

《研究ノート》

ストロボスコープ型遠心顕微鏡

上坪英治

高分解能遠心顕微鏡試作の背景

車軸藻類細胞における原形質流動は、細胞皮層部動因座繊維（アクチン繊維束）と細胞質内質（に含まれるミオシン）との相互作用によっておこる〔1〕〔2〕〔3〕。問題は、この相互作用が一体なんであるかを明らかにすることである。灌流法による細胞モデル〔4〕〔5〕・脱膜内質系による研究〔6〕・アクチン繊維束の運動〔7〕や流動セルによる研究〔8〕など、いずれもこの問題へのもっとも直截的なとり組みであろう。一方、エクトーリン顕微注射による細胞内カルシウムイオン濃度の測定〔9〕や、動因座繊維近傍における流速分布解析の試み〔10〕・同じく粘性の観測などの研究も着実に進められている。

車軸藻類節間細胞の原形質流動は、刺激による細胞膜の興奮に伴い瞬間的に停止する。回復には五〜一〇分を要す。ゲルファン〔11〕は、細胞質粘性の一過性の上昇（ゲル化）を流動停止

の原因と結論したが、田沢ら〔12〕によれば、流動原動力の一時的消失によって流動が停止し、細胞質の粘性は変化しないという。上坪〔13〕は、細胞の興奮と流動停止の連関を任意に切断・接続する方法を見出し、これを節間細胞に局部的にほどこすことによりUターン現象を誘起し、興奮に伴う流動停止の時点で流動動因座近傍の粘性が一過性に高まっていることを間接的に示した。

高分解能遠心顕微鏡を使えば、流動停止ならびにその回復過程における動因座近傍の粘性変化を、より直接的に観測できると考えられる。また、高分解能遠心顕微鏡は、ヒト赤血球変形能の研究、核分裂後期における染色体の運動力の測定、その他従来の遠心顕微鏡によっては不可能な各種の研究を可能にすると思われる。筆者ら〔14〕は、先にストロボスコープ型高分解能遠心顕微鏡開発のための予備試験をおこない、最近、その実用機の試作に着手した。本稿では、各種遠心顕微鏡について概説し、それらの特性について比較検討を加える。

遠心顕微鏡の種類

遠心顕微鏡は、遠心加速度の場における細胞および細胞の部分の状態・挙動を光学顕微鏡観測するための装置である。種々の型の遠心顕微鏡があるが、いずれも遠心機と光学顕微鏡の組み合わせより成る。機構上二種類に大別される。すなわち、顕微鏡光学系（以下光学系と略す）と遠心回転子（以下回転子と略す）とが独立しているもの、および、光学系の主要部分（対

物レンズその他)が回転子内に組み込まれているもの。前者の例として、ブラウン型とストロボスコープ型がある。ハーヴェイ型・ハーヴェイ改変型およびテレビジョン遠心顕微鏡は後者に属する。

光学系の面からみると、試料の虚像またはその対物レンズ一次像を回転子回転軸上に結像させるもの、および対物レンズ一次像を回転軸外に結像させるもの(ストロボ型のみ)に分類することができる。

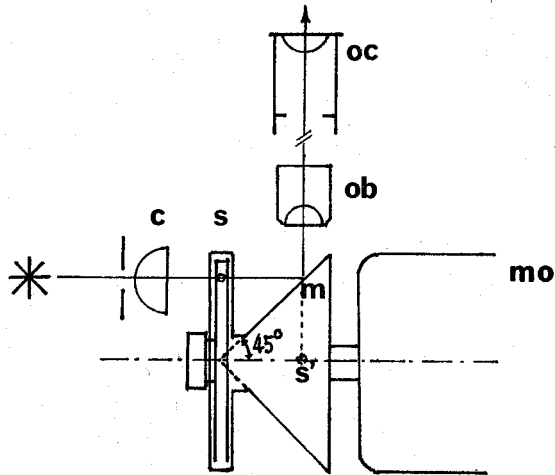
以下、まずブラウン型遠心顕微鏡の構造と機能および問題点についてやや詳しく述べ、ついで他の各型の遠心顕微鏡の構造および特性について記し、ストロボスコープ型遠心顕微鏡への理解の一助としたい。

