螢光顯微鏡と其の改良に就て

工業技術院 東京工業試験所

池 田 英 苗

A Fluoroscopic Microscope and its Improvement

Hidenae Ikeda

Tokyo Kogyo Shikenjo,
Kogyo Gijutsuin

1. 緒 言

生物学や医学の方面に利用される普通顕微鏡には、無染色或は染色したプレパラートを肉眼観察によるもの、投影によるもの、写真によるもの等がある。分散系で肉眼解像力の範囲に持ち来す事の困難なものに対しては、暗視野の限外顕微鏡がある。生態の観察其他染色を避けたい場合には、屈折率の差異を利用する位相差顕微鏡が用いられる。珪肺等組織中の結晶質（等軸晶系を除く）の検索・観察の為に、2枚の偏光板と1枚の四分一波長板を用いた偏光顕微鏡を措いて外にはない。

現在研究途上にあるもの、或は已に一部に於て利用され、将来普及の見込あるものに、紫外線反射顕微鏡写真器・紫外線反射顕微鏡分光器・赤外線反射顕微鏡分光器等がある。更に電子線領域には電子顕微鏡がある。上記の中顕微鏡分光器は被検物の物質確認に用いられるものである。例えば紫外線反射顕微鏡分光器によつて、トバコ・モザイク・バイラスの紫外線分光透過率が測定されている¹⁾。

茲に取扱う螢光顕微鏡も亦研究上の有力な利器である。此を初めて考察したのは K. Reichert (1911) で、此を初めて微生物学方面に応用したのは、P. Melzner (1920) である。此の一文は螢光顕微鏡の原理・実例・其の困難及び困難克服の為に著者の行つた改良に就て述べる。

2. 原 理

螢光性物質は紫外線によつて励起されて可視線領域の螢光を発する。明るい環境中では、其の螢光は輝度が微弱な為に通常観察されない。然し、此に可視線吸収フィルターを通過した紫外線を照射し、紫外線吸収フィルターを通して観察すれば、暗視野の中に螢光が顕著に観察される。夫自身螢光性のないものでも、螢光性色素で染色すれば同じ結果になる。此が紫外線物

質監視器の原理である。

上記2枚のフィルターの中間に顕微鏡を置き、螢光性物質或は螢光性色素で染色した物質を観察すれば、暗視野の中に螢光によつて、普通の顕微鏡の場合よりも一層明瞭に観察することが出来る。此が螢光顕微鏡である。但、此は暗視野観察法である。螢光性被検物と同時に組織を観察する為に、通常両フィルターは孰れも可視部青端を透過するものを用いる。此即ち青地観察法である。

上記染色用螢光性色素を M. Haitinger は Fluorochrom と名付けた。

3. 実 例

螢光顕微鏡装置の実例を第1表に掲げる。

Reichert Lux UV の光源側紫外線透過フィルターと“英弘”の光源側マツダ V-VI の分光透過率を GE 自記分光光度計で測定した結果を図に示す。いづれも可視部赤端を透過している。此の赤端を閉鎖する為に、Reichert は赤線吸収フィルターを使用し、“英弘”は硫酸銅溶液を用いる。

参考の為に M. Haitinger の指示した螢光色素 (Fluorochrome) を第2表に掲げる。

4. 製作及使用上の困難

“英弘”の装置を用いて、倍率 50 倍でオーラミンで染色した結核菌を輝いた点として認めた。200 倍では其の桿状形態を明瞭に観察した。低倍率で斯くも顕著な効果を挙げるのは、視野と螢光色の色度対比に因る。然し螢光の輝度が微弱である為に、明瞭に観察する為の視野と螢光の明度釣合は甚で微妙である。

光学フィルターの主要なものに、色素ゼラチン膜を2枚の硝子板で挟んだサンドキッチ・フィルターと、色硝子フィルターとがある。色素は光線、殊に紫外線に弱い。其の為にサンドキッチ・フィルターは光源側フィルターとしては不適格である。サンドキッチ・フ

