 実験結果

1. 蒸溜水浮遊液

1) 対 照 (空気乾燥のもの)

前報の酵母の場合と全く同様で、噴霧後空気乾燥したものでは、液滴中の菌体が凝集しやすく分散性がよくない。従って個々に遊離した菌体のよい標本が得難かった。特に今回使用したものは、菌体を洗ってから多少時日を経過したためか、ghost 様の透過性のよい菌体が比較的多いように思われた。空気乾燥菌に電子線をあてても、この程度の強度では全然形態的な変化はおこさない。

2) 凍結乾燥過程

噴霧後急速凍結した試料を冷却装置におさめて観察すると、径 20~50 μ くらいの円形の dense な部分があちこちに見える。これは噴霧された液滴であることは、その後に見られる乾燥の経過からよくわかる。 -80° ~ -90° C まで試料温度を上げると(氷晶の蒸発速度或いはホルダーの指示する温度からの推測)、凍結液滴からの昇華が盛んになり、その中に閉じこめられた菌体が次第に現われてくる。以上のような過程は、酵母を用いた実験に於いて観察されたものと全く等しい。

かくして見えてくる菌体には大体2種の形態のものがある。即ちスムーズな外縁で楕円形を呈し比較的 dense で内部構造のみえない正常形態と思われるものと、両端が竹の節のように鋭く切れたり或いは種々の形をとり、周辺部の透過性がよく収縮したと思われるものの2種である。本実験条件では、前者の正常形ものは非常に少なく、殆んど大部分の細胞は後者のような顕著な変形像を示している。

しかもこれら2種の細胞は、1つの液滴中に混在することは極めて稀で、多くの液滴がすべて収縮像を示し、ごく少数の液滴中に正常形のものが見られるのである。一般に菌体の分散はよく、対照の空気乾燥の場合のように液滴中の菌体が凝集して1つの塊をなすことはない。

この大部分を占める収縮菌では、氷の昇華後も殆んどそのままの形態を保っていた。前実験で報告したように、酵母では周囲の氷が昇華し菌体からの脱水が始まると思われる頃から細胞膜或いは細胞全体としての変形又は透明化がみられたが、大腸菌ではそのような変化はみられなかったわけである。ただごく稀に図版 I-4 に示すように、正常形と思われる細胞では乾燥に伴って極めて僅かの収縮がみられた。

多数の菌体は、カーボン・コロジウムの膜面に直接密着せず、菌体と菌体とが相接触したまま空間に浮いているためか、乾燥、特に周囲の氷の昇華に伴って位置の移動をするものが多く映画の撮影に当って苦心を要した。

3) 電子線を照射せずに凍結乾燥したもの

凍結乾燥過程は全然観察せず、凍結試料を試料室に入れたまま電子線をあてずに乾燥を完了し、試料温度もほぼ室温に達した後、始めて電子線を通して観察すると、前項の乾燥過程を撮影したものと同様に、dense な正常形の菌体と透過性のよい収縮形の菌体とがみられ、この場合にもやはり後者の数が圧倒的に多いことがみとめられた。しかも対照の空気乾燥菌に対し全然影響のない程度の電子流密度 5.6×10^{-4} A/cm² の電子線照射では、この種の菌体に対しても殆んど形態の変化をきたさなかった。ただごく僅かに収縮するようにもみえたが、同時に菌体の位置移動もあったので、はっきりした収縮の程度は測れなかった。凍結乾燥菌体を再び -140°C まで冷却してから電子線を照射したものでも、もちろん殆んど変化はみられなかった。

2. ブドウ糖浮遊液

1) 対 照 (空気乾燥)

電子線照射によってブドウ糖が泡立つのと、濃縮されたブドウ糖によって完全に包まれているため、個々の菌体は殆んど判別し難い。

2) 凍結乾燥過程

液滴中の氷晶が昇華するに従い、細かな network とそれに包まれた菌体が次第に見えてくる。網状構造は細い線と小さな粒子からできているが、この粒子状のものは乾燥過程で電子線照射によってできたものかもしれない。個々の菌体は network に包まれているため明瞭でない場合が多いが、蒸留水浮遊液にみられるような極端な収縮像を呈することは殆んどなく、両端円形の正常の形態を示している。ただ電子線に対して比較的透過性のよいものと dense なものがある。

