

透明な物質は、普通の顕微鏡では何らかの構造があっても均一な明るさに見えてしまう。このため、何らかの手法により観察対象の光学的な性質を活用して観察対象にコントラストをつける工夫が行われてきた。例えば水中の生体物質は周辺の水とは僅かでも屈折率が異なるので、水を透過した部分と試料を透過した部分では光の位相に差が生じる。位相差をもとにコントラストをつけるのが位相差顕微鏡や干渉顕微鏡である。観察対象としての液晶は屈折率が配向方向とそれに垂直な方向で異なる複屈折物体なので、光が液晶を通過するときに偏光状態が変化する。従って試料透過後各部分での偏光状態を可視化できれば液晶の配向変化に対応したコントラストが生じるはずである。これを実現するのが偏光顕微鏡で、液晶の発見当初から今日に至るまで液晶の組織観察には欠かせない道具である。本章では顕微鏡および偏光顕微鏡の基礎を扱う^{*1}。

1 顕微鏡の光学系

1.1 顕微鏡の倍率

偏光顕微鏡を含む現在の研究用顕微鏡は、対物レンズ系 (objective lens) により形成された実像 (real image) を接眼レンズ (eye lens, eyepiece, ocular) で拡大した虚像 (virtual image) を観察する「複式顕微鏡 (compound microscope)」である (図 1)。複式顕微鏡の拡大倍率は対物レンズ倍率×接眼レンズ倍率である。ビデオや写真撮影時には、対物レンズの実像を撮像素子に直接結像するか、投影レンズ (projection lens) を使って、撮像素子上に結像させる^{*2}。直接結像の場合の撮影倍率は対物レンズの倍率と等しく、投影レンズを用いた場合の撮影倍率は対物レンズ倍率×投影レンズ倍率である。

1.2 無限遠補正系と有限距離補正系

図 1 では対物レンズ単体で実像が形成されているが、現在販売されている顕微鏡の多くは図 2 に示すように、対物レンズで試料の 1 点からの光を平行光束にし、後段の結像レンズで集光して実像を形成している。対物レンズ通過後の光線が平行光線になることから、このようなシステムは「無限遠補正系」と呼ばれている^{*3}。これに対して対物レンズのみ

^{*1} 複屈折性物質を直交ニコル間に置くと光が透過し、条件により着色する原理については、複屈折物体の光学の章を、組織観察に関しては該当する章を参照されたい。

^{*2} これは直接法の光学配置で、カメラ側のレンズを使って虚像を撮影する手法 (コリメート法) もある。

^{*3} 無限遠は結像位置が無限遠方になるから。補正系は対物レンズ通過後の光が平行光束となる状態で対物レンズの性能が最適化されていることを意味している。

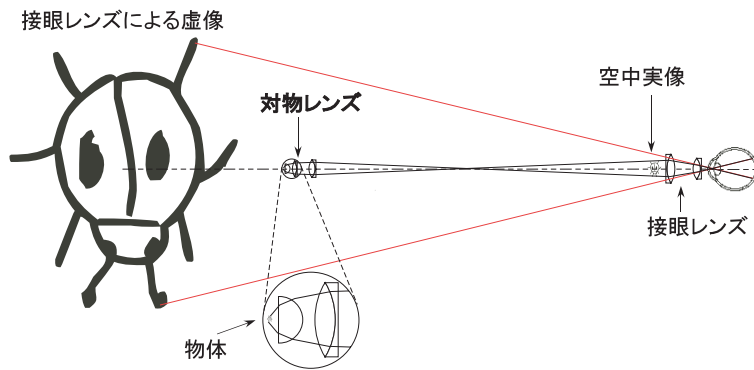


図 1: 複式顕微鏡の光学系

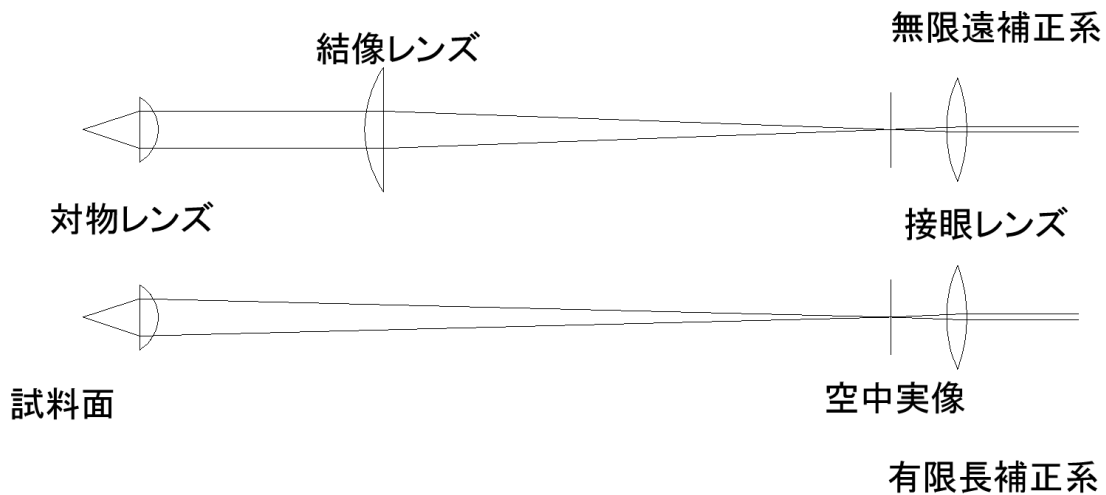


図 2: 無限遠補正系と有限距離補正系

で結像するシステムは「有限距離補正系 (有限系)」と呼ばれている。20 世紀中頃までは有限距離補正系が主流であったが、現在のニコン、オリンパス、ツアイス、ライツの機種は無限遠補正系である。

