

顕微鏡は微生物学の基本 I

田中 隆明

小学校の理科実習を通じて光学顕微鏡（以下、顕微鏡と略）は広く親しまれている。医学、生物学はもちろん、多くの分野で顕微鏡はなくてはならない機器として重用されている。しかし、顕微鏡を理解してその性能を最大に引き出し、有効に活用できているかという、胸を張ってそうだと言いきれる人は意外に少ないのではないか。本稿を通じて顕微鏡を改めて見直し、より深く理解できる発端となればと思う。

顕微鏡の歴史

顕微鏡は1600年代に発明され、はじめは「単レンズ顕微鏡」と「複式顕微鏡」2つがあった(図1)¹⁾。

今日の顕微鏡の原型と言えるのは複式顕微鏡で、照明装置（光源、コンデンサ）、対物レンズ、接眼レンズ、合焦機構、試料保持機構を備えているが、初期の単レンズ顕微鏡は大変に高性能で複式顕微鏡よりも高倍率で観察できたようである。以降、顕微鏡は微生物学と共に進歩してきた。ドイツ・カールツァイス社の創業者の一人、エルンスト・アッペ（1840～1905）は、顕微鏡の光学理論を確立した物理学者として大変著名であり、あとで触れる顕微鏡の各種観察法の原理はアッペの光学理論を背景にしながら、19世紀後半から20世紀前半に確立された。光学性能の向上に伴って対物レンズは少しずつ大きくなると共に顕微鏡自体も大型化しながら進歩して今日に至った。顕微鏡の大きさは、対物レンズの同焦点距離（対物レンズの取付け面から標本までの距離）が長いほど大きい。今日では、45ミリ、60ミリ、75ミリなどがあり、

顕微鏡各社でそれぞれの特徴を競っている。

顕微鏡の3つの基本機能

顕微鏡の最も大切な機能は何か？ それは、「倍率」「コントラスト」「分解能」と呼ぶ3つの機能である。

<倍率>

見たいものを見たい大きさで見る機能

<コントラスト>

見たいものを明暗や色の違いではっきりと見る機能

<分解能>

見たいものを十分に精細に見る機能

倍率は、見たいものをどのくらいの大きさで見たいかで決まる。たとえば、1 μmの大きさのものを肉眼で1 mmの大きさで見たい場合は、1000×で観察する（通常、対物100×、接眼10×）。「コントラスト」と「分解能」については、少々説明を要する。

この2つは相互に影響しあう面があり、光学理論の深い話になるため詳細は略するが、「コントラスト」は「コンデンサの調整と観察法の選択で決まる機能」、あるいは、少し広い概念で「見たいものを見つける機能＝検出能」と捉えるとよい。また、「分解能」は「対物レンズの開口数で決まる機能」、あるいは「見分ける機能」と理解するとよい。

図2に顕微鏡の参考書でよく掲載される「顕微鏡の原理図」を示す。

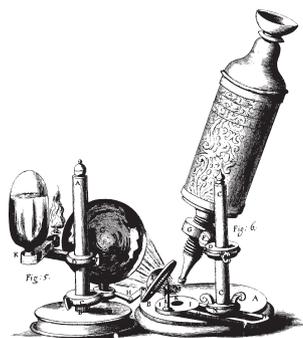


図1. 単レンズ顕微鏡（左）と複式顕微鏡（右）

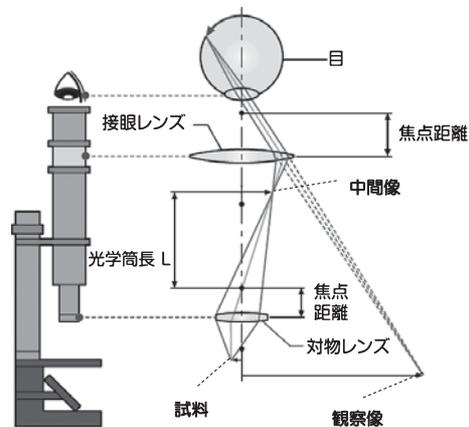


図2. 顕微鏡の原理

この絵では倍率が対物レンズでの拡大（実像拡大）と接眼レンズでの拡大（虚像拡大）の積で決まることは説明できるが、分解能やコントラストについては説明できない。それは、この絵が幾何光学での結像を説明しているだけで、分解能やコントラストの説明には回折や干渉という光の波の性質が必要になるためである。

