

輪帯照明と偏光顕微鏡法を利用した珪藻殻微細構造の新しい観察法

誌名	日本プランクトン学会報
ISSN	03878961
著者名	奥,修
発行元	日本プランクトン学会
巻/号	51巻1号
掲載ページ	p. 25-33
発行年月	2004年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



輪帯照明と偏光顕微鏡法を利用した珪藻殻微細構造の新しい観察法

奥 修

独立行政法人 産業技術総合研究所 環境管理研究部門 〒305-8569 茨城県つくば市小野川 16-1

A new method for visualization of diatom striae by using annular illumination and polarized light

OSAMU OKU

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

Abstract To investigate suitable methods for diatom observation, visualization of the dot structure of *Amphipleura pellucida* (Kützing) Kützing was studied using various contrast-enhancing techniques. *A. pellucida* is one of the most famous diatoms for the testing of microscope lenses over the last hundred years. The distance between striae is about 260 nm and spacing between each dot is 200 nm. This dot pattern has never been visualized by any of the following methods: phase contrast, differential interference contrast, dark field, oblique illumination or video-enhanced microscope. In the process of these trials, I found that the light that passes through the striae of this diatom is line polarized. The polarization of the light gets stronger as the spatial frequency of striae increases. This finding indicated that the contrast of fine structures in diatoms may be enhanced by using microscopy with polarized light. Therefore, trials on visualization of the *A. pellucida* dot pattern were done using polarized light. The dots of *A. pellucida* (mounted in pleurax [$n=1.7$], objective NA=1.25-1.40, wavelength is 450-500 nm) were clearly visible using the following three methods: 1) annular illumination using polarized light (cross polarized light [polarizer in; analyzer in], this method is called AIPL-cross hereafter), 2) annular (and also oblique) illumination using polarized light (plane, not cross polarized, AIPL-plane), 3) cross polarized light (in normal illumination, not oblique and/or annular illumination). Numerical aperture of condenser for annular illumination was 1.2-1.43. Highest contrast of images was observed under AIPL-cross and lowest under AIPL-plane. The essence of these methods is visualization of the polarized light from diatom striae and contrast enhancement by oblique (annular) illumination. The AIPL-cross method is very effective for visualization of slit-like structures in diatoms that are from 200 nm to 400 nm width. The contrast of images is maximum at ± 45 degrees to the analyser under cross polarized light. This grid pattern of *A. pellucida* corresponds to that observed in previous SEM images, and I believe that this grid image visualized by LM is the results of exact visualization of the fine structure. Although the AIPL methods cannot work beyond the diffraction limit, they are very useful for enhancing the contrast of diatom striae at high spatial frequencies.

Key words: diatom frustule, microscopic observation, annular illumination, polarized light

はじめに

珪藻殻に刻まれている微細構造は珪藻類分類上の重要な指標で、その寸法はマイクロメートル（光学顕微鏡レベル）からナノメートル（電子顕微鏡レベル）に至るまでの広範囲に分布している。これらを顕微鏡技術によって可視化することが分類の出発点となる。現代においては、新種記載等の詳細な微細構造観察には電子顕微鏡の利用が不可欠とされているが、その普及と利用、用途には限界があるため、フロラ調査、環境アセスメント、教育の現場において、珪藻類の査定・分類は現在でも大部分が光学顕微鏡を用いて行われている。

珪藻殻は非晶質ケイ酸を主成分とする屈折率 1.43 程度の無色透明体である。封入材でマウントされた珪藻殻は透明な樹脂中に透明な物体として存在し、互いを区別するのは屈折率と厚さだけである。このような物体は位相物体と呼ばれ（鶴田 1984）、低いコントラストしか作れないために可視化が難しい。光学器機の発達により各種の検鏡法を用いることができる現代でもこの問題は解決されたわけではなく、対物レンズの分解能付近の珪藻殻微細構造を観察する場合、以下に述べるような光学的困難が存在する。

中心透過照明法絞り開放では低コントラストの像となる。コントラストを増加させようと絞り込むと分解能は低下する。位相差法によるとコントラストは改善するが、コンデンサの環状絞りにより照明光の開口数 (NA) が低くなり分解能が低下する。最適な位相量を設定することも難しい。微分干渉法は屈折率勾配を高分解能かつ高コントラストに検出する点で優れている。しかし対物レンズの解像限界付近では分解能とコントラストは反比例の関係にあり、高分解能の像を得ようとするとき低コントラストの像となり、可視化にはビデオ技術等によるコントラスト増強が必要となる。偏光法が珪藻観察に用いられる例はほとんどなく、実用的とは考えられていない。偏斜照明法では微細構造の高コントラスト化が行えるが、この効果は偏斜方向に対してのみ有効である。珪藻殻の検鏡では、これらの諸問題により対物レンズの分解能より大きな構造であってもコントラストが失われ、見えなくなってしまうことが多いのである (Inoue & Spring 2001)。

このようなことから、もし対物レンズの分解能を少しも損なうことなく珪藻殻微細構造を検鏡できる方法が見つかれば、それは実質的に光学顕微鏡の能力を広げる有用なものであることは明らかである。そこで著者は珪藻