無限遠補正系では、対物レンズと結像レンズの間の距離が自由に変更できる^{*4}。このため両者の間に落射鏡筒や偏光鏡筒などを光学系の性能に影響を与えることなく組み込める。一方、有限距離補正系では、対物レンズと接眼レンズの距離が定まっているため、通常の鏡筒に距離を変えるような部品を組み込む場合には補正光学系も必要になる。無限遠

^{*4} 完全に自由というわけではなく、推奨範囲はある。対物レンズと結像レンズを離しすぎると観察範囲が狭くなり近づけすぎると像が劣化する。

図 3: 無限遠補正系と有限距離補正系対物レンズの表記。

補正系の方が顕微鏡のシステム化に適している。

2 対物レンズ

2.1 無限遠補正系と有限距離補正系対物レンズ

無限遠補正系用の対物レンズと有限距離補正系対物レンズは、倍率が同じなら、焦点距離も同程度の凸レンズである。このため有限距離補正系の対物レンズを無限遠補正系の鏡筒に装着しても、逆の組み合わせをしても像は見える。ただし、レンズの拡大倍率が表記とは異なったものになるし、ピントのあう位置が大幅にずれたりする^{*5}。また結像性能の低下が生じる。

無限遠補正系対物レンズと有限距離補正系対物レンズは対物レンズに記載されている表示で区別できる。無限遠補正系対物はレンズに ∞ 記号の表記があるのに対して、有限系は同じ位置に、160(170)、210 などの鏡筒長に関する表記がある。

2.2 対物レンズの倍率

無限遠補正系での拡大倍率 M は、対物レンズの焦点距離 f_o と結像レンズの焦点距離 f_c を用いて $M = f_c/f_o$ となる。結像レンズの焦点距離は顕微鏡メーカーにより異なるため^{*6}、あるメーカーの対物レンズを異なるメーカーの鏡基に取り付けると、実倍率は表記倍率とは異なってしまう^{*7}。たとえば、オリンパスの 10 倍対物レンズをニコンの鏡基に取り付けると、実倍率は $10 \times 200/180 \approx 11$ 倍となる。

有限距離補正系ではレンズから物体までとレンズから結像面までの距離で倍率が定まる^{*8}。詳細は次章に記すが設計鏡筒長と異なる鏡基にとりつけた時の実倍率は表示倍率とは異なってしまう^{*9}。

^{*5} ピントの再調整に粗動ハンドルを回す必要があるなら、異なる規格の対物レンズが紛れ込んでいる。

^{*6} ニコン:200mm、オリンパス:180mm、ライカ:200mm、ツアイス:164.5mm、ミットヨ:200mm

^{*7} 倍率は変化するが、ピント位置やガラス厚補正の特性など倍率以外のスペックは変化しないし、結像性能にも問題は生じない。

^{*8} 正確にはレンズの前主面からと後主面から。

^{*9} こちらは単純な計算で実倍率が出てこないの、対物マイクロメータを使って実倍率を計測するのが手軽である。

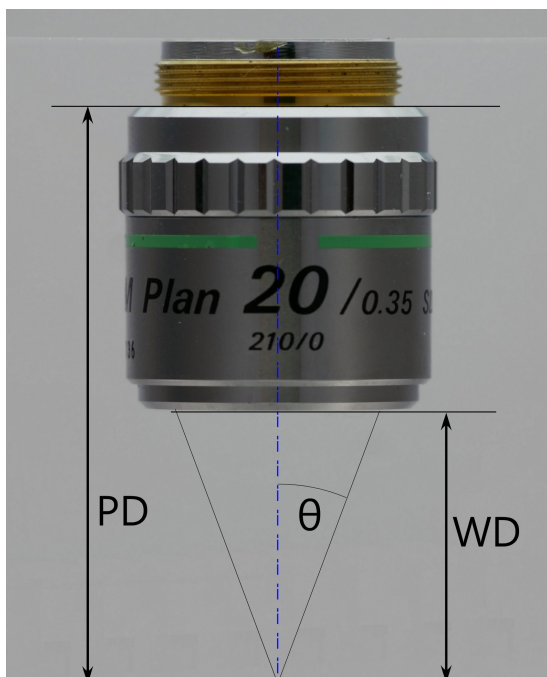


図 4: 同焦点距離 (PD) は対物レンズ取り付け位置からピント面までの距離で、RMS ネジの長頸対物レンズでは 45mm が標準。作動距離 (WD) は対物レンズ前面からピント面 (もしくは試料にピントがあった状態で、指定された厚さのカバーガラスの上面まで) の距離。見込み角 (θ) は、ピントがあった状態で、光軸と試料が交わる点から対物レンズの最外周を通る光線がなす角。開口数 (NA) は対物レンズと試料の間の媒体の屈折率を n (空気なら $n=1$) として、 $NA = n \sin(\theta)$ である。

2.3 同焦点距離・作動距離・視野数・開口数

対物レンズの取付け面から試料までの位置はシステムにより定っており、レボルバーを回転して対物レンズを交換しても、大きなピントのずれはない。取付け面から試料までの距離は同焦点距離と呼ばれている。オリンパス、ツアイス、ライカの同焦点距離は 45mm で、ニコンの CFI60 系は 60mm である^{*10}。

合焦状態で、対物レンズの最前面から試料 (もしくはカバーガラス上面) までの距離を作動距離 (Working Distance) と呼ぶ。10 倍の対物レンズでは作動距離が 10mm 程度であるものも多いが、40 倍程度以上の普通の対物レンズでは 1mm 程度以下となる。

対物レンズによる実像の大きさを視野数といい円形の像のミリメートル単位の直径で与

^{*10} ニコンも、CFI60 以前の取り付けねじが RMS のものは同焦点距離 45mm であった。

えられている。多くの対物レンズの視野数は 22~26mm 程度である。視野領域の外側にも像は広がっているが像の質は保証されていない。

合焦状態で、光軸と対物レンズの最前面の最外周を通過する光束との間の角を見込み角とよび、その正弦値 ($\sin \theta$) を開口数 (numerical aperture:NA) と呼ぶ。見込み角は最大でも 90° であり、開口数は 1 未満の値となる*¹¹。開口数は顕微鏡の分解能に直結する数値である。

