

# 光学顕微鏡使い方のヒントⅠ

小中学校の理科の時間、顕微鏡で覗いたミジンコやムラサキツユクサに感動を覚えたのは、筆者だけではないだろう。顕微鏡は、われわれにさまざまなミクロの世界を見せてくれる。しかしその一方で、正しい使い方をしなければ、見たい像が得られないことが多い。このコラムでは、今回と次回の2回にわたり、顕微鏡の各種観察法や基本的な取り扱い方を中心に解説する。

## 1. 倍率の定義

顕微鏡には対物レンズと接眼レンズがあり、それぞれに倍率が表示してある。総合倍率は、使用しているそれらのレンズの倍率の掛け算となる。たとえば対物レンズが40倍で接眼レンズが10倍ならば、総合倍率は400倍となる。対物レンズと接眼レンズの間に中間鏡筒が入ると、その中間鏡筒の倍率も積算される。また、テレビカメラで撮像してモニターで観察する場合は、撮像素子とモニターの対角長の比がさらに掛かることになる。ところで、接眼レンズの倍率は、肉眼で25 cm離れた所に置いた標本を見た場合との見かけの大きさの比で定義されている。

## 2. どこまで細かく見えるのか

顕微鏡でどこまで細かく見えるのかは、倍率で決まるのではなく、対物レンズの開口数 (numerical aperture: NA) で決まる。開口数は、対物レンズに必ず表記してある。たとえば「100×/0.95」とあれば、その対物レンズは倍率が100倍で、開口数が0.95である。肉眼観察における顕微鏡の2点分解能 $\delta$ は、次のレイリーの式で表されることが多い (他の定義式を用いる場合もある)。

$$\delta = 0.61 \lambda / \text{NA} \quad (\text{ここで、}\lambda \text{ は使用する波長})$$

NAは、乾燥対物 (対物先端にオイルや水を付けないタイプ) で1未満であり、液浸対物 (対物先端にオイルや水を付けるタイプ) でも1.4以下が普通である。可視光 ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ) で  $\text{NA} = 1.4$  の場合、 $\delta = 240 \text{ nm}$  である。

## 3. よく使われる観察法

### 1) 明視野

照明光と対物レンズの光軸を一致させる観察法。生物顕微鏡では標本の強度透過率分布、金属顕微鏡では標本の強度反射率分布が像となる。最も一般的に使われる方法。

### 2) 暗視野

照明光の光軸を対物レンズの光軸からまったく外して、標本による散乱光のみを見る方法。一様な媒質中の不純物やゴミなどを高感度で検出できる。たとえば半導体の欠陥検査によく用いられる。解像は明視野に比較してやや劣るが、分解能以下の細かいものでも散乱があれば検出できる。

### 3) 蛍光

蛍光を発する標本を観察する方法。蛍光より少し波長の短い照明光で標本を照明し、発生した蛍光のみで像を作る。あらかじめ、標本内の見たい要素を蛍光色素で染色することが多い。たとえば特定の遺伝子を観察するために用いられる。解像は明視野と同程度であるが、蛍光を検出できれば1分子 (数 nm) でも観察することができる。

### 4) 位相差

位相差専用の対物レンズとコンデンサーレンズを用いる。標本の屈折率や高さの境界にコントラストがついて見える。たとえば細胞内の微細構造を見るのによく用いられる。ただし、コントラストの高い標本だと、ハローと呼ばれる光のにじみが生じる。

### 5) 偏光

偏光用の対物レンズとコンデンサーレンズ、それに2枚の偏光板 (ポラライザー、アナライザー) を用いる。結晶や繊維を感度よく見ることができ。コンペンセーターを用いて、繊維の太さを測定することもできる。

### 6) 微分干渉

偏光顕微鏡の構成に加え、ノマルスキープリズムを用いる。標本の屈折率や高さの微分を見ることができ。たとえば細胞の形を見るのによく用いられる。解像は、明視野と同程度である。

