

ている。本課題では、同技術をわが国における結核対策に導入することを目的として、特に公衆衛生領域での検討を進めてきた。

現在わが国における固有の事情として、比較的最近（1960年代）まで罹患率がきわめて高かったため、その時代に感染した潜伏患者が高齢化して再燃するケースが増えていることが挙げられる。このような場合、当時の流行株を遺伝多型解析から区別することができないため、遺伝多型解析による一致をそのまま直近の伝播として判断することが難しい。低蔓延地域におけるサーベイランス解析において、疫学的リンクが無いVNTR一致株が一定頻度で存在することは、同型別法の欠点だけでなく、そうした過去の流行株再燃が背景にある可能性が高い。疫学的リンクがある菌株間にゲノム一致性が高いことは、ゲノム比較による菌株異同判定が過去の流行に起因する型別一致株をうまく排除できていることを示唆しており、今後ゲノム技術がスムーズに公衆衛生の現場へと導入されることで、より高精度な伝搬経路の追跡が可能になると考えられる。

結核対策としての分子疫学解析が普及してきた結果、地域的・短期的な分析のみならず、広域かつ中長期的な型別傾向が把握されるようになってきた。その中で、特定の型別を呈する菌株が広域的かつ持続的に分離される状況が明るみになっている。M株はそうした菌株の最も顕著な例の一つであり、大規模な集団感染や排菌患者の長距離移動といった疫学的要因に加えて、菌株側の遺伝的要因による高病原性・高伝播性が懸念されている。本解析では、比較ゲノムによって見いだされた固有の変異情報を

利用すれば、VNTR 型別が変化した場合でも特定の菌株をうまく検出できることを示した。さらに、M株内の微小なバリエーションを利用すれば、VNTR 型別では追跡できない伝搬経路が調査可能になることを示した。結果として、M株内の3系統のうち、2系統が関東・関西・沖縄などで広範に検出されるのに対して、残りの1系統は関西地域でのみ限局的に見いだされており、実際に全国的拡散と地域的拡散を区別して調査するための糸口が示された。今後、臨床株のゲノムデータをサーベイランス解析として地域単位で蓄積することができれば、詳細な伝搬経路推定が可能になるだろう。

伝搬経路の推定による直接的な公衆衛生対策に加え、わが国の菌株状況、とりわけ祖先型北京株の優先性については、他国と異なる状況にあることもあり、調査研究として進展させる必要がある。本課題では、既知の系統分岐情報に基づいて選別された菌株のゲノム情報を集積し、今後の基幹となるデータ取得に注力した。各データの分析はまだ途上であるが、現時点での菌株レパートリーは国内北京株の遺伝的多様性を網羅しており、今後実施される菌株個性解析や SNPs 多型に基づく菌株同定の基盤が構築されたと言える。一方で、本分析で用いた菌株はその由来が関西地区にほぼ限局されており、遺伝系統的には妥当性が高いものの、国内全域を見通した菌株の地理的分散を考慮する上で疑念の余地がある。他の研究プロジェクトで取得されたゲノム情報などを集約し、使いやすい形で提供できるデータベースの構築などを含め、研究プラットフォームの形成は喫緊の課題であると言えるだろう。

E. 結論

次世代シーケンサーの活用による比較ゲノム解析は、結核研究のみならずその対策にも大きな知見をもたらさう。こうした研究展開は、結核低罹患率を迎えた欧米諸国で特に活発に議論されており、わが国においても効率的、戦略的に蓄積していくことが将来的なビジョンとして重要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, Sheen P, Wada T, Taype CA, Shaw MA, Moore DA, Gilman RH. 2012. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. PLoS One. 7(11): e49651.
- 2) Wada T, Maeda S. 2013. Multiplex agarose gel electrophoresis system for variable number of tandem repeats genotyping: Analysis example using *Mycobacterium tuberculosis*. Electrophoresis. 34(8): 1171-1174.
- 3) Nakanishi N, Wada T, Arikawa K, Millet J, Rastogi N, Iwamoto T. 2013. Evolutionary robust SNPs reveal the misclassification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains into sublineages. 2013. Infection, Genetics and Evolution. 16: 174-177.
- 4) Tateishi Y, Tamaru A, Ogura Y, Niki M, Wada T, Yamamoto T, Hirata K, Hayashi T, Matsumoto S. 2013. Whole-Genome

Sequence of the Potentially hypertransmissible multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain OM-V02_005. Genome Announcement. 1(4): e00608-00613.

- 5) De Beer JL, Ködmön C, Van Ingen J, Supply P, Van Soolingen D, Jamieson FB, Bidovec-Stojkovic U, Brown T, Cirillo, DM, Cruz L, Miranda A, Dou HY, Fauville-Dufaux M, Fitzgibbon MM, García De Viedma D, Groenheit R, Haanperä-Heikkinen M, Indra A, Kam KM, Kramer R, Jiang GL, Niemann S, Obrovac M, Rasmussen EM, Refrégier G, Realpe T, Samper S, Sharma MK, Sougakoff W, Stakenas P, Stavrum R, Trenkler J, Wada T, Siame KK, Tafaj S, Cowan L, Sng LH, Seagar AL, Basu I, Rastogi N, Ferro BE, De Matos, F, Kipnis A, Van Soolingen D, Supply P. 2014. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases. 18(5):594-600.
- 6) Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, Yamamoto T. Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. 2015. PLoS ONE. 2015;10(3):e0118495.

2. 学会発表

- 1) 前田伸司, 和田崇之. 反復配列多型法による型別結果比較における問題点

- とその対策. 第 87 回日本結核病学会
総会 2012 年 5 月 広島
- 2) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 林清二, 岩本朋忠, 和田崇之. 半世紀前における結核患者由来病理組織標本からの結核菌 DNA 抽出の試み. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島
 - 3) Wada T, Yoshida S, Iwamoto T, Yamamoto T, Hase A, Kitaichi M, Suzuki K, Tsuyuguchi K. Looking into the past: genetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* from FFPE specimens embedded several decades prior. MEEGID XI: 11th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, October 30 – November 2, 2012, New Orleans, USA.
 - 4) Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, Sheen P, Wada T, Taype CA, Shaw MA, Moore DA, Gilman RH. Genetic diversity of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru compared with that of strains from East Asia. MEEGID XI: 11th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, October 30 – November 2, 2012, New Orleans, USA.
 - 5) Maeda S, Wada T, Naka T, Shibata M, Fujiwara N. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), especially Beijing genotype MTB, in Japan by using the variable-number of tandem repeats (VNTR) and a next generation sequencer (NGS). (NGS). The 5th EMBO meeting 2013, September 21 – September 24, Amsterdam, Netherlands.
 - 6) 飛永祥平, 松本充生, 吉田志緒美, 北市正則, 鈴木克洋, 露口一成, 岡田全司, 林清二, 山本太郎, 和田崇之. 昭和初期における結核菌の薬剤耐性を探る-抗結核薬の変遷とその影響に関する考察. 第 54 回日本熱帯医学会大会 2013 年 10 月 長崎
 - 7) 和田崇之, 山本太郎. わが国における結核分子疫学と伝搬経路推定:結核中蔓延国としての役割について. 第 54 回日本熱帯医学会大会 2013 年 10 月 長崎
 - 8) 和田崇之. 反復配列多型(VNTR) 分析法による結核菌型別—精度管理と考え方, 使い方—. 第 72 回日本公衆衛生学会総会 2013 年 10 月 三重
 - 9) Wada T, Yoshida S, Takata M, Tomita M, Tsuyuguchi K, Yanai T, Yamamoto T. *Mycobacterium kansasii*: its epidemiological background in humans and a case of infection in black bearded Sakis in a zoo. Combined Conference 2013, One Health in Asia Pacific, October 26 – October 27, Singapore, Singapore.
 - 10) Haridy M, Tachikawa Y, Wada T, Yoshida S, Maeda S, Inoue S, Sakai H, Yanai T. Pathological findings of Mycobacteriosis in Japanese forest green tree frogs, *Rhacophorus arboreus*. Combined Conference 2013, One Health

