

簡易蛍光顕微鏡の開発と高等学校生物における活用の提案

竹下 俊治・雑賀 大輔*・間賀 綾音**・絹谷 和子***・福田(時澤)味佳****

(2015年12月7日受理)

Development of a simple, hand made fluorescence microscope and a proposal to its practical use for the high school biology

Shunji TAKESHITA, Daisuke SAIGA, Ayane MAGA, Kazuko KINUTANI and Mika T. FUKUDA

Abstract. In the present study, a simple hand made fluorescence microscope was developed. Four UV-LED lamps (NS360L-5RLO, Nitride Semiconductors Co., Ltd.) were used for the ultraviolet irradiation device. Some problems of a sample device have been improved and that has been completed. As the result, the nuclear fluorescence of the epidermal tissue of *Tradescantia ohiensis* stained by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) were observed.

This low cost simple fluorescence microscope was very effective for the student's activities in the high school biology classes. In this paper, authors proposed an example of experiment which analyze relative DNA content value of nucleus in mitotic cell cycle by using this fluorescence microscope.

はじめに

今日の生物学の発展には、観察や分析に用いられる機器の発達によるところが大きい。中でも顕微鏡は、生物学で最も多用される観察機器の一つであり、その基本構造は初期のものから大きく変わっていないが、レンズ等の各部の性能の向上とともに、より高倍率で観察できるようになった。また、現在では単に外部形態を観察するだけでなく、様々な機能が付加され、細胞内の物質の濃度分布やイオンの動態を分析する機器としても用いられている。小・中・高等学校の理科においても、現行の学習指導要領のもと、科学技術と日常生活との関連性が重視され、教科書や資料集では最先端の機器を用いた研究による成果が取り上げられている(浅島2013, 吉里2013, 松本2014など)。一方で、そのような高度な機能を有した機器は、特定の目的のために開発されてきたという経緯もあり、高額で、操作にも一定の熟練を要するなど、一部の専門家のためのものとなっている。学校現場にそれらの機器が導入されることはほぼ皆無で

あり、最先端の機器に触れられるのは、その機会に恵まれた少数の生徒に限られているのが現状である。しかし、理科の授業には実験・観察が積極的に導入され、特に生物分野では、少なくとも通常の光学顕微鏡を使用する機会は確保されている。先にも述べたように、顕微鏡を構成の基本とするものは、各種の機能を付加することで発達してきており、学校現場の光学顕微鏡に特定の機能を持ったデバイスを追加できれば、先端的な機器の代用品として活用できる可能性がある。そこで本研究では、蛍光顕微鏡に着目した。蛍光顕微鏡は、試料に特定の波長の励起光を照射し、発生した蛍光を観察するものである。観察対象となる物質によって蛍光色素や励起光の波長を変えることで、試料の状態を非破壊的に把握することができる。本研究では、励起光に紫外線を用い、安価な紫外線照射装置を製作して一般の光学顕微鏡に取り付け、蛍光顕微鏡の代用として実用可能なものを開発することを目的とした。また、その簡易蛍光顕微鏡の高等学校生物における活用法を提案することとした。

*米子市立美保中学校, **広島県立三原高等学校, ***大学院教育学研究科文化教育開発専攻, ****東京都狛江市

紫外線照射装置の製作

1. 光源

蛍光顕微鏡の機能の要となるのが紫外線照射装置である。通常の蛍光顕微鏡は、水銀ランプを光源とし、フィルターを用いて必要な波長の光を得ている。この装置と同様の機能を持つものを作成するに当たり、発光ダイオード(LED)を用いることとした。現在、波長の異なる様々なLEDが市販されており、目的に応じて使い分けることで、種々の試料の観察に活用できると考えられる。樹脂の硬化や蛍光インクの検出に用いられるピーク波長が375 nm付近のものは、比較的安価で入手もしやすい。また、より波長が短いものでは、懐中電灯型のブラックライトとして製品化されたものがある。しかしこれらの市販品は、紫外線照射装置として顕微鏡で使用するには、一度分解して新たに組み立て直す必要がある。そこで今回は、蛍光色素 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) により細胞中の核を染色した試料を観察することを目的に、ピーク波長 360 nm の砲弾型の LED ランプ (NS360L-5RLO, ピーク波長 360 nm, 照射角 15°, ナイトライド・セミコンダクター株式会社) (図1a) を光源に用いて照明装置を自作することとした。砲弾型の LED ランプを使用する利点として、ランプ単体に凸レンズが実装されていることが挙げられる。その凸レンズのため、光の照射角が 15° や 30° という狭い光束を照射することで、より強い光を得られることである。

