
東京都微生物検査情報

MONTHLY MICROBIOLOGICAL TESTS REPORT, TOKYO

第42巻 第9号
2021年9月号
月 報



東京都健康安全研究センター

<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>

ISSN 1883-2636

電子顕微鏡を使って微生物を観察する

1. はじめに

細菌や真菌などは、寒天培地上などに発育したコロニーの状態であれば肉眼で確認することができる。また、その形態観察には光学顕微鏡が、さらに微細な観察には電子顕微鏡が用いられている。

一方、ウイルスはメガウイルス属や細菌などに比べて非常に小さいため、電子顕微鏡でないと観察できない。電子顕微鏡は対象物に電子線をあてて観察する機器であり、その分解能は理論的には 0.1nm^1 ほどで、光学顕微鏡に比較し分解能が非常に優れている。電子顕微鏡を用いて実施した幾つかの細菌とウイルスを例に微生物の観察について述べていきたい。

2. 微生物を観察する前処理

細菌を電子顕微鏡で観察するには、寒天培地上のコロニーから白金線で釣菌した菌をホルマリン加リン酸緩衝液に浮遊、あるいは対象の菌を液体培地で培養しホルマリンを加えるなどの方法で、菌を固定したサンプルを作製後、染色を行う。

一方、ウイルスを観察するためには、サンプル 1ml 中に 10^6 個以上のウイルス粒子が必要と言われている。そのため、培養が可能なウイルスでは、適当な細胞を用いてウイルスを増殖する必要がある。増殖したウイルスが含まれたサンプルをパラフォルムアルデヒドなどで固定試料とするが、このままでは電子顕微鏡でウイルス像を見ることはできない。ウイルスはタンパク質と核酸で構成されているため、原子番号が小さい元素(H, O, Nなど)のみでは電子線が透過してしまいコントラストが得られないためである。そこで、ウランやモリブデン、タングステンなどを含む染色液でネガティブ染色²⁾する。当所では、モリブデンによる染色をおこなっている。以上は、透過型電子顕微鏡による観察法である。

走査型電子顕微鏡での観察は透過型電子顕微鏡に比べ低倍率であり、培養細胞の表面などの観察に使用している。ウイルスを含むサンプルを接

種した細胞を固定し、アルコールにより脱水、乾燥した後、表面に金属を蒸着し観察試料としている。

3. 細菌の観察

細菌の大きさは μm 単位なので、透過型電子顕微鏡で菌体全体を観察する場合は、数千倍までしか倍率を上げることはできない。また、菌体の厚さもウイルスなどの nm 単位ではないので薄切しない場合は黒色に見える。

腸炎ビブリオの全体像を撮影したものと(写真1)、鞭毛の付け根を観察したもの(写真2)を示す。写真2では、特に鞭毛が菌体の中へ貫通しているところが観察されている。

カンピロバクターの電子顕微鏡像(写真3)は、両極に鞭毛を持った菌の形状がよく保存されていることがわかる。

結核菌は、ミコール酸と呼ばれる脂質に富んだ細胞壁を持つため染色液を弾いてしまうため、前述の菌(写真1, 写真3)と異なり菌体が白く観察されている(写真4)。

4. ウイルスの観察

咽頭結膜熱患者の咽頭拭い液から HeLa 細胞を使って分離したアデノウイルスは、特徴的な正20面体の構造が観察できる(写真5)。

インフルエンザウイルスは、A型インフルエンザ患者の咽頭拭い液から MDCK 細胞を使って分離したものである(写真6)。写真上部の長いウイルスは長さ約 800nm ほどある。このような長いインフルエンザウイルスは培養世代数が若いほど見られ、培養を重ねると写真下のような球形のウイルスが大多数を占めるようになる。右下の写真は、コンピューターによって見やすいように着色したものである。インフルエンザウイルスの大きさは、ほぼ 100nm 程度である。

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は、新型コロナウイルス感染症者の咽頭拭い液から VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて分離したもので、コ

コロナウイルスの名前の由来となった王冠状のスパイクがよく見えている（写真7）。大きさは、約100nm 程度である。

また、このウイルスは感染症法上の特定病原体（四種）であり、Biosafety Level 3 (BSL3) 実験室対応のウイルスであるため、細胞への試料の接種、接種した細胞の培養、パラホルムアルデヒドなどの固定液を培養上清へ添加するまでの操作は、BSL3 実験室内にて行う必要がある。培養に用いた培養プレートの細胞を固定後、脱水、乾燥させた後、金属を蒸着し、走査型電子顕微鏡の観察に供した。上の写真の右上に花びらのように5つのウイルスが出芽している部分を拡大し、着色したのが下の写真である（写真8）。

5. 電子顕微鏡の今後

電子顕微鏡による観察は、日常的な病原体の同定検査法として用いられていない。しかし、2002年に SARS コロナウイルスが出現した際には、当初、原因不明の病原体とされていたが、電子顕微鏡でコロナウイルスの一種であると確認された

