

# 電子顕微鏡を利用した病原体の検出

Detection of pathogens using electron microscopy

なが た のり よ さ た てつたろう  
永田 典代：佐多 徹太郎  
Noriyo NAGATA Tetsutaro SATA

## はじめに

電子顕微鏡は、1932年にErnst RuskaとMax Knollによって初めて発表され、1990年代までに物理学、化学、工学などの各分野で広く利用され、生物・医学分野ではウイルスの発見や細胞内小器官の構造解析など、大きく貢献してきた。しかしながら、1990年代には酵素結合免疫吸着測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) やポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) などの分子生物学的診断法の確立によりウイルス抗原やウイルスに対する抗体、あるいはウイルス核酸の検出が可能になった。これらの方法による検出感度は電子顕微鏡観察法を大きく上回り、また、電子顕微鏡観察による粒子構造解析のみではウイルス属の鑑別はできなかったため、電子顕微鏡は日常のウイルス診断法にはあまり用いられなくなった。現在では、さらに、次世代シーケンサーによる超高速、大量の塩基配列の解読によって、病原体の迅速な同定が試みられており、ますます電子顕微鏡は不要と見なされるようになってきている。その一方で、新興・再興感染症あるいはバイオテロ対策の病原体検出手段の一つとして、電子顕微鏡の有用性が見直されつつある。そこで本稿では、電子顕微鏡を用いた病原体の検出法の歴史と利点、欠点を整理しながら、その有用性について紹介する。

## I. 電子顕微鏡について

電子顕微鏡とは、高真空中に保たれた顕微鏡の鏡筒内において、電子銃で電子を加速した電子線を作り、これを観察したい対象にあてて透過の程度によって

濃淡をつけ、対象の形態を拡大観察する顕微鏡のことである。電子線は加速電圧を加えることで波長が変化し、数 nm の大きさまで識別が可能となる。2つの点を分離して観察可能な最短の距離を示す「分解能」は、理論的に 0.1 nm 程度であり、ウイルス粒子はもちろん原子レベルの大きさのものが観察可能である。また、電磁コイルを利用することで、電子顕微鏡のレンズは電流の変化によって倍率を自由に変えることができる。

電子顕微鏡は大きく透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope, TEM)、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM) の二つに分類され、使用目的によって使い分けられている。TEM ではウイルス粒子のネガティブ染色後の透過像、あるいはウイルス感染細胞を樹脂包埋後、超薄切片を作製することによって感染細胞の微細構造の変化やウイルス粒子の断面像および内部構造を観察することが可能である (図1)。SEM では二次電子線の反射によって立体的な表面構造を観察することが可能であり、例えば昆虫、ダニの体表の拡大、細菌 (図2)、あるいは感染細胞の表面に出芽したウイルス粒子を立体的に観察することが可能である (図3)。立体構造が観察できるので、TEM よりインパクトのある画像が得られることがあるが、内部構造はわからない。近年、Computed Tomograph法の原理をTEMの自動撮影システムに応用して三次元構造を観察・計測する電子顕微鏡トモグラフィーが開発された。最近はこれを生物試料に利用することによって、病原性ウイルスの感染・増殖が細胞の微細構造に与える影響を解析することが可能となった。これによって、細胞内部の立体構造の情報量が増え、また、さらにインパクトのある画像を得ることに成功している。一方で、SEMは操作性の容易さやコ