電子線にあてずに凍結乾燥を完了した後、始めて電子線を照射して観察すると、比較的きれいに作られていた細胞周囲の網状構造が殆んど瞬間的に壊れる。泡のように膨れ網が切れて縮み粒状のものとなるのがわかる。しかし菌体そのものには殆んど変化がみられない。

凍結乾燥過程を引続き観察していたものにきれいな network が残らず、溶けたような感

じがするのは、この電子線照射による影響であろうと思われる。

IV. 考 察

酵母に引続いて大腸菌について、凍結乾燥過程の電子顕微鏡的観察を行なった結果、両者に共通にみられる現象或いは両者にそれぞれ特有の変化のあることを知った。

1. 空気乾燥と凍結乾燥

対照の空気乾燥菌は噴霧液滴中のものは殆んど皆凝集して1つの塊となるため、観察は困難である。それに反し凍結乾燥菌は1液滴中の分散がよいので観察には好都合である。前者は乾燥時の表面張力のためと思われるが、後者では膜面に密着せず宙に浮いた状態のものが多いので、乾燥の経過とともに移動し或いは飛散するのがみられるし、残りの菌数は少なくなる。この点、媒質として種々の物質が加えられると、個々の菌は接続し膜面とも接触するので飛散が防げるわけである。

2. 試料についての技術的問題

試料の載ったメッシュを両側から2枚のメッシュで挟むように作られた特殊の試料筒を用いることによって、冷却試料の電子線照射による汚れを防ぐようにしているが、それでも長時間の照射では画面が次第に汚れがちであり、また試料面の一部の蒸発が他の部分への汚れを増すことにもなるので、1つの試料については、なるべく早い時期によい写真を撮るように努力しなければならない。

ただ、電子線の照射面積は狭いので、凍結乾燥が終った後、視野を移動させてみると、照射されながら乾燥した部分は汚れがひどいのに、照射されずに乾燥した部分は全然汚れがなくはっきり区別される。従って1つの試料で乾燥過程の観察から、乾燥後始めて照射する実験まですべて行なうことができる。

3. 酵母と大腸菌の比較

1) 凍結時の形態と脱水状況

大腸菌の蒸溜水浮遊液では、周囲の氷の昇華に伴って現われてくる菌体は、空気乾燥菌体から想像されるような両端の円い輪郭の滑らかな桿状菌ではなく、形態の複雑な収縮像を示すものが大部分を占めている。このような菌体は酵母の場合とちがって、氷がなくなってからも菌体内部の透明化や変形は殆んどみられない。しかしごく稀にみられるところの凍結で収縮せずほぼ原形を保ったまま乾燥したと思われるものでは、乾燥するに従って僅かではあるが縮少する傾向がある。結局酵母と大腸菌とを比較してみると、同じ凍結条件でありながら、酵母では原形を保つ細胞が多いのに大腸菌では収縮した細胞が多い。このことはさきに報告²⁾したように、同じ条件下の凍結乾燥で酵母は大腸菌よりはるかに生残率が低いということともてらし合わせ、酵母では細胞内凍結を起しやすいから原形を保ち、大腸菌は細胞外凍結だけなので細胞は収縮すると考えれば、いろいろの関係が説明しやすいように思う。しかも乾燥に伴う変形(電子線照射による影響も含まれる)は原形を保つものにだけみられることは両者に共通した事

実である。ただ収縮細胞では余り変化せず、非収縮細胞にのみ変化が著明に現われることについては、前報¹⁾に於いても述べたように理由は明らかではないが、単に細胞からの脱水の程度によるのではなく細胞の形態に関係するのかもしれない。