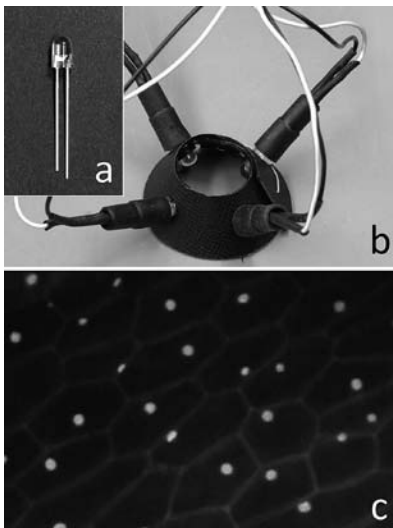


図1. 試作した紫外線照射装置.

a: 使用した LED ランプ. b: 試作品.
c: 得られた蛍光像 (タマネギの表皮組織).

2. 試作品の製作と評価

通常の蛍光顕微鏡では、照射される紫外線は鏡筒内で観察光路と同軸の落射光になる。試料に均等に紫外線を照射し、発した蛍光を観察するには非常に都合の良い構造である。これと同じ構造を自作するのは困難なため、外部光源として紫外線を照射する方法を検討した。その結果、対物レンズ先端とプレパラートとの隙間から紫外線を照射するのが最適と考え、対物レンズにセットできるスカート状の部品に LED を取り付けたいものを製作した(図1b)。なるべく強い紫外線を得るため、取り付ける LED は 4 個、電源アダプターを介してコンセントから給電するようにした。スカート状の部品には、黒色の PP シートを用いた。外光の遮断と、紫外線が周囲へ照射されるのを防止する効果を期待した。プレパラートに照射された紫外線の一部は、反射光として対物レンズ—接眼レンズを通して目に届く可能性がある。蛍光顕微鏡は、目的の蛍光波長のみを透過するフィルターを備えるなど、紫外線対策を講じてあるのが普通である。しかし今回の簡易の紫外線照射装置では、フィルターを装備することは難しいため、観察はデジタルビデオカメラを通じて行うこととした。

試作品を用いてタマネギの表皮細胞やムラサキツユクサの葉の表皮細胞の観察を行ったところ、光源ムラはあるものの、DAPI で染色された核に特徴的な青白い蛍光を確認することができた(図1c)。しかし、スカート状の部品が接眼レンズに固定できず、照射される光の強さや向きが一定にならないこと、倍率を変えるたびに取り付け直さないといけないこと、作動距離が短い40倍以上の対物レンズには不向きなこと、プレパラートを動かす際に邪魔になること、という問題点が明らかになった。

3. 紫外線照射装置の改良

(1) 装置の構成

試作品で明らかにされた問題点を解決するために様々な対策案を検討した結果、次のような構成の紫外線照射装置を製作することとした。

- ・落射型ではなく裏面照射型
- ・ステージと一体になったもの
- ・独立した電源を備えたもの
- ・紫外線の周囲への拡散を防止できるもの

裏面照射型としたのは、試作品で問題となった対物レンズとプレパラートの距離を解決するためである。ステージと一体にするのは、光源の向きが固定され、常に安定した条件で観察可能になるという利点のためである。また、既存のステージは機種により構造が様々なため、裏面から照射する装置の汎用性をより高められると考えた。独立した電源としては、乾電池による給電が最も簡便であり、市販の電池ボックスを用いて給電することにした。照射される紫外線を誤って直視しないよう、紫外線カットシートで遮蔽することとした。

(2) 材料と方法

装置の材料は以下の通りである。

- ・ LED ランプ：NS360L-5RLO, (株)ナイトライド・セミコンダクター
- ・ ユニバーサル基板：95×72 mm

- ・ 抵抗器：カラー抵抗器 (70Ω); 可変抵抗器 (任意)
- ・ 電池ボックス：スイッチ・カバー付, 単3×3コ用, オーム社
- ・ 紫外線カットシート：B89-90, (株)ミラリード
- ・ その他: アクリル板 (3mm, 黒), PPシート (黒), ボルト・ナット (M4, 20mm, ワッシャー付き), 配線用コード, アルカリ乾電池 (単3)

安定した照射光を得るため、図2のような回路で製作した。LED ランプや回路を収納するボックスの天板をステージとして一体化したものとした。明視野で観察することを考慮し、ステージになるケースの天板の中央から基板に直径10mmの穴を貫通させ、基板中央の穴の周囲にLED ランプ4個が配列するように各部品を配置させた(図3a)。LED ランプの取り付けは、天板上面に置いたスライドガラス表面で4個の照射光がきれいに重なるよう、天板との距離、穴との角度を調節し

