

オリンパス社

イメージングセミナー

【セミナー資料】

2017年1月20日(金)

- 資料の学内限定公開についてはOlympus株式会社の許可を得ておりますが、資料および音声データの二次配布については固く禁止させていただきます
- 問題が発生した場合、全てのセミナーデータを削除し、以降の公開ができなくなりますので、くれぐれもご注意ください

**OLYMPUS**

Your Vision, Our Future

鹿児島大学 遺伝子実験施設 様

# OLYMPUS 顕微鏡セミナー (基礎編)

2016年12月2日

オリンパス株式会社

科学ソリューション営業部 福岡営業G

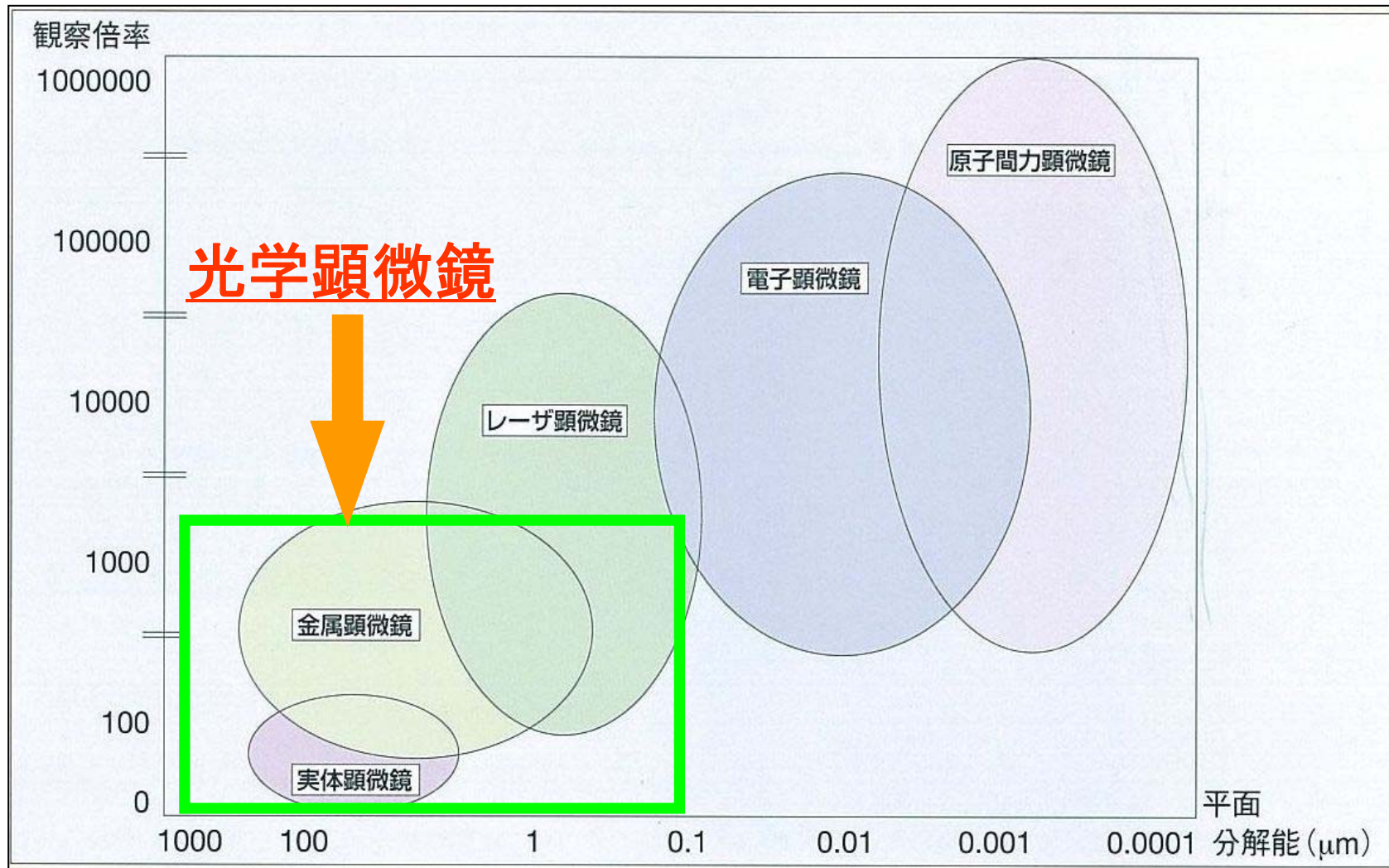
萬治 慶介

# 本日の内容

---

- ①. Introduction: 光学顕微鏡とは
- ②. 光学顕微鏡の分類
- ③. 観察方法
- ④. 対物レンズ
- ⑤. 接眼レンズ

# ① - 1. 様々な顕微鏡



## ① - 2. 光学顕微鏡 ～観察倍率と分解能～

### ■ 分解能(観える最小の大きさは?)

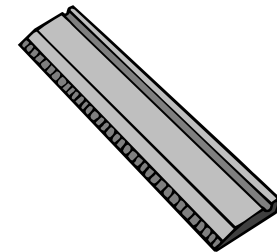
- ヒトの眼 ⇒ \_\_\_\_\_mm (個人差あり)
- 光学顕微鏡の限界 ⇒ \_\_\_\_\_ $\mu\text{m}$

### ■ 倍率(一般的な)

- 接眼レンズ⇒ 10倍
- 対物レンズ⇒ 1.25倍～100倍
- 総合(観察)倍率 ⇒ 1000倍      \* 対物レンズ × 接眼レンズ

### <参考>

- ・線虫 1mm位
- ・マウス受精卵 約100 $\mu\text{m}$
- ・細胞 1～100 $\mu\text{m}$
- ・赤血球 7～8 $\mu\text{m}$ 、大腸菌 0.5～3 $\mu\text{m}$ 、結核菌 0.3～0.6 $\mu\text{m}$



## ②-1. 光学顕微鏡の分類

---

### ◆用途による分類

生物顕微鏡

金属顕微鏡

実体顕微鏡

### ◆形による分類

正立型顕微鏡

倒立型顕微鏡

### ◆観察法による分類

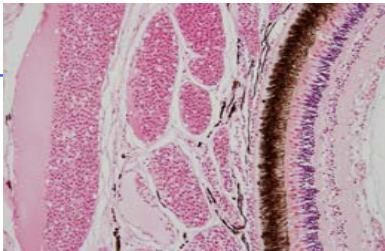
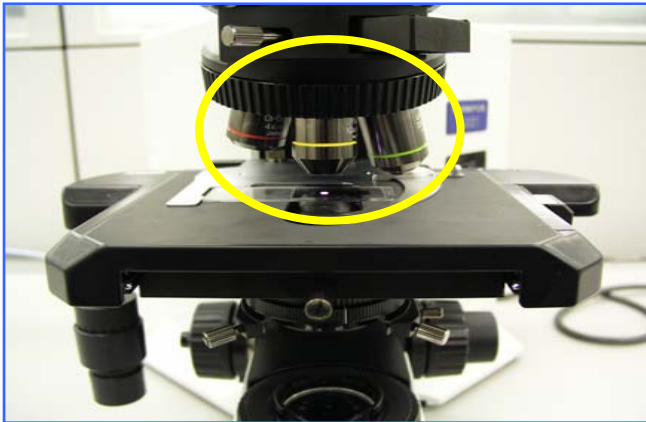
位相差顕微鏡

微分干渉顕微鏡

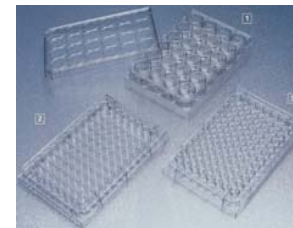
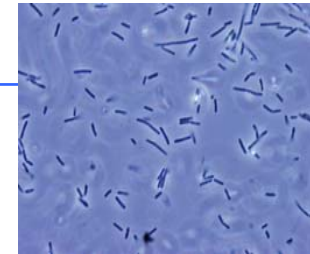
蛍光顕微鏡等

