

地学試料の電子顕微鏡的観察  
その4. 走査顕微鏡による高さの計測

大久保 雅 弘  
島根大学理学部地質学教室

Electron Microscopy of the Geologic Materials.  
Part 4. A Method of Measurement of Height by  
Scanning Electron Microscope.

Masahiro OKUBO  
(Received September 3, 1983)

Abstract

This paper presents the discussion on a method of measurement of height by SEM and its results, in taking the case of some Miocene diatoms. If the stereomicrographs are taken, it is easy to calculate a three-dimensional height from the following formula:  $H=b/\sin \theta - a/\tan \theta$  ( $\theta$  is the angle between a stereopair.  $A$  and  $b$  are the distances of the specific points from the axis of rotation.). As the results, the inner depths of the frustules of *Thalassionema* and *Denticulopsis*, and the relative relief of the frustule surface of *Actinocyclus* are quantitatively clarified. These values must serve to deepen our understanding on the outer micro-features, though the slight aberrations are unavoidable.

まえがき

筆者は数年前より珪藻化石の走査顕微鏡観察を行ってきたが、その過程で立体写真を用いた高さ（深さ・厚さ）の計測を試してみた。

一般に顕微鏡下の観察においては、水平方向の長さの計測は容易であるが、垂直方向の高さ・深さ・厚さ等の測定は粗雑になることが多い。光学顕微鏡では、対物レンズの焦点深度が浅いことを逆用して、作動距離の調節によって高さを知ることができるが、このとき付属の目盛りから読みとれる数値の限界は、倍率1000倍で $2\mu$ といわれている。しかし、これは機構上の可能性を示すだけであって、実際にこの高さを識別できるとは限らない。たとえば珪藻の被殻についてみると、常法どおりのプレパラート上で貫殻軸方向の厚さを測ることは、物体が微小なために非常に難しい。貫殻軸が横倒しになった標本をみつけだす偶然性に期待するほかはない。

このような場合には、走査顕微鏡の利用がもっとも適していると思われる。これは焦点深

度が深い上に、観察中の物体を任意の方向に転位させることが容易であるので、同じ対象物について傾斜角の異なる写真を撮ることも容易である。従って、この2枚の写真から、高さや深さを算出することができる。本稿では、この点に関する筆者の試みを報告する。

なお、文中の術語は小久保清治(1960)に従った。化石種の鑑定と試料作製を援助された横田正浩氏(島根大学理学部地質学教室4年生)に感謝する。

### 試料および処理法

(1) 本稿で例示した試料には、隠岐・島後の中部中新統に胚胎する海成珪藻土中の珪藻を用いた。

(2) 走査顕微鏡用試料は次のように作製した。すなわち、常法による光学顕微鏡用プレパラート作製の中途段階より、珪藻濃縮液をとってカバーガラス上に滴下し、風乾後、イオンスパターによる金蒸着をほどこした。

(3) 走査顕微鏡は、日本電子KK.製のJSM-15型を使用した。

### 高さの計算式

傾斜角の異なる2枚の写真から高さを算出するには、次のように考えて計算式をつくることのできる(紀本・菅沼 1973)。いま、試料台上の任意の1点Pの、回転軸からの水平距離を $a$ とする。次に、これより $\theta$ の角度だけ傾斜させると、P点は横に移動して、同じく水平距離 $b$ の所にうつる。このとき、もとの $a$ の距離におけるP点の高さ( $H$ )は次の式で与えられる： $H=b/\sin\theta-a/\tan\theta$ 。もし $a>b$ ならば、 $H=a/\tan\theta-b/\sin\theta$ となる。

実技的には、同一視野の、傾斜角を異にする2枚の写真と比較するのであるから、回転軸は画面の上下方向であって変らない。従って、 $a$ と $b$ の長さは、それぞれの写真上で実測することができる。また $\theta$ の値は、試料室傾斜コントロールの読みから簡単にわかる。従って、これら3つの値から高さを算出することができる。