3 顕微鏡分解能

顕微鏡の拡大倍率を上げれば小さな構造も鮮明に観察できると思われがちだが、光が波動性を有しているために、観察に用いる波長程度より微細な構造は、いくら拡大倍率を上げてぼやけてしまって細部を分離できない。顕微鏡がどこまで微細な構造を正しく拡大できるかを示すものが分解能である。

3.1 垂直入射光による周期的縞構造の観察時の分解能

光の波動性が顕微鏡の分解能とどのように関係しているかを透過回折格子のような周期的構造の観察を使って説明する。照明光は光軸に平行な平行光線である。このような光線を透過型回折格子に当てると、出射光はそのまままっすぐ透過する 0 次光に加えて、 ± 1 次、 ± 2 次……の回折光が生じる。0 次光の方向は回折格子の格子間隔には依存しない。それに対して 1 次以上の回折光の方向は格子間隔に依存して変化する。このことは、回折格子の周期に関する情報は 1 次以上の回折光にしか含まれていないことを示唆している。実際、対物レンズに 0 次光のみが入射し、1 次以上の回折光は対物レンズの外側に逃げてしまう場合には縞模様のない均一な明るさの像が見えるのみで、あるはずの周期構造は見えない。縞構造を観察するためには、最低でも 1 次の回折光が対物レンズに取込まれている必要がある。

回折格子の周期を d とすると、波長 λ の光の 1 次の回折角は $\sin \theta = \lambda/d$ で与えられる。この式と、対物レンズの NA の式を組み合わせると、NA 値と観察できる最小の周期 d

*¹¹ 市販の対物レンズの NA の最大値は、レンズと試料の間に空気がある乾燥系対物レンズで 0.95 程度でこの時の見込み角は 70 度を超えている。対物レンズと試料の間を屈折率 n_i の媒体で充填した場合 (油浸観察) には開口数は $n_i \sin \theta$ となり、最大値は 1 より大きくなる。屈折率 1.51 の油を用いる液浸対物レンズで 1.45 程度である。液晶の組織観察ではホットステージを用いる場合は油浸観察はできない。

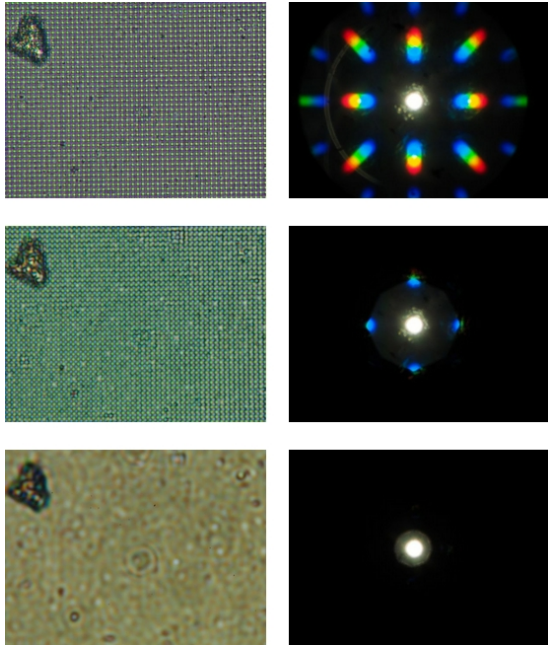


図 5: 回折スポットと画像の関係

の間に

$$d = \frac{\lambda}{NA} \quad (1)$$

という関係式が得られる。これが対物レンズの NA と分解能を結びつけるもっとも簡単な式である。乾燥系の対物レンズで NA の最大値が 1 程度であったことを思い出すと、乾燥系の対物レンズでは観察に用いる光の波長と同じ周期構造までは観察出来ることになる。

図 5 にクロス回折格子の画像と、対物レンズに取り込まれた回折光の関係を示した。回折スポットがはっきり見ている状態では格子もはっきり見えているのが、1 次の回折スポットを遮断すると格子構造が見えなくなる。

3.2 2 点間の分解に関する取扱い

周期的縞構造の議論では、一つの周期性を持った対象を考慮したが、実際の観察物体は決して一つの周期性をもったものではない。液晶を例に考えても、欠陥線やドメイン構造など非周期的なものが多い^{*12}。これらの構造は様々な周波数成分の重ね合せで作り出さ

^{*12} コレステリック液晶やキラルスメクチック液晶などの周期構造もあるけどね。

れている^{*13}。従って、ある周波数以下の成分は分解出来ても、それ以上の周波数成分は分解出来ずに、両者の画像が重なると、細かい部分からボケが生じることが想像できる。

このような場合の取扱いとして標準的に使われているのがレーリーによる分解能定義である。近接する2点からの像は、それぞれの像の中心から広がった画像となり、それらが重なると2点を区別して識別出来なくなる^{*14}。ただし、識別出来なくするという閾強度には物理的な基準は存在しておらず、一般にレーリーにより導入されたピーク強度の0.75倍という定義を用いるのが一般的である。この定義による分解能は次式で定義される^{*15}。

$$d = \frac{\lambda}{1.22NA} \quad (2)$$

3.3 使用条件逸脱による画質の低下

顕微鏡の対物レンズに限らず、全てのレンズ系には理想的な結像からの逸脱（収差）がある。球面収差はその一種で、光軸上の一点から発した光線がレンズにより1点には収束せず、ぼやけた像となる現象を指す^{*16}。球面収差があると、点がぼやけた像になるだけでなく、同じ距離に、荒い周期構造と細かい周期構造があると、周期によりピントのあう位置が異なって、異なる距離にあるように見えてしまう。

