

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4222664号  
(P4222664)

(45) 発行日 平成21年2月12日(2009.2.12)

(24) 登録日 平成20年11月28日(2008.11.28)

(51) Int.Cl.	F 1
G02B 21/00	(2006.01)      G02B 21/00
G02B 21/04	(2006.01)      G02B 21/04
G02B 21/06	(2006.01)      G02B 21/06
G02B 21/16	(2006.01)      G02B 21/16
G02B 21/18	(2006.01)      G02B 21/18

請求項の数 3 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平10-302237
(22) 出願日	平成10年10月23日(1998.10.23)
(65) 公開番号	特開平11-223773
(43) 公開日	平成11年8月17日(1999.8.17)
審査請求日	平成17年9月28日(2005.9.28)
(31) 優先権主張番号	特願平9-292446
(32) 優先日	平成9年10月24日(1997.10.24)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)

(73) 特許権者	000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(74) 代理人	100084618 弁理士 村松 貞男
(74) 代理人	100100952 弁理士 風間 鉄也
(74) 代理人	100097559 弁理士 水野 浩司
(72) 発明者	野々田 幸雄 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ リンパス光学工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】落射蛍光顕微鏡

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

複数の落射照明光を選択的に標本に照射することにより、標本の光学的操作と蛍光観察を同時に可能にした落射蛍光顕微鏡において、

前記標本に対する観察光学系光路に交点を介して交差する方向に配置された第1の落射照明光学系光路と、

前記観察光学系光路の前記第1の落射照明光学系光路と同一の交点で前記観察光学系光路と交差する方向に配置された第2の落射照明光学系光路と、

前記観察光学系光路に、前記第1および第2の落射照明光学系光路と異なる交点を介して交差する方向に配置された第3の落射照明光学系光路と

を具備したことを特徴とする落射蛍光顕微鏡。

## 【請求項 2】

前記観察光学系光路と前記第3落射照明光学系光路との交点に、波長分別手段を挿脱可能に配置したことを特徴とする請求項1記載の落射蛍光顕微鏡。

## 【請求項 3】

前記観察光学系光路に、さらに前記第1および第2の落射照明光学系光路および前記第3落射照明光学系光路と異なる交点を介して交差する方向に第4の落射照明光学系光路を配置したことを特徴とする請求項1または2記載の落射蛍光顕微鏡。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

**【発明の属する技術分野】**

本発明は落射蛍光顕微鏡に係り、特に、細胞生理学分野において細胞操作の手段として用いられるレーザートラップ法やCaged試薬解除法を採用した落射蛍光顕微鏡に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

落射蛍光顕微鏡による落射蛍光観察は、生物学の分野において、細胞内部の特定の物質の形態観察を行う為の手段として、現在広く一般的に行われている方法である。

**【0003】**

ところで、最近、特に細胞生理学の分野においては、顕微鏡の落射照明手段を利用した細胞内部物質の操作方法として、レーザートラップ法やCaged試薬解除法が広く採用されている。

**【0004】**

ここで、レーザートラップ法（光ピンセット法）は、標本中の任意の物質にレーザー光を照射して光学的に捕捉する方法であり、細胞内のタンパク質が運動する際の力量を測定する手段として用いられ、照射手段としては、赤外レーザーが使用される。一方、Caged試薬解除法は、生理活性を持つ分子にCaged試薬を結合して活性を抑制した状態で細胞内に投与し、光を照射することで結合を解除させてその分子の活性を回復させる方法であり、照射手段としては、紫外光が使用される。