## ②-2. 形による分類 ～対物レンズの向き～

正立:対物レンズ 下向き



倒立:対物レンズ 上向き



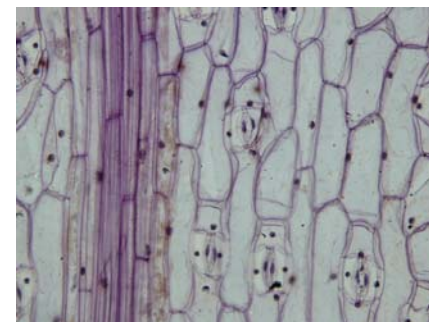
## ③ - 1. 各種観察方法

---

### 明視野観察

染色標本の観察に適する。

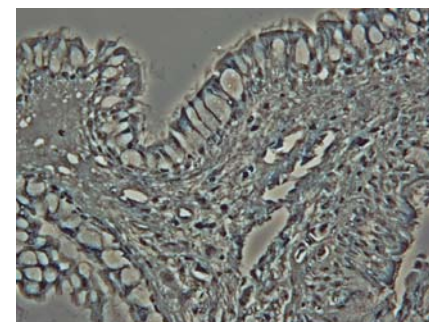
HE染色、ギムザ染色等



### 位相差観察

無色透明の標本観察に向いている。

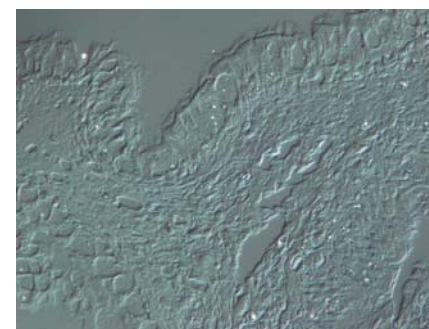
明暗のコントラストをつけて観察する。



### 微分干渉観察

無色透明の標本観察に向いている。

立体感のあるコントラストをつけて観察する。

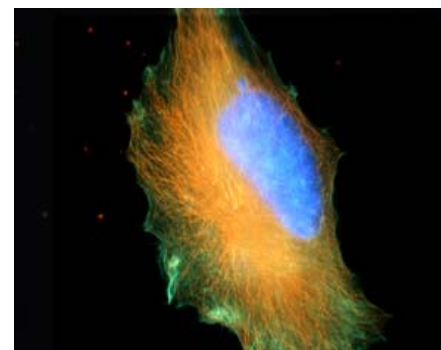




## ③ - 2. 各種観察方法

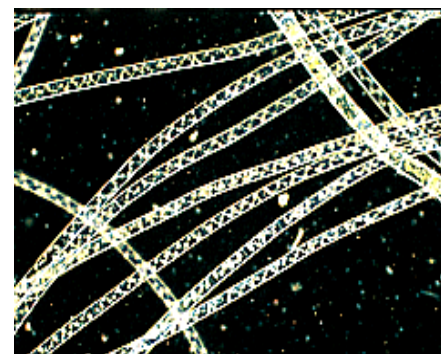
### 蛍光観察

蛍光染色標本の観察に適する。  
バックが暗く、シグナルが明るい。



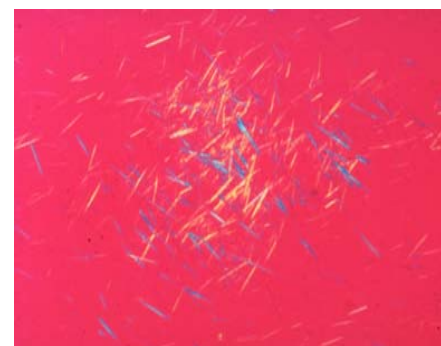
### 暗視野観察

乱反射を観察する。  
微生物・鞭毛等の観察に使われる。

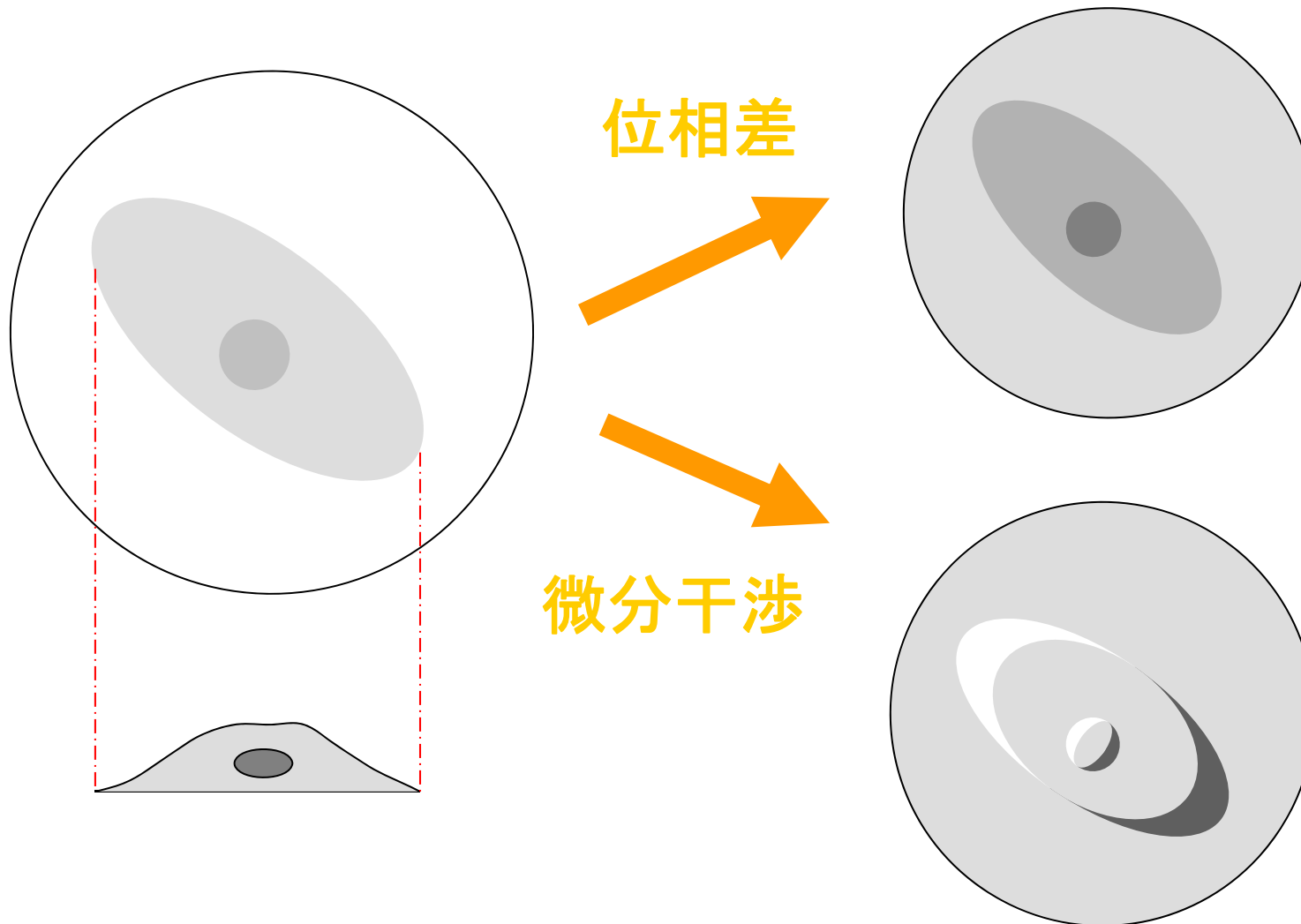


### 偏光観察

偏光性のあるサンプルに向いている。  
アミロイドや痛風観察に使われる。

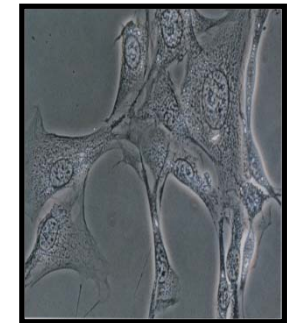


### ③ - 3. 位相差と微分干渉のイメージ

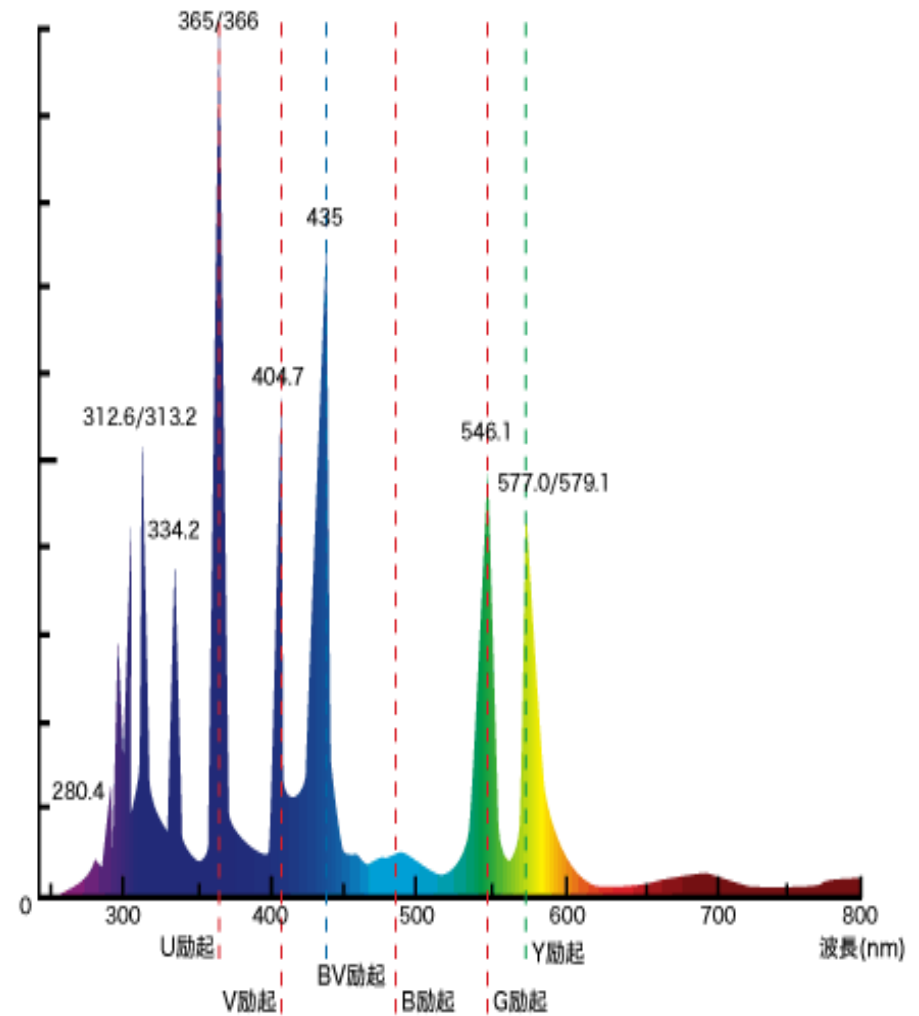
