

高校生のための光学顕微鏡講座

光学顕微鏡と生命科学の接点は、レーヴェンフック(1632-1723)やロバート・フック(1635-1703)らが、実用的な光学顕微鏡を開発して使っていた17世紀後半までさかのぼることができます。その後、300年以上も経過していますが、その中で技術的に大きく発展した重要な時期を3つあげることができます。

1つ目は19世紀後半です。物理学者のアッペ(1873)やレーリー(1874)が光学の理論が確立し¹⁾、レンズを設計したり製作したりする上で、重要な指針を与えてくれました。2つ目は20世紀半、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡などといった生体試料を染色せずに観察できる観察法が発明された時期です。当時、すでに電子線を使った電子顕微鏡は実用化されつつあったので、細かな構造が高い解像度で観察できるという点では光学顕微鏡は電子顕微鏡にはとても太刀打ちできませんでした。しかし、化学的な固定や染色剤で染めるといった処理が必要なく、生きたままの試料を直接観察できるようになったのは大きな革新でした。3つ目は、この20年ほどの間に著しく改良が進んだ蛍光顕微鏡や共焦点蛍光顕微鏡などの最新技術です。探している特定の物質に蛍光標識して観察できるようになりました。現在の生物学分野では不可欠の技術となっています。このような生物学の分野での顕微鏡技術の発展の歴史を振りかえる形で、光学顕微鏡の基礎的な原理から、最新の技術までを解説してゆきたいと思います。

§ 光学顕微鏡の分解能

光学顕微鏡で使う光は可視光線と言います。電磁波と呼ばれる波の一種ですが、水面を伝わる波と同じように、波の山と山との間の距離、波長、を使ってその種類を区別します。波長で言えば0.36~0.83ミクロンほどの長さを持ったものです。これより短い波長のもの(紫外線)や長いもの(赤外線)はひとの目には見えないので、顕微鏡には使えない光です。可視光線は、ち

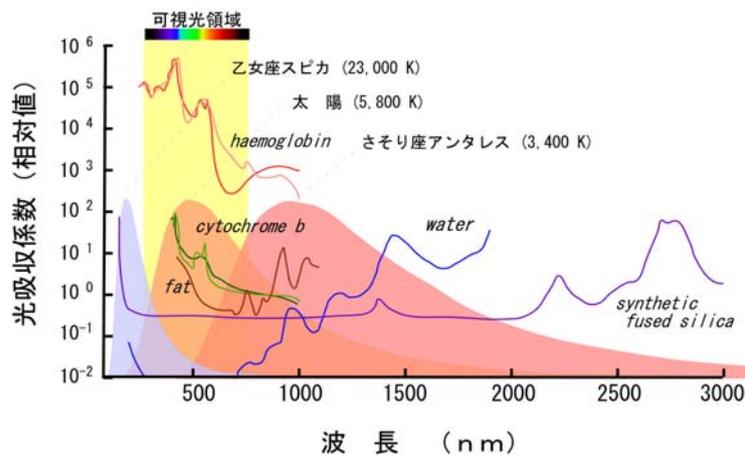


図1. 生体の物質、水、ガラスの光吸収と光の波長の関係³⁾。縦軸は吸収量を相対値で示しています。横軸は波長をナノメートル(ミクロンの1000分の1)の単位で表示しています。Cytochrome b(チトクロームb)、fat(脂肪)、water(水)は、可視光線の吸収は小さく、haemoglobin(ヘモグロビン)色素のため多少吸収します。Synthetic fused silica(合成ガラス)は、それらよりずっと吸収が少なく透明に見えます。恒星の温度は絶対温度(K)で示してあります。星の温度が高いほど、青く見えますが、これは光の波長の分布が左側に片寄るためです。