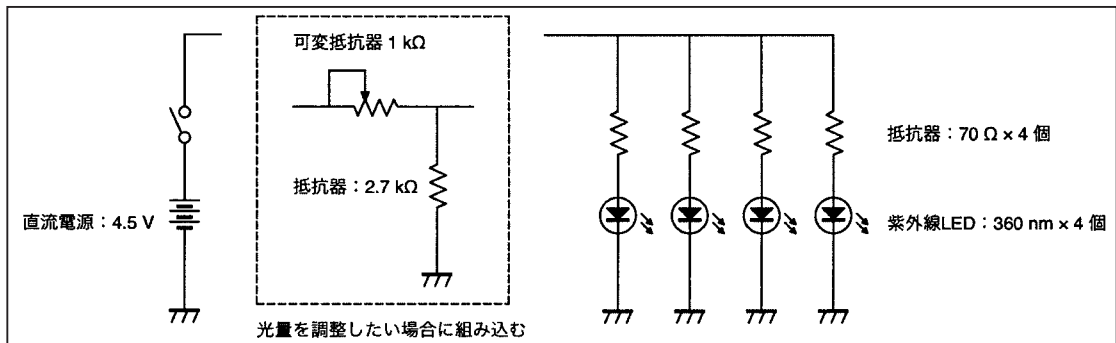


図2. 紫外線照射装置の回路図 (本図は Qt-BSch3V Modified による)。

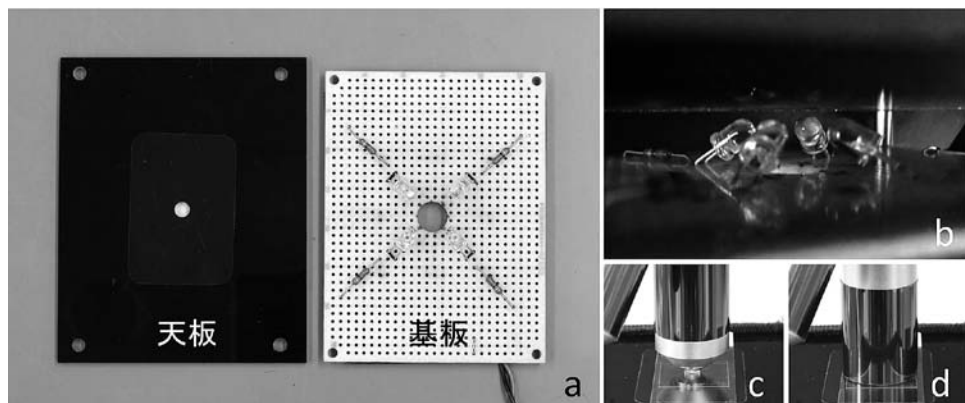


図3. 裏面照射型の紫外線照射装置の構成.

- a: 天板と基板を分離させた装置 b: LED ランプの取り付け角度.
c・d: 対物レンズに取り付けた紫外線カットシート (c: 明視野観察時, d: 蛍光観察時).

た。また、顕微鏡の視野にLEDランプが入らない位置にした(図3b)。天板と基板はボルト・ナットを柱として固定し、黒色のPPシートで側面を覆った。紫外線の遮蔽は顕微鏡のステージ全体を覆うのが最も安全であるが、使用する際の作業性が悪いため、各対物レンズに紫外線カットシートで作製した筒を取り付け、必要に応じてプレパラートをカバーするようにした(図3c, d)。天板の穴の大きさは、穴を開けた紫外線カットシートで観察時に適宜調節した。

