

生物光学顕微鏡ワークショップ
— 試料作製法および顕微鏡技術について —



日本木材学会・組織と材質研究会

2003年3月24日

九州産業大学（福岡市）

目次

木材の永久プレパラート作製法 ー実験書には載っていない2つの耳寄りな技法についてー 北海道大学大学院農学研究科 佐野 雄三	1
生物光学顕微鏡観察の最先端技術、画像処理手法 ー共焦点顕微鏡を用いてー 京都大学大学院農学研究科 研修員 尾形 善之	4
生物顕微鏡のしくみと各種観察法の原理・特徴 オリンパスプロマーケティング（株）オリンパスアカデミー 田中 隆明	9
付. ワークショップ概要	13

木材の永久プレパラート作製法

-実験書には載っていない2つの耳寄りな技法について-

北海道大学大学院農学研究科
佐野 雄三

木材の永久プレパラート作製に特有の問題として、高比重で硬い試料を薄切するための軟化処理が厄介なこと^{1,6)}、染色～脱水の過程で切片が丸まってしまい封入に手間どること^{1,3)}が挙げられる。そこで、これらの問題をなるべく解消するために筆者がおこなっている簡便な一時的軟化法、および薄切後の工程で切片が丸まるのを軽減する方法について紹介してみたい。副題通りの感想をもっていただければ幸いである。

なお、ここで紹介する経験談は、替刃（S35、フェザー社）を使った滑走式マイクロトームでの作業経験に基づいている。一般に、木材の木口の切削にはよく研いだ肉厚の鋼刃が最適で、カミソリは刃先の耐久性が低いため使用に適さないとされている⁷⁾。実際に重硬材の切片をマイクロトームで作製するとき、肉厚のカッターナイフの使用によりカミソリ状の替刃と比べて切削性が大きく向上することが昨年度の木材学会大会において報告されている⁸⁾。このように、切削性はナイフの種類やマイクロトームの機種にも大きく左右されるため、技法の評価をする際には使った道具について留意しておく必要がある。

1. 簡便な一時的軟化法について

高比重で硬い木材（比重 1.0 以上）の永久プレパラートを作製する場合、試料薄切の前に軟化処理をおこなわないと、裂けや厚さムラなどの欠点が頻発して満足な切片を得ることができない。それほど重硬ではない樹種（比重 1.0 以下）の場合でも、芯持ちあるいは切削面の大きな木口の試料など、軟化処理せずに厚さムラのない切片を得るのが難しい試料は少なくない。

軟化法は、薬品を使って試料を永久的に軟化する方法、切削時のみ一時的に試料を軟化する方法に大別される。このうち永久的な軟化法については、フッ化水素酸（市販品を 2 倍に希釈して使用）で処理する方法^{1,3,4,6)}、70℃程度の温度でエチレンジアミン（4%水溶液）により処理する方法^{2,3)}、水・グリセリン混液に浸漬して長時間煮沸する方法^{4,5)}などが知られている。これら永久的な軟化法にはそれぞれ一長一短があるようで、試薬の毒性が高く作業に危険がともなう、細胞壁が膨潤する、長い時間を要するなどの難点が指摘されている。

一方、一時的な軟化法としては、マイクロトーム上で試料を薄切するときにノズルから水蒸気が噴射する装置により試料表面を加熱させながらおこなう方法⁶⁾が考案されている。この一時的軟化法については、近年の実験書では触れられていず、不明の点が多い。今後、その効果について検証してみる価値があると思われる。

筆者が適用している簡便な軟化法とは、白熱電球、温風器（ヘアドライヤー）、ヒーティングケーブルなどの電熱器で試料を 40～50℃に温めながら試料を薄切する方法で、原理的には水蒸気噴射による一時的軟化法と同類である。感覚的には、試料の表面温度が 40℃程度まで上昇すると、切削性が向上するように思われる。簡便で危険が少ないことが大きな利点である。しかし、適用範囲には限度がある。これまでの経験では、日本産でもっとも重硬な部類に属する樹種（例えばアカガシ）、芯持ちで常温では薄切しにくい試料（図 1）には効果がみとめられた。これに対して、比重が 1.0 を超える著しく重硬な外国産材（例えばリグナムバイタ）から満足できる切