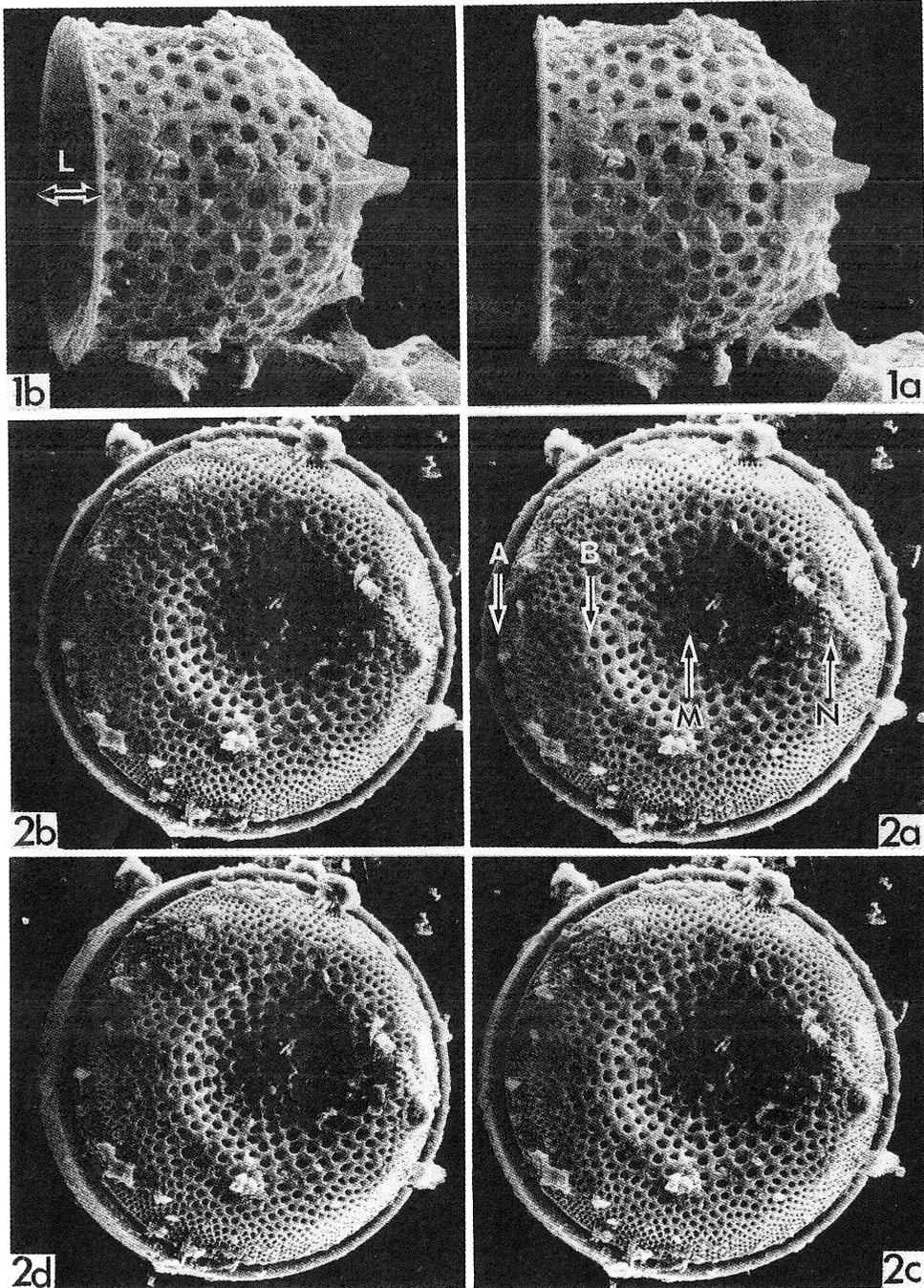
### 観 察 結 果

(1) *Stephanopyxis ferox* の蓋殻の直径(第1図)