in Asia Pacific, October 26 – October 27,
Singapore, Singapore.

- 11) 和田崇之, 岩本朋忠, 瀬戸順二, 田丸
重貴, 前田伸司, 長谷篤, 山本太郎結
核菌における遺伝型別一致株の比較
ゲノム解析. 第 87 回日本細菌学会総
会 2014 年 3 月 東京
- 12) 和田崇之, 岩本朋忠, 瀬戸順次, 阿彦
忠之, 田丸重貴, 長谷篤, 前田伸司,
山本太郎. M 株の広域的分離の原因究
明—比較ゲノム解析に基づく「結核ゲ
ノム疫学」の導入. 第 89 回日本結核
病学会総会 2014 年 5 月 岐阜
- 13) 和田崇之, 瀬戸順次, 阿彦忠之, 山本
太郎. 低罹患率地域における結核菌臨
床分離株の伝播経路追跡. 第 90 回日
本結核病学会総会 2015 年 3 月 長
崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
(総合) 分担研究報告書

結核菌の病原性と微細形態学的特徴との関連に関する研究

研究分担者 山田博之
公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部 主任研究員

研究要旨

あらゆる生物は環境に適応して生息するためのプログラムを固有の遺伝情報としてDNA上にコードしている。完全に同一な遺伝情報を有するクローン以外の個体は、同種内でも生存に影響を与えない範囲で僅かに異なる遺伝情報を有し、種としての固有性を保ちつつ多様性も実現している。特に細菌などの分裂周期が短い生物では種の存続をはかるため固有性と多様性が巧みに制御されていると考えられる。

一方、近年、同一ゲノムを有する細菌の1細胞観察の研究から、遺伝学的に同一な背景を持つ菌体集団でも遺伝子産物発現(量)に遺伝子そのものによる制御とは別にゆらぎ、多様性が見られることが明らかにされている。これは、ヒトの一卵性双生児において指紋が異なることにより支持される現象である。

結核菌基礎研究の多くは、他の細菌を含む広範な生物学分野の研究と同様に分子生物学的、生化学的手法に頼ることなく行うことは不可能である。しかし、分子生物学的、生化学的手法による分析は、多くの場合、菌体の集団を材料として解析し、様々な遺伝子発現状況や病原関連因子、免疫原性分子の産生量を、多様な菌体から構成される集団の平均値として示すことになる。この分析手法にはいくつかの未確認の前提が存在している。すなわち、

(1) 集団内の個々の菌体はあらゆる点において全て同一であること、(2) 集団内の菌体は全て生菌であること、(3) 集団を構成する菌体数が明確であること、である。そして、最終的にはこれらの前提に基づいて集団を構成する単個菌当りの遺伝子発現量、病原関連因子や免疫原性分子の合成量を計算によって推測することになる。これらの前提が全て想定に基づくものであるため、最終的な結果も推定の域を出ない。

この科学的な不明確性を解消するため、本研究では、結核菌単一菌体の超薄連続切片を透過電子顕微鏡で観察することにより、単一菌体の基礎形態情報を獲得し、菌体のサイズ、表面積、体積と細胞質内に存在するリボソームを透過電子顕微鏡像で直接計測するアプローチを選択した。このアプローチは上述の分子生物学的、生化学的手法とまったく逆のアプローチで、多様な単一菌体の表現型を基本情報として菌の集団を推測するもので、単一菌体の情報が正確であれば集団の表現型も正確に推測可能である。すなわち前者は微分的に高次元の集団が示す特徴から全ての菌体が同一であるという前提で単一菌体の特徴を推測するアプローチであるのに対し、後者は多様な単一菌体の特徴から積分的により高次元の集団の特徴をより正確に推測するアプローチであると考えられる。

本研究では、急速凍結置換固定法で調製した結核菌標準菌株の超薄連続切片観察により、一菌体ごとの全体像を高分解能で可視化し、菌体構成成分の実測による定量を行い、菌体ごとの類似性、共通性とともによどのような多様性が見られるかを検討する。将来的には菌体の高分解能三次元構築を目指す。

また、走査型電子顕微鏡を用いて固形培地に生育した非結核性抗酸菌コロニーの形態観察を行ったが、単個菌の形態および病原性とコロニー性状との関連を検討するために、より生きた状態に近い形態が観察出来る氷包埋サンプルをCryo-透過電子顕微鏡で観察し、菌種ごとの標準形態を計測する。

将来、遺伝子変異株の表現型観察を行うにあたり、可視化を伴った標準形態計測データとして利用可能なアーカイブ構築を最終的な目的とする。

A. 研究目的

あらゆる生物は環境に適応して生息するためのプログラムを固有の遺伝情報としてDNA上にコードしている。完全に同一な遺伝情報を有するクローン以外の個体は、同種内でも生存に影響を与えない範囲で僅かに異なる遺伝情報を有し、種としての固有性を保ちつつ多様性も実現している。特に細菌などの分裂周期が短い生物では種の存続をはかるため固有性と多様性が巧みに制御されていると考えられる。

一方、近年、同一ゲノムを有する細菌の1細胞観察の研究から、遺伝学的に同一な背景を持つ菌体集団でも遺伝子産物発現(量)に遺伝子そのものによる制御とは別にゆらぎ、多様性が見られることが明らかにされている。これは、ヒトの一卵性双生児において指紋が異なることにより支持される現象である。

