HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細菌研究における電子顕微鏡的方法：特に結核菌について
Author(s)	内藤, 康雄; 高橋, 昭一郎
Description	
Citation	結核の研究, 2, 60-80
Issue Date	1955-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26562
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_P60-80.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

細菌研究における電子顯微鏡的方法

―― 特に結核菌について ――

内藤康雄
高橋昭一郎
北海道大學工學部通信工學科
北海道大學結核研究所電子顯微鏡室
(結核研究所　主任　高橋義夫教授)

I 緒　言

細菌の研究において，電子顯微鏡(以下電顯と省略)的方法が光学顯微鏡(以下光顯と省略)的方法に比し，より複雑視される理由は顯微鏡の分解能に大差があること(光顯の分解能の限界は100 mμ，電顯の分解能は1～3 mμ)及び使用する光学系が本質的に異なること(光顯においては可視光線乃至紫外線，電顯においては電子線即ち粒子線)等である。従つて，電顯的方法により得られた細菌像を理解するためには，電子レンズの収差，電顯の変動，電顯用試料の作成法，電子線と試料との相互作用，写真効果等について綜合的な考察がなされねばならない。

われわれは，細菌特に結核菌について，その電顯像が信頼し得ると考えられる様な試料の作成方法及びその試料を映像として忠実に表現させ得る方法を実験的に追究し，更にこれらの結果に基いて，結核菌の電顯像を確立しようと試みた。

以下は昭和27年から29年に至るまでのわれわれの実験成績の大要を集録したもので各章の結果は夫々日本電子顯微鏡学会(一部を日本細菌学会において発表されたものである。

尚本論文に関係のある主要文献は一括して文献欄に収めた。

II 試料作成法

一般に細菌の電顯用試料の作り方には二つの方法がある。その一つは適当濃度の菌浮游液(蒸溜水或いは生理的食塩水)を作成し，その一滴を電顯用試料支持台(通称träger)の支持膜(100～200 メッシュ銅或いは真鍮製の金網上に張つた厚さ300 Å前後のコロヂオン或いはフォルムバール薄膜)上に滴下し，室温乃至50°C程度にて乾燥固定して試料とする。他の方法はあらかじめ培地上にコロヂオン膜を張つておき，その上に菌液を塗布してテスト用細菌を培養する。適当時間の後菌がはえているコロヂオン膜を取出して用意せる支持台に固定する。

1. 手振法

結核菌浮游液を作る場合，結核菌の菌塊を個々の菌に分散させるために通常菌塊を水晶玉入りコルベンに入れて手動或いは機械的に振盪して菌液をつくる。これに遠沈操作を2～3回行い適当濃度の菌浮游液に調整する。この手振法により作成された菌液から電顯用試料を作り検鏡すると結核菌は色々の形態を示すのが見られる。しかしこの際振盪という物理的刺戟が菌の形態的変化にかなりの影響を与えることを考慮に入れなければならない。

従つて結核菌の形態を追究するためには，特にその誘導期及び対数期のものに対しては本法は良好な方法とはいえない。然しながら結核菌以外の一般細菌の多くの場合は水晶玉を必要とせず軽度の手振操作で良い菌分散液を作ることが出来るのでこの場合には利用価値があると思う。

結核菌の場合，最近はDubos培地が容易に入手出来るので結核菌を深部培養してそのまま試料をつくると後述の膜面培養法による形態と極めて類似した電顯像を得ることが出来る。従つて結核菌の場合手振法は目下のところ膜面培養用の菌液作成のためにのみに使用している。

2. 膜面培養法

この方法は細菌の発育過程を観察したり，武谷等が行つた様に光顯像と電顯像とを一対一で対応させて比較研究する場合に適している。又筆者等が行つた様にこの方法によつて比較的長期間標本がコンタミネートしない様にして発育様式その他を観察することも出来る。方法；液体或いは固体培地上にあらかじめコロヂオン支持膜を張つておきその上に菌液を塗布して適当時間培養後膜を培地より剝離させ電顯用金網に固定して検鏡する。この方法は方法論的に見て細菌コロニーが大きくなるとその中央部は電子線を

この研究の一部は文部省科學研究助成研究費によつた。(高橋)

透過しなくなるので検鏡視野はコロニー周辺部に限定されてしまう。

然しながら，種々の物理的化学的処理と発育様式乃至は形態変化を相対的に考察するのには目下のところ優れた方法であつて上記の欠点を充分償うことが出来る。

この方法において膜面上に培養された細菌の栄養源はコロヂオン膜を透しての拡散によつて供給される。従つて細菌はコロヂオン膜との接触面積を常に大にする様に運動するためか内部構造を観察する上に非常に有利な状態になる事実がある。また，この様な栄養源の摂取方法から細菌の形態は培地の物理化学的性質に大いに影響されることがわかる。従つて逆に培地に種々の薬剤を投与して細菌の発育形態を観察するのに良好な方法である。

尚膜面培養菌の固定はオスミウム蒸気を使用すれば固定操作による人工的産物を僅少にすることが出来る。

3. 凍結乾燥法

一般に凍結乾燥には次の様な利点があることが指摘されている。1) 組織における新陳代謝或いは死後変化が殆んど瞬間的に停止し，また固定液を使わないからこれによる化学変化がない。2) 溶解性の物質の移動を最少にとどめることが出来る。3) 細胞成分が固定剤によつて抽出されない。4) 固定脱水剤を用いず直ちに包埋出来る。

深井等は，次の様な方法をとつている。即ち，コロヂオン膜を張つて支持台上に試料浮游液を載せ，この支持台を銅板製の架台に載せて固形炭酸塊の上におき急速に凍結せしめる。凍結は架台の一側にエチルクロライドを吹きつけて行つてもよい。凍結した試料台を直ちに架台ごと排気鐘中におき排気すると．試料台面は約40秒で乾燥するが，更にそのまま10分以上排気を継続する。排気は数mmHg程度で充分である。又急速に排気するために排気鐘は小容量のものがよい。標本の保存は$CaCl_2$を容れた乾燥を用いる。かかる方法で作製した標本のコロヂオン膜は電子線照射によつて破れにくくなる様である。と報告している。更に凍結真空乾燥の操作については Wyckoff の報告があるが，これは巻末の文献にゆずる。

結核菌についてわれわれが行つた実験によれば，試料の水分蒸発に基づく deformation を防ぐ為には膜面培養菌或いは他の方法によりコロヂオン膜上に mono-layer に分散された菌を供試しなければならない。

III 試料の変化

電顕的細菌像の解釈にあたつて，標本の物理的化学的変化及び標本作成条件が電子像に及ぼす影響等を適格に知つておくことは，その細菌像を正しく解釈するための不可欠な条件の一つである。

電顕的細菌像にあらわれる試料の変化は次の2項に大別することが出来る。

1) 電顕用試料の作成技術並びに真空操作に基づく試料の変化。2) 電子線の作用に基づく試料の変化。

1. 乾燥による試料變化

標本作成時における最も致命的な試料変化は乾燥による菌体の萎縮及び distorsion である。細菌においては，Cell wall と菌体内容とはその物理的化学的性質が異なり，更に通常の乾燥法は熱が Homogeneous に作用するために乾燥による両者の収縮の度合が異なることは明らかに考えられる。培養が新しい時（若い細菌）にはこの差異はわずかであるが，培養が古くなると（細菌が年をとつて行くと）この差異が顕著になり菌体内容は菌の長さにより1～数個所に凝集して電子線に対して electron dense になるので光顕，電顕を問わず細菌形態の考察に誤解や錯誤をまねくおそれがある。従つて培養の古い細菌の光顕染色標本においては殊更にこの点に関する注意が必要である (Fig. 1-4)。尚，薬剤その他の影響により物理化学的変化をおこした細菌も乾燥により同様の変化をうける場合が多いので注意が必要である。結核菌の場合に，われわれは菌塊を分散するために石油エーテル及び石油エーテルアルコールを使用して試料変化を僅少にすることが出来た。これについては後述する。電顕の真空操作中に起りうる試料の変化については，あらかじめ軽度であるが標本を乾燥或いは脱水してあるので条件によつては問題にならないと思われるが，このことは試料の電顕挿入前の操作に関係があるので共に考慮する必要がある。

2. 電子線の作用による試料の變化

従来，電顕検鏡時におきる試料変化に関しては数多くの実験がなされており，その原因として次の要素が指摘されている。即ち，電子線照射に基づく試料の加熱効果，電子線自身の何らかの作用，及び顕微鏡内に存在する各種物質粒子による試料の汚染等である。物質分子或いは粒子として油拡散ポンプから出る油蒸気，試料支持膜及びメッシュ表面から出る有機，無機物質粒子及びグリース等の有機物質粒子及び顕微鏡内の真空度に由来する浮游ガス分子等があげられる。

然しながら，実際問題としてこれらの中のいずれが最も試料変化乃至は試料汚染に関係しているかという問題に関しては，いずれも推論の域を出ない現状である。

筆者等は以上の問題を電顕像の正確な解釈のための基礎的研究の一つとしてとりあげたのであるが，細菌について実験する前に先ず試料の物理的，化学的性質及び電顕学的方法論の立場から考えて供試材料として Paraffin 膜及び食塩が適切であることがわかつたので，これを使用して

一応電顕検鏡時に発生する試料変化の状態を観察することが出来た。次いで，それに基いて生物学的標本における変化の状態を研究した。

1) 試料に照射される電子流密度の測定

実験用電顕として日本電子光学研究所製 **JEM-4** 型を使用し最終像における電子流を絶縁金属板に受け，島津製作所製可動線輪型検流計（電流感度 2.1×10^{-10}）により電子流を測定した。次いでこの電流値をその時の倍率に応じて試料面に換算した。Fig.-5 は試料面に換算した電子流密度及び電子電流，収束レンズ電流の関係を示す。

