

光学顕微鏡による軸索輸送の測定法

堀 英 明・川 上 倫*・竹 中 敏 文
(横浜市立大学医学部生理学第一・*北里大学医学部生理学)

I. は じ め に

軸索輸送の研究は Waller が神経軸索を切断すると遠位側が死滅することを見出したことが始まりと言われている[1]。その後、放射性同位元素の生物領域への応用が進むとともに軸索輸送研究にもこの手法が取り入れられ、現在も使われている。この RI を用いた間接的手法は、RI でマークしたアミノ酸などを細胞内に注入し、細胞内で生合成された RI を含む物質の輸送を経時的に軸索で観察する手法である。この研究方法は主として、細胞骨格系の蛋白を輸送する遅い軸索輸送の解析を行うために必要不可欠な手法である。

一方、光学顕微鏡を用いた軸索輸送の研究が直接的観察法である。すなわち軸索内を移動するオルガネラやそれより小さな物を直接目視しながら研究する手法である。これが可能になったのは1980年代に入ってからのものである。これは無染色の標本に明暗のコントラスト差をつけ、標本を生かしたままで観察することのできる微分干渉顕微鏡の実用化と、急速に発展を遂げたエレクトロニクスによって、ビデオカメラを介した顕微鏡の観察像を「画像処理」できるようになったためである。この Allen のビデオ増感顕微鏡法により軸索輸送の研究は飛躍的に進歩した[2-7]。標本を生かしたままの状態では、微小管のレール上をオルガネラが移動する様子をディスプレイに映し出すことが出来るようになり、軸索輸送のメカニズムの発見へと繋がった。生理学的にも培養細胞系を用い神経伝達物質による軸索輸送の制御機構の解明などに用いられている[8-13]。現在軸索輸送の研究を推進する上でビデオ増感顕微鏡法は、微細な物質の

動的变化を連続的に観察しうる点から必要かつ最も適した手法の一つであると考えられる。

ここではビデオ増感顕微鏡法に用いる装置の解説と、使用上の注意点、それに若干の応用例について述べる。

また軸索輸送の観察系に用いる装置は、使用する顕微鏡やビデオカメラの違いにより2種に分けることが出来る。すなわち通常の明視野系の観察に用いるビデオ増感コントラスト顕微鏡(VECM, Video-intensified contrast microscopy)と蛍光像を得るビデオ増感蛍光顕微鏡(VIFM, Video-intensified fluorescence microscopy)である。軸索輸送の研究に基本的な手法は VECM であり、VECM を習熟すればその延長として VIFM も扱えるから、ここでは VECM を中心に解説する。

II. VECM の 装 置

VECM は光学顕微鏡により得られる分解能 250 nm をはるかに越える細胞内の微小構造を生きたまま動的状態で観察することを目的としている。例えば、軸索輸送で輸送される粒子のレールとなる直径 25 nm の微小管の観察をはじめ、細胞内小器官等の動きを連続的に観察することが出来る。この装置は他のビデオ顕微鏡法と同様に、光学顕微鏡・ビデオカメラ・イメージプロセッサ・ディスプレイ・記録装置より構成されている(図1)。

図2は、平均直径 5 nm の金コロイド粒子を VECM により観察したものであり、超微細粒子の観察が可能であることを示す。

A. 光学顕微鏡

Allen が VECM に最適な顕微鏡システムと

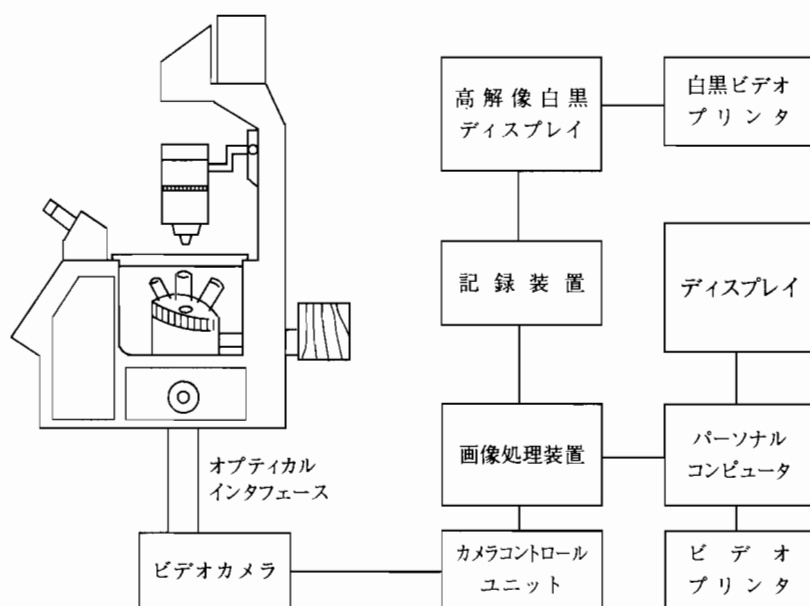


図1. ビデオ増感顕微鏡法のシステム構成

して見出したのが、ノマルスキー微分干渉顕微鏡である。この顕微鏡の特徴は、2枚の偏光フィルタ（ポラライザとアナライザ）とコンデンサレンズの光源側と対物レンズの後方に置かれたノマルスキープリズムを用いていることである。すなわち焦点面の標本に対し分解能以下のShear量でかつ互いに直交する振動面の2本の光線を当てることにより、標本の持つ屈折率の違いを2本の光線の位相変化量の差として表し、アナライザ通過後に明暗の差として描出する[14]。光学顕微鏡としては最高の解像度を持ち、コントラスト・明度とも低い欠点はビデオ増感で補うことが出来たのである。原理の詳細については他の項目に譲り、ここでは軸索輸送の観察で必要な高倍観察に適する倒立型ノマルスキー微分干渉顕微鏡の部品設定を中心に記す。

顕微鏡本体は以下の項目を満たすものが望ましい。①レンズ系での光の吸収が少なく、歪みが少ないこと。すなわち光路をミラー等によりあまり曲げず、対物レンズの直下にオプティカルインタフェースを設置できるタイプで、無限

遠設計のものが良い。②出来る限りポラライザ・アナライザ・ノマルスキープリズムを含む光学系の精度が高いこと。③後述するが、分解能は対物レンズの開口数により決定される。ゆえになるべく大きな開口数のレンズが使用可能な顕微鏡本体であること。④高倍率で観察を行うときには、わずかな振動も大きい影響を及ぼすので、振動に対し強いことが必要となる。

以上4点を満たす顕微鏡本体であるなら、どの製品でも問題はないが、購入時から比較的手を入れずに済む製品として、カールツァイス社製のアキシオパート135が薦められる（著者らは同社の旧型アキシオマート、並びにビデオポートが横側にあるアキシオパート35を使用している）。

また超高倍率（12インチディスプレイ上10,000～20,000倍）で観察を行うためには、対物レンズの最大倍率は60～100倍のものが必要で、さらに顕微鏡の対物レンズとオプティカルインタフェース間に、1～2.5倍程度の可変式の変倍装置が付いているものが良い。

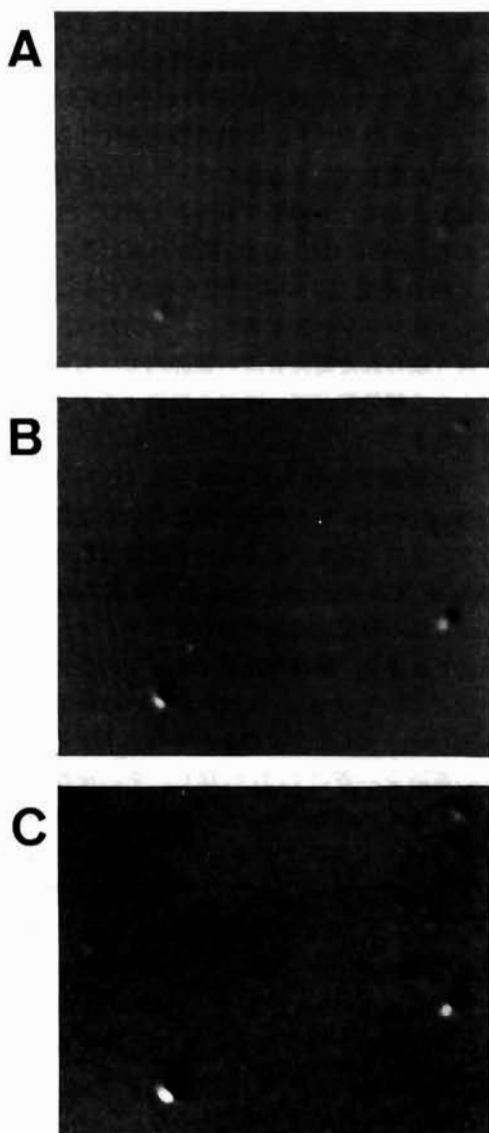


図2. VECMによる金コロイド粒子の観察例

- A: アナログ増感のみの画像.
 B: 積算と背景減算処理を行ったもの.
 C: デジタルコントラスト増強後.