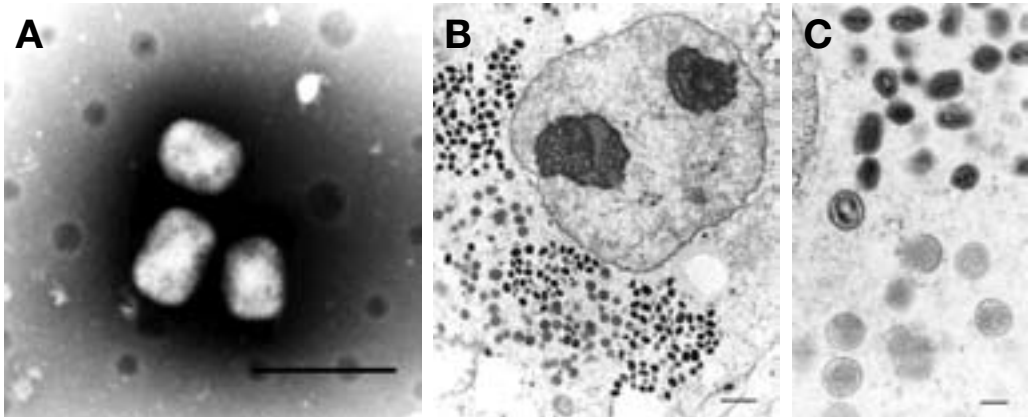


図1 オルソポックスウイルス（ワクチニアウイルス）の透過型電子顕微鏡像

**A.** リンタングステン酸を用いたネガティブ染色。成熟したウイルス粒子はレンガ状。バーは500 nmを示す。**B.** ウイルス接種後の発育鶏卵の漿尿膜に形成されたポックの樹脂包埋超薄切片。細胞質内に多数のウイルス粒子形成を認める。バーは1  $\mu\text{m}$ 。**C.** 同部位拡大像。内部構造が異なる種々の発育段階のポックスウイルス粒子が存在する。バーは200 nm。

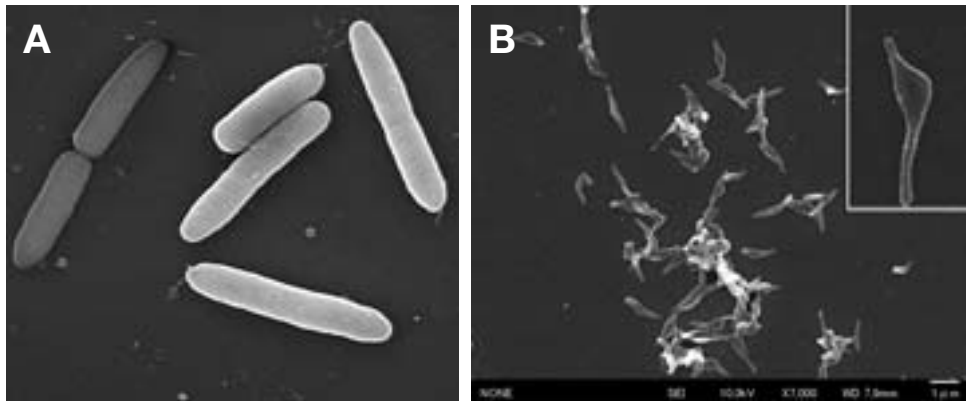


図2 バクテリアの走査電子顕微鏡像

**A.** 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*。鞭毛を持つ桿菌である。撮影倍率17,000倍。菌体の長さはおおよそ2  $\mu\text{m}$ 。**B.** 肺炎マイコプラズマ *Mycoplasma pneumoniae*。大きさは1~2  $\mu\text{m}$ で、特徴的な形状を示す。挿入図は1菌体 撮影倍率7,000倍。

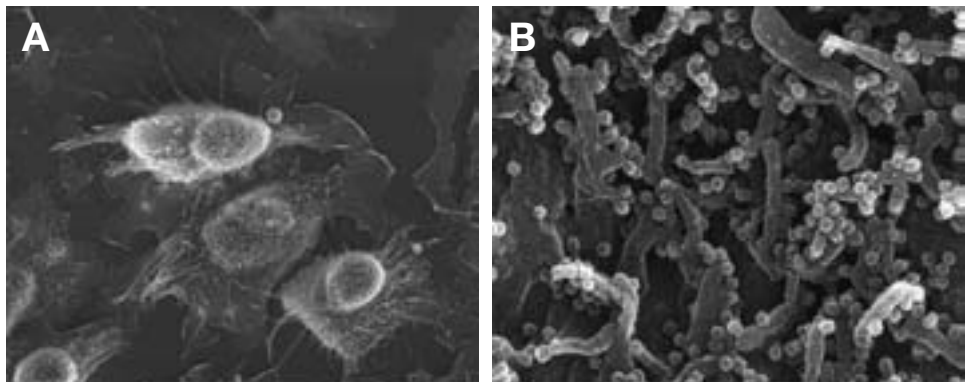


図3 インフルエンザウイルス感染後の培養細胞の走査電子顕微鏡像

**A.** ウイルス感染後に培養細胞の形態が変化し類円形化する細胞変性効果（CPE）を認める。撮影倍率2,000倍。**B.** 細胞表面の微絨毛表面から出芽する多数のウイルス粒子。ウイルス粒子の大きさはおよそ80 nm。撮影倍率50,000倍。

