

[ノート]

腸内細菌(サルモネラ菌)の電子顕微鏡用 試料作成と観察

Electron Microscopic Preparation and Observation of the Samples of Food Poisoning Bacteria (Salmonella)

横田 秀幸 大森 茂 清水 良夫 岡田 隆幸
高杉 信男

Hideyuki Yokota, Shigeru Ohmori, Yoshio Shimizu,
Takayuki Okada and Nobuo Takasugi

緒 言

昭和63年5月に、クジラ肉による食中毒が発生し、当衛生研究所では、食中毒の起原因菌の分離等、種々の検査を行ったが、¹⁾ 著者らも又、電子顕微鏡による分離菌の観察を行った。

今回、クジラ肉と患者便由来の分離菌を実験材料として、当所で行っている電子顕微鏡用試料作製の一部をまとめたので報告する。

実験方法

1. クジラ肉及び患者便由来分離菌の走査電子顕微鏡用試料作製

1-1 実験材料

実験に用いた菌株は、クジラ肉及び患者便から分離した、*Salmonella enteritidis* (O9: g, m-)と判定した菌株である。クジラ肉由来の菌試料をFp 125, 128とし、患者便由来のそれをFp 116, 117とした。各菌試料は、BHI培地約3mlに接種し、一夜37°Cのふ卵器で培養したものを実験材料とした。

1-2 実験に使用した固定液及び洗浄液

固定液: 2%グルタルアルデヒド・0.05MNa
リン酸緩衝液 (pH 7.4), 340 mOsm

洗浄液: 0.12MNaCl・0.05MNa リン酸緩衝液
(pH 7.4), 340 mOsm

1-3 試料作成手順

(1) 菌の濾紙による分離と固定

BHI培地で培養した菌のけん濁液約3mlに0.1mlの25%グルタルアルデヒドを加え、よく混合して直ちにパスツールピペットにとる。次にその1~3滴をミリポアフィルター(VC, 孔径0.1µm)の小片(径10mm)に落とし、それを濾紙全面に拡げてぬらしてから、その濾紙を傾けて余分の液を除く。濾紙がなま乾きのときに(液が一部残るところもある)組織培養盤(径15mm×深さ13.5mm, 2.8ml容, フタ付, Falcon 3047, 24穴)に移し、固定液を加え、室温に1時間静置して固定した。

(2) 菌付着濾紙の洗浄

固定の終わった濾紙片は、グルタルアルデヒドの臭気の無くなるまで、30分間室温で洗浄する。この間、6~7分の間隔で4回液を取り換える。

(3) アルコール脱水

上記の培養盤の容器をそのまま使用を続け、アルコール脱水する(室温)。すなわち、50%、

70%, 80%, 90%, 95%のエタノールの濃度の順に各々15分間(この間に2回液を取り換える)脱水を行う。最後に、99.5%エタノールで60分間脱水して完了する。この間、10分の間隔で6回液を取り換える。

(4) 臨界点乾燥

使用した臨界点乾燥器(CPD)は、日立製HCP-2型である。

アルコール脱水後の試料を入れる包埋カゴは $\phi 2.5\%$ のものを使用し、上下のフタの内側に小円形の汚紙をはめ込んだもので、あらかじめ、ふ卵器で乾燥しておく。使用時に99.5%のアルコールをフタの上下の汚紙に滴下してぬらしておき、直ちに試料を入れて、フタをとりCPDにセットする。なおこのCPDの容器の中には3個のカゴが固定状態でセットできる。

CPDの操作条件はカゴのセットが終了後、20℃で20分間、次に40℃で約20分間(92~100 kg圧)加温して乾燥後、 $2\ell/\text{min}$ でリークする。

(5) イオンスプッターコーティング

使用したイオンコーターはGIKO IB-3型である。

臨界点乾燥後の試料はSEM用アルミ試料台($\phi 15\%$)に両面接着テープを張った上に付着させ、グラファイトペースト(応研商事)で接着し、アースする。これを乾燥デシケーターで乾燥後、イオンコーターにセットする。