分解能は「見分けられる2点の最小間隔」とも言い換えられる。分解能 δ は対物レンズの開口数（NA, numerical aperture）と光の波長（ λ ）とで、一般に以下のような式で表す。

$$\delta = 0.61 \times \lambda / NA$$

δ が小さいほど、すなわち開口数（NA）が大きいほど高分解能になる。この式を「レーレーの分解能」と呼び、 λ には550 nm（緑色の光：人の眼で最も比視感度の高い光の波長）を使う。0.61という係数は、実際の観察ではコンデンサの開口絞りの大きさ等によって少し変わる。また、この式には倍率は含まれない。つまり、分解能は開口数と波長にのみ依存しており倍率には依存しない機能である。

以上、「見たい倍率に拡大（倍率）」し、「見つけたものをハッキリ（コントラスト）」と「十分精細（分解能）」に観察することが顕微鏡観察の基本になっている。

よい顕微鏡像の観点

「よい顕微鏡画像」は何をもって判断するか？ 倍率、コントラスト、分解能に加え、さらに「像面平坦性」が加わる。像面平坦性はプラン性とも言い、試料の中心にピントを合わせたときに、視野周辺までピントが合っている程度のことである。

評価の観点は、このほかに、

- ①照明の色：正しい昼光色で観察できるかどうかの性能。
- ②像の明るさ：観察に十分な明るさがあるかどうかの性能。
- ③周辺光量，明るさのむら：像の中心部の明るさに対する周辺部の明るさの程度と明るさのむら。
- ④ゴースト，フレア：コントラストを悪化させる迷光やゴースト像の程度。
- ⑤かたばけ：像の上下あるいは左右で、焦点位置に偏りがあること。

などがある。顕微鏡になんらかの不具合、照明（光源、フィルタ）の不良や光軸のずれや傾きなどが起きていると、最良の像を得ることはできない。

顕微鏡の観察法の種類と原理・特徴

次に顕微鏡のコントラストと直結している主な観察法について、原理と特徴のポイントを説明する（カッコ内

は観察法の記号）。

明視野観察（BF） 試料を照明して観察するだけの最も基本的な観察法で、無染色の薄い試料はほとんど見えない。通常は、試料を固定・染色することで像に色のコントラストをつけて観察する。無染色の生体試料を観察する場合は、コンデンサの開口絞りを絞ってコントラストを強めて観察する。明視野観察の際に行う光軸調整は、そのほかの観察法で正しく調整する前の基本＝ケラー照明の基本調整になっている。

暗視野観察（DF） 生きた菌や菌のべん毛など無染色の微小・微細な試料の観察に適する。暗視野コンデンサを使い、照明光が試料に当たって生じた回折光や散乱光のみで形態観察や検出をする。視野が暗い中で試料の部位だけが光るため、非常に感度が高く、分解能以下の微小な（数nm）物体の検出ができる。プレパラートのガラス部分の僅かな汚れによって生ずる散乱光がノイズになるため、プレパラート作成ではゴミや汚れのないよう注意が必要である。

位相差観察（PC） 無染色試料の観察に適する。照明光が試料に当たって生ずる ± 1 次回折光と0次回折光との位相差で像面に光の干渉を生じさせ、明暗のコントラストで形態観察ができる。厚い試料（十数～数十 μm 以上）の観察には適さない。ハローと呼ぶ明るいノイズ光が強くなるため、試料の厚さは数 μm 程度（薄い標本）までならハローの影響が小さい。像のコントラストには、明るい背景に像が暗く見える一般的なポジティブ（ダーク）コントラストと、その明暗が反転して菌や血球の計数などで見やすいネガティブ（ブライツ）コントラストの2つがある。位相差用のコンデンサにはリング状のスリットが、位相差用対物レンズにはリング状の位相板がそれぞれ内蔵されており、そのためにピントのぼけた部分にはリングボケと言う現象が生ずる。検出感度が高いので、暗視野同様にプレパラートにごみ、汚れがないように注意する。以前はコントラストをよくするために、グリーンフィルタを組合せて視野を緑色にするのが一般的だったが、近年は、グリーンフィルタを使わなくとも良好な位相差像が得られるようになった。

