

シリーズ「ビデオマイクロスコープ(VEC-DIC)法実験技術講座」

ビデオマイクロスコープの基礎

寺川 進

(浜松医科大学・光子医学研究センター)

1. ビデオ強化型微分干渉顕微鏡による細胞生理学

微分干渉顕微鏡の像をビデオカメラで捉え、映像信号を画像処理装置によって加工することによって、微細形態を詳細に観察することを生物学に持ち込んだのは R. Allen である。彼は、この手法で原生動物の細胞内構造を観察した¹⁾。それまでの光学顕微鏡像よりはるかに微細なものの観察が容易になることがわかり、さらに、イカの巨大軸索の内部の観察にこれを用いて、軸索内の微小顆粒が滑走運動するのを見いだした²⁾。これがラジオアイソトープ法などによってすでに知られていた早い軸索輸送の再発見となった。同じ現象は Allen らが論文発表する前に H. Horie, T. Takenaka らによっても観察されていた。その後、Allen は病死し、軸索輸送の研究は R. Vale らに受け継がれ、モーター・タンパクとしてのキネシンの発見に至る²²⁾。それまで、分子的な現象として直接見ることなど考えられなかったものが、実は直接見えるような顆粒の動きであることが分かっただけでなく、この顕微鏡法の高い解析力によって新しいタンパクが発見されたのは大きな成功である。電子顕微鏡のみの研究では、10年も20年もその発見は遅れたのではないと思われる。この分野の研究については、本シリーズの Hori らによる総説で紹介される予定である。Allen はこの方法に Allen's Video-Enhanced Contrast Differential Interference Contrast Microscopy という名を付けた。このようなビデオ技術はすでに工学の分野では既知のものであったことや、S. Inoue らによっても同時に導入使用されていたので、今では、Allen の名前

を冠せず、一般名の部分を略して VEC-DIC Microscopy とかビデオマイクロスコープと呼ぶことが多い。分解能はマイクロメートル(μm)以下の領域に達し、ナノスコープの範囲に入れることもある。

この手法では、すべての生体標本の形態が観察対象となる。電子顕微鏡法で固定が難しくアーチファクトなどが疑われる対象についても、生きた状態での高倍率観察ができるので形態の真偽を確認することも可能である。従来型の光顕でも電顕でも観察しにくい構造を見つけたし、生きた状態で調べるのにも向いている。我々は、無脊椎動物有髄神経の髄鞘に、跳躍伝導のための特殊な窓構造が存在するのを見いだした⁵⁾。窓は $10\sim 50\ \mu\text{m}$ の大きさであるが $1\ \text{cm}$ に1個しかなく、この方法を用いるまでは見つからなかったものである。しかし、この観察法の真価は生きた細胞や組織の生理的な反応が形態変化として現れたときに最も発揮される。たとえば、神経細胞の成長円錐が示す活発な活動を観察するのに最適な方法である¹⁴⁾。成長円錐では、フィロポディアやラメリポディアの目標探索運動や、軸索を引っ張ったりガイドしたりする役目が明らかにされた。我々は、電気刺激で成長円錐から数百ミリ秒の間にフィロポディアが発芽伸張する反応を見いだした¹¹⁾。また、成長円錐の萎縮反応についても調べた⁶⁾。さらに、このような形態的の反応に加えて、やはり分子的レベルの反応と考えられていたホルモン分泌が直接見える現象であることを見いだした¹⁷⁾。内分泌²⁰⁾だけでなく、外分泌^{21,12)}、神経分泌も直接可視化することができた。これまで、非常に大きな分泌顆粒をもつ肥満細胞では従来型の位相差顕微鏡で分泌反応

が見えていたが、一般的な大きさの顆粒をもつ分泌細胞で果たして肥満細胞と同じ反応であるかどうかは分からなかった。直接可視化されて初めて、エキソサイトーシスという基本的な過程は同じであるがその性質には大きな違いがあることがわかった。この件については本シリーズの別稿にて述べる予定である。細胞膜の伸張によって開閉するイオンチャネル(SAチャネル)を研究していたM. Sokabeは細胞膜の伸張される様子を正確に見ようとして本法を用いた研究を行った¹⁵⁾。パッチ電極先端において電極と細胞膜がどのように接着してギガシールが形成されるのかが分かり、細胞膜の伸張の度合いが正確に決められ、SAチャネルの刺激応答関係をきれいに求めることができた(本シリーズ Sokabe の総説参照)。Sheetzらは微小なビーズを細胞膜に結合させ、その重心の位置をnmの精度で決定し、細胞膜の脂質の動きをや流動性を直接的に測定した。光学顕微鏡の分解能としてはせいぜい100nmであるが、それでも位置としては1nmを切る精度の測定が可能であ

ることを示した¹³⁾。S. Kamimuraらは同様の方法をdyneinの微小管上の運動解析に応用した²³⁾。FFT解析によってdyneinに結合させたビーズが数百Hzの振動を示すのを捉え、微小管上でdyneinが力を出す様子が観察できた(位相差顕微鏡を使用)。A. Kusumiらは、膜のレセプターやタンパクに抗体などを介して特異的にビーズを結合させて、レセプターの位置を可視化した。さらに、それを光ピンセット(レーザー・ツイーザー)によって摘んで動かしてみることにより、レセプターが膜直下の細胞骨格によってつくられる微小な領域に囲まれているという膜フェンスモデルを提出した(本シリーズ Kusumi の総説参照)¹⁰⁾。内耳のHair cellは電気刺激に応じてその高さを数ミクロン変化させるということが単離した標本で観察され、耳音響反射との関係が論じられている⁸⁾。赤外線光源にすると、光の散乱効果が減少し、厚い標本での光の透過性がよくなる。これを利用した、赤外ビデオマイクロスコープ(IR-VEC)も脳スライス標本などで電気生理学的手法を用い