ブラウン型遠心顕微鏡<sup>15)</sup>

回転子および独立の光学系より成る(図1)。回転子は、試料を入れた遠心容器を塔載する円板部、および円板部と一体に切削してつくる真円錐部からできている。回転子の回転軸は円錐の軸と同一である。円錐の母線は回転軸に対し正確に四五度をなす。

光源を出た光は集光器によって集光され、回転子円板部の半径方向にあげられた細隙を通り、細隙後方に装着されたガラス製遠心容器内の試料を透過したのち、回転子円錐部に接着された表面鏡によって反射されて対物レンズに入る。この時、試料の虚像が回転軸上に形成され、光学系によって拡大される。試

図1 ブラウン型遠心顕微鏡



\* 光源, c 集光器, s 遠心容器内の試料 試料の前(集光器側)は細隙, m 表面鏡, s' 試料の虚像, ob 対物レンズ, oc 接眼レンズ, mo 回転子駆動用モーター, 鎖線 回転子回転軸。説明は本文。

料の虚像は、回転子の回転に伴い回転軸を軸として回転するが、回転子円板の細隙以外の部分が光を遮断すること、および円錐部表面鏡の回転のために、いわばストロボスコープ的静止像として連続観察される。ただし、回転子を低速回転させる場合の像の(へちらつき)は避けることができない。ブラウン型の回転子は、しかし、一般的には半径が小さいために比較的高速回転させることが多く、(へちらつき)が問題となることはあまりな

い。試料の各部分を走査観察するには、光学系を移動する。ブラウン型遠心顕微鏡は回転子の質量が小さく、回転数の——したがって試料に加える遠心加速度の急激な増減が可能であり、各種の生理学的実験ならびに特定の実験のための試料の調整などに極めて有用である(16)(17)(18)(19)。この型の遠心顕微鏡を用いた研究のうち、もっとも見事な結果を得た一例を示す。

#### 温度と原形質流動速度

車軸藻類細胞の原形質流動は、温度の上昇に伴い流速が増加する。この原因として、流動原動力の増加、細胞質の粘性の低下、あるいはそれら両者の変化が考えられる。林(16)は自作のブラウン型遠心顕微鏡を用い、一定の遠心加速度の下でシャジクモ節間細胞の細胞質が細胞遠心端に落ちるに要する時間からその相対的粘性を求め、遠心によって細胞遠心端に集積された細胞質が細胞求心端に向けて流動するのを阻止するのに必要な遠心加速度をもって相対流動原動力とした。温度を変えて両者の観測を行ったところ、五〜一五度Cの範囲で、原動力は一定、細胞質粘性は温度上昇とともに低下することを見出した。したがって、温度上昇にもなう流速の増加は、細胞質の粘性の変化によることが明らかとなった。この結果は、のちに、液胞灌流法(20)によっても確認された。なお、図1に示したブラウン型の回転子は、ブラウンの原型とくらべて全く異った外観をもつ。主として林によるデザインの洗練の結果である。また、構造が単純であるために、保守・点検が容易である。ちなみに、現在

(一九八一年夏)筆者の研究室において稼動中の回転子は一九六二年製である。

遠心加速度の場における試料の顕微鏡像の映画撮影(21)は、回転子が特定の速度で回転している場合を除き、原理的にはほとんど不可能である。しかし、テレビジョンカメラを使用すれば、モニターテレビによる観察ならびに録画ができることがわかった(22)。毎秒六〇フィールド(三〇駒)のVTR方式で、遠心像が明瞭に記録できるしくみについて目下検討を加えつつある。

