実験技術

超顕微鏡の試作

名大・理・臨海 佐藤 英 美
ニコン(株)光学部 竹 中 裕
同 二 星 俊 明

はじめに

見難いものを見るという試みは、やがて視えないものを観るという願いへと変わってゆく。しかも生きた細胞の内部で、そして細胞活性の動態が、分子レベルでの解析可能なデータとして追跡記録できれば素晴らしいことだ。例えば VEM (Video enhanced microscopy)^{(1),(2),(3)} がそれであり、死んだ細胞を使うとしても蛍光色素や金コロイドで標識した抗体による染色法^{(2),(3),(7)} がそれであろう。

昭和61年以来、私達は超顕微鏡を作っている。特に“super”という言葉を使ったのは、既存の光学部品を用いながら光学的解像能の限界にとらわれず、再現性の良い高忠実像を検出できる極限まで引出し、それを高感度・高解像ビデオシステムに記録し画像解析を行いたかったからである。試行は未だ続いており、数本の微小管または十本程度のアクチン繊維の束はほぼ確実にトレースできるが、未だ改良の余地がある。しかし光学部分はひとまず組立て終ったので、ここに超顕微鏡のあらましについて述べてみたい。

超顕微鏡の設計思想と製作目標

この顕微鏡は可視光領域を用い偏光を利用する光学顕微鏡であって、細胞生物、生物物理学の研究に適した最高の検出能を持つ、使い易い装置である。そして最新の電子工学技術と充分に対応し、組合せることができるように考えられた試作品である。主な設計思想は、以下のとおりである。

1. 光学的性能を極限まで高めるために、堅牢で耐震性に優れたオプティカルベンチを使用する。余分な光学部分はできるだけ省き、光軸を一本に通してズレ

を抑え、しかも各光学部品の装着、取換えが容易であること。

2. 直接観察や写真記録のほか、高感度テレビカメラとエンハンサー等のコントローラーによって最高の検出能を持たせ、意味のある画像解析を可能にすること。

3. 偏光・落射偏光・微分干渉等の各種検鏡が容易に適用でき、しかもその各々が最高の性能を保証されていること。

4. 基礎が判っていれば、学生でも気軽に使えるような、取扱いが容易で再現性の高いシステムであること、等である。

まず条件1を実現するために、全光学系を一つの長い“芯”の出るオプティカルベンチの上に載せ、光学系の各エレメントがベンチ上の適切な場所に取付けられるようにした。いわば、光学の原点に帰ったわけである。これは、市販の顕微鏡では、机上で検鏡するという習慣から形と大きさに制限があり、その為に光軸が曲げられ光学系も固定されるから、使用上不都合が生ずる場合が多いということと好対照をなす。条件2については、肉眼による観察での倍率、または光学的解像能は既に限界に到達していると考えられるが、テレビカメラの高検出能から予測すると現在の倍率では不充分である。そこで高性能のテレビ検出能を生かすために、拡大用のズームレンズをテレビ光学系に入れた。最後に条件3のためには、光学系の各エレメントに現在入手できる最高級のエレメントを使用し、特に偏光や微分干渉法による観察には、偏光波面の均質性、透過度、消光係数 (Extinction Factor = $I_{\parallel}/I_{\perp}$) がキポイントとなるため、特に精選したグラントムソンプリズムを偏光子および検光子に採用した。またノイズのもととなる背景光の明暗のフラツキを防ぐために、ハロゲン150W ランプの冷光とファイバーオプティクスを組合せ、光源とした。

顕微鏡の基本光学系

超顕微鏡の光学系を述べる前に、まず市販の複合顕微鏡の基本光学系について記しておく。両者を比較することで、超顕微鏡への理解が深まると考えるからである。

図1に示したのが透過型の偏光型微分干渉顕微鏡である。ポラライザー (偏光子) P とアナライザー (検光子) A、ウォラストンプリズム W_1 , W_2 を光路からはずすと普通の明視野顕微鏡になる。S は標本を載せるステージ、 O_1 は対物レンズ、 O_2 は接眼レンズ、 C_1 はコンデンサーレンズである。S より下側は照明系を

Experimental Construction of Supermicroscope with Reliable and Sensitive Detectability.

