



研究技術紹介

共焦点レーザー走査顕微鏡による植物体像の観察

松井 透

高知大学理学部生物学教室 〒780 高知市曙町 2-5-1

Matsui, T. : The confocal laser scanning microscopy for plant surface observations Jpn. J. Phycol. (Sôru) 34 : 30-36.

A method for plant surface observations using confocal laser scanning microscopy was developed. It is possible to obtain greater depth of focus and finer resolution than with standard optical microscopy, and the specimens can be observed without being damaged.

Key Index Words : autofluorescence - confocal laser scanning microscope - image processing - surface observation - three dimensional imaging

Tohru Matsui : Department of Biology, Faculty of Science, Kochi University, Akebono-cho, Kochi 780, Japan.

はじめに

小さな植物体をもつ藻類やコケ類などの形態を顕微鏡写真撮影する場合、顕微鏡像の焦点深度が浅く、全面にフォーカスの合った写真を撮影できないことが多い。田中(1962)によると20歳台の人が10倍の接眼レンズで適切な照明法のもとで光学顕微鏡観察を行った場合、対物レンズが10倍の時でおよそ47 μ m、40倍の時でおよそ3.1 μ mの焦点深度が得られるという。明視野照明法での観察の場合、焦点位置から大きくずれた試料は見ることができないが、わずかにずれた試料はぼやけた像として見え、観察や写真撮影に支障をきたす場合が少なくない。コンデンサの絞りを深く絞りこむことにより焦点深度を深くすることができるが、解像度の悪化を覚悟しなければならない。暗視野照明法や落射照明法、特に落射蛍光観察の場合は試料そのものが輝いて見えるため問題はより深刻である。焦点位置から大きくずれた試料からの光も観察に悪影響を及ぼす。また、コンデンサレンズと対物レンズを1つの

レンズで兼ねているため、絞りを設定できないので焦点深度を稼ぐことができない。熟練した研究者なら微妙にフォーカスをリアルタイムに変えながら正確な観察を行い、3次元立体構築すら行っている。しかし、写真撮影の場合、ある一瞬をフィルムに写しこむので、熟練研究者の技術を写真として表現することは極めて困難である。

共焦点レーザー走査顕微鏡はごく最近実用化され、生物学の諸分野で急速に利用されはじめたまったく新しい光学顕微鏡である。この顕微鏡を用いて厚い試料を観察した場合、あたかもマイクロームで試料を薄くスライスしたかのように焦点の合っている部分の像だけが取り出され、理想的な光学切片像が得られる。また、わずかでも焦点の合っていない部分の像はほぼ完全に取り除かれるので、観察にはほとんど影響を与えない。このようにして得られる非常に薄い光学切片像を、指定した厚みで連続して取り出すことも可能で、得られた多数の光学切片を次々に重ね合わせて、試料の立体観察を行うことすら可能である。すなわち共焦

点レーザー走査顕微鏡は試料内の構造の厚さ方向の分布解析を行う場合に特に優れた能力を発揮する。また、梶谷・徳田 (1994) によると理論的には通常の光学顕微鏡の約 1.4 倍の分解能が得られるため、これまで以上に微細な構造の観察を行うことができるという。生物学、特に細胞生物学の分野では超薄光学連続切片が得られる落射蛍光顕微鏡として利用され、微小管やマイクロフィラメント等の細胞骨格要素が細胞内でどのように分布しているかを 3 次元的に観察でき、その威力を発揮している。また、花粉等の微小な試料の立体構造の観察にも利用されている (Lichtman 1994)。