微分干渉観察（DIC） 無染色試料の観察に適する。照明光を偏光2光束に分け、試料に位相勾配のある部分で生ずる干渉コントラストで独特の明暗のある立体的な像になる。2光束間に十数nmの位相差があれば明暗のはっきりした干渉コントラストが生ずるので、微細な形態観察に適している。視野の南東-北西方向に2光束を分けるため、コントラストもその方向でもっとも強くなる。位相差観察では不可能なコントラストの微調整が

表1. 観察法比較表

	染色標本	無染色標本			蛍光検出	異方性検出
		分解能以下	薄い	厚い		
BF	◎	×	×	○	×	×
DF	×	◎	○	×	×	×
PC	×	×	◎	×	×	×
DIC	×	○	◎	◎	×	×
FL	×	○	○	×	◎	×
PO	○	×	○	○	×	◎

◎最適, ○可能 ×不適

できる。偏光板と微分干渉プリズムと呼ぶ位相板をそれぞれ対物側とコンデンサ側に組み合わせる構造になっている。ビデオエンハンス技術を使って、分解能以下の形態観察を行うこともできる。

蛍光観察(FL) 蛍光標識した試料に励起光を当て、暗黒の背景に光る蛍光シグナルで目的のタンパク質などを観察する方法である。蛍光の波長が励起光よりも長いことを利用し、励起フィルタ、吸収フィルタの2つのフィルタによるフィルタ暗視野法の原理を使っている。暗い視野の中に目的とする蛍光だけが観察できるので、大変高感度で検出能が高い観察法である。分解能以下のタンパク質1個を光らせることができる。ただし、使う蛍光色素や蛍光タンパク質に最適なフィルタを使わないと観察できない。また、蛍光の褪色を少なくするにはシャッターやNDフィルタを使って励起光を当てすぎないことが大切である。

偏光観察(PO) 試料の光学的異方性(複屈折性)の検出ができる。最初は鉱物観察用に開発された。試料全体あるいはその一部の光学的異方性を、偏光干渉によって明暗や色のコントラストで検出・観察することができる。試料に異方性がなければ、2枚の偏光板を直交ニコルの方位にすると視野は暗黒になるが、わずかでも異方性があれば明灰色や白色に光って見える。試料を360度回転させると、90度ごとに消光する現象がある。細胞の紡錘体を初めて画像化した観察法として有名である。

観察法の比較表を表1に示す。

対物レンズで大切なこと

顕微鏡の性能は対物レンズでほぼ決まる。使う対物レンズの仕様をレンズの表示で正しく理解できるのが望ましい(図3)。注目すべき対物レンズの仕様を以下に示す。

倍率 1, 1.25, 2, 2.5, 4, 10, 20, 25, 40, 60, 63, 100×。メーカーによりラインアップが若干異なる。



図3. 対物レンズの表示

開口数 分解能を決める数字。大きいほど高分解能。
浸液 油浸, 水浸, グリセリン浸, マルチ浸, シリコン油浸がある。浸液は、試料の調製条件や観察目的によって選択する。固定標本の場合は油浸, 生体試料の場合は水浸かシリコン浸が適している。

種類(収差性能による分類) アクロマート, プランアクロマート, プランセミアポクロマート, プランアポクロマートの大きく4種類あり, 「プラン」は像面湾曲収差が補正されていて像面平坦性がよいので, 写真撮影に適する。色収差性能が良い順にアポ, セミアポ, アクロとなり, 研究用にはセミアポかアポが適している。