2) パラフィン膜に対する電子線の影響に関する実験

電子線照射法の実際的な問題を確立する目的で次のような実験を行つた。

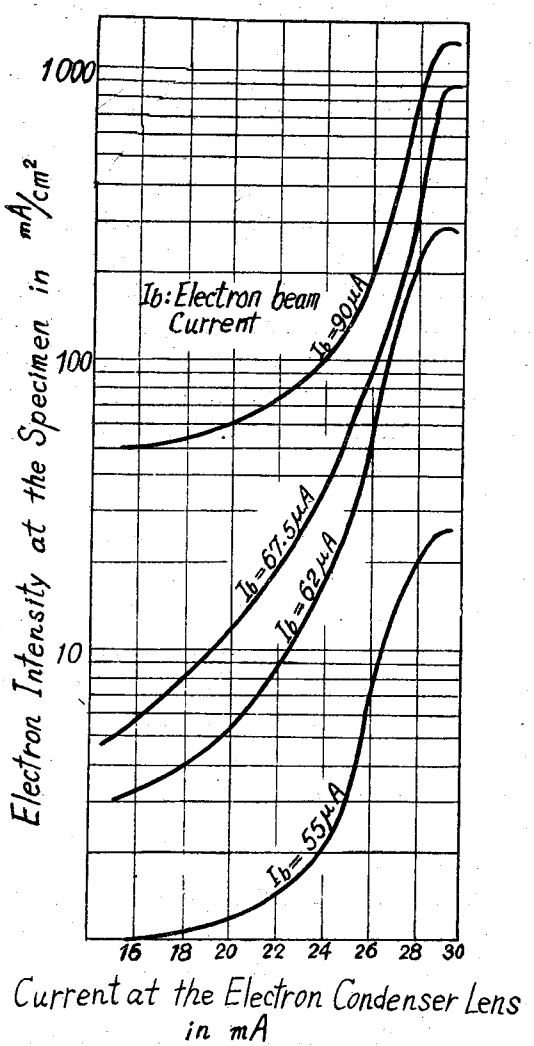

Fig. 5 試料面における電子流密度と顕微鏡内の全電子流，收束電子レンズ電流との關係

i) 実験方法及び材料

50 KV 電顕内に挿入された試料面の電子流密度と試料変化との関係を明らかにする目的で，種々の電子流密度下におかれた厚さ約 0.5μ のパラフィン膜の構造がどのように変化するかを観察し，同一試料の常圧下における加熱，及び真空内加熱による変化とを光顕的に比較検討した。常圧下における加熱処理は，恒温乾燥器を使用し，また真空内加熱には蒸着装置を使用して，その加熱されたタングステン線の輻射熱を利用した。パラフィンは比重 0.9，融点 63°C，融解熱 35.1 cal のもので，その石油エーテル溶液から薄膜を作成し，フォルムバール支持膜を張つた 100 メッシュの金網上に乾燥固定した。

ii) 実験成績

a. 常圧下における乾熱処理の場合

48°C 以下の温度においてはパラフィン膜の構造に変化は認められなかつたが，50°C，2 分間以上の処理では多くの場合，パラフィン膜は大部分溶融移動し，無構造の状態を示した。

b. 真空内における乾熱処理の場合（真空度 $10^{-3}\sim10^{-4}$ mmHg）

40°C 以下の温度においてはパラフィン膜の形態に変形は認められなかつたが，45°C，2 分間以上の処理では a. の場合と同様，無構造に等しい状態が認められた。

尚真空乾燥の場合は，パラフィン膜の構造に全く変形が認められなかつた。

c. 電子線による処理の場合

試料を 0.5～4 mA/cm² の電子流密度下において 5 分間処理したが，構造には変形が認められない場合が多く，特に照射時間 1～2 分，電子流密度 0.5 mA/cm² の場合には試料の変形は全く認められなかつた。

電子流密度 25 mA/cm² 附近においては，照射時間 1～2 分でも可成りの溶融変形が認められる場合が多くパラフィンはメッシュの周辺に移動凝集して，真空加熱処理像と類似したものが認められた。

電子流密度 100 mA/cm² 程度或いは，それ以上の場合には，すべて無構造の状態になるか或いは細粒化して残留する傾向が認められた。

以上の実験から考えられることは，4 mA/cm² 程度の電子流密度で試料を照射する場合，観察を短時間に止めれば実際問題として，電子線に基づく試料の温度上昇及びこれにともなう試料変化を充分少なくすることが出来ることである。更に試料を弱電子流密度で或る一定時間照射する場合には，電子流密度をそれ以上増しても試料自体は比較的安定な構造を維持しているので，このような場合試料に何か変化があつたとすれば，それはそのほかに電子線自体

の或る種の作用に原因するものではないかという推定もなし得る。

3) 電子線照射による食塩結晶の変化過程に関する実験

i) 実験方法及び試料の作成法

希望する大きさの食塩結晶を得るには食塩の蒸溜水溶液の温度を変化させればよい。高温及び低温時の場合の食塩の結晶状態については Dautrebande の報告がある。我々は 2000～3000°C の高温下で乾熱処理した食塩の蒸溜水溶液を作成し，スプレイにて 100 メッシュ金網上のフォルムバール支持膜に分散させた後 50°C の恒温乾燥器にて乾燥固定したものを用いた。亦目的に応じて高温処理を行つた食塩塊を磨潰法によつて希望する大きさの結晶を作成したこれらの試料に対して既知の電子流を照射して食塩に対する電子線の影響をしらべた。

ii) 実験成績

a. 電子線照射による食塩結晶の変化過程

食塩結晶に限らずすべての試料は，一定の最適電子流密度で一定時間照射をうけた後では，再びそれ以上の高密度電子線で照射をうけても，形態的には殆んど変化をうけずに，安定な状態を維持する。従つて試料の性質に応じて，この最適電子流密度を予め決定しておく必要がある。食塩結晶の場合この目的のためには，結晶の大きさによつて所要電子流密度及び照射時間を変える必要があるが，大略電子流密度 50 mA/cm², 照射時間 5 分以上であればこの目的に適う様である。従つて，この条件で前処理をうけた食塩結晶はその後数百 mA/cm² の電子流密度下におかれても，長時間比較的安定であることを確認することが出来た。それ故に，食塩結晶の変化過程を観察するには結晶が以上の様な安定な状態を獲得する前に 700 mA/cm² 程度の電子流密度で瀑射する必要がある。この様にして得られた結晶の変化過程が Fig. 6-7 である。これらの写真からわかるように，食塩結晶は照射時間の増加と共にもとの形を変えることなく不透過の状態からますます透過性になる。而して，その透過像があたかもレプリカ像の様な観を呈することは或る種の膜様物質が結晶の表面に形成されたことを予想せしめる。更にこの食塩結晶の周囲には一見無定形の観を呈する物質及び明らかに食塩結晶から出て来たと思われる同種の物質の粒子が無数に附着する。これらの物質及び粒子は単分子層の平板状結晶及び等軸晶形の食塩結晶であることを顕微鏡内において，或いは再結晶操作によつてその形態及び廻折像から確認することが出来た。そこでこの事実を利用して乾熱処理をした食塩塊より適当な大きさの食塩結晶を作成しこれに電子線照射，再結晶の操作を繰返すことにより，0.01 μ^3 程度の規則正しい食塩結晶の電顕像を得ることが出来た。こうして出来た結晶は形の上で非常に規則正しいのが特長である。

次に電子線照射によつて生成された食塩結晶表面の膜様物質の意義を明らかにするために以下の二種類の実験を行つた。

b. 電子線照射による食塩結晶表面の産物（その 1）

食塩の物理化学的性質から見て，電子線照射により食塩結晶が荷電されることが一応考えられる。この場合その結晶表面においては電気的に相反撥する 2 つの力がはたらくはずである。その結果，表面を外方に膨らませる力即ち，静電気圧力が生ずる。この現象を電顕的に観察するために，フォルムバール支持膜の穴の縁に食塩結晶を附着せしめて前の実験と同様にして電子線照射を行いその変化過程を動的に観察したところ，Watson 等 (1950) が映写機を用いて撮影した WO_3 結晶の変化過程と類似した結果が得られた。即ち，食塩が半透過性になる頃には，明瞭な膜様構造が形成され，その際内部の残留物質は非常な速度で運動しながらこの膜様構造をとおして蒸発し，内容物質の完全蒸発と同時に，形成された表面の膜様構造は萎縮するのが認められた。この現象中，膜様構造は明らかに膨張すること，及び電子線によつて内部の食塩結晶が運動を増すこと等が明瞭に認められた。

c. 電子線照射による食塩結晶の表面産物（その 2）

食塩の潮解性を利用して，膜様構造をレプリカ一段転写膜として映像させることに成功した。即ち，この膜様構造は厚さ及び形の上から考えてみて，力学的応力に極めて乏しいことが確かめられたので，供試食塩結晶の大きさを 0.5 μ 近辺に揃えて実験した。この食塩結晶を 30～100 mA/cm² の電子流密度下で 10～15 分間照射した後，これを数秒間蒸気中において乾燥固定させてから再び検鏡したところ明瞭な膜構造が映像として認められた。更に Cr shadow をほどこして一層鮮明な像を得ることが出来た。Fig. 8-9 はこの過程を示すものである。筆者等の実験によるとこれら薄膜の厚さは電子流密度と照射時間の相乗積に比例することがわかつた。

d. 実験結果に対する考察

試料変化乃至汚染に関係する要素としては先に述べた様に現在数多く存在するが，その機序に関しては，Watson 及び Fischer 等は顕微鏡内において hydrocarbon が蒸気分子となつて，これが試料と化学的反応をおこすためであろうと推測し，その際電子照射の程度，試料表面の如何がそれと密接に関係するといつている。