通常、共焦点レーザー走査顕微鏡観察では材料の固定と蛍光染色を行う。瀬川 (1991) は蛍光色素を含有した培養液を用いて、生きた細胞のエクソサイトーシスとエンドサイトーシスの観察を取り上げているが、筆者の知る限り生きた植物体の表面構造の 3 次元立体観察に応用された例はないようである。本稿では共焦点レーザー走査顕微鏡が生きたまま、または乾燥標本を材料とした植物体表面の微細な構造の 3 次元観察にも極めて有効であることがわかったのでその方法を紹介する。藻類やコケ類には非常に小さな体を持つ種類が多く、これらの全体像を詳細に観察・記録するためには焦点深度の極端に深い像が得られる走査型電子顕微鏡が便利である。しかしながら通常行われている高真空モードでの走査型電子顕微鏡観察の場合、あらかじめ試料を固定し脱水し、試料表面に金コーティングをするというややめんどろな処理が必要である。また固定や脱水処理の間に組織や細胞の表面構造にダメージを与え、人工物を生じる可能性がある。たとえ低真空モードでの観察であっても細胞に多量の水を含んでいる植物、特に水中で生活している藻類などで生きたままの個体を観察する場合は乾燥によって細胞が変形してしまう。また、どちらの方法を用いても試料を試料台にしっかりと固定する必要があり、試料の損傷を最小限にいとめる工夫をしなければならず、簡便であるとはいえない。共焦点レーザー走査顕微鏡は極端に薄い光学切片が得られるという特徴を生かして、多数の光学連続切片を重ね合わせることにより、試料をまったく損傷することなく試料表面構造を 3 次元的に立体観察することが可能であり、走査型電子顕微鏡に匹敵する焦点深度を持った像を得ることができるのである (Matsui 1994)。

共焦点光学系の原理

共焦点光学系とは対物レンズに対して共役な位置 (対称的な位置) に焦点位置とピンホールが置かれた光学系をさす。光源側のピンホールで点光源を作り、検出器側のピンホールで焦点位置以外の光を除去する。通常の光学顕微鏡では焦点位置以外からの光が焦点位置からの光と重なり、全体的にはぼやけた像になる。これに対して共焦点光学系では検出器側のピンホールによって焦点位置以外からの光を除去できるので、鮮明で焦点深度が浅い像を得ることができる (Fig. 1)。Fig. 1a は焦点位置に試料がある場合で、試料からの光は検出器手前のピンホールを通過する。しかし Fig. 1b のようにわずかでも焦点位置から試料がずれていると、光は検出器手前のピンホールを通過できない。

1955 年にハーバード大学の Marvin Minsky (“人工知能の父”として有名) によって共焦点光学系の原理が明らかにされた (Minsky 1988) が、実用化するためには極めて細く絞ることのできる高輝度の光源が必要であった。通常の光学顕微鏡に用いられている光源はその波長幅が広く、レンズを通過する時に波長によって屈折率が異なるため、極めて細く絞ることができない。その後、1960 年にレーザー光が発明された。レーザー光は高輝度で波長が一定で位相が揃っているため極めて細く絞ることができ、共焦点光学系にとって最適な光源である。Davidovits and Egger (1969) は共焦点光学系の光源としてレーザー光を用いた最初の顕微鏡を発明した。その後、数々の技術革新 (特にレーザー走査法やコンピュータ処理法) により実用化され、多数のメーカーから発売されるに至った。現在も新しい技術が次々に導入され、高性能・高機能化していると同時に、操作方法はますます容易になってきている。現在の一般的な共焦点レーザー走査顕微鏡はレーザー光源、共焦点光学系ユニット、落射蛍光顕微鏡、制御・画像処理用コンピュータシステム等から構成される。より詳しい原理や構造は Inoué (1989) や大出 (1990)、梶谷・徳田 (1994)、Lichtman (1994) 等を参照されたい。

観察方法

通常、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察する試料は固定と蛍光染色を施す必要がある (加藤・村上 1991 等)。しかしながら植物組織の全体像を観察するため