第1表 蛍光顕微鏡装置の実例

製作者及名称	光 源	光源側フィルター	接眼フィルター	観 察 法
Reichert (Wien) Lux UV	高圧水銀灯(AC 190V)	紫外線透過 (2 種) 赤線吸収	紫外線吸収	青地観察法
註記 1. 光源背鏡・反射鏡・集光器 (N. A. — 1.40)・スライド等総て UV-硝子 (紫外線透過) 製を使用する. 2. 無蛍光性対物鏡 (×100 は油浸用) がある. 3. 無蛍光性の油浸剤 (屈折率 1.515) 及封入剤 ("Afluol") がある. 4. バクテリア (特に結核菌) 及バイラス観察用補助属品として光源側紫外線及青線透過フィルター及接眼紫外線及青線吸収フィルターがある (螢光励起に青線併用). 5. 不透明試料観察用補助属品として反射光によるオパーク・イルミネーター 及特殊 "Epilum" 対物鏡 (無蓋試料用・乾燥) がある.				
同 上 Lux G	低電圧電球 (6V 5A)	青色 Keller フィルター	紫外線及青線吸収	暗 視 野 法
註記 1. 青線励起. 特に結核菌検索用 (Keller 法 (1938)). 2. 無蓋試料用対物鏡 (×60・乾燥) がある. 3. 油浸用集光器 (N. A. — 1.40) とスライドの間を油浸して 960 倍迄検鏡可能.				
Zeiss (Winkel)	高圧水銀灯 (AC 又は DC 220V)	Schott BG 12 (2mm)	Schott OG 5	青地観察法
矢崎芳夫氏 ²⁾	超高圧水銀灯 (東芝製) (AC 300V 100W)	コバルト硝子 (2 枚) Schott BG 1 (2 mm) 硫酸銅溶液 (2.5% 4.7cm)	イワキ・クロス Y-4 (岩城硝子製)	青地観察法
註記 油浸剤として局方パラフィン (屈折率 1.482) を使用.				
英弘精機産業 KK "英 弘" (新 型)	超高圧水銀灯 (東芝製) (AC 300V 100W)	マツダ V-VI (2 枚) マツダ UV-DI (暗視野用) 硫酸銅溶液 (4% 1.7cm)	紫外線吸収 (3 種) (特種偏光フィルター)	青地観察法 及暗視野観察法
註記 1. 集光器及スライドは石英製. 2. 視準及検知用としてウラン硝子板 (螢光性) を使用.				

第2表 蛍光性色素 (Fluorochromes) M. Haitinger 指示

Acridine orange NO	Fuchsin
Acridine yellow extra	Magdala red
Auamine	Morin
Auorophosphine G	Neutral red B extra
Berberine sulphate	Phosphine 3 R
Brilliant dianile green G	Primuline O
Chelidonium extract	Rhodamine B
Chlorophyll extract	Rhodamine GD extra
Choriphosphine HK,	Thiazine red R
Congo red	Thiazine yellow G
Euchrysin	Thioflavine S
Fluorescein	Trypaflavine

Rejchert Lux UV 及“英弘”の
光源側フィルターの分光透過率

フィルター製作に用いられる接着剤のカナダ・パルサムは螢光を発する。故に此を接眼フィルターとして用いると、其の螢光が明視を妨碍して此亦不適格である。前項の螢光顕微鏡装置の実例に於て、光源側・接眼側共に総て色硝子フィルターを用いているのは其の爲である。

処が色硝子フィルターには個性差異があつて、同じ製造口のものでも其の分光透過率や螢光の有無強弱には相当の開きがある。此の事は光源側フィルターとしては大した問題ではない。然し接眼フィルターとしては、視野と螢光の明度釣合が微妙なものであるだけに、甚だ重大である。此を螢光顕微鏡装置の生産に就いて見るに、特定色硝子フィルター 100 枚中接眼フィルターとして合格するものは 1~2 枚に過ぎない実情である。斯様な実情が装置の生産を困難なものにしている。

更に困難な事情は、顕微鏡倍率の変更に伴つて視野と螢光の明度比が変化することである。或る倍率で適当な明度釣合にあるものも、倍率が変わると其の釣合が破れてしまう。螢光顕微鏡の使用者は、低倍率に適合する接眼フィルターを使用して、倍率を高めて行くと、次第に視野が暗くなり、1000 倍位（油浸）では組織の観察が甚だ困難になり、1500 倍乃至 2000 倍（油浸）では殆ど暗視野中に螢光だけが見えるのを観察されたであろう。此の場合、も少し青線の吸収の少い、即ち薄い黄色の接眼フィルターに取換えなければならないのである。

螢光顕微鏡が世に出てから 40 年、今日尙此が普及しないのは、主として接眼フィルターに関して、上述の通り製作上及使用上の困難がある為と考えられる。

光源として一般に用いられる超高圧水銀灯の利点は、光源が小さいので輝度の高い事である。輝度の動揺の無い事も利点と考えて宜しかろう。分光光度の連続性は必須の要件ではない。要はプレパレート照射光が螢光励起の最適条件になつている事である。

Stokes (1852) が初めて螢光を報告して以来 100 年を経た今日尙、螢光の測定法は満足すべきものではない。螢光励起の条件も充分に把握されて居らず、螢光顕微鏡の光源光、プレパレート照射光、視野と螢光の明度釣合の条件等も充分に測定或は計算されていない。現在の螢光顕微鏡は測定に基く理論の裏付を持たず、経験的に発達したものである。此に就て Levaditi と Prudhomme (1948)³⁾ とは検討を加えて、次の様に結論した。「現在の螢光顕微鏡は理論上の理想から全くかけ離れている」。