よほど太陽光に最も多く含まれる波長の光で、ひとの目は、その波長の光が見えるように進化して来たのだと考えることもできます。窓ガラスなどの素材は、この可視光線をほとんど吸収せず、透過します（図1）。そのため透明に見え、顕微鏡の大事な部品となる光学レンズの素材としても使用できるのです。私たちの体の主成分は水やタンパク質ですが、こういった物質も幸い可視光線はほとんど吸収しません。そのため可視光線を使うと生物の細胞や組織の内部まで透き通って観察できるという利点があるのです。これらのいくつかの幸運が重なって、光学顕微鏡は、私たちにとってなかなか使い勝手のよい便利な道具となっています。太陽系で生物を研究できるというのは、なかなか人類は運が良いのかも知れません。

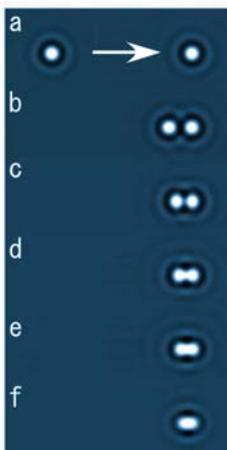


図2. 小さな点は光学顕微鏡で観察するとある広がりをもったパターン(a~f)となります。2点が接近すると区別できなくなります(e~f)。この像は顕微鏡写真ではなく、コンピュータを使って理論的に予測した像です。

顕微鏡の性能を決める要因はたくさんありますが、その中でもっとも重要なものは分解能です。分解能とは、ある接近した2つの点が、それ以上近づくと、拡大像の上で区別できなくなる限界の距離である定義されています（図2）。解像度と呼ばれることもあります。その限界となる距離（ d ）はどのようなか、いろいろな研究者が複雑な理論的考察を行ってきました。その結果、下のような式で表現できることがわかっています。

$$d = \kappa \cdot \frac{\lambda}{N.A._{obj}}$$

λ （ラムダ）は光の波長です。 κ （カッパ）は、一種の比例係数です。少し複雑なので後で解説します。 $N.A._{obj}$ は非常に重要な数字です。これは対物レンズの開口数と呼ばれるもので、

$$N.A._{obj} = n \cdot \sin \theta_{obj}$$

の式で計算します。 θ_{obj} は、今、皆さんがミクロンサイズになって観察される側の試料になったと想像してください。目の前にあるのは大きな対物レンズで、多分、そこを通して皆さんを眺めている観察者の眼などが見えるかも知れません。この対物レンズの窓の広がりを示す角度が θ_{obj} です。 n は皆さんのまわりの物質の屈折率で、光のスピードがどれだけ遅くなったかを示す数値です。空気なら1.0程度、ガラスなら1.5程度です⁴⁾。数学で習う三角関数、 $\sin \theta_{obj}$ は、 θ_{obj} の角度を持つ直角三角形の斜辺と他の一辺の比ですが、

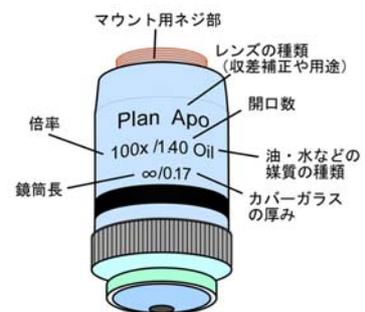


図3. 一般的な対物レンズ側面の表示

これは1よりは決して大きな値にはなりませんね。つまり、上の式から $N.A._{obj}$ はどんなに大きくても最大 n の値にしかならないことがわかります。

現在、 $N.A._{obj}$ は最大 1.4~1.7 の対物レンズが市販されています。図3のように、対物レンズの側面には倍率や鏡筒の長さ（接眼レンズと対物レンズの間の距離）と並んで $N.A._{obj}$ が必ず表記されていなければなりません。これが分解能を決める重要な数値だからです。