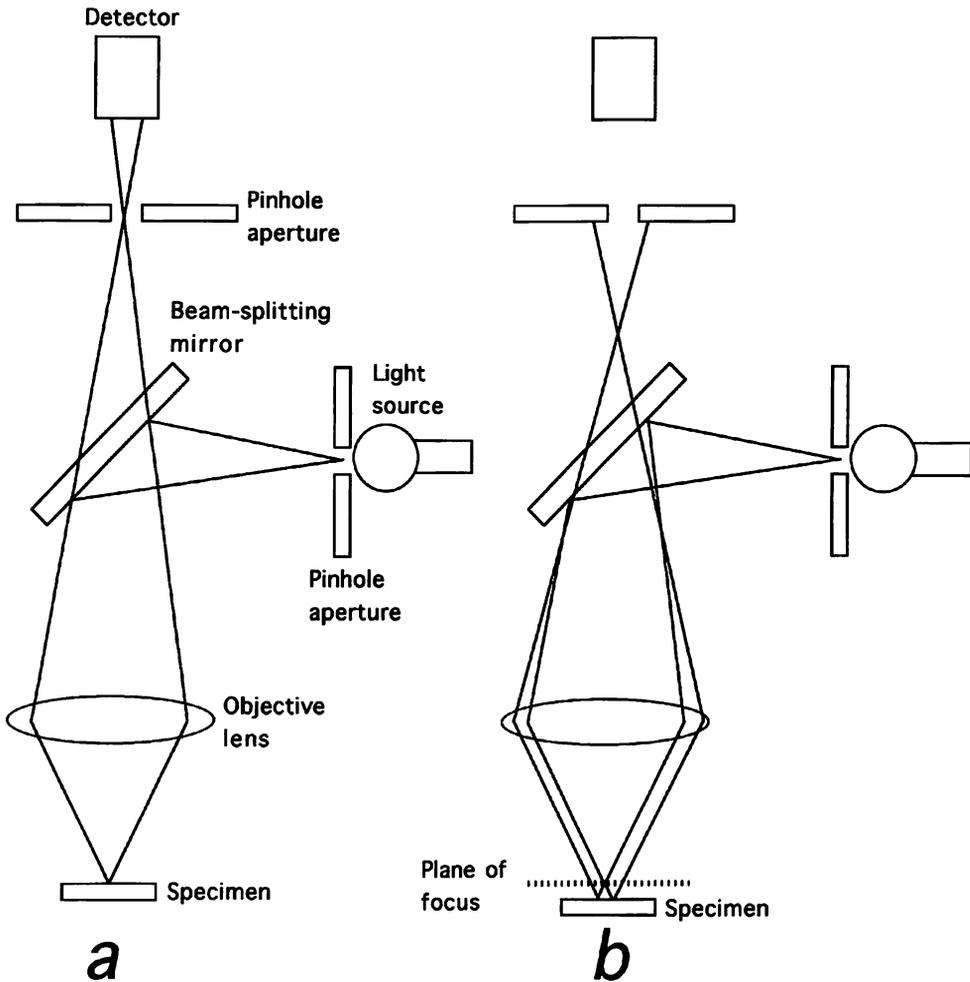


Fig. 1. Optical path in a confocal microscope. a: The specimen is 'in focus.' b: The specimen is 'out of focus.'

には必ずしも蛍光染色の必要はない (Matsui 1994)。これは植物体を形作る細胞壁などが自己蛍光を発するため、無染色でも共焦点レーザー走査顕微鏡で観察できる場合が多いためである。通常の植物細胞内の蛍光顕微鏡観察では細胞壁の自己蛍光は観察の妨げになるが、植物体の全体像を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察するにはこの自己蛍光が役に立つ。このため観察試料は通常の光学顕微鏡で観察するものとまったく同じでよい。また、かなり長時間レーザー光を照射しても蛍光退色しないため、同じ試料に対して相当な回数のレーザー走査を行うことができる。