ことにより、その後の遺伝子検査の開発と解析が導かれたといえる。現在は、次世代シーケンサー（NGS）などの遺伝子解析機器の発達により検査の場で電子顕微鏡が活躍することは稀である。その一方で、電子顕微鏡によって得られるウイルスの画像は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のニュースなどで取り上げられ、活用されている。

SARS-CoV-2 だけでなく、他のウイルスの電子顕微鏡写真は病原体の実態を把握する目的や教育用として微生物部門への見学者、あるいは研修の補助教材にも用いられている。今後もウイルスや細菌などを画像に残し、ライブラリーとして利用できるようにすることは必要である。

<引用文献>

- 1) （社）日本顕微鏡学会電子顕微鏡技術認定委員会編：電顕入門ガイドブック
- 2) （社）日本顕微鏡学会：第26回電顕サマースクール2015 テキスト

（病原細菌研究科 吉田 勲）



写真1. 腸炎ビブリオ 透過型電子顕微鏡(TEM)像

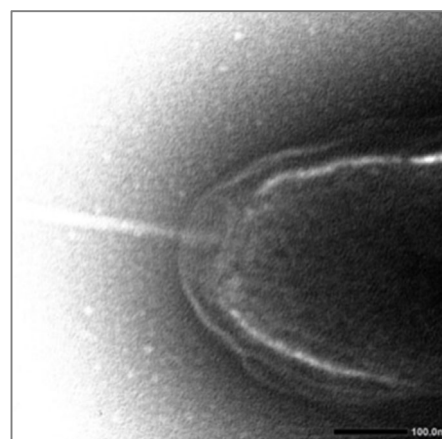


写真2. 腸炎ビブリオ部分拡大(TEM 像)



