

## 卓上走査型電子顕微鏡を用いた身近な細菌の観察

安川 洋生\*・今野 法子\*\*

(2013年11月14日受理)

Hiro YASUKAWA, Noriko KONNO

### Imaging of Bacterial Cells Using a Benchtop Scanning Electron Microscope

#### 要旨

私たちの身の回りに棲息する細菌の観察には顕微鏡が欠かせない。その中でも走査型電子顕微鏡は鮮明な画像を得ることができ、児童生徒の教育にはぜひ利用したい装置である。しかし、従来の装置は大型で取り扱いが難しく、十分な訓練を受けた者しか取り扱うことができなかった。また、観察試料の調製にも専用の装置と試薬が必要で、試料調製には長時間を要した。筆者らは、近年開発された取り扱いの簡単な卓上走査型電子顕微鏡と試料調製試薬キットを用いてスタフィロコッカス属細菌、シュドモナス細菌、納豆菌および大腸菌の観察を行ったところ、簡単迅速な操作で細菌の電子顕微鏡観察が可能であることが分かった。理科教育の現場では、児童生徒に実際に目で見せることが肝要であり、簡単で迅速な細菌の電子顕微鏡観察は、児童生徒の学習意欲を引き出すために大いに貢献すると思われる。また、卓上走査型電子顕微鏡はコンパクトで、移動、設置が簡単に行えるため、小中学校や高等学校での出前授業や、被災地の教育支援にきわめて有効な装置であると思われる。

#### 1. 緒言

私たちの周囲には無数の細菌が棲息している。それらの中には納豆菌や乳酸菌のように発酵食品

の製造に必須の菌種もあり、これらは私たちの暮らしに欠くことのできない重要な細菌である。また、ヒトの常在菌として私たちの身体に住み着き細菌感染のバリアの役目を果たしている菌種も多い。これらもまた、私たちが健康に生活するうえで欠くことのできない細菌である。一方で、ヒトに疾病を引き起こす菌種や、バイオフィーム（粘着性のある菌の集合体）を形成して持続感染の原因となる菌種もあり、これらは治療・感染予防の観点から重要である。特に、病原性の高い菌種や抗菌薬に耐性を示す菌種については注意が必要である。

世界保健機関（WHO）の実験室バイオセーフティー指針<sup>1)</sup>では、細菌は、その病原性の程度に応じて4段階にリスク群分類されている。リスク群1は個体および地域社会へのリスクは無い、ないしは低い菌種である。このような細菌を取り扱う実験はバイオセーフティーレベル1（BSL1）の要件を満たした実験室で行われる。リスク群2、リスク群3およびリスク群4に含まれる細菌はヒトに疾病を引き起こすことが明らかなものであり、児童生徒の教育教材等に用いるべきではない。これらの病原体の取り扱いはそれぞれBSL2、BSL3、BSL4の要件を満たした実験室内で、十分な知識と手技を有する者のみが行うべきである<sup>2) 3)</sup>。

細菌に関して私たちは、一方では発酵食品のよ

\* 岩手大学教育学部、\*\* 富山大学大学院理工学（現・富士化学工業株式会社）

表 1. 本研究で使用した菌株

菌種	由来
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ヒトの鼻
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ヒトの尿
<i>Staphylococcus simulans</i>	ヒトの表皮
<i>Staphylococcus warneri</i>	糠床
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	プールの水
<i>Pseudomonas mendocina</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	納豆
<i>Escherichia coli</i> BW25113	

うに先人の知恵に学びながら積極的にこれを利用し、他方では感染症の治療や予防のために注意を払わなければならない。私たちの生活圏から病原体等を完全に排除し、有用な細菌のみを残すことは技術的に不可能であるため、私たちは身の回りにはさまざまな細菌がいることを理解し、これらと賢くつき合う必要がある。そのために児童生徒には細菌に関する正しい知識を身に付けさせなければならない。児童生徒の教育には実際に目で見せることが肝要であり、細菌の鮮明な画像を見ることができれば教育効果が向上することは大いに期待できる。菌体を鮮明に観察するためには走査型電子顕微鏡 (SEM) の使用が望ましい。SEM は電子線をレンズで絞りながら観察試料の表面を走査し、試料から発生する反射電子や二次電子を解析して画像化するため、通常の光学顕微鏡より分解能が高い。さらに、SEM は光学顕微鏡より焦点深度が深く視野全体に渡って焦点の合った鮮明で立体的な画像が得られる<sup>4)5)6)</sup>。このような特性のため SEM を用いることにより細菌の形態や表面の微細な構造を鮮明な画像で見ることができる。しかし、SEM は操作方法が難しく、優れた手技を有しない場合は鮮明な画像を得ることが困難である。また、観察試料の前処理 (細菌の固定、脱水、導電処理等) は光学顕微鏡を用いる場合に比べてはるかに煩雑である。そのため、学校現場で SEM を用いた教育を行うことは極めて困難であった。