植物体そのものを共焦点レーザー走査顕微鏡で観察すると、植物体内へレーザー光が届かないか、たとえ届いても励起された蛍光が植物体そのものによって遮られてしまうため、レーザー光で励起される表面の輪郭だけの像が得られる。ちょうど地図の等高線だけが得られたようなものである。各等高線を重ね合わせればどのような起伏であるのかがわかるのと同様、多数の輪郭像だけの光学連続切片をコンピュータで重ね合わせることにより、植物体の全体像が明らかとなる (Fig. 2)。

筆者は通常、ホールスライドガラスまたは通常のス

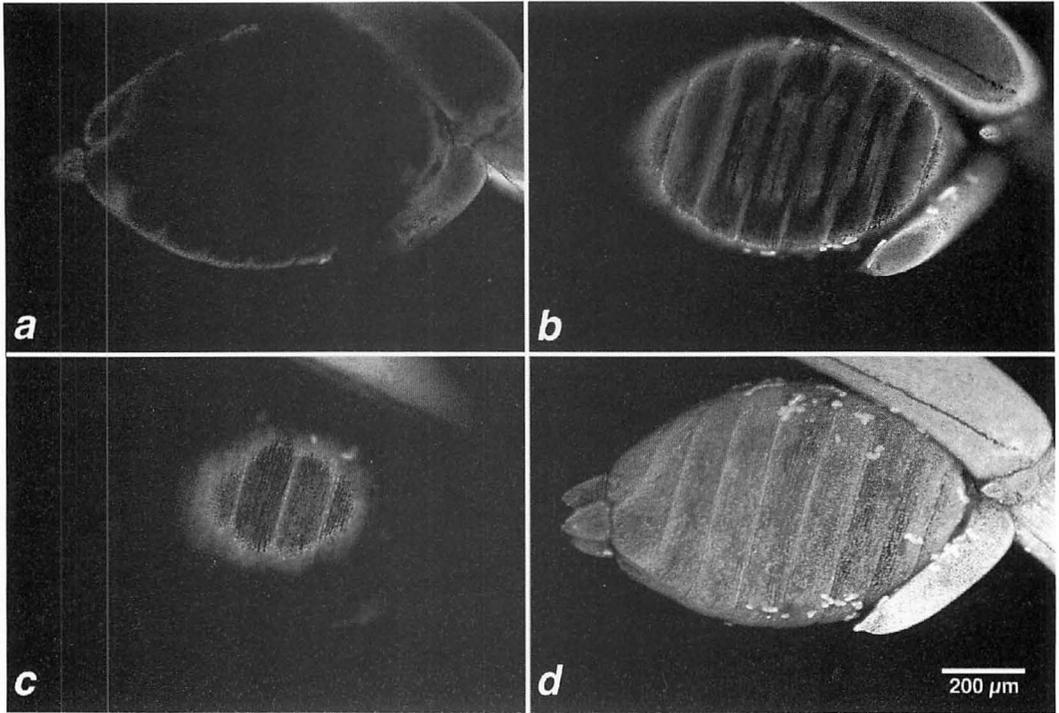


Fig. 2. Image projection of optical cross sections. a: Optical cross section (no. 30 of 64 sections.) b: Optical cross section (no. 45.) c: Optical cross section (no. 60.) d: Image projection of all 64 optical cross sections. *Chara braunii* Gmelin.

ライドグラスに試料を水でマウントし、カバーガラスを載せ、10~40倍の対物レンズで観察を行っている。乾燥標本の場合は乾燥状態のままスライドグラスの上に載せ、カバーガラスを載せて観察している。レーザー光は514 nmの波長を用い、減光フィルタで本来の明るさの10%まで光量を落とすか、場合によっては100%の光量で観察を行う。各光学切片はサンプリング間隔を通常2~5 μm の厚さに設定し、最も遅いレーザー走査速度で1枚の画像につき3~5回程度のレーザー走査を行い、データを平均化して1枚の画像を得ている。立体構造を観察するためには多数の光学連続切片を得る必要がある。このため、試料の奥から手前に向かって10~70枚(時にはそれ以上)の光学連続切片を得ている (Fig. 2a-c)。こうして得られた各画像をコンピュータ処理により重ね合わせ、立体画像を作り上げる (Fig. 2d)。