コンパクト性を追求し、卓上型 SEM も開発され、現場での迅速な解析を実現している。

## II. 電子顕微鏡による病原体検出の歴史

19世紀に Robert Koch によって微生物が感染症の病原体であることが証明された (Koch の原則)。Koch は光学顕微鏡が導入されるとすぐに炭疽菌 *Bacillus anthracis* (1876年)、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* (1882年) およびコレラ菌 *Vibrio cholerae* (1883年) といった医学的に重要な細菌の検出に成功したが、現在、ウイルスによる感染症として知られている疾患の原因解明には至らなかった<sup>1,2)</sup>。1932年に発表された TEM の導入によって、ウイルス粒子の大きさや形態観察が可能になるとウイルス学は飛躍的に進歩した。1938年には Von Borries らによって天然痘の原因であるポックスウイルスの形態が明らかにされ、その後、つぎつぎと種々のウイルス、バクテリオファージ、細菌の微細形態が解明され、その分類や形態と機能の関係の理解に貢献した<sup>1,2)</sup>。また、1941年には免疫電顕法によってタバコモザイクウイルスが観察された<sup>1,2)</sup>。TEM はウイルス診断に有用であることはすぐに理解され、これは当時、大問題であったポックスウイルスによる痘瘡 (天然痘) とヘルペスウイルスによる水疱瘡 (英名では Chicken pox と呼ばれる) の病原体鑑別診断に利用された<sup>3)</sup>。患者の皮膚に形成される発痘の水疱液から直接ウイルス粒子を観察できるという点で非常に有用であった。当時はオスミウム薫蒸法によるウイルス粒子の形態観察が行われていたが、のちに1960年代にはネガティブ染色法が紹介され、加えて操作が比較的容易な TEM が導入されたことから日常のウイルス診断に広く用いられるようになった。ネガティブ染色法は最も簡便・迅速な TEM による観察法で、電子線不透過性の低分子物質を染色液として被検生物試料に混ぜて支持膜にのせ、被検体を黒いバックに白く抜けた像として TEM で観察する。染色液としてリンタングステン酸、酢酸ウラニル、あるいはリンモリブデン酸が使用される。一方、1949年には Enders らは、初めて培養細胞でポリオウイルスを増殖することに成功した<sup>2)</sup>。その後、エンテロウイルスはもちろんのこと、アデノウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルスあ

るいはレオウイルスなどが、培養細胞によって分離された。このように培養細胞で分離・増殖が可能な病原体は、同時に TEM による形態観察が盛んに行われ、ウイルス粒子の形状が明らかになると、分類学にも利用された<sup>2)</sup>。

一方で、培養細胞によるウイルス分離・増殖が困難な病原体も多く存在した。肝炎や胃腸炎の病原体はなかなか検出されなかったため、患者の血漿、尿、あるいは便検体を直接、TEM によって観察することが試みられた。その結果、1970年代には培養細胞で分離が不可能であったウイルスが次々と患者検体から直接、TEM によって発見された<sup>2,3)</sup>。A型肝炎ウイルスやB型肝炎ウイルスは患者の血漿や便検体から、ロタウイルスは急性胃腸炎患者あるいは動物の便から直接検出された。また、非常に小さなウイルス粒子であるノーウォークウイルスも胃腸炎患者の便から直接検出された。その後、同様の形態を示したノーウォーク様ウイルスや小型球形ウイルスが発見されたが、これらは後にノロウイルスと命名された。この他に、アデノウイルス、アストロウイルス、カリシウイルスがそれぞれ胃腸炎患児の便検体から直接、同定された。BKウイルスは1971年に臓器移植患者の尿検体から直接同定されたポリオマウイルスである。また、ヒトパルボウイルス B19 は1975年に患者血清を用いてB型肝炎ウイルスをスクリーニングしている際に発見されたウイルスである。