結核菌基礎研究の多くは、他の細菌を含む広範な生物学分野の研究と同様に分子生物学的、生化学的手法に頼ることなく行う

ことは不可能である。しかし、分子生物学的、生化学的手法による分析は、多くの場合、菌体の集団を材料として解析し、様々な遺伝子発現状況や病原関連因子、免疫原性分子の産生量を多様な菌体から構成される集団の平均値として提示することになる。この分析手法にはいくつかの未確認の前提が存在している。すなわち、(1) 集団内の個々の菌体はあらゆる点において全て同一であること、(2) 集団内の菌体は全て生菌であること、(3) 集団を構成する菌体数は明確であること。そして、最終的にはこれらの前提に基づいて集団を構成する単個菌当りの遺伝子発現量、病原関連因子や免疫原性分子の合成量を計算によって推測することになる。ただ、これらの前提が全て想定に基づくものであるため、最終的な結果も推定の域を出ない。むしろ、DNA array、protein arrayなどの網羅的発現の分析結果は、均一であると想定された膨大な数の多様な細胞で構成される集団からのデータを単純に平均化しているため、極めて複雑で正確な解釈が

困難になっている。

この科学的な複雑性、不明確性を解消するため、本研究では、結核菌単一菌体の超薄連続切片を透過電子顕微鏡で観察することにより、単一菌体の基礎形態情報を獲得し、菌体のサイズ、表面積、体積と細胞質内に存在するリボソームを透過電子顕微鏡像で直接計測するアプローチを選択した。このアプローチは上述の分子生物学的、生化学的手法とまったく逆のアプローチで、多様な単一菌体の表現型を基本情報として菌の集団を推測するもので、単一菌体の情報が正確であれば集団の表現型も正確に推測可能である。すなわち前者は微分的に高次元の集団から全ての菌体が同一であるという前提で単一菌体を推測するアプローチであるのに対し、後者は多様な単一菌体から積分的により高次元の集団を推測するアプローチであると考えられる。

本研究では、急速凍結置換固定法で調製した結核菌標準菌株の超薄連続切片観察により、一菌体ごとの全体像を高分解能で可視化し、菌体構成成分の実測による定量を行い、菌体ごとの類似性、共通性とともにもどのような多様性が見られるかを検討する。将来的には菌体の高分解能三次元構築を目指す。

また、走査型電子顕微鏡を用いて固形培地に生育した非結核性抗酸菌コロニーの形態観察を行ったが、単個菌の形態および病原性とコロニー性状との関連を検討するた

めに、より生きた状態に近い形態が観察出来る氷包埋サンプルをCryo-透過電子顕微鏡で観察し、菌種ごとの標準形態を計測する。将来、遺伝子変異株の表現型観察を行うにあたり、可視化を伴った標準形態計測データとして利用可能なアーカイブ構築を最終的な目的とする。

また、結核菌コロニーの特徴であるコード形成を走査型電子顕微鏡で観察し、非結核性抗酸菌コロニーと比較して、病原性との関連を検討する。更に、結核菌のより正確な形態計測データを取得するために最も適した標本調製方法を検討するため、同じ菌をCryo-TEM、通常の走査電子顕微鏡、Negative染色による透過型電子顕微鏡観察で形態計測し比較検討する。

最後に、急速凍結法の改良法として、glutaraldehydeで予め固定した菌をリン酸緩衝液で洗浄してから急速凍結する調製法の有用性について検討する。

B. 研究方法

【結核菌単一菌体の超薄連続切片の透過電子顕微鏡観察】

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv株(ATCC 27294)をMiddlebrook 7H9液体培地(OADC, 0.05 % Tween 80添加)で約2週間培養し、遠心にて濃縮した沈渣約1 µlを親水化処理した銅製単孔グリッドに滴下し、もう1枚の単孔グリッドで挟み、液体窒素で冷却した液体プロパンに投入して急速凍結

置換標本（サンドイッチ法）を作製した。
-85 °C 2%オスミウム・アセトン (OsO₄) に
より置換固定し、徐々に室温に戻して、純
アセトンで洗浄後、Spurr樹脂に包埋、重合
した。Reichert Ultracut Eで厚さ55 nmの超薄
連続切片を作製し、Maxtaform HF49単孔グ
リッドに載せ、フォルムバール支持膜で裏
打ちした。酢酸ウランと鉛で電子染色し、
JEOL JEM1230 透過電子顕微鏡で観察した
(図1)。

グリッド12枚、総計500枚以上の超薄連
続切片を作製し(図2)、そのうち、観察に適
した約250枚の超薄連続切片内に存在する
菌体を2,000~2,500倍の低倍率で観察した
(図3)。当初、超薄連続切片作製において
菌体の縦断面を連続して観察できれば少な
い枚数の切片観察で結果を出せると考えた
が、図4に示すように縦断面では横断面と比
較して、超薄切片から菌体が抜落ちる頻度
が高いため、横断面を観察した。その中か
ら超薄連続切片間で末端から末端まで菌体
が保存された5菌を選択した(図5)。各菌
体はそれぞれ24枚、36枚、69枚、55枚、63枚の
超薄連続切片に両末端間が包含され、各切
片内の菌体横断面を30,000倍と60,000また
は80,000倍で観察、写真撮影した。

【固形培地上コロニーのコード形成観察】
結核菌H37Rv株及び非結核性抗酸菌の*M.*
abscessus (ATCC 23006)、*M. aurum*
(ATCC 23366)、*M. austroafricanum* (ATCC

33464)、*M. avium* (ATCC 26291)、*M. celatum*
type I (ATCC 51130)、*M. celatum* type II
(ATCC 51131)、*M. chelonae* (ATCC 35749)、
M. fallax (ATCC 35219)、*M. farcinogenes*
(ATCC 35753)、*M. fortuitum* subsp. *fortuitum*
(ATCC 11440)、*M. gallinarum* (ATCC 19710)、
M. gastris (ATCC 15754)、*M. gilvum* (ATCC
43909)、*M. gordonae* (ATCC 14470)、*M.*
haemophilum (ATCC 29548)、*M. interjectum*
(ATCC 51457)、*M. intermedium* (ATCC
51848)、*M. intracellulare* (ATCC 13950)、*M.*
malmoense (ATCC 29571)、*M. marinum*
(ATCC 927)、*M. neworleansense* (ATCC
49404)、*M. nonchromogenicum* (ATCC
19530)、*M. parafortuitum* (ATCC 19686)、
M. peregrinum (ATCC 14467)、*M. phlei*
(ATCC 11758)、*M. pulveris* (ATCC 35154)、
M. scrofulaceum (ATCC 19981)、*M.*
smegmatis (ATCC 19420)、*M. szulgai*
(ATCC 35799)、*M. terrae* (ATCC 15755)、
M. thermoresistibile (ATCC 19527)、*M.*
triviale (ATCC 23292)、*M. ulcerans* (ATCC
19423)、*M. xenopi* (ATCC 19250)のATCC
株を2%小川培地または7H10で培養し発育
したコロニーを2.5 % glutaraldehyde (in 100
mM, リン酸緩衝液 (PB)、pH 7.4)で固定、PB
で洗浄後、1 % OsO₄で後固定(4°C、1時間)、
エタノール上昇系列で脱水した。純エタ
ノールで脱水後、純エタノール：*t*-butyl
alcoholの1:1混合液で処理し、純*t*-butyl
alcoholで置換した後、凍結乾燥、金蒸着し