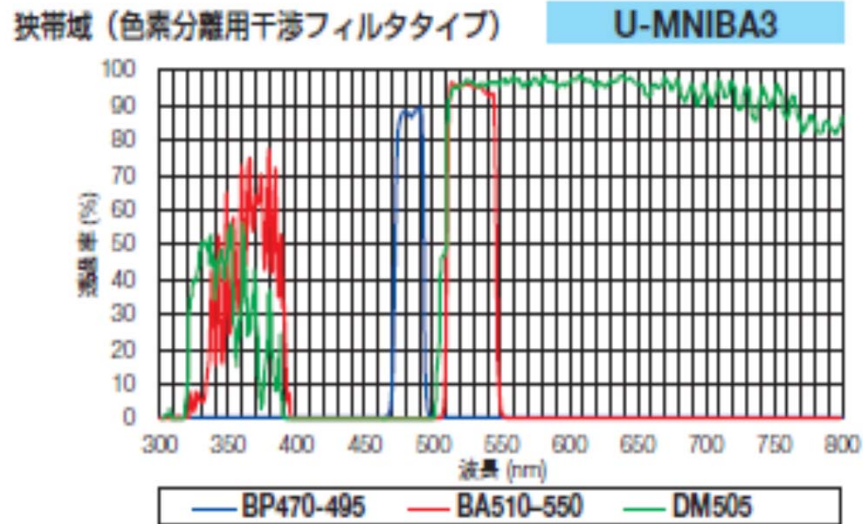
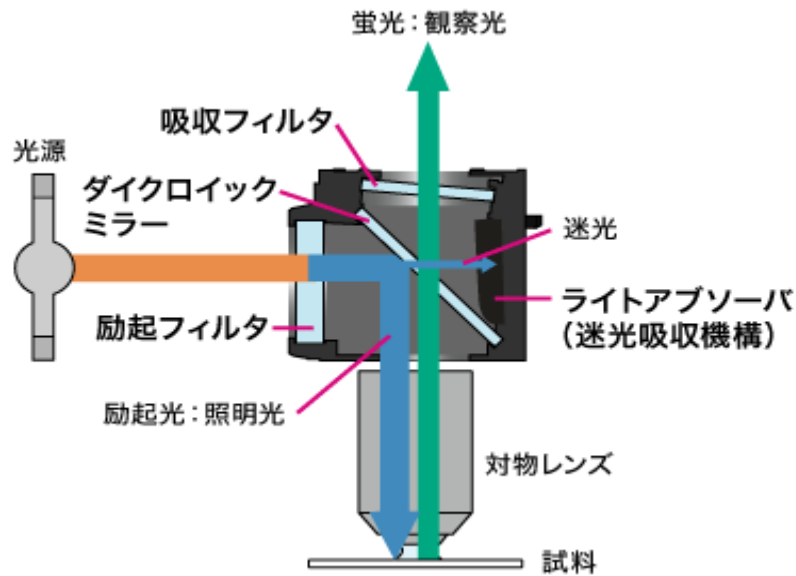


### ③ - 4. 位相差と微分干渉 比較

	位相差観察	微分干渉観察
コントラストのつき方	明暗のコントラスト	立体的なコントラスト
ハロー(散乱光)	強い	弱い
解像力	低い	高い
蛍光との組合せ	暗い	明るい
適した標本	<ul style="list-style-type: none"> <li>・微細な構造に適している</li> <li>・厚みとしては約10<math>\mu</math>m以下が向いている</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・微細な構造から粗大な構造のものまで適している</li> <li>・厚みとしては数百<math>\mu</math>m以下が向いている</li> </ul>
プラスチック容器	OK	NG(⇒レリーフコントラスト)
価格	安価	高価



# 【御参考】蛍光顕微鏡 ミラーユニット



### ③ - 5. <まとめ>光学顕微鏡 ～形状と観察方法～

	正立型顕微鏡	倒立型顕微鏡	実体顕微鏡
形状	標本の下に対物レンズがある	標本の上に対物レンズがある	対物レンズの作動距離が長い
対物レンズ	4、10、20、40、(60、)100×	4、10、20、40、(60、100)×	一般的に1×
接眼レンズ	一般的に10×	一般的に10×	一般的に10×
ズーム変倍	なし	なし	有り
最大倍率	1000×	1000×	115×
明視野	観察可能	観察可能	観察可能
位相差／微分干涉	観察可能	観察可能	観察不可
蛍光	観察可能	観察可能	観察可能
主な利用分野	組織切片標本	培養細胞	小動物の観察、マニピレーション