筆者等の実験によつて明らかにされた様に，電子線照射によつて食塩結晶の表面に薄膜が形成されるが，この様な薄膜は常圧下の加熱では得られない。このことから考えると，試料が電子線を吸収し電離作用を受ける結果試料面

においてイオン化された試料構成要素と試料面に附着していると考えられる顕微鏡内の色々の物質との間に化学変化を生じ，その結果生成せられた産物であると考えられる。この薄膜の化学的組成に対して明確なる断定を下すことは目下のところ出来ないが，一先ず均質な炭化された或る種の物質であろうと考えられる。従つて，顕微鏡内における浮游ガス或いは有機物質の存在が試料汚染の原因となることは否定し得ないと思われる。然しながら実際問題としては，二，三の研究者が報告しているような微粒子の観察に障害になる程の試料汚染は容易に除去出来るもので，そのためには顕微鏡内の清浄保守が不可欠の要素である。これは又，顕微鏡の解像力を最良の条件で維持する手段でもある。然しながら清浄度には自から限界があつて，顕微鏡の真空度がたかだか 10^{-4} mmHg 程度である現在では，全く完全な意味での化学的清浄さはのぞまれない。これに反して電子流密度，並びに照射時間は或る程度任意に変え得るので，このことによつて試料変化乃至汚染によつて生ずる産物を極力少なくすることが出来るわけである。このことは試料に対する電子線照射方法が試料変化乃至汚染に重大な関係をもつことを如実に示すものと考える。

4) 電子線照射による生物学的試料の変化

i) 生物試料の収縮

生物試料が標本作成操作中に或いは乾燥によつて収縮することは前述の通りであるが，一方電顕内においても試料の収縮がおきる。即ち結核菌を例にとると，電子流密度 4～10 mA/cm² における菌の長さを対照として電子流密度 100 mA/cm² における菌の長さを測定してその収縮率を統計学的に計算すると収縮率は 3～20% になる。また試料の収縮をおこす電子流密度は略一定していてこの限界内で収縮してしまえば，それ以上の電子流密度下におかれてもそれ以上の収縮はおこらない。然しながら，何れにしても急激に電子線を照射すると試料が収縮する他に distorsion をおこし又支持膜上で移動する原因になるのでこの様な操作は避けるべきである。一般に生物試料は電子線照射によりその透過性が増大するためいきおい強電子流を使用し勝ちであるが，この場合には上記の如き収縮がおこつているので特に計測を行わんとする際には注意を要する。筆者等の実験によれば筋線維を電顕的に計測する場合は筋線維の長さが長い程測定誤差が大きくなるので，あらかじめ線維を Microtome 等により短かく切断し，更に電子流密度を 30 mA/cm² 以下に押えなければ測定誤差は大きくなり，実際問題として極めて不正確な結果になる。

尚この実験はすべて non-shadowed の試料について行つた。

ii) 細菌々体構造の変化

細菌（結核菌）が電子線照射を受けると菌体は透過性を増し，菌体内の顆粒は空泡化される。

パラフィン膜，食塩結晶の実験結果に基づいて先ず電子流密度 0.5～4 mA/cm² で 1～3 分間照射して得られた細菌像を対照として，これと種々の電子流密度で撮影した細菌像とを比較検討した。細菌の場合，電子線による試料変化は常圧下の乾熱乾燥に基づく変化とは本質的に異なる。即ち，電子線照射による加熱作用は細菌々体内の各要素によつて不均一で，これはそれら要素の熱伝度並びに質が異なるために出て来る現象と考えられる。従つて，細菌々体内の各種要素の電子線照射による形態的変化は一様におきるものではなく，電子流を一定とすれば照射時間によつてズレを生ずる。事実，細菌の原形質に相当する部分は，30 mA/cm² 程度の電子流密度で照射されると，短時間で容易に透過されて，明るい像を呈する様になるが，しかしながらその透過度は直ちに安定されてしまう。こうなると更に高密度の電子線照射をうけてもその部分はそれ以上変化しない。これとは反対に，細菌々体内に存在する不透過性の色々な顆粒状物質は電子流密度が 30 mA/cm² 以上になつてはじめて変化をうけて，所謂空泡化の現象が現われて来るが，細菌の培養日数の新旧により顆粒の空泡化の発現様式に或る程度の規則性がある様に思われる。更に，ここで興味あり且つ注目すべき事実は，電子線照射によつて透過性が増大した細菌体の体積は，照射前のそれと比較して，著明な減少を示さないということである。この事実は電子線照射によつて透過性が極めてよくなつた菌体に shadow-casting を施すことによつて確認することが出来た。結核菌は培養が古くなると電子線に対する透過性が自然に増大して来るが，新しい菌で電子線に対する透過性を故意にたかめたものは，それとは形態的に異なることが以上の方法によつてわかつた。また，菌体の透過性増加に基づく菌体内各小体の位置の変化はおこらないことがわかつた。Fig. 10 は人型結核菌の初期コロニーの像で，これを予め軽度の電子線処理を行つたのちに電子流密度 200 mA/cm² で数 10 秒処理したものに Cr shadow を施したものである。Fig. 11 は培養 30 日を経過した BCG 菌の透過性を示す。

iii) 組織切片に対する電子線の作用

家兎大脳組織切片を供試材料として前記同様の実験を行つた。即ち，厚さ約 0.1～0.2 μ の組織切片を種々の電子流密度の電子線で照射して包埋剤（樹脂）を除去し，その透過性が著しく良好になつたものについて shadowing の効果をしらべたところ，顕著な効果は認められなかつた。これに反して，同一試料の包埋剤を化学的に除去したものについて shadowing をほどこした場合は鮮明な shadow 効果が認められた。この事実から Fig. 12 に示す様に電子

線曝射による脱包埋の際には，厚い切片では包埋剤を完全に除去し得ない中に食塩結晶の場合と同様電子線に対して安定性を獲得し，更にこの際，組織切片の表面に炭化された薄膜が形成されるものと思われる。

従つて，組織の包埋剤に対する電子線の作用は，これら包埋剤除去に使用する化学的溶媒の作用とは本質的にその機序を異にすると考えられる。尚切片の厚さが極めて薄い場合には切片が電子線に対して安定化される以前に包埋剤が除去されてしまうことも考えられる。この場合の切片の厚さを測定することは目下のところ困難であるが尠くも0.05μ以下であろうと考えられる。

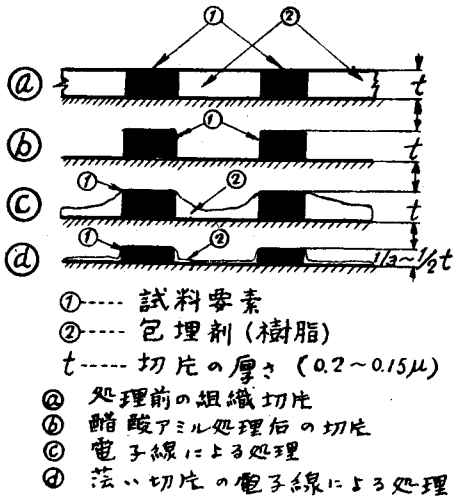

Fig. 12　脱包埋操作の比較模型圖

一方，電子線の作用を利用して切片の脱包埋をすると，組織内の各要素は位置的変動をおこさない。これに反して，化学的方法で脱包埋をすると組織の各要素は移動して組織像の解釈に困難さを加える場合がある。従つて，0.1μ乃至はそれ以下の厚さの超切片の脱包埋には電子線曝射を応用する方が良結果が得られる。但し，目的によつては化学的方法を併用しなければならない場合もあるので，この場合には上記の如き組織の各要素の移動，脱落があることに充分注意を払う必要がある。この際，化学的溶媒の作用時間を極力短縮し，又静かに操作すればこの障害を防ぐことが出来る。しかしながらこの際溶媒そのものの試料に与える影響は別に充分考慮されねばならない。

IV　試料變化を少くする方法

前節において筆者等は試料の変化に対する代表的な2，3の問題について考察を行つたが，電顕によつて細菌（他の試料に対しても同様のことが言えるのであるが）を研究する場合，この試料の変化機構及び変化防止策は細菌の電顕像を正確に解釈するにあたつて重大な意義をもつ。このことを考慮に入れておかないと，電顕的極微の世界に対して，従来の光顕的知識で勝手に解釈をすることになる。従つて電顕像を解釈するにあたつては標本が忠実に電顕像として表現されているかどうかということが充分吟味されなければならない。

1.　試料の作成中における變化防止法

細菌試料に重要な変化を与えるものの1つは菌浮游液の作成に用いる溶媒の物理化学的条件である。

一般に細菌試料としては蒸留水或いは生理的食塩水浮游菌液が用いられる。そして更にこれに遠沈操作が加えられる。この場合，蒸留水に菌を浮游してこれを長時間放置しておくと細菌細胞は著しい障害を受ける。特に室温が高いと障害が大きい。われわれの実験によれば蒸留水菌浮游液は作成後室温では30分以内に支持台に固定しなければ，一応蒸留水による影響が出て来る。また氷室に保守する場合でも24時間以上経過すると障害が現われる。従つて常温において蒸留水菌浮游液の作成に使用する場合には作成後出来るだけ短時間内に試料支持台に固定することが望ましい。生理的食塩水で菌液を作成する場合には細菌細胞は比較的長時間安定であるから実際問題としては蒸留水菌液に比しすぐれているわけであるが，この場合に固定された試料に時として食塩結晶が介入し鮮明な細菌像を得ることが出来ないことがある。これらの食塩結晶は試料面をスポイト等にて2～3回水洗すれば容易に除くことが出来る。また遠沈操作も細菌細胞に対して distorsion 及び細胞内容質に対しては凝集等の作用を与える。殊に培養が古いものではその影響は甚だ大きいので，急激に廻転を増す様なことは避けねばならない。