顕微鏡対物レンズは、設計された使用条件では球面収差が良好に補正されており、上記のような心配はないが、設計時の使用条件とは異なる使用法では球面収差による画像のぼけが生じる。

4 接眼レンズ

4.1 虚像の倍率

虫眼鏡で物を観察する時、虫眼鏡を物に近づけると、物はほとんど拡大されないが、虫眼鏡を物から離すと像は大きくなる。虫眼鏡の倍率は物体と虫眼鏡の距離に依存するため、条件を指定しないと倍率は定義できない。顕微鏡の接眼レンズも虫眼鏡と同様に虚像を観察するので、表記された倍率はある観察条件のものである。

^{*13} 最初はフーリエ変換すればと書いていたけど、非物理系だとフーリエ変換やってない場合があるので書き換えている。フーリエの説明をどこかでするかは思案中

^{*14} 前提として2点からの光の位相には相関がなく非干渉性であるとしている。

^{*15} 何らかの方法でコントラスト増強をして、谷部分がより明るくても区別できるようにすれば実効分解能は高くなる。Inoueらはビデオ顕微鏡技術はこのアイデアを実現したものである。

^{*16} 収差は光の波動性由来のものではなく、幾何光学の範疇の話である。

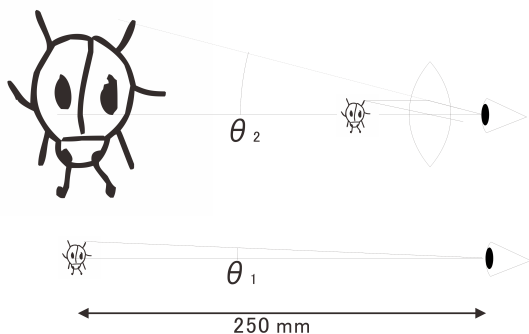


図 6: 虚像の形成、物体が焦点より手前にある場合から焦点位置にあるところまで。

図 6 に虚像の形成の様子を示した。虚像の位置と大きさは物体と凸レンズの距離に依存し、物体がレンズの焦点にある場合には、無限の遠方に無限の大きさ虚像が出来る。虫眼鏡がなしと虫眼鏡越しでの物体の大きさの比で倍率を定義しようとすると無限大が出てきてしまって意味のある定義ができないので、虫眼鏡の倍率は、物体からの光線が目に入る時の角度（視角）により定義される。

虫眼鏡を使わず、裸眼で物を見る場合、同じ物体でも遠方にある時には小さく、近づいてくるとより大きく見える。物の視角は距離に依存し、物が近づけば視角は大きくなっていく。しかし、物体が近づきすぎるとピントを合わせられず、物体をきちんと見ることが出来なくなる。虫眼鏡を使えば目視でピントが合わせられなくなった状態でもピントが合わせられるので、より大きく像を観察できる。目視観察可能な最大視覚と虫眼鏡を使ったときの最大視覚の比を虫眼鏡の倍率であると定義できそうだけれども、裸眼でピント合わせできる最短距離には個人差があるので、虫眼鏡の倍率が人により異なるという事態になってしまう。そこで、まずは、人が虫眼鏡無しで物を見る時にピント合わせができる最短距離を規定する。これが「明視の距離 (least distance of distinct vision)」で 250mm とされている^{*17}。明視の距離という日本語から、この距離だと物がはっきりと見えると説明されることもあるが、これは誤解である。

明視の距離にある物体と凸レンズの焦点位置にある物体の視角の比率から、凸レンズの拡大率はレンズの焦点距離を f (mm) として

$$M_e = \frac{250}{f} \quad (3)$$

^{*17} 若い人や近眼の人はもっと近くでもピントが合うけれども、年を取ってくると 250mm でもピントが合わなくなるので、平均値としては、よい線かなと思う。(人によっては初老になると最短距離がだいぶ伸びてしまって「はなせばわかる 40 代」などと言い出すようになる。

で与えられる。この式によると、焦点距離 500mm の凸レンズの拡大率は 1/2 となる。これは、虚像の倍率定義では、虚像が無限遠方にある状態で行われているためである。500mm の凸レンズを使った場合には、物がレンズから 500mm 離れている状態での観察となり、物までの距離が明視の距離の倍となるためである。これでは、小さく見えるのは当たり前である。実際に虫眼鏡を使って物を見る際には、目の調整機構も使っており、この効果を取り入れると、焦点距離が 250mm 以上の凸レンズでも実物より像が小さくなることはない*18。

4.2 接眼レンズの視野数

接眼レンズの視野は接眼レンズ内部にあるマスクで区切られている。マスクの光学的な直径が接眼レンズの視野数で、最近の研究用顕微鏡では 22 から 26 程度の値である*19。接眼レンズの視野数が対物レンズの視野数より大きいと周辺部分の低画質の画像まで見えてしまうことになり望ましくはない。両者の視野数はマッチしているべきである。

4.3 接眼レンズのアイポイント

接眼レンズに光がきていて全体のピントもあっている状態で、接眼レンズの上にトレーシングペーパーなどの半透明の紙をかざすと、接眼レンズからある距離のところではっきりとした円形の明るい部分が見える。これが接眼レンズのアイポイントで瞳をこの位置に置くと画像を一度に見ることができるが、瞳がアイポイントからずれた位置になると、画像の一部しか見られない。

古い対物レンズではアイポイントは接眼レンズの直上にあり、メガネをかけていると瞳をアイポイントに合わせられないため、顕微鏡観察時にはメガネを外す必要があったが、最近の対物レンズはアイポイントまでの距離があるハイアイポイント仕様になっており、メガネをかけた状態でも画像を一度に見ることができる。

一方でメガネをかけていない状態では、接眼レンズから離れた位置に目があるため、目の位置が固定できずに観察がしにくくなる場合もある。最近の対物レンズではゴム製の目当てがあるので、それを使えば目の位置を安定させて観察できるようになる。