表1. ビデオマイクロスコープ(VEC-DIC法)によって観察される生理反応

対象標本	反応	研究者	年
神経軸索	微小顆粒の軸索内滑走運動* キネシンの発見	Allen	1982
		Vale et al	1984
有毛細胞	電位変化による変形の測定	Kachar et al	1986
成長円錐	伸張と萎縮、目標探索運動 急速フィロポディア発芽 ボツリヌス毒素による退縮	Smith	1988
		Manivannan & Terakawa	1993
		Igarashi et al	1996
細胞膜	ビーズによる膜流動性の可視化 パッチ電極内の伸張変形測定* レセプター標識化と摂動*	Sheetz et al	1988
		Sokabe & Sachs	1989
		Kusumi et al	1990
内分泌細胞 外分泌細胞 神経終末	分泌顆粒のエキソサイトーシス*	Terakawa et al	1989
好中球	食作用とエキソサイトーシス 血管内皮との相互作用	Suzaki et al	1993
		Haapaniemi et al	1993
中枢神経細胞	スライス標本の赤外線観察* グルタミン酸毒性と核内変化	Dotd & Zieglgänsberger	1994
		Ikeda et al	1995

*本シリーズに総説が予定されている。

るとき、電極と神経細胞の関係を観察するのに有効である³⁾(H. Miyakawa による総説が予定されている)。その他、ビデオマイクロスコープの応用は広く、好中球の食作用¹⁶⁾や、血管内皮細胞と白血球の相互作用⁴⁾、トランスミッターによって引き起こされるニューロンの核内活性化⁷⁾の観察など、様々なものがある(表1)。

II. 微分干渉顕微鏡の特徴と使用上のポイント

1) 微分干渉法の原理

微分干渉顕微鏡は標本内の屈折率にしたがって光の位相がずれるという原理にもとづいて像の明暗(コントラスト)を形成する。位相差顕微鏡と似ているといえるが、位相差顕微鏡では屈折率の絶対値に応じた明暗となるのに対して、微分干渉顕微鏡では屈折率の空間微分に応じた明暗となる点が異なる。微分のための変数を決める空間軸が、通常は、顕微鏡ステージのX-Y平面内の45度方向にある。屈折率の空間微分とは近傍における屈折率差であり、それが零であればその点が灰色となり、差の符号の正負によって灰色より明るくなるか暗くなるかが決まる。偏光面の直交した2つの光のビームを、対物レンズの分解能程度の距離だけずらして平行に標本に通し、両方の光の位相がずれるのを偏光干渉法によって明暗とする。位相のずれはそれぞれの光が通過した部分の屈折率の差に比例するので、明暗は屈折率差を示す。微分方向の空間軸に沿って微分係数が正であれば明るく、負であれば暗くなるというようになっているが、プリズムの位置を変える装置(スライダー)の調節によってこの関係は逆転させることもできる。この軸に直交する方向には明暗は形成されない。2つのわずかにずれた光のビームを作るところと、偏光干渉によって明暗を検出するところには偏光プリズムが使われる。Wollaston prism または、Nomarski prism が使われている(後者を使う場合にはNomarski顕微鏡ともよばれる)。2つの偏光がレンズによってプリズムの表面に収束され、この表面におけ

る光の干渉によって明暗ができるので、表面にフォーカスされていない光では、明暗のコントラスト形成に対する寄与が小さくなる。

2) 光学的切断像

このような結像原理によって、微分干渉顕微鏡のユニークな特徴が生ずる。そのひとつは標本を光学的に切断する能力である(図1)。切断されて実際の像となるセクションの厚みは、コントラストが急速に弱まる点を目安にすると、1~2ミクロンとなる。この能力は共焦点レーザー顕微鏡においては広く知られるところであるが、従来型の光学顕微鏡のひとつである微分干渉顕微鏡においても同様の能力があることは意外に知られていず、もっと利用されていい機能であると思われる。ただ、微分干渉顕微鏡は明視野顕微鏡としての性質も合わせ持っている。標本の屈折率像だけでなく光吸収の像も重なっている。無染色組織の中の赤血球などは、特徴的吸収のため色付いて見え同定しやすい。明視野像の部分の光学的切断能はやや悪い。

3) Z軸方向の分解能

切断された像の中で完全にフォーカスの合っているところはごく一部である。屈折率差の符号が明暗を決めるので、微小な点状の高屈折率の標本があると、その点の中央に明暗の境目が現れるのがフォーカスが正確に合った状態である。したがって、切断像の厚みは1 μm より大きくても、フォーカス位置は非常にシャープに決められ、その精度は0.1 μm に近いものとなる(図2)。フォーカス調節ノブにロータリーエンコーダーを組み込み、対物レンズの高さをコンピューターに入力すると細胞の高さを測ったり組織の3次元再構成に役立つ。図3にエンコーダーの信号処理回路を示した。生理学研究所の小原正裕と市川 修の両氏によって作られた回路で、十分高速でコンピューターへの入力ができ、さらに、そのデータを画像処理装置に転送し、ビデオ観察中の像と共にフォーカスの位置をビデオテープの各駒に0.1 μm の精度で記録することが可能である。