#### ブラウン型の欠点とその対策

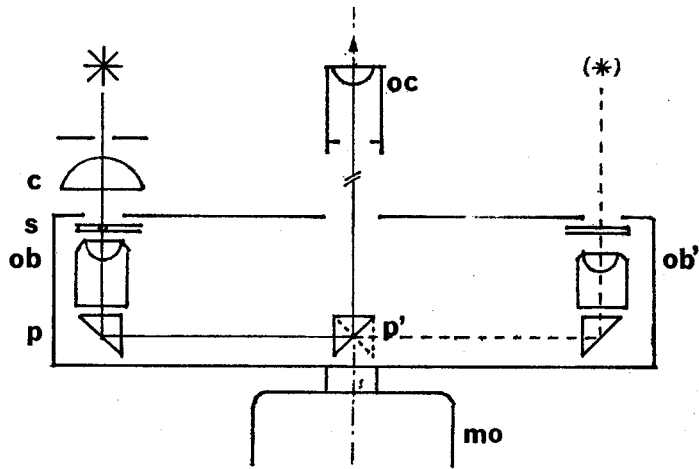
ブラウン型遠心顕微鏡の欠点は、機構上、回転子半径が対物レンズ作動距離より小さくなければならない、という制約である。このため、作動距離の長い——すなわち低倍率の対物レンズを用いざるを得ない。たとえばニコン・アクロマートCF四倍対物レンズの作動距離は二〇ミリメートルであるから、これに対応する回転子半径は一八ミリメートル程度となる。ニコン・アクロマート一〇倍対物レンズの作動距離は五・六ミリメートル、同二〇倍のそれは二・二三ミリメートルである。これらのための回転子の製作は、実際的には不可能である。このため、長作動距離対物レンズ、ニコン・U一〇倍およびU二〇倍(作動距離はそれぞれ一六・四、一四・六ミリメートル)を採用、半径一二・五ミリメートルの回転子を試作したところ、可成り良い結果を得た。ただし、これらのレンズは通常のものと同くらべ開口数が小さく、したがって分解能も数十パーセント低

下している。また、対物レンズの倍率を上げるのに伴い、試料位置の調節が新たな問題となる。すなわち、試料の虚像が正確に回転軸上に結像するよう調節しなければ、試料の虚像は回転軸まわりを軸と平行に回転し、対物レンズの集点を外れる。(ちなみに、ブラウン型における対物レンズは固定焦点と考えてよい。)この解決には、回転子円板部と円錐部の距離を、直進ヘリコイド式の調節装置によって可変にしておけばよい。ただし、半径一二・五ミリメートル程度の回転子にこの装置を組み込むには、可成り高い工作技術を要する。一九六七年、比較的長い車軸藻類節間細胞を遠心検鏡するために、半径五〇・〇五ミリメートルの回転子を製作し、ニコン双眼実体顕微鏡(総合倍率八〇倍、作動距離一〇〇ミリメートル)と組み合わせ、約四年間使用した。この回転子には、直進ヘリコイド式調節装置を組み込んでおいた。しかし、遠心管の内径を小さくすること(試料が正しい位置にくる)、および集光器の絞りこみにより、事実上大多数の試料が対物レンズ焦点深度内におさまったため、装置はほとんど使用されなかった。『教訓』その一、凝り過ぎハ凝ラヌニ等シ、その二、凝ル者ハ日ニ淋シ。なお、直進ヘリコイドの着想は、ごく最近、Stearnscope(高倍率検鏡下に細胞にすり応力を加え、その変形・回復過程を観察する装置)となって結実した(上坪・未発表)。

ハーヴェイ型遠心顕微鏡(24)

回転子内に対物レンズおよびプリズム系を組み込んである

図2 ハーヴェイ型遠心顕微鏡



\* 光源, c 集光器, s 遠心容器内の試料, ob 対物レンズ, oc 接眼レンズ, p 直角プリズム, p' 低倍率の対物レンズ (ob') を用いる場合 回転軸上のプリズムの向きを 180° 切り替える, mo 回転子駆動用モーター, 鎖線 回転子回転軸, 説明は本文。