スプッターリングの条件:白金パラジウム4 mA/5分, 0.1 Torr

(6) 観察及び撮影条件

使用した走査電顕は日立S-520型である。

加速電圧: 10kV

照射電流: 100 μ A

COND LENS: 5.0

可動絞: Na.3

W. D.: 7~10mm

カメラ絞: 1:16

フィルム: Neopan F

現像: D76, 20℃, 8分

2. 分離菌の透過電子顕微鏡用試料作製 (ネガティブ染色^{2~5})とシャドウイング)

2-1 実験材料

分離菌 *Salmonella enteritidis* (O9: g, m: -), 1の試料作製に用いた試料菌を使用した。

2-2 固定液と緩衝液(洗浄液)

1の試料作製に用いた同じ組成のものを使用した。

2-3 燐タングステン酸染色液(2%KPT)

燐タングステン酸(特級キシダ化学)を2%になるように蒸留水(イオン交換水使用)に溶かす(冷蔵庫内保管)。これの4 mlを小ピーカーにとり、ガラス棒でかくはんしながら、2N-KOHを滴下していき、pH試験紙(BTB試験紙使用)でpH 7.4まで中和して作成する。この染色液は4℃の冷蔵庫内で1週間は使用できる。

2-4 メッシュの支持膜と親水化

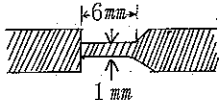
メッシュは国産のDN 400メッシュ(銅製)を使用した。メッシュの支持膜はコロジオン膜にカーボンを真空蒸着したもの。

メッシュの膜張りにはコロジオン膜張器(応研商事)を用いた。即ち、膜張器にステンレス網台を置き、その上にニッケルメッシュ台(3×5 cm)を載せ、イオン交換水を満たす。次に必要な数のメッシュをアルコール又はアセトンに一度浸してから、そのメッシュ台の目孔にはめて並べておく。

コロジオン膜の作製は2%コロジオン溶液(応研商事)を1滴、7型ピンセットの先から水面上に落とし、約3分間静置後、膜張器の底から水抜きを行って、水面上に形成された被膜を水面下のメッシュに張り付けるようにする。次にそのメッシュ台の外側の端の被膜をピンセットの先をはしらせて切り、汚紙の上にその台を移し、余分な水を除いてから、37

℃のふ卵器の中で、30分間乾燥する。

支持膜のカーボン蒸着は真空蒸着装置（日立製、HUS 5 GB）を使用した。蒸着条件¹⁾として、カーボンフィラメントのサイズは長さ6 mm×径1 mm



真空中度は 10^{-5} Torr 以下、試料メッシュとフィラメントとの高さは9 cmである。コーティングの終わったメッシュは乾燥デシケーターに保存し、使用前にイオンコーターで親水化処理する（4 mA/10秒間）。

2-5 試料作製手順

培養液（BHI）からの菌の分離

約3 mlの培養試験管の底に十分量の菌の沈積がみられたので、その上液をパスツールピペットで除去し、少量の残液に菌ベレットをよく混和して高濃度の白濁した菌試料液を作製する。

(1) ネガティブ染色直接法

- 親水化処理したメッシュを、5型ピンセットに挟み、輪ゴムでとめて水平に保ち、そのメッシュの上面に菌試料液を1滴のせる。次に三角形にカットした沷紙でその液の一部を吸いとり、液量を適量にする。
- 固定液を1滴、メッシュ上の菌液の上ののせ、三角形沷紙の先端で十分に混合し、3～5分間静置して菌を固定する。
- メッシュ上の固定液の上に2% KPTを1滴のせ、三角形沷紙で十分かくはんして染色する。
- メッシュ上の染色液の上に蒸留水を1滴のせ、直ちに三角形沷紙の一端をメッシュの端に軽く触れて、液を完全に吸い取り、沷紙を敷いたシャーレの中に移す。
- ふ卵器（37℃）にメッシュを入れたシャーレを移して約30分間乾燥させる。