殻を試料として分解能と照明法の関係を試行錯誤的に検討してきた。その結果、油浸対物レンズの解像限界付近のサイズにおいて、珪藻殻上の直線または直交する格子構造をきわめて明瞭に可視化する照明法を見いだした。この方法は輪帯照明（環状照明とも呼ぶ）と偏光顕微鏡法を組み合わせた偏光—輪帯照明法と呼ぶべきもので、*Amphipleura pellucida* (Kützing) Kützing 珪藻殻（樹脂封入レベル）の 200 nm 格子構造を明瞭に記録できた。*A. pellucida* の格子構造は従来の一般的検鏡法では見えなかったものであり、偏光—輪帯照明法が開発された意義は大きい。本論文ではまず、この照明法の基礎となる輪帯照明法と偏光法について述べ、両者の組合せである偏光—輪帯照明法による画像を示す。次に応用光学面からの考察を行う。最後に、この照明法が簡単かつ安価に実施できることを示して結びとする。

材料・方法

検鏡試料は、A) 東京湾より 1990 年 5 月にネット採集した浮遊珪藻 *Coscinodiscus asteromphalus* Ehrenberg, B) 小仏川（東京都八王子市）より 2001 年 5 月に採集した付着珪藻 *Synedra ulna* Ehrenberg, *Melosira varians* Agardh と *Diatoma vulgare* Bory de St.-Vincent, C) 東京大学付属小石川植物園の池（東京都文京区）より 2003 年 4 月に採集した付着珪藻 *Amphipleura pellucida* (Kützing) Kützing である。試料 A は硫酸—過酸化水素処理により、試料 B, C については家庭用漂白剤処理（南雲ら 2000）によって有機物を除去し、カバーガラスに貼り付けた後にマウントメディア（和光純薬製、屈折率 1.7 程度）で封じた。カバーガラスは 0.14 mm—0.17 mm 厚、スライドガラスは 1.0 mm 厚のものを用了。イメージングオイルとして 150CST（ニコン製）を用い、指定温度 23°C 付近で使用した。

生物顕微鏡として Nikon Biophot (VBD-2, 日本光学製) を用了。光源として 12V100W ハロゲンランプ、バックミラー付きのランプハウスを用了。照明光の波長は干渉フィルタによって 450—500 nm とした。解像限界付近の観察を行うため、対物レンズは以下に記す液浸系を用了。オリンパス製 Ach P 100 (NA=1.30) ニコン製 CF Plan 100 (NA=1.25), CF UV-F Gryc (NA=1.30), NCF Plan Apo (NA=1.40)。コンデンサとしてアクロマートコンデンサ (NA=0.90)、アクロマチックアプラナートコンデンサ (NA=1.40)、暗視野コンデンサを用了 (NA=1.20—1.43)。写真撮影はコリメート法（接眼レンズで無限遠に像を投影し、カメラレンズで結

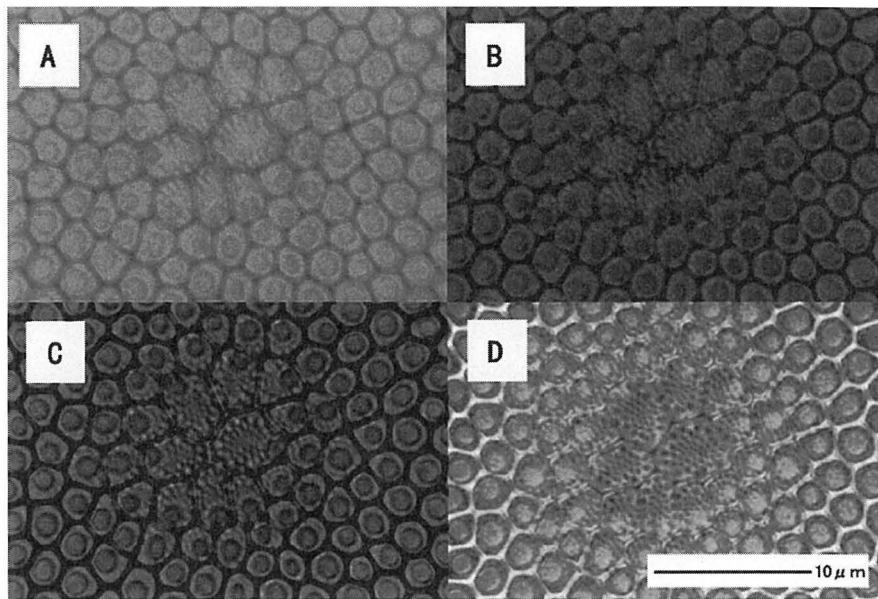


Fig. 1. Effects of condenser numerical aperture on image contrast and minimum resolvable distance (scale bar=10 μm). A: σ (defined as $NA_{\text{con}}/NA_{\text{obj}}$)=1.0, B: $\sigma=0.7$, C: $\sigma=0.5$, D: $\sigma=0.8-1.0$ (annular illumination). The specimen is the marine planktonic diatom *Coscinodiscus asteromphalus* Ehrenberg taken from Tokyo Bay. The objective is a Nikon Plan Apo NA 1.40, $\times 60$, oil immersion lens. The condenser is a Nikon achromatic aplanat NA 1.40, oil immersion lens. Annular stop is handmade. Contrast enhancement for fine dot (D) due to cut most of zero order light using annular stop.