BX3 シリーズ



OLYMPUS

# <参考>顕微鏡構成ユニット



接眼レンズ



TVアダプタ



鏡筒



レボルバ



フレーム



ランプハウス



クレンメル



蛍光装置



微分干渉装置



対物レンズ



コンデンサ



ステージ

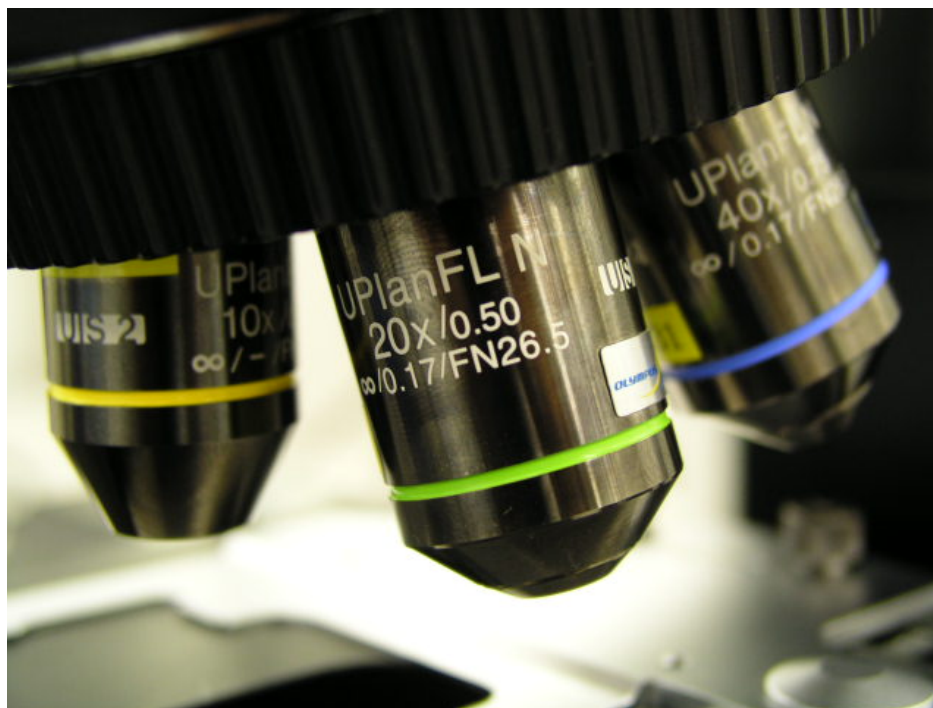


位相差装置

## ④. ★対物レンズ

---

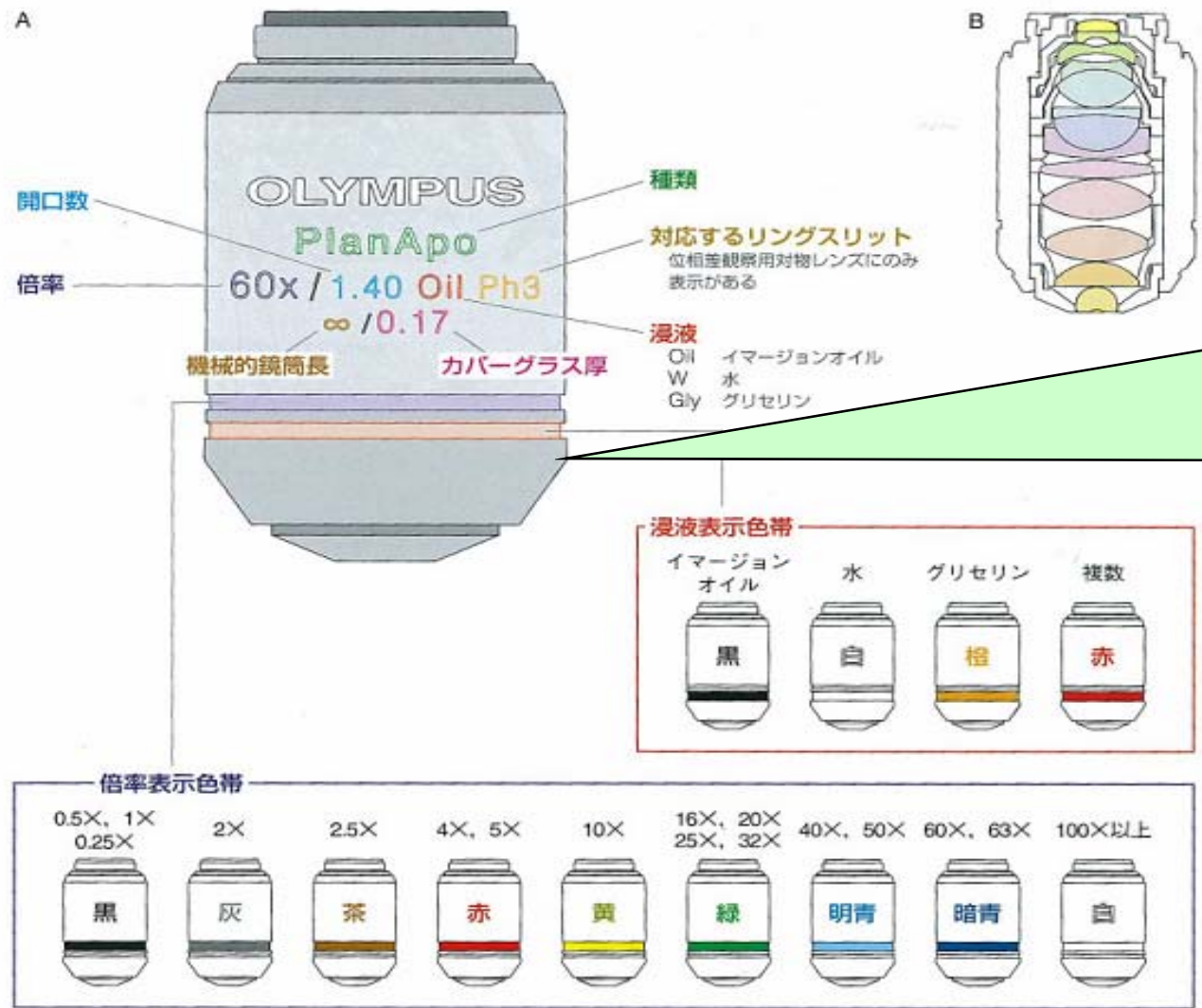
顕微鏡(光学)性能は、**対物レンズ** で決まります。



<キーワード>

開口数(NA)、焦点深度、作動距離(WD)、色収差、浸液

# ④ - 1. 対物レンズ ~表示について~



対物レンズから

- ・解像度
- ・観察方法
- ・使い方  
(浸液、カバーガラス等)

