SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

光学顕微鏡の観察手法と操作

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2015-11-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 水野, 武志 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00009249

光学顕微鏡の観察手法と操作

水野 武志
技術部　共同研究支援部門

1. はじめに

光学顕微鏡の発明は、16 世紀のオランダで発明されたと言われています。　そして、現在のような顕微鏡の原型は、19 世紀末までには完成しています。　この結果、微細領域での観察が進み、科学の世界において様々な発見が有り、これらの発見は産業化され、私達の日常生活は劇的な変化を遂げました。

現在では、光を使用する光学顕微鏡以外にも、電子線を使用する電子顕微鏡や、プローブ（探針）を用いる走査型プローブ顕微鏡などが発明され、光の波長よりも微少な領域での観察が、行えるようになっています。　共同研究支援部門では、一昨年に電子線を使用する電子走査型顕微鏡（SEM）の研修を行っています。　今回の研修では光学顕微鏡の研修を行いました。

2. 研修の目的

光学顕微鏡は、微細領域での観察を簡単に行うことができ、また手軽に観察することが出来るため、日常的に使用する事が多い顕微鏡です。　本研修では、工学系で用いられることが多い、**金属顕微鏡**の観察手法の知識を理解し、最適な観察方法を選択できるように、講義と実習を行いました。

金属顕微鏡：観察試料は金属などの光を透過しない試料で、観察側から光を照射して反射光で観察する。

3. 研修の概要

3.1　担当講師について

オリンパス株式会社野崎真左幸様に、本研修の講義と実習の講師を担当して頂きました。

3.2　日程

日時：2014 年 9 月 26 日（金）　10:30～12:30　講義　電子工学研究所　会議室
13:30～15:30　実習　電子工学研究所　EB ﾙｰﾑ(316 室)

3.3　参加者

共同研究支援部門　　：7 名
教育支援部門　　：2 名
プロジェクト支援部門：1 名

図 1　講義の様子

図 2　実習の様子

4. 研修の内容（顕微鏡の基礎知識）

4.1　光学顕微鏡の基本構造について

4.1.1　接眼レンズ

観察側（眼側）にあるレンズで、両眼タイプの場合は観察者の両眼の眼の距離や、視力などで最適な調整行える機構を備えている。

4.1.2　対物レンズ

試料に近接して使用するレンズで、レボルバと呼ばれるパーツに対物レンズを複数（低倍率から高倍率）装着し、観察の目的により任意の対物レンズを選択して使用する。

4.1.3　照明

生物系などの光を透過する試料は、観察する反対側から光を照明して、透過した光学像を観察する。　光を透過しない試料を観察する金属顕微鏡は、観察側と同方向から光を照明し、反射した光学像を観察する。

図 3　光学顕微鏡(紫外観察機能付き)

4.1.4　観察ステージ

試料を X 軸・Y 軸・回転軸・高さ調整機構を備え、試料の観察時に、最適な調整を行って観察する。

4.2　光学顕微鏡で用いる用語の理解

4.2.1　開口数（NA：Numerical aperture）　NA＝n×sinθ

n：媒質の屈折率（空気：n=1）　θ(開口角)：試料と対物レンズ光軸の最大角度

開口数は、対物レンズ性能を示す指数で、開口数が大きいほど分解能は高くなり、明るさも明るくなります。　しかし、焦点深度は浅くなり、作動距離も小さくなるため、凹凸の大きい試料は不向きとなる。

4.2.2　分解能

試料細部をどこまで細かく識別出来るかを表した数値です。　この数値が、光学顕微鏡の性能を表しています。　通常の光学顕微鏡（空気中での測定）では、0.37μm程度が最小分解能となります。

4.2.3　倍率　　総合倍率＝対物レンズ倍率×接眼レンズ倍率

実際の試料をどのくらい大きく拡大しているかを示す数値です。　総合倍率が大きくても、最小分解能よりも小さな領域は、識別出来ません。

4.2.4　作動距離と焦点深度

作動距離（WD　Working distance）：対物レンズ先端から試料表面までの距離

焦点深度：試料の凹凸で、高低差のでどこまでフォーカスが合うかの範囲です。　焦点深度が深いレンズであれば、試料の凸凹の高低差があっても試料全面でのフォーカスが合いやすくなります。NA が小さいレンズは、作動距離が遠く、焦点深度も深いため、凹凸の大きい試料向きです。

4.2.5　収差

理想光学観察像と実際の観察像とのずれで、収差（①ピンぼけ　②歪曲　③色ずれ）が有り観察目的に合わせて最適のレンズ系を選択します。（顕微鏡の購入時に決定）

4.3　光学顕微鏡の各種の観察方法

4.3.1　明視野観察（Bright field microscopy）

最も使用されている観察法で、生物試料などの光を透過する試料は、試料を透過した透過光を観察します。　光を透過しない試料には、観察側から光を照明して、反射光を観察します。　半導体表面などのよ