さて、対物レンズの反対側にはコンデンサレンズというものがあって、そこから出てくる光で観察試料は照明されています。さきほど、小さくなった皆さんが対物レンズを眺めたのと同じように、反対側の足もとを見ると、そこに見えるコンデンサレンズでも、同じように広がり程度を示す開口数 ($N.A._{con}$) を決めることができます⁵⁾。この2つの開口数の比、 $R = N.A._{con} / N.A._{obj}$ も、像の分解能を決める大切な数値です。前の分解能の式の中に出てきた κ (カッパ) と R との関係が図4のようにになっていることがわかったからです。この関係は、ホプキンス(1950)⁶⁾ によって計算されました。アッペやレーリーの示した理論もすべて網羅したもので⁷⁾、実際に私たちが使用する光学顕微鏡の分解能をよく表現していると言われています。この式から、分解能を改善するには、

- i) 波長を短くする
- ii) κ はを小さくする
- iii) $N.A._{obj}$ を大きくする

の3つの選択肢しかないことがわかります。限界は、0.2 ミクロンほどで、これよりも接近した2つの点は、光学顕微鏡を使って判別することは不可能です。見えるか見えないか？どこの位置にあるか？と言ったこととは別の問題なので、混乱しないようにして下さい。分解能は2つの点が区別できるかどうかということに限った場合の話ですが、像の鮮明さに一番大きく影響する大切な数値です。

上の開口数の比、 R は、観察像の明暗の差となるコントラストにも大きな影響を与えることがわかっています。通常の見視野照明で観察する場合、経験的に $R=0.8$ 程度がもっとも自然な印象のコントラストを与え、肉眼での観察や写真撮影にはこの条件が観察するのが最適です。 $N.A._{con}$ を大きくする ($R>1.0$ 、コンデンサ絞りを大きく開放する) と観察像はコントラストが低下してピンボケのような像となります。逆に、 $N.A._{con}$ を小さくする ($R<0.3$ 、コンデンサ絞りを小さく絞る) と不自然に強調されたコントラストの像となります。これは光学顕微鏡を使う時によく経験することかと思えます。また、焦点の合う部分の厚み（物体深度）は

$$\text{物体深度} = \frac{\lambda \sqrt{n^2 - (N.A._{obj})^2}}{(N.A._{obj})^2}$$

の式で決まります。さらに、観察試料と対物レンズ面までの距離（作動距離）や観察像の明るさも

$$\text{作動距離} \propto \frac{\sqrt{n^2 - (N.A._{obj})^2}}{N.A._{obj}}, \quad \text{観察像の明るさ} \propto \frac{N.A._{obj}^2}{\text{倍率}^2}$$

のように、 $N.A._{obj}$ と切っても切れない深い関係にあります。 $N.A._{obj}$ は光学顕微鏡のいろいろな性能を決定する重要な値です。

§ 位相差顕微鏡

位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡は、生体試料を観察する目的で使われます。特にゼルニケ⁸⁾により発明された位相差顕微鏡は、簡単なレンズの構成で実現できるので、一般にひろく使われています。観察試料と背景との間にある屈折率の差（光のスピードの差を生みます）を明暗の差として変換して観察することができます。

そのしくみを図5に示してあります。位相差顕微鏡の特長はその照明光です。コンデンサレンズのすぐ下にあるリング状の絞りを通った光だけを使います。また、この光が対物レンズの中のある決まった場所を通るように設計されていて、そこに位相板と呼ばれる特殊なフィルターが置かれています。対物レンズの倍率が変わるとこの位相板の大きさも変わります。リング絞りのサイズも合わせて変えなければなりません。もちろん、2つの光軸が一致していなければならないので、位相差顕微鏡ではその調節のためのツマミなどが附属しています。リング絞りは、コンデンサレンズに附属しているターレットと呼ばれる円板をまわして変えられるようになっているのが一般的です。

観察像の明暗コントラストを生み出す上で重要な原理は、観察する資料を通過した光（図5の回折光）

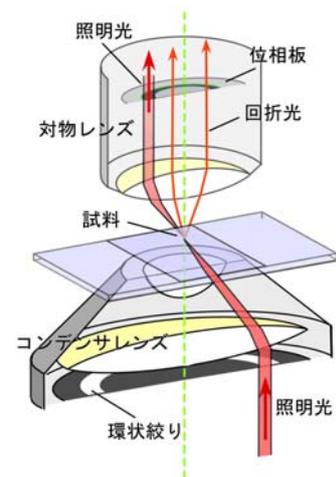


図5. 位相差顕微鏡の構成。リング上の絞りのついたコンデンサレンズと位相板のついた対物レンズを必ず組にして使用します。位相板の中のある決まった場所（灰色のリングで示す）を照明する光が通過するように調整して使わなければなりません。