*18 「続光の鉛筆」にルーペに関する話があり、そこでは小穴による解説を引用する形でルーペの倍率に関する記載がある。

*19 光学的な直径と記したのは、接眼レンズのマスクが視野レンズの後ろにある場合はマスクの物理的な直径と実際に観察できる領域が異なるため。接眼レンズの視野数はマスクで決まっており、その外側はまったく観察できない。

4.4 目盛り付き接眼レンズ

対物レンズの結像位置（即ち接眼レンズの物体位置）に目盛り付きのガラス板を入れると、試料像と目盛りが重なって観察できる。目盛りの種類として、偏光顕微鏡に欠かせない十字線タイプのもの他に、写真撮影用の撮影領域を示す範囲が示された物などがある。

5 明るさ・合焦範囲・視野

5.1 明るさ

観察時の画像の明るさは倍率の 2 乗に反比例する。これは、試料面のある面積の領域が対物レンズの結像面では倍率の 2 乗倍の面積となるためである。倍率が同じ対物レンズなら NA が大きい方が明るくなる*²⁰。これは、より広い角度の光束がレンズに取り込まれるため、明るさは NA の 2 乗に比例する。

5.2 合焦範囲

顕微鏡観察時に正確なピント位置からのズレがあっても画像として許容できる範囲がある。液晶観察などの乾燥系では mm 単位で以下の式となる。

$$T = \frac{1}{2} \frac{\lambda}{NA^2} + \frac{0.34}{mNA} \quad (4)$$

ここで、 m は観察倍率である。高倍率の対物レンズほど、開口数も倍率も大きいため合焦範囲は狭くなる。この式は対物レンズの NA が小さく拡大率が低いほど目視で焦点があっていると判断される領域が広くなることを示している。目視観察においては、その通りなのだけれども画像記録する場合には、画像観察ではピンボケ写真となる場合があるので、画像を拡大してきっちりとピント合わせする必要がある*²¹。

*²⁰ ただし、照明側の NA が対物レンズの NA と同程度以上である必要がある。

*²¹ 式には目の調整機能による部分も含まれているけれども、写真撮影ではその部分がないためだと思う。

5.3 視野範囲

実際に観察される領域は (接眼レンズの視野数/対物レンズの倍率) により求められる。たとえば、10 倍の対物レンズと視野数 20 の接眼レンズの組み合わせでは、実視野の直径は 2mm で、対物レンズを 20 倍とすると 1mm になる。

6 顕微鏡照明

最近の顕微鏡は照明系も備付けられているため、照明光学系を自分で組み立てる必要はなくなっている。透過型顕微鏡の照明系は光源-集光光学系 (コレクタレンズ)-視野絞り-開口絞り-集光レンズ (コンデンサレンズ) で構成されている。コンデンサには開口絞りがあり、照明光の NA を調整できる。研究用顕微鏡ではコンデンサレンズには上下移動機構がある。また、標準用途以外のコンデンサがオプションで用意されている。

顕微鏡照明には、視野内部を均一に、任意の NA 値で照明できることが望ましいが、ホットステージとの組み合わせで照明範囲と NA の調整が可能なシステムは少ない。

6.1 光源

顕微鏡の光源にはタングステンハロゲンランプが主流であった^{*22}。最近では LED 光源のものも多くなっている。また、輝度が必要な場合はキセノン放電灯、紫外励起や緑の単色光が必要な時には超高圧水銀灯が用いられる^{*23}。

ハロゲンランプを光源とするものでは、顕微鏡により光源の位置調整機能があるものと、位置は固定されており調整機構がないものがある^{*24}。

*22 研究用顕微鏡では 12V50W または 12V100W のものが多い。ランプを交換するときには、素手でランプ表面に触ってはいけない。ランプ表面に皮脂が付着するとランプ点灯時の熱で焼けてランプ光量を下げ原因となる。表面に触ってしまったら、アルコール系の溶媒で表面を清掃する。

*23 最近では紫外光源としても LED が使えるようになっている

*24 メーカーの言うことを信じると、位置が固定されているものでは、指定の電球をそのまま取り付ければ、正しい位置になるはずだけれども、使い手の中には電球の足を曲げて位置の調整をする人もいるので、メーカーの言うことを信じすぎない方が良くかも知れない。

6.2 集光レンズと視野絞り

集光レンズは光源からの光を集めて、コンデンサの開口絞り位置に結像するためのレンズである。視野絞りは集光レンズの付近にある虹彩絞りで、ケラー照明では視野絞りにより試料面での照明範囲を制御できる。

6.3 フィルターと拡散板

集光レンズと光源の間にフィルターや拡散板を入れる場所がある。標準で、ND フィルター、色温度変換フィルター、グリーンフィルター、拡散板などが用意されている。ND フィルターは光量を下げると照明光の色味が変わってしまうので、色味は変えずに ND フィルターで光量を下げることが行われていた。しかし、偏光顕微鏡では、偏光板により光量のロスがあるため、ND フィルターを入れなければならない状況になることは少ない。

グリーンフィルターは擬似的に一つの色で観察したい場合に用いる。ただ、附属のグリーンフィルターは帯域が狭くはなく単色光が必要な用途には適さない。

拡散板は光を拡散するためのもので、コノスコープ観察時に用いると、電球のフィラメントの像が重なるのを抑制出来る。

これらのフィルター系とは別に、照明光路の何処かに熱線カットフィルターが入っている場合がある。これは近赤外光による目の損傷を避けるためのものであるが、長波長側の光が減衰するため、分光測定では問題になることがある。逆に、顕微鏡の光による液晶試料の昇温が問題になる場合には、強めの熱線吸収フィルターを入れる。