**【0005】**

このように、これらレーザートラップ法やCaged試薬解除法を採用する落射蛍光顕微鏡では、通常の落射蛍光照明の他に、細胞操作のための各種の光源が必要になってくる。

**【0006】**

しかして、従来、一般的に用いられている落射蛍光顕微鏡として、図12に示すように対物レンズ101と接眼レンズ102を結ぶ観察光学系光路103中にバリアフィルターB Aとともに配置される第1ダイクロイックミラーDM1に対して蛍光観察用の励起光源104を配置するとともに、これら第1ダイクロイックミラーDM1と励起光源104の間に第2ダイクロイックミラーDM2を配し、この第2ダイクロイックミラーDM2と励起光源104の間にバンドパスフィルタBPを配置し、第2ダイクロイックミラーDM2から直交する光路上に標本操作用光源105を配置したものがある。

**【0007】**

また、特開平8-234110号公報には、落射蛍光顕微鏡として、図13に示すように、観察光学系光路107に蛍光観察用の励起光源108から励起光を導入する第1ダイクロイックミラーDM1と、レーザー光源109からレーザートラップのレーザー光を導入する第2ダイクロイックミラーDM2を2段に配置したものが開示されている。

**【0008】****【発明が解決しようとする課題】**

ところが、図12に示した従来のものは、励起光源104を、励起波長を切換えて蛍光観察を行うことを考えると、バンドパスフィルタBPは勿論のこと、第1ダイクロイックミラーDM1をも交換しなければならないが、このとき、第1ダイクロイックミラーDM1とバンドパスフィルタBPは、別々に配置されているので、これらを各別に交換しなければならず、このための作業が煩雑で面倒になるという問題がある。

**【0009】**

一方、特開平08-234110号公報に開示されているものは、第1ダイクロイックミラーDM1が、第2ダイクロイックミラーDM2よりも標本側に配置される場合、例えば、レーザー光源109のレーザー波長域を紫外域に切換えてCaged試薬解除用として使用すると、第2ダイクロイックミラーDM2を反射したレーザー光を確実に標本側に導入するためには、第1ダイクロイックミラーDM1およびバリアフィルタBAとして、レーザー光源109からのレーザー波長を透過する特性を有していなければならず、その度に第1ダイクロイックミラーDM1およびバリアフィルタBAを最適なものに取り替える

10

20

30

40

50

などの面倒な作業が必要となり、実現性がうすい。現実的に見てレーザー光源 109 は、レーザートラップ用の赤外領域以外の使用目的には対応できず、汎用性に乏しい。また、第 2 ダイクロイックミラー DM 2 は観察光学系光路 107 の中に固定されているので、通常の蛍光観察においては問題はないが、1 分子レベルの測光を行うような微弱蛍光観察においては光量ロスの要因となり好ましくない。

#### 【0010】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、落射照明光学系の独立した光路を複数有し、各々の落射照明光路の用途が限定されない、汎用性に富んだ落射蛍光顕微鏡を提供することを目的とする。

#### 【0011】

10

#### 【課題を解決するための手段】

本発明の一観点によれば、複数の落射照明光を選択的に標本に照射することにより、標本の光学的操作と蛍光観察を同時に可能にした落射蛍光顕微鏡において、前記標本に対する観察光学系光路に交点を介して交差する方向に配置された第 1 の落射照明光学系光路と、前記観察光学系光路の前記第 1 の落射照明光学系光路と同一の交点で前記観察光学系光路と交差する方向に配置された第 2 の落射照明光学系光路と、前記観察光学系光路に、前記第 1 および第 2 の落射照明光学系光路と異なる交点を介して交差する方向に配置された第 3 の落射照明光学系光路とにより構成している。

#### 【0012】

20

これにより、例えば第 1 の落射照明光学系光路に Cagel 試薬解除用のレーザー光源、第 2 の落射照明光学系光路に励起光照射用の水銀ランプを、さらに第 3 の落射照明光学系光路にレーザートラップ用のレーザー光源または励起光照射用の水銀ランプをそれぞれ配して、これら第 1 乃至第 3 の落射照明光学系光路を選択し、Cagel 試薬解除用のレーザー光源、励起光照射用の水銀ランプおよびレーザートラップ用のレーザー光源を組み合わせることにより、Cagel 解除と蛍光観察による Cagel 試薬解除実験や蛍光観察とレーザートラップによる微小物体の捕捉および微小力計測などのレーザートラップ実験を選択的に行うことができる。

