

# 光学顕微鏡施設での観察サンプルの準備

小林 健太郎（北海道大学 電子科学研究所 技術部）

KOBAYASHI Kentarou : Sample preparation at optical microscope facility.

In optical microscopy facilities, there are many opportunities to check the condition of microscopes and to conduct demonstrations. We need good samples in such cases, but it is difficult to prepare good samples. In this paper, we will introduce reasonable and easy way to provide excellent observation samples for optical microscope.

## 1. 目的

光学顕微鏡の設備提供を行う施設では、顕微鏡の状態確認の作業に加えて、施設見学時に観察デモンストレーションを行う機会も多い。また最先端顕微鏡を所有する場合、あるいは自身で光学顕微鏡を開発している場合は、既存の顕微鏡との取得画像との比較も必須となる。このような場合には観察サンプルが必須であり、定評のある多重染色サンプルは市販されている。ただし価格は概ね数万円となり、施設党での導入は難しい場合も多い。また装置担当者自身が直接的に研究に携わっていない場合は、顕微鏡で観察できるサンプルの常備も行っていない。こうした理由から、いつでも直ちに光学顕微鏡で観察できるサンプルを常備しておくことは、いくぶん難しいのが実状である。

そこで本紙では、優れた光学顕微鏡サンプルを安価かつ簡単に提供する一例を紹介する。併せて、共同利用設備等で利用できる利用記録システムの再構築も行ったため、こちらについても紹介する。

## 2. 固定サンプルの検討

生物由来のサンプルの染色法として、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色法は、組織切片等の明視野観察を行う目的として、極めてオーソドックスに使われている手法である。ヘマトキシリンは細胞核を青色に、エオシンは細胞質や筋線維を赤色に染色する。発色性であることから、明視野像での観察のみならず、蛍光観察でも適用できると推測される。またHE染色サンプルは作成が容易であることから、初級学生への実習用サンプル等として、市販されている。こうしたサンプルの一例として、ヤガミ社の理科実習用サンプルから、「ナメクジウオ横断プレパラート」（4,900円で10枚同封）と「ミミズ横断プレパラート」（4,600円で10枚同封）を、京都科学社の「植物組織サンプル」

（20,000円で40種が同封）を購入して、光学顕微鏡での観察を試みた。

まず、「ナメクジウオ横断プレパラート」を、カラーのCCDカメラと、蛍光顕微鏡で観察を行った。図1に示すように、緑の蛍光と赤の蛍光を示し、蛍光顕微鏡で申し分なく観察できることを確認した。

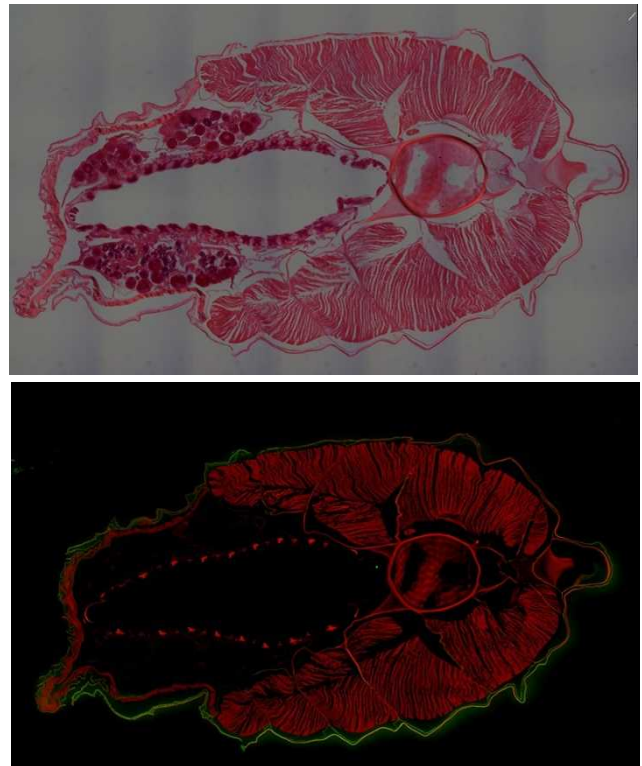


図1 ナメクジウオ横断プレパラートの顕微鏡画像。

上:カラーCCDカメラでの透過像 下:蛍光顕微鏡での観察像

次に、「植物組織サンプル」の1つとして、「ゼニゴケ 胞子と弾子」プレパラートを、観察Z位置を変えながら共焦点顕微鏡（ニコン A1Rsi）で観察すると、鮮明な二重らせん構造が確認でき、更には3次元分布状況も把握できた（図2）。共焦点顕微鏡では、こうした観察を行う研究者が多いため、顕微鏡等の状態確認用として、十分に使用に値することが確認できた。