て走査電子顕微鏡JEOL JSM-5800で観察した(図13)。

【抗酸菌の氷包埋サンプルの観察】

上記固形培地上でのコード形成を観察した非結核性抗酸菌の一部について氷包埋サンプルの透過電子顕微鏡観察を行った。観察菌は*M. abscessus* (ATCC 23006), *M. aurum* (ATCC 23366), *M. austroafricanum* (ATCC 33464), *M. avium* (ATCC 26291), *M. celatum* type I (ATCC 51130), *M. celatum* type II (ATCC 51131), *M. chelonae* (ATCC 35749), *M. chitae* (ATCC 19627), *M. farcinogenes* (ATCC 35753), *M. fortuitum* type I (ATCC 6841), *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (ATCC 11440), *M. gilvum* (ATCC 43909), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. marinum* (ATCC 927), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. xenopi* (ATCC 19250)のATCC株および結核菌H37Rv株である。7H9液体培地で培養し、十分に発育した菌液のペレットに、2.5 % glutaraldehyde (GA, in 100 mM, リン酸緩衝液 (PB)、pH 7.4)を1 ml加え、4°Cで一晩固定した。PBで洗浄後、Quantifoilグリッド上に上記沈渣を付着させ自然科学研究機構生理学研究所 岡崎統合バイオサイエンスセンター内のFEI Vitrobotにて急速凍結、氷包埋し、Cryo-透過電子顕微鏡 (JEOL JEM-2200FS)で観察した。形態計測は撮影した写真ファイルをFiji (ImageJ)ソフトウェアにて行った(図26)。

【サンプル調製法による菌体形態計測値の比較】結核菌CDC1551株をOADCおよび0.05% Tween 80添加Middlebrook 7H9培地で約2週間培養した。2.5%GA(0.1 M PB, pH7.4)で固定後、PBで洗浄した沈渣を観察標本として用いた。観察方法:(1)Quantifoilグリッド上に上記沈渣を付着させFEI Vitrobotにて急速凍結した氷包埋標本をJEOL JEM-3100FFC Cryo-TEM (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)にて観察、(2)上記沈渣を親水化した支持膜を張ったグリッドに付着させ、酢酸ウランを用いてネガティブ染色しJEM-1230透過電子顕微鏡にて観察、(3)上記沈渣を1%四酸化オスミウムで固定後、エタノール脱水、*t*-butyl alcoholによる凍結乾燥、金蒸着を行い、JSM-5800走査電子顕微鏡にて観察し、写真撮影した。上記3法で得られた観察像を元にImageJ (Fiji)ソフトウェアを用いて直径、菌体長、aspect ratioを計測し、比較検討した(図31)。

【GA固定後に急速凍結法を施行した結核菌の透過電顕像観察】材料:0.05% Tween 80添加7H9で培養し充分増殖した結核菌*M. tuberculosis* H37Rv株。方法:上記結核菌液を約1 ml分取し、microcentrifuge tubeを用いて、約10,000gにて遠心した沈渣に2.5% GA (0.1 M PB, pH 7.4)を約1 ml加えvortex後、4°Cで1時間以上固定し、遠心および上記PBによる洗浄を3回行った。(1)この遠心沈渣の1

ul以下を急速凍結法サンドイッチ法により急速凍結し、2%OsO₄-アセトン溶液を用いて-85°Cで凍結置換固定した標本、(2)GA固定、PB洗浄後、通常の化学固定と同様に、1%OsO₄で4°Cで1時間後固定し、再度PBにて洗浄後、急速凍結し、-85°Cの純アセトンで処理する標本、(3)(2)の標本を急速凍結せずに-85°Cの純アセトンで処理した標本を、徐々に室温に戻してSpurr樹脂に包埋した。超薄切片を電子染色してJEOL JEM-1230にて観察した(図34)。

C. 研究結果

【結核菌超薄連続切片の透過電子顕微鏡観察】5菌体の菌体中央部付近の横断面を図5に示す。また、個々の菌体の超薄連続切片像、計測値及び菌体模式図を図6～図12および表1～3に示した。

なお、菌体2と菌体3は連続した複数のグリッドに超薄連続切片が分かれて積載されており、グリッドが替わる際に数枚の超薄連続切片がグリッド銅版上に積載されたため、いくつかの断面が観察できていない可能性がある。したがって、これらの2菌体の長さ、表面積、断面積、リボソーム数は図11、12に示す値より多くなる可能性がある。

【固形培地上コロニーのコード形成観察】抗酸菌コロニー内の菌塊の形態に基づいて4つの群に分けた。

I:結核菌のコード形成と類似した3次元の強い湾曲を伴う菌塊構造を示す3菌種

(図14, 15)

II: Iより菌塊の密集に規則性が乏しいが時にコード形成と類似した構造を形成する9菌(図16, 17)

III:個々の菌体の配列は規則性に乏しいが平面的なコード形成様構造を形成する7菌種(図18, 19)

IV:殆どの菌が不規則に分布し統一された構造を形成しない15菌種(図20, 21)

各グループの平均幅(μm)はそれぞれ 0.41 ± 0.16 , 0.45 ± 0.05 , 0.38 ± 0.04 , 0.40 ± 0.06 , また平均菌体長(μm)はそれぞれ 1.59 ± 0.48 , 1.93 ± 1.01 , 1.94 ± 0.70 , 2.30 ± 1.65 で、Aspect ratioはそれぞれ、 4.16 ± 1.20 , 4.26 ± 1.91 , 5.23 ± 2.04 , 6.14 ± 4.94 であったが、群間及び結核菌(それぞれ、 0.41 ± 0.06 , 2.33 ± 0.29 , 5.65 ± 0.92)との比較でいずれも有意差はなかった(図22, 23)。また、病原性菌と非病原性菌の比較ではいずれも有意差はなかったが、迅速発育菌と遅発育菌の比較では、遅発育菌の菌体長が有意に長く($p < 0.05$)、aspect ratioも遅発育菌が有意に大きかった($p < 0.005$) (図24, 25)。

【抗酸菌の氷包埋サンプルの観察】今年度観察した菌および昨年観察した結核菌H37Rv株及び*M. aurum* (ATCC 23366), *M. austroafricanum* (ATCC 33464), *M. celatum* type I (ATCC 51130), *M. celatum* type II (ATCC 51131), *M. chitae* (ATCC 19627), *M. farcinogenes* (ATCC 35753)のCryo-透過電子