像させる方法)で行った。コリメート法の接眼レンズはCFWN 10とHKW 15、カメラはE995デジタルカメラ(すべてニコン製)を用いた。画像は低圧縮のjpegまたはtiff形式ファイルで記録し、Paint Shop Pro 5.0 (Jasc Software)により処理を行って出力した。

定 義

コンデンサと対物レンズの開口数(NA)の比はコヒーレンス係数と呼ばれ(鶴田1984)、結像特性を決定する重要な係数である。本論文では照明条件をコヒーレンス係数 σ で表す。

$$\sigma = NA_c / NA_o \quad (1)$$

ここに NA_c 、 NA_o はそれぞれコンデンサの開口数と対物レンズの開口数である。たとえば $NA=1.30$ の対物レンズを用い、 $NA=1.40$ の円形開口コンデンサで $NA=1.1$ まで絞り込んだ場合は $\sigma=0-0.85$ と示す。これは、中心光束($\sigma=0$)から $NA=1.1$ ($\sigma=1.1/1.3=0.85$)までの光が円形開口で照射されていることを意味するものとする。同様に、同じ対物レンズで $NA=1.20-1.43$ の環状開口暗視野コンデンサを用いて照明した場合であれば $\sigma=0.92-1.1$ と表す。この表記は $\sigma=0-0.92$ までの光束がカットされていることを示すものとする。

透過照明時の2点分解能 δ は、光の波長を λ として

$NA_c \leq NA_o$ の条件のとき、以下の式で表されるものとする。

$$\delta = 1.22\lambda / (NA_o + NA_c) \quad (2)$$

この式はレーリーリミット($0.61\lambda/NA$)にアッペの結像論の照明効果を加味したものであり、対物レンズ瞳面をコンデンサの共役面が絞り込まない($\sigma=0-1$)ときに分解能 δ が最大になることを意味している。なお本稿では、物体観察時に接眼レンズを引き抜いたときに見える明るい円、すなわち対物レンズ後側焦点面を“対物レンズ瞳面”または簡略に“瞳”と呼ぶ。コンデンサ開口部の形状を操作して対物レンズ瞳の形状を変化させる手法に対しては、“変形瞳”という用語を用いる(中村1999)。この用語は、透過中心照明でコンデンサを絞り込む操作に対しては用いない。

結果と考察

照明法による微細構造コントラストの変化

Fig. 1に*Coscinodiscus asteromphalus*の照明法による記録画像の違いを示した。既に述べたように、透過照明時に分解能が最も高いのは $\sigma=0-1.0$ の場合である。この条件では観察試料に対して多様な角度分布の光が入射する。また照明光のコヒーレンスも低い。空間周波数が高い部分の解像に寄与する照明光は全体の一部にしか

過ぎないため、コントラストの低い像が形成される。したがって Fig. 1A にみられるように、この珪藻の微細構造(約 300 nm)はほとんど判別できない。開口絞りを操作して $\sigma=0-0.7$ 程度まで絞ると部分的コヒーレント照明になり、像のコントラストが改善してゆく (Fig. 1B)。しかし式 (2) に示されるように、絞ると同時に分解能も低下し、高空間周波数成分から消失してゆく。 $\sigma=0-0.5$ まで絞ると低空間周波数成分のコントラストは劇的に改善されるが、微細構造はつぶれてしまう (Fig. 1C)。 $\sigma=0$ で計算上の分解能は $\sigma=1$ のときの約半分まで低下する (鶴田 1984)。

コンデンサを絞り込む ($\sigma \rightarrow 0$) と物体により生じた高次の回折光が対物レンズに入射できなくなるために分解能の低下を引き起こす。このため対物レンズの分解能付近の微細構造を記録するためには σ を低下させないでコントラスト向上を行うことが必要である。アップの回折理論によると、高空間周波数構造の結像に寄与しているのは高開口数の入射光である。したがってコンデンサ絞り面 (=対物レンズ瞳面と共役) の最外周 ($\sigma=1$, 一点) から斜光束を試料に照射すれば、高空間周波数成分のコントラスト向上が見込めることになる。これが変形瞳法の一つ、偏斜照明である。この照明法によると微細構造のコントラストは $\sigma=0-1$ 円形開口照明よりも上昇するので、珪藻類の検鏡に有用である (石澤・田中 1954, 小久保 1960)。しかし偏斜方向のコントラストのみが増加するので解像に著しい方向性が生じる。

解像の方向性を消すためには、環状開口で $\sigma=1$ 付近の光束を入射させればよい。言い換えると、対物レンズ瞳面が最外周で輪帯状になればよい。これが輪帯照明で、やはり変形瞳法の一つである (中村 1999, 渋谷 1999)。コンデンサ絞り面の中央部を円盤で遮光して環状の照明光とすれば簡単に実現でき、このとき対物レンズ瞳が輪帯状(円環状)になっていれば正しく輪帯照明になっている。この照明法によると方向性のない解像で、かつ高空間周波数の高コントラスト化を行うことができる (鶴田 1997)。また、焦点深度も深くなる (中村 1999)。 $\sigma=0.8-1.0$ の輪帯照明による像を Fig. 1D に示す。 $\sigma=0-1$ 円形開口照明と比較すると特に高空間周波数成分のコントラストが高くなっている。C. *asteromphalus* 中心部の小室(areola)微細構造の再現と比較すると、輪帯照明法の画像は $\sigma=0-0.5$ 程度の高コントラスト画像と比較しても優れている。