このように、電子顕微鏡はウイルスをはじめとする病原微生物の検出と分類学、形態と病原性の理解に大きく貢献し、微生物学の基礎を築いた。

## III. 新興・再興感染症の病原体検出における電子顕微鏡の貢献

さて、新興感染症とは、かつては知られていなかった、この20年間に新しく認識された感染症で、局地的に、あるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症である。また、再興感染症とは、既知の感染症で、すでに公衆衛生上の問題とならない程度までに患者が減少していた感染症のうち、この20年間に再び流行しはじめ、患者数が増加したものとされている。この20年間で、いくつかの新興・再興感染症が出現したが、そのたびに電子顕微鏡の有用



性が見直された。

1994年にオーストラリアのブリスベン郊外のヘンドラで発生した馬とヒトに致死的な呼吸器感染症では、発症馬と患者の組織検体を接種した培養細胞上清のTEMによる観察によって、パラミクソ様ウイルス粒子が検出され、ウイルス感染症であることが示された。同時に遺伝子学的解析によってモルビリウイルスに近縁の新しいウイルスであることが示され、ヘンドラウイルスと命名された<sup>4)</sup>。1998～1999年にはマレーシア、シンガポールで豚に急性呼吸器感染症、ヒトに急性脳炎を引き起こすパラミクソ様ウイルスが同様の方法によって発見された。最初にウイルスが分離された際の患者発生の地名を由来としてニパウイルスと命名された<sup>5)</sup>。これらは現在、パラミクソウイルス科ヘニパウイルス属と分類されている。丁度この頃が、ウイルス診断における電子顕微鏡学の有用性が議論された時期である<sup>3,6)</sup>。

その後発生した、重症急性呼吸器感染症 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) の世界的大流行の際に電子顕微鏡学的検査が果たした役割は、高く評価された。2002～2003年冬季に中国広東省を起点として世界的に流行したSARSは、当初はヒト

メタニューモウイルス、インフルエンザ、クラミジアが原因病原体として疑われたが、米国CDCの電子顕微鏡部門において、患者の咽頭拭い液を接種し、細胞変性効果 (Cytopathic Effect ; CPE) を示したVeroE6細胞の細胞上清をTEMで観察したところ、コロナウイルス様粒子が観察された<sup>7)</sup>。当時、コロナウイルスで下気道炎を引き起こすものはほとんど知られていなかったため、その後の免疫組織学的、免疫蛍光学的血清検査、細胞による分離といくつかの分子生物学的解析結果から結局、全く新しいコロナウイルスがSARSの病原体であることが判明し、SARSコロナウイルスと命名された<sup>8-10)</sup>。当時、われわれもWHOを通じて入手したウイルスをVeroE6細胞で培養・増殖し電子顕微鏡観察を行い、この新しいヒトコロナウイルスの画像をマスコミに提供し情報を一般に周知した (図4)。

2009年には中国で発熱を伴う血小板減少症候群が流行し、ダニが媒介する新しいブニヤウイルスが原因とされた<sup>11)</sup>。この時には、患者血清あるいは白血球の乳剤をVero細胞に接種し得られた上清を精製しTEMによるウイルス粒子検出が行われた。以上のように、この十数年で、電子顕微鏡は感染症の