うな、平滑面で観察するとパーティクルなどが観察し易くなります。

4.3.2　暗視野観察（Dark field microscopy）

照明光を正面からではなく、斜め方向から照明を行う。　これらの光が、試料中や試料表面で光が散乱や屈折などが発生し、接眼レンズ側に届いた光を観察像とします。

4.3.3　微分干渉観察（Differential interference contrast microscopy）

ノマルスキーにより開発されました。　照明光を、直交する 2 つの偏光として試料に照射します。　この際に試料において光路差が生じると微分干渉像が発生し、観察像に干渉色の濃淡が発生します。

4.3.4　偏光観察（Polarized light microscopy）

偏光した照明を試料に照射して、試料から接眼レンズへの経路で偏光板を利用して偏光像を観察します。偏光特性のある鉱物や、液晶などの観察が行えます。

4.3.5　蛍光観察（Fluorescence microscopy）

蛍光が発生する試料に、特定波長光を照射(励起光)し、発光した蛍光を接眼レンズ側で観察します。

4.4.　顕微鏡の種類と特徴

4.4.1　実体顕微鏡

試料を加工せずにそのままの状態で観察する顕微鏡、低倍率（数十倍程度）のものが多い。

4.4.2　金属顕微鏡

前述の通り

4.4.3.　共焦点レーザー顕微鏡

レーザー光を探針（プローブ）のように用いることにより、観察物を観察し正確な位置情報を取得する。　3 次元での位置情報を持っているため、パソコンとの組み合わせで、高精度の測定に利用出来る。

4.4.4　走査型プローブ顕微鏡

探針（プローブ）を使用して、試料表面を走査する事により、観察物の正確な位置情報を取得することが出来るため、高精度の測定に用いる。

4.4.5　電子顕微鏡

電子線を探針のように用いることにより、観察物の正確な位置情報を取得することが出来る、電子線を用いるため、試料を真空中にした観察室で測定する。

5.　実習について

実習では、実際の光学顕微鏡を使用して、顕微鏡の調整方法や操作方法を行いました。

また、電子工学研究所クリーンルーム所有のオプトデジタルマイクロスコープ(オリンパス DSX500)を操作しました。　この顕微鏡で、各種の観察方法にて観察を行い、観察像が各種の観察方法により変化することを観察しました。