顕微鏡像と走査電子顕微鏡像、計測データをそれぞれ図27~29に示す（計測データは *M. farcinogenes* は除外）。

【サンプル調製法による菌体形態計測値の比較】 Cryo-TEM、ネガティブ染色、SEM 観察による直径はそれぞれ $0.54 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 、 $0.53 \pm 0.08 \mu\text{m}$ 、 $0.35 \pm 0.05 \mu\text{m}$ 、菌体長はそれぞれ、 $2.87 \pm 0.61 \mu\text{m}$ 、 $2.35 \pm 0.60 \mu\text{m}$ 、 $1.91 \pm 0.35 \mu\text{m}$ 、aspect ratio はそれぞれ、 5.36 ± 1.41 、 4.51 ± 1.25 、 5.59 ± 1.14 であった。直径に関してはSEM観察の値がCryo-TEM、ネガティブ染色観察の値と比較して有意に小さく、菌体長に関してはCryo-TEM観察の値が他の2法と比較して有意に長く、SEM観察値はネガティブ染色法と比較して有意に小さかった。ネガティブ染色とSEM観察では菌体の収縮が示唆され、Cryo-透過電子顕微鏡観察値が標準データとしての信頼性が高いと考えられた（図32, 33）。

【GA固定後に急速凍結法を施行した結核菌の透過電顕像観察】 GA>RFSで作製した結核菌標本は、CF標本と比較して本来のRFS標本に匹敵する微細構造の保存が認められた。即ち細胞質は電子密度が一様でその中に直径約20 nmのリボソームが充満し、DNAと思われる繊維状の構造も観察された。一部、periplasm領域の拡がりやCF標本でしばしば観察される細胞質内の膜構造を認める細胞もあった。また、GA固定後、1%OsO₄

(4°C) で後固定する通常の化学固定を行った後、急速凍結して-85°Cの純アセトンで処理した標本及び、化学固定後急速凍結せずに-85°Cの純アセトンで処理した標本は化学固定標本と同等の菌体像を呈した（図35）。

D. 考察

【結核菌超薄連続切片の透過電子顕微鏡観察】 急速凍結法で調製した結核菌超薄連続切片作製、透過電子顕微鏡観察を行った。急速凍結法により調製された樹脂包埋結核菌の観察は既にいくつか報告があるが、超薄連続切片の観察はこれまで例がない。また、広く微生物を対象としても、真核生物である酵母で超薄連続切片による透過電子顕微鏡観察の報告はあるが細菌を対象とした報告はこれまで例がない。

今回の研究は、超薄連続切片の観察だけではなく、これまで想定や計算で算出されてきた菌体構造について、一連の観察により実測値を計測し、結核菌の様々な研究領域に有用な基礎データを提供しようと考えられる。

5菌体の計測データは、表1、図11に示すごとく平均菌体直径、細胞質直径はそれぞれ $0.345 \mu\text{m}$ 、 $0.297 \mu\text{m}$ で菌体ごとの差はほとんど見られなかったが、その他の計測値は菌体ごとに差が見られた。

菌体長に関しては、菌体1と菌体2が $2 \mu\text{m}$ 以下であるのに対して、他の3菌体は $3 \mu\text{m}$ を超えていた。同じ連続切片内で縦断面を観

察できた菌体で細胞分裂像を示すものはいくつか見られたが、3 μm以上の菌体長を示した3菌体の横断面で細胞分裂を示す像は認められなかった。また、後述のCryo-透過電子顕微鏡観察では6 μmを超える菌体長を持つ菌が観察されており、超薄連続切片観察では長い菌ほど超薄連続切片の作製、観察が難しく、今回観察した菌体より長い菌が存在していることが示唆された。

また、菌体内リボソームに関しては、4菌体ではリボソーム数が850から約2,000計数されたが、1菌体（菌体2）ではわずか49であった（図12、表3）。この菌は菌体3の極く近傍に存在した菌であり（図5）、リボソーム数の大きな違いがサンプル調製の過程で生じたアーティファクトであるとは考えにくい。また、菌体2の細胞質は全体的に電子密度が高く、この菌体像はしばしば死菌に見られる像であり、菌体2は急速凍結時に既に死菌であったことが示唆される。

さらに、単位体積あたりのリボソーム密度は菌体3を除いて約600/0.1 flであった（表2、3、図12）。菌体3は約1,000/0.1 flであり、他の3つの菌とは代謝状態が異なる可能性もある。即ち、同一の遺伝的背景を持つ菌集団内にリボソーム数を含むパラメーターに多様性を持つ菌が存在することを示唆している。このことは、実際に宿主に感染した遺伝学的に同一な単クローン由来の菌が、宿主細胞内外で分裂、増殖、生存する際、ゲノム情報の変異の有無に関わらず個々の

菌における様々な菌体構成成分の発現に多様性を示すことを示唆している。

リボソーム密度に関して考察すべきもう一つの大きな問題は、結核菌のリボソームを標的とする薬剤とその薬剤に対する耐性獲得に関するものである。一般に結核菌の薬剤耐性は、標的分子をコードする遺伝子の突然変異により、標的分子の構造変化により薬剤が標的に結合できなくなることで説明されることが多い。

たとえば、ストレプトマイシン(C₂₁H₃₉N₇O₁₂; MW : 581.57 Da, STR)は結核菌の30Sリボソームサブユニット内に存在する16S rRNAの結合部位に入り込んで蛋白質合成を阻害すると考えられている。STR耐性機序が全て解明されているわけではないが、16S rRNA遺伝子をコードする*rrs*遺伝子、リボソーム蛋白質S12をコードする*rpsL*遺伝子、rRNAに特異的なメチルトランスフェラーゼ7-メチルグアノシン(m7G)をコードする*gidB*の突然変異が耐性の表現系を与えることが明らかになっている。しかし、全てのSTR耐性をこれらの遺伝子の突然変異で説明できるわけではない。

バクtonディッキンソン社の結核菌薬剤耐性検査MGIT 960に用いられるSTRの薬剤濃度は1.0 μg/mlである²³⁾。これを上記のSTRの分子量とアボガドロ数をもとに計算すると、この薬剤濃度のSTR溶液中には0.1 flあたり約100個の薬剤分子が存在することになる。もし結核菌がこの濃度のSTRが存在