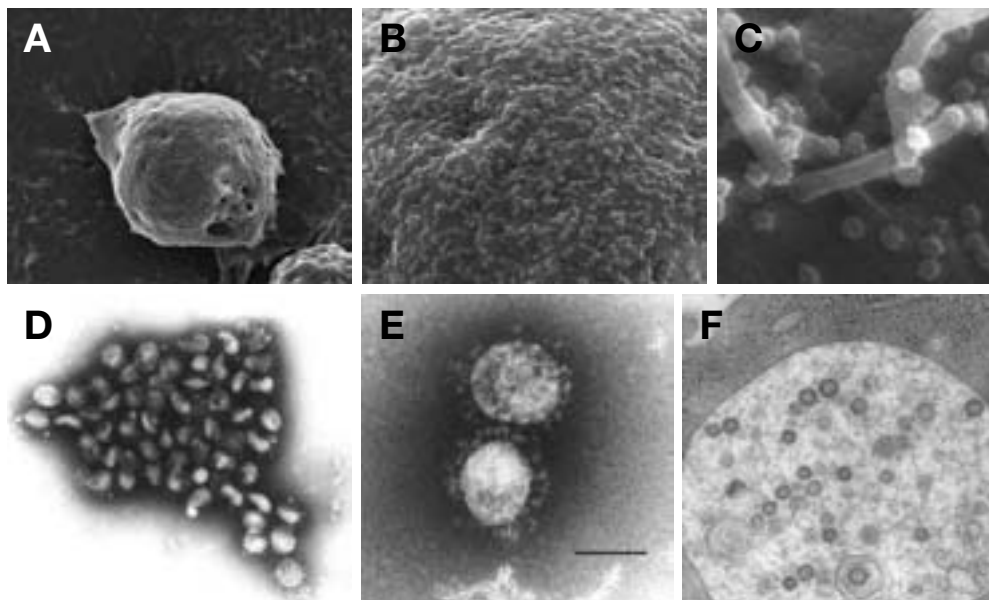


図4 SARSコロナウイルスの電子顕微鏡像

**A～C.** 丸く縮まった細胞 (細胞変性効果、CPE) の表面から無数のウイルス粒子が出芽する様子をとらえたSEM画像。**D, E.** 精製ウイルス粒子を用いたネガティブ染色TEM画像。このウイルス科は、粒子の周囲に太陽のコロナのような突起がTEMで観察されるため、コロナウイルス科と命名された。**F.** 培養細胞の空胞内に形成されたウイルス粒子。樹脂包埋超薄切片のTEM画像。ウイルス粒子の大きさはおよそ80 nm。**A.** 5,000倍撮影、**B.** 20,000倍、**C.** 100,000倍、**D.** 20,000倍、**E.** バーは100 nm、**F.** 50,000倍。

日常診断法から新興感染症発生の際の未知の病原体検出の補助的検出方法として利用されるようになった<sup>12~15)</sup>。

一方で、2003年にはアメリカ合衆国でヒトのサル痘のアウトブレイクが発生し<sup>16)</sup>、また、2002年頃から現在まで欧州において牛痘ウイルスの野生あるいはペットのラットからヒトへの感染が複数、報告されている<sup>17~21)</sup>。これらの病原体はいずれも痘瘡の原因ウイルスのオルソポックスウイルス属に分類され、ヒトに発痘を形成しこの水疱内に多量のウイルス粒子を含む。そこで、かつて痘瘡患者に実施されていた、皮膚の小水疱液から直接ウイルス粒子を観察する方法が利用されている<sup>22)</sup>。米国CDCによれば、この方法によって、痘瘡あるいはサル痘患者の発痘から95%、牛痘患者では65%の割合でウイルスの検出に成功している。

さらに、2001年9月にアメリカ合衆国で起きた炭疽菌芽胞を利用したバイオテロをきっかけに、電子顕微鏡はバイオテロ対策における細菌、ウイルスの迅速検出法の一つとしても利用されるようになった<sup>23~25)</sup>。条件さえそろっていれば、検体をうけとってから15分程度でネガティブ染色を終えて観察・診断まで行うことが可能である。このように、この数十年で電子顕微鏡は新興感染症やバイオテロに使用される可能性のある未知あるいは既知の病原体を検出するために欠くことのできない基本的な道具となった<sup>12, 14, 15, 26)</sup>。

#### IV. 電子顕微鏡検査法の利点と欠点

TEMを用いたネガティブ染色法による病原体の検出は迅速性、簡便性に優れ、スクリーニングによる包括的な鑑別診断が可能という点で感染症診断の一助となる(表1)。すなわち、病原体が含まれた