片を作製することは無理であった。

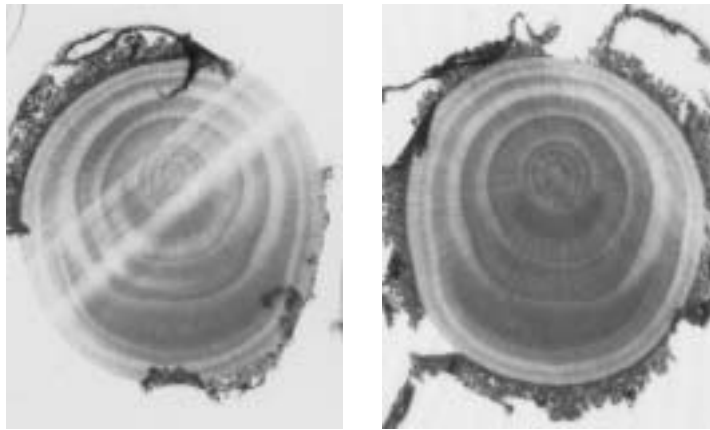


図1：カラマツの枝基部の木口面。左は20°で、右は50°で薄切。

2. 染色～脱水の工程で切片が丸まるのを軽減する方法について

木材の永久プレパラートを作製するときのもう一つの問題に、染色・脱水の工程で切片が丸まってしまうことが挙げられる^{1) 3) 8)}。重度に丸まった脱水済みの硬化した切片を有機溶媒にむせながら平らに伸ばして封入するのは、骨の折れる作業である。苦労を重ねて薄切した数少ない切片が染色・脱水の過程で次第に丸まってしまう、これを最後の封入の段階で無理に伸ばそうとして破いてしまうという、せつない経験を繰り返している人は少なくないにちがいない。こんな作業を長い時間にわたってつづけるのは不健康であり、できれば避けたいものである。

この問題について論じている文献はあまりみあたらない。**Berlyn** と **Miksche**¹⁾、**Kukachta**³⁾ は、染色以降の工程にすすむ前に、切片を2枚のスライドガラスで挟み水没させた状態で一昼夜～数日間養生することを推奨している。**Kukachta**³⁾は、この処理の最中に加温をほどこすべきことも述べている。この処理により、その後の染色・脱水・透徹の過程でも切片を平らな形状に保つことができるという。

永久プレパラート作製の過程で切片の状態を注意深くみてみると、切片は含水状態のときには軟らかく、フレキシブルに変形する。ところが、脱水するとその瞬間の形状をほぼ保ったまま硬化し、その後の工程でもその状態は固定されたままである。したがって、切片を平らに伸ばした状態のまま脱水までの工程を終えると、切片の形状が固定され、最後の封入の段階で無惨な事態に陥ることなく目度なく全工程を済ませることができる。

筆者は、切片を平らに伸ばした状態に固定するために、図2に示したような道具（切片挟み）を自作し、活用している。これは、蠅叩きの打撃面状の網2枚を重ね、これら2枚が開閉するように互いのフレームの一辺をルーズに留めた構造になっている。この切片挟みを使って、以下の手順で染色～封入をおこなう。

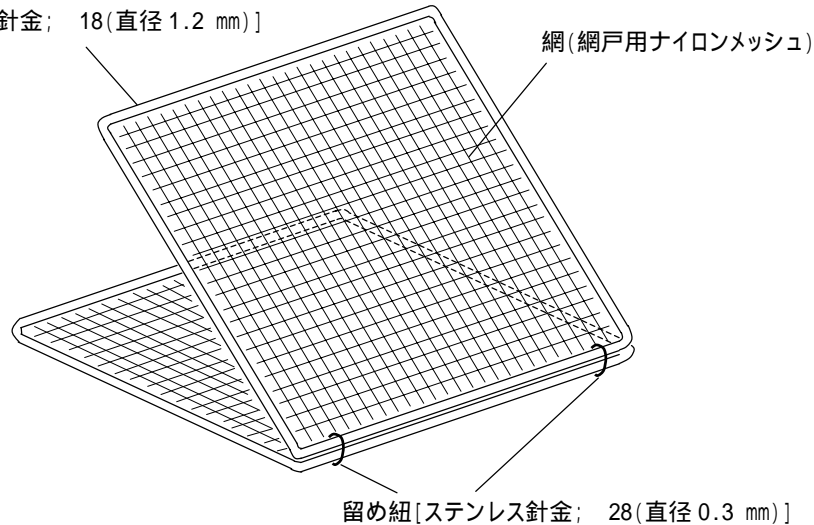
- (1) 薄切した切片を平らに伸ばした状態で切片挟みにセットする。
- (2) 所定の時間、切片挟みごと染色液に浸漬する。
- (3) 切片挟みごと水洗する。
- (4) 切片挟みごと100%アルコール中に移し、1分程度経ってから切片挟みを開いて切片を解放する。

※アルコールシリーズを使わず、直ちに100%エタノールに移して差し支えない⁹⁾。

※切片はこの段階で形状が固定され硬化するので、これ以降の工程には切片挟みは不要。

- (5) 切片を新鮮な **100%**アルコールにさらに **2**回、**2~3**分ずつ浸漬させ、完全に脱水する。
- (6) キシレンに浸漬する。
- (7) **Bioleit** (応研商事) やカナダバルサムでスライドガラスに封入する。

