

光学顕微鏡のしくみ

光学顕微鏡と生命科学の接点は、レーウエンフック(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として、以下の 3 つあげることができます。

一つ目は 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、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。二つ目は 20 世紀半、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡など、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、細かな構造を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技術革新でした。三つ目は、この 20～30 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を蛍光色素で標識して観察できるようになりました。さらに、画像処理技術を駆使した超分解能顕微鏡法やレンズを使わないレンズレス顕微鏡法なども 21 世紀に入って次々に考案され、現在の生命科学分野では不可欠の技術となっています。このような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

光学顕微鏡で用いる光を可視光線と言います。電磁波とよばれる波の一種ですが、水面を伝わる波と同じように、波の頂点と頂点の間（谷底と谷底でも同じ）の距離（波長）を使ってその種類を区別します。0.36～0.83 μm （360～830 nm）ほどの波長を持った電磁波を可視光線と呼びます。これより短い波長のもの（紫外線）や長いもの（赤外線）はヒトの目には見えず、また、さまざまな事情で顕微鏡にも使いにくい光です。可視光線は、ちょうど太陽光に最も多く含まれる波長の光で、ヒトがその波長の電磁波を認識できるのは、太陽光線のもと、我々が進化して来たことを意味します。幸いにして、窓ガラスなどの素材（ケイ酸ナトリウム）は、この可視光線をほとんど吸収せず透過する性質を持っていて（図 1）、透明に透き通って見えま

す。ガラスが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はそのそのためです。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なことに可視光線はほとんど吸収しません。そのために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。これらの複数の幸運が重なって、光学顕微鏡は、私

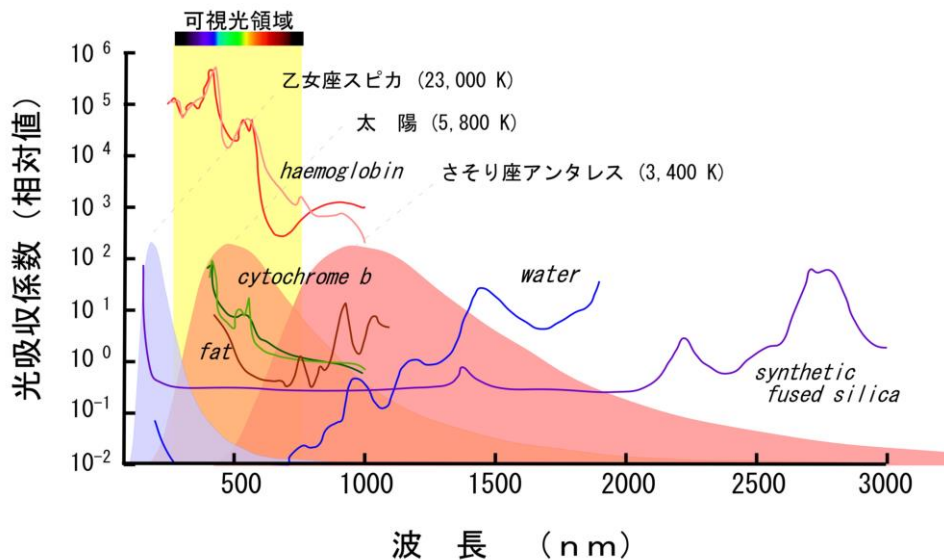


図1. 生体の物質、水、ガラスの光吸収と光の波長の関係³⁾。縦軸は吸収率を相対値で示しています。横軸は波長をナノメートル (nm、ミクロンの1000分の1) の単位で表示しています。Cytochrome b (チトクローム b)、fat (脂肪)、water (水) は、可視光線の吸収率は小さく、hemoglobin (ヘモグロビン) 色素のため多少吸収します。Synthetic fused silica (合成ガラス) は、それらよりずっと吸収が少なく透明に見えます。恒星の温度は絶対温度 (K) で示してあります。星の温度が高いほど、青く見えますが、これは光の波長の分布が左側に片寄るためです。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