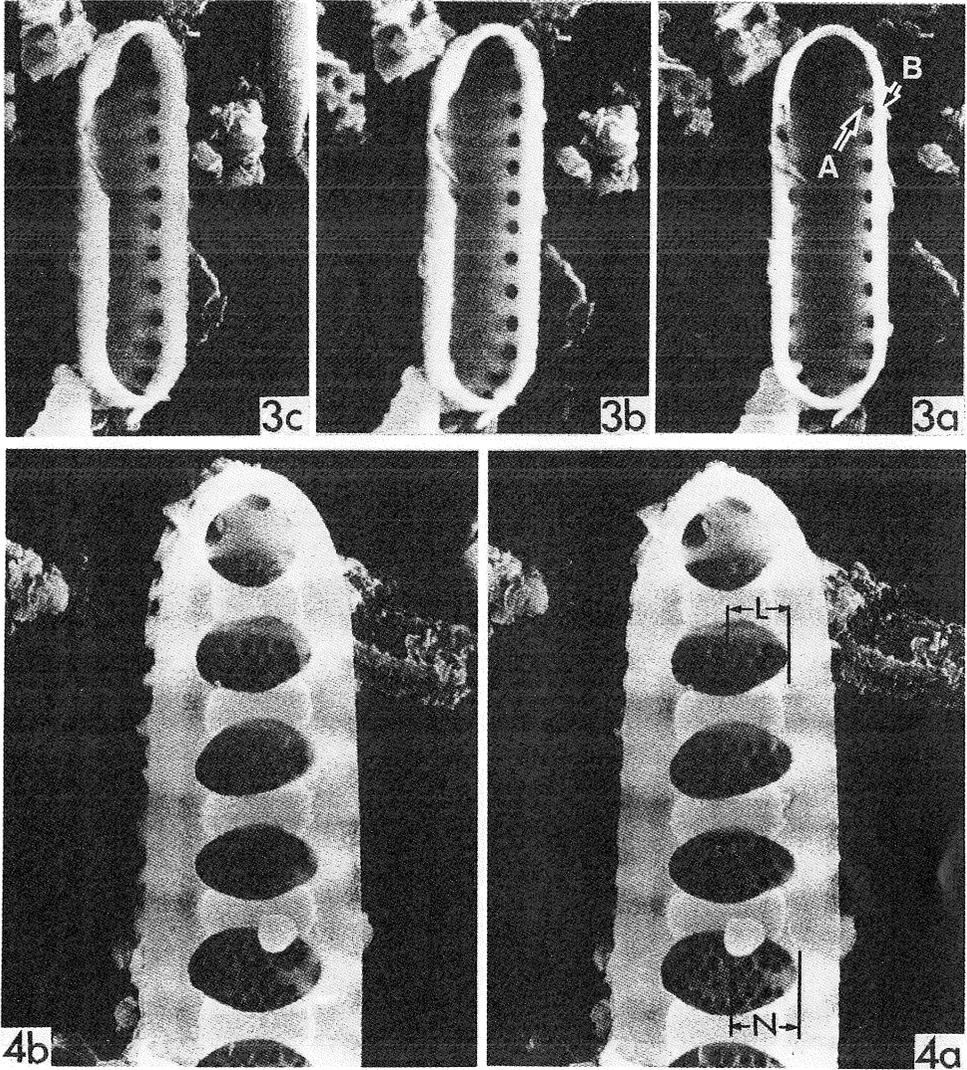
この場合は円の直径を測るのであるから、計算の必要もないが、もっとも簡明な例としてあげる。まず殻環面観の標本について、その接合面を回転軸(Y軸)方向にセットする(図1a)。次に $10^\circ$ 傾斜させたとき(図1b)、接合面は楕円形になるが、回転軸に直角方向の短径を $L$ とする。このとき、 $a=0$ 、 $\theta=10^\circ$ であり、 $b=L=8.6\text{ mm}$ であるので、前式による計算から、高さすなわち求める直径は $49.54\text{ mm}$ となる。写真(図1b)上での直径実測値は $49.4\text{ mm}$ であって、計算値との差は $0.14\text{ mm}$ 程度である。写真の倍率は2000倍であるから、この直径は約 $24\mu$ であることがわかる。

(2) *Actinocyclus ingens* の蓋殻表面のうねり(起伏)量(第2図)

図版 I



## 図版 II



## 図版 I. (前ページ)

第1図 *Stephanopyxis ferox* (GREV.) RALFS ×2000第2図 *Actinocyclus ingens* RATTRAY ×1000