B. 光源と電源装置

多くの光学系部品を用い、高倍率で観察する微分干渉顕微鏡は、光量が不足勝ちになる欠点を持っている。その欠点をカバーするために光源には 100 W 石英ヨードランプをフィラメント形状を選択して使用する。更に明るい光源が必要な場合には、50 W または 100 W の直流水

銀ランプ、あるいは 75 W キセノンランプを用いる。このとき、光源の熱エネルギーによる試料の熱害対策を配慮しなければならない。また、ビデオカメラの種類によって感度が異なるから、使用目的に応じてカメラと光源の組み合わせを選択する。使用するカメラの分光感度曲線を考慮しながら、光源側に適切な光学フィルタを挿入し、標本に有害な波長をカットすることが必要になる。しかし実際に長時間観察を行うためには、なるべく弱い光で観察することが秘訣である。

ちなみに著者のモットーは「明るく安定した細胞に優しい光を如何に作るか」である。安定した光を必要とする理由は、顕微鏡より得られた微小な輝度差の光をイメージプロセッサにより増幅するため、わずかな電源変動に伴う光源の輝度変化が大きな影響を及ぼすからである。そのため電源の安定化装置(NIF 回路設計社など)を光源トランスの前段に入れて使用している。

C. 対物レンズとコンデンサレンズ

対物レンズは顕微鏡の分解能を決定する重要な要素となる。分解能は $\lambda / (2 \cdot NA)$ で表される。ここで λ は入射する光の波長、NA は対物レンズの開口数である。すなわち開口数のなるべく大きなレンズを使用する。さらに収差補正が適切になされていることである。この2点を満足するのは、プランアポクロマト系のレンズである。筆者らはツァイス社の顕微鏡を主に用いているため、同社の63倍開口数1.4もしくは100倍1.3を使用している[12]。このときコンデンサレンズの開口数も対物レンズに合った大きなものを使用しなければ、対物レンズの性能を引き出しきれない。ただし以上の条件を満たす対物レンズの作動距離は 0.1 mm 程度しかなく、観察用チャンバを含めた工夫が必要である。

D. オプティカルインタフェース

VECM を始めるとき、顕微鏡とイメージプ

ロセッサは最高レベルの機器を用意する場合は多いと思われるが、カメラヘッドと顕微鏡を結ぶ、このパーツにまで気配りをしている場合は少ないのではないだろうか。しかし顕微鏡で得られた像をカメラヘッドに導く役割をはたすオプティカルインタフェース(TV チューブとも言う)は、顕微鏡並みの明るさや、収差の抑制など精度にこだわる必要がある部分である。これを自ら設計・製作することも可能であるが、光工学の知識を必要とし、あまり一般的ではない。顕微鏡本体を購入するときに、その本体専用に設計されたCマウント式(テレビカメラマウント)のオプティカルインタフェースが存在するものを選ぶことで解決できる。このとき同じ会社のどの顕微鏡にも接続できるタイプのものもあるが、このような汎用型 TV チューブは、使用する顕微鏡の分解能の100%全てがテレビカメラに正確に伝わるか疑問がある製品もあるので、顕微鏡会社に相談することが望ましい。またインタフェースは複数の倍率のものが用意されているものが良い。なおインタフェースによっては、チューブ内の壁に光が反射し、ディスプレイ画面上に光むらやリング状の模様を生じることがある。そのときにはビデオカメラの前に絞りを入れるか、チューブ内をつや消しの黒に塗ることにより解決できる。

E. ビデオカメラ—撮像管と CCD カメラ—
顕微鏡で得られた画像(二次元データ)を電気信号(一次元データ)に変換し、画像処理装置へ情報を入力する重要な装置である。

軸索輸送観察に用いるビデオカメラの規格は、日常生活で馴染み深い TV 放送の規格と同じ NTSC (national television system committee)方式の撮像管をよく用いる。撮像管は真空管の一種で、受光面(光電面)の光陰極に生じる光電子を陽極に捕獲して電流に変換する。撮像管の画像情報を電気信号に変換する過程では、カメラの受光面を水平方向の走査線で区分けし、1本づつを走査していくことにより二次元情報の一次元化が行われる。NTSC 方式で

は走査線は525本あり、1つおきの走査線を走査し、2回の走査で1枚の画像を形成する。言い換えると1/60秒の最初の走査で荒い画像(フィールド)を作り、2回目の走査で1回目の隙間を走査してもう1枚のフィールドを得る。両者を合わせたものをフレームと呼び、1秒間に30枚(正確には29.97枚)描かれる。このように2回の走査で1つの画像を構成することを2:1インタレースと言う。この方法は、放送と言う限られた電波資源の範囲内で、ちらつきが少なく解像度が高い映像を提供するためのものである。

一方撮像管とは方式の異なる CCD (Charge coupled device) カメラは、受光面に光電変換を行うシリコンフォトダイオードと電荷結合素子である CCD の組合わせにより構成されている。これの分光感度特性はフォトダイオードの感度で決まり、解像度はダイオードの受光面での数によって決まる。CCD 素子での画像の読み出しは、タイミングを合わせフォトダイオードの電荷を一斉に CCD へ移し、その後順次送り出す方式である。すなわち画像データは全画素同一のタイミングで得られる。通常の CCD カメラは撮像管と同様に1フレームの時間(フレームレート)は1/30秒であるので、この間の時間(蓄積時間)での光の変化は平均化され、時間分解能も1/30秒である。ただし CCD カメラのフレームレートは TV 規格と異なるものや、可変のものがあり、蓄積時間を長くしたものは高感度・低時間分解能となる。

軸索輸送の研究に用いるビデオカメラは、以上2つのどちらの原理でも、以下に記す解像度・感度・時間分解能・ノイズ特性、その他をクリアできれば問題はない。

1. 解像度

システムの絶対的な解像度(空間的分解能)は、使用する光学系に左右されるが、ビデオカメラ以降の電気系での解像度も重要なファクターとなる。

ビデオカメラそのものは、撮像管も CCD も空間分解能の高いものが製作されているが、

ディスプレイと記録装置に市販のものをを用いることがコスト的に有利なため、商用 TV 放送の規格(国内では NTSC)に合わせて出力するものが一般的である。NTSC では走査線数が525本であるため、垂直解像度はこれを越えることが不可能である。水平解像度は、商用放送の場合、輝度信号の周波数帯域幅は 4.2 MHz であるので、これを水平同期周波数 15.73 kHz で割り、2 (白黒2値)を掛けて得られる、約530本が限界値である。実際には走査線の帰線時間や走査線位置の再現性、にじみなどが総合されて、水平・垂直とも300本程度が商用放送で得られる分解能の限界ということになる。

これに対し、実験室のシステムでは放送電波のような制約がないから、輝度信号の周波数帯域幅を広げることが可能で、モノクロ映像を扱

う場合には 10 MHz 程度まで取ることによって水平解像度が800本のカメラも市販されている(浜松 C 2400-16 など)。この場合、ネックになるのはビデオ記録装置の帯域幅で、民生用のビデオレコーダなどは商用放送の帯域幅を前提にしているため、再生した画像の解像度が記録前よりも明らかに低下する。ディスプレイは水平解像度900本以上という高解像度のものがある(浜松 C 1846-04)。

垂直解像度は走査線という上限があるが、全体の解像度は水平解像度を高くすることで向上するから、より小さな粒子を描出するためには使用するビデオカメラの水平解像度の高いものが良い。多くの場合カメラの解像度は画像周辺部より中心部分で高いので、中心付近での解像度を中心解像度として表示している。

表1. ビデオカメラの諸元：浜松ホトニクス社による。

型 名	使用撮像素子	特長・用途	性 能						
			観察波長域 Typ. (nm)	水平中心 解 像 度 Typ. (TV本)	図形歪 Max. (内接円内%)	シェーディング Max. (内接円内%)	残 像 Typ. (%)	ガンマ Typ.	S/N Min. (dBp-p/r.m.s.)