次に問題になるのは前節で述べた様に試料の乾燥操作である。結核菌に対して，室温乾燥，高温乾燥，凍結乾燥等を行いそれらの差異ならびに乾燥操作の影響をしらべたところ，夫々の物理的条件により多少所見が異なることがわかつた。この差異は主として乾燥速度に基づくものであろうと思われる。

乾燥による細菌の変化を防ぐことは困難であるが，細菌の培養の新旧，或いは研究の条件について考慮を払えば一応大過なく電顕像の考察が出来ると思われる。われわれは，結核菌について，石油エーテルアルコール混液に菌を浮游させ全操作10数秒で菌を試料支持台に固定する方法を用いて満足し得る結果を得た。

2.　電子線による影響を少なくする方法

現在一般に使用されている50 KV 電顕において，電顕操作中におきる試料の変化乃至汚染は細菌に限らずすべての試料に当はまるのであるが，大体次の如き手段或いは注

意をすれば，試料変化を僅少にすることが出来る。

1) 電顕内各部の清浄保守

電顕内を常に清潔にしておくことは，顕微鏡内に挿入された試料の汚染防止に対する不可欠の要素であり，電子光学系の諸問題に対しても重要な事柄である。清掃にあたつては，塵埃ばかりでなく，電子線の作用にもとずく数多くの有機，無機変性産物を取除く必要がある。特に各レンズの絞り板，電子銃，収束レンズ間は屢々清掃しなければならない。

2) 各種試料に対する最適倍率及び試料照射電子流の最適値を決定すること。

試料に対して強い電子線を与えると試料が変化するので，このことは厳に注意しなければならない。一般に試料は或る一定の電子流密度で一定時間照射を受けると，電子線に対して安定な状態を維持するようになるので，試料の種類に応じてこの最適値の大略を決定しておくことが必要である。

われわれは細菌試料に対して電顕の各コンスタントを次の様に決めている。即ち，全放射電子流を2～5μA，試料面における電子流密度の可変範囲を 0.05～35 mA/cm²，電子光学的倍率を 1000～6000 倍，明視野像の観察には 0.05～10 mA/cm²，暗視野像の観察には 30 mA/cm²。尚 30 mA/cm² の電子流密度で照射された細菌の菌体各要素は多少透過性を増してくるが菌体内の微少顆粒 (200 Å 程度の粒子) が消失することはない。然し，100 mA/cm² 以上の電子流密度で照射した場合 10 数秒でこの粒子が不明確になることを認めた。

3) 電顕像の観察撮影に要する時間の短縮

必要以上に観察時間を長くすると試料は変化するばかりでなく汚染されてくる。タバコモザイクバイラスについて，試料を電顕に挿入後3分及び15分後にとつた2つの像でそのコントラストを比較したところ，後者においてコントラストは約半減 (視覚的に) していた。

4) 電顕内挿入前の防塵及び試料支持用金網の清掃

試料及び支持膜がその作成或いは保存中に汚染されていると電顕像を考察する際に無益な困難さを加える。これを防ぐためには試料及び支持膜の作成或いは保存に細心の注意をすと共に夾雑物の介入した原因を確かめることが出来る様に各操作毎に電顕的な検査を行う必要がある。

金網 (支持膜を支える金網) の汚れは電子線の作用により複雑な粒子或いは被膜となつて試料を汚染する因となる。それで一般的には稀塩酸等で数秒処理した金網を使用するとよい。また撮影にあたつては，金網の目の周辺にある試料は出来るだけ避ける様にする。われわれは，金網による試料の汚染を避ける意味で従来の 200～250 メッシュの代りに 100 メッシュの金網を使用しているが仲々好結果が得られる。

5) Shadow casting 法

前述の方法はいずれも試料変化防止のための消極的な手段であるが，Shadow casting 法は熱伝導度の良好な重金属を試料に cast して試料の温度上昇を防止し，温度による試料変化を防ぐ方法である。この目的のために多く使用されているのは Au であるが Ag，Cr でも可成りの効果がある。

先にわれわれは，試料が電子線照射により安定性をもつ様になることを述べた。そしてその機構は試料或いは試料表面の炭化現象ではなかろうかと考察した。このことは炭素の物理的性質から考えると明らかである。即ち，炭素は熱放射能が大なること，及び N:，Pt 等に比し，より優れた熱伝導度をもつていることなどである。

一方，コロヂオン或いはフォルムバール膜に SiO_2 を蒸着したものを支持膜として使用すると比較的試料変化が少なくなる様であるが，その原因については目下のところ確証はない。またあらかじめ支持膜に $C_{10}H_8$ (Naphthalen) を蒸着する方法を考案した。

古く，Ardenne は試料照射電子流を或る種の Slit で遮蔽して，試料の温度上昇を防ぐ方法を考案した。この方法の詳細は不明であるが，われわれは Fig. 13 に示す様に試料支持台に2枚の金網を取付けて不要な電子線を取除く方法を利用している。

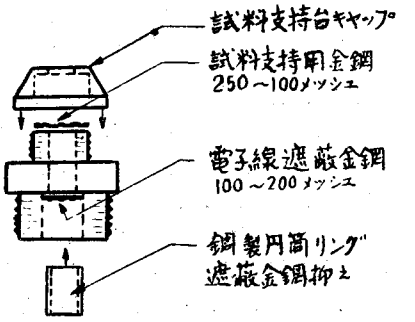

Fig. 13 二重格子試料支持臺

V metallic soft shadow casting 法について

生物学的標本に対して metallic shadow casting をほどこす目的は，1) 試料に立体感を与え，そのコントラストを増加させる。2) 試料の影の形或いは長さから形態を推定したり，試料の高さ乃至厚さを測定すること等である。これに用いられる金属は一般に Au，Cr，Pt，U 等数多くある。これらは真空蒸着装置内で試料に応じて適当な角度をもつて蒸着させる (詳細については巻末の文献にゆずる)。

従来，細菌その他の試料に対して行れて来た shadow casting は試料の影に主眼をおいて単なる立体観を主にしたものが多かつた。また，細菌細胞の内容を観察しようとして shadowing を行つても写真的には良好な結果が得られなかつた。そこでわれわれは，試料の影は従として，生物試料の微細構造を忠実に投影出来る様に以下に述べる様な極めて柔かい感じの shadowing を試みている。

この方法は試料の電子線に対する透過性をさして障害せず同時にコントラストを与えるので，筋原線維，何個か凝集しているバイラス，物理化学的処理を施された細菌，更に生物学的に変化したと思われる細菌その他の生物試料に対して極めて有効な方法であることがわかつた。一例を掲げれば蒸着膜の厚さが 25 Å 以下になる様に計算された Cr の一定量を 10^{-4} mmHg 以上（通常 shadowing が行われる時の真空度）に到達させない前に蒸着する方法である。従つて shadowing に要する時間は従来の方法の約 1/2～1/3 で充分である。この方法によると，従来の shadowing 効果に比し非常に軟かい感じの像が得られ，その上電子線の透過性もさして障害されないので試料各部の detail が可成り良好に表現される。特に，この soft shadowing においては試料の微細構造が monolayer で相互に隣接している様な場合には，その無影効果が特に目立つて来る。

M. A. Jakus 及び C. E. Hall 等は不良真空度における soft shadowing 法の利点を発表しているが，技術的な見地からこの方法をあまり推賞していない。然しわれわれは，この方法は蒸着に用いる金属の量が上記の如く比較的少なければ実験はいつでも再現されること（reproductivity）を確認したので，日常この方法を活用している。

この他，試料のコントラストを増加させる方法として生物試料を重金属塩等で処理する方法即ち，電子線染色等が行われつつあるが，これは後日にゆづることにする。

我々は以上述べた各種の方法を使用して結核菌の電顕像を電顕学的な立場から考察を試みた。以下はそれに関する記述である。

VI 結核菌の微細構造に關する電顕学的追究

A. 實驗材料及び實驗方法

使用した電子顕微鏡は JEM-4 型（加速電圧 50 KV）である。試料観察及び撮影時の試料面における電子流密度 2～5 mA/cm^2，電子光学的倍率 1000～5000 倍，光学的な引伸倍率 3～7 倍にて極力電子線による試料変化を僅少にする様に努めると同時に明視野法及び暗視野法を併用した。

供試菌としては，鳥型菌，人型株（青山 B 株，今村株，Frankfurt 株，仲野株，H37RV），BCG 予研株，牛型菌を用いたが，中でも BCG 予研株を特に多く用いた。

電顕用試料作成には次の 4 方法を利用し，目的に応じて作成法を決定した。

1. 物理的試料作成法（手振法）
2. 膜面培養瓶法
3. 化学的試料作成法（石油エーテル法）
4. Dubos 培地による深部培養法

これらの方法についての考按は前に述べたが，その使用目的は次の通りである。

1. は膜面培養法による菌浮游液の作成に使用し，2. は菌の初期コロニーの観察即ち発育様式の観察及び菌体内微細構造の追究に使用し，3. は 1. の方法の欠陥を確認すること並びに菌体表面の Wax 様物質を溶融し去り Cell wall の表面構造を観察するために使用した。この方法はまた極めて短時間内（10～60 秒）に標本を電顕用試料とすることが出来，アルコールの添加により後に述べる様な興味ある所見が得られた。4. は培地に増殖した菌を長期間に亘つてその形態を追究するために使用した。この方法は種々な電顕的研究のための菌液の作成に優秀な方法である。

以上の方法によつて得られる結核菌の電顕的菌体構造は次の如くである。

B. 結核菌の電顕像

発育初期及び発育旺盛な時期における結核菌の構造は Fig. 14-16 に示す様に電顕的に異なる 4 小体及び 3 つの部分からなつている。

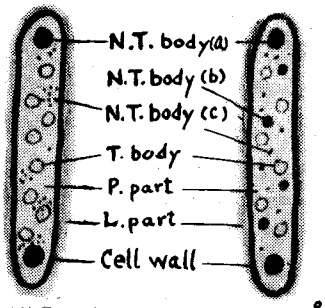

Fig. 16 結核菌体構造模型圖

これらの要素に対し説明の都合上次の様な名称を附しておく。

1) Non-Transparent bodies.

