

蛍光顕微鏡による細菌の観察

蛍光顕微鏡

ある物質に外部から紫外線や X 線をあてた時、特定の波長の光を出す現象を「蛍光」という。これは、紫外線など（「励起光」という）のエネルギーによって、その物質の原子に含まれる電子が基底状態から励起状態に遷移し、その後電子が基底状態に戻る際にエネルギーを光として放出するのが、発光現象として観察されるものである。

蛍光灯は、この現象を利用した光源である。蛍光灯がすばやくちらつくことがあることから分かるように、蛍光現象は、励起光を受けてから発光するまでの時間と、照射がなくなってから発光がなくなるまでの時間が、それぞれ 10^{-3} 秒以内、 10^{-6} 秒以内と非常に短い。もっとも、近頃のインバータ式の蛍光灯は、一秒間に 2 万回以上の点滅をさせているためちらつきは観察しにくい。似た性質の光として、夜光塗料などの「リン光」があるが、これはしばらく発光を続けるものをいう。

蛍光性の物質で染色した標本（蛍光標本）はそのままでは色がついて見えるわけではない。蛍光顕微鏡で観察すると、使用した染色液ごとに特有の色に標本が光って見える。励起光を蛍光標本の上部から照射するタイプの顕微鏡を、落射型蛍光顕微鏡という。このタイプでは、対物レンズが励起光を照射する役割を兼ねる。

蛍光標本を作製するための染色液（蛍光試薬）にはさまざまなものがある。それぞれ、特有の励起波長、蛍光波長を持つ（表参照）。蛍光は励起光と比べ、非常に微弱な光（ 10^{-6} 程度）であるため、蛍光顕微鏡には、励起光、蛍光のフィルタ、特定域の光を反射するミラーなどが装備されている（蛍光キューブ）。目的の蛍光試薬の特性に応じて、適切な蛍光キューブ（励起法）を選択する必要がある。

蛍光標本に励起光をあて続けると、時間の経過にともない蛍光は弱くなる。明るい像を得るために標本に強い励起光をあてると、その分退色も速くなる。そのため、すばやく観察することが必要である。

表 蛍光試薬の特性と推奨励起法

蛍光試薬名	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	推奨励起法	使用対象
FITC	490	520	WIB	蛍光抗体法
アクリジンオレンジ	490	530, 640	WB	核酸
DAPI	372	456	WU	A-T領域
ローダミン	500	540	WIB	ミトコンドリア
CTC フォルマザン	450	630	WB	呼吸活性

細菌の染色

DAPI は 2 本鎖 DNA を特異的に染色する。そのため、細菌液に DAPI を添加し、メンブランフィルタで細菌細胞をろ集すると、DAPI 染色された細菌を計数できるようになる。ここでは全ての細胞が染色されるため、観察される細胞には、死んだ（活性を持たない）細胞も含まれてしまう。

目的によって、生きている細胞（活性を持つ細胞）を計数する必要がある場合には、CTC を用いる。無蛍光の CTC は、電子伝達系の作用によって、蛍光性の CTC フォルマザンに還元され細胞内に蓄積するために、蛍光顕微鏡で呼吸活性を持つ細胞のみを計数することができる。CTC の代わりに INT を用いると、同様の機作によって INT は INT フォルマザンに還元され赤色を呈する。INT フォルマザンの観察には蛍光顕微鏡を必要とせず、普通の光学顕微鏡で細胞計数が可能である。細胞分裂を抑制するナリジクス酸を試料に添加し、培養後 DAPI 染色をして、伸長した細胞のみを生細胞として計数する方法もある。

細菌は細胞のサイズが小さいため、(1 μ m オーダー)、観察・計数には 1000 倍程度以上の倍率の顕微鏡が必要である。100 倍以上の倍率の対物レンズを使用する時には、対物レンズと標本の間をイメージジョンオイルで満たして（油浸）観察を行う。対物レンズの胴の先にある黒い線は油浸用レンズであることを示す印である。油浸を行うことによって、光の屈折を少なくし、分解能を上げることができる。

【DAPI 染色手順】

1. 試料に 1/10 量の DAPI 希釈溶液 (0.1 μ g/ml) を加え、5 分以上室温で放置する。
2. Nuclepore フィルタで 10ml ろ過する。
3. スライドガラスにイメージジョンオイルを 1 滴たらし、フィルタを貼り付け、その上に気泡が入らないようにカバーグラスをのせる。
4. 落射蛍光顕微鏡で 1500 倍で計数する。（励起法 WU, 青い細胞を計数）

【INT 染色手順】

1. 試料 (10ml) に 0.2%INT 溶液を 1ml 加え、暗所で 2h 反応させる。
2. Nuclepore フィルタでろ過する。
3. スライドガラスにイメージジョンオイルを 1 滴たらし、フィルタを貼り付け、その上に気泡が入らないようにカバーグラスをのせる。
4. 光学顕微鏡 1500 倍で観察する。

参考文献

野島博, 顕微鏡の使い方ノート, 羊土社, 1997

Porter, K. G. and Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 943-948

Zimmerman, R., Iturriaga, R., and Becker-Birck, J. (1978) Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration., *Appl Environ Microbiol.*, 36(6), 926-935