【撮像管タイプ(1インチ)】

C2741-01	カルニコン	可視域用	400~750	①	750	±1.0	10 (20)	10	0.95	50
-02	シリコンビジコン	高感度 可視~近赤外域用	400~1050	②	600	±1.0	10 (20)	12	1.0	50
-03	赤外ビジコン	赤外域用	400~1800	③	600	±2.0	20 (40)	60	0.6	46
-05	紫外ビジコン	紫外域用	200~750	④	700	±1.0	10 (20)	20	0.95	50
-06	サチコン	低残像、可視域用	400~700	⑤	750	±1.0	10 (20)	3	0.95	50
-07	ニュービコン	可視域用	400~800	⑥	700	±1.0	10 (20)	20	1.0	50
-07ER	ニュービコン	可視~近赤外域用	400~950	⑦	700	±1.0	10 (20)	20	1.0	50
-08	SIT	高感度、可視域用	400~850	⑧	500	±3.0	20 (40)	7	1.0	48
-16	スーパーハービコン	高感度、可視域用	400~700	⑨	800	±1.0	10 (20)	3	1.0~0.5	50

【撮像管タイプ(2/3インチ)】

C2741-51	カルニコン	可視域用	400~750	⑩	600	±2.0	20	5	0.95	40
-53	赤外ビジコン	赤外域用	400~1800	⑪	550	±2.0	20	40	0.6	40
-55	紫外ビジコン	紫外域用	200~750	⑫	700	±2.0	20	10	0.95	40

【CCDタイプ】

C2741-73	1/3インチCCD	小型、低残像、可視域用	400~920	⑬	570	±0	—	—	0.45~1.0 (3段階)	56
-75	1/2インチCCD	小型、低残像、可視域用	400~920	⑭	570	±0	—	—	0.45~1.0 (3段階)	56
-77	2/3インチCCD	小型、低残像、可視域用	400~920	⑮	570	±0	—	—	0.45~1.0 (3段階)	52

① 画面高を直径とする内接円内の値。

② 画面高を直径とする内接円内にて、シェーディングコレクタを用いた補正後の値。()内は補正前の値。

③ 入射光停止 3 フィールド(50 ms)後の値。

④ 光強度に対する信号電流のリアリティ。

近年、分解能を高めたハイビジョン方式のテレビカメラが商用 TV 放送局で使われだしているが、限られた需要であるため非常に高価で実験室向きではない。

2. 感度と時間分解能

ビデオカメラの感度は、紫外から赤外の全波長と特定波長に対する感度(分光感度)の2種類がある。前者は撮像できる最少光量(I_x)で、後者は単一波長の入射光量に対する出力電流で表される。参考に浜松ホトニクス社製撮像管のデータを示す(表1)。

この表に示すように、撮像管の種類により肉眼とは異なった分光特性を持っていることが分かる。

軸索輸送を観察する際、12インチディスプレイ上10,000倍前後の倍率を必要とする。倍率の上昇に反比例して、顕微鏡より得られる光量は減少する。またノマルスキー顕微鏡では、コントラストを強めようとすると画像は暗くなってしまう。生物材料をより生理的条件下で観察するには、種々の細胞に対する熱を含む“光”による障害が大きな問題となる。そこでビデオカメラの感度が重要なファクターとなる。ビデオカメラの分光感度は使用している顕微鏡から得られる波長領域に合って感度の高いものを選択し、カメラ直前でのフィルタ処理など光量のロスに繋がることは避けなければならない。さらに倍率を上げるほど、軸索輸送される移動粒子を的確に捉えるために時間分解能が問題になる。NTSC方式撮像管の場合、時間分解能は1/30秒であるのでほぼ問題はないが、CCDカメラでは感度を上げるために蓄積時間を長くする必要があり、蓄積時間の延長は速い粒子を検出できなくするばかりでなく、後の画像改善のための処理にも困難を生じる。

3. ノイズ特性

軸索輸送観察用の顕微鏡画像はかなり暗いことは前項に記した。ビデオカメラで問題となるノイズは、まず光の揺らぎに伴うショットノイズがあるが、このノイズは光量の平方根に比例して増加するので、感度が比較的高いビデオカ

メラを使用すれば減らすことが出来る。一方、光量に依存しないノイズとして、ビデオカメラ本体の光電面や電子回路から発生するものがある。電子回路が発生するノイズは、市販されているものでは無視することが出来る。撮像管が発生するノイズを暗電流と呼び、直流的なものと交流的なものがある。直流的なものは固定パターンノイズとして出現するので、後述の画像処理により取り除くことが出来るが、交流的暗電流は処理画像の画質の低下に結び付く。

これらビデオカメラから発生するノイズの“少なさ”を表すのが、S/N比である。これは通常デシベル単位、 $20 \log(S/N_{rms})$ で表す。Sは信号の電圧、 N_{rms} はノイズの実効電圧である。ビデオカメラで得た画像を画像処理しフレーム加算やコントラスト強調を行うには、なるべくS/N比の良いビデオカメラを選択する必要がある。

4. その他の特性

ガンマ(γ)特性はビデオカメラの入射光量に対する出力電圧の関係を示し、 $\gamma=1$ を標準に1未満では明るい部分、1より大きいと暗い部分のコントラストが強くなるが、画像処理によって γ 特性は必要に応じて補正できるので、特に注意を払わなくて良い。

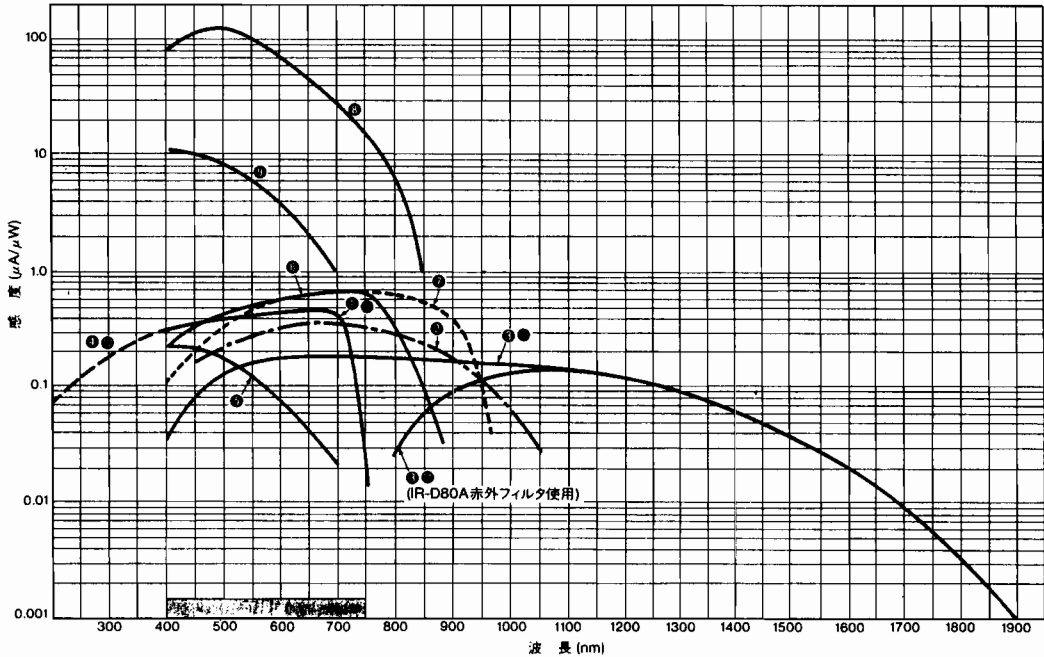
ビデオカメラの残像は、入射光が途切れた後も出力信号が残る現象である。残像は速い速度で移動している粒子の速度計測に誤差を生じる原因となることがある。性能上の数値は、入射光を切って50ms後の出力信号が、入射光があるときの出力信号の何%であるかを示している。CCDカメラの場合この現象は問題にならないが、撮像管を使用する際にはこの値のなるべく小さなものを選ぶべきである。