Hidemi SATO, Hiroshi TAKENAKA*,
Toshiaki NIBOSHI*

Sugashima Marine Biological Laboratory, Nagoya University, Toba, Mie 517 & *Department of Optical Design, Nikon K. K., Nishi-Ohi, Shinagawa, Tokyo 140.

図 1. 透過型偏光・微分干渉顕微鏡の基本光学系.

と標本の複屈折性（光学的異方性）を観察する偏光顕微鏡になり、更に W_1 , W_2 を挿入することで標本の屈折率や厚さの変化を見る微分干渉顕微鏡となる。これらの特殊顕微鏡法の場合には、標本の偏光振動面に対する方位角を変えるために回転ステージを使用するのが普通である。

図 2 は、標本を上方から照明し観察するための落射（反射）型明視野顕微鏡の構成を示す。この型では対物レンズ O_1 がコンデンサーの役割も兼ね、ケーラー照明になるように設計してある。これに特定波長の励起光と専用のダイクロイックミラーを組込むと、蛍光顕微鏡として利用できる。透過光方式に比べて簡便であり、使い勝手が良いのが特徴である。この 2 つのタイプを組合せ、更に光学性能を大巾に向上させたのが、超顕微鏡である。

超顕微鏡の基本光学系

超顕微鏡は透過照明系と落射照明系の 2 つの照明系を持っており、観察は肉眼およびテレビ（ビデオ）に

図 2. 反射型顕微鏡の光学系.

形成するが、照明系は解像能やコントラストを決める開口絞り（瞳絞り）AS と、視野の大きさを調節する視野絞り FS が取付けられており、顕微鏡の基本照明法であるケーラー照明ができる仕組みになっている。L は光源用のランプである。S より上は結像系であって、光路を切換えることにより肉眼 E による直接観察と、テレビ TV や写真 PHOTO による映像記録ができるようにしてある。PL は後者のための投影レンズであって、TV 録画の場合は固定倍率 1X または 0.9 ~ 1.25X 程度のズームレンズを使用するのが普通である。以上が基本構造であってこれに P, A を挿入する

図 3. 超顕微鏡の光学系.

よる画像記録の二つの方法で行う。図3に、この超顕微鏡の光学系の構成の基本を示す。図3の、S、O₁、O₂、C₁、W₁、W₂は図1で示した各光学エレメントに相当する。HMは落射照明用のハーフミラー（半透鏡）、Mは肉眼観察用とテレビ用の光路切換え用ミラーであって、使用目的に応じ光路に入れたり出したりできるようにしてある。基本の光学系は、透過照明用であって、W₁、W₂、HMを光路からはずし、Mを光路に入れ直接肉眼Eで観察する偏光顕微鏡光学系である。まず光源L₁（ハロゲンランプ、150W、Philips、West Germany）から射出された輝点の群れはオプティカルファイバーFを通して互に干渉しながら拡大され、コレクターレンズC₂の焦点面に均質な二次光源をつくる。C₁、C₂と他の補正レンズからなる照明系は、常にケーラー照明となるように予め設計してある。G₁、G₂は特に選別されたグラントムソンプリズム（S級；Carl Lambrecht 製、Chicago, U.S.A.）で、偏光子・検光子として使われている。方解石でできているこれらの偏光プリズムは、普通使用されている板状の二色性を利用したボラロイドに比べて入射光の異常光成分（Ne）をほぼ完全に透過するから吸光度の高い偏光板に比べて4倍程度明るく、しかも偏光子と検光子を暗黒の位置（直交ニコル）にした時の暗さが一桁以上あがる（消光係数； $EF = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = 10^5$ 以上）ので、細胞骨格のような微細な弱複屈折構造の観察には極めて有利である。Rは、さらに検出感度をあげる為の素子であってレクティファイヤーと呼ばれる⁵⁾。対物レンズやコンデンサーレンズ内では、どんな良い、歪みのないレンズを用いても、直線偏光がレンズを透過するうちに必ず偏光面の回転がおこり、例えば直交ニコルにしても全視野が暗黒にならなくなるが、この偏光面の回転を半波長板と倍率0のレンズによって補正するのがレクティファイヤーである。レクティファイヤーはコンデンサー、対物の両レンズに装着するのがのぞましいが、超顕微鏡では残念ながらコンデンサーにのみ取り付けられている。

