

# ルーミン博士のEpi蛍光モジュール・蛍光に関するQ&A(Ⅰ)

## LW Scientific社蛍光関連製品

- i4 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Epi-蛍光モジュール
- Mi5 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Kit



### 1. 蛍光はどうして光るのですか？

物質(染料)には、エネルギーを吸収して、エネルギーの高い不安定な励起状態となり、それが基底状態に戻る際に余分なエネルギーを光(発光)として放出するものがあります。この発光現象をルミネッセンスと云い、**蛍光は、フォトルミネッセンスの一種で、光エネルギー(紫外・可視光)で励起し、励起光より長波長の可視蛍光を発光します。**蛍光は光エネルギー照射を止めると発光も止まります。

### 2. 顕微鏡用染色では染まらないが、蛍光染色では染まる染色技法がありますか

はい、それは今後ますます増えるでしょう。暗視野で発光した蛍光体は、実サイズでは見えない海水微生物のウイルスが、強蛍光性SYBR Goldで核酸染色するとピンホール状発光体として観察できます。蛍光核酸染色は**グラム染色できない細菌や微生物を含め微生物のほとんどを染色します。**複数の蛍光染料を標識した抗体による**複数菌種の多色多重染色**、さらに、**代謝活性や酵素活性染色が可能**ためCFDAやCTGとDAPIなどの染料を組合せた生・死細胞の分別染色ができます。これらはEpi-蛍光モジュール設置蛍光顕微鏡でも観察可能です。

グラム染色で染色できない微生物例: *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp., *Aspergillus*などの糸状菌  
染色困難な細菌: *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Bacteriodes* spp., *Fusobacterium* spp., *Brucella* sppなどがある。

### 3. LW Scientific社の蛍光を観察する3製品は、どんな基準で選んだら良いですか

蛍光観察のための3製品(LW Scientific)

① 蛍光顕微鏡タイプ: [LW Scientific i4 Epi Fluorescence LED](#) (対物レンズ4種)、[LW Scientific Mi5 Epi Fluorescence LED](#) (対物レンズ5種)

② Lumin™ Epi-蛍光モジュール: ● [LWI4P-EPIL-485N](#) (i4顕微鏡仕様) ● [LWI5P-EPIL-485N](#) (Mi5顕微鏡仕様)  
● [LWOLY-EPIL-485N](#) (オリンパス仕様) ● [LWNKN-EPIL-485N](#) (ニコン仕様)

Epi-蛍光モジュールは、励起光により [EPIL-485N\(485nm\)](#) [EPIL-450N\(450nm\)](#) [EPIL-330N\(330nm\)](#) が準備されています。

③ Lumin™ Kit : (LED イルミネーター + 対物レンズ20X、40X、60X、100X いずれか1個)



① Mi5,i4 Epi Fluorescence LED (Epi-蛍光モジュール搭載機種)



② Lumin™ Epi-Fluorescence Module (以下Epi-蛍光モジュールと表記致します)



③ Lumin™ Kit

\*②、③は光学顕微鏡の適合機種が限定されます。  
②、③それぞれ適合機種は合致しません。

- 1) 顕微鏡のご購入を予定されている方は、①から、既に光学顕微鏡をお持ちの方は②、③からお選び下さい。
- 2) 既存の光学顕微鏡がEpi-蛍光モジュールに適合タイプかをお調べください。設置可能であれば、機能性、利便性上からは、②の**Epi-蛍光モジュールをお勧め致します。**価格差は約1.6倍高額(Δ135,000円)です。(Epi-蛍光モジュールはニコンやオリンパスCXシリーズ、BXの一部にも装着可能です。)
- 3) 真菌、原虫などの観察でしたら光源光は弱いですが③Lumin™ Kit で対応可能です。