(図2)。回転子の回転に伴い、試料が集光器直下を通過するたびに、その対物レンズ一次像がプリズム系によって回転子回転軸上に導かれ、同軸延長上の静止接眼レンズによって拡大され

る。対物レンズ一次像は、回転軸を軸として回転する。しかし、それ故に、また、試料の照明時間が短いため（遠心半径一二〇ミリメートル、毎分六〇〇回転のとき一ミリ秒以下）、一種のストロボスコープ的静止像として観察される。この型の特色は、比較的高倍率対物レンズが使えることである。

神谷と黒田(25)は、Sturges (コペンハーゲン) 製のハーヴェイ型遠心顕微鏡を用い、ヒメフラズモ節間細胞の原形質流動原動力の測定をおこなった。彼らは、細胞内を求心端に向かう原形質流動を停めるに要する遠心加速度と、流動が停まった時点での細胞質の厚さを求め、さらに、他の手段で別個に求めた細胞質・細胞液の各比重から、単位面積当りの流動原動力の絶対値を得た。すなわち、

$$F = Aa(D_p - D_c)\alpha$$

ただし、 $F$ ・流動原動力、 $A$ ・原動力発生座の面積、 $d$ ・細胞質の厚さ、 $D_p$ ・細胞質の比重、 $D_c$ ・細胞液の比重、 $\alpha$ ・流動を停止させるための平衡加速度。得られた値は、一平方センチメートル当り約一ダインであった。

ハーヴェイ型の欠点は、回転子の質量が大きいため、遠心加速度の急激な増減がほとんど不能であり、この型による実験・観察の種類に制限を受けることである。試料に対する光学系の照準は回転子静止時におこなうが、回転開始後、遠心加速度のため試料の位置が変化して焦点が外れることがある。回転子の回転中に焦点調節を行うには、回転子内にサーボモーターを組み込み、対物レンズ（もしくは試料）の微動を遠隔操作すれば

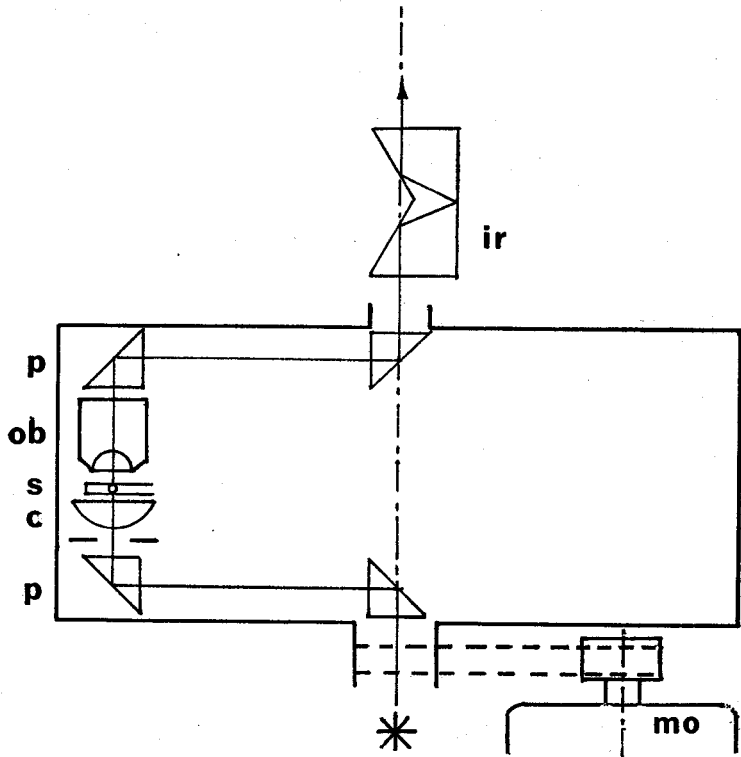
よい。ただし、機構的には可成り複雑なものとなり、製作費もいちじるしく高くなる（現在市販品はない）。試料の走査のための送り機構についても事情は同様である。