Bは弱い複屈折を測るためのブレスケーラー型の補償板であって20分の1波長程度の波の遅れ量を持つ。これで弱複屈折構造による波の遅れを相殺し、定量するのである。また構造の主軸に対する分子配向の方向を決定する。なお図示してはいないが通常グリーンの干渉フィルター（550nm）を光源の射出部位に取付けてある。また、Mの下にはG₂を通った後の偏光を解消するために、ディポラライザー（偏光解消子）が入れている。

このような構成で、Sに置かれた標本は、対物レンズO₁と光路を曲げるミラーM、接眼レンズO₂を通じて肉眼Eで観察される。

Mを光路からはずすと、テレビ用の光学系となる。Zはテレビ用のズームレンズで、肉眼観察の倍率より1.25Xから6.5Xまで変倍できるようになっている。現在使用している浜松ホトニクスC-1000テレビカメラのSIT撮像管の感度は高く、エンハンサー（カットオフ機構を含む）やシェーディング機構を持つコントローラーとイメージシグマを組合せると、微弱な複屈折構造の高忠実像の連続記録が可能になる。

以上述べた基本の偏光光学系に、二つのウォラストンプリズムW₁、W₂を光路内に入れると、直ちに高感度微分干渉顕微鏡となる。

この顕微鏡は、落射の偏光照明も同時に、或いは単独に行えるようにデザインされてある。G₃はグラントムソンプリズムであって、ハーフミラーHMを光路に入れると、100Wの超高圧水銀灯（Osram, West Germany）L₂による落射ケーラー照明になる。また光路切換えによりテレビまたは写真撮影用の光源としても利用できる。落射偏光照明系は、本来直径5nmの金コロイド粒子で分子標識した抗体や細胞骨格関連蛋白質を顕微注射し、これらの分子の生体内の動態を直接金粒子の円偏光2色性をマーカーとして検出し、定量するために、特に組みこんだ。

超顕微鏡の設計の実際

超顕微鏡は、レールの基線長1300mm、重量200kgの堅牢なオプティカルベンチの上に各光学素子が配置されている。これは機械的には顕微鏡観察において極めて不都合な振動を防止し、光軸を一本として保証するのが最大の目的である。光学的には各エレメントが同一光軸上に完全に、そして理想的に配置されているので余計なフレアの原因となるファクターが除かれている。装置全体は、砂の入った防震箱の上に載っている。

光源は図3に示したようにオプティカルファイバーを通して二次光源を作り、それを光源として用いている。これは図1の場合と異なり、できるかぎり均質な照明をえたいのと、光源の熱が顕微鏡本体、および生体標本へ悪影響を与えるのを防ぐためである。

既に述べたように、テレビ用のズームレンズを1.25～6.5Xとしたのは高性能のSITカメラとマッチさせ、肉眼では視難い弱複屈折構造を強調し、ノイズを除き、有為の拡大像として画像解析用に記録するためである。

超顕微鏡では、かなりの厚みがあるグラントムソンプリズムやレクティファイヤーを用いているから、こ

れらによって生じる光路長のズレを正確に補正しなければならない。それで例えば図3のG₂の前後を凹レンズと凸レンズで挟んだり、リレーレンズを用いたりして光路長補正を行っている。市販の顕微鏡では、空間に制限があるために、これらの素子を取り付けることは難しい。