6.4 コンデンサレンズ

ステージの直下にある集光レンズをコンデンサレンズと呼ぶ。コンデンサには絞り（開口絞り）が装着されている。開口絞りの開閉により、コンデンサの NA を調整出来る。

研究用偏光顕微鏡にハネノケコンデンサが標準装着されていることが多い。このコンデンサは、上部のレンズ（上玉）がスイングアウトできる。上玉を入れると最大 NA が 0.9 程度、コンデンサの作動距離は 1mm 程度、上玉を外すと最大 NA が 0.2 程度で作動距離はかなり長くなる^{*25}。ホットステージを使う場合には上玉を外す。

*25 それ以外のコンデンサについては次章で扱う。



図 7: 偏光顕微鏡に標準的に装着されていることの多いハネノケコンデンサ。上玉を外した状態と光路に入れた状態。

6.5 透過照明

透過顕微鏡の照明方法として生物系の書籍で紹介されるのが、「散光照明」「クリティカル照明」「ケラー照明」の3種類である。一方、鉱物系の偏光顕微鏡の書籍ではオルソスコープ観察用 (orthoscopic) とコノスコープ観察用 (conoscope) の照明手法が示されている。生物系と鉱物系（および液晶系）では照明方法がまったく異なっている。

ここでは、生物系書籍に従った照明手法の解説をおこなう。鉱物系の照明方法についてはこの章の後半で改めて取り上げる。

6.5.1 ケラー照明

照明の NA は、像の明るさだけでなく分解能やコントラストにも影響する。照明の NA は調整できる必要がある。また、観察領域以外に照明光が当たると、そこからの散乱光によりコントラストが低下するので、照明範囲を制御できる必要もある。照明領域の光強度ムラは観察や写真撮影の支障となるので照明には均一性も求められる。照明の NA と照明範囲を独立に調整でき、また均一性の条件をバランスよく満たしているのがケラー照明で研究用顕微鏡に標準で実装されている^{*26}。

ケラー照明のポイントは2つで1番目は視野絞りの像が試料面に結像することで、これはコンデンサレンズを上下に動かして調整する。この調整ができていれば、視野絞りにより試料面の照明範囲が正確に調整できうる。

2番目のポイントは光源像をコンデンサレンズの開口絞位置に結像することである。これは照明用のランプと集光レンズの距離を調整して行う^{*27}。開口絞はコンデンサレンズ

^{*26} ただし、きちんとしたケラー照明になるには最低限の調整が必要である。

^{*27} プリセット顕微鏡ではこれは調整された状態にあることになっている。

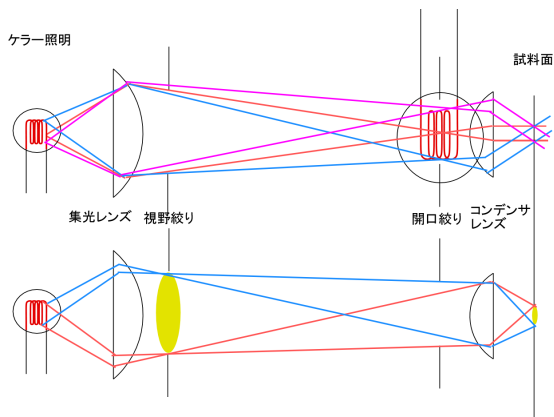


図 8: ケラー照明。上はランプ像に着目しており、下は視野絞り像に着目している。

の光源側の焦点位置にあるので、開口絞位置で結像した光の中心部分は光軸に平行な光線として、周辺部分に結像した光は斜入射の平行光線として試料に照射される。したがって開口絞りにより照明光の NA を制御できる。ケラー照明の光路図を図 8 に示す。

6.5.2 臨界照明と散光照明

図 9 にクリティカル照明と散光照明の光路図を示した。光源像を集光レンズとコンデンサレンズで試料面に結像する配置は臨界照明 (critical illumination) と呼ばれている。光源がそのまま試料面に集光するので、光は効率良く試料面に到達するが、電球のフィラメントがそのまま結像するため、試料像とフィラメント像が重なって見える。臨界照明では視野絞り像は試料面には結像しないので、照明範囲は正確には制限できない。開口絞りの調整により照明の NA はある程度の範囲で制御できる。

コンデンサレンズの焦点位置が試料面とは著しく異なるところにある場合は、試料面で照明光束は大きく広がる。明るさは均一であるが、照度は低く、低 NA での照明となる。このような照明は散光照明 diffuse illumination と呼ばれている。

7 偏光顕微鏡

偏光顕微鏡は複式顕微鏡の一種で通常の顕微鏡に偏光観察のための部品が取り付けられている。以下、個々の部品について紹介する。

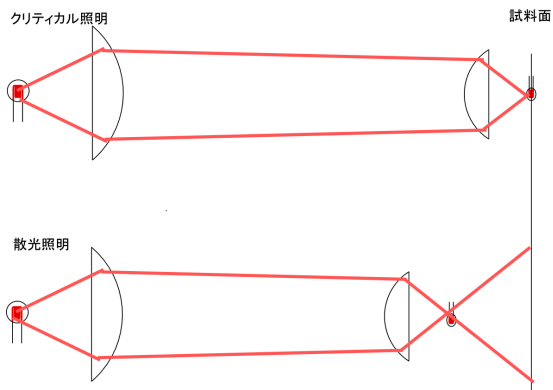


図 9: クリティカル照明と散光照明

図 10: (a) ニコン Optiphot の偏光子、半固定でメモリはついていない。(b) オリンパス BH2 の偏光子。メモリがあり回転できるようになっている。(c) オリンパス BX の偏光子。(d) ニコン Optiphot の検光子 ……