フレーム[ステンレス針金; 18(直径 1.2 mm)]



留め紐[ステンレス針金; 28(直径 0.3 mm)]

図 2 : 考案した切片挟み。ステンレス針金の角形フレームにナイロンメッシュを縫いつけたものを 2 枚重ね、これら 2 枚が開閉できる程度に互いの一边を極細針金でゆるく縛る。切片を平らに伸ばして網ではさみ、開かないように事務用の紙挟みで固定した状態で染色 ~ 脱水の液に順次浸漬してゆく。

引用文献

- 1) Berlyn, G. P.; Micksche, J. P.: *Botanical microtechnique and cytochemistry*. The Iowa State Univ. Press, Ames (1976).
- 2) Carlquist, S.: *Comparative wood anatomy (2nd, completely revised ed.)*. Springer-Verlag, Berlin (2001).
- 3) Kukachta, B. F.: *Sectioning refractory woods for anatomical studies*. USDA Forest Service Research Note FPL-0236, pp.1-9 (1977).
- 4) 日本木材学会編: 増補改訂・木材科学実験書, I. 物理・工学編. 中外産業調査会. 東京 (1985).
- 5) 日本木材学会編: 木質科学実験マニュアル. 文永堂出版. 東京 (2000).
- 6) Sass, J. E.: *Botanical microtechnique (2nd ed.)*. The Iowa State Coll. Press, Ames (1951).
- 7) Hoadley, R. B.: *Understanding wood, a craftsman's guide to wood technology*. The Taunton Press, Newtown (2000).
- 8) 藤井智之: カッターナイフ替刃を装着する替刃式マイクロトームナイフホルダー. 第 52 回日本木材学会大会研究発表要旨集, 岐阜, 21 (2002).
- 9) 緒方健: 南洋材の識別. 日本木材加工技術協会, 東京 (1985).

京都大学大学院農学研究科
 研修員 尾形 善之

はじめに

細胞内の微細構造を観察することに関心が高まるにつれ、高い分解能を実現できる電子顕微鏡を利用する技術が発達してきた。しかし、電子顕微鏡での観察は、試料作製が煩雑なこと、観察領域が制限されることなどの欠点を併せ持っている。

一方で光学顕微鏡は試料作製が簡便であり、観察領域を広く取れるという利点があるため、低倍での観察による樹種的な特徴の評価や細胞寸法の測定などに利用されている。

しかし、細胞寸法の測定に関しては、光学的分解能があと一息不足している感がある。一例を挙げると、オリンパス社製乾燥系対物レンズ **UniPlanApo 50×**（開口数 **0.85**）は通常の細胞観察において高い利便性を発揮してくれるが、その分解能 δ は通常の可視光下では次式を用いて約 **0.38 μ m** と見積もられる。

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (1)$$

ただし、 λ : 光の波長、**NA** : レンズの開口数

それ故、針葉樹早材部において、仮道管壁を識別することは可能であるが、その厚さを測定するにはやや不十分である。また、光軸に対し細胞が傾斜していると、壁の厚さを過大評価する恐れもある。こうした欠点を光学顕微鏡のレベルで解消できると大きく期待されるのが、共焦点顕微鏡である。

1. 共焦点顕微鏡

1950 年代に原理が紹介されたが、共焦点レーザー走査型顕微鏡(**Confocal Laser Scanning Microscope**、以後 **CLSM** と略す)として市場に出るようになったのは 1980 年代後半になってからである。詳細な歴史や原理については参考文献を参照していただくこととし、ここでは上述の細胞観察や壁厚の測定に関する項目について述べることにする。

1.1. 原理と特徴

共焦点顕微鏡の特徴は、主に 2 つの分解能、すなわち光軸 (Z) 方向および試料面方向 (XY) の分解能の向上である。

通常の光学顕微鏡においては、視野領域の情報はすべて入光するため、光軸 (Z) 方向の分解能は無窮大であると考えられる。一方、共焦点顕微鏡においては、対物レンズを通して得られた像をさらに集光させ、その集光部にピンホールを置いているため、試料の焦点面からの情報はピンホールを通過し、非焦点面からの情報はほとんど通過できない。すなわち、得られた像はほぼ焦点面のみからの情報、いわゆる光学切片となる。光軸方向の分解能 **Z** は次の定義式が提案されている。

$$Z = \frac{0.45\lambda}{\left[n \left[1 - \cos \left\{ \sin^{-1} \left(\frac{NA}{n} \right) \right\} \right] \right]} \quad (2)$$

ただし、 λ ：励起光波長、 n ：媒質の屈折率、 NA ：レンズの開口数

例えば、励起光波長をアルゴンイオンレーザーの **488nm**、レンズを上述の **UniPlanApo 40×** とすると、光軸方向の分解能は **0.464 μ m** と計算される。すなわち、同程度の厚さの薄切片を観察していると考えられることもできる。