検体が適切に調整され、観察条件が整っていれば、ネガティブ染色から観察、判定まで15~30分で完了する。これに病原体特異的な抗血清を用いた免疫染色(免疫電顕)を加えることで精度は高くなる。それに対し、TEMあるいはSEMを用いた感染細胞あるいは組織の観察には試料作製(前処理)が必要であり、これには丸1日~数日を要する。また、検体をそのまま観察することによって、病原体の種類の見当をつけることが可能である。ウイルスか、細菌によるものなのか。ウイルスであればエンベロープの有無、細菌であれば芽胞形成の有無をスクリーニングし、包括的な鑑別診断が可能である。SEMは粒子の表面構造と大きさの確認ができる一方で、TEMは透過像によりウイルス粒子のエンベロープの有無と大きさの確認が可能であるためウイルスの同定という点ではTEMが有用である。分子生物学的検査には病原体ごとの特異的なプライマー、プローブや高価な試薬が必要となり、血清学的検査には特異的な抗原が必要となる。また、そのためには臨床情報などある程度必要となる。

しかしながら、電子顕微鏡検査には $10^6$ 粒子数/ml以上の高濃度の試料が必要である。現在、PCR法やReal-time PCR法、あるいはLoop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)法などの分子生物学的方法では10~50コピーのウイルスゲノムが試料に含まれていれば検出が可能であるので、電子顕微鏡検査は非常に低感度である。また、電子顕微鏡による正確な感染症診断検査のためには、実施者には豊富な経験と高いスキルが要求され、機器の使用法も含めて十分な訓練が必要である。Robert Koch研究所では1994年に電子顕微鏡によるウイルス診断の外部評価システム(External Quality Assessment Scheme in EM Virus Diagnostics, EQA-EMV)を確立し、現在でもそのシステムは維持されている<sup>3)</sup>。

表1 感染症診断検査における電子顕微鏡の利点と欠点

|    |  |  |
|----|--|--|
| 利点 | 迅速診断が可能<br>病原体の種類の見当をつけることが可能<br>他の手法では検出困難な病原体の検出が可能<br>包括的な鑑別診断が可能 | ネガティブ染色は30分程度で診断可能<br>ウイルスか細菌か、エンベロープ、芽胞形成の有無<br>病原体毎に至適化された特殊な試薬等が不要<br>臨床情報はある程度不要                     |
| 欠点 | 低感度<br>実施者には豊富な経験と高いスキルが必要<br>電子顕微鏡は高価で操作が煩雑<br>自動化は困難、処理量に限度がある     | $10^6$ 粒子数/ml以上の高濃度のサンプルが必要<br>正確な診断のためにはトレーニングが必要<br>病原体診断には数十nm程度のウイルス粒子を観察できる高い分解能が必要<br>人間が観察し判断する必要 |

われわれも2011年から、検査従事者の教育訓練のためにこのシステムを利用することにした。このEQAについてご興味のある方は、Robert Koch研究所のホームページをご参照いただきたい(2013年春に更新予定とのこと)。さらに、電子顕微鏡自体はウイルス粒子を観察できる高い分解能が必要で、高価で操作が煩雑である。最近の電子顕微鏡には一定の粒子サイズのパラメータをもとに、試料台(グリッド)上を自動スキャンし候補を絞り込む機能が導入されており、ある程度の自動化が可能となった。しかしながら、最終的には、実施者が機器を操作し、観察し判断する必要があるため処理量には限界がある。

### まとめ

電子顕微鏡は1940年代から1990年代までの病原微生物の分類学、形態と病原性の理解に大きく貢献し、その基礎を築いたが、1990年代には新しい分子生物学的診断法や血清学的診断法の確立により不要なものと思われた。しかしながら、1990年代頃から新興・再興感染症が、また、2001年以降にはバイオテロが問題となり、感染症の日常診断法から感染症発生の際の未知・既知の病原体検出の補助的検出方法として、その重要性が再認識されつつある。現在、欧米では炭疽菌の芽胞を用いたバイオテロ等が現実問題となっており、これまではウイルスを中心とした診断が主流であったが、TEM、SEMともに細菌の迅速検出法に取り入れられている。また、マスコミ等を通じた病原体の電子顕微鏡写真の公開は、一般への感染症の理解にも役立っている。電子顕微鏡を病原体検出に活用するためには、実施者の正確で安定した標本作製と観察における高いスキルの維持が重要な課題である。