これに一応その大きさから次の 3 つを区別した。

a. 2000～3500 Å の小体で，菌体の両極に 1 つづつ規則正しく存在する。

b. 900～1200 Å の小体で，これは特に培養の或る時期に出現してくる様である。

c. 200～500 Å の微粒子で，5～10数個づつかたまりになつて菌体の所々方々に存在する。

2) Transparent bodies

従来空泡と言われているもの。その大きさは菌種によつて多少異なるが同種の菌では略一定している。

3) P-Part

原形質に相当する部分で，電子線による影響に対して他の小体乃至部分に比し最も敏感である。

4) Cell wall (菌膜)

極めて強靱 (物理的に) で伸性に富んでいる。この性質については後述の物理的な処理実験を参照。

5) L-Part (slim layer)

所謂層菌膜の外側を覆つている粘稠性物質であり，電子線散乱率が大である。

Non-Transparent bodies 及び Trans parent bodies を以下菌体内小体と仮称する。

1. 各種結核菌株における菌体内小体の共通性

人型菌，牛型菌，鳥型菌，BCG 等を膜面培養して電顕で観察すると，成熟期においては常に菌小体が存在していることを確認した。従つて，これらの小体の存在は結核菌に共通したものであろうと考える。

2. 発育速度と菌体内小体との関係

培地に菌浮游液を滴下し，一定時間培養後マイクロコロニーを検鏡するとコロニーの大きさに可成りの差が認められる。これは種々の条件によるものと考えられるが，(一応発育速度として取扱う) 発育速度が順調であると考えられる菌数10個からなるコロニーの各菌体内には小体が明瞭に認められる。一方，発育速度が遅かつたと思われる2～4個の菌からなつているコロニー内の菌は全般的に内部構造のコントラストはよくないが菌体内小体はやはり認められた。この他，増殖しないで1個のままで存在している菌が屢々見られるが，この状態の菌においては菌体内小体は確認されず菌体内の2～4個所に不成形でやや細長く，菌体の長軸に対して略直角な electron dense な縞様の部分が認められた。Fig. 17 参照。以上の所見から，発育，増殖能力のある菌には発育速度の如何に拘わらず菌体内小体が明瞭に存在するといえる。

3. 培養日数と菌体内小体との関係

Sauton 及び Dubos 培地培養の BCG について培養後5～60日まで，その形態を観察したところ，菌体は培養日数と共に電子線に対する透過性を増して来ることがわかつた。

2000～3500 Å (a) の小体は培養日数と共にその鮮明度は減少して来る。即ち発育旺盛な時期においては密度が高く略球状を呈するが培養日数と共に不定形になるので，暗視野像で観察するとその不定形部分は比較的電子線を透過する。従つて培養の古くなるにつれて，この小体は物理化学的変化をおこして来るものと考えられる。

900～1200 Å (b) の小体は培養の或る一定の時期に出現して来る様である。また，この大きさの小体は菌体を物理的及び化学的に処理してもまま出現して来ることが他の実験で観察された。

200～500 Å (c) の微粒子は培養日数に関せず存在している。但しこの粒子の集合，分散，数量等には変化がある様であるが今のところ確証はない。然しながら一方，2000～3500 Å の小体，900～1200 Å の小体，200～500 Å の粒子との間には，菌に対する紫外線照射の実験から，関連性があるように思われるが，この問題は目下新たに実験計画中である。

Transparent bodies は，菌種により，また培養の新旧により大きさ及び形状に多少差異があるが例外なく存在している。但し培養日数と共に不明確になる傾向がある。

4. 培養日数と P-Part

P-Part は若い培養では菌体内小体を包んでいる様に観察され，電子線の散乱能力は比較的 (経験上) 大である。培養日数の経過と共にこの部分は電子線の透過性を増す。培養が極めて古く菌が完全に透過性をもつた場合，電顕的には，菌は Cell wall のみの様に観察され，非立体的になる。

尚試料の作成に物理的方法を用いた場合，特に培養が古くなると，この原形質の変性物と思われる略円形の比較的大きい顆粒状のものが，菌体各所に出現するのが認められた Fig. 18。

5. Cell wall 及び L-Part

これについては後述する。

6. 2000～3500 Å 小体の電顕像について

この小体は電子線により空泡化し易いので，その内部構造の電顕像は確立し難く，その報告は尠ない。この小体が電子線で空泡化されて行く有様の1例を Fig. 19 に示した。

次に，空泡化をさけるようにして撮影したこの小体の写真を光学的にルーペで拡大して観察すると (この操作は写真引伸しによる粒子の荒れを防ぐために行われた) 極めて小さい (100～200 Å) 粒子状のものが不規則に略一定数

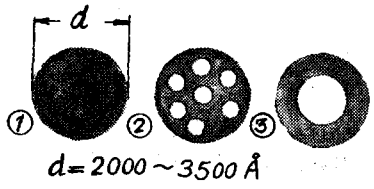

Fig. 19 結核菌の顆粒の電子線による變化過程

存在していることがわかつた。しかしながら，この黒点については更に厳密なる考察を必要とするので色々な基礎的な実験を計画中である。

更に，この小体の電子線による変化様式並びに暗視野効果による所見から，この小体は均質の無機顆粒に類似した性質があると考える。

C. 物理的因子の菌体に及ぼす影響

人工的に種々の物理的作用を結核菌に与えた場合，結核菌の電顕像がどの様に変化するかを追究した。

供試菌は鳥型菌及び BCG である。

1. 90°C, 30分乾熱の場合

電顕像における菌形は無処理の場合と大差がないが菌体は全体として萎縮し密度は大になり暗視野的に不透過性をもつ。又菌体内周辺部に特異な空泡状のものが認められる場合がある。これらの所見は，明らかに菌体蛋白が熱変性をおこして凝固するためであろうと考えられる。

2. 100°C 1時間煮沸の場合

菌体は極度に萎縮し，菌体内には electron dense な略球状の凝固物がブロック状に2～3個，個々に或いは連珠状に見られるものが多い。菌体内小体は全く不明確になる。これは菌体が熱処理をうける時蒸溜水中に浮游されているため煮沸による熱作用並びに振盪効果が外部から集中的に作用するので菌体蛋白が求心的に変性凝固してブロック状になつたものと考える。

3. 40°C 凍結，真空乾燥2時間の場合

菌体は極めて不整形を呈し，菌の両端をもつて引伸した様な形態を呈するものと (a)，菌体が多少萎縮し両端が高密度を呈するか或いは両端及び側面が高密度を呈するもの (b) との略2種ある。処理後，試料支持台上の試料は光顕的に白色の針状を呈し，且つ試料は立体的に重なつていることがわかつた。従つて，(a) の様にペスト菌の変形菌にみる様な特異な形態は凍結のみによるものではなく，菌体が支持膜上の空間で凍結され，真空乾燥によつて菌体外の凍結した水分の容積が減少するためにおこる変形であろうと思われる。一方支持膜上に密着して凍結乾燥された菌は (b) の形態を示す。

(a) の形態を示し得ることから菌体乃至 Cell wall は伸性であろうと思われる。

4. 1 mmHg, 10～60分 真空乾燥の場合

菌は乾熱の場合と略同様の形態変化を示すが，電子線の透過性は増加する。また蒸溜水菌浮游液を真空で乾燥すると，煮沸の場合に見られるような内容物の凝固は起らないで通常の真空乾燥の場合と類似した像が見られる。

5. 周波数 480 KC, 出力 200 W の超音波処理の場合

作用時間5分；煮沸した場合の形態と酷似した像が得られる。即ち，密度の大きい部分が菌体に1～3個現われ，また極めて少数ではあるが菌体の一部が破壊されたものも認められた。

作用時間10分；処理前の形態を保持していないものが多く，分散度が悪くなる。

作用時間15分；分散が非常に悪く凝集をまぬかれた菌については，殆んど大部分の菌体の一端が破壊されていた。

作用時間25分；処理前の形態を示すものは全く認められず，大多数の菌体は一端が必ず破壊され，内容物質が凝固するためか amorphous に見えた。

作用時間 40～60 分；作用時間 25 分の場合と同様の所見であつた。尚菌液に菌体の破壊片と思われる様なゴミ状のものが多く見られた。

以上の超音波の実験に使用した装置は出力が不足であつたため菌体が完全に破壊されない中に超音波の化学的作用の影響を受けて菌体が凝固してしまつたものと考えられる。

ちなみに，処理中に於ける菌液の温度上昇の割合は次の如くであつた。

作用時間(分)	5	10	15	25	40	60
菌液温度 °C 15°＋上昇温度	15＋0	15＋1	15＋5	15＋10	15＋15	15＋25

この実験で興味がある点は，短時間の超音波の作用が煮沸した場合と同様な効果を現していること及び菌体は常に一端から破壊されて行くことである。

6. 100 V, 19 W 殺菌灯で紫外線を作用させた場合

紫外線源と試料との距離を 15 cm とし，菌を蒸溜水に浮游させて照射した。

作用時間1時間後菌体の電子線透過性が増して来る。菌は細長くなり，一端が常に tapered end 示すのが特長である。膜面培養菌に紫外線を照射しても同様な結果が得られた。即ち，膜面培養直後に約 10～20 秒紫外線を照射し適当時間培養検鏡すると，菌は細長くなり，菌の一端が常に tapered end を示した。更に菌体内に 1000 Å 前後の不透過な粒子が非常に数多く現われ，前節で示した 2000～3500 Å の小体及び 200～500 Å の粒子は認められなかつた。菌体はやはり透過性を増していた。