5. 軸索輸送の研究に用いるビデオカメラの実際

上記したように選択すべきビデオカメラは高感度で、S/N比が高く、残像が少なく、比較的高解像度なものとなる。筆者らは10数年来撮像管式のビデオカメラを中心に使用してきた経験から、7,000倍前後の倍率で観察するには、

波長領域が 400~750 nm 前後と広く、分光感度特性が 550~650 nm の間で高く、S/N 特性他のファクタもほぼ満足できることから、カルニコンまたはニュービコンカメラを使用している。10,000~20,000倍の倍率で観察するときには、受光面の光量の低下が著しいことと、システムとしての分解能の向上のために、分光感度

撮像管分光感度特性



CCD分光感度特性

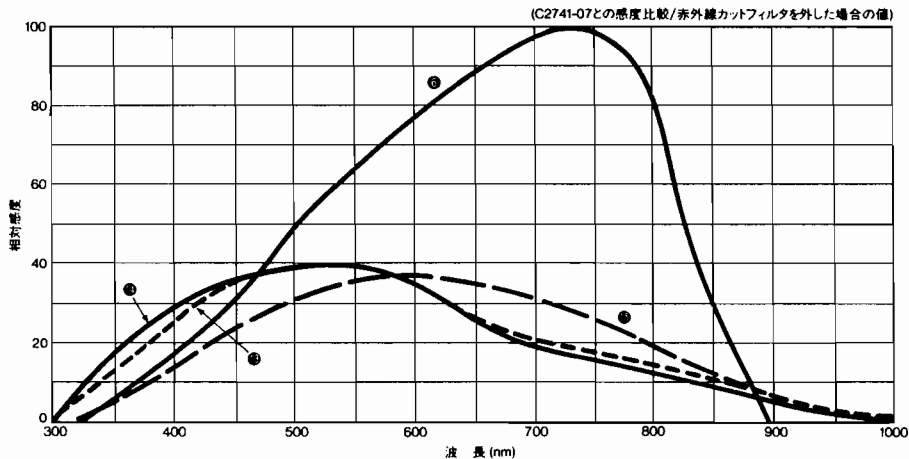


図3. ビデオカメラの分光感度特性
白抜き数字は、表1中のカメラ型番に対応している。
浜松ホトニクス社による。

FITC を蛍光染料に用いる一般の蛍光撮像にも、SIT (silicon intensified target) カメラほどの感度はないものの、感度を上げて使えば使用可能である。S/N 特性は少々低い、残像はカルニコンよりも少なく解像度は高いので、倍率を20,000倍近くに上げて軸索輸送される微小な速い粒子を捉えることが出来ている。SIT は解像度と S/N 特性が劣る(表1)が、感度が高い(図3)ので VIFM に向いている。

現状において CCD カメラは、小型・軽量で残像が無いのが利点であるが、水平解像度がカルニコンやニュービコンよりも劣り、感度は同等である。また ICCD (intensified ccd) カメラは一般的に画像の品位が低く、C-CCD (cooled ccd) カメラは光の蓄積時間が長いので時間分解能が不足する。今のところ CCD カメラは7,000倍ほどまでの倍率で軸索輸送を観察するなら使用可能であるが、更に高倍率(10,000倍以上)での観察にはより高感度・高分解能の CCD カメラが開発される必要がある。

その他ビデオカメラに関しては、画像処理装置とのマッチングの問題もあるので、同一会社の製品が良い。代表的メーカーとして、世界的に顕微鏡画像処理の草分けである浜松ホトニクス社がある。同社のビデオカメラには撮像管・CCD とともに生物材料を VECM で観察するのに適したカメラが多く見られる。中でも前述のハーピコンカメラや、高分解能 CCD であるデジタルカメラ等は、超高倍率で研究を進めるための必需品であると言える。

なお、撮像管領域ではハイビジョン化、CCD カメラの領域では高分解能・高解像度化が進んでいるが、近い将来にはビデオカメラから記録装置に至るまでフルデジタル化することが予想される。

F. イメージプロセッサ

ビデオカメラからの映像信号にデジタル的な様々の処理を行うのがイメージプロセッサで、ビデオコンピュータ・画像処理または解析装置とも呼ばれる。イメージプロセッサ内では、映

像は全てデジタル信号として扱われる。すなわち2次元の位置情報は画素として分割され、一つの画素の輝度情報は2進数のビットで表現される。デジタル化によって画像処理が容易となり、ノイズは減少し、再現性も高くなる。

ただし後述するように動画のデータ量は非常に大きいので、市販のイメージプロセッサでは、内部の演算はデジタルで行い、出力時にはアナログ信号である NTSC に再変換している。

ここでは筆者らが実際に使用している、浜松ホトニクス社製 C1966 または ARGUS-20 について使用法を説明する。コンピュータは日進月歩なので、画像処理コンピュータの代表的メーカーである浜松ホトニクス社でも常に新製品を発表しているから、最新の機種については同社システム第2営業部(工業計測)小楠俊彦氏または第1営業部(生物系)片岡卓治氏に問い合わせたい(電話053-452-2141)。

1. アナログ増強

デジタル的にコントラスト増強をする前に、最初にアナログのビデオ信号の状態でもコントラスト増強を行う。2段階に分けて行う理由は、市販のデジタル画像処理装置では AD 変換の分解能が8ビット(256階調)程度と小さいので、コントラスト増強をデジタルだけで行うには不足するためである。無理なデジタル増強を行うと、画面全体が最高階調の白になってしまう。もし14ビット(16,384階調)から16ビット(65,536階調)の AD 変換器を持つ画像処理装置を用いることが出来れば、すべてデジタルで処理することも可能であるが、非常に高価なシステムとなる。

アナログ増強回路は、普通カメラコントロールユニットの中に組み込まれている。

ゲイン(GAIN)調節はビデオ信号を電氣的に増幅し、その結果コントラスト「明暗差」と明度の両方が上昇する。オフセット(OFFSET)調節は、ビデオ信号から一定レベルの信号を差し引く処理をし、その結果バックグラウンドが引かれて全体の明度が減少し、コントラスト「明暗比」は増大する(図4)。この二つをうまく調

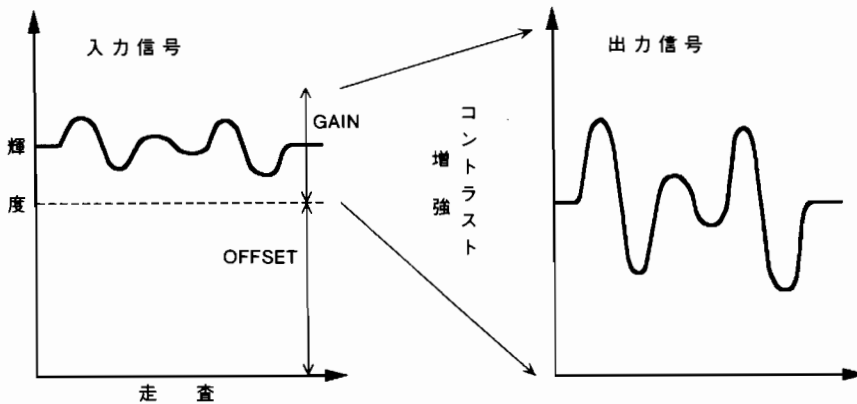


図4. コントラスト増強の原理

節することで、最良の画像を得ることが出来る。カメラコントロールユニットには感度 (SENSITIVITY) 調節がある場合があるが、これは撮像管の電極電圧を大きくすることによって感度を高めている。なるべく高く設定するのが画像の質を高める手段であるが、撮像管の寿命との兼ね合いになるから、メーカーと相談して設定を決めていただきたい。