#### ハーヴェイ改変型遠心顕微鏡

ブラウン型・ハーヴェイ型ともに、回転子の低速回転時に光学系の像が間歇的となる。特にハーヴェイ型は回転子半径が大きいためそれがいちじるしい。このため、低速回転時の試料の状態を連続観察することはできない。ハーヴェイ改変型(図3)は、試料を連続照明し、像回転プリズムを用いて低速回転時における、試料の像を連続的に観察しようというものである。神谷によって考案・試作された。

回転子回転軸上におかれた光源から、プリズム系によって光を集光器に導けば、試料は回転子回転中も連続照明される。試料を透過した光は対物レンズに入り、プリズム系によって回転軸上に導かれる。試料の対物レンズ一次像は、回転子の回転に伴い回転軸を軸として軸に垂直に回転する。像を観察するには、この回転を止めなければならない。このため、像回転プリズム(アミチ、アップまたはベチヤンなどの正立プリズム)を回転子回転軸延長上に同軸となるように置き、適当な連動機構によって回転子の回転速度に対し常に二分の一の速度で追隨させれば、像の回転は完全に停止する。図3ではアップのプリズムを示した。プリズムの代りにアップと同様の光路をもつ表面鏡系(26)を用いてもよい。回転子および像回転プリズムの各回転

図3 ハーヴェイ改変型遠心顕微鏡



\* 光源, p 直角プリズム, c 集光器, s 遠心容器内の試料, ob 対物レンズ, ir 像回転プリズム (プリズム駆動装置は省略), mo 回転子駆動用モーター, 鎖線 回転子の回転軸, 接眼レンズは省略。説明は本文。

軸は完全に同軸としなければなら  
ないが、この軸合わせ（芯出し）  
は機構的・技術的に至難である。  
また、この軸合わせなしには高倍  
率検鏡は不能である。現在、この  
型の実用機は存在しない。

テレビジョン遠心顕微鏡

神谷は像回転プリズム方式を放  
棄し、テレビカメラを回転子回転  
軸上に共軸となるよう固定した。  
したがって、集光器・対物レン  
ズ・接眼レンズ・テレビカメラは、  
回転子内で静止系をつくり、回転  
子の回転と無関係に試料の遠心像  
を撮影する。撮影された試料の像  
は集電環機構によって回転子外に  
とり出され、モニターテレビ上に  
写し出される。また随時ビデオテ  
ープ記録される。黒田と神谷〔勿〕  
はこの型の試作機を用いて、サイ  
トカラシンBによるフラズモ節間  
細胞の流動停止が流動原動力の消  
失に起因し、細胞質の粘性上昇や

ゲル化によるものではないこと、低速遠心時の流速—遠心力の関係が直線的でないこと、などを観測した。一〇倍対物レンズが使用された。

テレビジョン遠心顕微鏡における問題は、テレビカメラ撮像管の遠心力に対する耐久性である。神谷のデザインでは、撮像管は管の中心から遠心方向に均等に遠心加速度を受ける。撮像管の遠心加速度に対する耐久性が十分であるか、もしくは、回転子の回転を低速に限る場合、テレビカメラを回転軸上に同軸に置く必要はなく、たとえば図3の対物レンズ後方のプリズムの後に固定し、対物レンズ一次像を直接撮像すればよい。ただし、この対物レンズは収差補正不要のもの(CFレンズ)を用いなければならない。カラーテレビカメラを搭載する場合は、RGB三管式カメラは構造上使用困難であるから、単管式を採用せざるを得ない(感度・色再現性など三管式のものより劣る)。テレビカメラを用いる最大の利点は、ビデオテープレコーダーによって随時、かつ容易に、試料の遠心像を録画できることである。この型の欠点はハウエイ型のそれと同様である。なお、製作費はいちじるしく高く、同程度の光学性能をもつ顕微鏡の価格を二桁上まわる。