試料面 (XY) 方向での分解能はピンホールの径を小さくすることと励起光波長を短くすることで向上する。励起光波長を **488nm** として(1)式で試料面の分解能を計算すると、**0.350 μ m** となるが、ピンホールの径を極限まで小さくすると、さらに **1.4 倍 ($\sqrt{2}$ 倍)** 程度分解能が向上し、最終的に **0.248 μ m** の分解能となる。早材部仮道管の壁厚の **1/5~1/10** 程度を測定可能となる。

画像解析を行う場合、写真撮影の過程を入れると、デジタル化の手順が必要となるが、**CLSM** では、試料の情報は直接デジタル画像として得られるという利点もある。

共焦点顕微鏡の欠点として、ある時点で得られる像は非常に狭い領域に限られることが挙げられる。しかし、**CLSM** においては、高速でレーザーの走査が可能のため、その欠点を補うことができる。

1.2. 試料の作製

細胞壁を **CLSM** で観察するためには、2種類の染色処理が考えられる。すなわち、サフラニンなどの蛍光を発する染色剤を用いる手法と、リグニンの自家蛍光を利用する手法である。**Ar** イオンレーザーを用いる方が前述のように試料面方向の分解能が高いと考えられる。また、試料表面からの深さが蛍光量に大きく影響を及ぼす。両手法の特徴を以下の表にまとめる。

	サフラニン染色	無染色
励起光	He-Ne レーザー 543.5nm	Ar イオンレーザー 488nm
蛍光	サフラニンから 590nm 以上	リグニンから 530nm 付近
画像の特徴	<ul style="list-style-type: none">• 蛍光量が比較的多い• 焦点面の違いによる影響が大きい• 試料表面からの採取に最適	<ul style="list-style-type: none">• 蛍光量が比較的小さい• 焦点面の違いによる影響が比較的小さい• 光学連続切片に適する

1.3. 顕微鏡観察と光学切片作製

光学切片の画像の濃度はレーザー照射量、光電子増倍管の感度、画像採取面の試料表面からの深さによって変化する。蛍光量が少ない場合、レーザー照射量を増やす、光電子増倍管の感度を上げる、同じ領域から複数回画像を採取する、などの対応が考えられる。試料表面からの深さに関して、**30-80 μ m** 程度の深さで測定データが安定するという報告がある。しかし、当研究室での観察では、**10 μ m** 程度までは良好な光学切片が得られ、**20 μ m** 程度までは試料焦点面からの情報が得られていると評価された。しかし、それ以上の深さからはほとんど情報が得られず、感度を上げるなどして観察される像は非焦点面からの情報を増幅している可能性が高い。

2. 画像解析

細胞寸法の測定や特徴の抽出する場合、鮮明な像が得られ、細胞数が少ない場合は、光学顕微

鏡下や画像の印刷物上で直接測定してもさほど問題はない。しかし、画像にノイズが含まれている場合や、細胞数や測定項目が多い場合には非常に煩雑である。近年のコンピュータおよびソフトウェアの発達には目覚ましいものがあり、ノイズの除去、大量の測定、特徴の抽出など瞬時に行えるようになってきた。ここでは、樹木細胞の寸法の測定や特徴の抽出に関わる話題について述べる。

2.1. 画像相関法

CLSM で連続する光学切片から得られた像において、試料面方向の座標方向は共通しているが、正しい木口面が得られていない場合、光軸方向と樹軸方向は一致しない。その結果、連続する光学切片間でずれが生じ、細胞の壁厚の測定に大きく影響する。このようなずれを修正する方法として、画像相関法を用いることができる。

画像相関法の手順を以下に示す。

- i. 二枚の画像間で対応する各画素の濃度の積を計算し、それらの積の総和を求める。
- ii. 片方の画像を 1 画素ずつずらし、i.と同様に濃度の積の総和を求める。
- iii. 各総和値の最大を示すときのずらし量に従い、画像をずらす。

実際の画像相関法では、回転や拡大等の問題があるが、CLSM から得られる画像の場合には、XY 方向が固定され、また同じサイズの光学切片が得られるため、これらの問題は無視できると考えられる。

2.2. 細胞寸法の測定

寸法の測定には二値化画像を用いる。細胞内腔寸法、フェレ径、細胞壁密度などは従来の光学顕微鏡の分解能で十分に測定できる。測定には市販のソフトウェアを用いると便利である。NIH Image (Windows 版は Scion Image) は無償のソフトウェアであり、基本的な寸法測定はほとんど可能である。さらに、自らマクロプログラムを作成できるなどの柔軟性もある。