## 図版 II.

第3図 *Thalassionema* cfr. *hirosakiensis* (KANAYA) SCHRADER ×5000第4図 *Denticulopsis lauta* (BAIL.) SIMONSEN ×5000

図示した4枚の写真は、図2aから順に、傾斜角が $0^\circ$ 、 $8^\circ$ 、 $10^\circ$ および $20^\circ$ となっている。本種は、円盤状にふくれ上った蓋殻の中央部に凹みをもつものであって、このうねりを量的に明らかにするため、表面上の2点について高さを計算した。いま図2aにおいて、殻環帯から上の蓋殻の厚さを測るために、A・Bの2点を設定する。また、中央の凹みの深さを知るために、M・Nの2点をえらんだ。直線ABとMNはいずれも回転軸に対してほぼ直角である。B点のA点面に対する比高、およびN点のM点面までの高さを、4枚の写真を使って計算した結果は次のとおりである（単位：mm）。

比較した写真	B点の高さ	N点の高さ
2aと2b	5.19	4.93
2aと2c	5.71	5.14
2aと2d	5.99	5.99
平均値	5.63	5.35

倍率は1000倍であるから、B点の高さは約 $5.6\mu$ 、N点の高さすなわち中央の凹みの深さは約 $5.3\mu$ であることがわかる。

#### (3) *Thalassionema* cfr. *hirosakiensis* の内面の深さ（第3図）

小型の羽状目では、被殻内面がしばしば観察できるので、その深さを知る手がかりを求めた。図3aはやや傾いているが、これを $0^\circ$ としたとき、図3bは $20^\circ$ 、図3cは $30^\circ$ に傾斜させてある。内面の底に見分けやすい物体がないので、深さを知る目安として、便宜的に小孔の下縁(A)をえらび、ここから殻環上縁(B)までの深さを計算した。その結果、図3aにおけるB点の高さとして、図3aと3bとの比較では $5.49\text{ mm}$ 、図3aと3cの間では $5.80\text{ mm}$ の値がえられた。平均値は $5.64\text{ mm}$ である。この場合はAB間の斜辺の長さが実際の深さとなるので、上記の平均値から計算すると $6.39\text{ mm}$ となる。倍率を考慮すれば、小孔下縁までの深さは約 $1.2\mu$ となる。

#### (4) *Denticulopsis lauta* の内面の深さ（第4図）

前出の例と同じく、小型羽状目について内面の深さを算出した。2枚の写真の傾斜角の差は $5^\circ$ である。底面に明瞭な点紋が多数みえるので、その中の1点をえらび、底面から穴の周縁部までの高さを知るために、図示した長さLを両図について実測した。その結果、高さの値として $19.87\text{ mm}$ がえられた。同様に、別の穴についてNの値から計算すると、 $19.89\text{ mm}$ となる。平均値は $19.88\text{ mm}$ となり、これを倍率5000倍で割ると、穴の周縁から底面までの深さは約 $3.9\mu$ であることがわかる。

### 議論および考察

(1) 走査顕微鏡下の計測にさいしては、拡大倍率の精度がまず考慮されなくてはならない。筆者は標準試料を使って倍率の検査を行ったが、機器の表示倍率どおりの値がえられること

は、むしろまれであることがわかった。これは、試料を試料台にセットするときの高さの微差に主として基因するものであって、この調整が思いのほか難しい。走査顕微鏡による計測においては、表示倍率が絶対的に正確なものではないことを念頭におくことが大切である。

(2) 計測誤差について留意すべきことは、測点のとり方である。すなわち、写角の異なる2枚の写真上で、両者に共通した1点を識別しなくてはならないのであるが、実際には立体的な物体上の1点である。そのため、角度によって画像に変化が生じたとき、同一の測点をとるのに難しいことがある。これは角度差が大きくなるほど難しくなる。従って、計測誤差が大きくなりやすい。その上、肉眼の分離能の限界も考慮しなくてはならないから、2点間の長さ(計算式の  $a$  と  $b$ ) を実測するさいには慎重さが必要である。

