

マッピング像やイメージング像から得られる画像データは、解析がとて重要であり、データ処理の仕方によっては全く異なる結果や解釈を得ることがあります。そこで、本年のミニファイルでは、マッピング像やイメージング像の取得できる顕微鏡とその画像データ処理について、計12テーマを取り上げ、測定原理からアプリケーション事例まで紹介して参ります。〔ぶんせき編集委員会〕

## 光学顕微鏡

### 1 はじめに

光学顕微鏡は、手軽な形態観察の手段として有効であり、また、撮影装置や画像処理装置を組合わせたイメージングシステムを構築することもできて、応用分野は幅広い。観察法の基本的な原理と特徴を理解していれば、化学分析の補助としても有効な機器である。本稿では、光学顕微鏡で何がどう観察できるかを紹介し、顕微鏡理解へのお手伝いとする。

### 2 構成と原理

#### 2.1 顕微鏡の構成

試料を透過光で観察するか、反射光で観察するかで大きく生物顕微鏡、金属顕微鏡とに呼び分けるが、基本的には、照明装置（透過照明装置や落射投光管）、コンデンサー、ステージ、焦準機構、対物レンズ、中間鏡筒、観察鏡筒、接眼レンズ（撮影レンズ）で構成されている。最も基本的な構成による「明視野観察」のほか、「暗視野観察」、「微分干渉観察」、「蛍光観察」（以上、生物顕微鏡、金属顕微鏡で可能）、「位相差観察」、（生物顕微鏡のみ）などのコントラスト観察法がある。コントラスト観察法は、専用の装置（コンデンサー、フィルター、対物レンズ、プリズム素子）を組み合わせることで可能となる。試料をスライドガラス、カバーガラスで封入・保持する場合や平板状の試料の観察には正立型顕微鏡が、ディッシュなどの容器で保持する試料や厚みある試料の観察には倒立型顕微鏡が使いやすい。

#### 2.2 顕微鏡の原理

顕微鏡は倍率・分解能・コントラストの三つの機能で成り立っている。

〈倍率〉：見やすい大きさで見るための機能。総合倍率は対物レンズ倍率×接眼レンズ（撮影レンズ）倍率で決まる。目視での総合倍率の最大値は、生物顕微鏡で1000倍～1500倍、金属顕微鏡で1500倍～2250倍である。対物レンズが主にその役割を担う。

〈分解能〉：精細に解像して見る機能。対物レンズの開口

数（NA）と光の波長で決まる。分解能  $\delta = 0.61 \times \text{波長} \lambda / \text{開口数 NA}$  の関係がある。波長を固定すれば、開口数が多いほど高分解能（高解像）にできるが、開口数には上限値（通常1.40）があるため、0.2  $\mu\text{m}$  程度が限界である。

〈コントラスト〉：見やすくはつきりと見る機能。広くは検出能とも言う。明視野観察では分解能とコントラストの両方が開口絞り（コンデンサーや落射投光管に内蔵）の影響を受ける。たとえば、開口絞り全開では分解能は良いがコントラストは劣化する（試料によっては、分解能が悪くなるように見えるものがあるが、これはコントラストが悪くなることで起こる現象）。一方、コントラスト観察法では、光の散乱・回折・干渉や蛍光発光を利用して、見たい（見つけたい）対象を高コントラストで観察・検出ができる。位相差、微分干渉、偏光は、光の干渉を利用している。光を干渉させる方法はそれぞれ異なるが、試料で生ずる光の位相差で数 nm 程度あれば、位相差では無色透明試料の形態を、微分干渉では無色透明試料の位相勾配を、偏光では光学的異方性のある部位を、明暗や色のコントラストで観察することができる。暗視野は、試料で生ずる回折光、散乱光のみを観察する。ノイズ光が少ないほど観察視野が暗くなり検出感度が高くなるので、数 nm の微粒子や段差を検出できる。蛍光観察は試料の発する蛍光で観察する方法で検出感度が高い（別途本シリーズで改めて紹介する）。

### 3 特徴と長所、短所

観察法の特徴、長所、短所を表1に示す。

〈注意すべき点〉

①標本と使用する対物レンズのカバーガラス厚条件（対物レンズに表示されている）が合っていること。これが合わないと球面収差の影響で像は劣化する。

②透過照明での観察では、試料と媒質の屈折率差が小さいほうが見えやすいことがある。たとえば、透明な微粒子、微細繊維の観察では、空气中に置いて見るよりも、試料が溶けない適当な封入材を使ってカバーガラスをかけた標本にするほうが見やすくなる。顕微鏡に付属しているイメージングオイルを使うこともできる。

### 4 観察法を選択するときの観点

基本的に、透明媒質中の試料の観察は生物顕微鏡で、不透明基板や基板中の試料の観察は金属顕微鏡が適しており、さらにその試料から何を観察したいかで、適する観察法を選択する。

表1 各種観察法の特徴  
(生：生物顕微鏡，金：金属顕微鏡を示す)