以上の比較から明らかのように、分解能付近の観察においては、微細構造の高コントラスト化と、粗大・微細構造のフラットなコントラスト分布、焦点深度の深さと

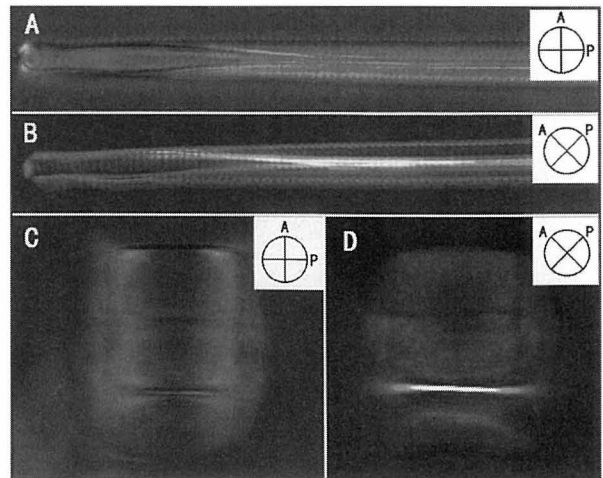


Fig. 2. Line polarized light from slit-like structure of diatom frustule under microscopy using cross polarized light ($\sigma=0.63$). A and C: no polarized light from slit-like structure was found in parallel against analyzer (or polarizer), B and D: strong polarized light was found in ± 45 degree azimuth against analyzer. The specimen (A and B) is freshwater attached diatom *Synedra ulna* Ehrenberg. The specimen (C and D) is freshwater attached and/or planktonic diatom *Melosira varians* Agardh. These sample were taken from Kobotoke river in Tokyo. The objective is a Nikon Plan Apo NA 0.95, $\times 40$, dry. The condenser is a Nikon achromat NA 0.9.

いう点で輪帯照明は中心照明よりも優れていると言える。輪帯照明において、対物レンズ開口絞りとコンデンサ開口数のバランスを調整し $\sigma > 1$ の照明を行えば暗視野照明になる。粗大構造の輝度が大きくなりすぎる欠点があるが、きわめて微弱な構造の可視化には輪帯照明同様に優れている。

微細構造による構造複屈折の発生

生物顕微鏡に簡易ポラライザとアナライザを装着して直交ニコルとし、透過明視野で絞り込みながら ($\sigma=0-0.5$) 各種の珪藻殻を観察していたところ、1) 特定の構造が明るく光る、2) 約 $0.4 \mu\text{m}$ 以下の微細周期構造のコントラストが向上する、3) 上述二つとも、ステージを回転すると 45° ごとに明るさまたはコントラストが消失する、という現象を認めた。この現象の代表的な様子を Fig. 2 に示す。*Synedra ulna* では珪藻殻上のスリット構造部分が、直交ニコルに対して 45° に配置されたときに明るく輝く (Fig. 2B)。この輝きはスリット構造が直交ニコルに対して平行のときには消失する (Fig. 2A)。同様に、*Melosira varians* では珪藻殻の接合面で全く同様な現象が観察された (Fig. 2C, D)。これらの現象は、珪藻殻のスリット構造を通過した光の一部が直線偏光であるこ

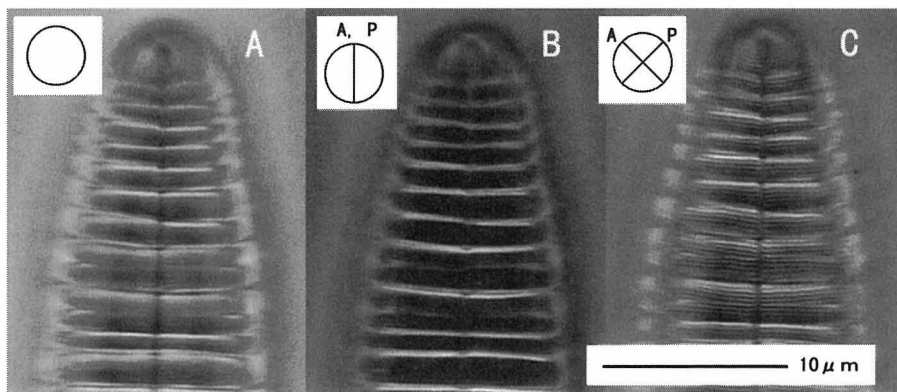


Fig. 3. Visualization of striae in *Diatoma vulgare* Bory de St. Vincent using polarized light and annular illumination ($\sigma=0.8-1.0$). A: no polarizer and analyzer. B: polarizer (placed at 90°). C: polarizer and analyzer (cross polarized light, placed at 45°). The specimen is freshwater diatom taken from Kobotoke river in Tokyo. The objective is same as Fig. 1. The condenser is a Nikon dark field NA 1.20–1.43, oil immersion.

とを示している。珪藻殻の成分は非晶質ケイ酸であり偏光性を持たない。また珪藻殻上の模様はふつう、ケイ酸質の骨格と点紋列から構成されるので、微小管の束やDNAのような配向性も考えにくい。観察された偏光は構造複屈折に由来すると考えられるが、エッジによる偏光（佐藤 1991）、スリットによる偏光（鶴田 2003）、反射による偏光（鶴田 2003）等の何に該当するのかは不明である。しかし 1) の現象は被殻が広く重なり合っスリットを形成している場合に認められるのでスリット偏光、2) の現象についてもおよそ 400 nm 以下の周期的スリット構造について認められたのでスリット偏光の一種ではないかと思われる。スリットの幅や形状により、生じる偏光の強度や波長依存性が異なっているためにこれら二つの現象が起こるのではないかと推察される。

輪帯照明と偏光顕微鏡法の組み合わせ

輪帯照明により高空間周波数の高コントラスト化を行い、偏光顕微鏡法により 400 nm から解像限界までの回折光を検出すれば、可視化が困難な微細構造が見えるかもしれない。そこでこの方法（以後、偏光—輪帯照明法 annular illumination using polarized light と呼ぶ）を用いて *Diatoma vulgare* の条線を観察してみた (Fig. 3)。本種の条線は約 260 nm の間隔で、位相差法や微分干渉法では観察不能で、輪帯照明でごくまれに見えることがあり、高輝度光源を用いた暗視野顕微鏡でやっと見えるほど微弱なものである。Fig. 3A に見られる通り、輪帯照明では条線はきわめて微弱である。ところが、コンデンサの下にポラライザを配置して、*D. vulgare* の条線に対して透過軸を直交させたところ、コントラストの増加が観察された (Fig. 3B)。そこでアナライザを配置して

