

原生生物の蛍光分光光度計による細胞数の計測

6年C組 西村 咲野

指導教諭 櫻井 昭

1. 要約

ミドリゾウリムシとブレファリズマの「ある特定の蛍光色素を反射すること」を利用して、蛍光分光光度計を用いて、培養液中の生きた微生物の個数を計測することを試みた。ミドリゾウリムシは、培養が不安定であり、細胞数の計測まで至らなかった。ブレファリズマは、培養が安定的に進み、細胞数の計測を行うことができた。その結果、実際に細胞数を希釈法でカウントした時と、蛍光分光光度計で計測した波長の変化には、ある一定の相関関係を見出すことができた。

キーワード 蛍光分光光度計(以下 Qubit) *Paramecium bursaria*(ミドリゾウリムシ)、*Blepharisma*(ブレファリズマ)

2. 研究の背景と目的

4年生から培養していたミドリゾウリムシの細胞数のカウントは毎日大変だった。不在時には友達にカウントをお願いしたこともあったが、上手く培養できたときは特に大変で、10 μ Lの小さな水滴の中を泳ぐ10cells以上ものミドリゾウリムシを目で追うのは至難の技だった。そこで、今年、ミドリゾウリムシを新たに培養し始めるにあって、カウントをより簡単するためにQubit(蛍光分光光度計)を用いたカウントの可能性を探ることにした。

3. 研究内容

3-1 実験仮説

ミドリゾウリムシ及びブレファリズマの色素は、光を吸収するとある特定の蛍光を発することで知られている。よってミドリゾウリムシ及びブレファリズマにある特定の波長を照射すると、照射した光とは異なる波長の光が発せられると考えた。また、

これらの繊毛虫の色素は蛍光色素であり、発せられる光は蛍光のためその波長はQubitにより検出測定される。細胞数が多くなるにつれて単位体積あたりの蛍光色素の数が多くなるため、同じ波長の光を照射した時、細胞数が多いほど発せられる蛍光の波長は大きいと考えられる。よって、測定された波長とセル数の間に何らかの式を立てることができる。

3-2 実験1

3-2-1 目的

ミドリゾウリムシ(5月、6月)とブレファリズマ(7月以降)を材料に、個体数のカウントと、Qubitによる計測を並行して行い、相関関係を調べる。

3-2-2 実験方法

ミドリゾウリムシとブレファリズマの個体数カウントの方法は材料によらず同じである。

準備1: 培養液のみをチューブに入れ Qubitの fluorometer モードで赤色光(635nm)と、

青色光(470nm)の照射をそれぞれ行い、コントロールデータを測定しておく。

	g	blue	fr	r	fr
5月7日		49.24	216.22		74.71

(比較参考データ)

準備 2: ミドリゾウリムシまたは、ブレファリズムを新しい培養液に移す。

カウント方法:

① クリーンベンチ内で培養液を、ディプレッションスライドガラスへ 1 mL 取り出す (滅菌済みピペットを使用)。

② 取り出した培養液からマイクロピペットを用いて、Qubit の観測用のチューブ 100 μ L \times 3 本、目視でのカウント用のシャーレに 10 μ L \times 10 ドロップ \times 2 セットにわたる (図 1)。

③ Qubit の fluorometer モードで赤色光 (635nm) の照射、青色光(470nm)の照射を ② で用意した 3 本のチューブに対して行う (図 2)。