画像を重ね合わせるためにいくつかの方法が準備されているが、今回用いた方法は最大輝度投影法であ

る。この方法は画像を重ねた時、画像を構成するピクセルの明るさを比較し、明るい方の値を優先する処理法である。高知大学に設置されているBio-Rad MRC-600共焦点レーザー走査顕微鏡の場合、開口数1.4の60倍プランアポクロマート対物レンズで理想的な光学切片像が得られる (Bio-Rad 1991)。本稿で用いている10倍~40倍のような低開口数、低倍率の対物レンズでは理想的な像が得られないため、焦点位置からわずかに外れたぼやけた像も少し写りこんでしまっている (Fig. 2a-c)。しかし、最大輝度投影法で画像を重ね合わせているため、焦点位置からずれた像は焦点位置を正確に捉えた別の像により置き換えられるので、Fig. 2dのようにぼやけた部分はほぼ完全に除去される。この結果、Fig. 2dでは250 μm ほどの焦点深度を持った鮮明な画像が出来上がっている。対物レンズに試料が接しなければより深い焦点深度も得ることができるが、くれぐれもレンズを傷つけないように注意されたい。

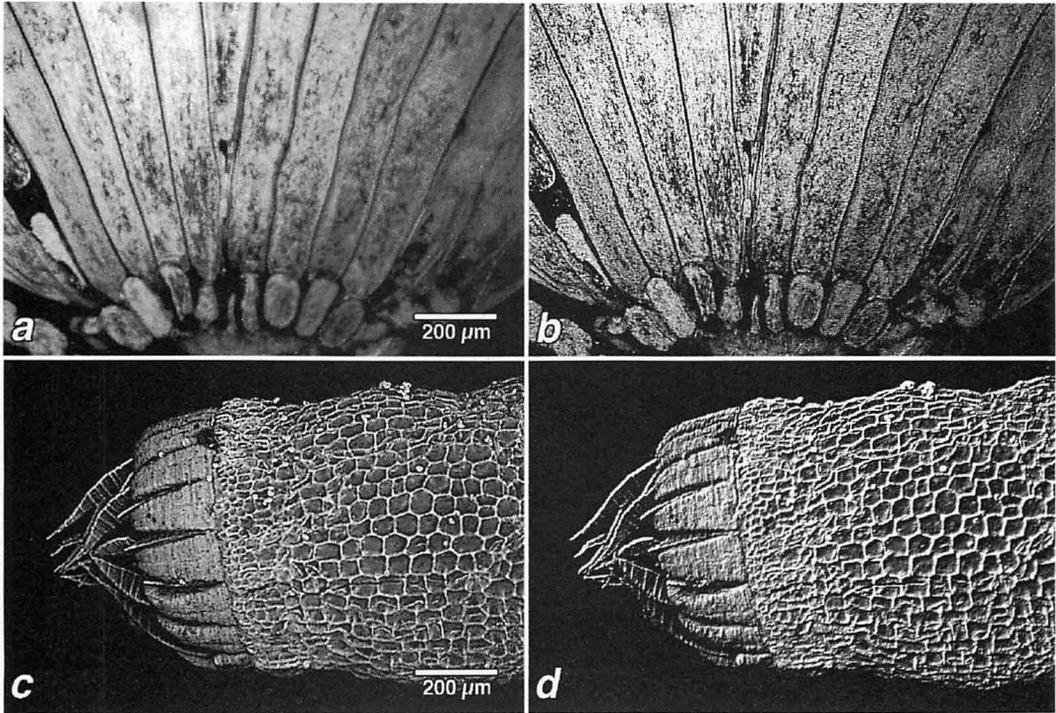


Fig. 3. Image processing. a: *Acetabularia calyculus* Quoy et Gaimard. b: Sharpness filtering from a. c: Capsule and peristome teeth of *Hypopterygium japonicum* Mitt. (dried herbarium specimen.) d: Digital shadowing from c.