↓

様々な情報が得られます！

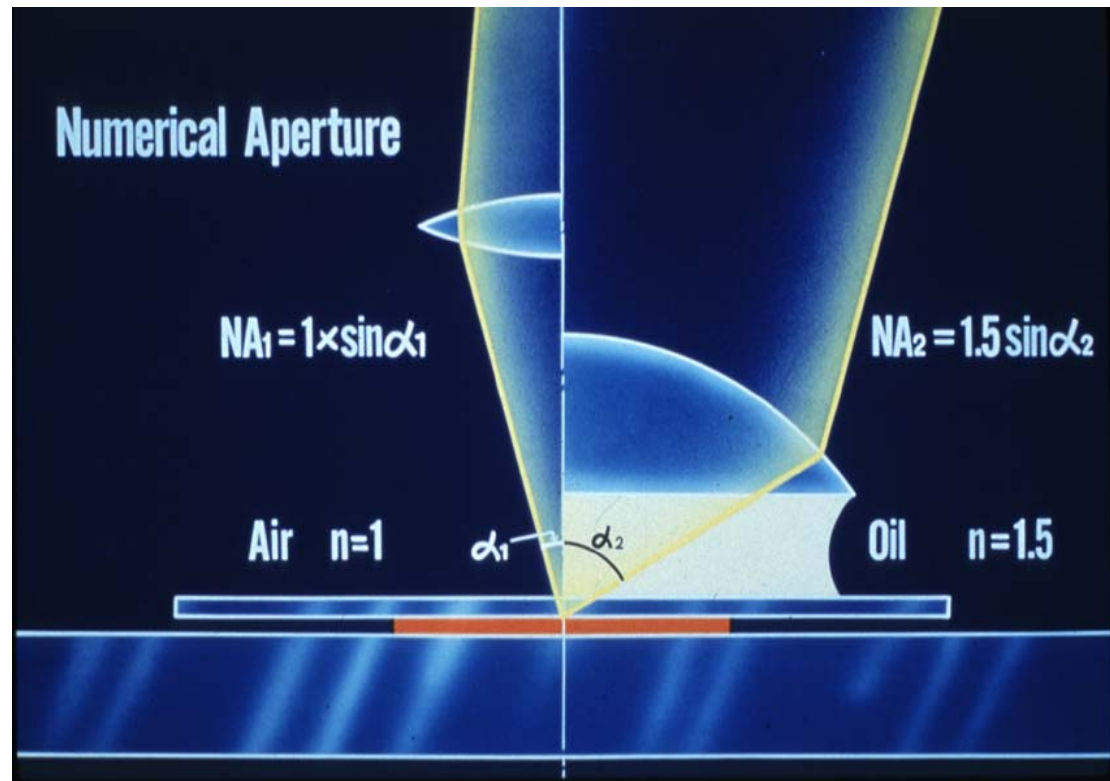
顕微鏡フル活用術イラストレイト(秀潤社)より



## ④ - 2 - 1. 対物レンズ ～開口数～

### ◆ 開口数(Numerical Aperture)

顕微鏡の解像度、明るさ、深度等を決める重要な値。



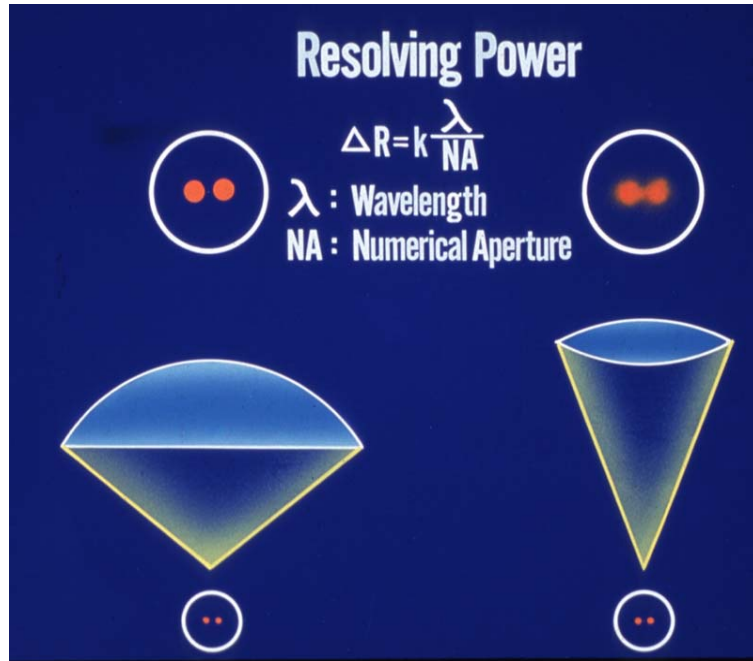
$$NA = \sin \alpha_1 \text{ (乾燥系)}$$

$$NA = n \sin \alpha_2 \text{ (液浸系)}$$

## ④ - 2 - 2. 対物レンズ ～開口数(NA)と分解能の関係～

NAが大きくなると分解能は高くなる

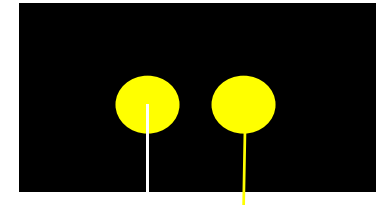
分解能(2点間識別能力)を求める式



開口数が十分

開口数が不足

$$0.61 \times \frac{\lambda}{N.A}$$

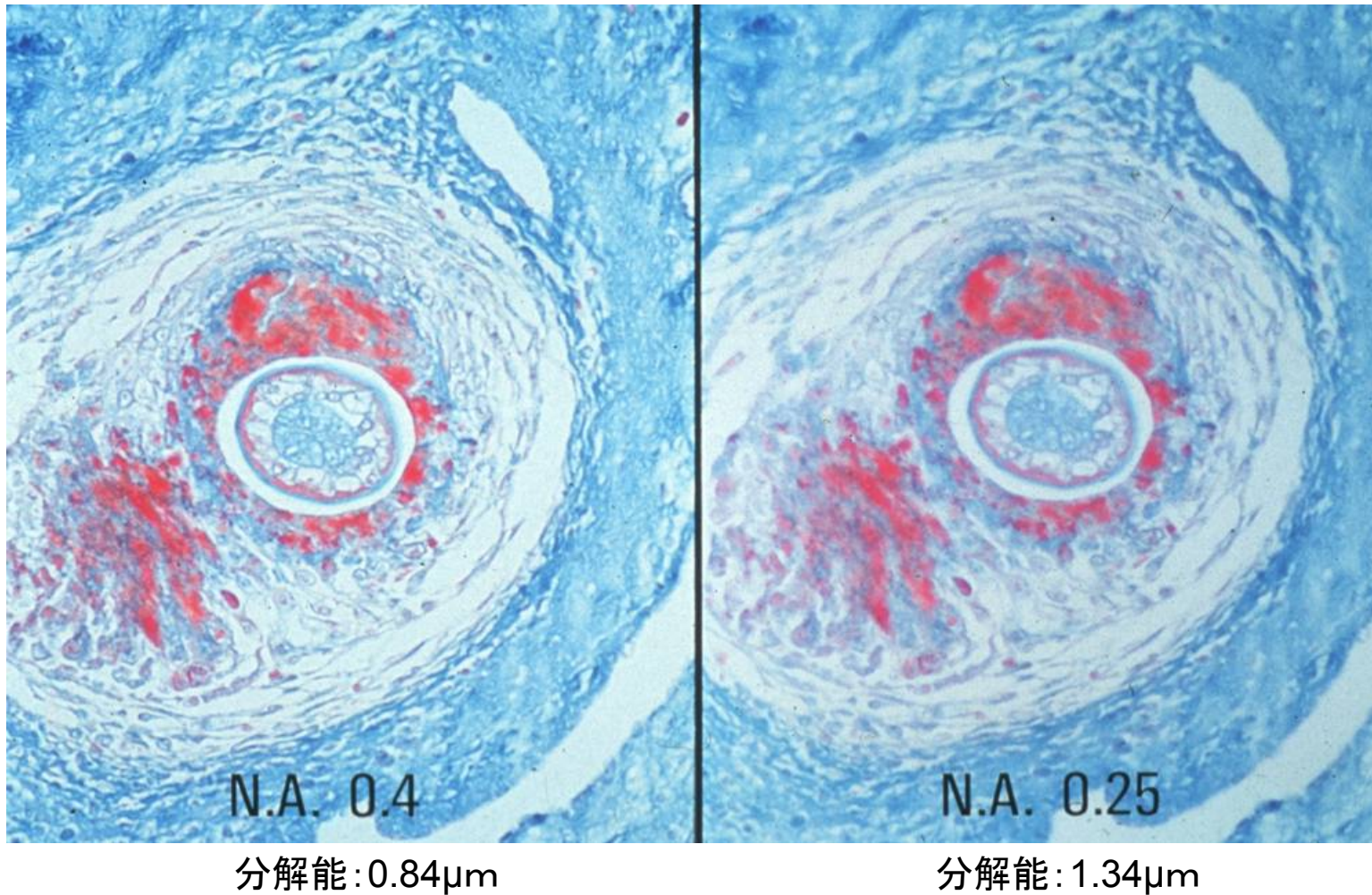


開口数大きい対物レンズで観察すると2点間識別能力は高くなります。

※λ=0.55(基本波長550nm)、NA=1.42(観察最大NA)とすると、  
δ≒0.24μm これが通常の光学顕微鏡の分解能の限界

## ④ - 2 - 3. 対物レンズ ～開口数(NA)の違う画像～

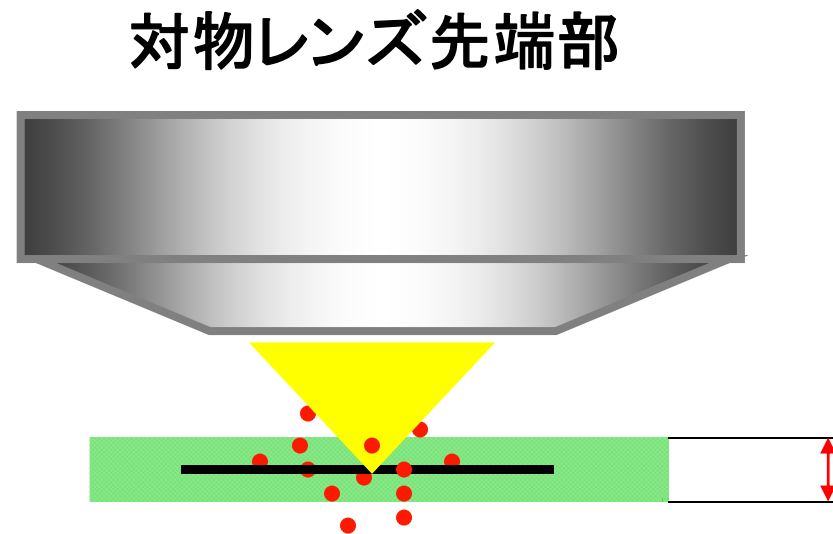
### 10×対物レンズ画像比較



## ④ - 3. 対物レンズ ～焦点深度～

### ◆焦点深度「同時にピントが合って見える上下の幅」

標本中のある物体にピントを合わせると、その点以外の上下にある点も同時に見ることができる。



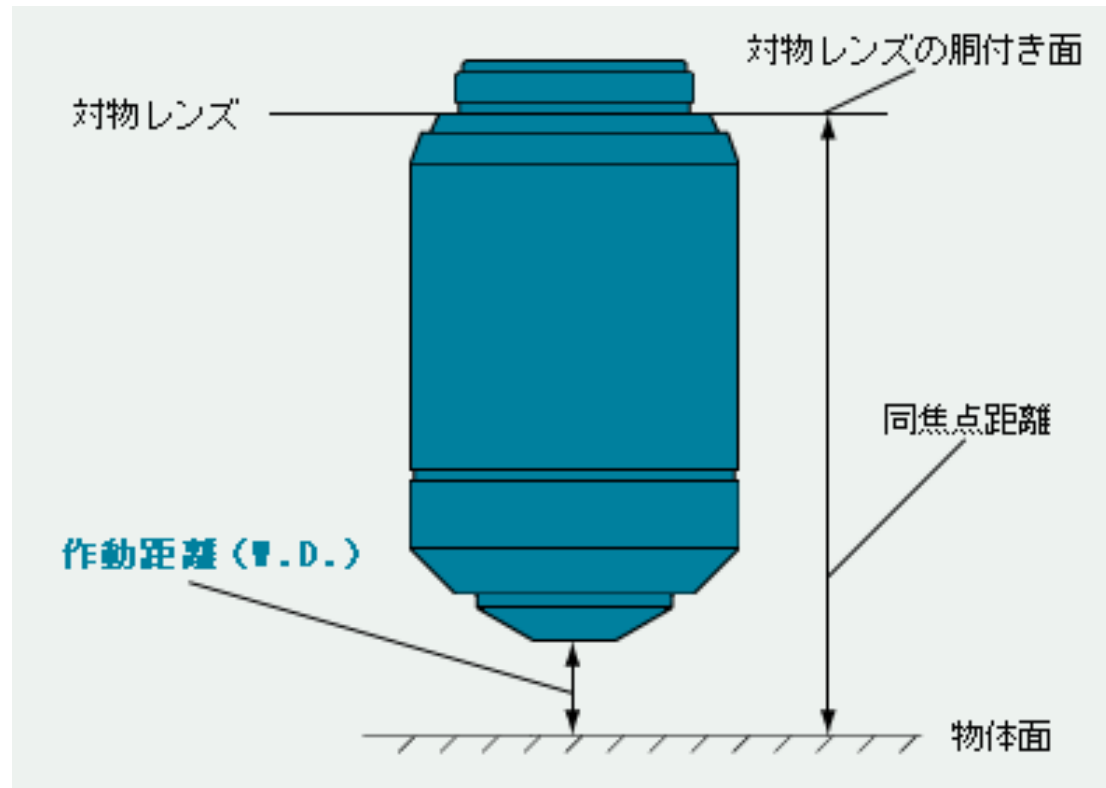
※NA値の大きい方が焦点深度は浅くなります

## ④ - 4. 対物レンズ ～作動距離～

### ◆作動距離(Working Distance : WD)

標本にピントが合っているときの対物レンズ先端と標本上面までの距離

※一般的にWDの長いレンズは、倒立型顕微鏡に用いられるケースが多く、ピント合わせの操作性は良いが、NAが小さい



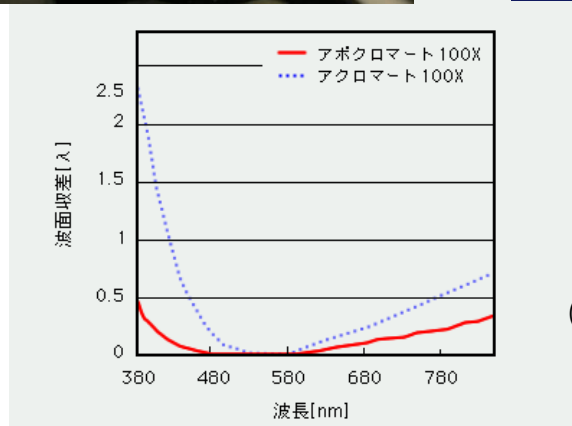
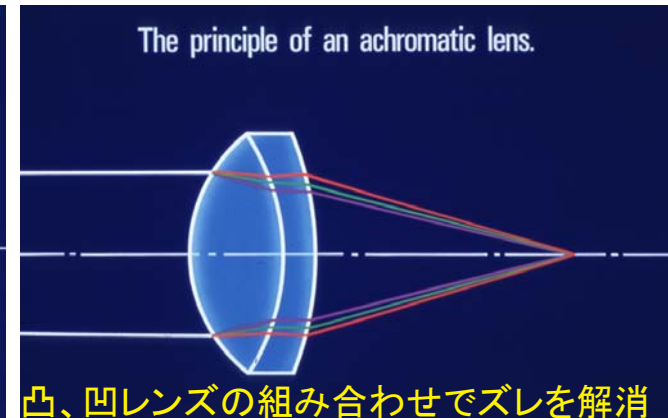