図6. 位相差顕微鏡（ブライトコントラスト）で観察したゾウリムシ。

は 1/4 波長分だけスピードダウンして遅れたと見なせる点です。これを位相差といいます。これは数学的な一種の近似計算ですが、そう厚みの厚くない観察試料では、多くの場合正しい計算となります。そこで、背景の何も試料に当たっていない光を 1/4 波長すすめたり、逆に、遅らせたりといったことをします。これが位相板の役割です。この光が最終的に観察像の上で試料を通過してきた光と重ね合わさりますが、そのとき、1/2 波長分の差となって山と谷が一致する場合には観察像の上では互いに打ち消し合い(暗く観察される)ます。山と山が重なると強め合い(明るく観察される)ます。それぞれ、ダークコントラスト像(図6)、ブライトコントラスト像と呼ばれますが、対物レンズの中の位相板の種類で、この違いが出ます。光吸収の少ない生体試料でも、明暗の差をつけて明瞭に見える特長があります。小さな細胞内構造や厚みのない細胞の観察などに最適です。

観察試料を通過する光(回折光)の通り道、あるいは、試料の厚み・屈折率・周期構造のあるなしによっても実際は微妙に変わります⁹⁾。上の近似計算が必ずしもいつも正しくはありません。また、位相板の決まった場所を期待通りに通過しない光もあります。つまり、位相差顕微鏡の計算ミスが時々発生します。サイズの大きな構造物(細胞体や核)や屈折率が極端に異なる物では、そこにはないはずの縁取りの縞模様が見えたり、白黒が反転したりするなどの問題が生じます。位相差顕微鏡を使う上での注意事項です。見えているからといって、そこにもものがあるとは限りません。

§ 微分干渉顕微鏡

位相差顕微鏡と並んで、微分干渉顕微鏡も生きた細胞などの観察に使用されています。観察試料の中で、ある決まった方向へ、わずかな距離(分解能以下)離れた2点間の屈折率の差を、白黒のコントラストの差として観察できるようになっています。ちょっと複雑ですが。

図7に原理を示します。光は波の一種で、その振動の方向は水面の波と同じです。進む方向に対して垂直です。ある垂直な平面の中だけで振動します。普通の光はいろんな方向に振動する光がミックスされたものですが、1平面のものだけをフィルターで取りだしたものを偏光と呼びます。そのようなフィルターを偏光板と呼びます。微分干渉顕微鏡はこの偏光を使います。

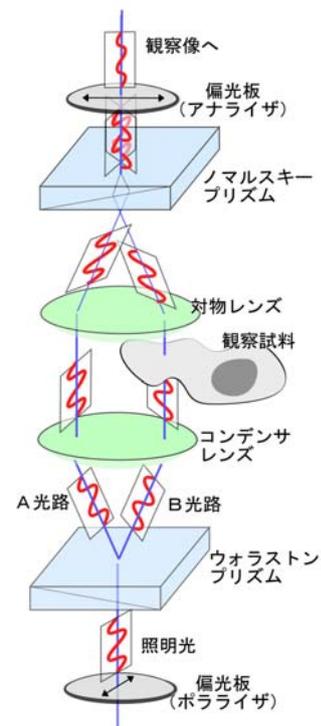


図7. 微分干渉顕微鏡のしくみ。ウォラストンプリズムに偏光を通すことで、A Bの異なる道筋を通る互いに直交する2種類の光に分けることができます。

光源からの光をまず、偏光板（ポラライザ）を通して偏光にします、次にウォラストンプリズムと呼ばれる特殊な光学素子を通して。この素子は、ある決まった振動面の光を、2つの直交する光に分けます。しかも、それらが横方向へわずかにずれた偏光であるのが特長です（図7のA、B光路）。この調整はなかなか微妙で、もちろん光源の光も決まった方向への偏光となっていなければなりません。プリズムの置く角度も重要です。