近年、操作の簡単な卓上タイプの SEM が開発

され、また、簡便な導電試薬キットが発売されたことにより、細菌の SEM 観察が従来に比べて格段に身近になりつつある。そこで、筆者らはこれらの装置と試薬を用いて、児童生徒が身近な細菌種を簡便に SEM 観察できるようなプロトコルを検討した。本稿では具体的な SEM 画像を示しながら実施例を紹介する。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 細菌種と培養方法

本実験に用いた細菌種を表 1 に示す。いずれも BSL1 で取り扱い可能な細菌種である。これらの細菌を LB 寒天培地に塗布し 27°C で終夜静置した。または、菌懸濁液を 96 穴プレートに分注し 27°C で 60 時間静置した。このようにして調製した細菌試料を SEM 観察に供した。

### 2.2. 細菌試料の固定・脱水・導電試薬処理

調製した細菌試料を白金耳で採取しスライドガラスに拡げた。これらを 2% グルタルアルデヒド溶液に 2 時間浸漬し固定した後、リン酸緩衝液にて洗浄し、50% エタノールに 15 分間浸漬、75% エタノールに 15 分間浸漬、99% エタノールに 15 分間浸漬して脱水した。固定・脱水処理をした細菌試料に TI ブルー試薬 (日新 EM 株式会社) を滴下し 5 分間静置して導電処理を施し SEM 観察に供した。納豆菌については、培養した菌体の観察とは別に、芽胞を観察するために食品から白金耳で採りスライドガラスに塗布し、固定、脱水処理、導電処理を行った。

### 2.3. 細菌試料の電子顕微鏡観察

本実験には卓上走査型電子顕微鏡 TM-1000（日立ハイテク株式会社）を用いた（図1）。装置の操作はメーカーの取り扱い説明に従って行った。倍率の変更や焦点合わせはモニターで試料の画像を見ながらマウスを操作することによって行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. スタフィロコッカス属細菌の電子顕微鏡観察

本属細菌種はグラム陽性の球菌であり、環境中に広く分布し、ヒトの常在菌としても多くの菌種が知られている。本属のうち黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）はBSL2で取り扱うべき菌種であり、化膿や敗血症の原因ともなり、臨床分離株では抗菌薬に耐性を示すものも多く医学上重要な菌種である。



図1. 卓上走査型電子顕微鏡

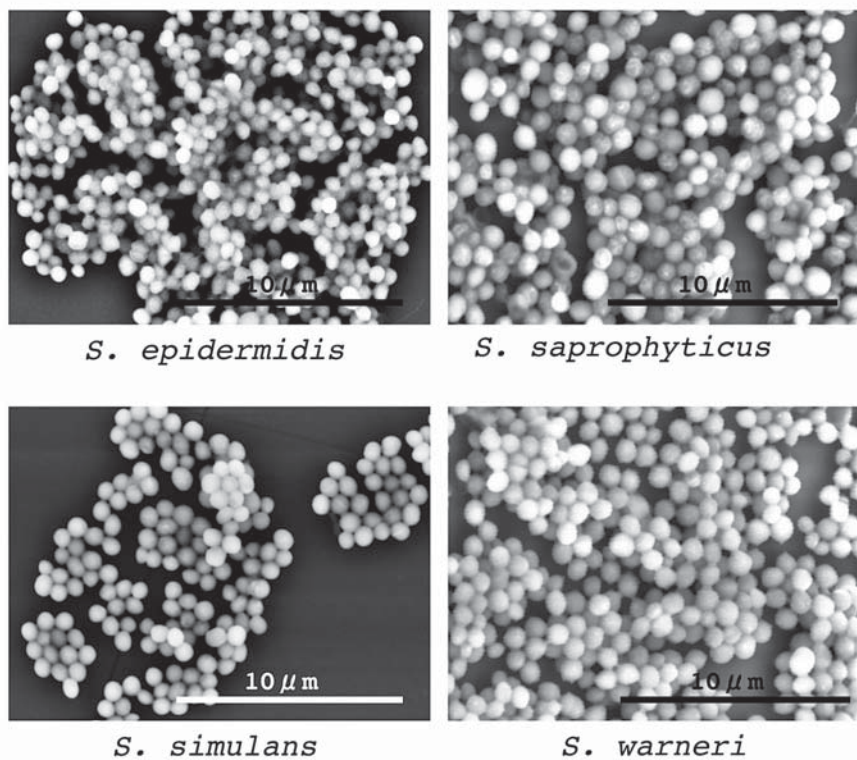


図2. スタフィロコッカス属細菌のSEM画像

本属のうちBSL1で取り扱いができる *S. epidemidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* のSEM画像を図2に示す. 球菌の形態が鮮明に確認できた.