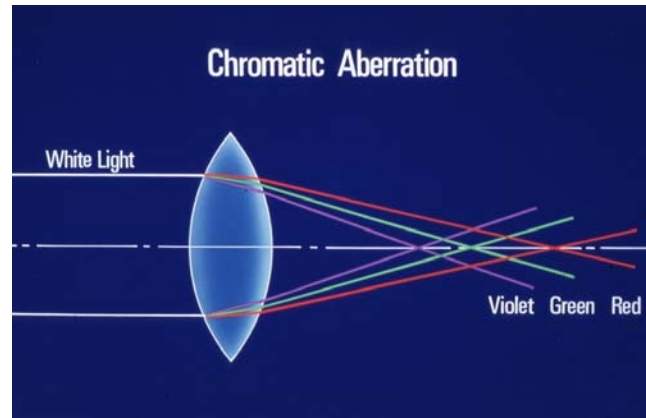
<http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/bio-micro/terms/4.cfm>

## ④ - 5 - 1. 対物レンズ ～プラン、アポクロマート～

### ◆種類名称（メーカーにより表記は微妙に違います）

- ・「Plan（プラン）」：視野周辺までピントが合う（平坦性、フラットネス）。
- ・「Apo (Apochromat)」：最高級の対物レンズ（紫色までの色収差補正、高NA）。

色収差「ガラスの屈折率のため、波長ごとにピントを結ぶ面が違う」



### ①プランアポクロマート

UPLSAPO20× (NA0.75) ¥170,000-

### ②プランセミアポクロマート

UPLFLN20× (NA0.5) ¥69,000-

## ④ - 5 - 2. 対物レンズ ～色収差のレベル～

---

- アクロマート(ACH) ……実習用  
PLN10X (¥41,000 - )
- プラン・セミアポクロマート(FL) ……検査、研究用  
UPLFLN10X (¥61,000)
- プラン・アポクロマート(APO) ……検査、研究用最高級タイプ  
UPLSAPO10X (¥142,000)

アクロマート < セミアポクロマート < アポクロマート

アクロマート : 2色収差補正(赤・青)

アポクロマート : 3色収差補正(赤・青・紫)

## ④ - 6. 対物レンズ ～浸液～

### ◆ 浸液

指定された液体を対物レンズ先端と標本の間に入れないと見えない。  
無表記のものは、浸液を使わない(乾燥系対物レンズ)。

#### ◆ ドライ



#### ◆ オイル



◆ 対物レンズ先端と  
標本上面をoilで満たす。

◆ Oilは必ず使用します

メーカー推奨イメージジョンオイル



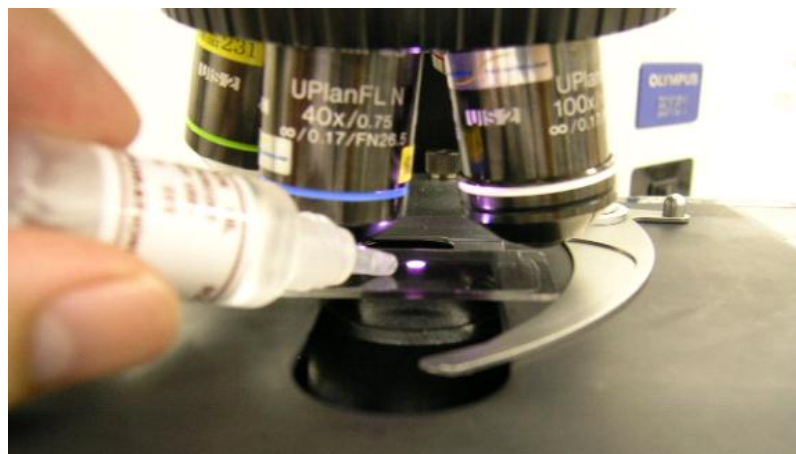
## ④ - 6 - 2. 対物レンズ ～イマージョンオイルの使い方～



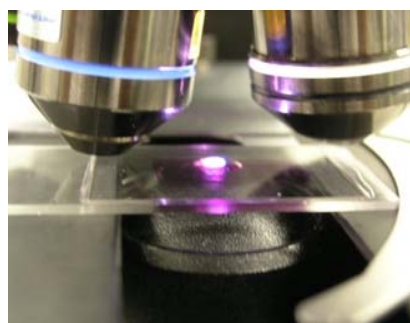
必ずoilをつけて観察します。



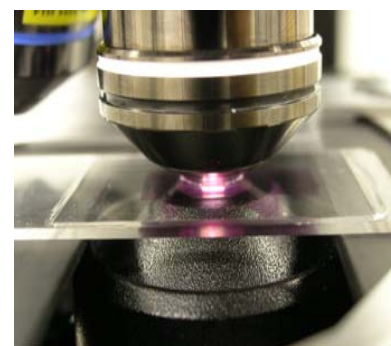
低自家蛍光イマージョンオイル  
※消費期限有り



100Xへ変換するとき、空間ができるのでスライドガラス上に滴下する。(米1, 2粒くらい)



