

植物防疫基礎講座：

光学顕微鏡の使い方

石川県農業総合研究センター砂丘地農業試験場 ^{もり}森 ^{かわ}川 ^ち千 ^{はる}春

はじめに

顕微鏡観察についてよく聞かれるのは「マウント液はなにか?」「よく使う染色液は?」ということである。答えはズバリ、「マウントは水で、染色液は使わない」である。

顕微鏡観察で最も重要な操作と考えるのはコンデンサーの調整である。光軸をしっかりと合わせ、目的に応じてコンデンサー絞りを調整することにより、染色液を用いなくとも、見たいものを鮮明に浮かび上がらせることができる。解像度は水が最も高い。

初心者でも、スライドガラスの上に切片を置き、水を1滴たらし、カバーガラスをかければ、とりあえず観察することはできる。しかし、慣れない間は光軸やコンデンサー、絞りの調整が煩雑で鮮明な画像を得ることが難しいのではないかと。どういう状態が良好な画像なのか、ということがわからないまま顕微鏡は扱いにくい物と思ってしまうこともあるだろう。ここでは迅速な病害診断に役立ててもらうために、難しい光学原理は抜きに、悪い画像に対処する「正道」、とともに「悪い画像」を利用する「邪道」も示してみたい。

I 光源絞り（視野絞り）の調整

1 プレパラートに焦点を合わせ、光源絞り（図-1A）を絞り込む

明暗の境界がぼやけているのは、①コンデンサーの上下位置が適正でないため、②光が中心から外れているのは光軸がずれているため、である。これでは光のムラができて良好な観察はできない（口絵①）。

2 まずコンデンサーの上下位置を調節する

コンデンサーを上下すると、絞りの多角形の輪郭が現れる（口絵②）。この位置が適正な上下位置である。光のスポットは絞りの輪郭がぼやけているときのほうが大きく、絞りの輪郭が現れたときはかなり小さくなる（口絵①→口絵②）。そのため光軸のズレが大きいと、調整中に視野から光が見えなくなる場合がある。暗黒の視野

を見ても慌てることはない。絞りすぎた光源絞りを開いていくと光が見えてくる。

3 次に光軸を中心に合わせる

光源絞り心出しネジ（ビルトインタイプの機種ではコンデンサー心出しネジ）をXY軸方向に調節し、光を移動させて視野の中心に合わせる（口絵③）。ここまでできたら、やや光源絞りを開いて視野に内接するくらいにしたほうが調節しやすい。

4 最後に光源絞りを開いていき（口絵④）、視野に外接させて観察する

ただし、高倍率で視野中心のみ、よく観察したい場合、写真撮影しない場合などは絞り込んだまま観察してもよい。余分な光の乱反射（迷光）が抑えられ、見やすくなる。ここまでの過程はプレパラートを替えるごとに、レンズの組み合わせを変えるごとに、さらには厚みのある切片ではフォーカスを変えるごとに再調整・微調整が必要である。そのため実際の観察では、光源絞り像は視野に内接させておき、ズレやボケを常に確認できるようにしておくのが現実的である。

5 ここで、一度、接眼レンズから目を離して、ステージ上のプレパラートを肉眼で見よう

プレパラート上に小さな光のスポットが見える。この部分が顕微鏡の視野と一致している。このスポットの位置を確認しておくと、次回、同じ場面を観察したいときに探しやすい。小さな切片を見るときには、あらかじめスポットの中に切片が入るようステージを操作してから検鏡すると手間が省ける。サビダニのような微小害虫や胞子塊など、ほとんど無色透明なサンプルでもスポットに入るとキラッと光るので容易にわかる。大きな切片を見ている場合は、視野に見えている部分が切片のどの位置かを確認することも重要である。

II コンデンサー絞り（開口絞り）の調整

コンデンサー絞り（開口絞り）は光路に入る光量を調節するもので、ステージ直下にあるコンデンサーについている（図-1B）。

コンデンサー絞りの輪郭は、光源絞りとは異なり、顕微鏡の視野の中には現れない。視野には明暗の変化となって現れる。接眼レンズを外して鏡筒を覗き込むと絞りが

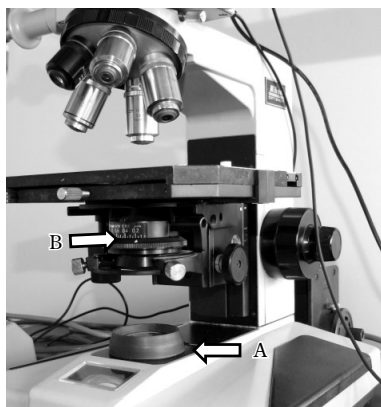


図-1 光学顕微鏡の構造

A: 光源絞り, B: コンデンサー絞り.