### 4. 蛍光染色のメリットと食品、畜産、農水産分野など応用分野を教えてください？

蛍光は暗視野で発光するため**低倍率での観察が可能**です。(抗酸菌染色では200倍、400倍での観察が可能で、観察作業の効率化と迅速化が期待されます。)発光体の観察は**検出が容易**です。また、蛍光物質を特異反応体(抗体やレクテンなど)に標識した**多重特異染色**や蛍光性合成基質を用いた**生菌・死菌の分別染色**が可能です。さらに、**強蛍光性染料SYBR Goldを用いた海水中ウイルスの染色**も試みられています。

蛍光染色は臨床検査や栽培漁場など水産分野における水質管理や魚類のフローラ分析、農業分野における土壌微生物管理や環境・果実の微生物分析、発酵分野での微生物モニター、畜産分野、居住環境、林業、食品製造・加工など多方面での微生物管理や細胞監視を中心とした簡易な総合的スクリーニング法としてその意義が高まっています。

- i4 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Epi-蛍光モジュール
- Mi5 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Kit

## 5. 蛍光顕微鏡はどのような機構で蛍光を観察するのですか

一般的な落射式蛍光顕微鏡(左図)は、接眼レンズと対物レンズの間に励起光を入射・反射させ標本を照射します。生じた特異蛍光が透過できる特殊なダイクロイックミラーを透して蛍光を観察します。広域光の強光源と狭域選択分光および特異蛍光の選択機構が機器の性能を左右します。右図に示した、LEDによる特定単色励起光(例485nm)では抗酸菌や真菌の蛍光染色および蛍光抗体法など限定的な蛍光染色だけでなく多くの蛍光染料の観察が可能です。



## 6. 蛍光顕微鏡は高額と聞きますが、Epi-蛍光モジュールを設置するだけで蛍光を観察できますか？

はい、出来ます。但し、顕微鏡はEpi-蛍光モジュール対応モデルである必要があります。高額な蛍光顕微鏡は、強広域スペクトルの光源、特定励起光の選択、特異蛍光の選別と同時に高機能なレンズ機能と画像編集などを備えています。価格帯は概略で、共焦点レーザー顕微鏡(数千万円)、蛍光顕微鏡(数百万円)、Epi-蛍光モジュール(数十万円)です。当然分析可能な内容や機能・性能、用途は大きく異なります。Epi-蛍光モジュールの励起光は限定波長のみですが、既存の光学顕微鏡の三眼鏡筒と鏡栓(アーム)の間にEpi-蛍光モジュールを設置後は光学および蛍光観察ができます。

## 7. 微生物検査にEpi-蛍光モジュールの導入を検討しています。導入の利点を教えてください

Epi-蛍光モジュールは、**低価格、長寿命、即応性、低電力、低発熱**での稼働を特徴とし、同時に多くの蛍光微生物染色の観察が可能です。既存の光学顕微鏡に設置するため**対物レンズの倍率、機能はそのまま**で、光学顕微鏡に蛍光観察機能を付加します。LED光は、その特性から低電力で特定波長を照射し**適合蛍光体を励起**します。また、Epi-蛍光モジュールはレバーを引き出すだけで電源が入り、直ちに**蛍光の観察**ができます。

現在、[EPIL-330N\(DAPI仕様\)](#)、[EPIL-485N\(FITC仕様\)](#)、[EPIL-450N\(450/510\)](#)と3種の励起光の機種が準備され、ユーザー指定波長への対応、2種波長搭載機も特注対応しています。

LED光源寿命は50,000時間＝理論上は概略(1日4時間使用)×(1年250日使用)×(50年使用)となります。

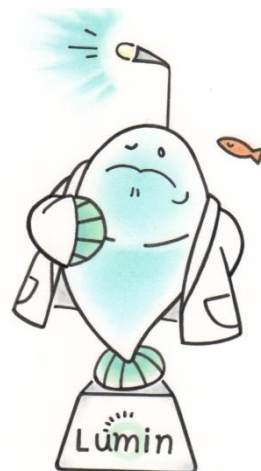
## 8. Epi-蛍光モジュール EPIL-485Nの導入を検討中です。FITCで蛍光免疫染色し、DAPI封入剤で核染色したいが観察は可能ですか？