画像処理と加工

共焦点レーザー走査顕微鏡で撮影した画像はコンピュータ処理が不可欠なため、デジタルデータとして保存される。このため目的に応じた画像処理が非常に容易に行うことができる (Fig. 3)。Fig. 3aはホソエガサ *Acetabularia calyculus* (緑藻類) の傘基部の像である。この像を元にして画像をシャープ化したものがFig. 3bで、元画像ではほんやりとしていた個々の葉緑体がかっきりとしている。Fig. 3cはヒメクジャクゴケ *Hypopterygium japonicum* (蘚類) の朔と朔歯の像である。この像にシャドウ処理を行ったものがFig. 3dで、明るさの違いを高さとして擬似立体化している。元画像では一様な明るさに見えていた構造にも微妙な濃淡があることが視覚的にわかる。この他にも非常に多くの画像処理法があり、これらの処理法を複数組み合わせることも可能である。また画像処理専用ソフトウェアにも画像データを移すことができる。

通常の共焦点レーザー走査顕微鏡のシステムには

フィルムレコーダ等の画像記録/出力装置が付属しているため、得られた画像をすぐにフィルム等に出力できる。しかしながら、付属のソフトウェアには貧弱なグラフィック処理機能しか装備されることが多く、自分の思い通りの図版に仕上げるのが難しい場合がある。特に植物体の全体像を得る場合、試料にゴミが混入している場合があり、どうしてもこれらのゴミを画像中から取り除きたい場合も少なくない。通常の焼き付け作業の場合では暗室内で様々な技法を駆使しなければならない。このような場合も共焦点レーザー走査顕微鏡で得られた画像データをフォトタッチ用のソフトウェアに移すことにより、非常に手軽に行うことができる。筆者は通常、画像データをApple社のMacintoshへ移し、Adobe社のフォトタッチソフトPhotoshopやアメリカ国立衛生研究所のフリーウェアNIH Imageでコントラストや明るさの変更、画像の修正、スケールや文字等を入れる作業、場合によっては様々な画像処理を行い、フィルムレコーダ等で出力