#### 【0013】

前記落射蛍光顕微鏡において、前記観察光学系光路と前記第 3 落射照明光学系光路との交点に、波長分別手段を挿脱可能に配置していることが望ましい。

30

#### 【0014】

これにより、レーザートラップを行わず通常の蛍光観察のみを行う場合、例えば、ダイクロイックミラーなどの波長分別手段を観察光路から除外することにより、微弱蛍光観察時の光量ロスを除外した観察像を得ることができる。また、波長分別手段を観察光路に挿入することにより、例えば第 3 の落射照明光学系光路に配したレーザートラップ用のレーザー光源または励起光照射用の水銀ランプによるレーザートラップ用レーザーと蛍光観察用の励起光を選択的に観察光学系光路に導入できるので、この場合も、必要に応じてレーザートラップ実験や Cagel 試薬解除実験を選択的に行うことができ、汎用性に富んだ実験系を構成することができる。

#### 【0015】

40

前記落射蛍光顕微鏡において、前記観察光学系光路に、さらに前記第 1 および第 2 の落射照明光学系光路および前記第 3 落射照明光学系光路と異なる交点を介して交差する方向に第 4 の落射照明光学系光路を配置してもよい。

#### 【0016】

これにより、例えば第 1 の落射照明光学系光路に励起光照射用のレーザー光源、第 2 の落射照明光学系光路に励起光照射用の水銀ランプを、さらに第 3 の落射照明光学系光路にレーザートラップ用のレーザー光源を配し、さらに、第 4 の落射照明光学系光路に Cagel 試薬解除用のレーザー光源を配し、第 1 乃至第 2 の落射照明光学系光路を選択し、励起光源の水銀ランプおよびレーザー光源を選択的に使用し、レーザートラップ用のレーザーと Cagel 試薬解除用のレーザーを使用することで、細胞内の任意のタンパク質に紫外

50

レーザーを照射して Caged 試薬を解除し、活性化したタンパク質に赤外レーザーを照射してトラップし、微小計測を行うような操作が可能となり、細胞内物質の挙動を分子レベルで解析する細胞生理学の分野において非常に有効な実験系を構築することが可能となる。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を図面に従い説明する。

#### 【0018】

##### (第1の実施の形態)

図1および図2は、本発明が適用される倒立型の落射蛍光顕微鏡の概略構成を示している。図において、1は観察すべき標本で、この標本1の下方に対物レンズ2を配置し、この対物レンズ2を通る観察光学系光路の光軸31上に破線で示すキューブターレットCTを設けている。

10

#### 【0019】

このキューブターレットCTは、光軸31に対して45°の斜度を持つダイクロイックミラーDM1を有するキューブCV1と、光軸31に対して45°の斜度を持つダイクロイックミラーDM1、バリアフィルタBA1および励起フィルタEX1を有するキューブCV1を備えていて、光軸31に対して垂直平面内を図示しない回転軸を中心に回転することにより、キューブCV1またはキューブCV1を選択的に光軸31の交わる点O1に位置合わせさせるようにしている。

20

#### 【0020】

なお、図1に示すキューブターレットCTは、2つのキューブしか表示されていないが、キューブCV1, CV1と同一構成、同一形状のキューブを少なくとも4つ挿脱することができ、ターレットの回転と図示しない位置決め機構により、任意のキューブのダイクロイックミラーの反射面を光軸31の交わる点O1に合わせることができる。例えば、図2では、キューブターレット内部CTにダイクロイックミラーDM1、バリアフィルタBA1を有するキューブCV1を挿入した例を示しており、後述するレーザー光源3および水銀光源6の波長を変えた場合に適用できるようにしている。また、キューブCV1は、光軸31に挿入された時にダイクロイックミラーDM1の反射面が後述する水銀光源6の方に向くようにダイクロイックミラーDM1を保持している。