④ ② で用意したシャーレを双眼実体顕微鏡にセットしセル数を計測する

なお、カウント作業は毎日昼 12:40 から行った。

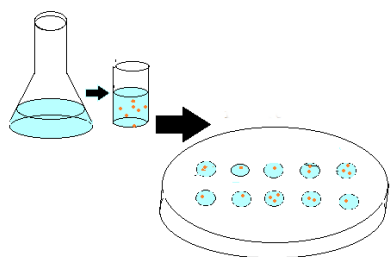


図 1 シャーレへの分配イメージ

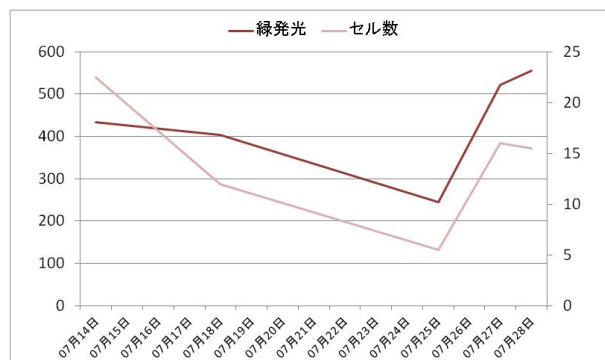


図 2 Qubit の fluorometer mode

実体顕微鏡で観察したとき、色が抜けたようになっているブレファリズムが多く見られた。ブレファリズムは長く光に当たると、自らがもつ色素を分解する性質があるとのことだったので、8/30 からは、インキュベータから取り出す時は段ボールの中に入れて運ぶなど、余分な光に直接さらさないように工夫した。

3-2-3 実験結果

ミドリゾウリムシを用いた実験では、個体が安定的に増殖せず、Qubit を用いた蛍光色素での計測を行えなかった。7月以降に培養を始めたブレファリズムは、個体が安定的に増殖したため、Qubit を用いた蛍光色素での測定を行うことができた。その結果は、グラフ 1 のようになった。



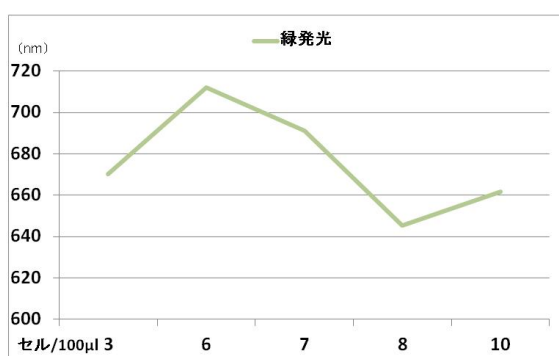
グラフ 1 ブレファリズムの目視による個体数変化 (セル数)と、Qubit による蛍光色素の波長の変化(緑発光)

3-3 実験2

3-3-1 目的

波長計測用とセル数の計測用の100 μ Lの中に、細胞が等しく入っている可能性は低くはないが、確かでもない。そこで、9月4日からのカウントでは細胞数を波長計測用、セル数のカウント用の間で確実に等しくするために、各回で Qubit の計測に用いたチューブ(3本)内の培養液をシャーレに移し実体顕微鏡でカウントし、細胞数と Qubit で計測された蛍光の波長のデータとの一対一対応を調べることにした。

3-3-2 結果



グラフ2 培養液中の細胞密度に対する反射光の波長の関係

結果のグラフは一次関数様になるのが望ましい。

4. 考察

セル数との相関がみられたのは緑色光の波長のみであった。青色光照射時の遠赤色光、赤色光照射時の遠赤色光では相関は見られなかった。

実験1のデータ(グラフ1)ではセル数と蛍光波長のデータが似通った推移を見せた。だが、100 μ L中のセル数、即ち細胞密度と蛍光波長との関係を数式にするには、相応の数学が必要なので断念した。

ブレのセル数と、緑色光の発光量の関係を見るために行った計測では相関がみられなかった(相関係数 0.0935) (グラフ2)。

5. 結論

今回の研究目標が達成できなかった主な原因を以下にあげる。

- (1) Qubit のチューブに入れる培養液の量が100 μ lでは少なすぎ、Qubit が十分に性能を発揮できるだけの蛍光色素の量に達していなかった可能性がある。
- (2) セル数と波長の一対一対応の実験は実験期間が短く取れたデータ数が少なすぎ、それぞれのセル数に対応する蛍光波長のデータが十分に取れず平均が取れなかった。
- (3) セル数と波長の一対一対応の実験(実験2)ではセル数をコントロールしなかったため、データが偏って出た。

今後の展望としては上記の原因を解消して、実験に十分な時間をかけて、さらなるデータ収集を行い、数学を勉強するか数学ができる人に手伝ってもらえば目的の式が得られる可能性は十分にある。

またこれが実現すると、他の蛍光色素をもつ原生物(ソライロラップムシなど)のカウントへの応用が期待できる。

6. 謝辞

ミドリゾウリムシ、ブレファリズムの準備や実験計画への助言などで多くの協力をいただいた櫻井先生、不在時に植え継ぎを請け負ってくれた結崎さん、細かな質問に返答をして下さった神戸大学理学部洲崎敏伸教授に、この場を借りてお礼申し上げます。