十分な情報が得られない測定項目の場合にはそれなりの工夫が必要となる。例えば、細胞壁厚の測定において、CLSM から得られた各光学切片の濃度は細胞表面の凹凸の影響を受けるが、連続する光学切片を画像相関処理後に重ね合わせることで、こうした問題を解消できる。また、濃度むらが激しく、二値化のための閾値の設定が困難である場合、濃度差のある部位を抽出する微分フィルターを用いて、内腔と壁を区切ることも可能である。

2.3. 座標変換の試み

樹木の横断面は髄を中心とする極座標と考えられる。すなわち、横断面の各部位は方位と髄からの距離を用いて表すことができる。これらの円周方向の情報を解析する場合、極座標を直交座標に変換すると解析が容易になる。座標変換後、画像の水平方向は方位、垂直方向は髄からの距離を表す。年輪の方位間での違いを評価する場合、直交座標に変換すると、垂直方向を伸ばすことで髄からの距離の情報を強調することが可能となり、樹木の肥大成長の円周方向でのばらつきを容易に確認することができる。

3. その他の話題

光学顕微鏡ではないが、搭載した微小な CCD カメラを用いて画像を採取する手法として以下の 2 つを紹介する。

3.1. フィルムスキャナ

現在はミノルタ社から光学解像度 **4800dpi(dots per inch)** のフィルムスキャナが販売されている。カラー画像が得られ、**1 画素あたり約 5.3 μ m** に対応する。広葉樹の道管内腔を **50 μ m** 以上とすると、少なくとも **10 画素程度** で表現でき、その寸法測定には十分な解像度と考えられる。針葉樹仮道管の場合、各仮道管を識別でき、また画像処理をすることにより早材部内腔面積の測定が可能となる。今後、さらに高解像度のフィルムスキャナが開発されることにより、広葉樹木部繊維の寸法測定が可能となろう。

3.2. デジタルカメラ

オリンパス社製の光学顕微鏡 **DX50** に専用のデジタルカメラ **DP50** を装着した場合は、光学解像度を超える画素を採取できる (**0.115 μ m/pixel**) ため、対物レンズが解像度の限定要因となっている。また、光学顕微鏡装着用の接続部品が市販され、画像採取に用いられるようになった。ただし、普及型のもは **CCD カメラ** の配列がハニカム型であり、画像として保存される際に再配列される。そのため、解像度の評価には注意が必要である。**300 万画素** のデジタルカメラで対物レンズの解像度と同等、**600 万画素程度** で対物レンズの分解能を超えると考えられる。

参考文献

1. 共焦点顕微鏡関連

野島博 編 顕微鏡の使い方ノート 光学顕微鏡から CCD まで 羊土社

長谷川茂 1995. 共焦点レーザー顕微鏡の原理 細胞工学 14(9):1081-1089

Donaldson, L.A., Lausberg, M.J.F. 1998. Comparison of conventional transmitted light and confocal microscopy for measuring wood cell dimensions by image analysis. IAWA Journal. 19:321-336.

Gray, J.D., Kolesik, P, Høj, P.B., Coombe, B.G. 1999. Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue. The Plant Journal. 19:229-236.

Kitin, P., Funada, R., Sano, Y., Ohtani, J. 2000. Analysis by confocal microscopy of the structure of cambium in the hardwood *Kalopanax pictus*. Annals of Botany. 86:1109-1117.

Knebel, W., Schnepf, E. 1991. Confocal laser scanning microscopy of fluorescently stained wood cells: a new method for three-dimensional imaging of xylem elements. Trees. 5:1-4.

Matsumoto, B. 1993. Methods in cell biology. Vol. 38. Cell biological applications of confocal microscopy. Academic Press Inc.

Matsumura, J., Booker, R.E., Donaldson, L.A., Ridoutt, B.G. 1998. Impregnation of radiata pine wood by vacuum treatment: identification of flow paths using fluorescent dye and confocal microscopy. IAWA Journal. 19:25-33.

Minsky, M. 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. Scanning. 10:128-138.

- Rubbi, C. 1994. Light microscopy: essential data. BIOS Scientific Publishers Limited.
- Travis, A., Murison, S.D., Perry, P., Chesson, A. 1997. Measurement of cell wall volume using confocal microscopy and its application to studies of forage degradation. *Annals of Botany*. 80:1-11.
- Wilson, T. 1985. Scanning optical microscopy. *Scanning*. 7:79-87.
- Wilson, T. 1990. The role of the pinhole in confocal imaging systems in handbook of biological confocal microscopy, Pawley, J.B. ed. pp. 113-126. Plenum.
- Wilson, T. 1990. Confocal microscopy. Academic Press.
- Wilson, T., Garlini, A.R. 1987. *Optics Letters*. 12:227-229
- Wilson, T., Sheppard, C. 1984. Theory and practice of scanning optical microscopy.
- Xiao, G.Q., Kino, G.S. 1987. A real-time confocal scanning optical microscope. *Proc. SPIE*. 809. Scanning Imaging Technology Wilson, T. & Balk, L. eds. 107-113.