30

#### 【0021】

そして、キューブターレットCTの点O1から光軸31に対して垂直方向の第1の落射照明光学系光路の光軸32上にリレーレンズ5、コレクタレンズ4およびレーザー光源3を同一直線上に配置し、また、点O1から光軸31に対して垂直で、さらに点O1からレーザー光源3への方向に対して垂直方向の第2の落射照明光学系光路の光軸33上にリレーレンズ8、コレクタレンズ7および水銀光源6を同一直線上に配置している。

#### 【0022】

キューブターレットCTの下方には、破線で示すスライダーSVを後述する光軸34に沿って移動可能に設けている。

#### 【0023】

このスライダーSVは、光軸32に対して45°の斜度を持つダイクロイックミラーDM2、バリアフィルタBA2および励起フィルタEX2を有するキューブCV2と、このダイクロイックミラーDM2と平行に配置したダイクロイックミラーDM2を有するキューブCV2を、ダイクロイックミラーDM2により光軸32が反射される方向(光軸34の方向)に並べて設けている。これらキューブCV2とCV2は、スライダーSVに挿脱可能になっている。また、スライダーSVのキューブCV2の真下には、結像レンズ15を配置し、キューブCV2の真下には、結像レンズ16を配置している。

40

#### 【0024】

そして、スライダーSVを光軸34方向に沿って移動することで、キューブCV2のダイクロイックミラーDM2の反射面またはキューブCV2のダイクロイックミラーDM2

50

の反射面を選択的に光軸 3 1 と交わる点 O 2 に位置合わせさせるようにしている。

**【 0 0 2 5 】**

なお、スライダー S V 上のダイクロイックミラー D M 2 , D M 2 の切り換え停止位置は、図示しない位置決め機構により設定される。

**【 0 0 2 6 】**

そして、スライダー S V の点 O 2 から反射された第 3 の落射照明光学系光路の光軸 3 4 上には、リレーレンズ 1 1 、コレクタレンズ 1 0 および水銀光源 9 を配置している。また、リレーレンズ 1 1 とコレクタレンズ 1 0 の間の光軸 3 4 上には、光軸 3 4 と交わる点 O 3 に、スライダー S V を挿脱可能に配置し、このスライダー S V を介して光軸 3 4 に対し垂直方向にコレクタレンズ 1 3 およびレーザー光源 1 2 を配置している。

10

**【 0 0 2 7 】**

この場合、スライダー S V には、全反射ミラー 1 4 を設けており、スライダー S V の図中矢印方向への移動により、全反射ミラー 1 4 の反射面を点 O 3 に挿脱し、レーザー光源 1 2 からの光束を光軸 3 1 と交わる点 O 2 方向へ導くことができるようになっている。なお、スライダー S V の挿脱位置は、図示しない位置決め機構により自動的に設定される。

**【 0 0 2 8 】**

一方、スライダー S V 下方の光軸 3 1 上には、光路分割のためのハーフプリズム 1 7 、光軸 3 1 を接眼部へと導く全反射ミラー 1 8 を配置している。

20

**【 0 0 2 9 】**

結像レンズ 1 5 又は 1 6 を透過した観察光は、ビームスプリッタ 1 7 によって 2 分割される。ビームスプリッタ 1 7 で反射した光は撮影光路に導かれ、写真撮影装置又は T V カメラの受光面 P h 上で結像する。

**【 0 0 3 0 】**

また、ビームスプリッタ 1 7 を透過した光は全反射ミラー 1 8 で反射され、観察光路に導かれる。観察光路上の中間結像点 A でいったん結像した後、リレーレンズ R 1 でリレーされて点 B で再び結像し、この像が接眼レンズ O c によって観察される。