5. 接眼偏光フィルターの完成

接眼フィルター撰択に関する前節の困難を解決する為、可視線部分偏光板を採用した。此のフィルターは 2 枚の偏光板から成り、此を重ね合わせる角度によつて青線の透過率は変化するが、螢光色領域の透過率は変らない。

此を接眼鏡の上に載せて、2 枚の偏光板を青地が最も明るく見える位置に止める。絞りを入れると、青地の組織だけが明瞭に見え、螢光は見えない。絞りを開き、偏光板の 1 枚を固定して他の 1 枚を廻すと、青地が減光すると共に螢光が輝き出して、遂に全体が観察に適当な状態になる。更に此を廻すと青地は次第に暗くなり、暗黒の視野に螢光が燦然と輝くに至る。

接眼偏光フィルターの効用を記せば

1. 螢光顕微鏡装置の工業的生産が容易になつた。接眼偏光フィルターが総ての装置に適合するからである。
2. 如何なる倍率に於ても常に良好な明度釣合を保たせることが可能になつた。明度の不釣合を是正するには可動偏光板を廻して調節すれば良い。
3. 青地観察法から暗視野観察法に移る事が出来る。
4. 螢光顕微鏡天然色写真の撮影が容易になつた。肉眼の最高視感度は 580 mμ 附近にある。写真は青線部に感度が高い。従つて写真撮影には肉眼の場合よりも青地を強く減光しなければならない。簡易に青地減光の程度と撮影条件を決定する方式はこれから研究する。

接眼偏光フィルターはアメリカの Polaroid corp

の偏光板と同様なものであるが、ポリビニル・アルコール膜を基礎材として作った。此に著者が先に完成した無蛍光性紫外線吸収剤を配合し、接着にはカナダ・バルサムを避けて、無蛍光性の合成樹脂を使用した。

6. 残された問題

矢崎氏は多数のオーラミン色素を比較検討し、最も強力な蛍光性色素として Auramine Fl (保土谷化工) を選定した。然し染料工業の實際が不純の儘合成工程が進められ、製造口毎に仕上り品の色調が相違する事から見て、此が常に強力な蛍光性を確保するか否か疑念を持つ。著者は硫化蛍光剤に賦活剤を加えると同様な処理で、蛍光性色素の賦活が可能であると信じ、此の研究を予定している。

Reichert 社では無蛍光性の油浸剤 (屈折率 1.515) と封入剤 "Afluol" とを提供している。矢崎氏は無蛍光性油浸剤として局方流動パラフィン (屈折率 1.482) の使用を指示した。著者は完全なアプラナートの実現を期して、屈折率 1.518 の油浸剤を試作したが、多少臭気があつて好ましくない。他日無蛍光性の油浸剤と封入剤を完成したい。

光度関係を測定して、蛍光顕微鏡を検討することも重要な問題である。Beckman 型の分光光度計は簡便であるが、此の目的には適しない。Beckman 型の欠点を挙げると、

1. 広範多岐な測定要求に応ずることが出来ない。
2. 特定の測定に於ても、方法の改善や変形を許さない。
3. 理学上の測定の為には精度が不充分である。

著者の研究室では和蘭の Kipp & Zonen 社の鏡面式複式単色光器 (Mirror Double Monochromator) を購入した。石英・硝子・岩塩の3種のプリズムを交代使用して、紫外線・可紫線・赤外線的全域、波長 240 mμ から 16 μ 迄の単色光が得られる。単色光の性質 (純度や収差等に関して) の良さは他に比類がない。此を用いて、先づ分光透過率測定を、次に分光エネルギー分布測定を整備する予定である。此で蛍光顕微鏡の光度関係の測定が可能になる。

蛍光関係の測定には新しい方法を考えている。一方に其の準備として grübler 社 (Berlin-west) ・ gurr

社 (London) ・ Geigy 社 (Bale) 等の蛍光性色素21種を入手した。

分光測定に関して、我々は重要な基礎的事実を発見した。プリズムを屈折透過した光線は偏光している。此に就ては同僚の水島容二郎技官が測定研究中である。其の結果に基づき、完全偏光の偏光器を併用すれば、偏光板の光学的性質の測定及計算は簡単になり、且、従前よりも一層明確な結果が得られるであろう。