カバーガラス厚表示 「0.17」カバーガラス標本用, 「0」ノーカバーガラス標本用, 「-」カバー, ノーカバーガラス標本共用。

作動距離 ピントを合わせたときの対物先端からプレパラートまでの距離。表示のない対物レンズもある。一般に開口数が大きい対物レンズの作動距離は小さい。

補正環付き リング状の補正環あり。「0.11~0.23」などのカバーガラス厚補正範囲が表示されている。

カバーガラス厚の厚みの誤差に起因する球面収差を補正する機構である。試料と対物レンズの間には、封入剤やカバーガラス、浸液などがあるが、これらの試料と対物レンズの間に介在するものはすべて対物レンズの1部とみなす必要がある。カバーガラスの実際の厚さが設計値と異なると球面収差の増加で像が劣化してしまう。補正環は正しく調整しないと本来の分解能、コントラストの性能が出ない(図4)。

観察法による分類 位相差用, 微分干渉用, 蛍光用, 偏光用など各種観察法用の対物レンズがある。

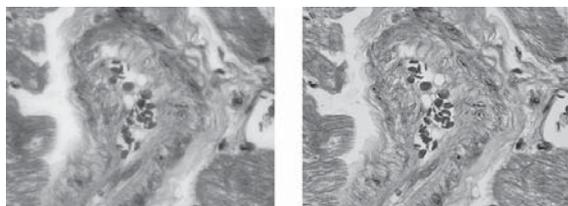


図4. 補正環調整. 左: 調整前, 右: 調整後.

<位相差用>

文字色が緑色で「Ph○」(○には記号, 数値)の表示がある(「Ph○」は内蔵する位相板のサイズを示す記号). 対物レンズの取付けネジ側から中を覗くとリング状の位相板が見える.

<微分干渉用>

微分干渉プリズムに対応するよう設計されており, 通常「ユニバーサル対物」と呼ばれるものは微分干渉観察に使用できる. 偏光を利用するためレンズの歪みが小さくなるよう作られている.

<蛍光用>

普通のガラスは紫外線を吸収する性質を持っているが, 蛍光用対物レンズは紫外線透過率が高く, 自家蛍光(ガラス自体から出る蛍光)の少ないガラスでできている. 微弱な蛍光も検出できるよう高開口数で, 微分干渉と併用できるものが多い.

<偏光用>

特に光学的な歪みを除去してある. 偏光性能の上では開口数が小さいほうが高性能だが, 微細な試料の異方性を検出するには開口数の大きなほうが有利である.

接眼レンズで大切なこと

接眼レンズは双眼で正しく使用できるよう, 両目での視度調整, 眼幅調整の方法は確実にできることが大切である. 接眼レンズで注目すべき仕様を以下に示す.

倍率 通常は10×接眼レンズ組合せが一般的だが, 15×接眼レンズを使って見やすくなる場合もある.

視野数 中間像の直径を示す. 20~22 mmが使いやすい大きさで「広視野」とも呼ばれる. 以前は18 mmの視野数が普通であった. 実視野(標本上の観察範囲直径)の大きさは, 視野数と観察している対物レンズとの倍率とで下式になる.

$$\text{実視野}(\varphi) = \text{視野数} / \text{対物倍率}$$

アイポイント 観察の際に眼の瞳を置く最適な位置で, 接眼レンズの射出瞳位置に相当する. めがねマークが付いているものは「ハイ・アイポイント」と呼び, め



W: 広視野タイプ
H: ハイ・アイポイント
10×: 倍率
22: 視野数

図5. 接眼レンズの表示

がねをつけたまま観察できる(図5). 接眼レンズに白い紙をかざして光の円盤を投影させ, 紙を接眼レンズから少し離して光の円盤が最小になる位置がアイポイントである. 観察時は, アイポイントに眼の位置を合わせるよう意識するとよい.

ヘリコイド 視度調整用の機構. 焦点板を装着する場合は焦点板への視度調整ができる.

各種焦点板 計測用のマイクロメータ, 方眼マイクロメータ, 視野中心と偏光の方位を示すクロス線, 各種の計数用焦点板などが装着できる. メーカー指定品以外を使う場合は, 直径と厚さが合うものを選択する.

撮影レンズ(カメラアダプタ)で大切なこと

デジタルカメラの普及で, 顕微鏡写真撮影は初心者でも簡単に操作できるようになった.