7.1 偏光子と検光子

偏光子は照明側、検光子は観察側にある偏光板の名称である。偏光子はコンデンサレンズの下方にあり、コンデンサレンズと一体になっているものやコンデンサホルダーに取り付けられているものもある。偏光子の方位は半固定の機種もあるし、目盛り付きの枠に入っていて回転できる機種もある。検光子は後述の位相差板と接眼レンズの間にあり、軸方位を回転でき、透過軸の角度が分かるように目盛りが付いている。また回転用のノブを引くなどして光路から検光子を外せるようになっている。

偏光子と検光子は、試料が入っていない状態で光が透過できず暗視野となるように、偏光子の透過軸に対して検光子の透過軸の方位が 90 度になるように調整されているべきである。この状態をクロスニコルと呼ぶ。クロスニコルからのずれがあると、コントラストが低下したり、偏光による着色がクロスニコルと異なってしまう。使用前にはクロスニコル状態であることを確認するとともに、使用中はクロスニコル状態からずらさないように注意する。



図 11: $\lambda/4$ 波長板と鋭敏色板。ニコンの製品（上）は一つの板に両方ついていて本体に付属している。オリンパスはオプションで別々に供給されている。

7.2 位相板

対物レンズと検光子の間に位相差板を入れるホルダーがある。標準的な位相差板には $\lambda/4$ 板 (Quarter Wavelength Retardation Plate)、鋭敏色板 (sensitive color plate, sensitive red plate, First Order Reterdation Plate) がある。

7.2.1 $\lambda/4$ 板

位相差が基準波長の $\lambda/4$ の位相差板。基準波長はナトリウムの D 線 (589.3nm) のものは位相差 147nm、水銀の e 線 (546nm) のものは 137nm である。光軸は偏光子の軸から 45 度である。 $\lambda/4$ 板は試料の複屈折の符号を調べるのに用いられる。また、 $\lambda/4$ 板と検光子を組み合わせると、円偏光板となるので、観察している光が円偏光であるかの確認や円偏光の左右の決定できる。

7.2.2 鋭敏色板

位相差が 530nm~580nm 程度の位相差板。この位相差付近で青色光と赤色光の比率が変化して、色調が赤から赤紫を経て青へと大きく変化する。このため複屈折の小さな試料と重ねると、明暗のコントラストを色調のコントラストに変換して観察できる。また、試料の複屈折の符号も調べられる。

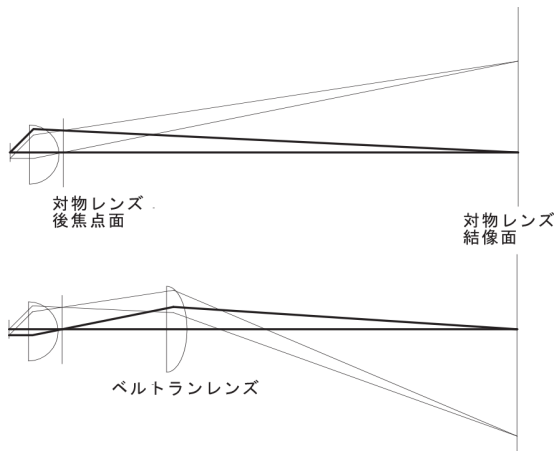


図 12: ベルトランレンズによる光路変化。入っていない状態（上）では試料面の像が接眼レンズ位置に結像するが、ベルトランレンズを入れると、試料をある角度で平行に透過した光が、角度に応じた位置に結像するようになる。。

7.3 ベルトランレンズ

対物レンズと接眼レンズの間に挿入されるレンズで、図 12 に示すように、対物レンズ後ろ焦点面の画像を接眼レンズのピント位置に集光する。コノスコープ観察に用いる。

対物レンズにより後ろ焦点面の位置が異なるため、きちんとしたピント合わせを行うためにはベルトランレンズの移動機構が必要である。しかし、機種によってはベルトランレンズの位置が固定のものもある。そのようなものではベルトランレンズのレンズ径が小さく、ピントの合う範囲を広くしてある。

ベルトランレンズのない顕微鏡でも、接眼レンズを外して覗き込むと小さなコノスコープ像を観察できる。位相差顕微鏡の調整に用いるセンタリングテレスコープを使うとコノスコープ像を拡大できる。

7.4 回転ステージ

偏光顕微鏡のステージには回転ステージが標準的に装着されている。顕微鏡によっては、回転ステージの芯だし機構がある。また、特定の角度毎にクリックする機構がついたものもある。



図 13: 左側から普通の 20 倍対物レンズ、長作動 (ELDW) 対物レンズ、超長作動 (SLDW) 対物レンズ。取り付け面からピントがあう位置までの長さは同じ。

7.5 芯だし機構付きレボルバー

偏光顕微鏡のレボルバーは対物レンズの芯だし機構がついたものが多い。芯だし機構はステージを回転しても、観察対象物の位置が動かなくするためのものである。実習用クラスの偏光顕微鏡では、芯だし機構がついていないものも多い。

7.6 対物レンズ

偏光顕微鏡の偏光子と検光子の間にある光学素子は歪みがなく偏光を乱さないものである必要がある。このため、「P」表記のある偏光顕微鏡用の低歪み対物レンズも用意されている。ホットステージを用いる場合は、倍率 20 倍以上の偏光用対物レンズは作動距離が不足するために偏光顕微鏡用の対物レンズではなく、作動距離が 10mm 程度以上はある長作動対物レンズを用いることになる。

8 オルソスコープ観察とコノスコープ観察の照明

組織観察のような通常の観察をオルソスコープ観察という。非偏光の通常の顕微鏡観察では、観察時に照明の NA を対物レンズに合わせて大きな値とするが、オルソスコープ観察では低 NA の平行光線のような照明が推奨される。これは、斜入射光では実効的な光路長や複屈折が変化し、偏光色の色調が変化するためである。

コノスコープ観察では、様々な角度で試料を通過した光束の状態変化を一度に観察するため、対物レンズと同じ NA での照明が求められる。ケラー照明では、コノスコープの像