する環境に置かれ、全てのSTR分子が自由に結核菌の細胞質に出入りできるすると、菌体内には0.1 flあたり約700個の標的分子リボソームが存在するので、約1/7のリボソームと結合できることになる。この結合により結核菌が蛋白質合成を阻害されて殺菌されるのか、あるいは時間経過とともにより多くのSTR分子が菌体内に入り込んでより多くのリボソームと結合して殺菌されるのか、あるいはまた、より少数のリボソームとSTRの結合により、迅速に殺菌されるのかについてはどこにも述べられていない。これは、これまで1菌体当たりの細胞質内リボソーム密度が不明であったため、菌体内に存在する標的の何%が薬剤と結合すると殺菌されるのかが不明であるためである。一般に病原細菌の抗生物質耐性獲得は突然変異による標的分子や修飾分子の構造変化や欠損により説明されることが多いが、薬剤分子と標的分子の数的な割合の変化により耐性が生じる可能性についても考察される必要があると思われる。また、上記のSTR耐性と関連した突然変異がSTR分子と標的分子の結合を阻害するのではなく、標的分子の正常な代謝を阻害して、細胞質内に標的分子が蓄積され、最終的に有効な薬剤濃度に対する標的分子数が過剰になるため完全な殺菌ができず耐性という表現型を呈する可能性が無いのかという考察も必要と考える。何れにせよ、将来、抗生物質と標的分子の相互作用の場を可視化することができ

れば、薬剤の作用機序と耐性獲得に関する正確かつ詳細な検討が可能になると考えられる。

【固形培地上コロニーのコード形成観察】結核菌のコード形成と最も類似した菌塊構造を示したIグループに属する*M. abscessus*, *M. gallinarum*, *M. haemophilum*はいずれも病原性が報告されている菌であったが、ほとんどコード形成様の菌塊構造を示さなかったVIグループに分類された菌種の中にも*M. avium*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*など病原性が報告されている菌種もあり、コード形成を誘導する菌の特徴が何に由来するのか、更に検討を進めたい。

【抗酸菌の氷包埋サンプルのCryo-透過電子顕微鏡観察】菌体直径は16種の平均±SDが $0.577 \pm 0.087 \mu\text{m}$ で種間での差がほとんどないことが明らかになった。一方、菌体長は種ごとの観察菌体平均値で最も短かったのが*M. aurum*の $1.43 \mu\text{m}$ 、最も長かったのが*M. celatum* IIの $3.424 \mu\text{m}$ で、その差は2倍以上であった。種間で直径が近似しつつ菌体長に多様性が見られることから、菌体長が短い種では極めて球菌に近い菌体形態をとることが明らかになった(図28, 29)。特に*M. aurum*, *M. chitae*, *M. gilvum*は平均真円度(circularity)が0.8を超え、かつその標準偏差が0.1以下でかなり球菌に近い形態的特徴を持つことが明らかになった。

コード形成に関しては菌体長が結核菌と

近似した種のコロニー内の菌の配置は類似している傾向が見られたが、それらの種のコロニーでは単個菌の配置が平面的で、結核菌のコードはより立体的であるように思われた（図30）。また、氷包埋サンプルのCryo-透過電子顕微鏡観察での菌体直径と先述の超薄連続切片で計測された菌体直径を比較すると、超薄連続切片での測定値は約60%であり、樹脂包埋、重合及びそれ以前の脱水で菌体が収縮している可能性が示唆された（表1、図11、図28）。

【サンプル調製法による菌体形態計測値の比較】ネガティブ染色と走査電子顕微鏡観察では菌体の収縮が示唆され、Cryo-透過電子顕微鏡観察値が標準データとしての信頼性が高いと考えられたが、Cryo-透過電子顕微鏡は一般的な装置ではないため、ネガティブ染色標本観察による計測データを参考値として利用することも考慮されるべきである（図32、図33）。

【GA固定後に急速凍結法を施行した結核菌の透過電子顕微鏡観察】今回のGA>RFS処理標本の電顕像は、GA固定せずに急速凍結した標本と同等で、GAによる前固定が、その後の急速凍結と液体窒素温度 $\sim -80^{\circ}\text{C}$ における2%OsO₄-アセトン凍結置換固定を妨げず、良好な透過電子顕微鏡像を得られることを証明するものである。更に、GAだけでなく4°Cでの1%OsO₄固定（化学固定）

を行った後でRFSした標本作製し、電顕像を観察したが、この標本は従来の化学固定標本と同等の菌体構造を示した。これらの結果はRFSによる結核菌微細構造の保存は、GAによる前固定により阻害されないことおよび超低温での2%OsO₄-アセトンによる置換固定が極めて重要であり、アセトンによる低温置換だけでは良好な微細構造の保存は困難であることを示している。

今回試行したRFSの変法は、培養不能な菌や、その場でRFS処理を行わず輸送が必要な多剤耐性菌のRFS-透過電子顕微鏡標本作製に有用であると考えられた。

E. 結論

結核菌及び非結核性抗酸菌の電子顕微鏡観察及び標本調製法の改良を行った。これらの菌が示す微細構造を電子顕微鏡を用いて可視化して解析することは、菌の基本的な特徴を理解する上で極めて重要であり、標準菌株を用いて得られたこれらのデータは、将来様々な変異株での表現型の研究において対照となる基本データとして極めて重要であると考えられる。

急速凍結法で調製した結核菌の樹脂包埋超薄連続切片の透過電子顕微鏡観察では、菌体内部微細構造を含む形態計測を行い、Cryo-透過電子顕微鏡でより生きた状態に近い氷包埋した結核菌の形態計測を行った。いずれの計測でも菌体直径はほぼ近似していたが菌体長には多様性があった。

また、今回の検討では1菌体当たり最大2,000をわずかに超えるリボソームを有する菌体が2菌体あった。これらの菌体は菌体長が他の3菌体より長く、より長い菌体を観察すれば、より多いリボソームを有する菌体が見つかる可能性はある。しかし、単位体積当りのリボソーム密度は3菌体で約600/0.1 flで、1菌体で約1,000/0.1 flであった。これら4菌体の平均リボソーム密度は約700/0.1 flであった。したがって、今回観察した菌よりも菌体長が長い菌のリボソームを定量した場合、総リボソーム数に多様性が見られる可能性はあるが、今回のデータと大きく変わる可能性は低いと考えられる。

Cryo-透過電子顕微鏡観察では菌体幅が超薄連続切片の透過電子顕微鏡観察で得られた計測値の1.6倍ほどあり、樹脂包埋標本で収縮が起きている可能性が示唆された。

コード形成に関しては走査電子顕微鏡とCryo-透過電子顕微鏡観察結果から菌体長が結核菌と近似した種のコロニー内の菌の配置は類似しているが単個菌の配置が平面的で、結核菌のコードはより立体的であるように思われた。

多くの分子生物学的、生化学的な手法は高次元の集団が示す特徴から、微分的に集団を構成する単一菌体の特徴を推測するアプローチである。この場合、集団を構成する単一菌体は全て同一であるという前提に基づいている。これに対し、これまでに記述した今回の電子顕微鏡を用いた一連の観察は、