実際に、顕微鏡からの画像をビデオ入力するところから、解説して行こう。

まず、デジタル的な処理はパスするよう設定しておく。具体的には画像処理装置の出力を「RAW」にすれば良い。顕微鏡像を接眼レンズにて肉眼で確認した後、一度照明を落としてから光路をビデオカメラ側に切り替える。それからゆっくりと照明を上げていく。ほとんどのカメラコントローラには、適正入力レベルを表示するインジケータがあり、これがしっかり点灯する光量でもっとも SN 比が高い映像が得られる。絶対に過大入力インジケータを点灯させてはならない。先に述べたように光には細胞毒性があるから、カメラの適正入力レベルの光では細胞が傷害されることがある。この場合は適切なフィルタを光学系に挿入するのが正しい解決法であるが、光量を若干減らして適正レベルインジケータが点灯しない状態でも、ディスプレイ上に判別可能な映像が得られていれば増強処理によって観察に耐える記録が行える場合が多

い。

ゲインとオフセットの調整は、原則的には、最初にオフセットをゼロ、ゲインを最少にしておき、適当な明るさが得られるまでゲインを上げ、その後オフセットで背景光を除去して、もっともコントラストが良い状態に設定する。オフセットを上げすぎると、全体が黒くなってしまう。それからゲインとオフセットを交互に調整して最良の画像が得られるようにする。

実際には、後でデジタル的コントラスト増強を行うから、この段階ではそれほど鮮明な画像を追求する必要はなく、むしろオフセットを上げすぎて細部の情報まで削ってしまわないように気をつける必要がある。またこのときに設定したゲインとオフセット値は次回以降の観察においてほとんど再調整の必要がない。逆に、これを変更するとデジタル的な処理に大きな影響を与え、面倒な再調整が必要になってしまうので、実験中は触らないように注意する。光路系を変更したときなどには、再調整する。

最近のカメラコントローラには、シェーディング補正回路が内蔵されるようになってきた。シェーディングとは、カメラに入光するレンズ系の特性のために、画像中心に比べて画面周辺の光量が低下する現象である。これは後で述べるバックグラウンド補正によってもある程度補正することが出来るが、バックグラウンド補正が減算処理であるのに対し、シェーディング補正は

除算処理なので理想的な補正方法である。シェーディングは低倍の画像を観察するとき顕著であり、超高倍システムでは無視できることが多いが、カメラ自体の持つ感度むらや、顕微鏡の照明むらを補正するためにもシェーディング補正は有効である。

2. デジタル増強と画質改善処理

a. 積算処理

1枚(フレーム)の画像は、多くのランダムノイズを含んでいる。そのため1フレームだけを観察すると(静止画)かなりざらついた画面となる。またノイズは以後の画像処理を行う上で障害ともなる。ランダムなノイズは平均化すれば $1/N$ に減少するから、積算処理は画像品位の向上にかなり有効な方法である。ただし積算するほど時間分解能は低下してしまう。

浜松ホトニクス社の画像処理装置では、静止画用に“ACCUMULATION (ARGUS-20)”または“INTEGRATION (C 1966)”，動画用として“ROLLING AVERAGE”と“JUMPING AVERAGE (C 1966のみ)”がサポートされている。ACCUMULATION または INTEGRATION では、単純なフレームの加算と平均化が行われる。ROLLING AVERAGE は軸索輸送測定に通常使用している処理で、リアルタイムに以下の演算を行う。

$$V_n = V_{n-1} + (V_{in} - V_{n-1})/P$$

V_n = 出力画像

V_{n-1} = 1 フレーム前の出力画像

V_{in} = 入力画像

P = アベレーシングのパラメータ

つまり積分回路と似た処理を行っているわけで、この方法ではノイズを減らすためにパラメータを大きくすると、残像が多くなって移動する物体の観察が困難になるので、観察する物体の速度に合わせて適切なパラメータを与えなければならない。軸索輸送の観察に適したパラメータは、2 または 4 である。

JUMPING AVERAGE は与えたパラメータだけフレームを蓄積して、最後のフレームの加算と平均化が終わったときのみに出力が行われ

る。例えばパラメータが4なら、1秒間に7.5コマしか出力されない。つまり、「コマ落ち」してしまうので、動きが滑らかではなくなる。しかしノイズ除去効果は ROLLING AVERAGE よりも強力である。

もしリアルタイムに平均化が出来れば、よりノイズが少なく残像が少ない画像が得られるわけだが、そのためにはフレームメモリが1つ余分に必要で演算も複雑になるため、サポートされていないのが残念である。

b. バックグラウンドサブトラクション

光陰極の蒸着むら・傷・ごみ・焼き付き・光電素子の暗電流といったものが原因となって、カメラの撮像面の決まった位置に決まった大きさのノイズが表れる。これを固定ノイズと言う。この固定ノイズのパターンを記録しておき、映像から差し引けばノイズはキャンセルされる。これが背景減算(background subtraction)である。この処理には、顕微鏡のごみや先に述べたカメラの感度むら・照明むらを軽減する効果もある。固定ノイズは意外に大きいものなので、デジタルコントラスト増強をする上で大きな障害となるから、背景減算は増強前の処理として必須である。

浜松ホトニクス社の製品では、積算処理と背景減算は連動して設定するようになっている。

(1) 積算方法を選択する。

JUMPING AVERAGE か ROLLING AVERAGE を選ぶ。機種によっては JUMPING AVERAGE はサポートされていないものもある。

(2) 積算パラメータを設定する。

できれば積算無し(パラメータ1)が望ましいが、ノイズがあつて観察が困難なときには、2や4もやむを得ない。逆に8以上を選択して移動する物体を消してしまうことも可能ではある。

(3) 背景減算のパラメータ設定。

「背景」として記憶する画面も1フレームではノイズを含むから、ある程度平均化が必要なので、何フレーム積算するかを設

定する。通常8フレーム程度で良い。

また入力画像から背景を減じると、減算した結果はゼロを中心として分布し、マイナスの数値はすべて真っ黒になってしまう(C1966のように符号を無視する演算を行う場合には白に近い灰色になる)から、ある任意の値(オフセット)を加えて正常な画像とする。これは127が8ビットの中間値であるが、後の増幅を考慮して、100程度の値を設定すると良い。

機種によっては、背景を記憶するメモリと、減算結果を表示するメモリを設定する必要があるものがある(C1966)。

(4) 減算処理の実行。

まずは背景画面を取得する。ほとんどの場合、単に顕微鏡の焦点をずらして、画面に光学系のむらとごみだけが映るようにすれば良いが、細胞体のような大きな屈折率を持つ物体が近傍にあるときには、視野を移動してから背景を取得する。その後画像処理装置の背景処理を「START」すると、背景画面が記憶される。同時に表示映像が減算処理後の画像である「PRO」に切り替わる。ここで顕微鏡の焦点を試料に合わせ直す。

c. コントラスト増強処理

デジタル的なコントラスト増強も原理的にはアナログ増強と変わらない。

ただし最新の ARGUS-20 の場合、OFFSET と GAIN で設定するのではなく、出力画像の黒レベルを「LOW」(OFFSET に相当する)、白レベルを「HIGH」(OFFSET+GAIN に相当)で設定するようになっている。

3. 種々の画像処理

イメージプロセッサを用いれば、画像の2値化・微分・白黒反転・擬似カラー化・長さや面積の測定といったことが容易に行える。これらについては軸索輸送の研究には関連が薄いので割愛する。ただし以上の処理は不可逆的なものが多く、一度失われた情報は取り戻せないもので、一次的に記録したものについて行うべきであ

る。またコントラスト増強と他の処理は共通の回路で行われるものが多く、その場合同時処理は出来ない。

G. 記録装置

軸索輸送の速度などの移動粒子の測定は、記録した画像データを用いて行う。また再画像処理にも用いられる。記録装置は単に忠実に記録再生できるだけでなく、測定が容易かつ正確に行えるものが望ましい。この点から記録装置に要求される性能と機能は以下の通りである。