光学素子について

ここで超顕微鏡に用いてあるいくつかの光学素子について説明を補足しておく。

直線偏光を作る偏光素子は、通常“ポラロイド”と呼ぶ偏光板を用いるが、方解石の偏光プリズムは、透過率が良いこと、透過してくる偏光（異常光）がより完全偏光に近いこと、そして利用可能な波長域が赤外から紫外域までカバーしているという利点がある。欠点は光学的に良質な方解石の結晶から切り出すので高価であること、また使用可能な視界の角度が小さいことである。現在のところ、グラントムソンプリズムが最も良質で改良されたプリズムであるといわれている。

直線偏光が、ガラス面に入射し屈折すると、直線偏光の方位により反射率が異なるために多くの場合偏光の方位が少し回転し、偏光光学系の性能を低下させる。この傾向はレンズの枚数の多い、大きな開口数を持つ

レンズ程顕著になり、弱複屈折体の検出に支障をきたす。これを補正するのがレクティファイヤーである^{4),5)}。

ブレースケーラー型の雲母の補償板（コンペンセーター）は、20～30分の1波長以下の波のおくれ量を測定するためのもので、特に生物学的な目的に適している。今、標本を偏光の振動面に対して適切な、複屈折量が最大となる方位角に置き（ θ ）、測定したい部分の明るさを相殺して暗くするために雲母板（補償板）を角度 θ' だけ回転したとすると、その部分の波の遅れ（複屈折） δ は、

$$\sin 2\theta \cdot \sin \delta / 2 + \sin 2\theta' \cdot \sin \delta_{\text{comp}} / 2 = 0$$

として与えられる。ここで δ_{comp} は雲母板の既知の波の遅れ量（複屈折値）であるから、 θ を45°とすれば、

$$\sin \delta / 2 = -\sin 2\theta' \cdot \sin \delta_{\text{comp}} / 2$$

として測定できる⁶⁾

おわりに

以上のような考えにたって検討を重ねながら、私達は一応満足できる高性能超顕微鏡を作り上げた（図4）。現在私達は納得のゆく画像記録と画像解析法の設定と金コロイド粒子の円偏光二色性を指標とした生体内重合、脱重合反応の定量化について^{2),7)}、試行を繰り返している。

超顕微鏡とその附属システムは菅島臨海実験所に置いてあり、来訪研究者、学生が自由に使えるようにしている。使用希望の方は、筆者に連絡されたい。

文 献

- 1) Allen, R. D., Allen, N. S., Travis, J. L. (1981) *Cell motility*, 1, 291-302.
- 2) Bajer, A. S., Sato, H., Mble-Bajer, J. (1986) *Cell Structure and Function*, 11, 317-330.
- 3) Holgate, C. C., Jackson, P., Cowen, P. N., Bird, C. C. (1983) *J. Histochem Cytochem.*, 31, 938-944.
- 4) Inoué, S., Hyde, W. L. (1957) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3, 831-838.
- 5) Inoué, S. (1986) *Video Microscopy*, Plenum Press, New York.
- 6) 佐藤英美 (1986) 続生化学実験講座（日本生化学会編）, 6, 24章, 599-611.
- 7) 佐藤英美 (1987) 細胞光学, 6, 246-249.
- 8) 佐藤英美 (1988) 生体の科学, 39, 5号, 530-533.