EPIL-485NはFITC仕様で問題ありませんが、DAPIは二本鎖DNAに結合すると励起光358nmに吸収極大を、461nmに蛍光極大を示します。従って、**EPIL-485NではDAPIの励起はできません**。赤色に色調は変わりますが核染色を7-AAD(Ex:546/Emit:647)、Ethidium homodimer 1(528/617)、ヨウ化プロピジウム(530/625)など485nmで励起可能な核酸染色染料を検討されてはいかがでしょうか。または、EPIL-330N(DAPI仕様:Epi-蛍光モジュール)と2段に重ねる事も可能です。もしくは、2波長搭載機の特注機購入をご提案致します。

# ルーミン博士のEpi蛍光モジュール・蛍光に関するQ&A(Ⅱ)

LW Scientific社蛍光関連製品

- i4 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Epi-蛍光モジュール
- Mi5 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Kit



## 9. Epi-蛍光モジュールは暗室でなくても蛍光観察できますか？

暗室内でなくとも観察は可能ですが、但し、蛍光輝度の低い発光体を観察する場合は目当てを使用するか、周辺を暗くした方が観察は容易です。特に、観察時の対眼部位に明るい光があると観察し難くなります。顕微鏡目当てグッズとしては、LW Scientific社製または他社製品のboya fit(マイクロネット株式会社)なども効果的です。また、特に光の影響を受け易い標本を観察される場合は暗室の使用を推奨致します。

## 10. Epi-蛍光モジュール 型式EPIL-485Nで観察できる具体的な蛍光染料は？

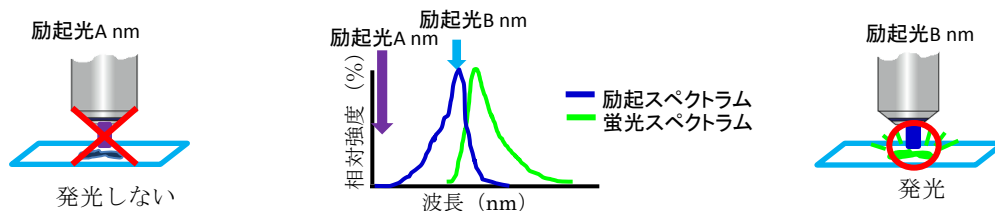
EPIL-485N は、(励起光485nm/510nm以上の蛍光)を観察できます。励起可能な主な蛍光染色例

- |  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| ●抗酸染色<br>Auramone O<br>Auramone O/ Rhodamine B<br>Phenol-Acridine Orange | ●真菌染色<br>Fungi-Fluor Kit,<br>ファンギフローラY<br>"KBM" GPフルオファンギー | ●核酸染色<br>SYBR Green<br>SYBR Gold<br>Acridine Orange | ●生菌・死菌染色<br>fluorescein diacetate(FDA)<br>carboxyfluorescein diacetate(CFDA)<br>5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride(CTC)<br>とPIとの重染色 |
|--|--|---|---|
- FITC標識の蛍光染色
- 485nmで励起される数多くの蛍光染料にも応用可能です。

\* EPIL-485N と近接波長のEPIL-450Nは、Auramone O 染色、Auramone O/ Rhodamine B染色、Phenol-Acridine Orange 染色などの抗酸染色、Acridine Orange核酸染色および真菌染色における発光増強を目的に開発されました。