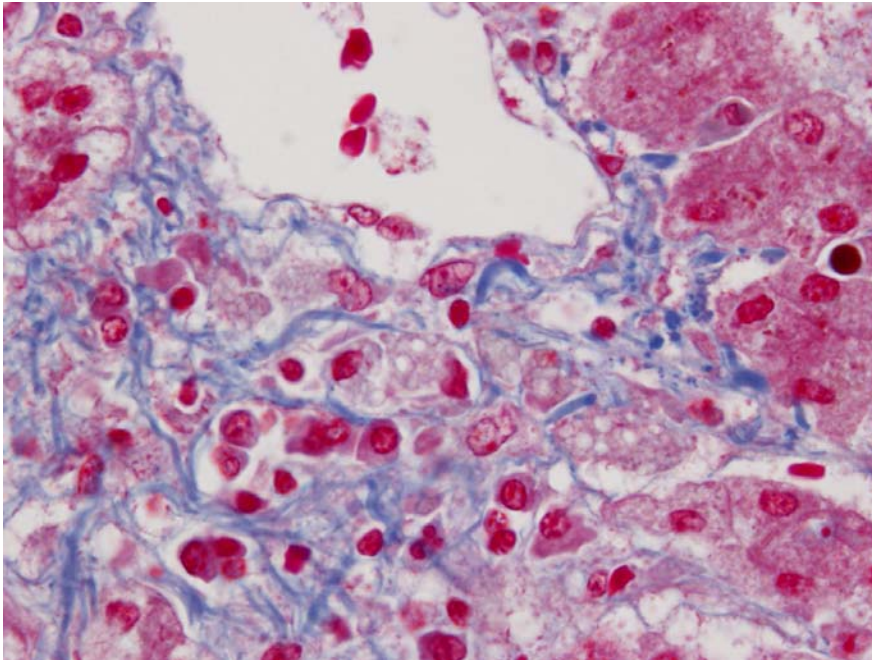
滴下するとオイルが少し盛り上がります。



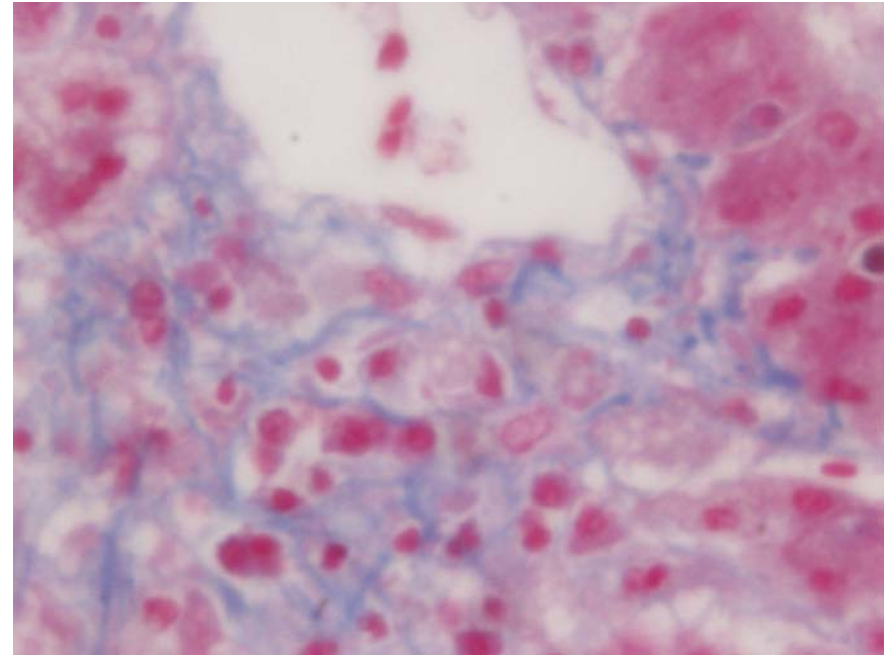
対物先端と標本上面がオイルで満たされます。

## ④ - 6 - 3. 対物レンズ ～オイル対物画像例～

◎ 良い例



× 悪い例



(注) Oilをつけないで観察した場合

## ④ - 7. 対物レンズ ～カバーガラス標本～

### ◆ カバーガラス標本

生物用途における顕微鏡の場合、一般的にカバーガラス(0.17mm)を考慮した光学設計が施されています。

サンプルは組織切片や各種細胞など

カバーガラス:t 0.17mm

サンプル:t 数 $\mu$ m

封入剤

スライドガラス:t 1~1.2mm

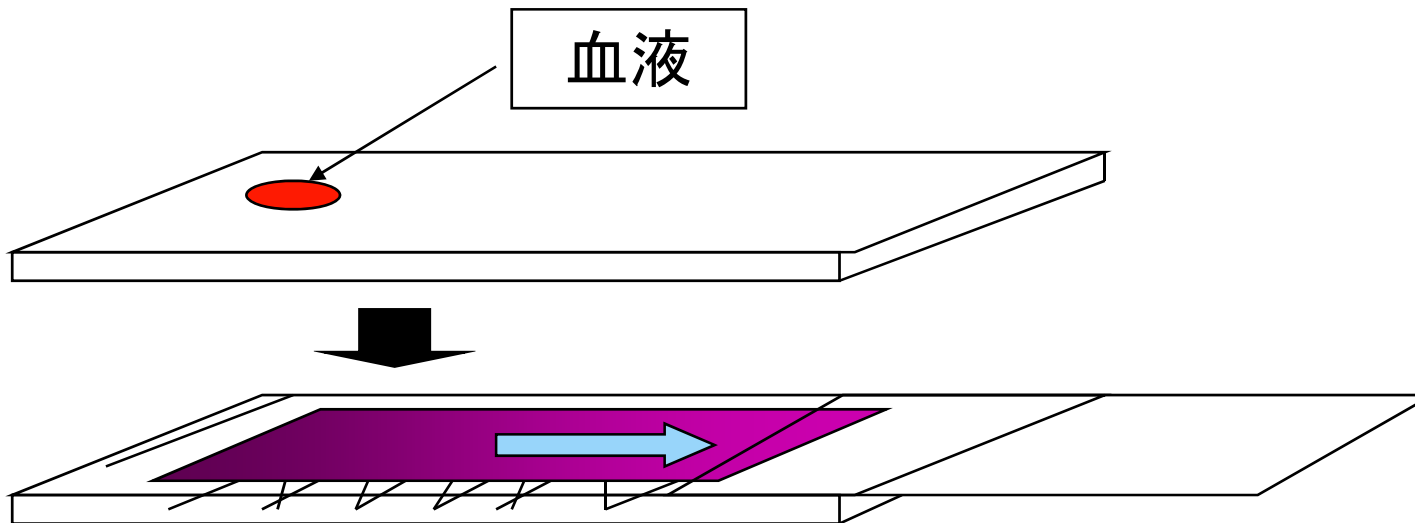


## ④ - 7. 対物レンズ ～ノーカバーガラス標本～

### ◆ ノーカバーガラス標本(0)

病院検査における顕微鏡の場合、血液や尿を観察するために、カバーガラスをしない標本があります。専用対物レンズを使用します。

乾燥しても支障のないもの(血液塗抹標本など)



## ④ - 8. 対物レンズ ～補正環～

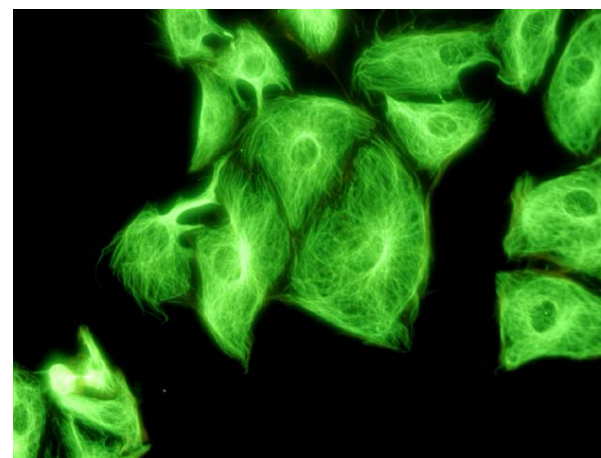
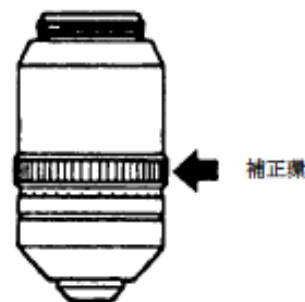
### 補正環付き対物レンズ