図では、2つに分けた光の片方、B光路だけが観察する試料の中を通過するような場合を示してあります。この場合、B光路の光は、試料の厚みと屈折率の分だけ進行が遅れた（位相が遅れた）光となります。あとは、位相差顕微鏡と似ていて、この位相差を白黒コントラストへと変換すると、像が見えて来ます。この操作は、対物レンズの後のノマルスキープリズム¹⁰⁾によって行われます。ノマルスキープリズムは発明者の名前が付いたものですが、実際のしくみはウォラストンプリズムと同じです。2つの光路の光を再合体させて重ね合うようにします。背景の照明光が邪魔なので、アナライザと呼ばれる偏光板で取り除くと、AとB、2つの光の間で強め合ったり、弱め合ったりする様子が、観察像の上で見えて来ます。

AB2つの光路の横方向のずれは、光学顕微鏡の分解能よりも小さくなるように設計されていて、どの2点間もほとんどわかりません。ごく近距離の間の屈折率の差となります。数学的にはこれは「微分値」と同じようなものなので、「微分干渉顕微鏡」と呼ばれるようになりました。「干渉」は、2種類の光が重なって強め合ったり弱め合ったりする現象のことを指します。微分干渉顕微で観察すると全体が灰色で一見コントラストの低いピンボケのように見えますが、デジタルカメラで撮影した後、コントラストを強める処理を行うと、格段に像が改善されます（図8、9）。0.03ミクロンの細い繊維（微小管など）や直径0.05ミクロンの細胞内小胞など、極めて小さな構造物も観察できます¹¹⁾。これは分解能ではなく、あくまで「検出能力」という意味の「見える」なので、間違わないでください。

設計上、コンデンサレンズ、対物レンズ、両方とも最大限 $N.A._{con}$ と $N.A._{obj}$ を大きくして使用できます。つまり、光学顕

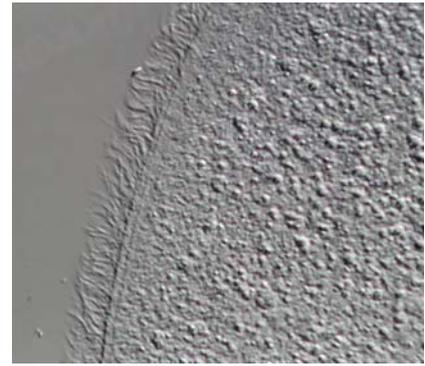


図8. 微分干渉顕微鏡で観察したオパリーナの繊毛。左下側に向かって影が付いてみえます。この陰影のおかげで、細かな細胞内の顆粒がよく見えます。

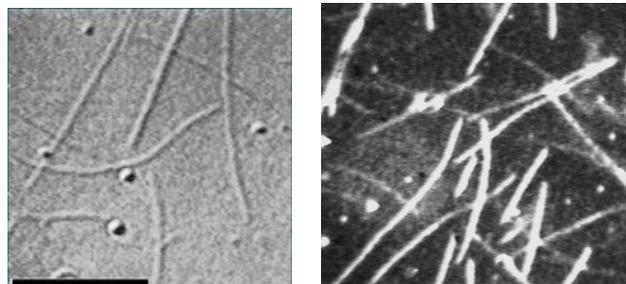


図9. 微小管は細胞の中にある直径約0.03ミクロンの繊維です。左は、微分干渉顕微鏡で観察したもので、右が暗視野照明法で観察したものです。黒い棒は、10ミクロンの長さを示します。

