歯科領域におけるレーザホログラフィ 干渉顕微鏡の応用

第1報 光学顕微鏡との比較

南里 嶽仁 森本 啓三 末次 恒夫

Application of Laser Holographic Interferometric Microscopy in Dental Investigation

Part 1. Comparison with Optical Microscopy

Takehito Minamizato, Keizou Morimoto and Tsuneo Suetsugu

1. はじめに

2. 材料ならびに方法

歯牙および歯周組織を含む大きな組織標本の作製において、現在ではツェロイジン包埋による方法が一般的である。ツェロイジン切片標本作製の際、硬組織と軟組織の両者を同時に薄切するためその切片の厚さは 20μ 前後となる。

ところで光学顕微鏡の特性から切片の厚みが増すと同一視野においては解像力が劣る。さらに同一切片内に硬組織と軟組織とを含むため切片の厚さが不均一となり、染色性にも差異が生じ、その結果焦点を合わせにくいなどの欠点が生じる。

一方、レーザホログラフィ干渉顕微鏡^{1)~4)}（以後レーザ顕微鏡と呼ぶ）は、ホログラフィ⁵⁾の原理を利用して凹凸測定、変形測定、振動測定などの干渉測定や深度情報記録等ができる。そしてその応用に関する研究がいくつか報告されている^{4,6-11)}。

そこで著者らは硬組織を含むツェロイジン包埋組織標本の厚さによる解像力の減少や不均一な厚さによる焦点ずれ等の問題解決の一助として、レーザ顕微鏡の応用を試み、通常の光学顕微鏡と比較、検討し、興味ある知見を得たので報告する。

1) 材料：成犬の健全な下顎第3前臼歯および同部の歯周組織を用いた。

2) 方法：(1) 通法に従い、フォルマリンで固定し、急速脱灰（Plank-Rychlo法）を施し、ツェロイジン包埋組織標本作製した。その後約 20μ に薄切し、Hematoxyline-Eosin染色を施し、光学顕微鏡下で組織学的観察を行った。

(2) 同一組織標本に関して、フジノンホログラフィ干渉顕微鏡⁴⁾を用い、同様に観察した。光源はHe-Neレーザ5mW（直線偏光、 $\lambda=0.6328\mu$ ）透過照明で、50倍、100倍、200倍の倍率で観察した。

3. 結 果

図1～9は通常の光学顕微鏡下の組織像(A)とレーザ顕微鏡下の組織像(B)を示している。

図1：A、Bともに50倍像で、歯髄、象牙質、セメント質、歯根膜、歯槽骨等の歯牙および歯周組織が観察できる。

Aでは歯根膜、歯髄などの軟組織のシャープな像が認められる。しかしこれらの軟組織と象牙質等の硬組織とでは透過像の違いが顕著である。

Bでは象牙質、セメント質、歯槽骨等の硬組織と歯髄、歯根膜等の軟組織はほぼ同一の透過像を示してい

九州大学歯学部第2歯科補綴学教室（主任：末次恒夫教授）
The Second Department of Prosthodontics, School of
Dentistry, Kyushu University (Chief: Prof. Tsuneo
Suetsugu)