多様な単一菌体が示す特徴からそれらの菌体が構成する高次元の集団の特徴を積分的により正確に推測するアプローチであり、同一の遺伝学的背景を持つクローンを同一条件で培養した場合でも、集団内にエピジェネティックに多様性が生じる可能性を理解した上で、集団を推測することの重要性を示唆するものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada H, Bhatt A, Danev R, Fujiwara N, Maeda S, Mitarai S, Chikamatsu K, Aono A, Nitta K, Jacobs WR Jr, Nagayama K. Non-acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis* $\Delta kasB$ mutant correlates with the cell envelope electron density. *Tuberculosis*. 2012. 92:351-357.
2. Mitarai S, Karinaga R, Yamada H, Mizuno K, Chikamatsu K, Aono A, Sugamoto T, Hatano T. TRICORE, a novel bead-based specimen concentration method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Microbiol. Methods*. 2012. 90:152-155
3. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Mitarai S. Evaluation of Genotype MTBDRsl for testing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to fluoroquinolone, aminoglycoside, and ethambutol. *Kekkaku*. 2012. 87: 641-647.
4. 青野昭男、近松絹代、山田博之、村田正

- 太、結城 篤、三澤成毅、小栗豊子、御手洗 聡 抗酸菌塗抹検査外部精度評価の試み 日本臨床微生物学雑誌 2012. 22:279-283.
5. 山田博之. 電子顕微鏡観察で可視化される結核菌の素顔。顕微鏡、2013. 48; 51-56.
6. Yamada H, Chikamatsu K, Aono A, Mitarai S. Pre-fixation of virulent *Mycobacterium tuberculosis* with glutaraldehyde preserves exquisite ultrastructure on transmission electron microscopy through cryofixation and freeze-substitution with osmium-acetone at ultralow temperature. J. Microbiol. Methods. 2014. 96; 50-55.
7. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Sugamoto T, Kato T, Kazumi Y, Tamai K, Yanagisawa H, Mitarai S. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. BMC Infect. Dis. 2014. 14; 54.
8. Hoshino A, Hanada S, Yamada H, Mii S, Takahashi M, Mitarai S, Yamamoto K, Manome Y. *Mycobacterium tuberculosis* escapes from the phagosomes of infected human osteoclasts reprograms osteoclast development via dysregulation of cytokines and chemokines. Pathogens and disease. 2014. 70; 28-39.
9. Aono A, Chikamatsu K, Yamada H, Kato T, Mitarai S. Association between *pncA* gene mutations, pyrazinamidase activity, and pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 2014. 58: 4928-4930.
10. Nishiyama H, Aono A, Sugamoto T, Mizuno K, Chikamatsu K, Yamada H, Mitarai S. Optimization of the microscopic observation drug susceptibility assay for four first-line drugs using *Mycobacterium tuberculosis* reference strains and clinical isolates. J. Microbiol. Methods. 2014. 101: 44-48.
11. Yamada H, Yamaguchi M, Chikamatsu K, Aono A, Mitarai S. Structome analysis of virulent *Mycobacterium tuberculosis*, which survives with only 700 ribosomes per 0.1 fl of cytoplasm. PLoS One. 2015. 10:e0117109.
2. 学会発表
1. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗 聡. Glutaraldehyde固定後に急速凍結置換固定した結核菌標本の透過電顕観察 第87回日本結核病学会総会. 2012/5/10~11 (広島)
2. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗 聡. 固形培地で生育した抗酸菌コロニーの走査型電子顕微鏡観察日本顕微鏡学会 第68回学術講演会 2012/5/16~18. (茨城)
3. Yamada H., Chikamatsu K., Aono A., Mitarai S. Transmission electron microscopy sample preparation by rapid freeze-substitution of glutaraldehyde-fixed tubercle bacilli provides excellent ultrastructure compared to the samples prepared by conventional chemical

- fixation. UltraPath XVI. 2012/8/5~9. (Regensburg, Germany)
4. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. Glutaraldehydeで固定した結核菌の急速凍結置換標本の透過電顕観察 第44回日本臨床分子形態学会、2012/9/28~29. (高知)
5. 山田博之、前田伸司、近松絹代、青野昭男、御手洗聡、永山國昭. 電子顕微鏡観察による結核菌形態計測データの比較 日本顕微鏡学会第37回関東支部講演会. 2013/3/6. (東京)
6. 山田博之、前田伸司、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. 電子顕微鏡を用いた結核菌の形態計測標準データの試行 第88回日本結核病学会総会、2013/3/28~29. (千葉)
7. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. 急速凍結置換固定結核菌の超薄連続切片による透過電子顕微鏡観察. 日本顕微鏡学会第69回学術講演会. 2013/5/20~22 (大阪)
8. Yamada H, Chikamatsu K, Aono A, Mitarai, S. Quantitative structural analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cells by rapid freeze- substitution and serial ultra-thin sectioning. FEMS-2013, 2013/7/21~25, (Leipzig, Germany)
9. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. 急速凍結置換固定した結核菌樹脂包埋標本の連続超薄切片を透過電顕観察して得られた形態計測データ. 第45回日本臨床分子形態学会学術集会・総会. 2013/9/13~14 (福岡)
10. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. Analog vs. Digital. ~超薄(連続)切片、FIB-SEM, SBF-SEM像の比較~ 平成25年度 生理学研究所研究会. 2013/11/13~14 (愛知)
11. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡. 結核菌急速凍結置換固定標本の連続超薄連続切片による定量構造解析. 日本顕微鏡学会第57回シンポジウム. 2013/11/15~16 (愛知)
12. 山田博之、加藤朋子、御手洗聡. 急速凍結置換固定した結核菌超薄連続切片の透過型電子顕微鏡観察による定量構造解析. 日本細菌学会総会. 2014/3/26~28 (東京)
13. 山田博之、近松絹代、青野昭男、加藤朋子、御手洗聡. 急速凍結法で調製した結核菌超薄連続切片のストラクチャー解析. 日本顕微鏡学会第70回学術講演会. 2014/5/13~15 (千葉)
14. 山田博之、山口正視、清水公德、川本進、村山琮明、御手洗聡. 急速凍結法と超薄連続切片観察による大腸菌ストラクチャー解析の試み. 日本顕微鏡学会第70回学術講演会. 2014/5/13~15 (千葉)
15. Hiroyuki Yamada, Kinuyo Chikamatsu, Akio Aono, Satoshi Mitarai, Masashi Yamaguchi. Structome analysis of rapid freeze-substituted *Mycobacterium tuberculosis* cells on serial ultra-thin sections by transmission electron microscope.

FEBS-EMBO 2014, 2014/8/30 ~ /9/4, (Paris, France).