2) ブドウ糖浮遊液

酵母の場合には蒸溜水浮遊液でもブドウ糖浮遊液でも原形を保つ細胞が多かったが、大腸菌では蒸溜水浮遊液のものが大部分収縮形を示すだけでブドウ糖浮遊液のものでは酵母同様やはり原形保持のものが多かった。このことはブドウ糖があるために凍結の際に細胞からの脱水が行なわれにくいのか、或いは脱水されても収縮しにくいのか、更には多少収縮していても見難いのかはわからない。周囲の network のために多くの細胞は輪郭がはっきりしないが、中には明瞭に見えるものがあり、そのものでは確かに収縮した様子はみられない。余程冷却速度が大きくなければ、ブドウ糖のように膜透過性の小さな媒質では細胞外凍結の結果細胞収縮をおこす可能性の方が多いと思われるのに、それがみられないのはどのように説明されるのであろうか。凍結乾燥に当っての媒質の効果について、形態的立場からだけ論ずるのは無理であろうが、蒸溜水浮遊液では明らかに酵母と大腸菌の相違がみられるのに、ブドウ糖浮遊液ではみとめられないで両者とも同じような形態を示すという結果からすると、糖類の存在が確かに細胞試料の凍結の機構を変えているものと思われる。従って形態的立場からだけでも、もっと違った角度からの検討が必要と考えられる。

V. 摘 要

冷却装置のついた電子顕微鏡を用い、大腸菌浮遊液の凍結乾燥過程を映画に連続記録した結果、知られたことは次の通りである。

1) 一般的にみて、酵母の場合と同様に、まず細胞周囲の氷晶が昇華した後、細胞自身からの脱水が行なわれるらしい。

2) 蒸溜水浮遊液では、凍結時に細胞の収縮があるらしいが、乾燥過程では膨化収縮等の変化は殆んどみられない。ただ僅かに現われる原形を保った細胞にのみ軽度の収縮がみられる。

3) ブドウ糖浮遊液中の細胞では、凍結時の収縮はみられず、乾燥でも変形はおきない。

4) 酵母と大腸菌とでは、同一凍結乾燥条件でも形態的にかなり異なった態度をとるが、その所見は機能的にしらべた結果とそれぞれ相通ずるものがあるように思われる。

文 献

- 1) 根井外喜男 1961 微生物の凍結乾燥過程の電子顕微鏡的研究 I. 酵母細胞の 16 mm 映画撮影による動的観察. 低温科学, 生物篇, **19**, 79-93.
- 2) 根井外喜男・僧都 博・花房尙史・荒木 忠 1961 凍結乾燥に於ける乾燥の機構 VIII. 乾燥過程での試料中の部位による含水率と菌生残率との関係 (第 2 報). 低温科学, 生物篇, **19**, 59-72.

Résumé

Escherichia coli was used as an experimental material to observe the process of sublimation of extracellular ice and dehydration of cellular water during drying after freezing. Employment was made of the electron microscope with which were incorporated a special cooling device and a 16 mm cinematograph.

The results obtained from careful study of the cinematographic recording are as follows :

1) Generally speaking, it seems to be that the dehydration of cells begins after the complete sublimation of extracellular ice, as has been previously observed in *Saccharomyces cerevisiae*.

2) In aqueous suspensions, the changes in cellular morphology such as swelling or shrinking can hardly be seen in the shrunken cells during drying. Slight shrinkage can be found in a very few cells retaining their original size and shape.

3) Neither shrinkage nor any other alteration in cells is observable in glucose-suspensions during freezing and drying.

4) There are some differences in morphology of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* even under the same conditions of freeze-drying. Cells of both microorganisms indicate a reasonable relationship between their morphology and function after freeze-drying, respectively.