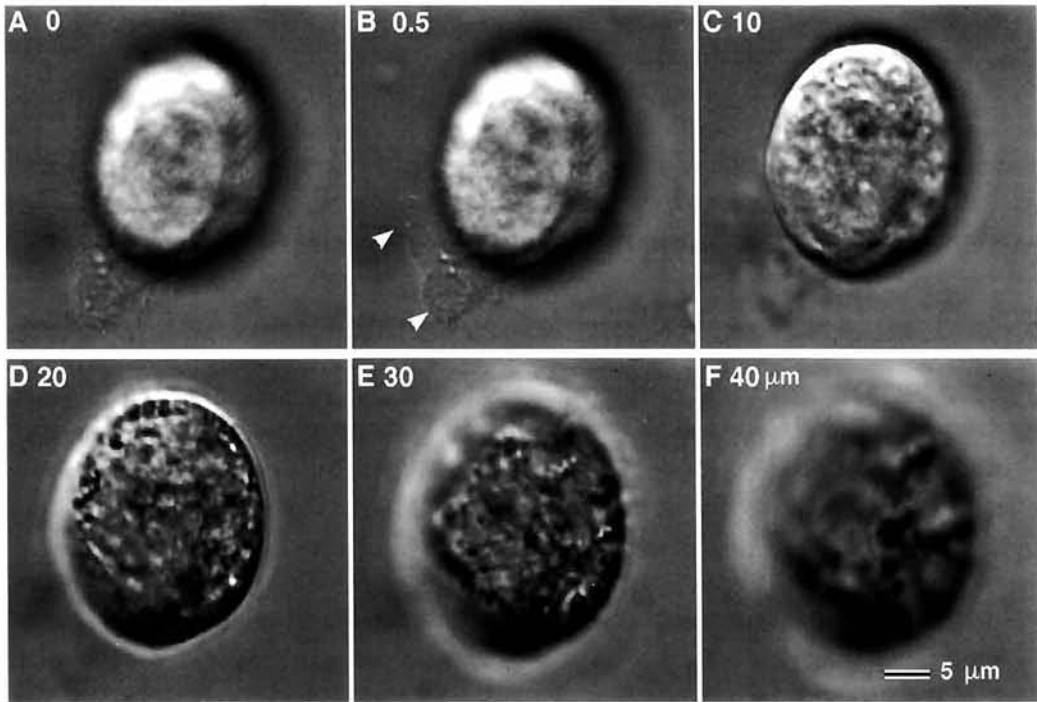


図1. 光学的切断効果. ガラスの上に接着培養したウシ副腎髄質のクロマフィン細胞を観察し、フォーカスをガラス表面から順次移動させて得た連続像. 左上の数字はフォーカスの高さを示す(単位は μm). ガラスに接着したラメリポディア(矢頭)の見え方の変化と、各像のコントラストの違いに注意. 3桁の精度で細胞の高さの測定もできる. フォーカスから遠い部分の画像がぼやけて重なっているのが分かるが、さらに高倍率で観察するとぼやけた領域の面積が広がり、重なりがわからなくなる. S-VHSビデオテープの再生像をコンピュータファイルとし、Macintosh 上にて Photoshop 3.05 J を使って各駒を配置した. ラベル、数字、較正棒は Photoshop 上で添加し、Sony の UP-D7000 にてデジタル出力した.

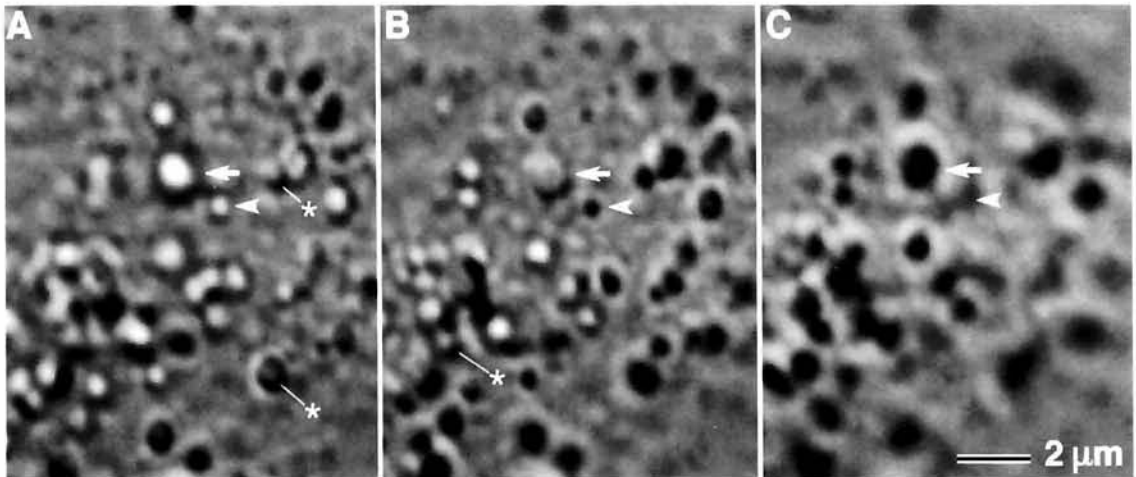


図2. フォーカスの小さな移動による細胞内顆粒の見え方の変化. フォーカスを $0.7 \mu\text{m}$ ずつ動かして得た3枚の連続画像. 倒立顕微鏡で対物レンズをステップ状に上げた. 矢印で示した大きな顆粒はフォーカスを $1.4 \mu\text{m}$ 動かすと白から黒に変化した. 一方、矢頭で示した小さな顆粒は $0.7 \mu\text{m}$ 動かすだけで白から黒へ変化した. ジャストフォーカスにある顆粒は白黒半々の像になる(星印).

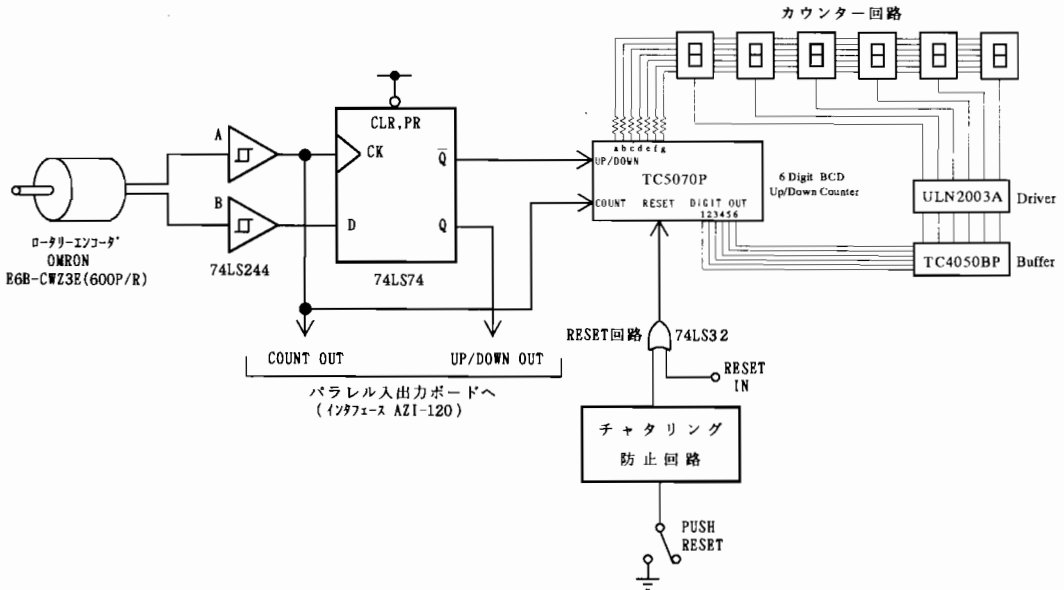


図3. フォーカスの位置をコンピュータに記録するためのロータリー・エンコーダー信号処理回路。顕微鏡のフォーカス微調整つまみの軸にエンコーダー軸を直結し、回転角の値を PC 98 にパラレルポートを介してマシン語で入力する。この情報は画像処理装置に送られビデオ画面に時々刻々数値として記録される。生理学研究所の小原正裕，市川修らによる。