16. 山田博之、近松絹代、青野昭男、御手洗聡、山口正視. 急速凍結置換固定結核菌の連続超薄切片によるストラクチャー解析. 第46回日本臨床分子形態学会学術集会・総会.2014/10/17~18 (東京)

17. 山田博之. 急速凍結法と連続超薄切片による結核菌単一菌体の構造解析から得られた新知見.日本顕微鏡学会 微生物の超微形態解析研究部会主催研究会.「単一菌体の時間的, 空間的連続観察から得られる新知見」2014/11/21 (東京)

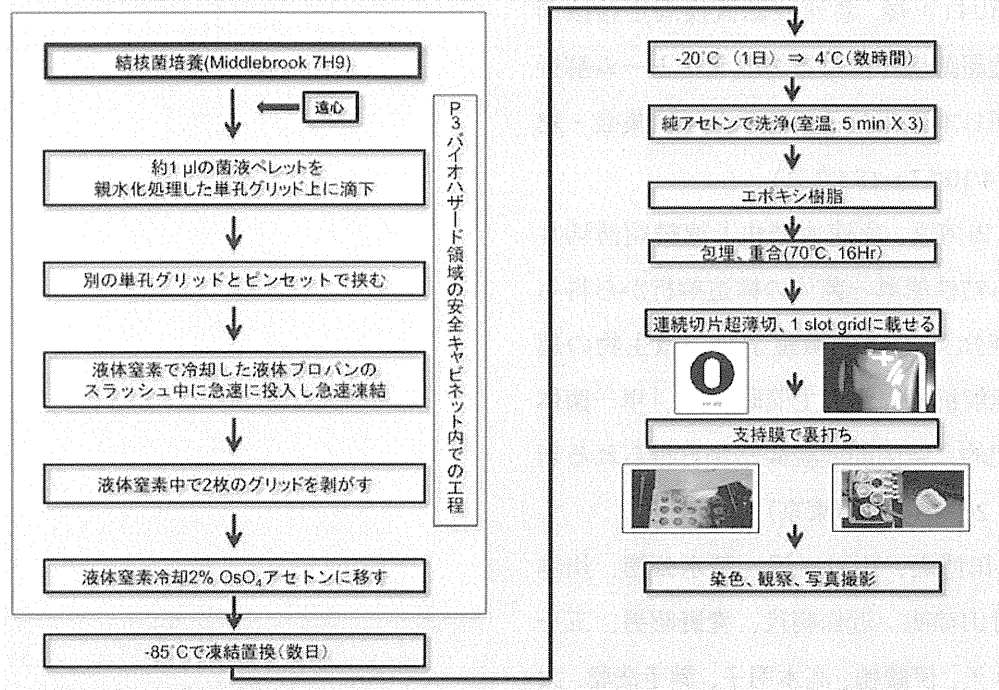
18. 山田博之、山口正視、清水公德、川本進、村山琮明、近松絹代、青野昭男、五十嵐ゆり子、伊麗娜、高木明子、御手洗聡. 大腸菌ストラクチャー解析の試み.第39回日本顕微鏡学会関東支部講演会. 2015/2/28 (東京)

19. 山田博之、山口正視、清水公德、川本進、村山琮明、高木明子、御手洗聡. 急速凍結置換固定法による大腸菌ストラクチャー解析.第88回日本細菌学会総会.2015/3/26~28 (岐阜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

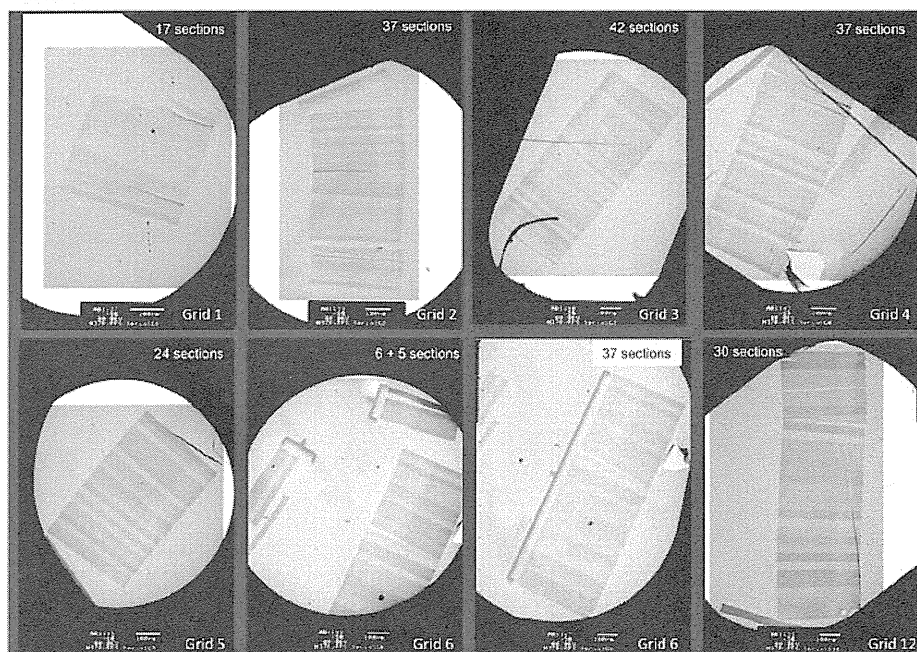
材 料 と 方 法



厚生科学研究事業(12)年度 研究報告書

図 1 . 急速凍結法による結核菌超薄連続切片作製方法

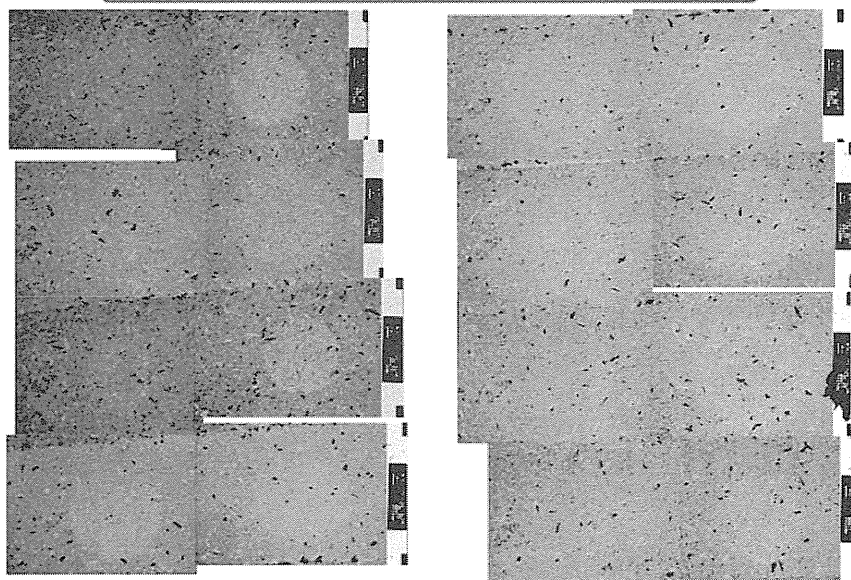
連続超薄切片



厚生科学研究事業15年度 研究報告書

図 2 . 超薄連続切片低倍率像 (グリッド低倍率像)

高倍率観察に適した菌体選定のための低倍率観察



厚生科学研究事業16年度 研究報告書

図 3 . 高倍率観察に適した菌体選定のための低倍率観察