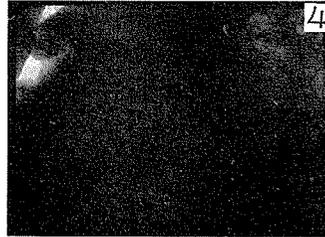
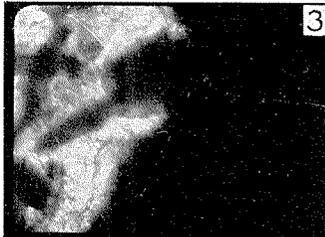
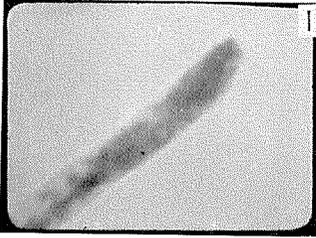
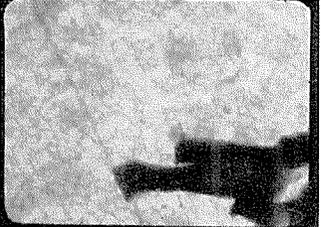
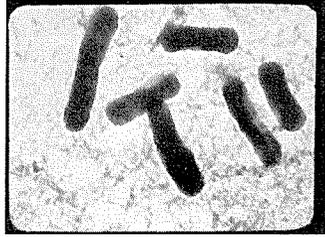
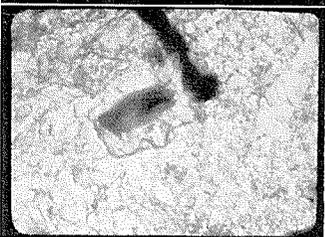
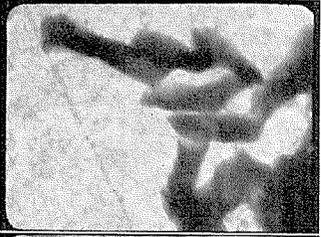
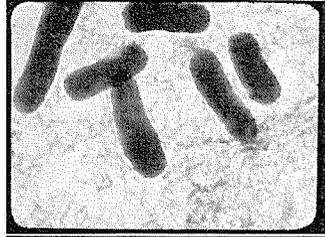
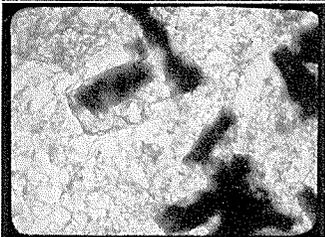
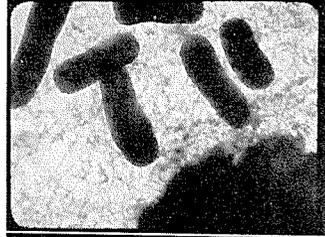
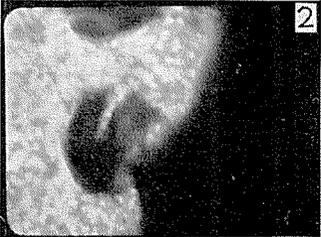
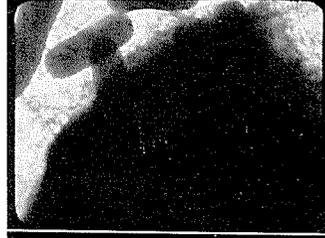


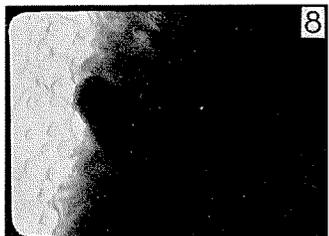
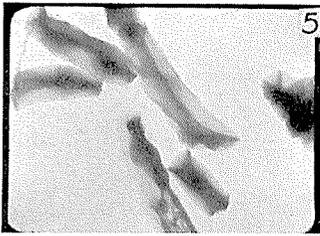
図 版 説 明

1: 対照 (空気乾燥)。以下倍率はすべて 8000×



2~3: 蒸溜水浮遊液の凍結乾燥過程
個々の細胞は収縮変形している。

4: 蒸溜水浮遊液の凍結乾燥過程
細胞は比較的原形を保っているが、乾燥後僅かに収縮する。



5~6: 蒸溜水浮遊液のものを凍結乾燥した後、始めて電子線を照射した場合。すべて収縮細胞で、電子線照射による変形は殆どない。

7~8: ブドウ糖浮遊液の凍結乾燥過程
細胞はほぼ原形を保ちdenseである。