(2) ネガティブ染色遠沈法

- BHI培養液から分離した菌試料液に固定液約1 mlを加え混合してから、1時間静置し

て菌を固定する。

- 固定の終わった菌試料液は1,500回転5分間遠心分離し、その上澄液をピペットで除去し、残った菌沈渣に洗滌液1 mlを加え、よく混合してから同一条件で遠心分離を行う。この洗滌操作は1～2回行う。
 - 洗滌の終わった菌沈渣に洗滌液を適量（2～3滴）加え、染色用試料液とする。
 - ネガティブ染色は2-5の(1)のネガティブ直接法に準じて行う。
- (3) シャドウイング法 2-5の(1)のネガティブ直接法に準じて行う。
- 親水化処理したメッシュ上にBHI培養液から分離した菌試料液を1滴のせる。次いで、三角形の沷紙で液の一部を吸い取り適量とする。
 - メッシュの菌液に10%酢酸アンモンの1滴をのせ、三角形の沷紙の先端でかくはんしながら、菌液を吸い取り、洗滌して適量にする。
 - メッシュ上の酢酸アンモン液の上に蒸留水を1滴のせ、直ちに三角形の沷紙の一端をメッシュの端に軽く触れ、メッシュ上の液分を完全に吸い取り、沷紙を敷いたシャーレの中に移して、自然乾燥させる。
 - シャドウイング
スライドガラスの上に菌をのせたメッシュを並べ、ベルジャー内の置台に乾燥した硬めの薄い紙を敷き、その上にそのスライドガラスを置く。金属蒸発用の加熱フィラメントはV字型のタングステン線ヒーター（ $\phi 0.7$ mm, 応研商事）の先端に白金パラジウム合金線（Pt 80%, Pd 20%, $\phi 0.1$ mm）の約20 cmを巻き付けたものである。蒸着装置にセットする前に、アセトンに浸して洗滌しておく。フィラメントのセットの高さは2 cm、距離は5 cmとした。ベルジャー内の真空度は約 5×10^{-6} Torr付近で行った。

(4) 観察及び撮影条件

使用した透過電子顕微鏡は日立製H 800型である。

加速電圧 100 A
照射電圧 15 ~ 20 μ A
コンデンサー 絞りNo. 2
対物可動絞 No. 4
フィルム フジFGフィルム
現 像 コピナール, 20 °C, 4分

実験結果と考察

1. 走査電顕写真⁶⁾

クジラ肉由来のF p 125の写真1では、菌の鞭毛が比較的保存されているが、F p 128の写真2では鞭毛の切れが多い。全般的にみて、菌がミリポア濾紙上に散在しているところでは、菌の損傷が大きいと思われる。患者由来のF p 116の写真3、4では菌の鞭毛のしなやかさも、ある程度保存されていると思う。

2. 透過電顕写真

a. ネガティブ染色直接法

メッシュの上で直接に固定洗滌をする方法である。写真5のように菌体の周囲に染色液が広がって残るのが大部分であったが、中にはまれに、写真6~9のように染色液がほどよく残っており、鞭毛、線毛の保存性もよく、菌体の損傷も少ないものが観察された。

b. ネガティブ染色遠沈法

菌体の染色前に固定洗滌を小試験管内で行うもので、写真10~14のようにすべて菌体表面にしわなどがみとめられ、染色液の付き方もよくなかった。

観察された菌体は鞭毛のあるものばかりで、線毛のある菌体はほとんどみられなかった。しかし、鞭毛の他に線毛もある菌体の集団がメッシュの一箇所に観察された(写真15, 16)。こ

れは菌体の損傷も少なく、染色液の付き方も良好で、2-5の(1)の直接法のそれと比較して、遜色のないものと思われる。今後さらに検討したい。

c. シャドウィング法

鞭毛を有する菌株(写真17~19)、線毛を有する菌株(写真20, 21)、鞭毛と線毛の両方を有する菌株(写真22)がそれぞれ観察された。観察された菌株の中には、菌体の一部に発泡がみられるなど、明らかに菌膜の損傷のあるものがあったが、他の菌種に比較して損傷の受けにくい菌株と思われる。

3. 固定、洗滌の緩衝液について

今回の実験ではサルモネラ菌を実験材料としたため、通常の試料作製法を採用した。このため、固定液、洗滌液のpHは7.2~7.4に、浸透圧は300~400 mOsmの範囲になるように試薬等を加え調製した。