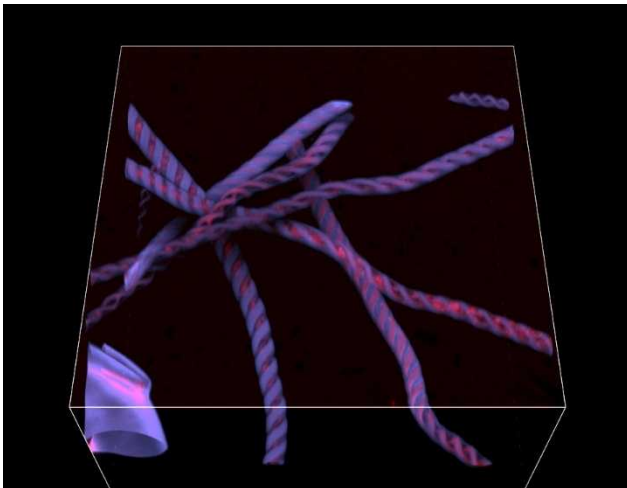


図2 ゼニゴケ弾子プレパラートの共焦点顕微鏡での観察画像

続いて、「ミミズ断面プレパラート」を、電動ステージの位置を制御することで、サンプルの広域観察を行うと、数ミリメートルサイズに及ぶサンプル全域が観察できた。またこのサンプルの一部のズームアップ観察を行うと、サンプル内部の微細構造の3次元構造も

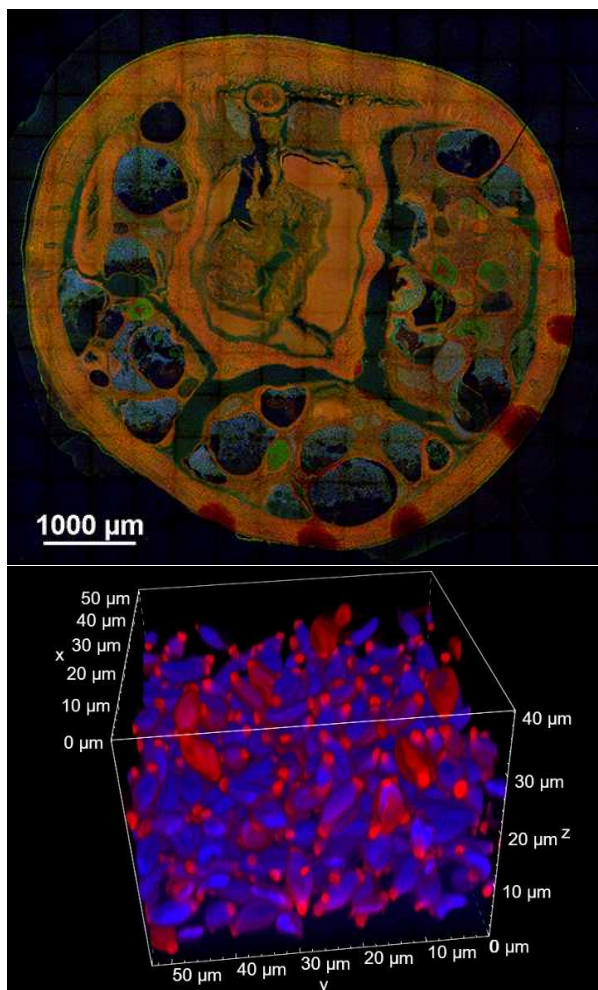


図3 ミミズ横断プレパラートの共焦点顕微鏡での観察画像。上:サンプル全体の広域観察 下:サンプル一部の拡大観察

確認できた(図3)。

更に、他の光学顕微鏡でも観察を試みた。「植物組織サンプル」の「ムクゲ茎断面」プレパラートでは、共焦点観察の結果、サンプルの一部に微細な構造が確認できたため、この箇所を構造化照明式の超解像顕微鏡(ニコン N-SIM)で観察した。図4で示すように、直径が数マイクロメートルの構造が明瞭に観察できた。ただし、生理学研究所の堤元佐博士に依頼して、誘導放出抑制による超解像顕微鏡(STED)で「ナメクジウオ横断プレパラート」の観察を試みたものの、STEDによる超解像観察はできないことがわかった。STEDでは蛍光標識色素分子の光化学特性が重要であるが、ヘマトキシリンならびにエオシンは、STEDに対応できない模様である。