**【 0 0 3 1 】**

次に、このように構成した実施の形態の動作を説明する。

**【 0 0 3 2 】**

30

いま、レーザー光源 3 に C a g e d 試薬解除用の波長 3 3 7 n m の N<sub>2</sub> レーザーを使用し、水銀光源 6 に励起光照射用で蛍光観察用の波長 4 8 8 n m の光を取り出すための水銀光を使用し、水銀光源 9 に励起光照射用で蛍光観察用の波長 5 3 2 n m の光を取り出すための水銀光を使用し、レーザー光源 1 2 にレーザートラップ用の波長 1 0 6 4 n m の I R レーザーを使用するものとする。

**【 0 0 3 3 】**

まず、図 1 に示すように、キューブターレット C T のキューブ C V 1 を光軸 3 1 上に位置させるとともに、スライダー S V のキューブ C V 2 を観察光学系光路の光軸 3 1 に挿入し、スライダー S V を光軸 3 4 から取り外す。

**【 0 0 3 4 】**

40

この状態で、レーザー光源 3 の波長 3 3 7 n m の C a g e d 試薬解除用の N<sub>2</sub> レーザーが、コレクタレンズ 4 、リレーレンズ 5 を介してキューブ C V 1 のダイクロイックミラー D M 1 に入射される。ここで、ダイクロイックミラー D M 1 に波長が 4 0 0 n m 以下の光を反射し、4 0 0 n m を超える光を透過する図 3 に示す分光透過率特性を有するものが用いられると、レーザー光源 3 の N<sub>2</sub> レーザーは、ダイクロイックミラー D M 1 で反射し、対物レンズ 2 を通して標本 1 の観察視野内の所定位置に照射され、C a g e d 試薬解除が行われる。

**【 0 0 3 5 】**

一方、この状態では、スライダー S V のキューブ C V 2 のダイクロイックミラー D M 2 が光軸 3 1 と交わる点 O 2 に位置され、スライダー S V が光軸 3 4 から外れているので、

50

水銀光源 9 の波長 532 nm の水銀光が、コレクタレンズ 10 、リレーレンズ 11 を介して、ダイクロイックミラー DM 2 に入射される。ここで、ダイクロイックミラー DM 2 に波長が 800 nm 以下の光を透過し 800 nm を超える光を反射する図 4 に示す分光透過率特性を有するものが用いられると、水銀光源 9 からの光は、ダイクロイックミラー DM 2 を透過し、キューブ CV 2 の励起フィルタ EX 2 に入射され、さらに、この励起フィルタ EX 2 に励起光波長 510 nm 以上 550 nm 以下の光を透過する図 5 に示す分光透過率特性を有するものが用いられると、励起光のみが透過し、ダイクロイックミラー DM 2 に入射される。さらに、ダイクロイックミラー DM 2 に、波長が 570 nm 以下の光を反射し、570 nm を超える光を透過する図 5 に示す分光透過率特性を有するものが用いられると、励起フィルタ EX 2 からの励起光は、ダイクロイックミラー DM 2 で上方に反射し、ダイクロイックミラー DM 1 を透過して対物レンズ 2 を介して標本 1 の観察視野に照射される。  
10

#### 【 0036 】

そして、励起光の照射により、標本 1 から蛍光が発すると、この蛍光は、対物レンズ 2 を通り、ダイクロイックミラー DM 1 、 DM 2 を介してキューブ CV 2 のバリアフィルタ BA 2 に入射される。ここで、バリアフィルタ BA 2 に、波長 590 nm 以下の光を反射し、590 nm を超える光を透過する図 5 に示す分光透過率特性を有するものが用いられると、蛍光は、透過して、ハーフプリズム 17 、全反射ミラー 18 を通して蛍光観察が行なわれる。