見える。これを見ながら絞り込み、開口度 70～80% に調整すると最も観察しやすい。しかし、接眼レンズを外して調整するのは面倒な作業である。そこで初心者の場合、難しく考えなくとも、視野が明るい場合は絞ればよいし、暗い場合は開ければよい…のか？

やはり少し難しく考えてみよう。接眼レンズを外さずに調整する方法がある。コンデンサー絞りのダイヤルに目盛りが打ってある（レバーで絞りを開閉する構造の場合、目盛りはない）。残念ながらこの目盛りは「コンデンサーの開口数」であり、そのままコンデンサー絞りの「開口度」にはならない。開口度は対物レンズとの組み合わせで決まる（開口度＝コンデンサーの開口数／対物レンズの開口数×100）。試しに今一度、接眼レンズを外して鏡筒を覗き込みながら絞りきった状態から開いていってみよう。筆者の使用している 20 倍の対物レンズなら 0.4、40 倍の対物レンズなら 0.65 くらいで全開 100% の開口度になる。実はこの「0.4」や「0.65」が対物レンズの開口数であり、レンズ側面に倍率の次に刻印されている。開口数 0.4 の対物レンズならコンデンサー開口数を 0.3 に合わせると開口度 75%（ $0.3 \div 0.4 \times 100 = 75$ ）となる。

難しく考えるのはやめよう。重要なのは理論より実践である。コンデンサー絞りはカメラの絞りと同様、絞ると焦点深度が深くなり、開けると焦点深度が浅くなる。一眼レフで写真を撮影するときにバックをぼかして被写体を強調するときには絞りを開ける。顕微鏡でもこれと同じである。バックを除きたいか、あるいはバックを写し込みたいか、というのがコンデンサー絞りの調整である。このことさえわかっているならば、ちょっとした「画像処理」ができ、見にくいモノが見やすくなり、見えな

かったモノが見えるようになる。しかし、見えなくてもよいモノが見えてしまう場合もあるので注意が必要である。以下に数例の「画像処理」を示す。

（1）絞りを全開にする場合

コンデンサー絞りを全開にすると、視野が明るくなるばかりでなく、焦点深度も浅くなる。この状態でステージを上下させることにより「光学的」な切片にすることができる。あまり薄く切ることができなかったサンプルや、宿主葉上に形成された病原菌の分生子を見るときなど、時として有効である（口絵⑤→口絵⑥）。宿主組織内の菌体（口絵⑦）や宿主表皮上の菌糸（口絵⑧）も、絞りを開き気味にすることで鮮明に浮かび上がる。

（2）絞りを絞り込む場合

コンデンサー絞りを絞ると焦点深度が深くなる。その結果、当然、多くのものが一度に見えることになる。

小さな孢子がなかなか見つからないとき、絞り込んでみると、違う光学切片にあったものがいっせいに視野に現れる、ということはよくある。これと同様に血球計算盤を用いて孢子濃度を測定する場合も絞りきったほうが、液中に分散した孢子とともに計算盤の目盛りも見やすくなる。ただし絞り込むと「微妙な質感」が失われる。計数中に孢子か否か、あるいは生死（原形質の有無）など迷ったときは少し絞りを開いてみるとよい。

罹病組織からの細菌の流出を見る場合も絞りきって焦点深度を深くしておく、見かけ上、細菌の存在が増幅され、確認しやすくなる（口絵⑨→口絵⑩）。ここで重要なのは、細菌の存在を確認後、再び絞りを開いてみる。細菌が流出している部位は宿主の導管であることがわかる（口絵⑩→口絵⑨）。

また大きな孢子、凹凸の著しい孢子など、一部分にしか焦点が合わない形がつかみにくい。少し絞り気味にしたほうが見やすい場合もある（口絵⑫→口絵⑬）。

もう一つ、絞り気味で用いるのはコンパクト・デジタルカメラで撮影する場合である。レンズ口径の小さいコンパクト・デジタルカメラは特別なアダプターを用いなくとも顕微鏡写真を撮影することができる。オートフォーカスを有効に機能させるためコンデンサー絞りを絞り込み、ラインの強調効果を狙う（口絵⑭）。コンデンサー絞りには見かけ上のコントラストを高める効果もある。

（3）適正な絞りで使う場合

写真撮影する場合、絞りを開き過ぎると焦点の合う部分が少なくなり、像がぼやけた感じになる（口絵⑪）。また絞り込んだ状態では焦点深度の深さゆえに余計なものがたくさん写り込んでしまう（口絵⑬）。ラインや粒子が重なり、ゴミも写り込みやすい。そのため画像が滲

んだ感じになり美しくない (口絵⑮)。そこで前出の「開口度 70 ~ 80%」が出てくるのであるが、実際、開きすぎのものより、絞りすぎの写真を見る機会が多い。シャッターを押す前に、少し絞りを開いてみよう。像が洗練されるはずである (口絵⑮→口絵⑯)。