4) X-Y 軸方向の分解能

標本の各深さの像が重ならないために、対物レンズが本来もっている分解能がそのまま有効になる。さらに、ビデオ画像処理によって必要部分のコントラストの増大をすると、眼やフィルムによる観察では2点に分解できにくい場合でも分解されるようになる。しかし、分解能が飛躍的に上昇することはなく、 $0.2\ \mu\text{m}$ をやっと切る程度である。分解能を決めるのは対物レンズの開口数 NA である。これまで長い間、光学顕微鏡の対物レンズの開口数は1.4が最も高いもので、これ以上のものはできないとされてきた。簡単な分解能 d を与える式は $d = \lambda / (2 \text{ (NA)})$ であり、波長 $0.6\ \mu\text{m}$ の光では $d = 0.21\ \mu\text{m}$ となる。最近、我々は高屈折率ガラスを用いることによって開口数1.65という油浸レンズ(オリンパス)を開発した。このレンズを対物用とコンデンサー用に併用すると分解能は $d = 0.18$ となる。設計上の最適波長は $0.45\ \mu\text{m}$ なので $d = 0.14\ \mu\text{m}$ まで分解可能になることが期待される。ビデオコントラスト増強によって

上昇する分解能の限界はこの数値のさらに20% 小さなもので $0.1\ \mu\text{m}$ である。紫外線を観察に使うことは波長の短い点は有利であるが、色差などの少ないレンズの設計が難しく、かつ、高感度、低ノイズのビデオカメラが無いのが現状である。

5) 拡大率

ビデオカメラによって顕微鏡像を捉えてそれをモニタースクリーン上で観察するという方法は、接眼レンズをとおして眼で観察するのと大きな違いがある。分解能の向上がある以上に、大きな拡大率が得られる。通常の倍率は5,000~20,000倍が適当である。この倍率は、光学系での倍率200~500倍程度に、ビデオ装置によって得られる倍率を掛け合わせたものである。ビデオカメラとして1/2インチのCCD受光面をもつカメラを使い、14インチのモニター上で観察すると単純計算では28倍の拡大率となる。実際にはCCDの受光面全体より小さい部分がモニターに写り32倍程度までの拡大率が得られる。1/3インチのカメラを使うとビデオでの拡

大率は42~45倍になる。これで総合倍率が20,000倍に達するが、このような倍率は従来、光学顕微鏡では無効倍率と呼ばれ、不必要なものとしていた。しかし、実際に眼を使って観察する場合、接眼レンズを通して見た像と、ビデオを介して見た像とでは大きな違いがある。拡大率が大きいと、標本上の1 μm の大きさの点はモニター上で1cmの大きな点になる。点の中の細かい構造は、分解能の限界があるため現れてこないが、点の重心の位置は精度よく決定できる。この精度は画面上で0.1mmくらい、標本上では10nmになる。このような重心の移動は拡大率が大きい方がはっきり見える。つまり、速度という量も拡大されて見えるのである。多くの細胞の観察で最も眼を引くのは細胞の形や細胞内小器官の時々刻々の変化や運動である。ビデオ顕微鏡は細胞の形態の観察というよりは、その生理反応やダイナミクスを観察する手法という位置づけが適している。

6) 画像の見え方

屈折率の勾配に従って明暗が決まるので、屈

折率が生理塩溶液よりも高い細胞では、片端が明るく、その反対端が暗くなる。ちょうど斜め上から光を受けたレリーフのように立体的に見える。このイメージは標本の1 μm の厚みの部分の屈折率分布に対応するものであり、実際の細胞の立体性とは異なる。イメージに現れた立体の高さは標本内の屈折率の大きさに対応する。明暗の関係が反対に出る場合は、その部位が周囲よりへこんで見え、その部分の屈折率が低いことが読みとれる(図4)。このような関係を直感的に把握しやすくするためには、微分干渉像を記録した写真を、上方に白い端が現れるように表示するとよい。視覚心理的に、我々の目は上方に陽の光の存在を仮定してものを見るからである。プリズムの調節によって視野の上方に白い端が現れるようにすることができる。

7) 顕微鏡の選択

倒立型、正立型とも各社類似の価格帯にあり、基本性能には差が無い。ニコンの倒立型(TMD-300)は高倍の対物レンズと組み合わせるために、NA 0.85のドライコンデンサー

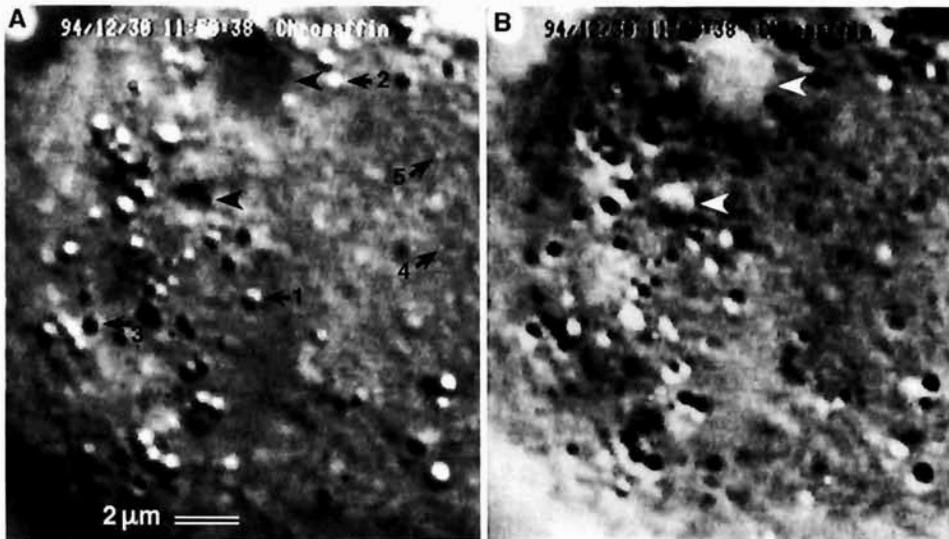


図4. 微分干渉像の立体感と屈折率。A, クロマフィン細胞の細胞質内の様子を好ましい顕微鏡のセッティングで見たもの。矢印1はジャストフォーカスに、矢印2はアンダーフォーカスに、矢印3はオーバーフォーカスにあるカテコールアミン含有顆粒。0.1 μm に相当する直径の顆粒も見えている(矢印4と5)。矢頭は細胞内の液胞。液胞の白黒の関係は顆粒のそれとは逆になっており、その中の屈折率が細胞質の屈折率より低いことを示している。B, Aの像の白と黒を画像処理的に逆転して表示したもの。顆粒がへこみ、液胞が膨らんで見える。