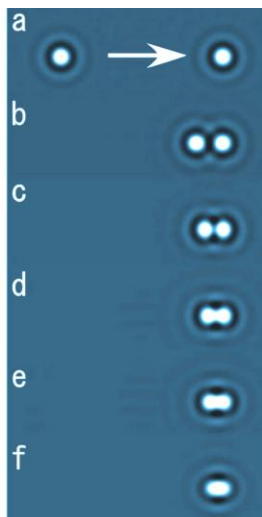


図2. 小さな点は光学顕微鏡で観察するとある広がりをもったパターン(a~f)となります。2点が接近すると区別できなくなります(e~f)。この像は顕微鏡写真ではなく、コンピュータを使って理論的に予測した像です。

たちにとって、生物試料を観察するために、なかなか使い勝手のよい便利な道具となっています。太陽系で光学顕微鏡を使って生命科学を研究できるという点で、人類は、なかなか運が良いのかも知れません。

光学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に相当します(図2eや2f)。解像度とよばれることもあります。その限界となる距離(d)はどのようになるか、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、一般に次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 (カップ) 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よばれるもので、

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

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大きな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 (0~2.4) です。物質の種類で異なります。空気や真空なら 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、この値は、1 よりは決して大きな値にはなりません。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。

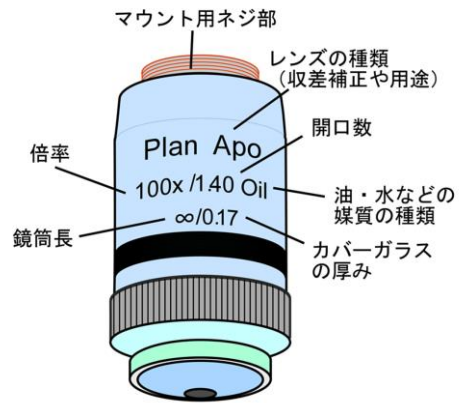


図 3. 一般的な対物レンズ側面の表示

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ます。

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、反対側の照明光側を見ると、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 ($N.A._{con}$) を定義することができます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

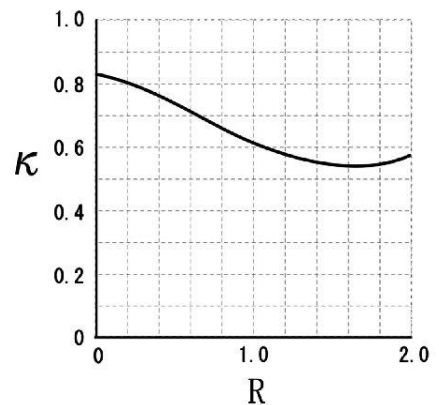


図 4. ホプキンスらの計算による 2 つのパラメタ、 κ と R との関係を示す。

中に出てきた κ (カッパ) と R との関係が図 4 のよう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 は小さくする (R を大きくする)
- iii) $N.A._{obj}$ を大きくする

の三つの選択肢しかないことがわかります。分解能の限界は、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の限界はどこか? どの位置に試料があるか? と言ったこととは別の問題です。この点、混乱しないように注意して下さい。分解能は 2 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。通常の明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

$$\text{作動距離} \propto \frac{\sqrt{n^2 - (N.A._{obj})^2}}{N.A._{obj}}$$

$$\text{観察像の明るさ} \propto \frac{N.A._{obj}^2}{\text{倍率}^2}$$

となるように、 $N.A._{obj}$ は、分解能以外にも光学顕微鏡のいろいろな性能を決定する重要な数値となっています。

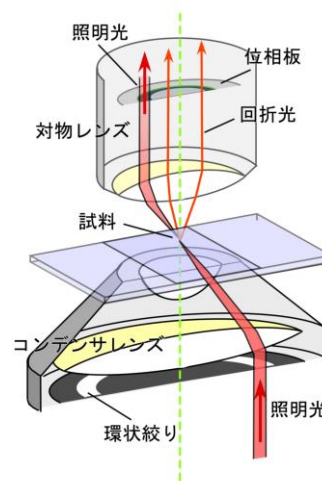


図 5. 位相差顕微鏡の構成。リング上の絞りのついたコンデンサレンズと位相板のついた対物レンズを必ず組にして使用します。位相板の中のある決まった場所 (灰色のリングで示す) を照明する光が通過するように調整して使わなければなりません。