### 3.2. シュードモナス属細菌の電子顕微鏡観察

本属細菌種はグラム陰性の桿菌であり, 環境中に広く分布する一方で, 家庭や病院の水回りに棲息し感染症の原因となることが多い. 本属のうち, 緑膿菌 (*P. aeruginosa*) はBSL2で取り扱うべき菌種であり, 院内感染の代表的な菌種で, 消毒薬や抗菌薬に抵抗性を示すため临床上重要である.

本属のうちBSL1で取り扱いができる *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. putida* のSEM画像を図3に示す. 桿菌の形態が鮮明にみとめられた.

### 3.3. 納豆菌の電子顕微鏡観察

本菌種はバシラス属のグラム陽性桿菌であり, 発酵食品である納豆の製造に必須で, 産業上重要な菌種である. 安全性は歴史的に証明されていると言ってよく, BSL1で取り扱うことができる. 本菌種は栄養分が豊富で温度, 湿度等の条件が適した環境では活発に分裂し増殖するが, 適さない

環境では増殖を停止し芽胞を形成して休眠する. 本菌種のSEM画像を図4に示す. 納豆から分離した試料には芽胞が多く, やや丸みのある形態がみとめられる. これを培養した後に採取しSEM解析を行うと, 明瞭な桿菌の形態がみとめられた.

### 3.4. 大腸菌の電子顕微鏡観察

本菌種はエシェリキア属のグラム陰性桿菌であり, ヒトや動物の腸管内の常在菌である. 病原性を有する種類も多く临床上重要な菌種である. 本菌種のうちBW25113株 (BSL1で取り扱いが可能なK12株に由来する) のSEM画像を図5に示す. 桿菌の形態が鮮明にみとめられた.

大腸菌は分子生物学分野における実験材料として古くから世界中の研究機関で用いられている菌種でもある. 特に, K12株やB株, およびこれらに由来する菌株は遺伝子組換え実験では欠かすことのできない重要な実験ツールとなっている. 筆者らの研究室ではこれらの大腸菌株を用いた新規有用遺伝子の探索や, 既知の遺伝子の改変等の遺伝子組換え実験を行っている. 細菌の増殖制御を