レンズがある。レンズの先端が限界まで斜めに加工してあり、標本にあてた電極の操作がやりやすい。ツアイスのコンデンサーは NA が 0.55 と 1.3 のものがあり、広い作動距離 (25 mm) をもつ 0.55 でも高倍率観察がよくできる。教科書的には、コンデンサーレンズの NA が大きい方が分解能が高くなるのであるが、標本による光の散乱が NA を大きくする効果を上げているものと思われる。オリンパスには微分干渉効果を得るためのプリズムのシヤーの小さな物がある。これを使うと光学切断性能が上がる。標本の深い部分のイメージの歪みをなくすには、レンズ設計上、油浸型より水浸型の方が有利で、このために水浸対物レンズが作られている。この型のレンズはカバーガラスと一緒に使うように設計されており、カバーガラス無しでは性能が出ない点に注意を要する。高倍率の対物レンズを用いると、視野が狭く、微小電極の先端がどこにあるのかわかりにくい。ベルトランレンズを挿入するためのターレットが接眼レンズの前にセットできるもの(ニコン、オリンパス)は、この点大変便利である。本来対物レンズの瞳を見たり、芯出し調節のために使われる物であるが、これで、一時的に拡大率が下がり、視野範囲と焦点範囲が著しく広がる。すぐに微小電極を見つけ、ガイドすることができる。各社の顕微鏡とも、焦点調節のために、レンズ側を固定してステージを動かす方式と、その逆がある。また、X-Y 方向についても、ステージを動かす方式と、ステージ固定で顕微鏡本体を動かす方式とがある。電極刺入などステージ上での操作によって必要なものを選択しなければならない。

Ⅲ. 標本の作成

微分干渉顕微鏡では組織と単離細胞がよい検鏡対象となる。組織は生体内にあるものでも、切り出したものでもよい。微分干渉顕微鏡は透過型顕微鏡のひとつであり、あまり厚い標本では見えが悪くなる。組織の構造によって大きく異なるが、約 300 ミクロンくらいの厚みであれ

ば見る事ができる。複雑な細胞の重なりがある場合は、その厚みのどの部分でも同等に見えるのではなく、対物レンズ側の表面から 80 ~ 100 ミクロンの深さまでが限界である。

1) 生体内組織

腸間膜などの観察は容易である。最近我々の研究室では、ラットの膵臓を引き出して正常な循環の保たれた状態の外分泌組織の詳細を観察することに成功した (Y. Ishihara et al, in preparation)。カルバコール刺激で腺房細胞に開口放出が引き起こされるのが観察できる。組織が薄く、1 cm ほど外に引き出せれば高倍率での観察が可能である。露出された組織を乾燥から守ることと、拍動などによる振動を抑えることが生理反応の高倍率観察には必要である。また、組織を圧迫しないことも生理反応維持に重要な要因となる。

2) 切り出し組織

通常の基本的な標本の作り方は、まず、組織を 5 ミリ角くらいに切り、氷冷し十分に酸素化した溶液中に保存するというものである。この方法で、3 ~ 10 時間反応性を維持できる。組織は厚みが薄い方が見えがよいので、カミソリの刃などで細片とする。目安としては 0.2 ~ 1 mm の大きさにする。カミソリの刃を斜めに折ったものを 2 つ使ってガラス板の上で挟みながら切るか、シリコンラバーの上で押し切りにする (図 5)。切片は必ず斜めになるので適当な厚みの部位を観察できる。標本によっては、切るときの機械的な侵襲によって生理的反応が抑えられ、うまく行かないものもある。そのときは酵素処理によって細胞や腺房を単離する方法をとる。溶液はそれぞれの標本に対して一般的に使われているものでよいが、10 mM のグルコースと 0.1% の BSA を加えると成績が良いようである。バッファーは HEPES でよい。BSA を含む溶液に酸素ガスのバブリングをすると泡が出て始末が悪い。これを解決するには溶液中にシリコンチューブを入れ、これに酸素を通すとよい。細片とした標本はガラスに挟んで固定し、薄い部分を探して観察する。接着テー

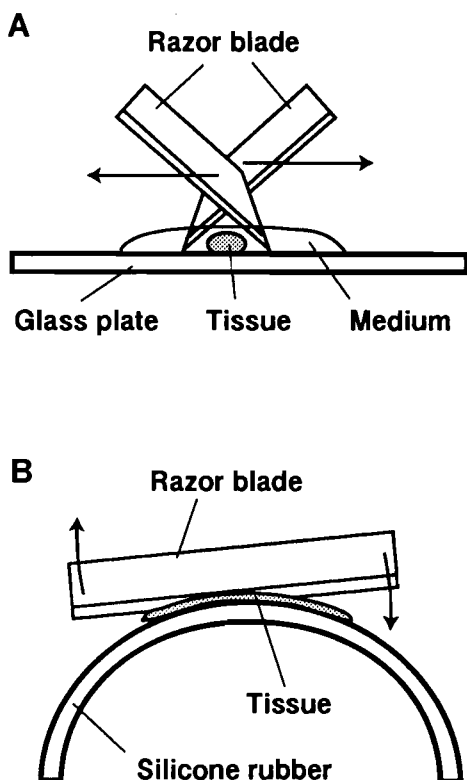


図5. 組織の切り方。A, 2枚のカミソリの刃を矢印の方向に引くことによって組織を切断する。B, シリコンゴムのホースを半切して太鼓橋にし、そのうえに組織をピンで留め、ナイフを回転させるようにして押し切る。

プでスペーサーを作り、ワセリンなどの粘着性を利用してガラスを固定する。高倍率観察には対物レンズの作動距離が短く、通常、厚みが0.17 mm (No. 1) のカバーガラスしか使えない。また、フォーカスの合う距離も短いので標本はレンズから近いところに置かなければならない。