乾燥系で開口数の大きい高性能対物レンズの場合、カバーガラスの厚さの誤差によって生ずる球面収差で悪化する見えを補正できる、補正環が付いている。

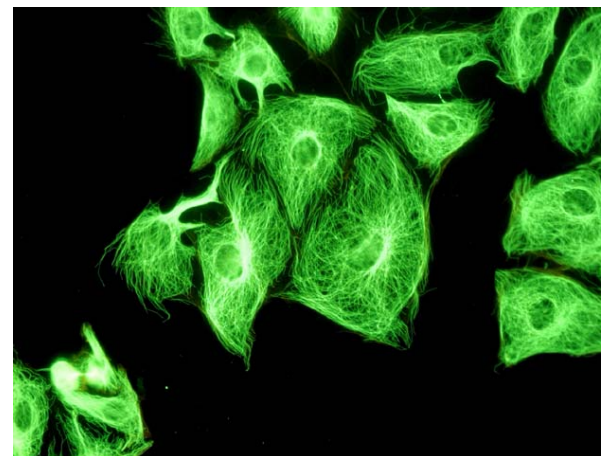
例えば、Uplan Apo40×はカバーガラスの厚さ 0.11～0.23mm の範囲について補正できる。

#### 補正環の使い方

- ① 厚さ 0.17 の位置でピントを合わせて、見え（主にコントラスト）をチェックする。
- ② 補正環を右か左いっぱいまでまわしてピントを合わせ、見えをチェックする。
- ③ その位置から補正環を反対方向に僅か回し、ピントを合わせて見えをチェックする。これを、補正環が反対側で止まるところまで何回か繰り返すと、見えは、悪い→徐々によくなる→徐々に悪くなる→悪い と変化するはずである。
- ④ 見えがよくなるおよその補正環位置をもとめ、まわす量を徐々に少なくして最も見えのよい補正環位置に追い込んでゆく。
- ⑤ 補正環を回すことでピントが甘くなるので、きちんとピント合せをした時の見えが、その補正環位置での見えである。



調整不十分



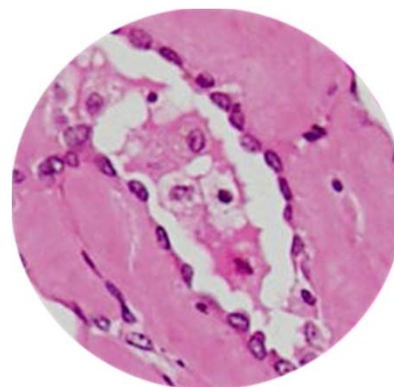
適正

## ⑤. 接眼レンズ ～視野数～



◆対物レンズの像(中間像)を拡大します  
主に10X を使用します。

◆視野数 (FN...Field Number)  
⇒実視野が分かる



視野数



型式

倍率

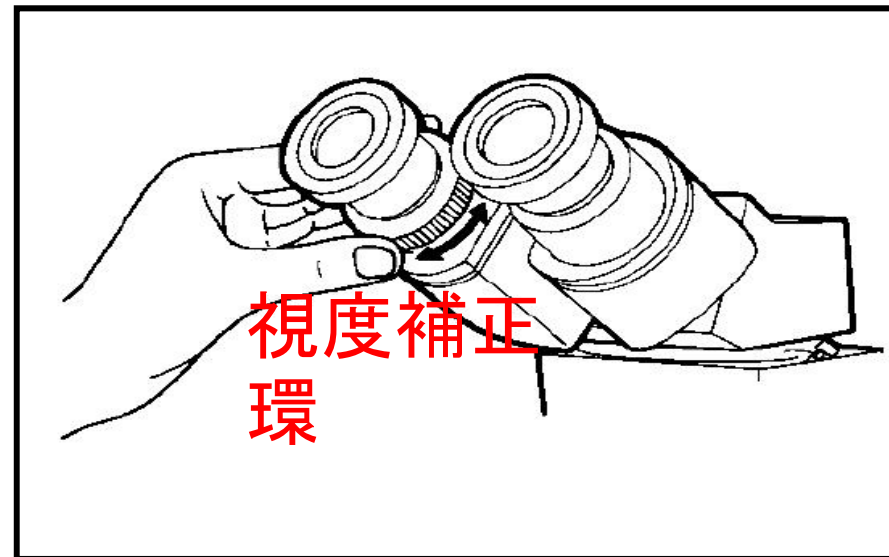
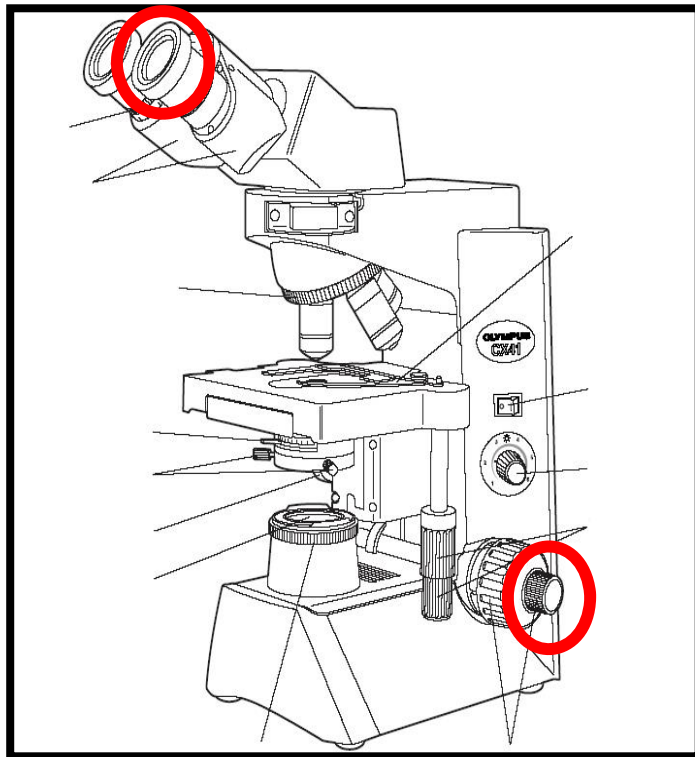
視野数

$$\text{実視野} = \frac{\text{視野数}}{\text{対物レンズ倍率}}$$

対物レンズ10×、視野数22のとき→2.2μm

## ⑤ - 1. 接眼レンズ ～視度調整～

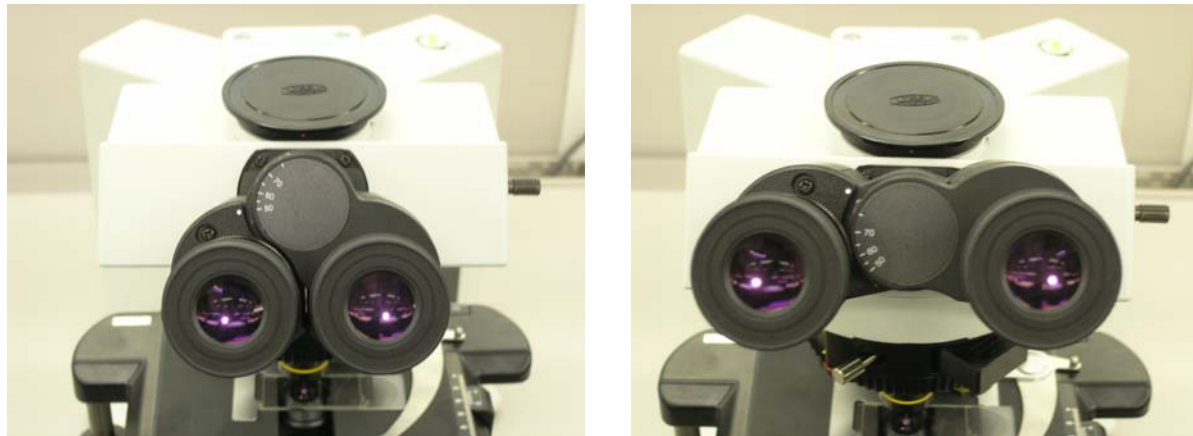
- ①右側視野だけでピントを合わせる
- ②左側の鏡筒ヘリコイドで左側視野のピントを合わせる  
(このときステージの上下はしない)



## ⑤ - 2. 接眼レンズ ～眼幅調整、アイポイント～

- ◆両眼観察で、視野が1つに見えるよう、左右接眼レンズ光軸の幅を左右の眼の幅に合わせる。
- ◆眼の光軸が左右並行にならないと、両眼視にならない。慣れない内は、遠くを見てから接眼レンズを覗く。

眼幅





**OLYMPUS**

---