

## 蛍光顕微鏡を用いた、極域フィールドにおける微生物検出法の開発

吉村義隆<sup>1</sup>、荒川まりあ<sup>1</sup>、西川彰人<sup>1</sup>、宮川厚夫<sup>2</sup>、佐々木聰<sup>3</sup>、山岸明彦<sup>2</sup>、小川麻里<sup>4</sup>、本山秀明<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 玉川大学農学部

<sup>2</sup> 東京薬科大学生命科学部

<sup>3</sup> 東京工科大学応用生物学部

<sup>4</sup> 安田女子大学教育学部

<sup>5</sup> 極地研究所

### Developments of fluorescent microscopy for *in situ* detection of microorganisms on polar fields.

Yoshitaka Yoshimura<sup>1</sup>, Maria Arakawa<sup>1</sup>, Akito Nishikawa<sup>1</sup>, Atsuo Miyakawa<sup>2</sup>, Satoshi Sasaki<sup>3</sup>, Akihiko Yamagishi<sup>2</sup>, Mari Ogawa<sup>4</sup> and Hideaki Motoyama<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Tamagawa University

<sup>2</sup>Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

<sup>3</sup>Tokyo University of Technology

<sup>4</sup>Yasuda Women's University

<sup>5</sup>National Institute of Polar Research

A fluorescent microscope is widely used to study microorganisms in various environments, however most study was done in laboratories after taking samples. This study aims to develop techniques for *in situ* detection of microorganisms using a portable fluorescent microscope on polar fields. We studied staining efficiencies of various types of fluorescent dyes using cultured bacteria and Antarctic soils when high concentration of glycerol was added as an antifreeze. All tested dyes, SYTO24, Propidium Iodide, SYBR Green I, SYPRO Red, and CFDA-AM, successfully stained microorganisms in the 66.7% glycerol solution which was expected to keep a liquid phase at -40°C.

We also newly designed a portable fluorescent microscope. The characteristics are as followed: a waterproof structure, scanning a soil surface by moving an objective lens, possessing several color of laser diodes and fluorescent filter sets for multi-color imaging, and so on. Several parts of the prototype were manufactured and imaging tests of microorganisms were conducted.

蛍光顕微鏡は、各種の蛍光色素や、クロロフィルなどの自家蛍光などを利用し、微生物を高感度に検出することができる機器として、環境中の微生物研究において幅広く用いられている。蛍光顕微鏡を用いる場合は、フィールドで採取した試料を実験室に持ち帰ってから観察することが一般的であるが、フィールドにおいて観察することができれば、その場所で実際に活動している微生物の数や分布を知ることができる他、試料採取場所の選定においても有益な情報が得られると思われる。しかしながら、極地のような低温環境下での蛍光観察では、染色液の凍結や、土壌や湖沼などの多様な低温環境で動作する蛍光顕微鏡がほとんど存在しないことが問題である。そこで、本研究では、染色液に凍結防止剤としてグリセロールを添加し、培養微生物や南極土壌などを用いて種々の蛍光色素の染色性を調査した。用いた蛍光色素は、核酸染色用の SYTO24、Propidium Iodide、SYBR Green I、タンパク質検出用の SYPRO Red、酵素検出用の CFDA-AM である。その結果、いずれの蛍光色素においても、グリセロール濃度 66.7% の染色液を用いて染色可能であった。66.7% は -40°C でも凍結しない濃度であることから、凍結防止剤の添加は、極地での蛍光観察において有効な方法であると考えられた。

また、本研究では、フィールドで使用可能な蛍光顕微鏡を、以下の仕様で設計した。(1) 水深 5 m までの水中でも観察可能な防水・防塵構造、(2) 試料をステージに載せることなく、地表や水中の試料をそのまま観察可能、(3) X 軸、Z 軸、θ 軸駆動機構により、地表面などを広範囲に走査可能、(4) 低温 (-40°C) から高温 (85°C) の広い温度範囲で使用可能、(5) 省電力化のため、励起光源としてレーザーダイオードを用いる、(6) 蛍光観察波長は、蛍光フィルタホイールを利用することによって、3~5 波長から選択可能。上記のうち、(3) (5) (6) に関係する部品を製作した。X 軸、Z 軸、θ 軸駆動機構の駆動範囲は、X 軸 32.0 mm、Z 軸 15.0 mm、θ 軸 370° であり、試料面に対して直径 64.0 mm の円内を観察・撮影することができる。光源に関しては、複数のダイオードからの光を、レーザービームコンバイナーを用いて 1 本の光ファイバーに入射して顕微鏡本体へ導入させた。これにより、複数のレーザーダイオードによる多色蛍光観察だけでなく、白色光に

よる反射光観察（明視野観察）も可能である。これらの部品を組み上げ、蛍光染色した培養微生物などを用いて撮像試験を行ったところ、蛍光画像を得ることができた。