試料作製の過程の浸透圧等の変化について、特に試料の菌株を培養液から固定液、洗滌液へと移す場合に、菌が育成した培養液の諸条件が試料作りに重要な要因となると思われるので、今回実施したネガティブ染色法では、直接法と遠沈法を合わせて行い両者を比較したところ、直接法による方法ではまれではあるが、菌体の形状の良いものが観察されたので、今後さらに検討して行きたい。

まとめ

腸内細菌の鞭毛、線毛等の電顕観察のための試料作製の諸条件を検討した。使用菌株はクジラ肉及びその患者便から分離した*Salmonella enteritidis*で、培養液としてBHIを使用した。

1) 試料作製のために使用した固定液と洗滌液は走査電顕及び透過電顕に共通の組成のものを用いた。

固定液: 2%グルタルアルデヒド・0.05M
Na 磷酸緩衝液(pH 7.4), 340 mOsm

洗滌液・0.12 M NaCl・0.05 M Na 磷酸
緩衝液 (pH 7.4) 340 mOsm

- 2) 走査電顕用試料の観察から、菌の鞭毛が比較的よく保存されているのがみられた。
- 3) 透過電顕用試料作製法として、ネガティブ染色法に、メッシュ上で直接処理する方法と試験管内で固定洗滌する遠沈法の両者を比較した。

直接法は遠沈法と比較して、試料作製にテクニクを要するが良い観察試料が得られた。

- 報) 146, 8, 9 国立予防衛生研究所 (1988)
- 2) 日本電子顕微鏡学会関東支部編・電子顕微鏡生物試料作製法21, 147, 丸善 (1975)
- 3) 天児和暢: 細菌と電子顕微鏡図譜, 133, 南山堂 (1983)
- 4) 野々村禎昭: 代謝, 8, 778 中山書店 (1971)
- 5) 前木吾市: 東京衛研年報23, 27 (1971)
- 6) 天児和暢, 小池聖淳編著: 微生物学における電子顕微鏡技術〔上〕23, 学会出版センター(1982)

参考文献

- 1) 大森 茂, 小林 毅・病原微生物検出情報 (月

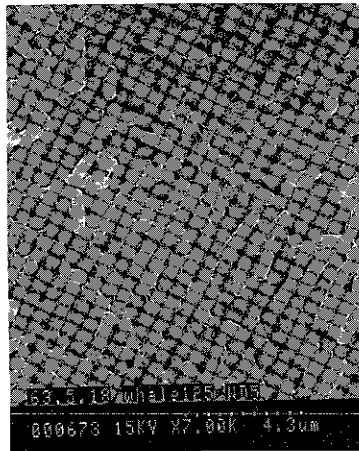
写 真 の 説 明

写真番号	菌試料 (由来)	倍 率 (k)	備 考
1 (673)	Fp 125 (クジラ肉)	3.5	走査型
2 (686)	Fp 128 (")	3.5	"
3 (677)	Fp 116 (患者便)	5.0	"
4 (678)	Fp 116 (")	5.0	"
5 (447)	Fp 125 (クジラ肉)	5.0	透過型 (直 接 法)
6 (448)	Fp 125 (")	8.0	" (")
7 (450)	Fp 128 (")	8.0	" (")
8 (449)	Fp 116 (患者便)	8.0	" (")
9 (452)	Fp 128 (クジラ肉)	9.0	" (")
10 (454)	Fp 125 (")	4.0	" (遠 沈 法)
11 (455)	Fp 125 (")	7.0	" (")
12 (480)	Fp 116 (患者便)	6.0	" (")
13 (499)	Fp 116 (")	6.0	" (")
14 (483)	Fp 116 (")	6.0	" (")
15 (481)	Fp 116 (")	8.0	" (")
16 (482)	Fp 116 (")	7.0	" (")
17 (462)	Fp 128 (クジラ肉)	6.0	" (シャドウイング法)
18 (463)	Fp 125 (")	5.0	" (")
19 (466)	Fp 116 (患者便)	6.0	" (")
20 (459)	Fp 125 (クジラ肉)	10.0	" (")
21 (465)	Fp 116 (患者便)	9.0	" (")
22 (470)	Fp 117 (")	6.0	" (")