3) バイオプシー標本

ヒトの消化器粘膜からバイオプシーによって得た標本や、手術によって摘出した標本も、正常な生理反応を維持している。数ミリ角の大きさであれば、酸素化し氷冷した輸液用の塩溶液(ラクテックなど)に入れておくだけで10時間ほどは保存できる。バイオプシー標本もさらに小さく切って観察する。

IV. 標本の維持とチェンバー周り

組織を切り出した場合はそれを生きた状態で保存し、さらに顕微鏡ステージ上でその生理反応を維持しなければならない。そのための工夫には多くの物があるが、著者の研究室で用いられている方法を簡単に記す(図6)。

1) チェンバー

対物レンズの作動距離が短いのでチェンバーは薄い物とならざるを得ない。カバーガラスとプラスチックを組み合わせて自作する。標本をガラスで挟むときのスペーサーにはスコッチ

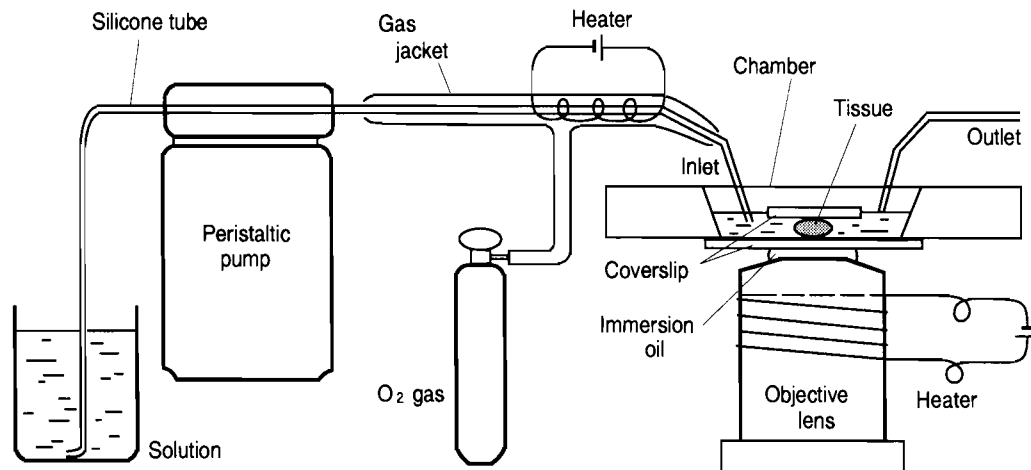


図6. 灌流システムとチェンバー。

テープ(片面または両面糊)を使う。底に厚みが0.17 mm のガラスを貼った35ミリ直径のディスプレイ・ディッシュは、細胞を培養してそのまま高倍率観察ができるので便利である。Meridian から購入できる。

2) 灌流液と加温

標本を載せたチェンバーは連続的生理塩溶液で灌流する。この灌流液は0.5 mm の直径のシリコンチューブに通して供給する。このチューブをもう一つの太いチューブに通して、こちらのチューブには酸素をゆっくりと流しておく。酸素はシリコンチューブを通して灌流液に入り、ほぼ、飽和状態まで酸素化できる。細いニクロム線をチェンバーに入る直前のところでチューブに巻き付けておけば能率よく加温できる。高倍率で観察するときは対物レンズが油浸型であり、標本の載ったガラスは薄いので標本近傍の温度が下がりやすい。そこで、対物レンズにもニクロム線を巻き付けてこれを36度に暖める。標本はレンズのそばにあるのできわめて効果的な温度維持ができる。レンズに対する加温の影響は無視できる。

V. ビデオ装置

ビデオ装置によって、倍率を上げる(拡大)、

暗い像を見えるようにする(増感)、コントラストを上げる(増幅)、ノイズを減らす(平均)、変化分を抽出する(時間微分)など、DIC 顕微鏡の機能を様々に強化することができる。そのための機器について述べる。

1) ビデオカメラ

CCD 型ビデオカメラが最も安く受光面が小さい割に感度が高い。ビデオ信号はコントラスト強調するのが基本であるのでビデオカメラのノイズは小さい方がよい。S/N 値で45 db から60 db のものが実用になる。高倍率観察では像が暗くなるので最低推奨感度が0.1から1 lux のものがよい。カラーカメラはこれより感度が低くなる。カメラによってはコントラスト強調をすると著しい固定ノイズが現れるものがある。これらは、通常の商品規格上では問題が無く、同じ型番でも非常にばらつきが大きいので購入時に注意がいる。浜松ホトニクス、Sony、NEC のものなどがある。ハーピコンと呼ばれるビジコン型のカメラはアバランシェ効果を利用して感度をあげており、オーロラの撮影などに威力を発揮している。やや暗いイメージの高画質撮影により、さらに暗いイメージに対してはICCD カメラが向いている。しかし、高感度の物ほどノイズレベルが上がり、階調巾が下が

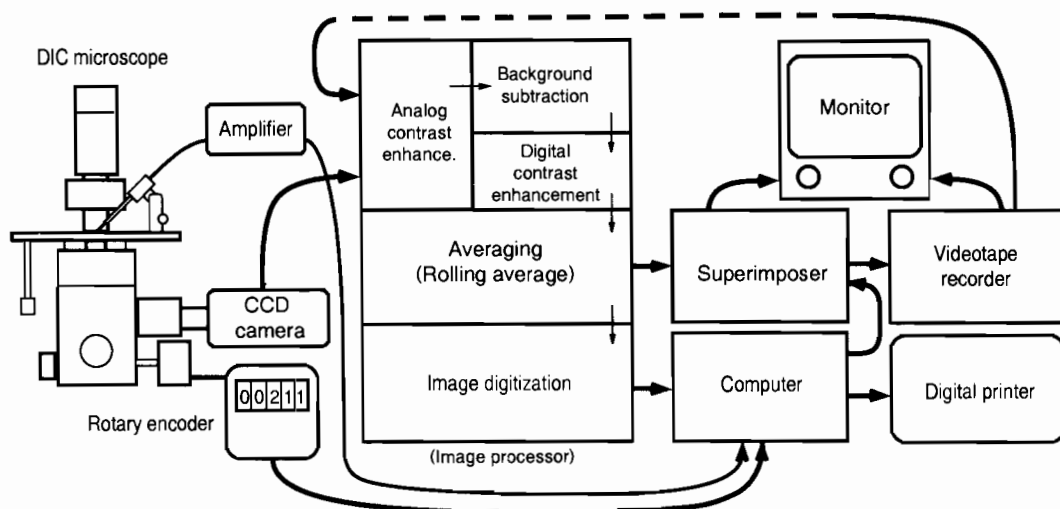


図7. ビデオ信号, Z軸信号, その他の電氣的信号の処理系.