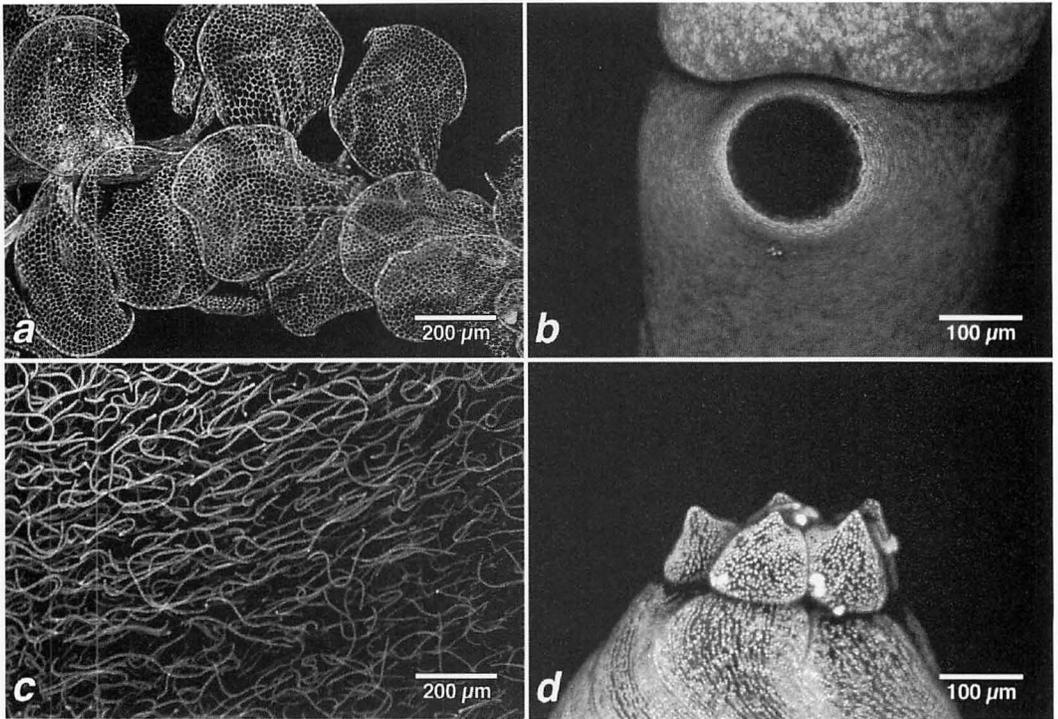


Fig. 4. Confocal laser scanning micrographs of moss and algae. a: *Distichophyllum catinifolium* Froeh. (dried herbarium specimen.) b: *Enteromorpha prolifera* (Mueller) J. Agardh. c: *Nostoc commune* Vaucher. d: *Chara braunii* Gmelin.

するようにしている。本稿で用いた写真はすべて Photoshop で加工後、出力業者に依頼して Adobe 社の Illustrator でレイアウトし、Canon 社の Pixel Jet プリンタで出力したものである。

今回の材料について

Fig. 2はシャジクモ *Chara braunii* (輪藻類) の雌器である。64枚の光学連続切片像を撮影している。Fig. 2aは30枚目の光学切片像で、雌器の輪郭が明瞭に観察できる。Fig. 2bは45枚目の像で、らせん細胞の配列状態が明瞭に観察できる。また、卵細胞の輪郭も観察できる。Fig. 2cは60枚目の像で、らせん細胞に葉緑体が直線状に配列していることがわかる。Fig. 2dは64枚の光学切片像をすべて重ね合わせた像である。走査型電子顕微鏡を用いても同様な像を得ることができるが、高真空モードでの走査型電子顕微鏡観察では固定、脱水、金コーティングのプロセスを経るため、材

料は死んでしまう。また、低真空モードによる観察でも水分の多い藻類はすぐに乾燥してしまい、原形を保つことがむずかしい。しかし共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより、生きたままの藻体を通常の光学顕微鏡で観察するのとまったく同じ状態で観察することができる。

Fig. 3aはホソエガサ(緑藻類)の傘基部で、白く光っているのは葉緑体に含まれるクロロフィルの自己蛍光である。葉緑体が細胞内に比較的均一に観察されるため、藻体の輪郭もよくわかる。Fig. 3cはヒメクジャクゴケの朔と朔歯である。乾燥標本を用いている。この写真の場合10倍の対物レンズを用いて5μm間隔で137枚の光学切片を得て、すべての像を重ね合わせている。このため焦点深度は約685μmある。通常の光学顕微鏡で10倍の対物レンズを用いた場合、得られる焦点深度は約47μmなので約15倍もの能力向上が行われたことになる。朔壁の細胞の形態や配列状態が非常によくわかる。通常の走査型電子顕微鏡写真では

材料の表面のみの観察しか行えないため、この写真のように細胞の輪郭が明瞭な像は得られない。また、朔歯表面の横条も明瞭に観察される。朔表面に見られる非常に輝度の高い顆粒状のものは本種の胞子である。