① イメージプロセッサより得られる画像情報がいかに良くとも、記録装置の性能が劣るとデータとして生きてこなくなる。得られる画像情報の時間分解能・コントラスト・解像度並びに S/N 特性等、今まで述べてきた項目を満たすデータを出来る限り忠実に記録・再現できる装置が必要である。

② 培養神経細胞の神経線維を用いて軸索輸送の実験をする場合、ステージ上で観察と観察の間に薬物の投与等を行いながら30分から90分間の実験を行う。記録媒体を入れ換えずに全体を記録したいから、60分以上の録画が可能なのが見たい。

③ いかに忠実に記録できても、計測を実施するためには、画像の歪みを出さずにデータの変速再生(静止画像を含む)が出来る装置でなくてはならない。

現在以上の3点を満たす記録装置として一般的に用いられているのがビデオテープレコーダ(VTR)である。その他、光ディスクを用いた記録装置(SONY・CRV レコーダ等)は画質は素晴らしいが、記録時間の問題と時間当たりに掛かる経費が高いことが上げられ、日常の使用にはあまり適さない。またパソコンを用いた方法も記録時間やデータの保存法を考えれば、今後使用が可能となるのではないかと考えられるが現状では不向きである。ただし、浜松ホトニクス社などはデジタルカメラと称して、CCD カメラの出力を直接パソコンに出力するものを開発しており、パソコン側の画像記憶容量と書き

込み速度の問題が改善されれば普及すると思われる。

1. ビデオテープレコーダ

VTR は家庭用 (S-VHS や 8 mm ビデオ)、業務用 (S-VHS, U マチック, β -カム)、放送局用 (β カム, D-1・D-2・D-3 方式デジタルビデオ) の 3 種に分類され、記録方式の違いにより個々の名称が付けられている。

家庭用 VTR は信号帯域幅が狭く、出力信号も完全な NTSC 規格になっていないので、業務用または放送局用 VTR から記録再生装置を選択する。その際、輝度信号帯域が広く S/N 特性の良いものが良い。計測精度は記録された画質と再生時の機能により決定されるので、放送局用の VTR は高価ではあるが望ましい。筆者らは昨年まで市販されていた 3/4 インチカセットテープを用いた放送局用 U マチック SP・VTR を使用しているが、この後継機種は 1/2 インチテープを使用したベータカム SP・VTR である。この VTR は U マチックと異なり、輝度信号と色信号を分離して、それぞれ専用のヘッドで別々のテープトラックに記録するアナログコンポーネント記録方式を取り、メタルテープの使用による EM キャリア周波数の上昇など、U マチックよりも録画画質の向上が認められる。また放送局用としては最も廉価である点で薦められる。

また再生速度の再現性についても放送局用が理想的である。画像の再生は、データの観察・計測・再画像処理に利用されるが、その際再生装置に必要とされる機能に、デジタル式タイムベースコレクタ (TBC) による時間軸誤差 (ジッター) 補正機能と再生信号の標準 NTSC 信号化がある。VTR はモータを含むメカニカルな機構を用いているため、記録時と再生時の機械的誤差やテープの伸びによる誤差を生じる。TBC はこの誤差を補正し、揺らぎの無い映像信号を発生するので、計測および再処理に欠かせない。さらに TBC はビデオ信号の位相調整・レベル調整・ノイズリダクションなどの機能を持ち、有用である。業務用 VTR 以上の製品には内蔵

されているものが多い。

計測時に重要な機能としてノイズレス可変速再生がある。通常の VTR では可変速再生を行うと、録画時のヘッド軌跡と再生時の軌跡が一致しないために画面に特有のノイズと歪みを生じる。これは計測に重大な妨げとなる。歪みやノイズ無しに可変速再生をするには、SONY 社が放送局用 VTR で採用しているダイナミックトラッキング (CT) 機構が良い。この方法では再生速度に合わせてヘッドの角度が変わり、静止画像も含め $-1 \sim +3$ 倍速の間でノイズレスな可変速再生が行える。また松下電気産業の製品の中にも、再生ヘッドにピエゾ素子によるオートトラッキング機構を採用して、 $-1 \sim +3$ 倍速のノイズレス再生が行える機種がある。

軸索輸送の観察データでは、同時刻に、極微小なものから大きなものまで、輝度やコントラストを含め様々の形態の多数の粒子が、異なる速度と様々のパターンで移動している。現在、パーソナルコンピュータを用いる自動計測化へ向けて取り組みを進めているが、用手計測の域に達することは当分有り得ないと思われる。そのため計測精度の向上を図るには、より良い VTR を選ぶ必要性があるわけである。

2. 記録のデジタル化の展望

デジタル化の利点を先に挙げたが、問題点は映像が持つ情報量が極めて大きいことから、適切な記録媒体が見当たらないことである。

顕微鏡を用いて、デジタルな記録を行う装置としては、フォトダイオードを多数格子状に配置した“ダイオードアレイ”を用いてデジタル映像を描出する、カルシウム濃度測定や細胞電位測定装置が市販されている。この場合、ダイオードアレイは時間分解能が優れていることで用いられているのであって、空間的にはかなり低解像度 (16×16 画素程度) なので、細胞内の構造を観察するような実験には用いられない。逆に高分解能を求めると画素数は飛躍的に増大する。例えば垂直・水平の画素数が 512 であれば、全画素数は 26 万個に達し、輝度を 8 ビット (512

階調)で表現して、1秒間に30フレームの画像ならば、約8Mバイトの情報量になる。1時間の記録ならば、約30Gバイトになり、現在のパソコンレベルでは扱えないデータ量なのである。

現在の CCD カメラは解像度に問題があるが、製作コストが安価なので、次第に主流となっていくと考えられる。CCD カメラの持つ情報は本来デジタル的であり、NTSC を介せずに処理すれば非常に高品位の映像を得ることが出来る。映像情報に対応した大容量記録媒体の開発とデータ圧縮技術が急速に進んでいるので、高価な VTR に取って代わる記録装置が出現するのも遠くはないと思われる。

Ⅲ. 試料の調整

VECM は、微分干渉顕微鏡により得られる画像を処理する以上、観察材料は顕微鏡の光学特性を100%引き出しうるよう、なるべく光の透過性が高く、バックランドと顕鏡目的の微小管や粒子との屈折率に差がありコントラストが付きやすい材料が望ましい。

一つの系は、生化学的に抽出再構成した微小管やモータ蛋白をカバーガラス上に散布し、その上を移動する粒子を直接観察するという軸索輸送の再構成系である[15]。この方法は構成成分の抽出が簡単ではないが、非常に薄い検鏡標本を作れるから観察が容易である。より生理学的な研究方法としては、培養神経細胞を用い、神経線維の中の微小管の上を細胞体から神経線維末端へ向けミトコンドリアなどの細胞内小器官等が輸送されている順向性の軸索輸送と、逆方向、細胞体へ向けての輸送すなわち逆行性の軸索輸送を直接 VECM で観察しながら、薬物を投与し、軸索輸送の経時的变化を生理的に実験する手法がある。筆者らはマウスより摘出した、知覚を主体とした脊髄後根神経節(DRG, dorsal root ganglion)、交感神経である上頸神経節(SCG, superior cervical ganglion)並びに海馬を中心とした中枢神経等より摘出した組織からトリプシンやコラゲナーゼ等酵素を用い分離