図4. 超顕微鏡

Human Frontier Science Program (HESP) について

東大・理・物理学 和田 昭 允

私はこのプログラムの検討・立案に参加して、我が国政府が外国の基礎研究に資金援助をしたことがないこと、そして本件がその最初の試みであることを知った。かつて私の親しい外国人研究者が言ったことを思い出す。“科学の基礎研究は未知のジャンルを探検するようなものだ。先頭を歩くものは穴に落ちたり毒蛇にかまれるという失敗をする。日本は先頭集団に居るとはいうものの、基礎研究の大きなプロジェクトではいつも、失敗しないようにしないようにと後から歩いているじゃないか。たまには先頭を歩いたらいいだろう。”

I. 発端

1986年の初め頃、通産省でヒューマン・フロンティア・プログラムとして、生物がもつ優れた機能を解明し、工学的な応用に向けて開発するというアイデアが生まれた。一方、その頃科学技術庁にはヒューマン・アンド・アース・サイエンス・プログラムとして、生物科学および地球科学を合わせた総合的研究を行うという案があった。科学技術会議（総理大臣が議長で、科学・技術関連省庁の大臣および学識経験者からなる、科学技術に関するわが国の最高意志決定機関）の下で国の科学技術政策を議する科学技術政策委員会（委員長：岡本道雄元京大学長）では、この2省庁の案を合体させ、前者が多分に応用技術指向であったのを基礎科学重点に修正した上で、ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラムとし、その立案のための国際フィジビリティ・スタディー委員会を発足させた。このような動きの背景となったものは、わが国が国際的協同研究を援助することによって、貿易摩擦に加えてその頃から激化の徴を見せはじめた技術摩擦・情報摩擦を長期的展望のもとに軽減して行こうという考えがあったように思われる。しかし、その後われわれ科学者が了解するに至った大義名分は、世界の経済大国の重要なメンバーである我が国が、基礎科学技術分野で国際的貢献を果たそうということである。

II. 国内・外のコンセンサスのとりかた

1986年12月から87年3月にかけて、科学技術庁が世話役となり、国内の生物科学およびバイオテクノロジー関連の研究者を召集して、主として研究分野についての検討を実施した。

その結果、重点研究領域として、知覚・認知機能、運動・行動制御機能、記憶・学習機能、遺伝情報発現機能、形態形成機能、分子認識・応答機能、エネルギー変換機能、先導的支援技術などがあげられた。生物の分子機能および脳の機能解明に重点を絞ろうということになったわけである。これを受けて、わが国政府はサミット各国政府に科学者の推薦を依頼し、国際科学者会議を持ち、上記の方向でプログラムを進めることに関する合意を得た。もっともこの時、米国からは、予算の規模も小さいことだから日本は熱帯病、森林問題、公害問題に焦点を絞ったらかどうかとの意見が出たが、国際科学者会議の中のわれわれ日本側委員は、日本の意図は純粋基礎研究の推進にありとして上記の分野を主張し続けた。現在では日本が提案した上記の分野でプログラムを行うという国際的合意が成立している。このような背景のもとに、87年4月にロンドンに国際科学者会議のメンバーが集まり（ロンドン賢人会議）、サミット諸国首脳にこのプログラムを支持することを要望、これを受けて87年6月、中曽根総理がベネチア・サミットにおいて提唱した。その結果、サミット諸国はその理念を了解し、立案に向けての検討が行われることを希望するというのが合同の経済宣言に盛り込まれた。

87年11月より88年3月にかけては、上記の宣言を受けてサミット関係国の科学者約30名からなる国際フィジビリティ・スタディー委員会が発足、プログラムの事業内容、研究分野、実施体制などについて検討し、とりまとめを行った。この結果は88年6月のトロント・サミットにおいて竹下総理から各国首脳に報告され、その推進に協力依頼がなされ、経済宣言に盛り込まれた。このような政治的動きとは別に、88年4月から国際フィジビリティ・スタディーは継続され89年3月にその最後のものが行われた。これら国際委員会の直前には国内科学者会合が開かれ、計画推進に關しての意見の汲み上げが行われた。参考までに国内及び国際科学者会議等の開催状況及びメンバーを文末に示しておく。

III. 各国の反応

当初は我が国の真意、とくに通産省が基礎科学に資