微鏡の分解能の限界まで解像度を上げることができます。また、普通の明視野照明や位相差顕微鏡に比べると光学的な切片効果¹²⁾も非常に優れているという特長があります。光源の光を100%使うのではなく、一部を偏光として使うので、観察像が暗い点、また、観察するものに一方方向へ影が付いて見える（図のAB光路のずれの方向へ）がある点が欠点です。繊維状のものなどは、方向によって見え方が大きく異なります。見えているからといって、その形のままであるとは限りません。

§ 暗視野（照明）顕微鏡

暗視野顕微鏡は、観察する試料によって散乱したり回折したりする光だけを観察する方法です。図10に示したような、コンデンサレンズを使います。この光学系は、位相差顕微鏡によく似ていますが、対物レンズは、以下に回折する開口数の問題さえなければ、どのようなタイプのもので構いません。位相差顕微鏡と異なっている点は、照明する光が直接対物レンズの内部へは入射しないようにしてある点です。大きな開き角（ $N.A._{con}$ ）の光だけで試料を照明するようになっています。経験的に $N.A._{con} > 1.0 \sim 1.2 \times N.A._{obj}$ の条件を選ぶと、明暗のコントラストのはっきりした像となることがわかっています。

$N.A._{obj}$ が 0.05～0.5 程度の対物レンズを使用する場合には、コンデンサレンズのすぐ下側（開口絞りのある位置）に、直径 10 数 mm の黒い紙（遮光板）を置くだけで暗視野照明を自作できる。 $N.A._{obj}$ の大きな対物レンズ（倍率 40 倍以上の対物レンズなど）の場合には、より大きな $N.A._{con}$ が必要となるので、特殊な反射凹面鏡を付けた専用のコンデンサレンズを使用しなければなりません。さらに、 $N.A._{obj}$ が大きな場合で、1.2 以上の対物レンズ（倍率 100 倍の対物レンズなど）では、 $N.A._{con} > 1.0 \sim 1.2 \times N.A._{obj}$ の条件を満たすようなコンデンサはなく、光学系として設計もできない（作れない）ので、暗視野顕微鏡とすることは残念ながらできません。やむなく、対物レンズの開口数を小さくして（可変のものがあるので）、 $N.A._{obj}$ を 0.7～0.9 程度にして使用します。この時の問題は、すでに前に解説しましたが、分解能が低下する点です（図4、および、ホプキンスの式を参照してください）。

暗視野顕微鏡では、背景が暗く、ものが白く光って見えます。コントラストの高い観察像となるものの、像全体の明るさはあまり強くできません。水銀灯などの非常に明るい光源や臨界照明法¹³⁾を用いることで像を明るくすることもできますが、写真撮影の場合には感度の高いフィルムやカメラを使わないと難しいのは事実です。微小管や細胞内の顆粒など非常に小さな構造物も高いコントラストで観察できる点が大きな特徴です（図9）。

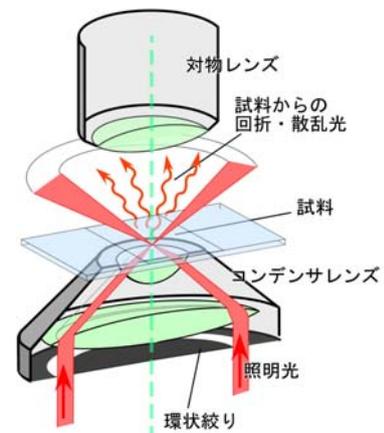


図10. 暗視野顕微鏡の光学系

暗視野顕微鏡で観察される光は、主にミー散乱と呼ばれるものである。空の雲が白く光って見えるのと同じ現象です（空が青く見えるのはレイリー散乱と呼ばれる現象）。ミー散乱は、観察する試料の大きさが、光の波長と同程度の場合に起こるもので、試料の内側の光の反射や屈折によって説明することができます。波長によってあまり散乱の強さが大きく変わることはありませんが、試料サイズに非常