面と光源像が重なるので電球のフィラメントが重なった画像となる。均一で明るいコノスコープ像はクリティカル照明で得られる。

偏光顕微鏡のテキストでは、ハネノケコンデンサを用いて、オルソスコープでは上玉を外し、コノスコープでは上玉を入れるように記載してある。上玉を外した状態では、コンデンサの NA は低く、またコンデンサの焦点面は試料面よりかなり上になり、散光照明になっている。上玉を入れた状態で、コノスコープが均一で明るい照明だったならクリティカル照明か、それに近い状態になっているけれども、オルソスコープ時には、上玉を外しているので問題にはならない。

生物系と鉱物系で照明に関する記述が根本的に異なっているのは、生物系が主に低コントラストで微細なものを観察対象としているのに対して、鉱物系はコントラストがあり、そこそこの大きさのものが観察対象であるためではないかと思う。生物系では偏光色は問題にならず、微小な複屈折物体の観察が主題であるため、偏光顕微鏡でもケラー照明が行われている。

9 偏光顕微鏡の日常調整

9.1 偏光子と検光子の角度調整

試料を入れるまでに、偏光子と検光子の軸がきちんと直交しているかを確認しておこう。明確な理由がない限りは偏光顕微鏡はクロスニコルで使うようにする。等方性での試料確認などでクロスニコルだと暗くて見づらい場合には、 $\lambda/4$ 位相板を入れれば明るくなる^{*28}。クロスニコルをずらしてしまい、それに気がつかずに液晶相に入ると見えているものに誤った解釈をする危険性がある。

検光子の可動範囲が $0^\circ \sim 180^\circ$ の機種では、 90° が消光位になるように調整しておく、ねじれ構造などの判別時に検光子をプラス側にもマイナス側にも変化できるので操作がやりやすくなる。

9.2 接眼レンズの視度調整

双眼鏡筒の一方に内部に目盛り線等のある接眼レンズを用意し、その目盛りがはっきりと見えるように接眼レンズを調整する。その状態で目盛り線のある側で試料にピントを合わせる。続いて、もう一方の接眼レンズ側でもピントが合った状態になるように視度調整

^{*28} 鋭敏色板を入れるのでもかまわない。どちらにするかは趣味の問題だ。

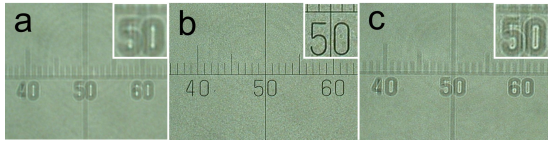


図 14: 視度調整を行って接眼レンズのメモリがはっきり見えるようにする。

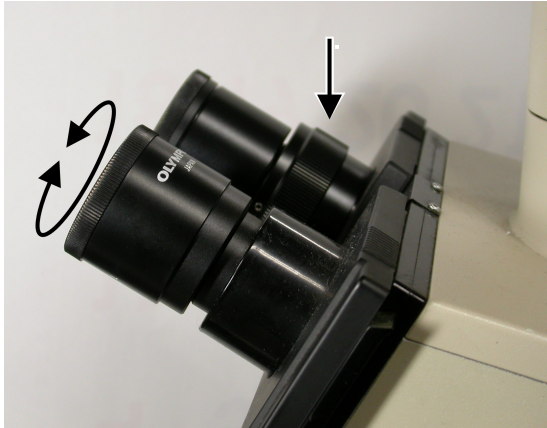


図 15: 視度調整には接眼レンズを回したり鏡筒のリングを回して光路長を変えて行う。

を行う。これにより両眼視で両方の目でピントが合った画像が観察できるようになる^{*29}。

10 ホットステージ中の試料の観察

室温での顕微鏡観察では試料はスライドガラス上にあり、試料の上にはカバーガラスがあるだけなので、コンデンサレンズも対物レンズもスライドガラスやカバーガラスにはほぼ接するまで近づけることができる。しかし、ホットステージに試料を保持最大状態では、ホットステージのために試料と対物・コンデンサレンズの間にはかなりの空間が必要となる。たとえばメトラー社のホットステージでは対物レンズの作動距離が 10mm 程度以上ないとピント合わせができないし、コンデンサの作動距離が 15mm 程度以上ないとケラー照明が出来ない。

対物レンズに関しては 4 倍程度の低倍率のものは作動距離も長く、ホットステージにそのまま対応できる。10 倍の対物レンズになると、メーカーにもよるが対応できるかは分

^{*29} 両眼視で対象物が立体視できると一部では思われているようだけれども、普通の偏光顕微鏡では左右で同じ画像を見ているので立体視はできない。実体双眼顕微鏡では左右で異なった角度方向からの像を見ているので立体視ができています。

かれるところで、それより高倍率となると、偏光用や通常の対物レンズでは作動距離が不足する。しかし、工業用顕微鏡の超長作動距離対物レンズも考慮に入れると 50 倍で作動距離が 10mm 以上のものがあり*³⁰、この倍率までは、一応はホットステージ中に試料の観察が可能である。

標準のハネノケコンデンサは上玉を入れた状態での作動距離が 1mm 程度でホットステージの組み合わせではケラー照明もコノスコープ用照明も不可能である。上玉を外すと NA が 0.2 程度の長作動コンデンサとなる*³¹。オルソスコープの観察は低 NA（平行光束）で行うものなので、この状態での使用となる。ホットステージとの組み合わせでコノスコープ観察を行う場合には、作動距離が 15mm 以上で、NA が 0.5 程度はあるコンデンサを見つけてきて用いる必要がある。

*³⁰ ただしこれらの対物レンズはカバーガラスがない表面観察用に設計されており、ガラスに挟まれた液晶試料の観察は設計条件外使用となる。詳細は次章参照。

*³¹ きちんと確認はしていないがニコンの旧機種のハネノケコンデンサは作動距離が長すぎて、試料面に視野絞り像を結像できない気がする。