

# 電子顕微鏡による可視化で編纂する 「結核菌の歩き方」



結核研究所 抗酸菌レファレンス部

細菌検査科科长代理 山田 博之

結核菌は液体培地では濁りとして、固形培地上ではコロニーとして肉眼で観察できます。しかし肉眼の分解能は約0.2mmであり、個々の菌を観察するためには抗酸菌に特異的な染色と光学顕微鏡を使う必要があります。光学顕微鏡で観察すると結核菌は集塊状や分散した菌として確認することができます。但し光学顕微鏡もその分解能は約0.2 $\mu$ mであり、幅が0.2~0.4 $\mu$ m、長さが1~5 $\mu$ mの結核菌の内部を詳細に見ることは到底できません。例えてみれば肉眼観察は宇宙ステーションから地球を眺めているのに相当し、光学顕微鏡観察は低空飛行の飛行機から地上の生き物を見ているのに過ぎません。

結核菌の内部を観察するには電子顕微鏡が必要です。電子顕微鏡は1931年ドイツで開発され、現在に至るまで様々な改良がなされて、生物学的な材料を用いた場合、数nm(100万分の1mm)の分解能があるので、結核菌の内部も十分観察できます。装置の進化と平行して、動植物、微生物などの材料を電子顕微鏡で観察する方法も多く試みられ、現在では主にアルデヒド系(ホルマリンの仲間)の薬品で「固定」という処理を行い(化学固定)観察することが一般的です。しかし、化学固定は化学反応と長時間の処理を伴うため最終的な観察像が生きた状態の構造をそのまま反映しているかどうかは不確実です。特に、細菌は構造が単純で高等生物とは異なり細胞内小器官や細胞骨格といった膜構造や骨組みが乏しいため、生きた菌の内部構造がそのまま保たれている保証はありません。

他方、できるだけ生きた状態に近い電顕像を得るた

め急速凍結法という固定法が1950年代から開発されてきました。生物学的な標本を10,000K/秒以上の急速な温度変化を伴って凍結すると標本中の水分が氷晶を形成することなくガラス状になりきれいな標本を観察できます。

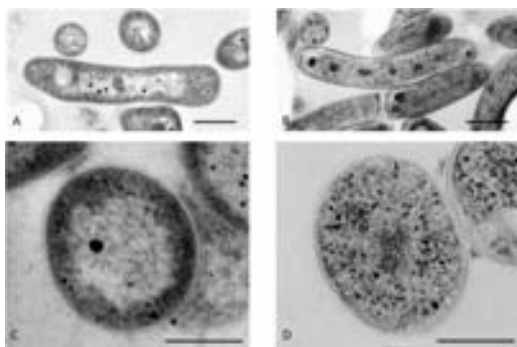
今回、結核研究所菌バンク施設にあるP3バイオハザード領域の安全キャビネット内で、液体培地で培養した結核菌を液体窒素で冷却した液体プロパンに急速に漬け込む浸漬法を用いて急速凍結し電子顕微鏡で観察しました。その結果、化学固定では観察されなかった主にリボソームからなる均一な菌体内構造、DNA、更に細胞壁外膜の観察が可能になりました。今回の方法は、将来開発が期待される、光学顕微鏡のGFPに相当する電子顕微鏡用分子標識技術と組み合わせれば、結核菌の内部で起こる様々な酵素反応、抗生物質と標的分子の相互作用が起こる場の詳細な検討が可能になると考えられます。それは結核対策を有利に進める上で極めて重要なことです。

旅行ガイドブック「地球の歩き方」シリーズをご存じの方は多いでしょう。世界中の有名都市に関して詳細な情報を提供しています。重要なことは、実際に訪れた人の情報が使われていることです。

急速凍結法や最近開発されたCEMOVIS(cryo-electron microscopy with vitreous section)法は生きた状態に極めて近い標本を電子顕微鏡で観察し可視化する優れた方法ですから、これまで誰も訪れたことがなく、化学固定による不確かな想像図でしかなかったバクテリア内部の真実の姿を撮影できるようになるでしょう。将来、詳細な観察により結核菌の「リボソームレストラン」、「細胞壁遊園地」、「DNA博物館」を詳しく記した「結核菌の歩き方」が完成すれば結核撲滅のために果たす役割は極めて大きいと期待されます。

## 【参考文献】

Yamada H, Mitarai S, Chikamatsu K, Mizuno K, Yamaguchi M., Novel freeze-substitution electron microscopy provides new aspects of virulent *Mycobacterium tuberculosis* with visualization of the outer membrane and satisfying biosafety requirements. *J Microbiol Methods*. 2010 Jan; 80(1): 14-8.



A, C : 化学固定, B, D : 急速凍結法  
バーの長さ A, B : 0.5 $\mu$ m, C, D : 0.2 $\mu$ m