Fig. 4aは *Distichophyllum catinifolium* (蘚類) の配偶体で、乾燥標本を撮影したものである。葉の細胞の輪郭が明瞭になっているため、細胞の配列状態が一目瞭然となる。Fig. 4bはスジアオノリ *Enteromorpha prolifera* (緑藻類) の主枝と小枝の断層写真である。小枝内は空洞であることがわかる。小枝の断面は光学切片像で、機械的に切断したものではない。このように共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより材料を切断することなしに断層像が観察できる。Fig. 4cはイシクラゲ *Nostoc commune* (藍藻類) の糸状体である。かんでん質の部分はまったく自己蛍光を発しないため何も観察されない。このため糸状体のみが撮影できる。この写真では左上が最も手前で右下が最も奥であることもよくわかる。また、各糸状体の上下関係も明確にわかる。通常の光学顕微鏡写真では焦点深度を極端に浅くすることができないため、どうしても各糸状体が重なりあってしまい、上下関係を表現することは困難である。また、焦点面からわずかにずれた糸状体もぼやけて写りこんでしまう。Fig. 4dはシャジクモ (輪藻類) の冠細胞である。白く光っているのは葉緑体に含まれるクロロフィルの自己蛍光である。冠細胞とらせん細胞の位置関係や冠細胞と葉緑体の配列が明瞭にわかる。また、らせん細胞では原形質流動が非常に速いため、葉緑体が高速に移動し、その道筋が帯状に観察される。これに対して冠細胞では葉緑体の移動が遅いため、各葉緑体の形態がはっきりと観察される。

おわりに

共焦点レーザー走査顕微鏡は極めて薄い光学切片が得られるため、これまで困難であった様々な形態の解析が可能となった。しかし、これまで細胞生物学以外の分野ではあまり用いられてこなかったように思われる。本稿で述べてきたように共焦点レーザー走査顕微鏡はまったく無処理の材料を用いても、これまで観察できなかった世界を我々の前に見せてくれる。今後、生物学のあらゆる分野において強力な研究機器としてその能力が発揮されるものと期待される。

筆者が共焦点レーザー走査顕微鏡にはじめて触れたのは高知大学にBio-Rad MRC-600システムが設置され

た1994年5月のことである。それまで“共焦点レーザー走査顕微鏡”という名前は知っていても、何を観察することができるのかさえ知らない状態であった。このようなまったくの初心者に様々なアドバイスをしていただき、本稿をまとめるようご配慮いただいた高知大学理学部生物学教室の奥田一雄博士にこの場をお借りして感謝いたします。

引用文献

- Bio-Rad Microscience Division 1991. BIO-RAD MRC-600 Laser Scanning Confocal Imaging System. Operating Manual. Bio-Rad House, Herts.
- Davidovits, P. and Egger, M. D. 1969. Scanning laser microscope. *Nature* 223 : 831.
- Inoué, S. 1989. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. p. 1-13. In : Pawley, J. (ed.) *The Handbook of Biological Confocal Microscopy*. IMR Press, Madison.
- 梶谷文彦・徳田周子 1994. 共焦点レーザー走査顕微鏡. *蛋白質核酸酵素* 39 : 1911-1919.
- 加藤一夫・村上 徹 1991. 共焦点レーザー走査顕微鏡 : 全載標本の観察. *細胞* 23 : 76-10.
- Lichtman, J. W. 1994. Confocal microscopy. *Sci. Am.* 271 (2) : 30-35. (大出孝博訳. 立体像が得られる共焦点顕微鏡. *日経サイエンス* 24 (10) : 100-106.)
- Matsui, T. 1994. *Leskeodon rotundifolius* Bartr., a new synonym of *Distichophyllum catinifolium* Froeh. *Hikobia* 11 : 423-428.
- Minsky, M. 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10 : 128-138.
- 大出孝博 1990. レーザー走査顕微鏡の開発. *日経サイエンス* 20 (10) : 42-53.
- 瀬川彰久 1991. 共焦点レーザー顕微鏡による生きた細胞の観察. *細胞* 23 : 81-84.
- 田中克巳 1962. 顕微鏡の使い方. 裳華房, 東京.