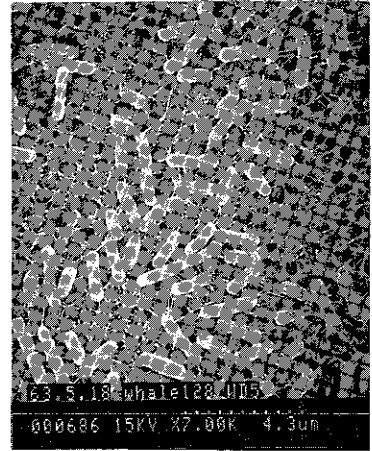
【走査電顕写真】（写真1～4）

写真1（左）クジラ肉由来

菌体の鞭毛がある程度
みられるもの。



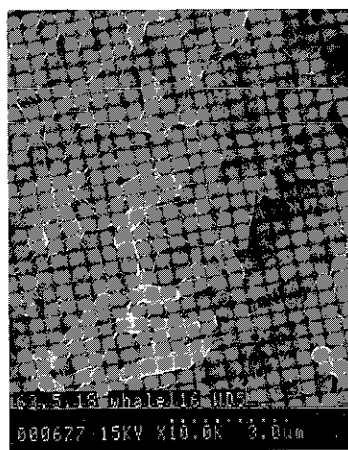
（ 3,500 倍 ）



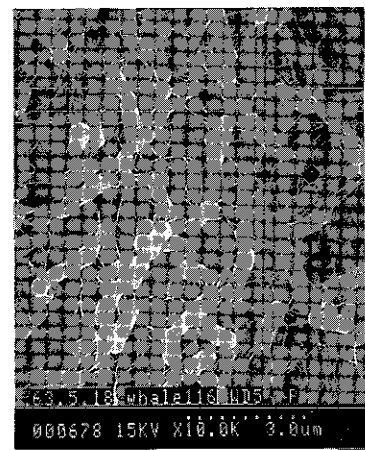
（ 3,500 倍 ）

写真2（右）クジラ肉由来

鞭毛の切れが多い。
菌の散在しているもの
ほど菌の損傷が大きい。



（ 5,000 倍 ）



（ 5,000 倍 ）

写真3（左）患者便由来

鞭毛が比較的保存され
ている。

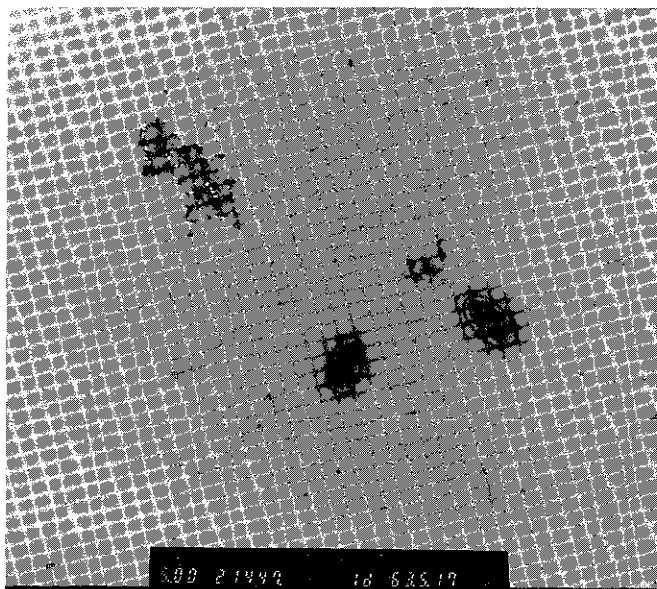
写真4（右）患者便由来