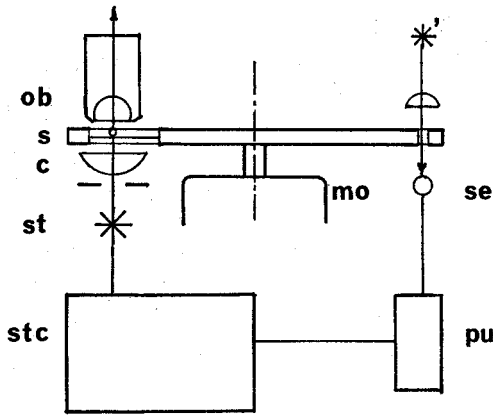
ストロボスコープ型遠心顕微鏡

ストロボスコープを用いれば、回転体や振動体を静止像として観察することができる。しかし、遠心顕微鏡へのその適用は、種々の技術的困難のために行われなかった。今回、筆者らによ

ってはじめて適用・試作される。

ストロボスコープ型遠心顕微鏡は、回転子、光学系、パルス発生回路およびストロボ装置より成る(図4)。回転子は、プラン型回転子の円板部と基本的に同形である。回転子の回転に伴い、回転子に装着した遠心容器の試料が対物レンズの直下に来た瞬間、同期信号用光源の光が回転子の小孔を通過してセンサーに入る。センサー電流はパルス発生回路に入り、パルス信

図4 ストロボスコープ型遠心顕微鏡



\* 同期信号用光源, se センサー (フォトトランジスター), pu パルス発生回路, stc ストロボ制御装置, st 放電管, c 集光器, s 遠心容器内の試料 その下側は組隙, ob 対物レンズ, 接眼レンズは省略, mo 回転子駆動用モーター, 鎖線 回転子回転軸, 回転子回転数計測装置は省略。説明は本文。

号となつてストロボ制御装置に送られ最終的にストロボ放電管を放電させる。すなわち、試料が一回転するたびに、これと同期してストロボが発光する。回転子回転速度(光学系によって拡大される)に対し、ストロボ発光時間が十分みじかければ、試料の顕微鏡像は静止して観察される。菅原研究所製HS・二五〇型ストロボ装置および菊山によるパルス発生回路を用いた予備試験結果から、この型の遠心顕微鏡が実用に耐えうるといふ見通しを得たので、試作機の製作に着手した。

試作機の主な仕様は、回転子半径四〇ミリメートル、回転数毎分一五〇〇と六〇〇〇回、得られる遠心加速度は重力加速度の一〇〇〜一五〇〇倍、光源―菅原研究所製ストロボ装置「ナノバルサ」(アルゴン・水素放電管使用、発光時間七五ナノ秒)、光学系▽対物レンズ、ニコンCFプラン一〇・二〇・四〇倍、明視野・位相差・微分干涉照明可能、試料の走査―遠心方向は光学系の移動、接線方向はセンサーの微動によっておこなう。ストロボスコープ型遠心顕微鏡の特色は、光学系が回転子から完全に分離されているため、光学系全体を通常の顕微鏡と全く同様に操作できること、あらゆる遠心顕微鏡の中でもっとも高い分解能をもつこと、位相差・微分干涉照明が可能のため、無染色透明試料の観察が容易であること、などである。また、回転子が極めて軽量であるため、回転速度の制御が自由自在であり、試料に加える遠心加速度を急速に増減でき、各種の生理学的研究に有利である。なお、回転子の回転速度は、回転子一回転ごとにパルス発生回路から出るパルス信号を電気的に毎秒

計測し、デジタルに表示する装置を製作した(菊山)。

ストロボスコープ型遠心顕微鏡の短所は、低速回転時の(へちらつき)および高倍率位相差または微分干涉観察のさいの光源輝度の不足であると思われる。(へちらつき)に対しては、回転子半径を二五ミリメートル程度まで小さくすることにより相応の改善が見込まれる。光源の輝度不足への対応策としては、対物レンズ一次像を高感度テレビカメラによって直接撮影し、モニターテレビ上で観測を行えばよいであろう。製作費は同程度の光学性能をもつ顕微鏡価格の三〜四倍程度と見積もられている。