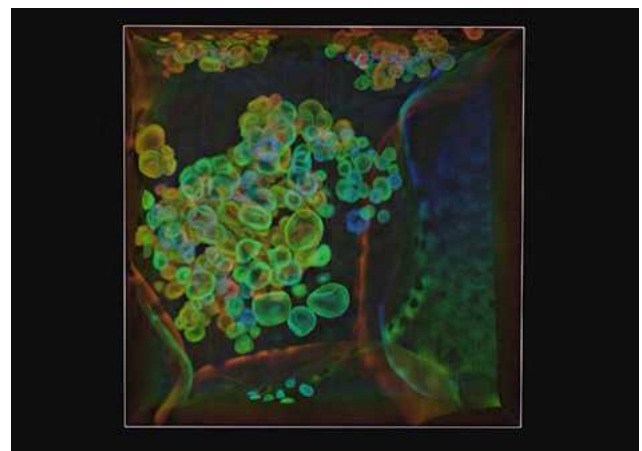


図4 ムクゲ茎プレパラートの超解像顕微鏡での観察画像。

「植物組織サンプル」の「ジャガイモ 貯蔵でん粉」プレパラートについて、共焦点顕微鏡と2光子顕微鏡(ニコン AIMP)で、3次元観察を行った(図5)。共焦点顕微鏡では、ガラス面から数十マイクロメートルより深部の観察は困難であったが、2光子顕微鏡では概ね支障なく観察できることが確認された。

以上より、容易に導入できる市販の実習用サンプルで、共焦点顕微鏡によるXYZ観察、広域観察、ズームアップ観察に対応でき、更には多光子顕微鏡や構造化照明式の超解像顕微鏡での観察も可能であったことから、機器の状態確認やデモンストレーション等を目的として、光学顕微鏡施設で常備する大きな意義があることが確認できた。こうしたサンプルは、1セットでも数千円程度で購入できるため、ぜひ他の施設等で参考となれば幸いである。

### 3. 培養細胞での蛍光標識の検討

施設によっては、培養細胞の用意は可能である一方、

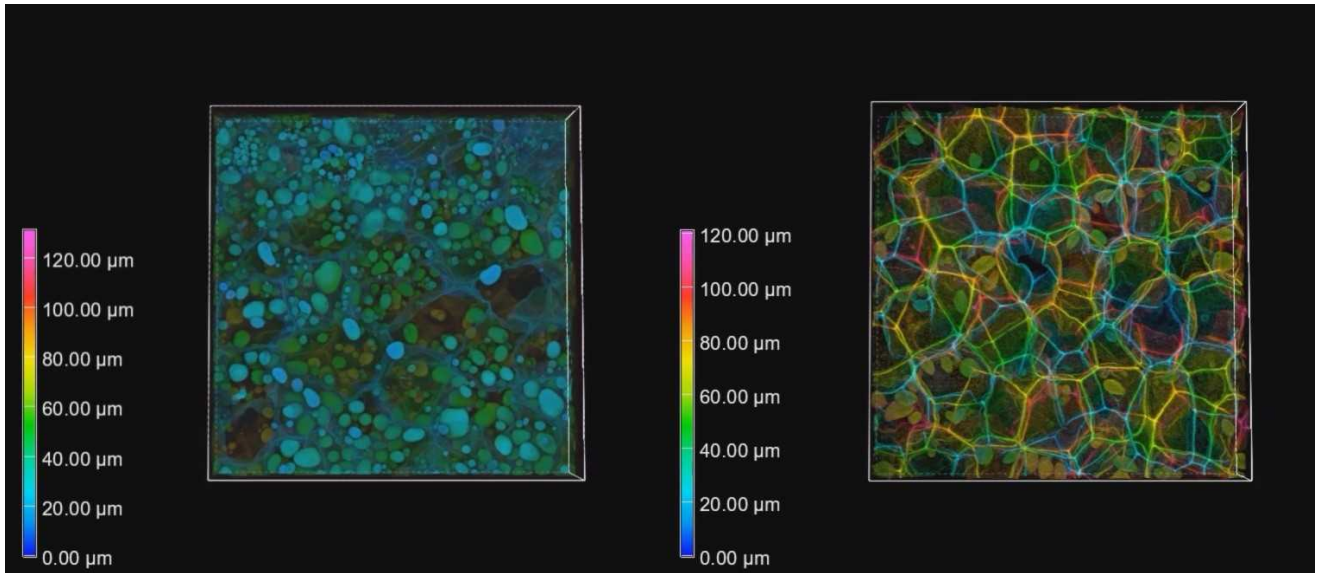


図5 ジャガイモ 貯蔵でん粉プレパラートの観察画像. 左:共焦点顕微鏡での観察 右:2光子顕微鏡での観察

培養細胞の蛍光標識試薬は、1バイアルで数万円に及ぶものも多く、同様に調達が困難であることも考えられる。蛍光標識した培養細胞の観察は、施設見学での観察デモンストレーションなどで効果が大きいと考えられる。例えば小学生等に、顕微鏡の接眼レンズから、暗い視野の中で細胞が光っている様子を観ることにより、生物学に興味を持たせることも期待できる。そこで安価かつ容易に準備できる物品を用いて、細胞の蛍光標識を試みた。