るので、映像信号を増幅してわずかな輝度変化を取り出そうとする用途には向かない。

2) ビデオレコーダー

カメラからのビデオ信号を記録する方法は多様であるが、最も一般的なのはビデオテープを使うことである。ビデオレコーダーは安価な家庭用でも間に合うが、S-VHS方式がHi-8方式よりノイズが少なく解像度もいい。S-VHSデッキも業務用といわれる機種は再生画像の質が家庭用とは歴然と違っている。解像度の点からはVictorのW-VHS方式が優れている。しかし、ビデオマイクロスコープでは簡単に拡大率が大きくなるので、相対的に画像の分解能は下がっており、あまり高分解能の記録系を必要としない。最近出始めた家庭用デジタルビデオは大変優れているが、現在のところカメラで撮った画像の記録ができるだけで、ビデオデッキとしては動作しない(アナログのビデオ入力を用意されていない)。この方式でのビデオデッキはヨーロッパで先行発売された。レーザーディスクを用いたビデオレコーダーは静止画の記録と再生性能がよく、駒撮りに向いている。しかし、アナログ記録であり、高価である。ディスクも高価で、記録できる時間が50分程度と短い。S-VHS型での駒撮り性能(Victor, BR-S925)も最近はよくなっており、画面の中のぶれが殆ど無くなったので、あえてレーザーディスクを使う必要度は減っている。ビデオ信号をデジタル化するコンピュータ用の入力ボードを使って、カメラの映像信号を直接コンピューターに取り込むこともできる。静止画像であればこれでもよい。動画像の時は画像の圧縮の問題やメモリーの容量の問題が出てくる。

3) 画像処理装置

主たる目的はリアルタイムのコントラスト強調機能を使うことである。この目的のためだけであれば、アナログ型のものもほぼ十分な性能を持ち、安価である。デジタル型は色々な機能を持っており、それらの機能の種類に応じて選ぶことになるが、各機能がどのくらいの速度で出来るのかという点に留意する必要がある。

静止画に対して出来る機能も、1秒間30駒のビデオレート(リアルタイム)では出来ないものが多い。各機能はクロックに従って実行されるが、最小クロックはビデオレート、即ち33msである。機能によっては数クロックを必要とする。ほとんどの画像処理装置で、一つの機能は他の機能と重複しては使えず、複数の機能が必要なときにはそれを順次ステップとして実行しなければならない。リアルタイムで処理するときには、複数の画像処理装置を直列につなぎ、各ステップを分担させる必要がある。高価な画像処理装置を何台も使用することは通常できないが、現在のアナログ信号の測定装置が、演算増幅器を何個か組み合わせられてできているのと同じで、一つの画像処理装置を一個の演算増幅器に対応すると考えれば、これも自然な流れである。画像が2次元マトリクスの時間変化を取り扱う点が違うだけである。現在、画像処理の各種機能が一個のICで実現されるようになってきているので、複合機能も自作できる範囲になりつつある。最近ではNTSCビデオレートのうちに4ステップぐらいの機能を実行してしまうDSP処理型や、パイプライン処理型の画像処理装置も登場している。必要とする画像処理の内容がどのような機能の組合せで実現するのかを考慮しなければならない。浜松ホトニクスのARGUS-20、アビオニクス社のイメージΣが使いやすい。背景像(モトルという)を取り込み、見る対象であるリアル像から差し引き、それにコントラスト強調をしてから、さらにローリングアベレージをかけられる。これだけの処理が同時にできる点が良い。ARGUS-20はリアルタイムに時間微分像(各フレーム間の差分像)を表示できる。この機能は筆者が浜松ホトニクスのM. HosodaとともにC-2000という大型の画像処理装置を用いて開発したものであるが、今や、小さな箱に収まるようになった。エキソサイトーシスを正確に計数する際に必要となる機能である。各顕微鏡会社も顕微鏡とセットで画像処理装置を販売している。初心者が使いやすい形になっている一方、高度な機能は省かれ

ている。内部は浜松ホトニクス社のもので基本性能は同等である。筆者は ARGUS の他に ADS 社の PIP-4000 を主に使用している。これは古い型になってしまったが、計測能力が高く、多数のフレームメモリーを持ち、PC 98 にシステムバスを介して接続されるので、両者からフレームメモリーに直接アクセスができる。これによって、連続画像を光磁気ディスク(MO)に落とし、Macintosh コンピュータに移してから Photoshop による作図をしている。同社は新型として PIP-7000 を出している。ローリングアベレージができないのが欠点であるが、他の機能は充実している。

4) 出版用画像データを作る作業

観察によって得られるデータは、主としてビデオテープの記録として残されることになる。ビデオテープの画像を論文用の図にするには、モニター画面に画像を表示し、それをポラロイドなどで撮影して、写真とすればよいが、これは非常に手間がかかり、よい図を作るが難しい。写真の特性(γ 曲線)と、モニターの明るさの範囲を完全に一致させるのは至難である。コントラストを十分に着けて、かつ、階調を正確に表すのはフィルムにとっては背反的な要求となる。ビデオプリンターの方がハードコピーを作るのは容易である。しかし、これも、8ビットを完全に再生してくれるものは少ない。最近の安価なインクジェットプリンターは、カラーの図に対してはかなり満足度が高いが、8ビットの階調をもつ白黒の図を出版用に作るには力不足である。A4 サイズにプリントできないものは、最終的な論文用の図をつくるのに、結局プリントされた紙を切ったり貼ったり、ラベルを入れたりしたいへんになる。A4 サイズで印刷できるものは論文出版用の最終の図ができるので非常に便利である。フジの Pictography 3000 が高価(約250万円)であるがきれいな再生結果を見せる。Sony の UP-D7000, UP-D 8800 などはこれよりはるかに安価で(75~130万円)、ほぼ満足できる性能である(図1, 2, 4)。これらのプリンターはコンピュータからディジタ