このような絞りの調整と画像の変化の関係がわかれば、もう、いちいち接眼レンズを外して鏡筒を覗き込み (あるいはコンデンサーと対物レンズの開口数を計算して) 開口度を調整するという“マニュアル的”操作をする必要はない。見たいものを探すために、見せたいものを撮影するために、接眼レンズを通して画像を観察しながら、積極的にコンデンサー絞りを調整して、「好みの画像」を得るとよい。「絞りすぎ」や「開きすぎ」のような、いわゆる「悪い画像」にも、目的に応じて利用価値はある。

顕微鏡はステージの上下・平行移動だけで観察するものではない。常にコンデンサーも上下に調整し、光軸を微調整し、二つの絞りを開閉しながら観察するものなのである。

Ⅲ ノマルスキー型微分干渉顕微鏡

顕微鏡は、ステージの上下・平行移動だけで観察するものではない。常に回転させて観察するものである、というのがノマルスキーの極意である。

ここでは水生不完全菌のテトラポッド型の分生子にモデルになってもらおう。立体的には四放射型であるがプレパラート内では (都合良く!) 二次元的に十字型になっている (口絵⑰~⑱)。

ノマルスキーでは光路にプリズムを用いているためプリズムと平行方向 (視野内 X 軸方向) はコントラストが最も低く、プリズムと直交方向 (視野内 Y 軸方向) はコントラストが最大になる (口絵⑰)。直線構造物があった場合、45 度方向に配置すると均等なコントラストが得られる (口絵⑱)。そのためにノマルスキーのステージは円形で回転できるようになっている。写真の構図上、XY 方向に配置したい場合には、鏡筒上のカメラを回転させればよいだけである (口絵⑲)。画像処理ソフトウェアを用いた回転も可能であるが、写真は極力、光学系で解決したい。

おわりに—ミクロの世界に溺れることなかれ—

病害診断に当たって、「肉眼」と「顕微鏡」、それぞれに見える画像を上手く結びつけることが重要である。そのためには、ルーペ (and/or 実体顕微鏡) を活用したい。ルーペの観察を通して、肉眼と顕微鏡を結びつけるのである。しかし、本稿は「顕微鏡の使い方」、ルーペは

テーマではない。顕微鏡にできることを示さなくてはならない。そこで提案したいのが 20 倍の対物レンズである。

通常、光学顕微鏡の対物レンズセットは、4 倍、10 倍、40 倍、100 倍油浸の組み合わせが多い。10 倍では糸状菌の孢子形状や宿主細胞内の菌糸を見るには倍率が足りない。40 倍では菌体はよく見えるが、局部的に拡大されるため、周辺の宿主組織・細胞との関係は掴みづらい。20 倍レンズを用いると孢子や菌糸が明瞭に見え、しかも周辺の宿主組織・細胞との関係も把握できる。周囲の宿主組織との関連で観察することにより、マイクロメーターの目盛りに頼らなくとも肉眼世界と同様におおよその大きさの把握ができるようになる。ぜひオプションで 20 倍の対物レンズを装備したい。

話はそれるが、年に 1 回、研究センターの一般開放デーがあり、そのときは顕微鏡をロビーの園芸相談コーナーに持ち出して草花、樹木などの病害診断の実演することになっている。この顕微鏡、ティーチング装置といって、二人同時に覗ける装備がある。視野に可動式の矢印を表示できるので、依頼者やその家族にも顕微鏡を覗いてもらう。小学生になると初めて見るミクロの世界にかなり興味をもってくれるが、一人、記憶に残る児童がいる。

顕微鏡の視野で矢印を追いながら真剣に説明を聞いていると「もうこれはわかったから、ほかのものないの?」となかなか手厳しい。しかし彼の妻はこんなことではない。一つのプレパラートを見終わるたびに、必ず「何を見ていたの? それ (プレパラート) 見せて」と言っていて、プレパラートを手にとり、今、自分の見ていたものが肉眼ではどのように見えるのか確認しないと気が済まない。母親はプレパラートを割るのでは、とひやひやしていたが、この感覚は大切である。

彼がプレパラートを手にもって肉眼で確認してから、再びステージに載せ顕微鏡を見せて、視野内に光源絞りの輪郭を出し、そのままの状態、肉眼でプレパラート上の光のスポットを確認してもらった。「この光が当たっている部分が今、顕微鏡で見えている場所だよ」と教えると、ようやくニコリと子供らしく笑ってくれた。

顕微鏡下で、何を、どれくらいの倍率で、どの部分をどういう方向・切片で見ているのか、ということを常に頭に入れておくことは、とても重要なことである。顕微鏡で見たものを肉眼で見る世界の中に組み込み再構成できなければ顕微鏡を覗く意味はない。それを誰に教えられともなく体得しているとは幼いながら見上げたものである。「この子は、きっと顕微鏡が好きになるぞ!」と一人ほくそえみながら見送った。