ひとまず今回はトライアルとして、身の回りにある物品の一例として、数種のペンのインクで細胞の標識を試みた。まずプラスチックチューブに、滅菌用アルコールを適量入れ、ペン先を数秒間浸して、インク成分を抽出した。そして HeLa 細胞を培養している培地に約 100 倍希釈で滴下した。30 分程度染色した後に、緩衝液で洗浄して通常の培地へと交換し、共焦点顕微鏡での観察を行った。

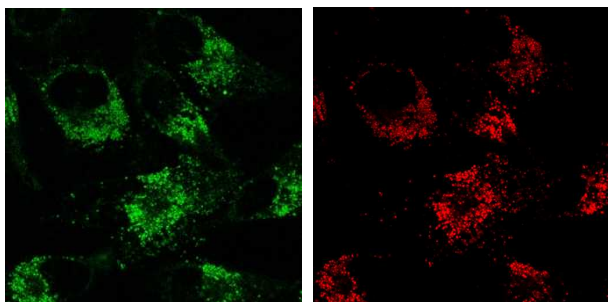


図6 培養細胞の共焦点顕微鏡での観察画像。

左:ペンのインクによる標識 右:リゾソーム標識試薬による標識

まず、あるペンで染色を試み、488nm のレーザーを照射して緑色蛍光を確認すると、細胞内で粒子状構造が観察された。細胞内小器官の蛍光標識試薬の1つとして、リゾソーム染色試薬があるため、多重標識を行

って局在を確認すると、ほぼ同一であることが確認できた。細胞内に取り込まれたインク由来の分子が、細胞外の異物として分解されるためにリゾソームに移行した可能性も高いが、簡易的にリゾソームを可視化する手法であると考えられる(図6)。

次に、別のペンでも染色を試みて、561nm のレーザーを照射して赤色蛍光を確認すると、ミトコンドリアが可視化できたと考えられる(図7)。図7右では、スタンダードなミトコンドリア染色試薬で赤色蛍光となる標識を行って観察して比較を行った。図7の両画像では、レーザー強度などの観察設定、ならびに画面表示設定は、完全に同一とした。あくまでもこの蛍光標識方法は、トライアルの粗い手法であるため。ガラス面に微結晶が散在しているが、ミトコンドリアの見え方や蛍光輝度等の点でも、試薬による染色と概ね遜色ないことがうかがわれる。

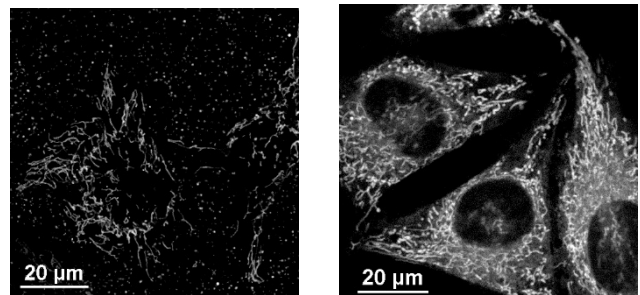


図7 培養細胞の共焦点顕微鏡での観察画像。

左:ペンのインクによる標識 右:ミトコンドリア標識試薬による標識

サンプルを共焦点顕微鏡で高さを変えながら XYZ 観察を行うと、空間内でのミトコンドリアの分布状況が明瞭に確認できた(図8)。また一定時間間隔で長時間観察(タイムラプス観察)を行ったところ、さすが

に長時間に及ぶ蛍光輝度の維持は困難であったが、16時間後も視野内の細胞は完全に生きており、そして滞りなく細胞分裂が行われたことが確認された。以上より、この方法によるミトコンドリアの蛍光標識は、概ね細胞への毒性は低いことが示唆される。

以上の結果より、身の回りの物品等を用いても、培養細胞の蛍光標識が可能であることが確認できた。今回用いたペンは、どちらも200円以下で購入可能である。そのため、標識方法が確立できるならば、極めて安価に細胞内構造の可視化を達成できるため、こちらも参考となれば幸いである。