(3) 具体例について、若干の考察をのべておこう。

*Stephanopyxis ferox* (第1図) の場合は、殻環面観に近いものがあって、まず方位を調節して正対させた。次にその位置から傾斜させて、 $10^\circ$ 、 $17^\circ$ 、 $30^\circ$  の角度ごとに撮影した。図示したのはその中の2枚である。大型の円形のものを例にとったのは、計算値と実測値との比較が容易にできるからである。実際には4枚の写真について計算したが、実測値との誤差は0.2%程度であった。

次に *Actinocyclus ingens* についていえば、図 2a は貫殻軸が、画面に対して垂直の場合であって、以下、 $8^\circ$ 、 $10^\circ$ 、 $20^\circ$  と傾斜しているので、それぞれ左右の写真について立体視が可能である。1枚の写真だけでは、凹凸があることはわかっていても表面の起伏量の判断はできにくい。立体視によっておよその見当をつけることはできる。しかし、量的把握のためには計算しなくてはならない。ただし、4枚の写真をつうじて、共通して識別できる測点を、横軸上にえらぶことはあまり容易ではない。傾斜角によって測点のみえ方が変わるからでもある。さきにのべたように、本例の場合、計算値の間に20%もの違いがみられるのは、測点のとり方に基因すると思われる。従って、2枚の写真について1回の計算だけでは、かなり不正確な値しかえられない場合が生じる。

羽状目の珪藻については、内面の深さを知るために2種類をえらんだ。*Thalassionema* cfr. *hirosakiensis* の場合は、図 3b と 3c の立体視からもわかるように、内面の底は舟底型である。しかも、底面上に識別可能な測点が見当たらないので、このようなときには深さの値を算出することはできない。従って、およその目安をうるために、小孔下縁までの深さを計算したものである。もし底面に何か異物がのっていたならば、それを利用して底までの深さを算出できる。*Denticulopsis lauta* (第4図) は、底面にある多くの点紋が見わけやすいので、本例のような場合は計測が比較的容易である。しかし、1ヶ所だけで測るのではなく、同じ目的にそった別の測点についても計測して結果を比較してみた。

なお、傾斜角の大小と倍率との関係において、立体像のみえ方に違いが生じるが、この点については田中・永谷(1980)が実例をあげて比較している。

(4) 以上の4例から、計算値の精度について次のことが指摘できる。すなわち、比較する2枚の写真の角度差が大きくなるほど、計算誤差は小さくなる。たとえば、傾斜角に $10^\circ$ の差があるときには、長さ 0.2 mm の計測誤差は約 1.15 mm の高さの差になって現われる。しかし、角度差が $30^\circ$ ならば、高さは約 0.4 mm の差にすぎない。このことから、高さの計

算のためには、角度の開きをなるべく大きくした方が有利であることがわかる。しかしその反面、測点のとり方に難しさが生じるという不利はさげられない。

(5) 従って、1つの値を求めるさいにも、1回の計算だけで終わらせるのではなく、3枚以上の写真を比較しながら多面的な計算をし、検算することが望ましい。また、物体全体の計測値と、微小部分の計算値との比較検討も必要であろう。

(6) 走査顕微鏡のステレオ写真を利用した高さの微計測法については、桐谷(1981)が反射実体鏡による方法をのべている。しかし、実際的には、本稿でのべた計算法がもっとも簡明だと思われる。このようなステレオ写真の利用法は、化石観察においてももっと多くとり入れてよいものである。例示したような珪藻に限らず、有孔虫や花粉などの微化石についても、また化石の微細構造についても応用が期待される。微小形質の計測は、記載を深める上で欠くことのできないものであるだけでなく、生物体としての生理機構の解明にも必要不可欠である。

#### 引用文献

- 紀本静雄・菅沼忠男, 1973: 高さの計測法. 走査顕微鏡テキスト(日本電子 K.K.), 60-62.  
桐谷道雄, 1981: ステレオ観察の実際と効用. 電子顕微鏡, 16, 71-90.  
小久保清治, 1960: 浮游珪藻類. 恒星社厚生閣. 330頁.  
田中啓一・永谷 隆, 1980: 図説・走査電子顕微鏡, 176-181, 朝倉書店.