2. 画像解析関連

- イブ・トーマス、中村尚五 1995. プラクティス デジタル信号処理 東京電機大学出版局
- 長谷川純一、輿水大和、中山晶、横井茂樹 1986. 画像処理の基本技法 技術評論社
- 日野幹雄 1977. スペクトル解析 朝倉書店
- 南茂夫 1986. 科学計測のための波形データ処理 CQ 出版社
- Lee, J., Rosen, D. 1985. On the use of automated microscopy in wood research. *Holzforschung*. 39:1-6.
- Sachsse, H. 1984. Zur Dichtebestimmung von Hölzern mittels mikroskopischer Linearanalyse. 42:121-129.
- Srinorakutara, T. 1998. Determination of yeast cell wall thickness and cell diameter using new methods. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86:253-260.
- Travis, A.J., Hirst, D.J., Chesson, A. 1996. Automatic classification of plant cells according to tissue type using anatomical features obtained by the distance transform. *Annals of Botany*. 78: 325-331.
- van der Heijden, G.W.A.M., van de Vooren, J.G., van de Wiel, C.C.M. 1995. Measuring cell wall dimensions using the distance transform. *Annals of Botany*. 75:545-552.
- Xi, Y.H., Pitot H.C. 1999. Building quantitative stereology data files with scion image, a public domain image processing and analysis software. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 59:131-142.

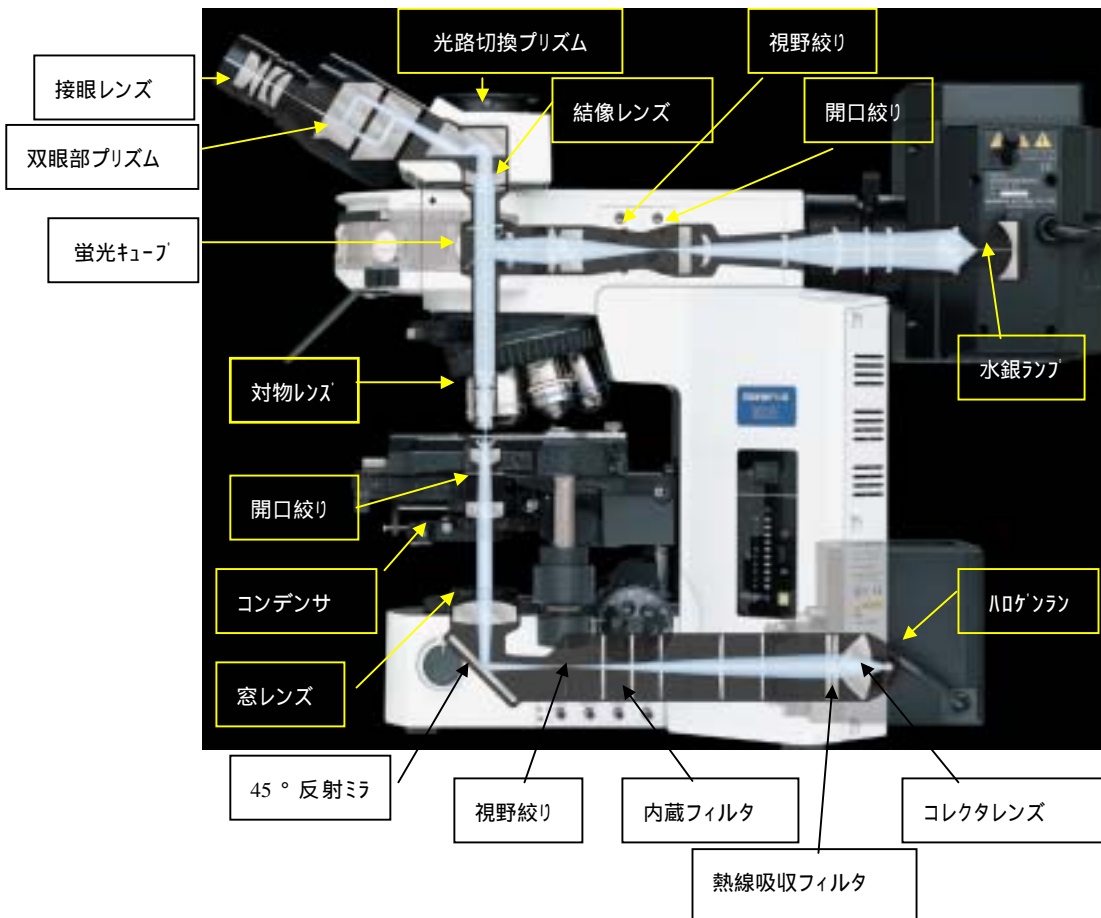
生物顕微鏡のしくみと各種観察法の原理・特徴

オリンパスプロマーケティング（株）オリンパスアカデミー
田中 隆明

はじめに

細胞生物学や分子生物学の分野などで、光学顕微鏡がよく使われています。分解能や拡大倍率という点では、電子顕微鏡にはかないませんが、「生きている細胞を」「生きているそのまま」映像としてとらえることのできる点が、他の方法に優る光学顕微鏡の利点と言えるでしょう。本稿では、講演の補足資料として各種観察方法の原理、特徴と関連事項を簡略にまとめます。