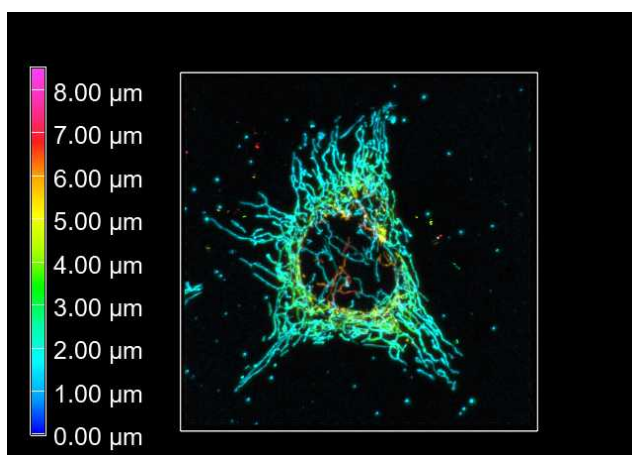


図8 ペンのインクで蛍光標識した培養細胞の観察画像。

#### 4. 利用記録システムの構築

以前より筆者らは、利用記録ソフトウェアを作成し、装置利用者には、利用時に都度記入させている。大部分の共用機器施設等では、装置の傍りに設置のノートに利用状況を記載させていると思われるが、こうしたソフトウェアの導入により、利用記録は即座に電子化されるため参照が容易である、記載内容は装置担当者のみが参照できる、といったメリットがある。ただ十数年前に構築したシステムであるため、インターフェースも古びている、大解像度のモニターに対応できない点などが目立ってきたため、全面的に再構築を行った。

今回構築したシステムは、Total Activity on Microscope / Machine Application (TAMA) とした。TAMA の特長として、以下がある。

- ・日本語と英語の両方に対応し、随時切り替え可能。
- ・設定ファイルを修正することで、システムに応じて使うことができる。

TAMA の構築における最大の特長は、「ChatGPT を駆使することで、筆者では対応が難しい点も迅速に対

応」がある。プログラムの記載方法にとどまらず、「パンフレット用のキャッチコピーの作成」や、「アイコン画像の作成」、更には「機器利用ログシステムとして、ソフトウェアの略称が『TAMA』となるような正式名称の検討」さえも対応できた。従来版では基本機能の構築のみでも3か月を費やしたが、わずか3日でTAMAのシステム構築を完了できた。今後の機能追加等においても、極めて有用となる可能性があるため、システム構築にとどまらず、今後も活用を目指したい。

なお、このTAMAについては、プログラムや説明書など一式を提供することも可能のため、興味のある方はご一報ください。

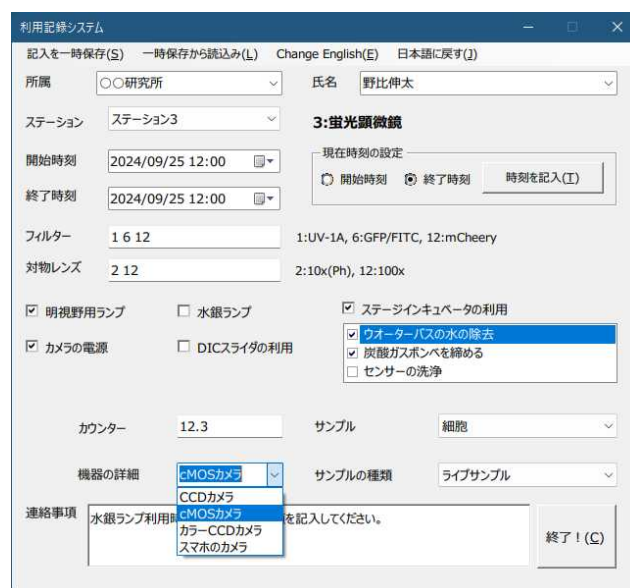


図9 作成した利用記録システム (TAMA) の画面。

#### 謝辞

本発表は、北海道大学電子科学研究所ニコンイメージングセンターの諸スタッフ（三上秀治教授、松尾保孝助教、富菜雄介特任助教、中野和佳子技術専門職員）、ならびに生理学研究所兼生命創成探究センターに異動の前スタッフ（根本知己教授、堤元佐特任助教）との日頃の協議等が基となりました。また「ペンのインクによる細胞染色」については、2008年に北海道大学に永井健治教授が研究室を設けた際の研究員の方々（齊藤健太博士、松田知己博士、小寺一平博士、竹本研博士）との話を十数年ぶりに思い出したことに端を発しております。この場を借りて、諸氏に感謝を申し上げます。