考按：乾熱及び煮沸の場合，原形質に相当する部分が熱変性されてしまうので，菌体内小体は不明確になつてしまうが，その他の処理方法においては小体は依然確認出来た。従つて，上記の如き物理的因子により各小体は容易に消滅しないものと考えられる。

D. BCG に對する石油エーテル及び石油エーテルコー

ルの影響

通常結核菌の分散が他の細菌に比し悪いということは菌体表面に分泌せられる特種の粘稠性物質，即ち Fats, Waxes, Lipoid 等の複雑な化合体が原因であろうとの考えから，菌体を石油エーテルで処理を行つて非常に良い結果が得られた。更にこれに基いて，石油エーテル及び石油エーテルコール菌体に及ぼす作用を形態学的に追究した。

1. 石油エーテルによる結核菌の分散

1% 酸性小川培地，及び Sauton 液体培地に発育した BCG について実験を行つた。

培養日数に関せず BCG 菌塊は石油エーテル中に投入すると 10～60 秒で非常に良く分散する。菌体は個々に分離して分散するものと膜面培養における如く mono-layer に分散するものとある (Fig. 20)。

2. 石油エーテルの BCG に及ぼす影響

BCG は石油エーテルの影響をうけて形態的にも機能的にも変化することは当然考えられる。そこで，われわれはこれまでの実験結果から考えて BCG が成熟期にあると思われる Sauton 培養 9 日目附近のもの，及び菌体構造が非常に不明確になり，II. 3 で述べた 900～1200 Å (b) の小体が出現しやすいと思われる 18 日目附近のものとについて石油エーテルの影響を観察した。

1) Sauton 培養 9～10 日目の BCG についての観察

石油エーテルの作用時間 30 秒乃至 2 分程度の間は菌体に変化は認められなかつたが，10 分では菌体内構造が不鮮明になる。この際，2000～3500 Å の小体は確認出来るが，空泡様小体は不明確になる。30 分では菌体部が不鮮明のまま新たに電子線の透過良好な部分が菌体内に 1～3 個所出現してくる。1～20 時間では電子線透過良好な部分が菌体の中央部或いは側面に比較的広範囲に拡がる。20 時間以上では更に変化を増すことはなく一応，このままの状態で安定してしまう様である。この様にして，石油エーテルの影響により原形質は菌の一部におしやられ電子線に対して極めて不透過性を示す様になる。この場合，菌体内の透過性の良好な部分を shadow casting 法で確めると明らかに立体観を与えているところから，古い培養菌に見られる同様な所見とは生成の機序が異なるものと解釈出来る (Fig. 21)。また，この実験中 2000～3500 Å の小体はしばしば消失する場合もあるが，大部分の場合依然として存在が認められるのでこれらの小体が石油エーテルの影響で消滅するとは考えられない。

2) Sauton 培養 18～20 日目の BCG についての観察

培養日数 18～20 日目の BCG の形態は前にも述べた様に，2000～3500 Å の小体は不明確で，菌体の電子線透過性は比較的良好になるため，1) の場合の如く形態変化の過程をつかむことが困難であつたが石油エーテルで 20 時間処理した場合には前回と略同様な所見が得られた。

尚本法により培養日数 18～20 日目の BCG を分散させた時の菌の形態は Dubos 培地に同日数培養したものと全く同様であつた。

3. 石油エーテルアルコールの BCG に及ぼす影響

BCG に限らず一般結菌菌にアルコールを作用させると菌体が萎縮するので，石油エーテルとアルコールの等分混合液を使用して前記の分散実験を繰返した。

1) 分　散

分散速度は極めて早く石油エーテルのみの場合と大差なく，菌塊は mono-layer に分離される。但しこの場合菌体周辺から由来したと思われる粘稠性物質が各所に分離されているのが認められた (Fig. 22-23)。

2) 石油エーテルアルコールによる影響

この混液中に 1 時間放置しておいても菌体は特別の形態変化を来さず，石油エーテルのみ 30 秒間作用させた場合の所見と同様であつた。1 時間以上放置した場合には，内部構造のコントラストが悪くなるが菌体内小体に大きな変化は認められなかつた。

考按：結核菌の分散，即ち試料作成法の一つとして石油エーテル或いは石油エーテルアルコールを使用すれば好結果を得る場合があることを知つた。また石油エーテルアルコールによる菌の分散実験において，菌膜を包んでいる L-Part (粘稠性物質) に対して石油エーテルとアルコールとでは各々逆に作用することがわかつた。

菌膜を包む L-Part は極めて大きい電子散乱能力をもつていることが暗視野効果によりわかつた。従つて，通常結核菌の周辺のコントラストが悪いのはこの L-Part の電子散乱性によるためであろう。

菌体構造のうち石油エーテルの影響に最も鋭敏なものは Transparent bodies である。また L-Part は石油エーテルに対する溶融状況及び電子線に対する透過性等が菌の培養日数の経過と共に変化して来ることから考えると，此の物質は菌が古くなると量的よりもむしろ質的に変化するのではないかと推論される。

E. 結核菌の所謂“鞭毛様物質”について

Dubos 培地による深部培養法及び，膜面培養法を用いて H37RV, BCG, 鳥型菌の培養 1 日目から 60 日目までの形態を電顕的に比較観察する途中所謂“鞭毛様物質”に遭遇した。

各菌株の若い培養の観察には，主として膜面培養を用い，その他は Dubos の培養を用いた。

深部培養とした菌は滅菌蒸溜水で洗い，最後に蒸溜水

を用いて適当な濃度の菌浮游液をつくり，これから電顕用試料を作製した。更に必要に応じて shadow casting をほどこして観察した。

膜面培養による各菌株の電顕的形態は屢々説明したごとく通常電子線に対して不透過性な大小2乃至3種の顆粒状小体と透過性のよい transparent とが，Cell wall によつて包まれている菌体内容質の中に包埋されているのが普通である。然しながら，Dubos の培地に比較的長時間深部養培を行つてその形態を追究したところ，特に鳥型菌の場合，一見鞭毛のごとき繊維状の物質が菌体外側に多数認められた (Fig. 24-25)。

このような状態を呈した鳥型菌の抗酸性をしらべたところ，約半数がメチレンブラウに着色した。この実験は数回繰返して試みたが同様の結果が得られた。この繊維状を示す物質の根元を確認するために，これら鳥型菌の約10%が非抗酸性を示す時期 (われわれの実験では3日目) における形態を電顕により詳細に調べたところ菌体が破壊しはじめた状態を容易に認めることが出来た。この場合における菌体は恰かもゴムの加硫操作中に見られる様な繊維状の物質から出来ていて，かろうじて菌形が保持されている程度で，Cell wall は破壊されていることが確認された (Fig. 26)。

鳥型菌以外の菌株においては60日間培養を行つたものでも Cell wall は確実に存在し，菌体内容のみが消化減少して所謂 Gohst 化して見られることは先の実験の通りである。然しながら鳥型菌以外の菌株において，かかる繊維状物質が構成されないとは考えられない。それはいずれの菌体内容も或る物理化学的条件のもとでは繊維状を呈する可能性が充分あるからである。われわれは他の実験で，BCG が自家融解を起したと考えられる状態において，鳥型菌の場合と同様な繊維状の物質を菌体外に確認した。この場合，BCG の Cell wall は鳥型菌の場合と同様完全に破壊されて見えた。これらの一見鞭毛繊維状物質がその生成の時期及び電顕像からみて真の鞭毛でないことは明らかである。

しかしこれら繊維状物質の生成条件については目下のところ不明である。

VI 総括並びに結語

以上われわれは，加速電圧 50 KV の電顕を使用して，細菌研究における電顕的方法について実験，考察を行つた。然しながら電子線はその電子加速電圧の大小によつて種々の性質 (波長，散乱性，エネルギー等) が変化するので，今後は加速電圧を変えて実験を行い以上の結果を更に検討したいと思う。

一方，結核菌体の諸構造の生物学的意義は勿論，物理的，化学的性質乃至は意義についても目下のところ断定するわけには行かない。これを解明するためには更に生物学的，細胞化学的研究等に俟たねばならない。

擱筆するに当り，常々御指導御鞭撻を賜つておる北大工学部浅見義弘教授に深く感謝する。また生物学的試料の実験に関し，御指導御協力をして下さり，且つ有益なる御討論をして下さつた北大結核研究所長高橋義夫教授，有馬純助教授，山本健一講師及び北大医学部病理学教室下田晶久氏，実験の一部に労をわずらわした札幌医科大学電顕室中村三義技師の各位に厚く御礼申上げる。