(3) 紫外線照射装置(裏面照射型)の評価

以上のようにして製作した紫外線照射装置(図4a)を顕微鏡(Olympus CH-2)に取り付けた(図

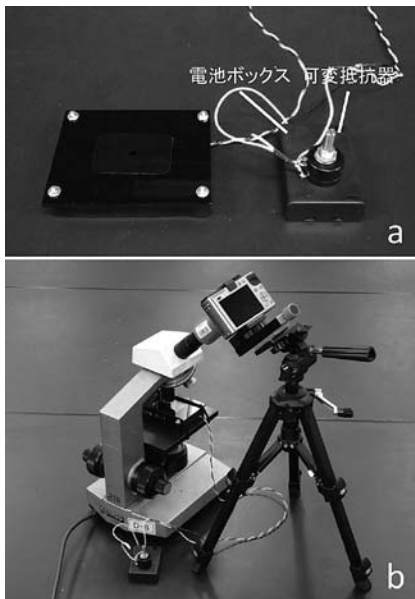


図4. 製作した紫外線照射装置。
a: 装置の全体。
b: 顕微鏡に取り付けて観察する状態。



図5. 自作の顕微鏡-カメラアダプター。
a: アダプターの構成(カメラボディキャップと給水栓ソケットは両面テープで接着した)。b: カメラに取り付けた状態。

4b)。顕微鏡のメカニカルステージは取り外し、既存のステージ上に照射装置を置き、光軸が照射装置の穴の中心になるよう調節した後、ゴム紐で固定した。観察はデジタル一眼カメラ(Panasonic LUMIX GX1)のプレビュー機能によって行った。カメラと顕微鏡の接続には、カメラボディキャップの中心に穴を開け、塩ビ製の給水栓ソケットに貼り付けたものを自作し、顕微鏡-カメラアダプターとして使用した(図5a, b)。DAPIで染色したムラサキツユクサの葉の表皮細胞を観察した結果、十分な蛍光像が得られた。また、40倍の対物レンズでも通常の蛍光顕微鏡(Olympus BX-50/BX-FLA)と比較して遜色ない明瞭な蛍光像が得られ、試作品に見られた問題も解決できたと言える(図6a-d)。紫外線の強さを変更できるよう、可変抵抗器を取り付けたが、結果的には最大光量での観察がほとんどであった。対物レンズに取り付けた紫外線カットシートの筒は、外光も遮断するため、暗室ではなく通常の教室で観察することができた。

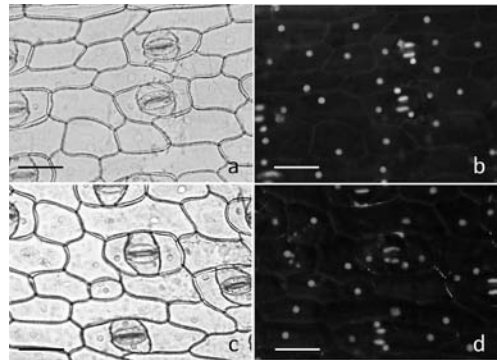


図6. 蛍光顕微鏡で観察したムラサキツユクサの葉の表皮細胞。
a・b: Olympus BX-50/BX-FLAによる観察結果(a; 明視野像, b; 蛍光像)。c・d: 紫外線照射装置を取り付けた簡易蛍光顕微鏡による観察結果(c; 明視野像, d; 蛍光像)。スケール: 0.1 mm。

この紫外線照射装置による蛍光観察を、日本生物教育学会第98回全国大会(愛媛)のワークショップで発表した(竹下ほか2015)。ワークショップでの観察には、DAPIで染色したムラサキツユクサの表皮細胞を用いた。参加者の中では、特に医療系の学校の方に好評であり、「学校現場で活用したい」「製作キットが欲しい」との声が聞かれた。

授業での活用の提案

本研究で製作した紫外線照射装置を学校現場で活用するには、具体的な学習内容と関連させる必要がある。この装置を取り付けた簡易蛍光顕微鏡を、単に蛍光像を確認させるだけでなく、得られた蛍光像を授業の中でどのように活用するかが重要である。先にも述べたように、本来、蛍光顕微鏡は分析や測定に用いられるものである。そこで、蛍光の照度を測定して簡易的に核の DNA 量を求める方法を紹介する。

細胞中の核 DNA を染色する DAPI は、DNA の特定の塩基対 (A-T) の領域に結合し、蛍光を発する。同一個体の体細胞における核 DNA の塩基配列は基本的に同じであり、A-T 領域の頻度も等しい。つまり、染色された核が発する蛍光の光量は、DAPI が結合した DNA 領域の量に相関があることから、核の蛍光量を測定し、細胞周期の各時期における核 DNA 量の相対値を比較することが可能である。光量の測定は、フリーソフト ImageJ (National Institutes of Health, USA) を用いると、カメラで撮影した画像を簡単な操作で解析し、輝度値として数値化することができる (図 7)。