写真3と同様

【透過電顕写真】ネガティブ染色直接法（写真5～9）

写真5 クジラ肉由来

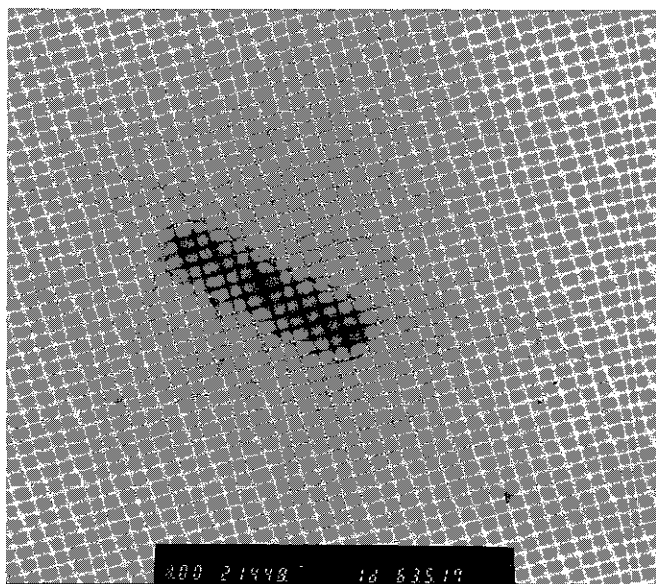
菌の周囲の染色液が広がっているのが大多数を占めた。



（5,000倍）

写真6 クジラ肉由来

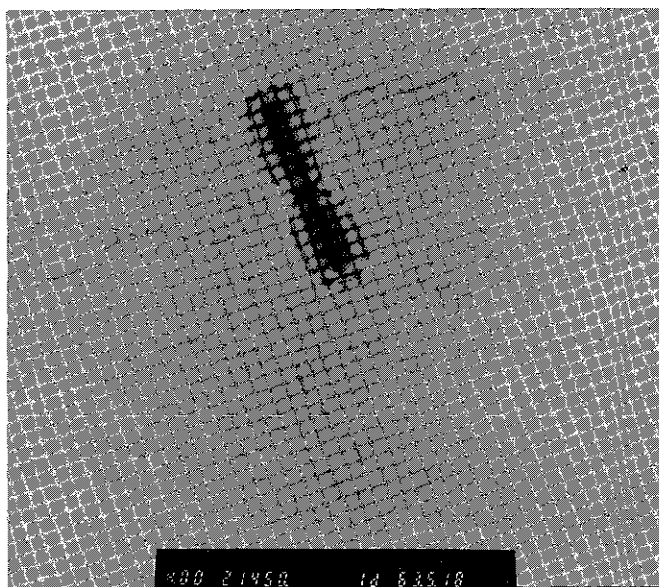
菌の周囲の染りもほどよいが数は少い（以下7～9同様）
鞭毛の発育のよい単独の菌。



（8,000倍）

写真7 クジラ肉由来

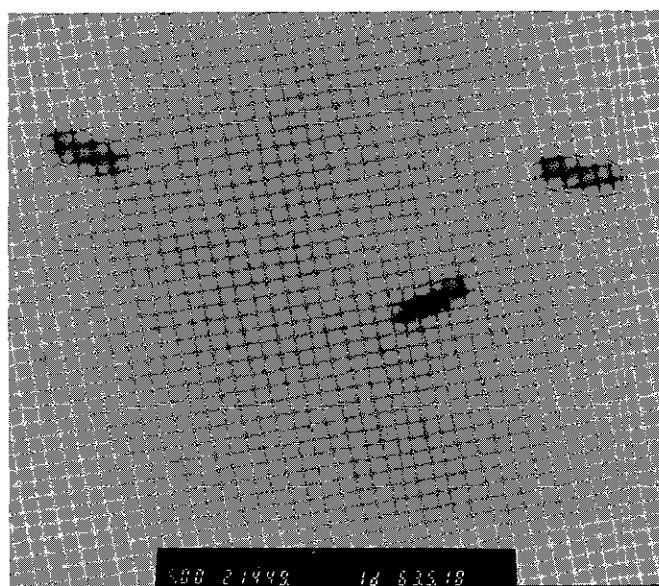
鞭毛の少ない，若い菌
分裂後の菌体がペアで
存在していると思われ
る。



(8,000 倍)

写真8 患者便由来

鞭毛のほかに線毛もある菌



(5,000 倍)