直交ニコルの状態で観察したところ、偏光軸に対して条線が 45° の位置にあるときに、条線のコントラストが最大になり、きわめて明瞭に可視化された (Fig. 3C)。暗視野（輪帯）照明に直交ニコル偏光を組み合わせても同様の効果が確認され、暗視野または偏光法を単独で用いたときよりも明瞭な像が観察された。直交ニコルのときに限り、条線は円形開口（油浸、 $\sigma=0-1.0$ ）でも観察可能であった。珪藻殻の輪郭や粗大構造との対称性から見て、この微細構造は干渉縞ではなく、条線構造であると考えられる。この構造は Round et al. (1990) が示した透過電子顕微鏡写真ともよく一致している。直交ニコル観察のときに、条線は暗い背景に対して明るく見え、その明るさは直交させたポラライザ、アナライザに対して 45° のときに最大になった。条線がポラライザかアナライザのどちらかに平行なときには明るさは最小になり、ほとんど見えなくなる。平行ニコル（あるいはポラライザ、アナライザの一方のみ）の場合には、条線が偏光の透過軸と直交するときにコントラストが極大になる。このとき条線はやや暗くなった背景に対して明るい縞として見えるが、背景光の影響が大きいのでコントラストの変化は極めて微弱である。以上の観察結果は、1) 従来観察が困難であった微細な条線が偏光—輪帯照明法（平行ニコル・直交ニコル）または油浸コンデンサを用いた偏光顕微鏡により観察できること、2) 可視化は条線の偏光特性を利用していることを示している。

偏光—輪帯照明法（直交ニコル）において、直交したポラライザ・アナライザのどちらかに対して $\pm 45^\circ$ の位置にあるときに条線のコントラストが最大になるということは、直交する格子構造に対しても、均一なコントラスト増加作用を持つことを意味している。

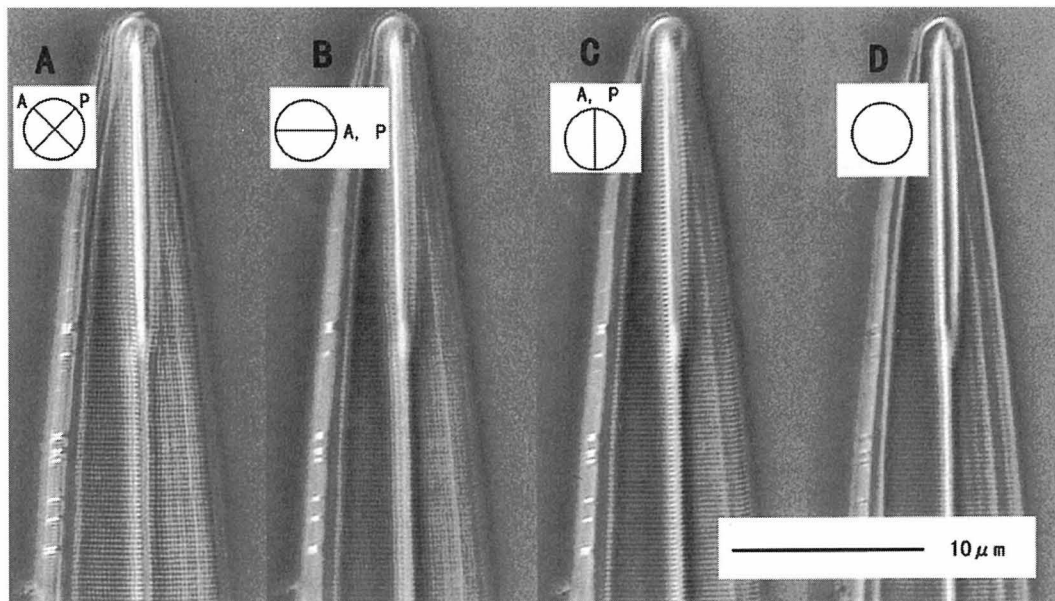


Fig. 4. Visualization of grid pattern of *Amphipleura pellucida* (Kützing) Kützing in the method of Annular Illumination using Polarized Light (AIPL). A: AIPL (polarizer in, analyzer in). The specimen is placed at 45°. B: AIPL (polarizer in, analyzer out). The specimen is placed at 0° against polarizer. C: AIPL (polarizer in, analyzer out). The specimen is placed at 90° against polarizer. D: annular illumination ($\sigma=0.8-1.0$). The specimen is taken from pond of Botanical Gardens (Graduate School of Science, The University of Tokyo) in Tokyo. The objective is same as Fig. 1. The condenser is a Nikon dark field NA 1.20-1.43, oil immersion.