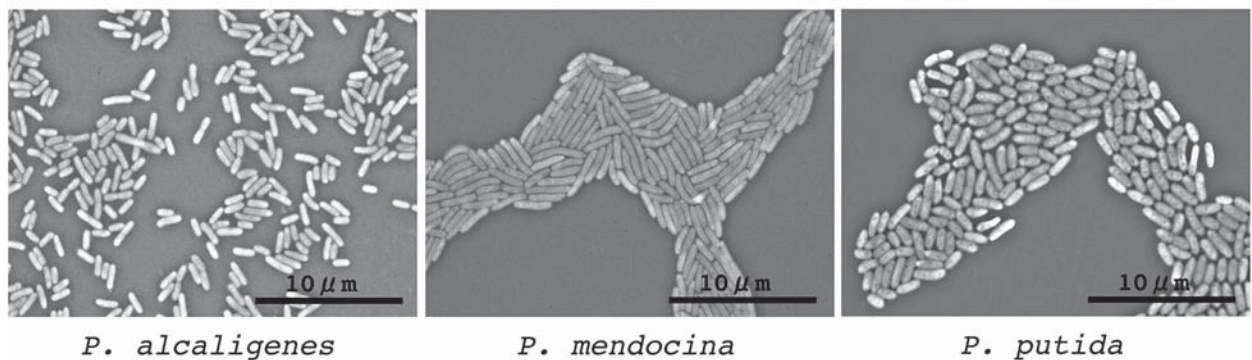


図3. シュードモナス属細菌のSEM画像

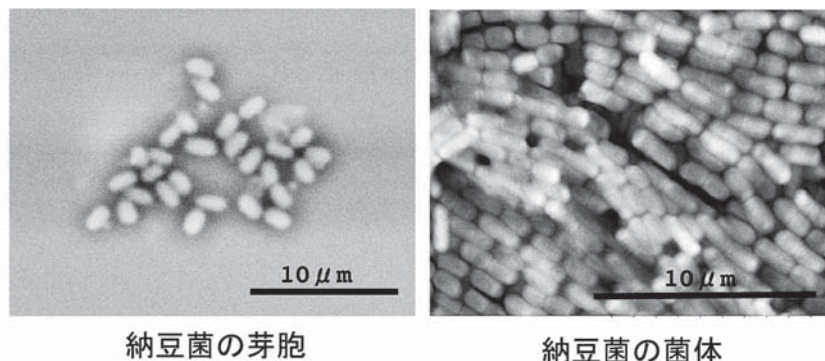


図4. 納豆菌の芽胞と菌体のSEM画像

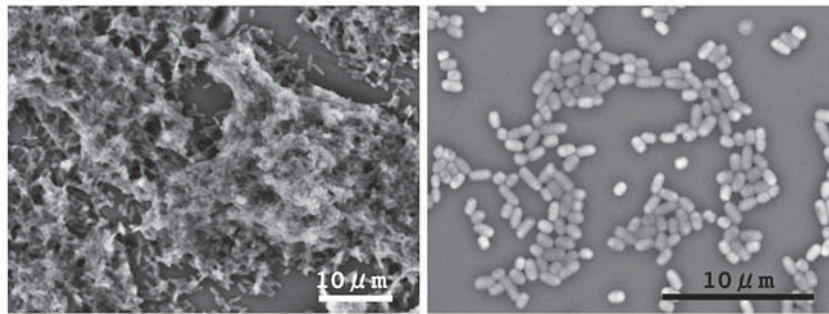


図5. 大腸菌 BW25113株の SEM 画像

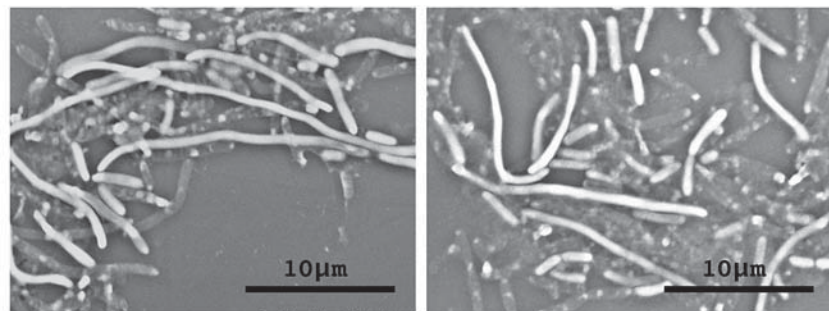


図6. 形態異常を示す遺伝子組換え大腸菌の SEM 画像

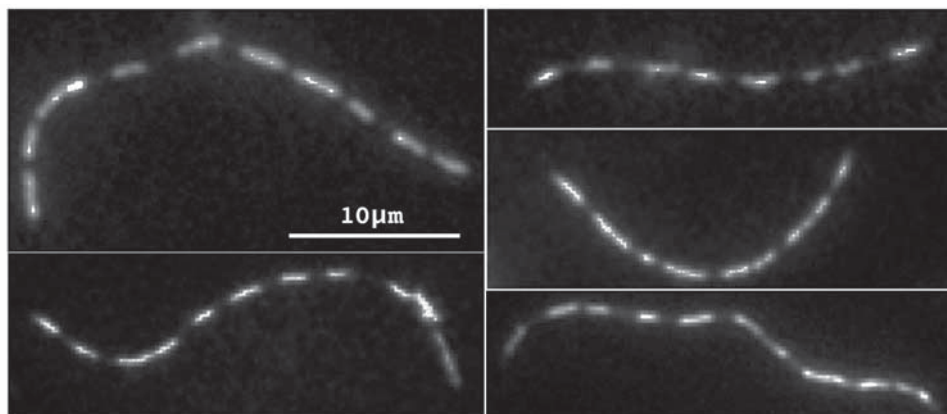


図7. 形態異常を示す遺伝子組換え大腸菌の蛍光画像

目的とした研究の過程で当研究室にて作製した遺伝子組換え大腸菌の一例を図6に示す。SEM所見より、この大腸菌は菌体が伸長し本来の大腸菌とはまったく異なる形状を呈していることが分かった。本菌のDNAを蛍光色素ヘキスト33342で染色し蛍光顕微鏡で観察すると、菌体内に大腸菌DNAがほぼ等間隔に配置している様子がみとめられた(図7)。他の所見と合わせて検討した結果、この遺伝子組換え大腸菌は細胞増殖の過程でDNA複製は正常に行うが、細胞分裂が正常に行えないことが分かった。