1 光学顕微鏡のしくみ



2 顕微鏡の能力

- ・見分ける能力：光学的分解能・・・約 $0.2 \mu\text{m}$ (NA1.4 にて)
NA (開口数) と波長に依存
- ・見つける能力：光学的検出能・・・数 nm
S/N に依存

3 透過観察の基本調整(生物顕微鏡の基本調整)

観察の最初に、いつも確認しておく習慣をつけるとよい

項目	目的	調整の内容
光軸調整	視野を明るく、均一に照明する	コンデンサの上下位置を正しい位置にし、コンデンサと対物の光軸を一致させる
視野絞り、開口絞りの調整	最良のコントラスト、分解能で観察する	迷光の進入を防ぎ、分解能とコントラストのバランスをとる
視度、眼幅調整	見やすく、疲れ難く観察する	観察者の目の視度と眼幅に、接眼レンズと鏡筒の状態を合わせる
明るさ、色調整	見やすく、正確な色で観察する	眩しすぎず暗すぎない明るさの昼光色で観察する

4 各種観察法での顕微鏡構成と調整法

観察方法	構成	調整の内容
位相差観察	位相差用対物レンズ 位相差用コンデン(エバーサルコンデンサ) 心だし望遠鏡 グリーンフィルタ	光軸調整 リングスリットの心だし調整(対物レンズに適合するリングスリット毎に)
微分干渉観察	微分干渉用対物レンズ(エバーサル対物) 対物レンズ側 DICプリズム アライザ エバーサルコンデン(対物レンズに適合する DICプリズムを内蔵させる)	光軸調整 クロスコル調整 コントラスト調整： 対物レンズ側 DICプリズムの移動 ポラライザの回転(セパレート方式)
蛍光観察	蛍光用対物レンズ 落射蛍光照明装置 蛍光キューブ(蛍光用フィルタ)	ランプ心だし調整(ランプ交換時) 最適な蛍光キューブの選択
偏光観察	明視野用対物レンズ(簡易偏光) 偏光用対物レンズ ポラライザ、アライザ 検板、コンペンセータ	光軸調整、各部心だし調整 オリスコープ観察： 異方性の検出・可視化、リタレーション測定、 遅軸の検出 コンスコープ観察：結晶の軸性の観察
共焦点観察	共焦点装置： 光量検出方式 マルチピンホール方式	各装置構成による ピンホール径の選択： 分解能・明るさのバランス

5 各種観察方法の原理、特徴

観察方法	原理	特徴
位相差観察	標本による回折光と直進光との間の位相差を利用して、無染色標本に明暗のコントラストをつける	厚い標本（数 $10\mu\text{m}$ 以上）の観察には不向き コントラストの境界にハローがある ポジティブコントラスト、ネガティブコントラスト
微分干渉観察	無染色標本の厚さの勾配や、屈折率の勾配のある部分に、偏光2光束シリンダ干渉によるコントラストをつける	厚い標本の観察にも対応できる 見かけの立体感と試料の3次元構造は対応しない シア量と立体感に対応性がある プラスチック容器使用不可
蛍光観察	検出対象への蛍光色素染色や、蛍光タンパク質発現等による蛍光標識、あるいは自家蛍光など、試料からの蛍光で像にコントラストをつける	検出能と特異性に優れている 明るさと色の測定で定量化ができる 多重染色により、複数のシグナル同時観察が可能 一般に永久標本はつくれない
偏光観察	偏光干渉を利用し、光学的異方性のある個所に明暗、色のコントラストをつけるほか、複屈折の測定ができる	ホロスコープ観察： 異方性の検出・可視化、リタレーション測定、遅軸の検出 ミクスコープ観察：結晶の軸性の観察
共焦点観察	共焦点光学系により、合焦点の像のみを光学的断層像として取得できる	コントラストに優れた像が得られる 光学的断層像の取得、多次元観察 画像処理により3次元像構築ができる