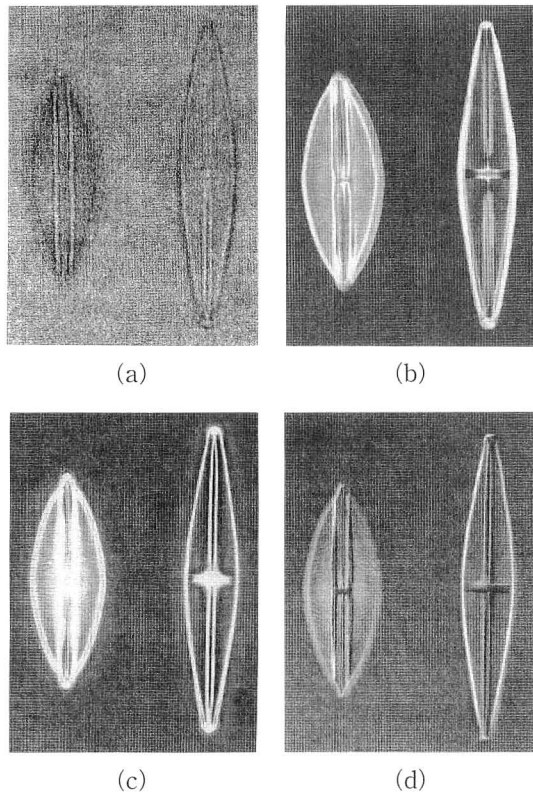


図1 (a) 明視野, (b) 暗視野, (c) 位相差, (d) 微分干渉.

#### 4. 物を見たい

##### 1) 透過物体を見たい

ミジンコやムラサキツユクサなど光を透過する標本には、生物顕微鏡を明視野で用いる。標本に色が着いていれば、そのまま見ることができる。標本をあらかじめ染色することもある。

##### 2) 透明物体を見たい

生物組織薄片などほぼ透明な標本の場合は、明視野で見るとはほとんどできない。位相差や微分干渉を用いると、標本の屈折率や厚さの分布を見ることができる。単純に標本の検出のみなら、暗視野が一番感度が高い。

##### 3) 不透明物体を見たい

IC 標本など不透明な標本には、金属顕微鏡を明

視野で用いる。標本の表面を色の違いで見ることができる。

##### 4) 金属表面の凹凸、きずを見たい

表面の反射率が一樣な標本の凹凸やきずを明視野で見るとはほとんどできない。きずの有無を見るなら、暗視野が最も検出感度が高い。きずの形状や標本の凹凸を見るなら、微分干渉を用いるとそれがレリーフとなってよく見える。

##### 5) 立体構造を見たい

実体顕微鏡で見ると、標本の立体構造がよくわかる。小さな虫や、機械式腕時計を見ると面白い。

##### 6) 寸法を正確に測りたい

ある程度小さいものは、マイクロ接眼（視野内に目盛りのついた接眼レンズ）を用いると簡単に測れる。あらかじめ寸法のよくわかった標本（たとえば対物マイクロと呼ばれる目盛りのついたスライドガラス）で、そのマイクロ接眼の目盛りを校正して用いる。

ある程度大きいものを正確に測る場合には、測定顕微鏡を用いるのがよい。クロス接眼（視野内に十字線の入った接眼レンズ）の中心に測定する基準点をもってくるようにステージを移動させ、ステージに装備されたりニアースケールで移動量を読み取る。

#### 5. 作例写真

ここに、珪藻標本の明視野、暗視野、位相差、微分干渉像の例を示す（図1）。珪藻は無色透明なため、明視野ではほとんどコントラストがつかない。暗視野は最もコントラストが高いが、細かい構造が見えにくい。位相差は、一部にハローが生じ、コントラストがつぶれている。微分干渉は、全体的にコントラストこそ低いものの、標本の形状をよく表している。このように、同じ標本でも見る目的によって観察法を使い分ける必要がある。

今回は、実際に顕微鏡を用いるときの注意点を中心に解説する。この記事に関してのご意見は、itoh@bk.tsukuba.ac.jp あるいは、optics@kobe-u.ac.jp までお寄せください。