#### 4. 結言

TIブルー染色用キットと卓上SEMを用いることで簡単、迅速に細菌のSEM観察ができた。卓上SEMはマウスで操作できるためパソコンを使い慣れた世代にはストレスなく使用できた。理科教育の現場では、児童生徒に実際に目で見せることが肝要であり、簡単で迅速な細菌のSEM観察は児童生徒の学習意欲を引き出すために大いに貢献するであろう。また、卓上SEMは軽量、コンパクトで、移動と設置が簡単に行えるため、小中学校や高校での出前授業や、被災地の教育支援に

きわめて有効な装置であると思われる。筆者らは更に身近な SEM 解析を目指して、より簡便な導電試薬の検討とプロトコルの作成を行っている。

なお、本稿に示した菌種はいずれも BSL1 で取り扱える比較的安全なものであるため感染事故の危険性は低い。納豆やヨーグルトからは納豆菌や乳酸菌を得ることができるので、児童生徒らには細菌の採取から SEM 観察までの一連の作業を経験させながら、発酵についての理解を深めさせることができるであろう。また、BSL1 で取り扱える菌種のいくつかは独立行政法人理化学研究所から入手可能であるため利用されたい<sup>7)</sup>。入手した細菌は培養して菌数を増やし、一部を SEM 観察に供して、残りを適切に凍結すれば長期間保存可能である。ただし、比較的安全な菌種といえども、微生物取り扱い作業の基本に従い、安全管理規則を遵守しながら行う必要がある。

一方、児童生徒が河川や土壌から細菌種を分離する場合は注意が必要である。環境中には BSL2 で取り扱うべき病原体も多く、実験室で分離を試みると意図せぬ病原体が得られることもある。細菌種の分離は児童生徒の安全を守るために、十分な知識と手技を身につけた指導者のもとで行うべきである。

本稿には遺伝子組換え大腸菌の画像も示した。遺伝子組換え生物を取り扱う場合はカルタヘナ法<sup>8)</sup>等の遺伝子組換え実験に関する法令を遵守しなければならない。遺伝子組換え実験を行う際には拡散防止区分がどれに該当するか、実験室はそのための設備を備えているかを検討して、十分な知識と手技を有する指導者のもとで行う必要が有るので注意されたい。

## 謝辞

本稿の SEM 観察に用いたスタフィロコッカス属細菌、シュードモナス属細菌および大腸菌 BW25113 は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) より入手した。本稿に記載の結果の一部は富山大学大学院理工学教育部の上松和徳氏 (現・愛媛県警察)、梶野隆嗣氏 (現・

アース環境サービス株式会社)、喜多彩香氏 (現・辰巳化学株式会社)、佐藤彩氏 (現・株式会社池田模範堂)、辻晋一氏 (現・第一薬品工業株式会社)、鳥崎真吾氏 (現・東亜薬品株式会社)、羽根田ゆかり氏 (現・株式会社鹿島塾)、山守漠氏 (現・株式会社ニッポンジーン) の協力により得られた。ここに感謝の意を記す。

## 参考資料

- 1) 「実験室バイオセーフティー指針－第3版－」  
[http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety3\\_j.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety3_j.pdf)
- 2) 「Biorisk management: 実験施設バイオセキュリティガイダンス」  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO\\_CDS\\_EPR\\_2006.6\\_jpn.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_EPR_2006.6_jpn.pdf)
- 3) 「病原細菌の BSL レベル」  
[http://www.nacos.com/jsbac/img/bsl\\_level.pdf](http://www.nacos.com/jsbac/img/bsl_level.pdf)
- 4) 「新・走査電子顕微鏡」日本顕微鏡学会関東支部編、共立出版、2011。
- 5) 「電顕入門ガイドブック改訂版」日本顕微鏡学会電子顕微鏡技術認定委員会編、ミュージアム図書、2011。
- 6) 「よくわかる生物電子顕微鏡技術 プロトコル・ノウハウ・原理」白倉治郎、2008。
- 7) 「JCM オンライン微生物株カタログ」  
[http://www.jcm.riken.jp/JCM/catalogue\\_J.shtml](http://www.jcm.riken.jp/JCM/catalogue_J.shtml)
- 8) 「カルタヘナ法説明書」(文部科学省作成)  
[http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/carta\\_expla.html](http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/carta_expla.html)

責任筆者；安川洋生 (E-mail: hiroyo@iwate-u.ac.jp)