ル制御でデータ転送されるもので、ビデオ記録を先ずコンピュータのファイルに取り込む必要がある。このためには、画像をデジタルサイズできる画像処理装置やコンピュータ用差し込みボード(5~20万円)を使う。Radius の Video Vision はフルフレーム・フルカラー・ビデオレートに取り込みができるボードである。ARGUS-20 やイメージΣのような画像処理装置はビデオの駒をコンピュータに転送できる専用のインターフェースが用意されている。また、簡易的には Macintosh コンピューターの AV タイプを使う方法もある。取り込んだビデオデータは、画像ファイルとして基本的な BMP 形式などで保存する。次にこれを Photoshop などのソフトに読み込めば、ラベルや矢印の挿入が自由にでき、上記のプリンターで出力できる。Photoshop 3.0 からはレイヤー構造が使える。画像と、ラベルを別のファイルのように取り扱えるようになり、非常に使いやすくなった。

VI. おわりに

VEC-DIC マイクロコピーは生理学研究にとって新しいフィールドを開いた。この方法は、他の様々な生理学的測定法と同時に併用することによってさらに応用範囲が広がり、新しい現象の発見につながる。特に電極法との併用は容易であり、実りも多い。多くのプローブが使える蛍光法と併用し、同時イメージングをすることも可能である⁹⁾。著者らは、2つの ICCD カメラを使って高倍率での蛍光微分干渉同時イメージングをおこない、クロマフィン細胞や好中球において、エキソサイトーシスと Ca 反応を同時に観察した。特にイメージングをする目的でなくても、細胞、組織レベルの何らかの生理学実験をおこなうときに、標本を載せるための単なる実験台として VEC-DIC 顕微鏡を常用すれば、予期しない反応を観察するチャンスには事欠かないであろう。ビデオ画像処理の内容について解説した拙著^{18,19)}も参考になれば幸いである。

参 考 文 献

- 1) Allen, R. D., Allen, N. S. & Travis, J. L. (1981) Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia latifollaris*. *Cell Motil.* **1**, 291-302.
- 2) Allen, R. D., Metzuzals, J., Tasaki, I., Brady, S. T. & Gilbert S. P. (1982) Fast axonal transport in squid giant axon. *Science*. **218**, 1127-1129.
- 3) Dodt, H. U. and Zieglgänsberger, W. (1994) Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function. *Trend. Neurosci.* **17**, 453-458.
- 4) Haapaniemi, H., Tomita, M., Fukuuchi Y., Tanahashi, N., Takeda H. & Terakawa, S. (1993) PAF-induced white cell-endothelial cell interactions observed under a VEC microscope. In: *Microcirculatory stasis in the brain*. ed. Tomita, M. et al, Elsevier Science Publishers, Tokyo, pp. 185-191.
- 5) Hsu, K. & Terakawa, S. (1996) Fenestration in the myelin sheath of nerve fibers of the shrimp: a novel node of excitation for saltatory conduction. *J. Neurobiol.*, in press.
- 6) Igarashi, M., Kozaki, S., Terakawa, S., Kawano, S., Ide, C., & Komiya, Y. (1996) Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by *Botulinum* neurotoxin C1: a t-SNARE is involved in axonal growth. *J. Cell Biol.*, in press.
- 7) Ikeda, J., Terakawa, S., Murota, S.-I., Morita, I. & Hirakawa, K. (1996) Nuclear disintegration as a leading step of glutamate excitotoxicity in brain neurons. *J. Neurosci. Res.*, in press.
- 8) Kachar, B., Brownell, W. E., Altschuler, R. & Fex, J. (1986) Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature*. **322**, 365-368.
- 9) Kinoshita, K., Jr., Itoh, H., Ishiwata, S.-I., Hirano K.-I., Nishizaka, T. & Hayakawa T. (1991) Dual-view microscopy with a single camera: real-time imaging of molecular orientations and calcium. *J. Cell Biol.* **115**, 67-73.
- 10) Kusumi, A., Sako, Y. & Yamamoto, M. (1993) Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* **65**, 2021-2040.
- 11) Manivannan, S. & Terakawa, S. (1994) Rapid sprouting of filopodia in chromaffin cells, PC12 cells, and dorsal root neurons induced by electrical stimulation. *J. Neurosci.* **14**, 5917-5928.
- 12) Segawa, A., Terakawa, S., Yamashina, S. & Hopkins, C. R. (1991) Exocytosis in living salivary glands: direct visualization by video-microscopy and confocal laser microscopy. *Eur. J Cell Biol.* **54**, 322-330.
- 13) Sheetz, M. P., Turney, S., Qian, H. & Elson, E. L. (1989) Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive membrane glycoprotein movements. *Nature* **340**, 284-288.
- 14) Smith, S. J. (1988) Neuronal cytomechanism: the actin-based motility of growth cones. *Science* **242**, 708-715.
- 15) Sokabe, M. & Sachs, F. (1990) The structure and dynamics of patch clamped membrane: a study using differential interference contrast light microscopy. *J. Cell Biol.* **111**, 599-906.
- 16) Suzaki, E., Terakawa, S. & Kataoka, K. (1993) Real time analysis of exocytosis and cellular Ca^{2+} during phagocytosis in neutrophils. *Acta Histochem. Cytochem.* **26**, 484.
- 17) Terakawa, S. (1989) Optical studies on the intracellular processes for secretion. *Gumma Symp. Endocrinol.* **26**, 137-144.
- 18) 寺川 進 (1990) 高速画像処理による細胞生理機能の可視化. *生物物理* **30**, 10-16.
- 19) 寺川 進: 光学顕微鏡の限界を広げる. *ビデオ顕微鏡* (1993) 実験生物物理 (アドバンステクノロジーシリーズ) 丸善, 東京 pp. 45-80
- 20) Terakawa, S., Fan, J. H., Kumakura, K. & Ohara-Imaizumi, M. (1991) Quantitative analysis of exocytosis directly visualized in living chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* **123**, 82-86.
- 21) Terakawa, S. & Suzuki, Y. (1991) Exocytosis in colonic goblet cells visualized by video-enhanced light microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 466-472.
- 22) Vale, R. D., Reese, T. S. & Sheetz, M. P. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
- 23) Yagi, T., Kamimura, S. & Kamiya, R. (1994) Nanometer scale vibration in mutant axonemes of *Chlamydomonas*. *Cell Motil. Cytoskel.* **29**, 177-85.