淡水産付着珪藻 *Amphipleura pellucida* の偏光一輪帯法による画像を Fig. 4 に示した。直交ニコルに対して 45° の位置に置いた画像では、本種の格子構造 (点紋列) がきわめて明瞭に可視化されている (Fig. 4A)。ポラライザ (またはアナライザ) を長軸に対して直角に配置すると、長軸に平行な格子模様が強調される (Fig. 4B)。ポラライザ (またはアナライザ) を長軸に対して平行に配置すると条線が強調される (Fig. 4C)。アナライザ・ポラライザを外して通常の輪帯照明法を行うと、条線のコントラストは弱くなり、格子構造は可視化されない (Fig. 4D)。本種においても直交ニコル時には輪帯開口 ($\sigma=0.86-1.02$)・円形開口 ($\sigma=0-1.0$) のどちらでも格子構造が観察できた。円形開口 ($\sigma=0-1.0$) の平行ニコル時にはコントラストが著しく低くなり、格子構造・条線ともに全く確認できない。

本種の条線は 250—270 nm 程度の間隔で、NA=1.2 以上の油浸対物レンズ用テストチャートとして古くから利用されている (石澤・田中 1953, 井上 1977)。開口数限界付近の斜光照明で格子構造 (点紋列) がわずかに見えることは古くから知られていたが、コントラスト良く観察・撮影することはきわめて難しく、高い分解能と検出能を持つ微分干渉装置とビデオ顕微鏡技術を用いても格子構造には写らない (Weiss et al. 1999)。透過電子顕微鏡像によると本種の被殻には直交する格子模様が存在

する (Stoermer & Pankratz 1964)。走査電子顕微鏡像によると、この格子模様は被殻表面にある長軸に平行な線と、被殻裏面にある条線との組合せにより生じている (Round et al. 1990)。Fig. 4A により可視化された格子構造はこれらの電子顕微鏡像ともよく一致しており、とりわけ透過電子顕微鏡画像に近いものとなっている。これは偏光一輪帯照明法が珪藻殻のケイ酸骨格を通過した光を可視化しているからだと考えられる。

Fig. 4A で解像されている距離は、条線幅で約 240—270 nm、点紋列の間隔で 200 nm である。Fig. 4A の撮影波長は 450—500 nm で、 $\sigma=0.86-1.02$ 、対物レンズ NA=1.40 から分解能を計算すると式 (2) より約 190 nm であるから、この格子構造の可視化はレーリーリミットの範囲内である。これらのことから考えても、Fig. 4 に見られる格子構造は、*Amphipleura pellucida* の格子構造 (点紋列) に他ならないと結論される。格子間の距離が偏光を起こしやすいサイズであり、輪帯照明と偏光の組合せによるコントラスト強調が可視化に効果的であったものと想像される。本種の格子構造は油浸のアクロマート (NA=1.3)、プランアロマート (NA=1.25)、プランアポロマート (NA=1.40)、グリセリン浸蛍光用アクロマート (NA=1.30) のどの対物レンズでも観察することができた。

過去においては、本種の点紋列を光学顕微鏡によって

明瞭に撮影するには、硫化ヒ素 ($n=2.4$) などの高屈折率の媒質に珪藻を封入する、特別に設計された大開口数 ($NA=1.6$) 対物レンズを用いる、必要ならば銀染色を行う、紫から紫外 (275 nm または 365 nm) の短波長光を用いる、紫外線の場合は専用開発されたモノクロマト対物レンズを使うなど、特別な装置の購入や特殊な技術を身につける必要があった (Stoermer & Pankratz 1964 中の文献を参照)。これに対して偏光一輪帯照明法においては、青色光、屈折率 1.7 程度の封入剤、開口数 1.25 以上の対物レンズで *A. pellucida* の点紋列を確実に可視化できるので、現在市販されている機材を用いて簡単に実現でき、その有用性は明らかである。

偏光一輪帯照明法の結像論

輪帯照明法は対物レンズの後側焦点面 (瞳) の中央部を遮蔽し、結像に寄与しない 0 次光の多くをカットする変形瞳法である。この照明法を用いるとエアリディスクは小さくなるが副極大は大きくなるので、解像限界は円形瞳と同じとされている (久保田 1959)。しかし結像には主に高次の回折光が寄与することになるので、高空間周波数領域のコントラストが上がり、微細構造の強調効果に優れている (鶴田 1984, 中村 1999)。偏光法 (円形開口) で直交ニコル、高開口数レンズを使用した場合、後側焦点面では十字模様が出現し、エアリディスクは四つ葉のクローバー状になり (Inoue & Spring 2001)、分解能は正常な円形開口の約 0.5 倍に低下する (久保田 1959)。この現象は高開口数レンズによる偏光面の回転に原因があるので、レクチファイヤ光学系 (Inoue & Spring 2001) を用いなければ防ぐことができない。輪帯照明・偏光法の組合せである偏光一輪帯照明法は、理論上どのような結像特性を持つのか興味を持たれるが、本法による顕微鏡観察法や回折像の形状に関する報告は見あたらない。そこで従来の理論と瞳の形状から結像特性を類推する。

偏光一輪帯照明法で直交ニコルの状態にすると、対物レンズ瞳面はリング状に十字の切れ込みが現れた四開口の形態となる。リングは輪帯照明、十字の切れ込みは偏光板の直交ニコルによる消光に帰因する。輪帯全面で消光が起こらないのは、高開口数のコンデンサ・対物レンズによって偏光面の回転が起こるからである (前述)。偏光面の回転による光漏れはアナライザから $\pm 45^\circ$ の位置でかつ、 $\sigma=0$ で最小、 $\sigma=1$ に向かって極大になる (鶴田 1984)。したがって偏光一輪帯照明法 (直交ニコル) は直交する両方向から斜光照明を行う四開口変形照明法 (渋谷 1999) の要素も持っていることになる。この変形照

明法はある条件を満たすときに、直交するパターンに対しては輪帯照明法を上回る解像が期待できるとされている (渋谷 1999)。

偏光一輪帯照明法はこれら輪帯照明、変形照明、偏光法の 3 種の照明・観察法の複合系になっている可能性が高いと思われる。偏光顕微鏡による観察試料の構造複屈折の検出効果が、輪帯照明 (変形照明) による高空間周波数成分のコントラスト強調効果と共に現れ、その結果として解像限界に近いサイズのスリット構造から発する偏光を効果的に可視化できたものと考えられる。