#### 結びにかえて

遠心顕微鏡の製作・実際の使用については、様々な技術的問題点があるが、紙面の制約で割愛した。ブラウン、ハーヴェイともに、夫々の遠心顕微鏡を用いてさしたる業績を残さなかった。前車の轍を踏まぬよう心掛けたい。

- (1) 神谷宣郎(一九七二)当時大阪大学理学部教授。
- (2) ただし、戦車用ベリスコープなどの低倍率・低速回転の光学系には、この像回転プリズムが用いられている。
- (3) 小孔の位置は任意であるが、試料部細隙とオーバーラップしてはならない。センサーは反射方式で作動させてもよい。
- (4) 菊山宗弘・新潟薬科大学物理化学教室・講師・理博。
- (5) 一ナノ秒は一〇億分の一秒。



参考文献

- [1] Chen, J. C. W. and N. Kamiya: *Cell Struct. Funct.*, 1, 1 (1975)
- [2] Kamitsubo, E.: *Protoplasma* (田副中) (1981)
- [3] 上坪英治 植物生理学講座第八卷 朝倉書店 (田副中) (一九八一)
- [4] Williamson, R. E.: *J. Cell Sci.*, 17, 655 (1975)
- [5] Tazawa, M. et al: *Cell Struct. Funct.*, 1, 165 (1976)
- [6] Kuroda, K. and N. Kamiya: *Proc. Japan Acad.*, 51, 774 (1975)
- [7] Higashi-Fujime, S.: *J. Cell Biol.* 87, 569 (1980)
- [8] 三津家正之・清水博 生体と秩序' 三〇巻 三二六頁 (一九八〇)
- [9] Williamson, R. E. and C. C. Ashley: *XIII Internat. Bot. Congress (Sydney) Abstracts* p. 35 (1981)
- [10] 上坪英治 日本植物学会第四二回大会 (福岡) 講演要旨 二〇一頁 (一九七七)
- [11] Gelfan, S.: *Protoplasma*, 4, 192 (1928)
- [12] Tazawa, M. and U. Kishimoto: *Plant & Cell Physiol.*, 9, 361 (1968)
- [13] Kamitsubo, E.: *Can. J. Bot.*, 56, 760 (1979)
- [14] 上坪英治・菊山宗弘 昭和五十六年度科学研究費試験研究

究(2)申請書

- [15] Brown, R. H. J.: *J. Exp. Biol.*, 17, 317 (1940)
- [16] Hayashi, T.: *Scient. Papers Coll. Gen. Ed. Univ. Tokyo*, 10, 245 (1960)
- [17] Kamitsubo, E.: *Proc. Japan Acad.* 42, 507 (1966)
- [18] ———: *Protoplasma*, 74, 53 (1972)
- [19] ———: *Exp. Cell Res.*, 74, 613 (1972)
- [20] Tazawa, M.: *Protoplasma*, 65, 207 (1968)
- [21] 東京シネマ新社「生体と動き」第二部 原形質流動 (一九八一)
- [22] 上坪英治 トランシエント顕微鏡による細胞遠心像のVTR (未発表)
- [23] Kamitsubo, E.: In: *Cell Motility: Molecules and Organization*, 241, Eds. S. Hatano et al, Univ. Tokyo Press, Tokyo (1979)
- [24] Harvey, E. B.: *J. Appl. Phys.*, 9, 68 (1938)
- [25] Kamiya, N. and K. Kuroda: *Protoplasma*, 50, 144 (1958)
- [26] 上坪英治 日本災害医誌二一巻一一九頁 (一九七三)
- [27] Kuroda, K. and N. Kamiya: *Biorheology* 18, 633 (1981)

(一橋大学教授)