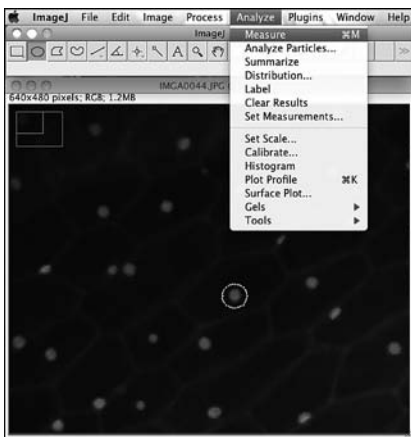


図 7. ImageJ による輝度測定例 (スクリーンショット)。任意のエリアの積算輝度値を測定できる。

細胞周期を高校の授業で取り上げる際、視覚的にダイナミックな変化を観察できる分裂期に注目しがちだが、細胞内で核 DNA の複製を行っている間期も非常に重要な時期である。しかし、間期における核の状態の変化は通常の光学顕微鏡では観察できないため、高校の授業では、教科書や資

料集に示されている細胞周期における核 DNA 量の変化の模式図やグラフを確認するとどまっている (浅島 2013, 松本 2014 など)。DAPI 染色による蛍光像から DNA 量を測定し、グラフ化するという活動は、これまでは機器の問題で行うことができなかったが、今回開発した紫外線照射装置を用いることで、実際に生徒が行う実験として導入が可能となると考える。同様の活動は、事前に得ていた画像を用いても可能であろうが、生徒に実際に先端的な機器と同じ原理のものに触れさせ、観察・測定させることは非常に有意義であると考えられる。蛍光顕微鏡は、従来の光学顕微鏡では見えないものや現象を可視化させる機器である。清水・山崎 (2014) が言及したように、可視化することは、児童・生徒に新たな気付きや発見を促す効果が期待される。また、野崎 (2014) が、『「はかる」ことは、科学的であるための第一歩である』と述べている通り、測定できる条件が整っているのであれば、その活動を生物の授業に積極的に取り入れても良いであろう。

おわりに

専門の蛍光顕微鏡は数十万円から数百万円する。より安価なものを求める声に応じて、LED を用いたものも開発され、数万円のレベルまで低価格化されている。LED ランプも様々な波長のものが市販されており、目的に応じて選択できる。現在のところ、LED は波長の短いものほど高価で、光源の作製には若干の工作技術が必要だが、蛍光顕微鏡よりもはるかに安価に入手できることは、大きなメリットと言える。また、先端的な機器の中でも蛍光顕微鏡は構造や操作がシンプルな部類である。今回開発した紫外線照射装置は、更に操作が簡単である。安全対策も含め、より低コスト化するなど改良を加えることで、実際に現場に導入されることを期待する。さらに、今回の実践の例で取り上げた蛍光色素の DAPI は、学校で購入する試薬としては高価である。しかし、実際に使用する際には $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ という、きわめて少量しか必要としない。したがって、DAPI に限らず、このような購入するには高価でも使用する際にはコストパフォーマンスの高い物品・試薬については、教育センターに備えておくなどの対応についても期待したい。

謝 辞

照射装置の回路について、広島大学大学院教育学研究科の前原俊信教授にご助言をいただいた。ここに感謝の意を表す。また、試作品の性能評価に協力してくれた、当時教育学部4年生であった中丸恭宏氏に感謝申し上げる。本研究の一部は、科学研究費基盤研究(A)(25242015)および科学研究費基盤研究(C)(26350235)の助成を受けて行った。この場をお借りして御礼申し上げます。

引用および参考文献

浅島誠ほか, 生物基礎, 東京書籍, 2013.

稲澤譲治・津田均・小島清嗣, 顕微鏡フル活用術イラストレイテッド, 秀潤社, 2003.

清水誠・山崎麻美, 現象を可視化することが規則性の発見に及ぼす効果 ― 葉のつき方の学習を事例として ―, 科学教育研究, 38: 20-26, 2014.

竹下俊治・雑賀大輔・間賀綾音・時澤味佳, LEDを用いた顕微鏡観察の工夫, 日本生物教育学会第98回全国大会研究発表予稿集, p.109, 2015.

野崎修司, 「はかる」ことの価値を考える, 理科の教育, 63: 612-614, 2014.

野島博(編), 改訂顕微鏡の使い方ノート, 羊土社, 2008.

福田裕穂・西村幹夫・中野明彦(監), 新版植物の細胞を観る実験プロトコル, 秀潤社, 2006.

松本洋介, 二訂版スクエア最新図説生物 neo, 第一学習社, 2014.

文部科学省, 高等学校学習指導要領解説 理科編 理数編, 実教出版, 2010.

吉里勝利ほか, 高等学校生物基礎, 第一学習社, 2013.

Rost, F. W. D., Fluorescence microscopy Vol. I, Cambridge Univ. Press, 1992.