試料の観察像の変化は、下記（図 5 から図 7）の観察写真を参照。　観察方法により、試料の観察像は大幅に変化する。

観察目的に合わせて、観察手法を選択する。

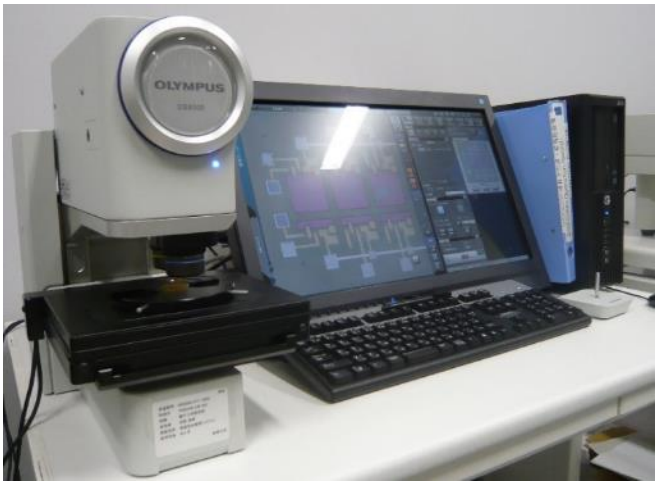

図 4　オプトデジタルマイクロスコープ（DSX500）

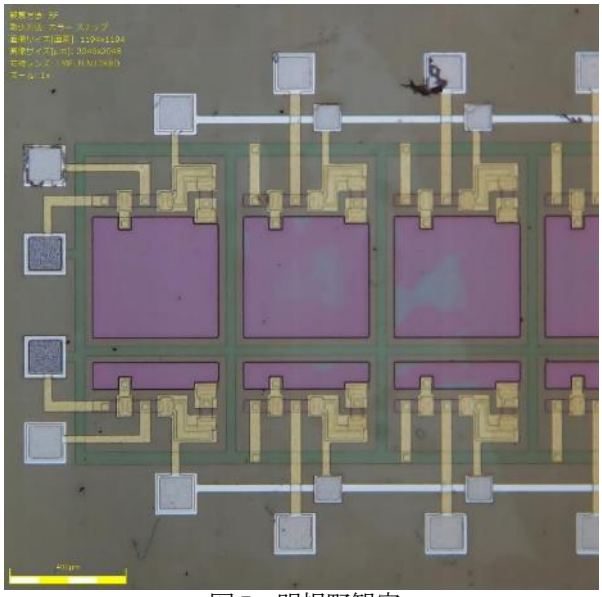

図５　明視野観察

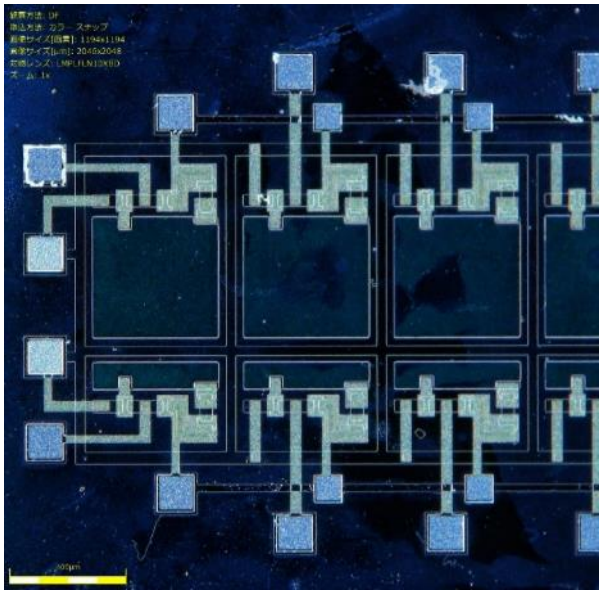

図６　暗視野観察

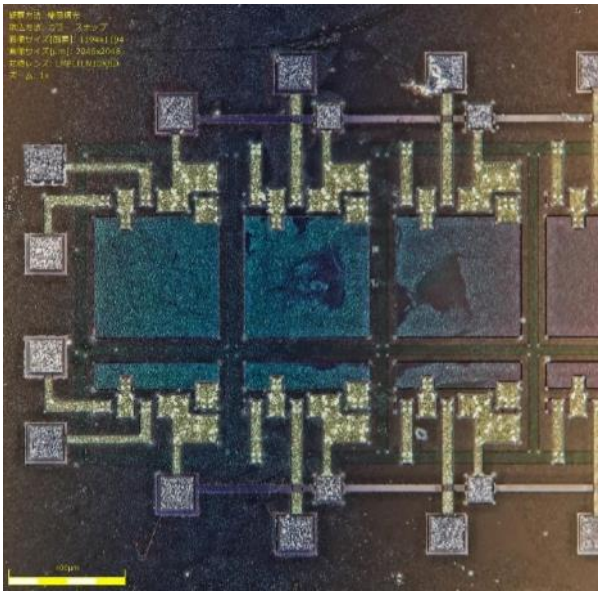

図７　簡易偏光観察

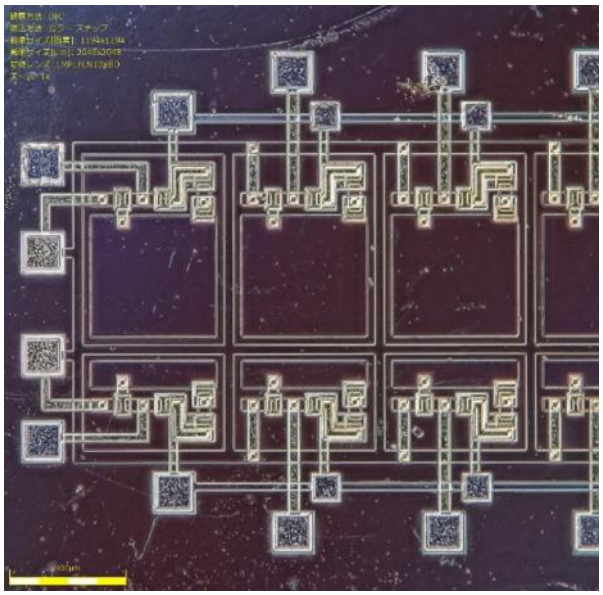

図８　微分干渉観察

6. まとめ

一昨年の電子顕微鏡の講習会では共同研究支援部門の参加者のみで合ったが、今年度は光学顕微鏡ということもあったのか他部門の方に講習会に参加頂きました。　参加者の皆様にはご多忙の中、ご参加頂き有り難うございました。　今後も、多くの方に興味を持って参加して頂ける講習テーマと、内容のある講習について考えていきたい。

7. 謝辞

講義と実習は、講師のこれまでの経験と知識が反映されていて大変わかりやすかった。　ご多忙の中、本研修の講師をお引受け頂いた、オリンパス株式会社の野崎真左幸様に深く感謝致します。

参考文献・URL

[1]　オリンパス株式会社：金属顕微鏡の利用術(2014 年 9 月 26 日版)

[2]　オリンパス株式会社　顕微鏡用語解説　http://www.olympus-ims.com/ja/microscope/terms/

[3]　日本顕微鏡工業会　顕微鏡の基礎　http://www.microscope.jp/knowledge/index.html