昭和56年2月24日受付

る。すなわちレーザ顕微鏡では染色性や組織標本の厚みによる差の影響が少ない。ただし、全体的に暗い画像で周辺部は不鮮明である。

図 2 : A, B とともに 100 倍像で、図 1 の根尖部を中心とした像である。

A では高コントラストな像を示し、神経束の走向も明確に認められる。

B では A に比較してより多くの歯根膜線維の細胞が規則正しく配列しているのが認められ、軟組織と硬組織の透過像がほぼ同一である。しかし全体的に暗い画像である。

図 3 : A, B とともに 200 倍像で、図 2 と同一部位である。

A では硬組織と軟組織の両方に焦点を合わせることができない。これは組織標本の厚みの差によるためである。

B では硬組織、軟組織ともに焦点は合っており、非常にシャープな像を呈している。

図 4 : A, B とともに 100 倍像で、歯根の中央部の象牙質を中心とした像である。

A ではセメント質、歯根膜の細胞がやや不明瞭である。

B では A に比較して細胞は明瞭に認められ、全体として同一透過像を示している。しかし全体的に暗い画像であり、等高線状の干渉縞が認められる。

図 5 : A, B とともに 200 倍像で、図 4 と同一部位である。

B は A に比較してシャープな画像を示しているが、干渉縞が認められる。

図 6 : A, B とともに 200 倍像で、側枝の部分である。

A では側枝部分に焦点を合わせたため、歯根膜等が不明瞭である。

B では全体的に暗い画像であるが、同一透過像を示している。しかしわずかに干渉縞が認められる。

図 7 : A, B とともに 50 倍像で、根尖部のセメント質、歯根膜および歯槽骨を示している。

B は A に比較して全体的に暗い画像で、干渉縞が認められる。また、周辺部は不鮮明である。

図 8 : A, B とともに 200 倍像で、図 7 の血管部分を中心とした像である。

A では高コントラストな画像が認められ、血管壁や血管周囲の細胞が不鮮明である。

B では A に比較して血管組織に立体感が出ている。また血管周囲の歯根膜線維の細胞群も鮮明に認められ

る。しかし全体的に暗い画像である。

図 9 : A, B とともに 200 倍像で、歯槽骨の部分である。

B は A に比較して鮮明な画像を示しているが、全体的に暗く、干渉縞が明瞭に認められる。

4. 考察および結論

レーザ顕微鏡を用いて成犬の歯牙および歯周組織の観察を行い、通常の光学顕微鏡と比較、検討した。

その結果、硬組織および軟組織の混在している標本に対しては明らかに組織標本の厚みが増大し、解像力の低下がおこる。また同一切片内に硬組織と軟組織とを含むため、標本の厚さおよび染色性が不均一となる。これらの像を通常の光学顕微鏡でとらえると、両組織をとともに鮮明に写し出すことはできない。また高コントラストになり、画像の周辺部は中心部に比較して不鮮明になり易い。

しかしレーザ顕微鏡は硬組織、軟組織いずれも同一透過度で鮮明な画像を現わし、切片上の組織をすべて写し出す。それも 100 倍、200 倍と拡大するにつれて良い結果を示した。また血管などに立体感を思わせる像を示した。これらの利点はレーザ顕微鏡の特徴である(1)単色照明である。(2)光源の広がりがなく、コンデンサー絞りを絞り切った場合に該当するからである。そのため画像は(3)コントラストの改善ができる。(4)エッジ回折のため構造境界部分が見易いなどの理由による。

しかし通常の光学顕微鏡に比べて暗い画像を示した。また倍率が上がるにつれて等高線状の干渉縞が現われる欠点も認められた。また、低倍率の 50 倍像では周辺部は不鮮明であった。これは対物レンズの結像による像面彎曲がおこるためである。この解決には写真撮影用の補正接眼レンズを用いることで改善できると思われる。したがって、厚い標本では立体的観察ができ、大きな標本による検索のためには必然的に厚さが増したり不均一な厚さになる場合が生じるので、通常の光学顕微鏡では不都合な部分をレーザ顕微鏡によってカバーできると思われる。

一方、通常の光学顕微鏡写真でもフィルターの選び方、印画紙の感度、仕上げ時の焼き方などによって画像が大きく左右される。今回、一条件下での光学顕微鏡との比較であったが、上記の点についてはかなり明確に比較できたと思われる。

稿を終るに臨み、標本を提供していただいた藤田明男先生

（香川県開業）や林善彦先生（本学歯学部第2保存学教室）に深謝いたします。さらに本学医学部顕微鏡写真室の町田進氏および富士写真光機K.K.の鈴木正根氏、山足陽一氏に対しても深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 藤井陽一：レーザ顕微鏡，レーザ応用技術研究会会報，4（2）：1～4，1979.
- 2) 光学工業技術研究組合ホログラフィ研究会：リップマンホログラフィ顕微鏡，光学技術コンタクト，13（6）：28～31，1975.
- 3) 鈴木正根，金谷元徳：ホログラフィ技術の現状，光学技術コンタクト，15（4）：1～11，1977.
- 4) 富士写真光機 K.K.：ホログラフィ干渉顕微鏡（カタログ）.
- 5) 小林春洋：レーザ応用技術，152～171，日刊工業新聞，東京，1971.
- 6) Glicksman, M.E. and Schaefer, R.L. : Holographic study of crystal growth, Journal of Crystal Growth, 13/14 : 68～72, 1972.
- 7) Cox, M.E., Buchles, R.G. and Whitlow, D. : Cinemicroscopy of small animal microcirculation, Applied Optics, 10 : 128～131, 1971.
- 8) Rhodes, M.B. : Holographic interferometric microscopy of polymer crystallization, Applied Optics, 13 : 2264～2267, 1974.
- 9) 平木研司，大塚信之，三井利夫：顕微ホログラフィ干渉法による細胞の微小変形の観測，信学技報，75（152）：57～62，1975.
- 10) Davidovits, P. and Egger, M.D. : Scanning Laser Microscope for Biological Investigations. Applied Optics, 10 : 1615～1619, 1971.
- 11) Bedarida, F. and Zefiro, L. : Measurements of dihedral angles in crystals by holographic techniques, Journal of Crystal Growth, 24/25 : 327～330, 1974.