5 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（前述のように、光のスピードの差を生みます）を明暗のコントラスト差に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、そこに位相板とよ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、二つの光軸中心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、コンデンサーレンズに附属しているターゲットとよ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）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人為的に1/4波長だけ進めたり、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

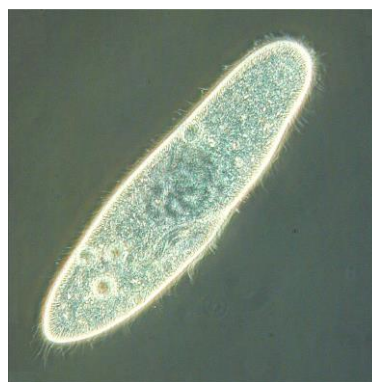


図6. 位相差顕微鏡（ブライトコントラスト）で観察したゾウリムシ。

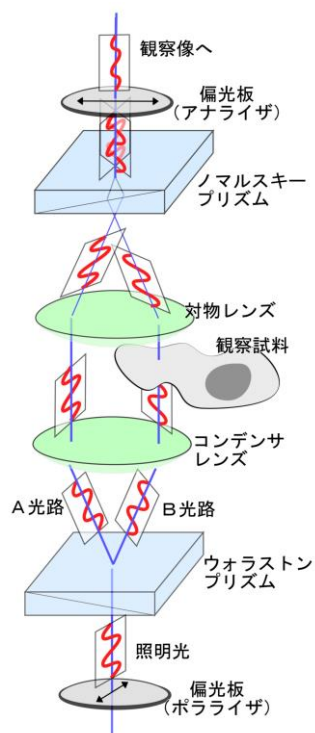


図7. 微分干渉顕微鏡のしくみ。ウオラストンプリズムに偏光を通すことで、A Bの異なる道筋を通る互いに直交する2種類の光に分けることができます。

クコントラスト像、ブライトコントラスト像（図 6）とよばれますが、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、実際の位相差顕微鏡の像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。位相差顕微鏡の計算ミスが時々発生し、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、白黒が反転したりといった問題が発生します。これは位相差顕微鏡を使う上での注意事項です。見えているからと言っても、そこに物体があるとは限りません。

S 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、ある決まった方向に、わずかな距離（分解能以下）だけ離れた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。一つ一つの光線は、ある垂直な一平面の中だけで振動している波です。我々の周囲にある普通の光線は 360 度、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、一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よびます。そのようなフィルターを偏光板とよびます。微分干渉顕微鏡はこの偏光を使います。