### 謝辞

国立感染症研究所 村山庁舎 電子顕微鏡室の片岡紀代氏、藤野美穂子氏、波多野焯持氏には、電子顕微鏡試料作製等にご協力いただいた。また、国立感染症研究所の森川茂先生、西條政幸先生、佐々木裕子先生、岩田奈織子先生には、各種病原体のご提供にご協力いただいた。ここに深謝する。

### 文献

- 1) Kruger DH, Schneck P, Gelderblom HR. Helmut Ruska and the visualization of viruses. *Lancet* **355** : 1713-1717, 2000.
- 2) Levine AJ and Enquist LW. History of Virology. In : Knipe DM, Howley PM. Editors. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> ed. New York : Lippincott Williams & Wilkins ; p4-24, 2007.
- 3) Biel SS and Gelderblom HR Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method.: *Journal of Clinical Virology*. **13** : 105-119, 1999.
- 4) Murray K, Selleck P, Hooper P, *et al.* A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science*. **268** : 94-97, 1995.
- 5) Chua KB, Goh KJ, Wong KT, *et al.* Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet*. **354** : 1257-1259, 1999.
- 6) Biel SS and Madeley D Diagnostic virology-the need for electron microscopy : a discussion paper.: *Journal of Clinical Virology*. **22** : 1-9, 2001.
- 7) Goldsmith CS, Tatti KM, Ksiazek TG, *et al.* Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis*. **10** : 320-326, 2004.
- 8) Drosten C, Gunther S, Preiser W, *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. **348** : 1967-1976, 2003.
- 9) Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. **348** : 1953-1966, 2003.
- 10) Peiris JS, Lai ST, Poon LL, *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. **361** : 1319-1325, 2003.
- 11) Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, *et al.* Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med*. **364** : 1523-1532, 2011.
- 12) Roingard P Viral detection by electron microscopy : past, present and future. *Biol. Cell*. **100** : 491-501, 2008.
- 13) Vale FF, Correia AC, Matos B, *et al.* Applications of transmission electron microscopy to virus detection and identification. *Microscopy : Science, Technology, Applications and Education*. 128-136, 2010.
- 14) Gentile M and Gelderblom HR, Rapid viral diagnosis : role of electron microscopy. *The New Microbiologica*. **28** : 1-12, 2005.
- 15) Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections : Present and future. *Micron*. **37** : 91-106, 2006.
- 16) Reed KD, Melski JW, Graham MB, *et al.* The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *Engl J Med*. **350** : 342-350, 2004.
- 17) Wolfs TF, Wagenaar JA, Niesters HG, Osterhaus AD. Rat-to-human transmission of cowpox infection. *Emerg Infect*

- Dis. **8** : 1495-1496, 2002.
- 18) Pelkonen PM, Tarvainen K, Hynninen A, *et al.* Cowpox with severe generalized eruption, Finland. *Emerg Infect Dis.* **9** : 1458-1461, 2003.
  - 19) Ninove L, Domart Y, Vervel C, *et al.* Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg Infect Dis.* **15** : 781-784, 2009.
  - 20) Campe H, Zimmermann P, Glos K, *et al.* Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg Infect Dis.* **15** : 777-780, 2009.
  - 21) Favier AL, Flusin O, Lepreux S, *et al.* Necrotic ulcerated lesion in a young boy caused by cowpox virus infection. *Case Rep Dermatol.* **3** : 186-194, 2011.
  - 22) CDC. Negative staining electron microscopic protocol for rash illness <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/lab-testing/pdf/em-rash-protocol.pdf>. 2006.
  - 23) Madeley CR. and Biel SS. For debate : Is disinfection of specimens, which may contain unknown or bioterrorist organs, essential before electron microscopic examination? : *Journal of Infection.* **53** : 70-74, 2006.
  - 24) Kurth A, Achenbach J, Miller L, *et al.* Orthopoxvirus detection in environmental specimens during suspected bioterror attacks : inhibitory influences of common household products. *Appl Environ Microbiol.* **74** : 32-37, 2008.
  - 25) Hazelton PR and Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis.* **9** : 294-303, 2003.
  - 26) Goldsmith CS and Miller SE. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22** : 552-563, 2009.