主要文献

1) 武谷健二・他：新しい生物試料の作り方．膜面培養法．電顕委員會資料 55-B-3 (1950)；57-B-6 (1951).
2) 深井孝之助：凍結眞空乾燥法．電顕委員會資料 52-B-3 (1949).
3) 金谷光一：電顕像の讀み方．電顕誌 **2**, 278 (1952).
4) Ralph. W.G. Wyckoff: Frozend Dried Preparation for Electron Microscope, Science **104**, 36 (1946).
5) 上田隆三：試料變化と顯微廻折法．電顕誌 **3**, 2, 43 (1954),
6) 金谷光一：電顕試料支持膜の溫度分布の計算，電顕試料溫度について，第6回高性能綜合査員會資料 (1954).
7) Carl. Göran Hedin, Ralph, W.G. Wyckoff: The Electron Microscopy of Heated Bacteria, J. of Bact. **58**, 153 (1949).
8) James Hillier, Georges Knaysi, and Richard, F. Backer: New Preparation Techniques for the Electron Microscopy of Bacteria, J. of Bact, **56**, 566 (1948).
9) Georges Knaysi, James Hillier, and Catherine Fabricart: The Cytology of an Avian Strain of Mycobacterium Tuberculosis Studied with the Electron and Light Microscopes (1950).
10) Kurt Muhlethaler: The Structure of Bacterial Cellulose, Biochmica et Biophysica Acta **3**, 527 (1949).
11) Ralph, W.G. Wyckoff: Electron Microscoph, (1949 New York).
12) V.E. Cosslett: Practical Electron Microscopy (1951 London).
13) C.E. Hall: Introduction to Electron Microscopy (1953 New York).
14) R.B. Fischer: Apllied Electron Microscopy (1954 Indiana Univ. Press).
15) R. Doerr und C. Hallauer: Handbuch der Virusforschung II. (1950 Wien. Springer-Verlag).
16) Georges Knaysi: Elements of Bacterial Cytology (1951 Comstock Co.).
17) 笹川久吾編：電子顯微鏡 (1951 本田書店).
18) 金谷光一著：電子顯微鏡 (1954 電氣書院).

19) L. Marton: Advances in Electronics (1952 New York)