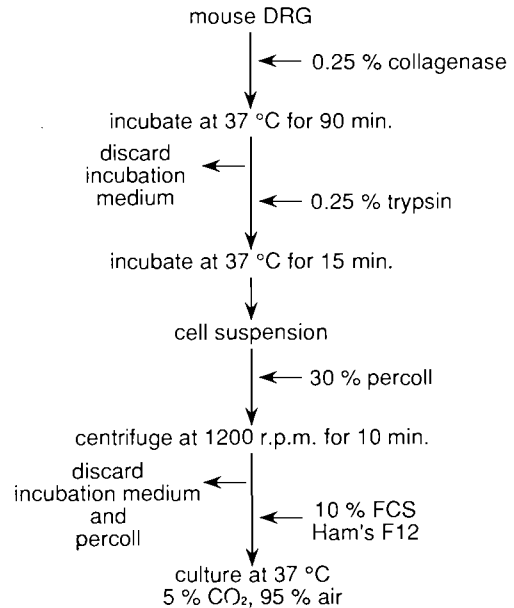


図5. 培養神経細胞の調製法

培養した神経細胞を用いて実験を行っている。培養の具体的流れを図5に示す。培養細胞はコーティングを施したカバーガラスの中心付近に散布する。ここで注意を要するのは2点ある。

① コーティング材料には、コラーゲン・ポリリジン等多種あるが、観察部位が光学系と直交する水平な面を形成しなくてはならず、薄く均一なコートが得やすい点からポリリジンコートをを用いる。

② カバーガラスの厚さは、使用する対物レンズの作動距離を考慮に入れ、顕微鏡の光学的

表2. カバーガラス規格表
松浪硝子、一般品標準規格表より。

規格	厚さ (mm)
No. 00	0.06 - 0.08
No. 0	0.08 - 0.12
No. 1	0.12 - 0.17
No. 1S	0.15 - 0.18
No. 2	0.17 - 0.25

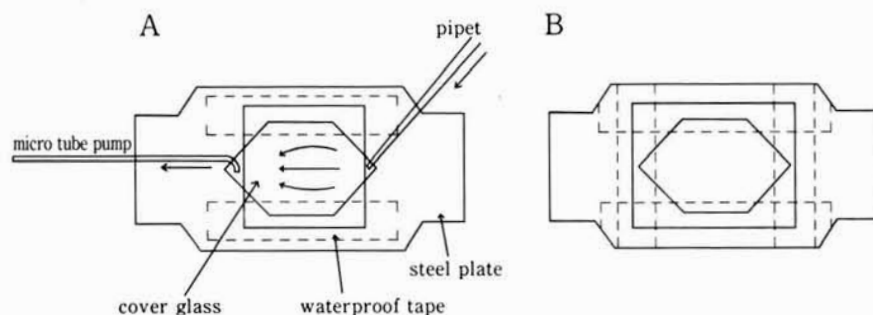


図6. 試料とチャンバの模式図

チャンバは、500 μm 厚の18-8ステンレスを図のように切断したもの。
A：上方より，B：下方より見た図。破線はカバーガラスをチャンバに固定するための防水性テープ。

設計値に合った状態で観察し顕微鏡より得られる画像の歪みをなるべく作らないようにする。筆者らは松浪硝子製 No. 1 のカバーガラスを中心に使用している。表2に同社のカバーガラスの一覧を示した。

カバーガラス上に撒いた細胞は、2～3日間 CO_2 インキュベータで培養して実験に用いる。

A. チャンバと保温装置

顕微鏡のステージ上に細胞をマウントし、10,000倍前後まで倍率を上げて観察する場合、対物レンズとコンデンサフロントレンズの作動距離は短く、かつ両者とも油浸で顕鏡することが多い。この限られた空間で実験操作をなるべく行い易いチャンバを用いる必要がある。図6は、筆者らが使用しているものである。Bはチャンバを下方から見た図で、細胞を培養したカバーガラスが張り付けられている。カバーガラスをチャンバに張り付けるには、防水性の比較的高いクリアテープを用いて行う。Aはチャンバを上方より見た図で、コンデンサレンズを油浸で使用するためのカバーガラスが貼ってあるが、図のように長軸方向に隙間を作る。隙間の片側から実験溶液を注入する。また逆側には吸引ポンプからのノズルを設置し、液交換に供する。チャンバの空間が亀甲型をしているのは、液交換時に渦流を生じにくく、交換効率が良いからである。チャンバの厚みは500 μm として

いる。なお液の交換は、液面の変動が画像に影響するので、記録中に行ってはならない。

チャンバを生理的温度に温めるため、ステージを保温する装置が種々市販されているが、構造的な障害や、ノイズの発生源になるなどの問題が付きまとう。図7に示したケージタイプの保温装置は、温度変化が少なく、また湿度も保ち易い。

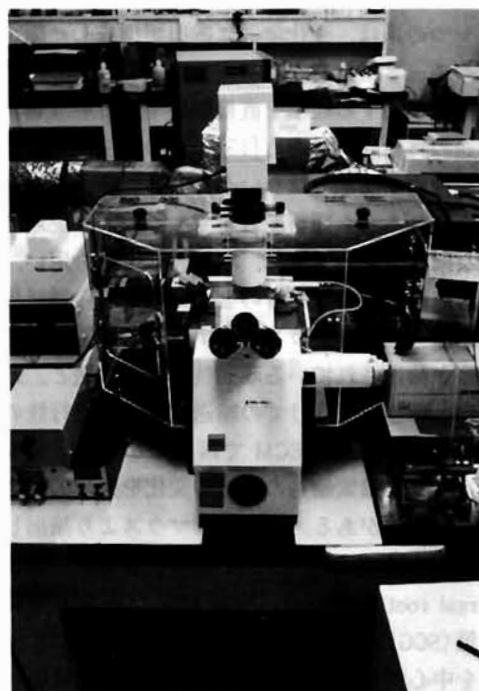


図7. 保温装置

IV. 実験の実際と応用

筆者らは VECM による観察の際、完全な連続記録ではなく、2 分間記録して 1 分間インターバルを置く、断続的な記録としている。インターバル中は照明を消すことで、細胞に対する光の障害を減らすことが出来る。また液交換もこのとき行う。

SCG や DRG に神経伝達物質等受容体関連試薬を投与し軸索輸送を経時的に観察し変化のみられた物質について、軸索輸送を指標に種々のアンタゴニスト・アゴニストを用い機能的に受容体の同定、細胞内メッセンジャ並びにキナーゼ系の決定等、細胞内機能にも踏み込める [8-13]。図 8 は実際に DRG の神経線維を VECM にて観察した像で、図 9 は SCG に神経

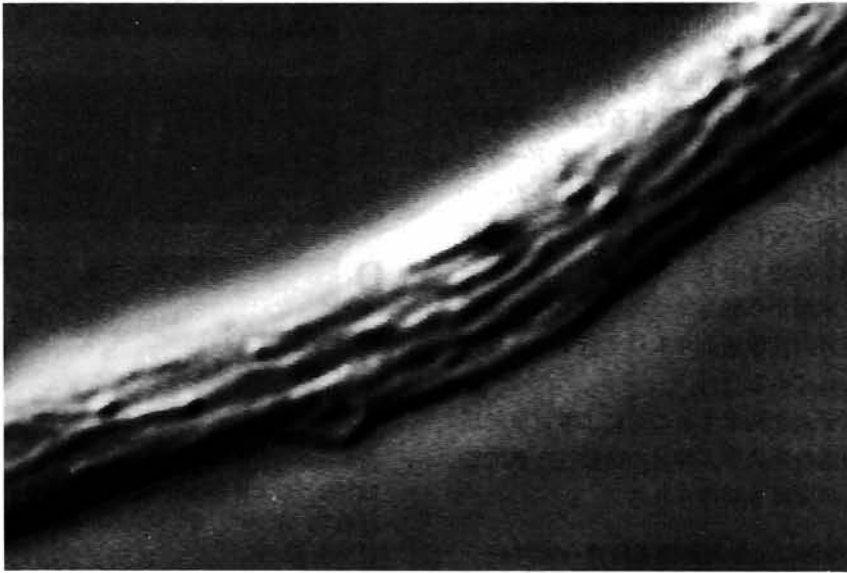


図 8. VECM 神経線維内構造の観察例
バーは 5 μ m.