観察法	特徴	長所	短所
明視野	主に染色試料観察用(試料にコントラストをつける) 明視野照明により、 生：透過率の違い(色) 金：反射率の違いで形態を観察できる。	開口絞りによって分解能とコントラストのバランスを調整できる。 試料と封入材とに屈折率差があれば、開口絞りを最小にして無染色試料の形を観察できる。	分解能以下のもは見分けられない。 無色透明な物体や反射率が均一の試料は観察困難。
暗視野	暗視野照明により、 生：透明体中の微粒子 金：基板上の微粒子、段差、きずなどを観察・検出できる。	検出感度が高く、数nmの微粒子や微細な段差を検出できる。	コンタミがノイズの原因となって、検出感度が悪化する。
位相差	無染色試料観察用 生：透明媒質中、または透明媒質上の透明体を明暗コントラストで観察できる。 ポジティブ(ダーク)コントラスト、ネガティブ(ブライト)コントラストの2種類がある。	感度が高く、微細構造が高コントラストで観察できる。 微分干渉でコントラストの付き難い薄い試料でも観察できる。 プラスチック容器で観察可。 蛍光観察と併用可。	厚い(数十μm以上)試料では、強いハローで分解能が損なわれる。 微分干渉より若干分解能が劣る。 ピント面以外のコンタミはリング状のボケ像になる。
微分干渉	無染色試料観察用 生：透明媒質中、または透明媒質上の透明体 金：基板上的段差、きず、透明体などを立体感のある像で観察できる。	分解能が高い。位相差が苦手な厚い試料が高コントラストで観察できる。 コントラストの微調整が可能。 蛍光観察と併用可。	試料の立体構造とコントラストは対応しないことがある。 プラスチック容器での観察不可。 コントラストに方向性がある。
偏光	光学的異方性の検出・観察用 生：結晶、液晶、有機物 金：セラミックス、金属の組成、表面状態などを明暗や色のコントラストで観察できる。	感度が高く、数nmのリターデーション(複屈折で生ずる光の位相差)を検出できる。	対物、コンデンサーに歪みがあると検出力は低下する。

表2に試料の特性と観察法との適合性を示す。

### 5 観察事例

「透明媒質中の透明な試料」として、生物顕微鏡でのコントラストの比較例を図1に示す(試料は、無染色

表2 試料の特性と観察法の適合性

		明視野	暗視野	位相差	微分干渉	蛍光	偏光
形の観察	コントラストがある試料	◎	△	○	○	△	△
	無染色、無色透明の試料	△	○	◎	◎	○	○
分解能以下の微粒子、微細繊維の検出、計数		×	◎	×	×	○	×
蛍光標識、自家蛍光による観察		×	×	×	×	◎	×
光学的異方性の観察		×	×	×	×	×	◎

◎：最適，○：適，△：可，×：不適

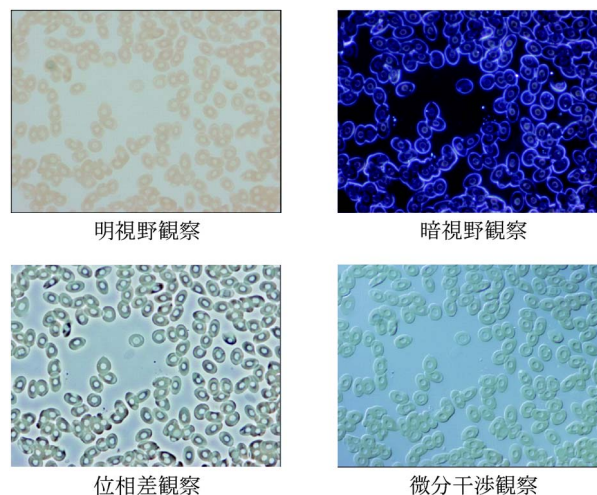


図1 観察法によるコントラストの違い

のカエルの血球)。

- 明視野観察：血球の色素でかろうじて形態が見えている。
- 暗視野観察：暗い視野の中に、血球によって回折、散乱した光で形態が見えている。
- 位相差観察：ポジティブ(ダーク)コントラスト像。形態が明暗コントラストで見えている。
- 微分干渉観察：立体感のある像で見えている。コントラストの付き方に方向性(左上-右下方向)のある様子が見える。

### 6 おわりに

光学顕微鏡のほんの触り部分の紹介である。参考文献もぜひ参照して欲しい。

#### 参考文献

- 1) 野島 博編：“改訂第3版 顕微鏡の使い方ノート”，(2011)，(羊土社)。
- 2) 稲澤譲治，津田 均，小島清嗣監修：“顕微鏡フル活用術イラストレイテッド”，(2000)，(学研メディカル秀潤社)。
- 3) 宝谷紘一，木下 一編：“限界を超える生物顕微鏡”，(1991)，(学会出版センター)。
- 4) Olympus America Inc. <http://www.olympusmicro.com/> (2012年9月8日最終確認)

[オリンパス株式会社 田中隆明]