著者は別に中心とする研究テーマを持つてゐる。然し以上は中心テーマと至大の関係のある事でもあり、多少時日を要するが本問題の解明を期している。

7. 結 論

1. 蛍光顕微鏡の原理・装置の実例・蛍光性色素の種類を述べた。
2. 蛍光顕微鏡の優秀な性能は視野と蛍光色の色度対比を利用した事に由来する。
3. 然し明視に必要な視野と蛍光の明度釣合が極めて微妙であり、接眼色硝子フィルターには個性差異があるので、蛍光顕微鏡装置の製作は甚だ困難である。
4. 使用に当つても倍率の変更に伴つて明度比が変化して良好な明度釣合が破れる。
5. 前記の困難を排除する為に、著者は接眼偏光フィルターを採用した。其の利点を挙げると、
 - (1) 蛍光顕微鏡装置の工業的生産が容易になつた。
 - (2) 如何なる倍率に於ても常に良好な明度釣合を保たせることが可能になつた。
 - (3) 青地観察法から暗視野観察法に移ることが出来る。
 - (4) 蛍光顕微鏡天然色写真の撮影が容易になつた。
6. 蛍光性色素の賦活・無蛍光性の油浸剤及封入剤の研究について述べた。
7. 光度関係の測定に基く蛍光顕微鏡の検討・理論の裏付けについて述べた。

蛍光顕微鏡について種々御教示にあづかつた日本慈恵会医大の矢崎芳夫教授、及び絶えずプレパラートを供与され御援助を賜つた横浜医大の桑島直樹教授に厚く御礼を申上げる。

文 献

- 1) J. T. Randall 其他: Trans. Faraday Soc. Discussion 9, 353—503 (1950).
- 2) 矢崎芳夫: 成医会雑誌 64. No. 1, (昭和 24 年).
- 3) J. C. Levaditi et R. O. Prudhomme: Ann. Inst. Pasteur, 75, 217—22 (1948).

Reichert 社編: Literatur zur Fluoreszenz-Mikroskopie (1951).

1852 年 Stokes の蛍光に関する最初の報告から 1950 年に至る迄の蛍光顕微鏡の基礎事項・製作・応用例等の文献が集められ良く整理してある。本稿中文献を提示しなかつたものに就ては、本集を利用されたい。

Bräutigam u. Grabner 編: Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie (1949).

Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik の雑誌 "Mikroskopie" の特別号である。

螢光顕微鏡に関して Reichert 社が最も多く寄与しているのは、K. Reichert 以来の伝統もさる事乍ら、Wien 大学の Prof. Dr. H. C. Max Haitinger (1946 没) 及其の門下の協力に負う処が大い。本書は門弟達が執筆編輯して、亡師に献呈したものである。生物学や医学は著者の専攻外ではあるが、良書たる事を信じて疑わない。

参考の為、茲に其の内容を記す。

Dr. H. C. Max Haitinger, der Begründer der modernen Fluoreszenzmikroskopie
Von Dr. Frilz Bräutigam (18 頁)

Fluoreszenzmikroskopie
Von Dr. Frilz Bräutigam u. Prof. Dr. Alfred Grabner (12 頁)

Die Bedeutung der Fluoreszenzmikroskopie für die Pashologie
Von Prof. Dr. Hans Eppinger (9 頁)

Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen
Von Prof. Dr. Karl Höfler (25 頁)

Die Emission polarisierten Fluoreszenzlichtes (Difluoreszenz) durch gefärbte Zellulose und Kutinmembranen
Von Dr. Habil Hermann Ziegenspeck (15 頁)

Die gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien
Von Prof. Dr. Siegfried Strügger (16 頁)

Die Bedeutung der Fluoreszenz in der Mineralogie und Petrographie
Von Prof. Dr. Herbert Haberlandt und Prof. Dr. Alexander Köhler (17 頁)

Zur Wirkung des Coriphosphins auf die Pflanzenzelle
Von Prof. Dr. Karl Höfler und Theodora Müllner-Haitinger (8 頁)

Sjöstrands Verfahren zur Feststellung einer Eigenfluoreszenz in animalen Geweben sowie Befunde in diesen und besonders in der Niere
Von Prof. Dr. Viktor Patzelt (5 頁)

富士X-レイフィルム

“富士 X-レイフィルム” は増感紙感度に重点を置いて製造されていますから胸部撮影に最高の性能を発揮します

“レンドール” (富士 X-レイフィルム現像剤)

使用液: 2.000c. c. 用

レンドールは富士 X-レイフィルム指定処方による調合剤混合剤で主剤 補助剤とも最高 純度のものが使用してあります。従って現像液の持ちはよく理想的な調子に仕上げる上、一々調合する手数を必要とせずスピーディに仕事はかどるので好評です。

“フジフィットクス” (富士酸性硬膜定着剤)

使用液: 4.000c. c.

フジフィットクスも亦富士の純粋 薬品を組合せて造った酸性 硬膜定着剤です。各薬品の純度が高いので液は容易に汚染せず短時間で完全に定着 効果を挙げます。仕事のスピーディに運ぶことは富士の他の混合剤と同様です。

富士フィルム