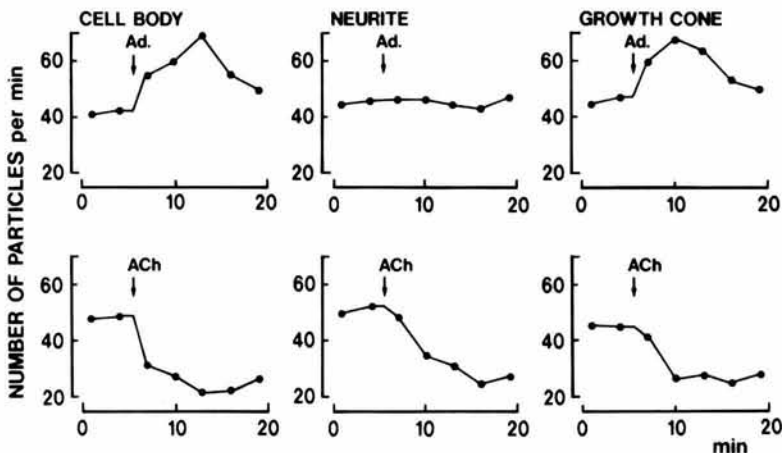


図 9. アドレナリンとアセチルコリンの軸索輸送への影響 [12]

マウス上頤神経節細胞の細胞体、神経線維、成長円錐の各部位にアドレナリンまたはアセチルコリンを局所投与したときの移動粒子数の変化。

伝達物質アドレナリンとアセチルコリンを投与したときの軸索輸送される粒子数の変化を示す。

またマイクロマニピレータとマイクロインジェクタを組み合わせることにより細胞の局所に神経伝達物質を投与し、軸索輸送の変化を指標に受容体の細胞内局在を知ることが出来る[12]。Capsaicin 等の細胞内 Ca イオンの上昇を伴い軸索輸送が変化する試薬の場合、VECMを用いた軸索輸送のデータ、Fura-2 等細胞内カルシウム測定用蛍光色素を用いたデータ、レーンとなる微小管を確認するための電顕のデータ等、他の実験手法より得られるデータと複合的に検討し細胞機能との関係を知るための手法として用いられる[16]。光による障害を積極的に観察した例として、軸索末端をレーザー照射すると、末端から細胞体へ送られる順方向性の輸送が逆方向性輸送よりも早く低下する現象が見付けられている[17]。

このシステムを利用することにより電氣的現象と軸索輸送の関係等、神経の活動性と軸索輸送の関係への発展も期待される。

V. 蛍光染色による軸索輸送研究—VIFM—

特定のオルガネラに特異的に結合する蛍光染料を用いて、軸索輸送を見る方法である。

このとき顕微鏡本体には落射照明装置と、適切な蛍光フィルタセットを取り付け、また光量を確保するためにアナライザは取り外す。撮像管には高感度な SIT カメラを用いる。画像処理の手法は基本的には VECM と同様であるが、蛍光像では光量が非常に低下するため、顕微鏡の拡大倍率は VECM の $2/3 \sim 1/2$ に設定し、さらに S/N を上げるために ROLLING AVERAGE パラメータは 4 程度必要である。

図10には、ミトコンドリアに選択的な rhodamine 123 による実験例を示した[18]。

VI. 終 わ り に

以上軸索輸送の光学的測定について、微分干渉顕微鏡とイメージプロセッサを用いた

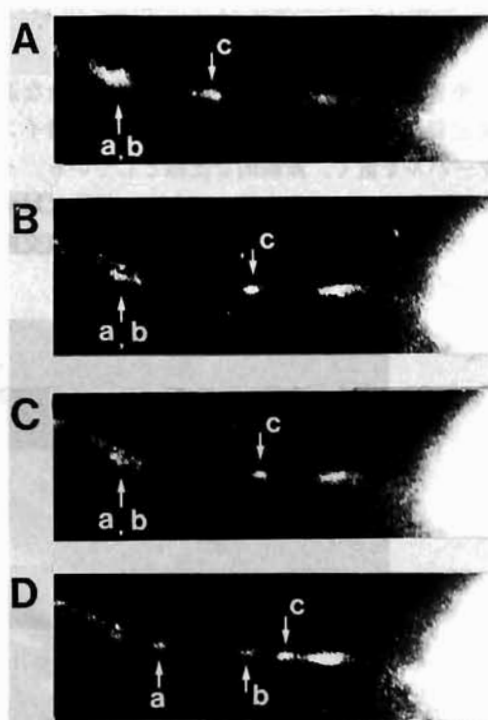


図10. Rhodamine 123 によるミトコンドリアの超生体染色[18]
試料はマウス脊髄後根神経節細胞。A～Dは時間経過で、A: 0, B: 23, C: 40, D: 70秒後。
バーは 10 μ m。

VECM を中心に、製品名まで踏み込んで解説した。より優れた機器があるかも知れないが、筆者が実際に使用しているものについて紹介したので、お許し願いたい。

この手法は軸索輸送の研究のみならず、一般の培養系などにも応用できるので、実験の一助となれば幸いである。

文 献

- 1) Waller A: Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alteration produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philos Trans R Soc Lond* **140**: 423-429, 1850.
- 2) Allen R D, Allen N S & Travis J L: Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of allogromia laticollaris. *Cell Motility* **1**: 291-302, 1981.

- 3) Allen R D & Allen N S: Video-enhanced microscopy with a computer frame memory. *J Microscopy* **129**: 3-17, 1983.
- 4) 竹中敏文: コンピューター方式によるビデオ増感コントラスト顕微鏡. *生体の科学* **34**: 401-404, 1983.
- 5) 竹中敏文, 川上 倫: 軸索流を見る. *Clinical Neuroscience* **4**: 1058, 1986.
- 6) 竹中敏文, 川上 倫: 細胞運動測定法 “軸索内輸送 (AVEC-DIC)”. *生体の科学* **39**: 496-499, 1988.
- 7) 川上 倫, 竹中敏文, 堀 英明, 橋本容子: ニューロサイエンスの新しい研究方法 “軸索輸送の測定法”. *Clinical Neuroscience* **13**: 134-135, 1995.
- 8) Takenaka T, Kawakami T, Hikawa N, Gotoh H & Bandou Y: Neurotransmitter regulation of axoplasmic transport and neuronal growth. *Biomedical Res* **12**: (S2): 171-172, 1991.
- 9) Takenaka T, Kawakami T, Hikawa N, Bandou Y & Gotoh H: Effect of neurotransmitters on axoplasmic transport: acetylcholine effect on superior cervical ganglion cells. *Brain Res* **588**: 212-216, 1992.
- 10) Takenaka T, Kawakami T, Bandou Y, Hikawa N & Gotoh H: How neurotransmitters affect axoplasmic transport? *J J Physiol* **43**: (S1): S205-S207, 1993.
- 11) Takenaka T, Kawakami T, Hori H & Bandou Y: Effect of neurotransmitters on axoplasmic transport: how adrenaline affects superior cervical ganglion cells. *Brain Res* **643**: 81-85, 1994.
- 12) Kawakami T, Takenaka T, Hori H, Hashimoto Y & Kusakabe T: Effects of acetylcholine and adrenaline on axoplasmic transport at different regions of mouse superior cervical ganglion cells in culture. *Brain Res* **683**: 88-92, 1995.
- 13) Takenaka T & Kawakami T: Signal transduction mechanism responsible for changes in axoplasmic transport caused by neurotransmitters. *Neurochem Res*, 1996 (in press).
- 14) Lang W: Nomarski differential interference-contrast microscopy. Collection of four articles from ZEISS informations.
- 15) Vale R D, Reese T S and Sheetz M P: Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**: 39-50, 1985.
- 16) Kawakami T, Hikawa N, Kusakabe T, Kano M, Bandou Y, Gotoh H & Takenaka T: Mechanism of inhibitory action of capsaicin on particulate axoplasmic transport in sensory neurons in culture. *J Neurobiol* **24**: 545-551, 1992.
- 17) Kano M, Tashiro H, Kawakami T, Takenaka T & Gotoh H: Differential suppression of axoplasmic transport: effects of light irradiation to the growth cone of cultured dorsal root ganglion neurons. *Cell and Mol Neurobiol* **15**: 297-306, 1995.
- 18) Takenaka T, Kawakami T, Hikawa N & Gotoh H: Axoplasmic transport of mitochondria in cultured dorsal root ganglion cells. *Brain Res* **528**: 285-290, 1990.