写真3. カンピロバクターTEM 像

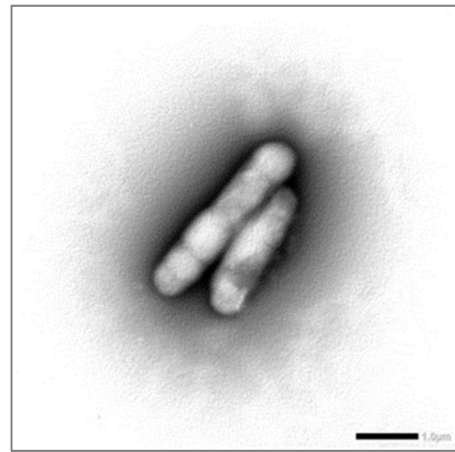


写真4. 結核菌 TEM 像

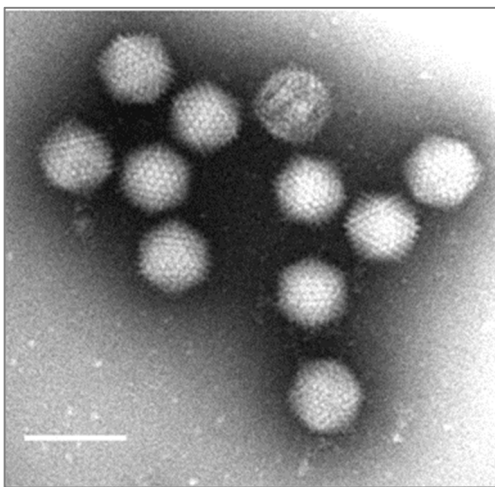


写真5. アデノウイルス TEM 像

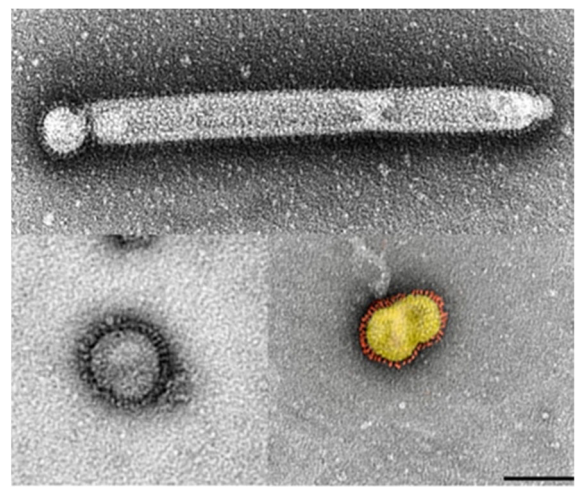


写真6. インフルエンザウイルス TEM 像

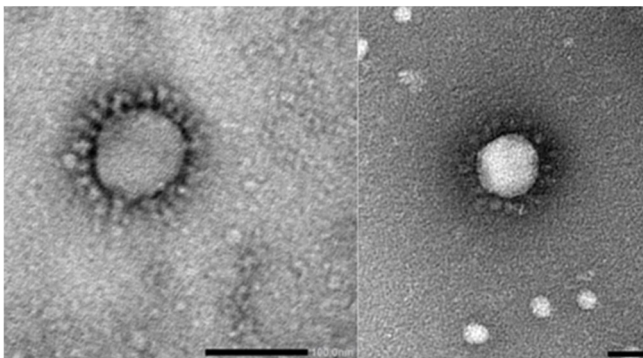


写真7. 新型コロナウイルス TEM 像

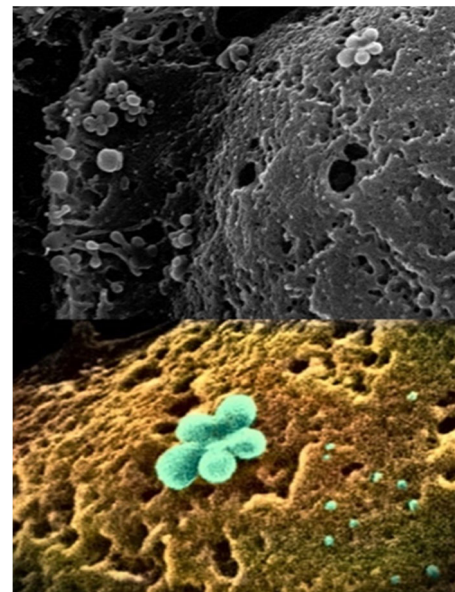


写真8. 新型コロナウイルス
走査型電子顕微鏡 (SEM) 像

表1 病原体搬入・検出状況(4種等)※

2021年9月分

機関名		コレラ菌	赤痢菌	チフス菌	パラチフス A菌	腸管出血性 大腸菌	結核菌
区	千代田区					2	
	中央区						
	港区					1	
	新宿区					2	
	文京区					6	1
	台東区						
	墨田区					1	
	江東区						
	品川区						
	目黒区					1	
	大田区						
	世田谷区					1	1
	渋谷区					3	
	中野区					5	
	杉並区					4	
	豊島区						
	北区					2	
	荒川区						
	板橋区					1	
	練馬区						
	足立区					6	
	葛飾区						
	江戸川区					1	
市	町田市						
	八王子市					4	
小 計						40	2
都	西多摩						
	多摩立川					1	
	南多摩					1	
	多摩府中					1	
	多摩小平					2	
	島しょ						
小 計						5	
合 計						45	2
健康安全研究センター 検出分						14	

※2016年4月より、各保健所から搬入された検体を集計することとした。

表2 検体搬入状況(全数把握対象疾患-五類)※

2021年9月分

	検体数	2021年累計
侵襲性インフルエンザ菌感染症(菌)	1	17
侵襲性髄膜炎菌感染症(菌)		
侵襲性肺炎球菌感染症(菌)	4	39
カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症(菌)	8	41
播種性クリプトコックス症(菌)	1	6
合 計	14	103

表3 病原微生物検出状況(食中毒関連)

2021年9月分

	菌 種 名	検体数	2021年累計
細菌	大 腸 菌		
	毒素原性		
	組織侵入性		
	病原血清型		
	腸管出血性		1
	その他・不明		
	サルモネラ		
	O4		1
	O7	5	5
	O8		
	O9		5
	その他		2
	不明		
	腸 炎 ビ ブ リ オ		
	カンピロバクター	1	47
	黄色ブドウ球菌	11	28
	F型ウェルシュ菌		161
ウイルス	ボツリヌス菌		
	F型ボツリヌス毒素産生 クロストリジウム・バラティイ		2
	セレウス菌		2
	ノロウイルス(GⅠ)		18
	ノロウイルス(GⅡ)	6	147
	ノロウイルス(GⅠ,GⅡ)		2
寄生虫	ロタウイルス		
	サボウイルス		
	アニサキス	3	29
合 計	クダア		
		26	450

表4 HIV 検査数及び陽性数

2021 年 9 月分

	男性		女性		性別不明		合計	
	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数
東京都新宿東口検査・相談室*	635	5	196	0	0	0	831	5
保健所等	13	2	9	0	0	0	22	2
合 計	648	7	205	0	0	0	853	7
2021年累計	6,104	92	1,948	1	2	0	8,054	93

*:2021 年 3 月より名称変更

表5 性感染症検査数及び陽性数

2021 年 9 月分

	梅毒検査		クラミジア遺伝子検査		淋菌遺伝子検査	
	検査数	陽性	検査数	陽性	検査数	陽性
東京都新宿東口検査・相談室*	831	112	0	0	0	0
保健所等	47	6	43	1	23	0
合 計	878	118	43	1	23	0
2021年累計	8,242	836	1,322	86	1,073	3

*:2021 年 3 月より名称変更

定点把握疾患別病原体分離状況（ウイルス）

過去 3 か月

定点種別	対象疾患名	検出病原体	7月	8月	9月	合計
小児科	咽頭結膜熱	RSウイルス		1		1
	RSウイルス感染症	RSウイルス	6	8	3	17
		パラインフルエンザ			1	1
	不明発疹症	パラインフルエンザ			1	1

◆東京都微生物検査情報◆

2021年10月28日

編集・発行

東京都健康安全研究センター

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-24-1

TEL:03-3363-3213

FAX:03-5332-7365

S0000786@section.metro.tokyo.jp

<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>