実験結果から解釈して、解像限界に近い空間周波数領域において本法が可視化しているのは直線偏光といえる。つまり直交ニコル時に効果的に可視化されているのは偏光を発しているスリットであり、消光された背景に明るい線となって結像している。直交する格子 (スリット) を結像させた場合に現れる暗い点像は、直交格子間にある偏光を発していない空間がポラライザとアナライザにより消光されてコントラスト生成しているものと思われる。このため格子間に現れる点像が暗点像の場合には異常回折が起きないが、点像が輝点の場合は瞳の形状に由来する異常回折や分解能の低下が起こる可能性がある。この点、像解釈に注意が必要であろう。

偏光一輪帯照明法において平行ニコルにした場合、瞳面は通常の輪帯照明と等しい。この配置において、アナライザに対して珪藻殻条線の微細なスリット構造を直交させると、条線間隔が観察波長以下であれば条線がアナライザの役割を果たし、同時に斜光照明による高空間周波数成分の強調効果が加わって、微細な条線のコントラストが僅かに高くなる (Fig. 3B, Fig. 4B, C)。このときの回折像は輪帯照明のそれと等しいので、直交ニコル時のような解像力の低下は起こらない。この性質をビデオ顕微鏡技術と組み合わせれば、異常回折を起こさずにレーリリミット付近の直線構造の高コントラスト化が可能である。またポラライザの透過軸を回転させながらデジタル画像を取得し、コントラスト強調を行ったのちに画像合成を行えば、方向性の少ない偏光強調像を得ることができる。偏光一輪帯照明法 (平行ニコル) のもつこれらの特徴は、常に方向性のある解像でかつ異常回折の可能性を持つ円形開口の偏光顕微鏡法 (直交ニコル) よりも優れている。

偏光一輪帯照明法を直交ニコルで用いる場合、偏光の検出特性と斜光照明の方向性から、300 nm から解像限界までの周期的スリット構造、それらが直角に組み合わせられた格子構造の高コントラスト化に最も効果を発揮すると考えられる。したがってこのような構造を持つ多種

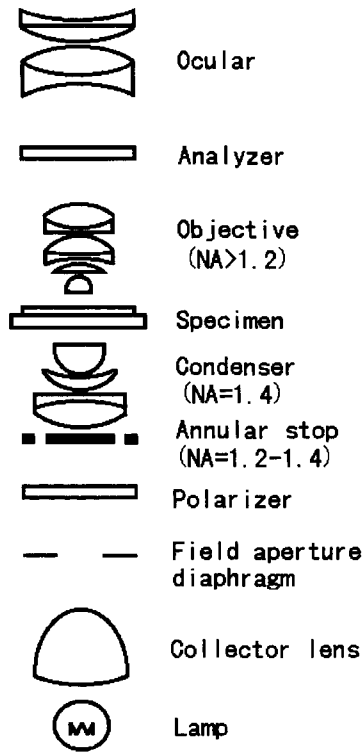


Fig. 5. Configuration of annular illumination using polarized light. This configuration is equal to polarized light microscopy equipped with high NA dark field condenser (or high NA achromatic aplanat condenser and annular stop). Oil immersion is required for observation of 200–250 nm structure.

の珪藻類, *Amphipleura*, *Bacillaria*, *Craticula*, *Diatoma*, *Eunotia*, *Frustulia*, *Gyrosigma*, *Hantzschia*, *Rhizosolenia* 等の観察に効果的であろう。一方, 斜め格子の構造を持つ種には直交ニコルよりもむしろ, 斜め格子のそれぞれの直線に対してポラライザをアナライザを直交するように配置すること (つまり, 斜め格子と同じ角度でポラライザとアナライザの透過軸を交差させる) が効果的といえる。このコントラスト向上効果が物体の構造に依存することから, ポラライザとアナライザを操作し, 微細構造が直交する格子状かどうかを決定する材料に用いることもできるであろう。

偏光一輪帯照明法の有用性はこれから検証されていくべきものである。結像特性が解析的に明らかにされることはもとより, 新たに微細構造が観察可能になる珪藻種や他の観察対象を見つけること, また, 物体の微細構造に応じてポラライザとアナライザをどのように操作することが最適かを解明することは, 今後の重要な課題である。

偏光一輪帯照明法の実施方法

偏光一輪帯照明法の基本構成要素を Fig. 5 に示した。この方法の本質は, NA=1.3 以上の油浸検鏡において, 1) 瞳いっぱい照明して中央部を遮蔽すること, 2) ポラライザとアナライザを配置すること, 3) 物体の周期構造をポラライザ・アナライザに対して適当な角度で配置すること, の3つである。したがって通常の生物顕微鏡に簡単な部品を追加するだけで実施でき, 経費もほとんどかからない。1) は瞳中央部を遮蔽してリング状でできればよい。2) では消光係数が大きく平面性がよい偏光板を追加すればよい。3) については回転ステージの導入で解決できる。簡単に実現するには, 偏光顕微鏡の乾燥系コンデンサを, NA=1.3 以上の油浸対物レンズで $\sigma=0.8-1.1$ 程度を実現する油浸暗視野コンデンサ (NA=1.4) に交換し, コンデンサ下に偏光板を入れればよい。生物顕微鏡を用いる場合は, コンデンサをアクロマチックアプラナート (+遮光板) か油浸暗視野コンデンサに交換して $\sigma=0.8-1.1$ 程度の照明条件とし, 簡易偏光装置を取り付け, 回転可能なステージに交換すればよい。