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

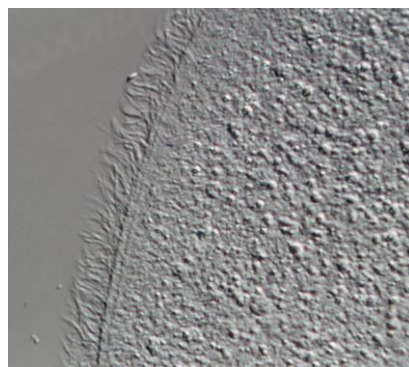


図 8. 微分干渉顕微鏡で観察したオパリーナの繊毛。左下側に向かって影が付いてみえます。この陰影のおかげで、細かな細胞内の顆粒がよく見えます。

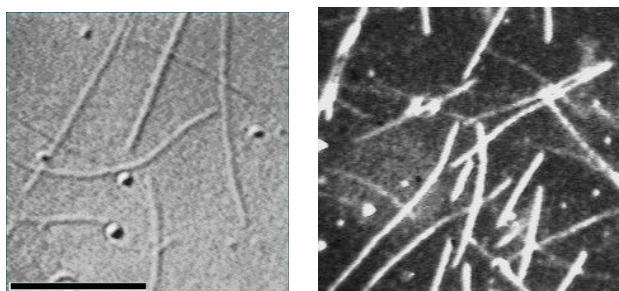


図 9. 微小管は細胞の中にある直径約 0.03 ミクロンの繊維です。左は、微分干渉顕微鏡で観察したもので、右が暗視野照明法で観察したものです。黒い棒は、10 ミクロンの長さを示します。

ズムとよばれる特殊な光学素子を通過させます。この光学素子は、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となるように設計してあります（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大変重要です。

図7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つに分けた光路の光を、再び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、アナライザとよばれる偏光板で取り除くと、AとB、二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。

AB二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ます。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」とよ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⁾。これは分解能が改善されたのではなく、コントラストを高めることで、検出する能力が改善されたからです。

設計上、コンデンサレンズ、対物レンズ、両方とも最大限まで $N.A._{con}$ 、および $N.A._{obj}$ を大きくして使用できます。つまり、光学顕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、方向によって見える太さ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。

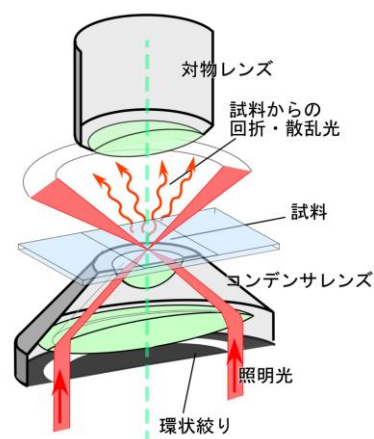


図10. 暗視野顕微鏡の光学系

§ 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、後述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も構いません。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設計してある点です。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 $0.05 \sim 0.5$ 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することもできます。

$N.A._{obj}$ 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することになります。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（技術的に作成できない）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 $0.7 \sim 0.9$ 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う必要があります。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特徴です（図 9）。

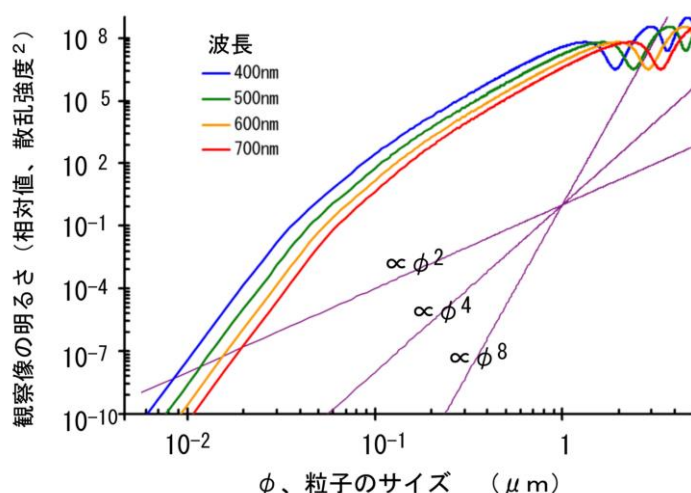


図 11. ミー散乱による観察像の明るさとサイズとの関係¹⁴⁾。両対数軸のプロットで、サイズによって大きく明るさが変わることがわかります。

暗視野顕微鏡で観察される光は、上では回折や散乱した光と言いましたが、正確にはミー散乱とよばれるも現象です。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ーリー散乱とよばれる現象）。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現象で、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。光の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、試料サイズに非常に大きく左右されます（図 11）。そのため、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。この理由で、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よぶ。不均一な照明とはなるが、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。
- 15) 大学生や高校生が光学顕微鏡のしくみを正確に理解してもらうためにこの説明文を記しました（文責：上村慎治、中央大学理工学部生命科学科）。