CCDのサイズが小さいと撮影実視野も小さい. 撮影倍率が小さいと撮影実視野を大きくできるが, 周辺光量不足が目立ちやすくなる(目視では目立たずとも写真では目立つ).

撮影実視野は下式で計算でき, 観察実視野と同じか小さめになるよう選ぶと良い.

撮影実視野

$$= \text{CCDサイズ} / (\text{対物倍率} \times \text{撮影レンズ倍率})$$

カメラを決めればCCDサイズが決まるので, 撮影レンズの倍率で撮影実視野が決まることになる.

観察視野よりも広範囲で画像を撮影したい場合は, 視野を換えて複数の写真を撮って画像の張り合わせをする. この場合, 1枚1枚の写真には周辺光量不足がないように撮影する必要があるため, 大きめな倍率(通常1×)を選択するのがよい. ズーム変倍機能つきのアダプタを使う方法もある.

微生物観察上の留意点

特に大切な点について以下に述べる。

レンズ、フィルタは常にクリーンに そのほかの何に気をつけても、レンズやフィルタに汚れがあつては最良の像は得られない。中でも対物レンズの汚れがもっとも画質を劣化さる。

最適な観察法の選択 観察目的や試料の調製条件に合った観察法を選択する。そのためには各種観察法の特徴、長所・欠点を正しく理解し、最適な対物レンズを選択することが大切。

各種の調整を正しく、適確に 基本的な光軸調整、視度・眼幅調整はもとより、各種観察法での調整や正しい浸液の選択、補正環対物の調整が正しいことは必須である。

各観察法での調整のポイントは、

- ・暗視野観察：コンデンサの光軸合わせと視野の背景が暗黒になるよう上下位置を調整する。
- ・位相差観察：リングスリットを正しく心出し調整する。
- ・微分干渉観察：ポラライザ、アナライザを直交ニコルに調整し微分干渉プリズムを正しく組合せる。
- ・蛍光観察：高輝度光源を心出し調整する。適切なフィルタを使う。
- ・偏光観察：ポラライザ、アナライザを直交ニコルに調整する。

目視観察とカメラ撮影での同焦調整は正しく 正しい視度調整の後にカメラアダプタ部で焦点位置の調整を行い、目でピントが合うときにカメラにもピントが合うようにする。

コンデンサの開口絞りを上手に使う 生体試料は染色できないので、コンデンサの絞り(図6：開口絞り)を絞って観察する。開口絞りの開き加減は、分解能とコントラストの両方のバランスがよい条件に調整する。最小に絞り込まないと見えない試料を観察する場合は、分解能が損なわれることに注意する。それでも見えない場合は位相差観察や微分干渉観察に換える必要がある。

微分干渉のシア量選択 位相差観察でハローが大きい試料には微分干渉観察が適する。微分干渉プリズムは、微生物の場合は、ノーマル用か小シア量の高分解用プリズムを選択すると良い。



図6. コンデンサの開口絞り環と目盛

顕微鏡の適切な維持管理 設置環境に振動、煙、酸・アルカリ、多湿は避けること。日常のレンズクリーニングなどは自分できるようにする。可動部分の動きが固くなったりガタが生じたりした場合は、専門技術者によるメンテナンスや修理が必要となる。

おわりに

以上、顕微鏡の基本的な原理から使用上の留意点まで紙面の許す限りまとめてみた。下記の参考資料も活用し、顕微鏡への理解をもう一段深めてもらえれば幸いである。なお、文献2)～5)は基礎的なテキストとして活用して欲しい。

参考資料

Webサイト

- ・ <http://bioimaging.jp/>
- ・ <http://bioimaging.jp/learn/cat003/>
- ・ <http://www.olympusmicro.com/>

文 献

- 1) ブライアン J. フォード：シングルレンズ，法政大学出版局(1986)。
- 2) 稲沢譲治ら：顕微鏡フル活用術イラストレイテッド，秀潤社(2000)。
- 3) 野島 博編：顕微鏡の使い方ノート，羊土社(2011)。
- 4) 曾我部正博ら編：バイオイメージング，共立出版(1998)。
- 5) 朝倉 健太郎ら：マクロ観察と新型顕微技報Q&A，アグネ承風社(2010)。