## 11. 蛍光顕微鏡で蛍光染色標本が観察できません、なにが原因ですか？

まずは、**蛍光観察には、励起光源搭載の顕微鏡が必要です。**蛍光観察可能な顕微鏡としては、高額な蛍光顕微鏡から特定励起波長のLED光を発するEpi-蛍光モジュールを搭載した安価な顕微鏡などが挙げられます。**最も重要な点は、使用した蛍光染料を励起させ得る励起光が顕微鏡に備わっていると云う事です。**(励起出来ない励起光では蛍光体は発光しません。)但し、励起光は蛍光染料の励起スペクトルのピーク波長でなくとも強い光源の励起光であれば数十%域の励起スペクトルでも十分に観察可能な場合もあります。**蛍光顕微鏡で蛍光染色標本の観察が出来ない原因の多くは励起光不適です。**



## 12. 蛍光染色試薬は高額な気がしますが

染色液にもよりますが、蛍光体標識の染色試薬は高額なものが多い様です(標識試薬は蛍光に限らず高額です。)。核酸染色液のSYBR Goldも原液0.5mLで3万円弱と購入価は高額ですが、原液は10,000倍濃縮液であり、使用液濃度に換算した場合は高額ではありません。他の染色液も、商品調査により安価な市販品や自家調整により安価となる試薬類もあります。蛍光試薬は長期保存に弱く高額感を助長しますが、有益な染色情報が得られれば高額感は払拭できるかも知れません。

- i4 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Epi-蛍光モジュール
- Mi5 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Kit

### 13. 蛍光染色の顕微鏡画像はモニターに映せますか？

はい。無線タイプのMini VID WiFi Camera, と有線タイプのMini VID USB, 5.1MP Cameraが準備されており、顕微鏡の3鏡筒の上部もしくは接眼鏡筒部に設置し、パソコンのモニターに映せます。観察室での映像を診察室のモニターにリアルタイムに映し出して患者様への説明に活用、検出が稀な貴重な標本画像や判断に躊躇した画像を教育画像として保存記録として、または、抗酸菌陽性標本をデジタルデータとして染色画像を保存できます。

### 14. 蛍光染料の励起スペクトル、蛍光スペクトルの調べ方を教えてください

蛍光染料を活用するには、染料の励起および蛍光スペクトルを知っておく必要があります。これらの資料を調査するには、インターネット検索エンジン(例: Google)に染料名(英語名が望ましい: 商品名と染料名は区別する)、[excitation spectrum](#)、[emission spectrum](#)とキーワードを入力し検索すればヒットします。また、Ex: Excitation Wavelength / Emit: Emission Wavelengthとしてスペクトルのピーク値のみを表記した一覧表もあります(例Ex:546/Emit:647)。表記スペクトルは染料フリーか核酸、タンパク質等と結合したものかを確認してください。

### 15. 蛍光染色は褪色し易いといわれていますが対策はありますか？

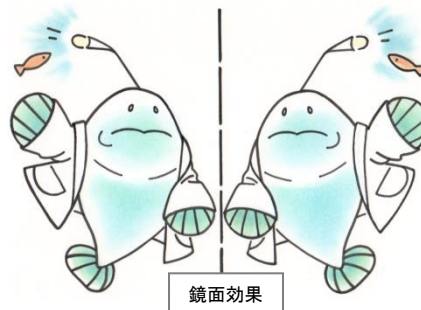
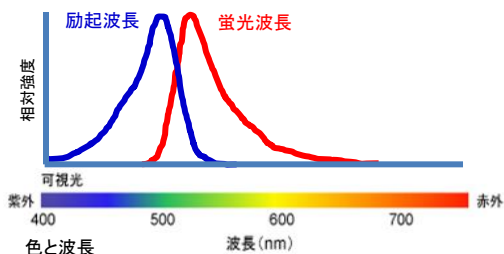
一般的に蛍光染色標本は褪色し易いことを念頭に置き、染色を終えた標本は速やかに観察、標本への不要な励起光照射は避ける、保存画像はデジタルデータとして記録する、観察時以外は遮光箱にしまうなどを慣習化されると左程支障はありません。一般に高エネルギー(紫外域)での励起照射ほど褪色は大きい傾向にあります。