【写 眞 說 明】

Fig. 1 ブイヨン培養24時間目の凝結核菌 (西軍株) × 15,600

Fig. 2 Fig. 1 の暗視野像，菌体の pole に不透過小体が認められる

Fig. 3 ブイヨン培養3日目の凝結核菌 (西軍株)，菌体内容が收縮して菌体中央に集まる × 12,000

Fig. 4 ブイヨン培養3日目の凝結核菌 (生垣株)，菌体内容が收縮し菌体各所が顆粒狀を呈す × 12,000

Fig. 6-a 樹枝狀の食鹽結晶像 × 12,000

6-b 電子線の影響により (6-a) における廻折縞が變化する

6-c 時間の經過と共に廻折縞が消失し，結晶は完全に透過性になる。

6-d (6-c) に Cr shadowing を施したもの，結晶周邊の微小結晶に注意

Fig. 7-a 食鹽結晶像 × 6,600

7-b (7-a) の食鹽が強電子流密度で照射された後の像，食鹽は透過性を增すが，その形は變らない

Fig. 8-a 磨潰法により作成された食鹽塊 × 3,750

8-b (8-a) を撮影後，試料を顯微鏡外に取出し，濕度を與えた後に再び檢鏡す。食鹽結晶表面に産出された薄膜 (矢印) に注意

Fig. 9-a 電子線に對して比較的安定性を獲得した食鹽結晶 × 20,000

9-b (9-a) の食鹽を數秒間水蒸氣中に放置した後再檢鏡す。結晶表面の薄膜のみが殘る

9-c (9-b) に Cr shadowing を施す。薄膜のみにより立体形を保持している

Fig. 10 人型結核菌 (H37RV) を電子線曝射によりその透過性を良好にした後に shadowing を施したもの × 10,000

Fig. 11 Dubos 培地培養30日目の BCG × 12,000

Fig. 14 膜面培養6日目の BCG × 7,250

Fig. 15 Dubos 培地培養25日目の BCG，1,000 Å 附近の不透過小体 (矢印) に注意 × 1,200

Fig. 17-a 膜面培養2週間目においても增殖しなかつた BCG × 16,000

17-b (17-a) の暗視野像，菌体内の Electron dense な部分に注意

Fig. 18 手振法で試料作成を行うと，屢々菌体内に連珠狀顆粒が出來る (矢印) × 12,000

Fig. 20-a 石油エーテルで分散されたソートン培養9日目の BCG × 4,000

20-b (20-a) の暗視野像

Fig. 21 石油エーテルで20時間處理された BCG，Cr soft shadowing. × 18,400

Fig. 22-a 石油エーテルアルコールで分散された BCG × 4,000

22-b (22-a) の暗視野像，菌体周邊が電子線を強く散亂させている

Fig. 23-a 石油エーテルで20分處理された BCG，菌体表面の L-Part が分離されている (矢印) × 4,000

23-b (23-a) の暗視野像，L-Part は電子線を強く散亂させている

Fig. 24 Dubos 培地培養3日目の鳥型菌，菌体周邊の纖維狀物質を示す Cr shadowing × 8,000

Fig. 25 Dubos 培地培養3日目の鳥型菌，菌体の纖維狀構造 (矢印) 及び Cell wall の破壞を示す × 8,000

Fig. 26 Dubos 培地培養6日目の鳥型菌，Cr shadowing × 5,000

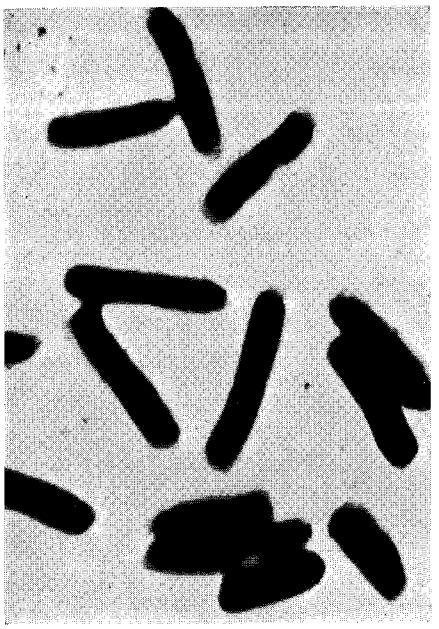

Fig. 1

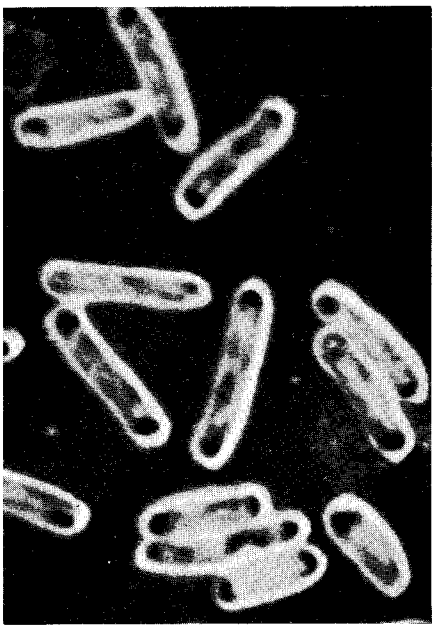

Fig. 2

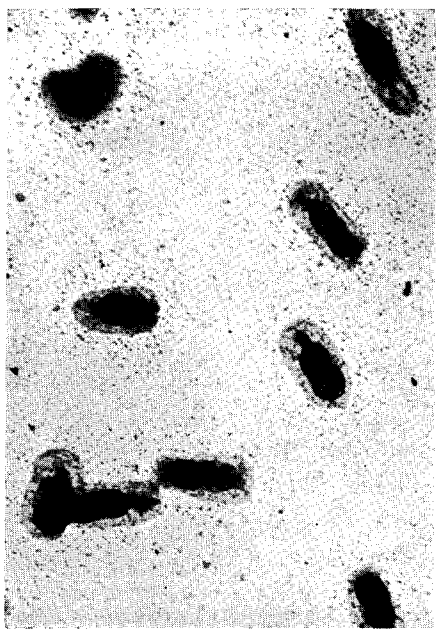

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 6 – a

Fig. 6 – b

Fig. 6 – c

Fig. 6 – d

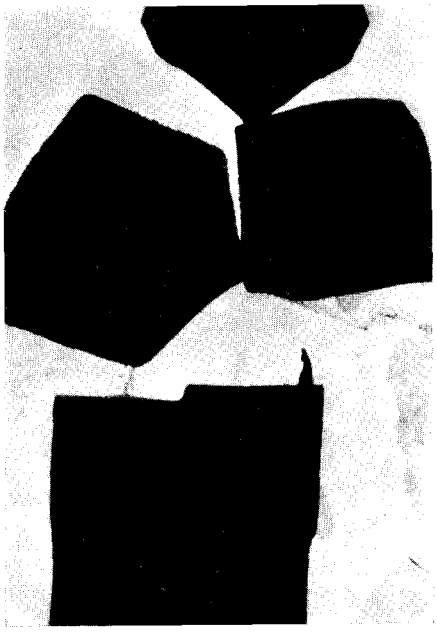

Fig. 7 – a

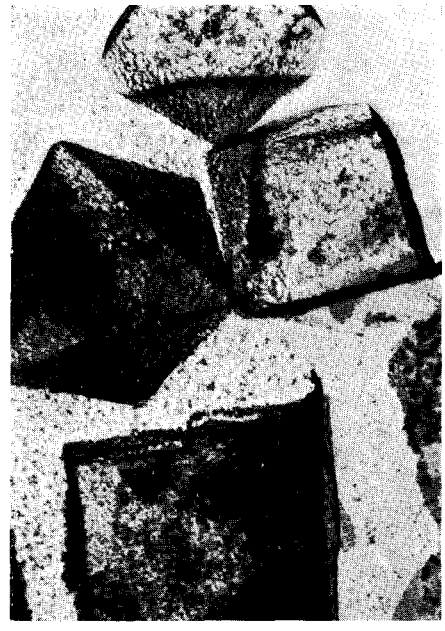

Fig. 7 – b

Fig. 8 – a

Fig. 8 – b

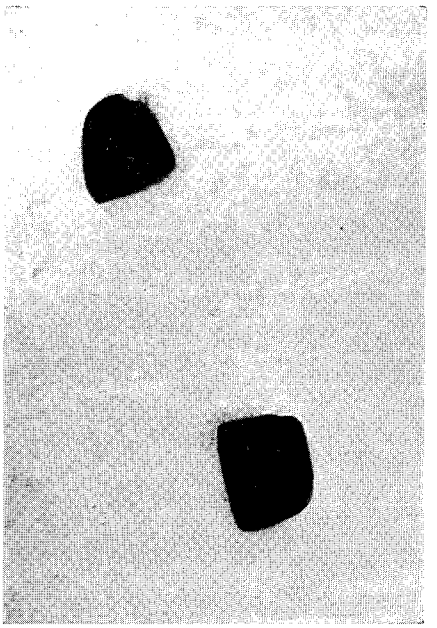

Fig. 9 – a

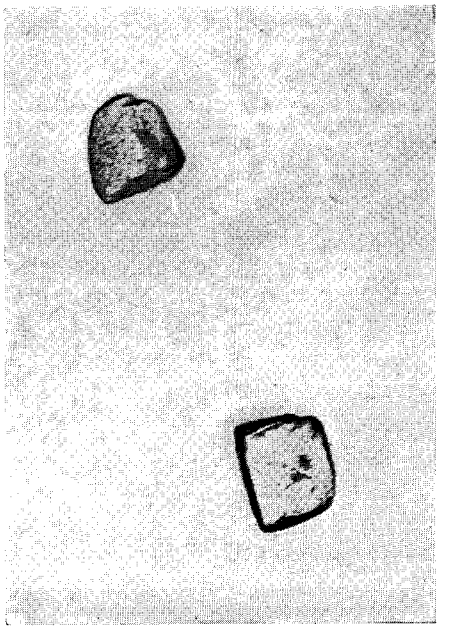

Fig. 9 – b

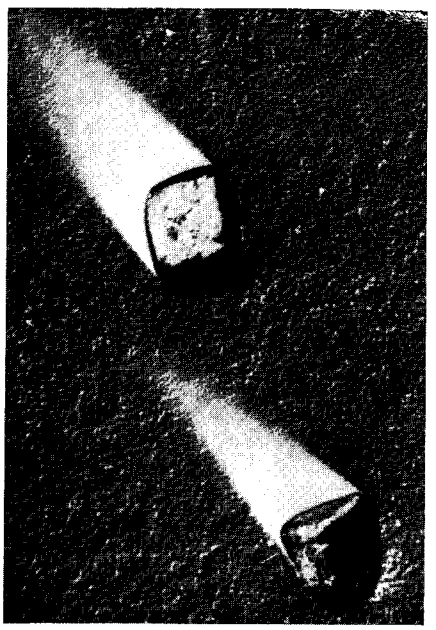

Fig. 9 – c

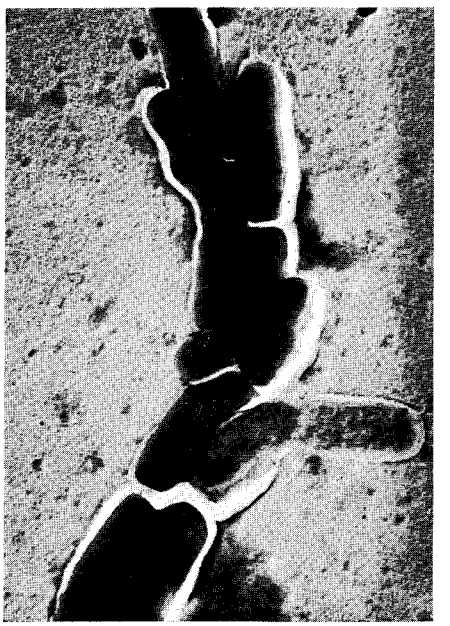

Fig. 10

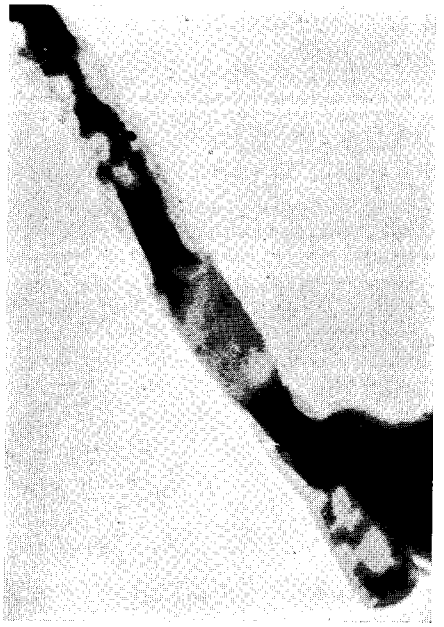

Fig. 11

Fig. 14

Fig. 15

Fig. 17 – a

Fig. 17 - b

Fig. 18

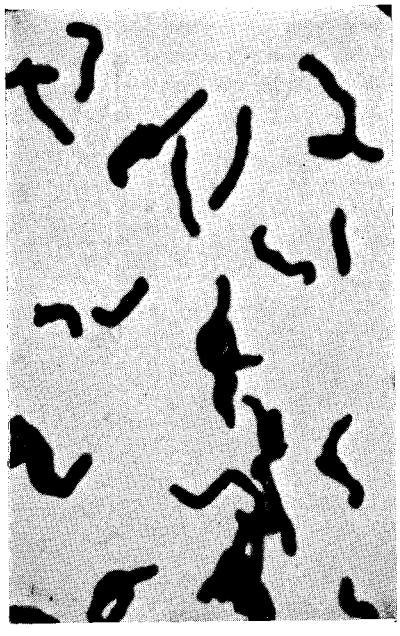

Fig. 20 - a

Fig. 20 - b

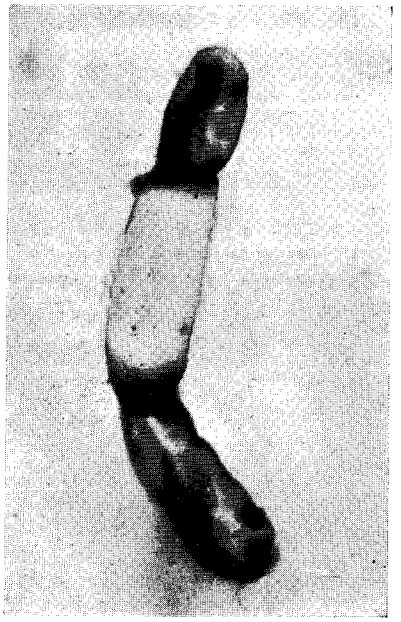

Fig. 21

Fig. 22 - a

Fig. 22 - b

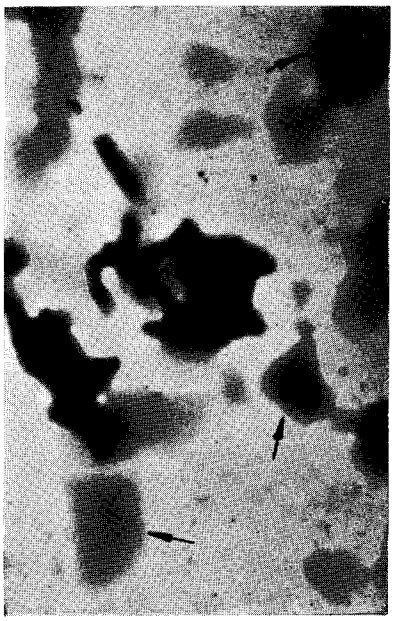

Fig. 23 - a

Fig. 23 - b

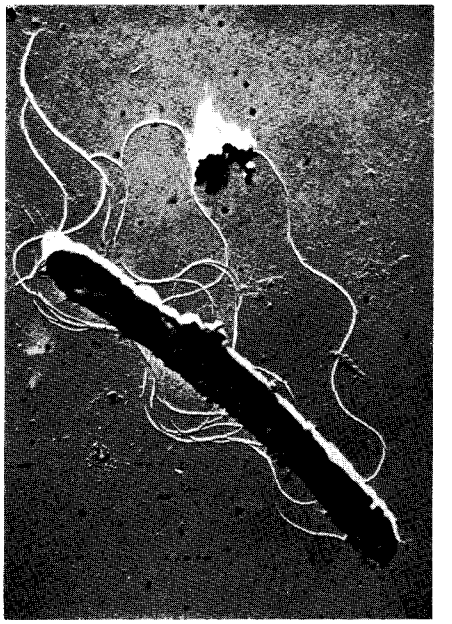

Fig. 24

Fig. 25

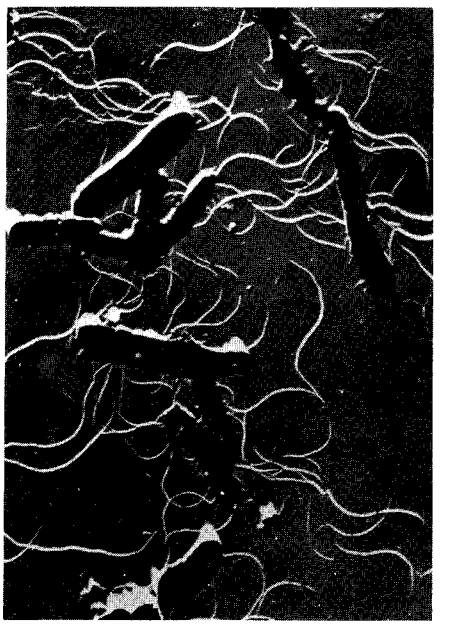

Fig. 26