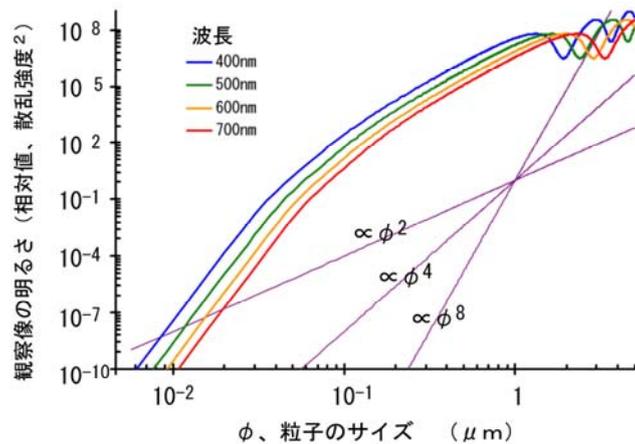


図 1 1. ミー散乱による観察像の明るさとサイズとの関係¹⁴⁾。両対数軸のプロットで、サイズによって大きく明るさが変わることがわかります。

に大きく左右されます（図 1 1）。観察試料の中に 1 つでも大きなものが混入していると、そこからの強い散乱のために他の微細な構造が観察できなくなってしまいます。そのため、密度が高いもの、厚みのある試料などは、あまり暗視野顕微鏡の観察には適しません。

<引用文献や補足の説明>

- 1) den Dekker, A.J. & van den Bos, A. *J. Opt. Soc. Am. A*, 14(3):547-557 (1997)
- 2) JIS Z 8120:2001
- 3) 水の吸光係数は Hale & Querry (1973)、タンパク質・脂肪の光吸収は Prahl, S. (Oregon Medical Laser Center)の web サイト (<http://omlc.ogi.edu/spectra/>) から引用。
- 4) 空気の屈折率は 1.000、水は 1.333、油浸オイルは 1.516 の値となる（波長 589.3 nm の標準ナトリウム D 線を使って計測された値）。
- 5) コンデンサレンズについている絞り（コンデンサ絞り、開口絞り）を開閉する事で 0～1 の範囲で調節可能となる。油浸式コンデンサレンズでは、最大 1.3～1.4 まで $N.A._{con}$ を調節可能なものもある。
- 6) Hopkins, H.H. & Barham, P.M. *Proc. Phys. Soc. London*, 63,270B :737-744 (1950)。
- 7) 開口数の比 R を変えることで、照明光のコヒーレンス性が変化する。 $K=1$ としたアッペの定義はコヒーレント照明条件 ($R=0$) での分解能、 $K=0.61$ としたレーリーの定義はインコヒーレント照明条件 ($R=\infty$) での分解能に相当する。
- 8) Zernike, F. *Physica*, 9:686-698, 974-986 (1942) 。
- 9) 観察試料の大まかな周期構造は小さな回折光として、細かな周期構造は大きな回折光として対物レンズ内を通過する。
- 10) ウォラストンプリズムと同じような機能を持つ光学素子で、対物レンズの後方に置くデザインのもの。

- 11) このような検出限界は、顕微鏡の分解能とはまったく別に議論をしなければならない。像のコントラスト、つまり、信号と背景光の強度比によって決まる。単一蛍光分子のように、ほとんど大きさのないものであって、背景光さえ十分に低くできれば、その分子があるかどうかを敏感に検出できる。分解能が向上したのではないので、2つの色素がたまたま重なり合っている場合でも、2つとして判別はできない。
- 12) 物体深度が浅く、また、焦点面を外すと像のコントラストが著しく低下するために、試料のある断面だけを切り取って観察したかのような拡大像が得られること。
- 13) 通常の光学顕微鏡はすべてケーラー照明という照明方法を採用している。ケーラー照明では、照明光源の像をコンデンサレンズ絞りと同じ位置に形成させる。照明光をコンデンサレンズ内へ平行光にして入射させると、観察試料同じ位置に照明光源の明るい縮小像を形成させることができる。この照明法を臨界照明法と呼ぶ。不均一な照明とは異なるが、像の輝度を上げる効果は高い。
- 14) ScatLb (ver.1.2, <http://www.scatlab.com/>) による計算。