6 デジタルカメラの概要

① CCDについて

・画素数：同じサイズであれば、画素数が大きいほど高画質になるが、感度が低くなる

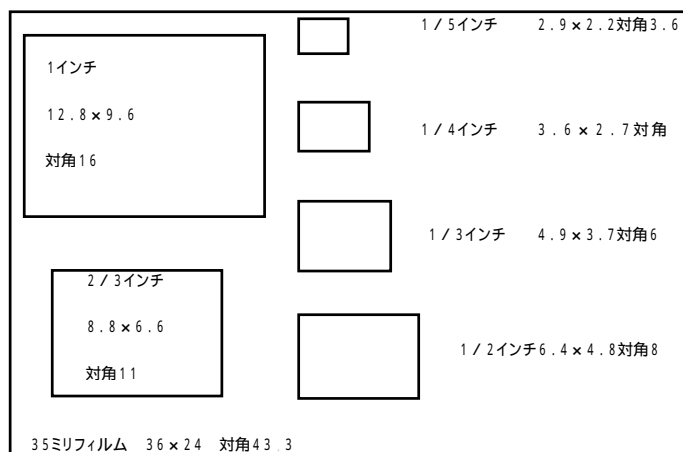
・撮像サイズ：**35**ミリフィルムに比べ、小さい

・感度：高感度にセツするとノイズが増える

・ラチエツト：ヒトの眼 **10**

銀塩フィルム **5**

CCD **2**



② 撮影時の留意点

- ・アプタ倍率は小さくする：撮影実視野への考慮
- ・対物レンズの活用：昼光色の設定
- ・用途に応じた画質(高画質、普通画質、低画質)の選定

7 光学顕微鏡の将来

キーワード：生きている細胞の中で起きていることを可視化し、同時に定量化する
生きている細胞を操作する

検出能の向上 <ul style="list-style-type: none">・ノイズ低減化の工夫・エレクトロニクス光利用・電子画像の応用・高感度カメラの応用・偏光の応用・フィルタ光学特性の改善	分解能の向上 <ul style="list-style-type: none">・近接場光の応用・共焦点顕微鏡の光源、レーザー光源の発展・2光子励起蛍光顕微鏡の応用・ずれぶれの検出
安定性の向上 <ul style="list-style-type: none">・タイムラプス観察・対物レンズの色収差低減・対物レンズ収差性能の向上	システム性の向上 <ul style="list-style-type: none">・多次元画像取得の自動化、リアルタイム性の向上

参考文献

- ① 宝谷紘一、木下一彦編「限界を超える生物顕微鏡」学会出版センター、1991
- ② 「顕微鏡の使い方」羊土社、1997
- ③ 伊東丈夫「改訂版 光学顕微鏡写真撮影法」学際企画、1998
- ④ 曾我部正博、白倉治郎担当編集「ハイイメージング」共立出版、1998
- ⑤ 石川春律 他編「見る技術 分子・細胞のハイイメージング」共立出版、1998
- ⑥ 石川春律 監修「ハイイメージングの最先端」共立出版、1999
- ⑦ 船津高志 編「生命科学を拓く新しい光技術」共立出版、1999
- ⑧ 宮脇敦史 編 ホストゲル時代の実験講座シリーズ「GFPとハイイメージング」羊土社、2000
- ⑨ 「顕微鏡の活用術のストリート」秀潤社、2000
- ⑩ 栗屋裕「高分子素材の偏光顕微鏡入門」アグネ技術センター、2001
- ⑪ Shinya Inoue & Kenneth Spring 著 寺川進、市川更治、渡辺昭 訳
「ビデオ顕微鏡」共立出版、2001

ワークショップ概要

主催：組織と材質研究会

集会名：生物光学顕微鏡ワークショップ - 試料作製法および顕微鏡技術について -

概要：生物光学顕微鏡の試料作製方法や観察技術は、自動化・デジタル化などにより利便性が向上してきている。一方で、解析処理等のブラックボックス化などにより、結果を誤って解釈する危険性をはらんでいる。試料作製方法と顕微鏡観察手法の基礎から最先端技術についての講演をもとに、現技術の問題点を整理し、木材科学の発展につながる形態学的手法の可能性について討議する。

日時：3月24日 13:30～16:30

場所：九州産業大学第1会場(S202)

1. 講演

木材の永久プレパラート作製法 - 実験書には載っていない2つの耳寄りな技法について -
北海道大学大学院農学研究科 佐野 雄三

生物光学顕微鏡観察の最先端技術、画像処理手法 - 共焦点顕微鏡を用いて -
京都大学大学院農学研究科 研修員 尾形 善之

生物顕微鏡のしくみと各種観察法の原理・特徴
オリンパスプロマーケティング（株）オリンパスアカデミー 田中 隆明

2. ワークショップ

「試料作製方法の現状と課題」「光学顕微鏡の現状と課題」

司会：愛媛大学農学部附属演習林 小林 修

九州大学大学院農学研究院 内海 泰弘