遮光板と偏光板により照明光の多くがカットされるので, 輝度の高い光源を使える鏡基が望ましい。12V100 W ハロゲンランプを用いた鏡基なら十分な条件である。また偏光一輪帯照明法は偏光を使うので歪みが少ない偏光または微分干渉用の油浸対物レンズ・コンデンサが適している。しかし現在市販されている対物レンズに大きな歪みが見られることは少ないので, 手持ちのものを流用しても大きな障害はないものと考えられる。直交ニコル時に, 対物レンズ瞳面を覗いて形の整った十字様様ができていれば観察に支障はない。

検鏡は概ね次の手順で行う。対物レンズとコンデンサを油浸の状態にする。コンデンサ高さはケーラー照明位置とする。観察したい珪藻を視野の中央に置き, 正しくピントを合わせる。珪藻はカバーガラスの直下にあることが必要である。カバーガラスと珪藻の間に封入材が存在すると球面収差が発生して像質が劣化する。対象が定まったら接眼レンズを引き抜き, 対物レンズ瞳面が正しく輪帯状になっており, その外周部が瞳面いっぱいに照明されていることを確認する。瞳面をいっぱい満たしていないのなら, コンデンサ絞り・高さ・ランプ光源面の投影の大きさを確認しながら調節する。次にコンデンサ下にポラライザを入れ, 鏡基にアナライザを入れる。ポラライザを回転させ, 瞳面が最も暗くなる直交ニコルの状態にする。接眼レンズを戻して珪藻を観察する。ステージを回転させながら観察を続け, 微細な条線の有無を調べる。ステージを回転させると浮き出る条線がある

のなら、アナライザを外し、ステージ（またはポラライザだけ）を回転させて条線のコントラスト強調を試みる。両者の像を比較し、適当と判断される方法で撮像を行う。高分解能の記録のためには対物レンズの球面収差が増大しない範囲の短波長・単色光（アクロマートで $\lambda=450\text{--}500\text{ nm}$ 程度、アポクロマートで 436 nm 程度）を使用して銀塩またはデジタルカメラで撮影する。デジタル撮像素子の中には解像に方向性を持つものがあるので十分にテストしてから用いることが必要である。

以上の機材・操作によってこれまで殆ど不可能であった $200\text{--}250\text{ nm}$ 領域の珪藻殻スリット構造の画像記録が可能になる。また低コントラストの像しか得られなかった $250\text{--}300\text{ nm}$ の構造が高いコントラストで記録できる。本稿では観察対象を珪藻に限定したが、この照明法は、位相物体のスリット構造から発する偏光を明暗コントラストに変えて分解能を上げる方法として、極めて広い分野で応用できるものと思われる。

謝 辞

東京大学大学院総合文化研究科の上村慎治助教授には査読を通じて建設的かつ非常に有益なコメントを頂きました。鷲見栄一（産業技術総合研究所）、斉藤敏幸（日本冬虫夏草の会）、白山弘子（北海道キノコの会）の各氏からは温かい励ましを頂きました。これらの方々に御礼申し上げます。本研究は日本学術振興会特別研究員申請研究「珪藻類休眠胞子の発芽特性の解明」の一環として行

われたものである。

引用文献

- Inoue, S. and K. R. Spring 2001 (寺川・市江・渡辺訳): ビデオ顕微鏡—その基礎と活用法, 共立出版, 東京, 744pp.
- 井上 勤 1977. 顕微鏡のすべて. 地人書館. 東京, 240 pp.
- 石澤政男・田中克己 1953. 顕微鏡の使い方. 裳華房. 東京, 246 pp.
- 小久保清治 1960. 浮遊珪藻類. 厚生社厚生閣. 東京, 330 pp.
- 久保田 広 1959. 応用光学. 岩波書店. 東京, 258 pp.
- 南雲 保・出井雅彦・長田敬五 2000. 珪藻の世界. 国立科学博物館. 東京, 58 pp.
- 中村 收 1999. 変形光源と変形瞳による超解像. 日本分光学会測定法シリーズ 38, 超解像の光学 (河田聡編), pp. 13-30. 学会出版センター. 東京.
- Round, F. E., Crawford, R. M. & D. G. Mann 1990. *The Diatoms*. Cambridge University New York, 747 pp.
- 佐藤英美 1991. 偏光で見たいものだけ選んで見る (偏光顕微鏡). 日本分光学会測定法シリーズ 21, 限界を超える生物顕微鏡 (宝谷紘一・木下一彦編), pp. 31-51. 学会出版センター. 東京.
- 渋谷真人 1999. 超解像光リソグラフィー. 日本分光学会測定法シリーズ 38, 超解像の光学 (河田聡編), pp. 13-30. 学会出版センター. 東京.
- Stoermer E. F. & Pankratz H. S. 1964. Fine structure of the diatom *Amphipleura pellucida* I. Wall structure. *Amer. J. Bot.* 52: 1067-1078.
- 鶴田匡夫 1984. 光の鉛筆. 新技術コミュニケーションズ. 東京, 483 pp.
- 鶴田匡夫 1997. 第4・光の鉛筆. 新技術コミュニケーションズ. 東京, 510 pp.
- 鶴田匡夫 2003. 第6・光の鉛筆. 新技術コミュニケーションズ. 東京, 535 pp.
- Weiss, D. G., Maile, W., Wick, R. A. & W. Steffen (1999): Video Microscopy, pp. 73-149. In *Light Microscopy in Biology* (ed. Lacey, A.J.). Oxford University Press, New York.