市販の蛍光染色用褪色防止剤入り封入剤例

Fluoromount/Plus™, EverBrite™, ProLong® Gold, VECTASHIELD Mounting Mediumなど

### 16. 励起スペクトルと蛍光スペクトルの見方を教えてください

光は波長により紫外線(400nm以下)、可視光線(380nm~800nm)、赤外線(800nm~1000nm)とに分けられています。励起スペクトルは蛍光波長を固定し、励起光の波長を走査して測定したもので、最も強い蛍光強度を示した波長が最適励起波長でスペクトルのピークを示します。蛍光スペクトルは最適励起波長を固定して測定します。蛍光スペクトルのピークは励起スペクトルのピークより長波長側にあります。また、励起スペクトルと蛍光スペクトルには鏡面効果が見られます。発光する蛍光波長により観察される色調が異なってきます。従って、同じ励起波長でも収束する蛍光フィルターにより異なる色調での観察が可能です。励起スペクトルは励起強度と励起可能スペクトル域を示します。特に光が収束するLED光源では使用波長は特に重要となります。



- i4 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Epi-蛍光モジュール
- Mi5 Epi-蛍光顕微鏡 LED
- Lumin™ Kit

## 17. 高額な蛍光顕微鏡を備えているので、Epi-蛍光モジュールは不要とお考えの方へのご提案です

蛍光染色は、染色工程や標本間での染色性の可否評価ができず染色終了まで判断できません。染色液1 $\mu$ Lの追加が染色の成否を分けたりもします。また、観察室と染色室が離れているため作業が不便とのご意見も多く聞きます。染色作業室にEpi-蛍光モジュールを搭載した顕微鏡を設置し染色性の成否を確認しながら作業を展開されてはいかがでしょうか。さらに、不備な励起光域の補充としても一策かも知れません。Epi-蛍光モジュールは即応性に優れ、お役に立てると確信致します。

## 18. 微生物の蛍光染色は、初心者には難しいですか？

いいえ難しくありません。抗酸菌・真菌染色や微生物の核酸染色等の蛍光試薬キットや溶解染料などが数多く市販されており、添付書にしたがって操作すれば染色できます。蛍光染料を用いる以外は可視染料での染色操作と同等、むしろ迅速・簡易な染色法も数多くあります。染色時に、陽性、陰性の管理試料と一緒に染色することを慣習化し、染色後は、可視染色と比較し他場合やや退色し易い事を配慮すればより堅実な染色ができます。

## 19. Epi-蛍光モジュールは、光学顕微鏡の観察時は外さないといけませんか？

いいえ、設置したまま光学顕微鏡の観察ができます。Epi-蛍光モジュールは取手を引く(ON)、押す(OFF)だけで蛍光観察が可能です。蛍光OFF状態で光学顕微鏡の観察ができます。従って、可視光下で焦点を合わせた後、蛍光に切換えると暗視野下での焦点調整が容易です。また、蛍光ONの状態でも蛍光光源を入れると蛍光・光学が同時に観察出来るため細胞の位置関係の理解が容易です。



Epi-蛍光モジュール取手(ON,OFF)



## 20. 白癬菌検査の蛍光染色は有用と聞きますが、私は、無染色標本でも高い検出率をあげています

暗視野で発光する蛍光染色は有用な検査法ですが課題もあります。白癬菌検査では、厚い組織試料もあり染色液の浸透性と細胞に覆われた菌体の励起には課題もあります。無染色標本の場合は、下からの透過光で観察するため菌の存在を判断するのが容易です。しかし、やや厚い組織表面付近に絡んだ菌影は透過光では見落とす可能性もあります。このような症例での蛍光染色は有効です。Epi-蛍光モジュール設置後は透過光+蛍光の同時併用が可能です。以下に2例(試料2, 3)の同一部位の光学顕微鏡と蛍光顕微鏡での観察例を提示しました。