#### 【 0037 】

これにより、Caged 試薬解除及び蛍光観察を同時に行なうことができる。  
20

#### 【 0038 】

ここで、Caged 試薬解除及び蛍光観察を同時に行なう際に使用されるダイクロイックミラー DM 1 , DM 2 の特性に関してまとめると次のようになる。

#### 【 0039 】

すなわち、ダイクロイックミラー DM 1 としては、レーザー光源 3 からのレーザー光（波長が 400 nm 以下）を反射する一方、水銀光源 9 からの励起光や標本 1 から発せられる光（波長が 400 nm 超）を透過するものが使用される（図 3 参照）。また、ダイクロイックミラー DM 2 としては、水銀光源 9 からの励起光（波長が 570 nm 以下）を反射する一方、標本 1 から発せられる光（波長が 570 nm 超）を透過するものが使用される（図 5 参照）。

#### 【 0040 】

次に、図 2 に示すように、キューブターレット CT を図示矢印方向に回転して、キューブ CV 1 を光軸 31 上に位置させ、また、スライダー SV の切り換えにより、キューブ CV 2 を光軸 31 に挿入し、さらに、スライダー SV を切り換えて全反射ミラー 14 を光軸 34 に挿入する。

#### 【 0041 】

この状態で、水銀光源 6 の蛍光観察用の波長 488 nm の水銀光が、コレクタレンズ 7 、リレーレンズ 8 を介してキューブ CV 1 の励起フィルタ EX 1 に入射される。ここで、励起フィルタ EX 1 に波長が 470 nm 以上 490 nm 以下の光を透過する図 6 に示す分光透過率特性を有するものが用いられると、励起光のみがダイクロイックミラー DM 1 に入射され、さらに、ダイクロイックミラー DM 1 として波長が 500 nm 以下の光を反射し 500 nm を超える光を透過する図 6 に示す分光透過率特性を有するものが用いられると、励起フィルタ EX 1 の励起光は、ダイクロイックミラー DM 1 で上方に反射し、対物レンズ 2 を介して標本 1 の観察視野に照射される。  
40

#### 【 0042 】

そして、励起光の照射により標本 1 から蛍光が発すると、この蛍光は、対物レンズ 2 を通りダイクロイックミラー DM 1 を透過して、キューブ CV 1 のバリアフィルタ BA 1 に入射される。ここで、バリアフィルタ BA 1 に波長 515 nm 以下の光を反射し、515 nm を超える光を透過する図 6 に示す分光透過率特性を有するものが用いられると  
50

、蛍光は、透過して、スライダー S V のダイクロイックミラー D M 2 に入射される。この時の蛍光の波長は 800 nm 以下なので、ダイクロイックミラー D M 2 を透過し、ハーフプリズム 17、全反射ミラー 18 を通して蛍光観察が行なわれる。

#### 【 0043 】

一方、スライダー S V が光軸 34 上に挿入されていることで、レーザー光源 12 にレーザートラップ用の波長 1064 nm の I R レーザーが、コレクタレンズ 13 を通って全反射ミラー 14 に入射し、ここで全反射され、キューブ C V 2 のダイクロイックミラー D M 2 に入射される。すると、ダイクロイックミラー D M 2 の分光透過率特性により上方に反射し、キューブ C V 1 のバリアフィルタ B A 1 に入射されるが、このバリアフィルタ B A 1 の分光透過率特性により透過し、さらに、ダイクロイックミラー D M 1 の分光透過率特性により透過し、対物レンズ 2 に入射される。10

#### 【 0044 】

すると、対物レンズ 2 に入射されたレーザー光は、集光され、標本 1 上の所定位置にレーザースポットとして照射され、この照射されたレーザー集光点の近傍において、標本 1 中の微小物体を光学的に捕捉することができる。

#### 【 0045 】

これにより、蛍光観察及びレーザートラップによる微小物体の捕捉・微小力計測等を同時に行なうことができる。

#### 【 0046 】

ここで、蛍光観察及びレーザートラップによる微小物体の捕捉・微小力計測等を同時に行なう際に使用されるダイクロイックミラー D M 1 , D M 2 の特性に関してまとめると次のようになる。20

#### 【 0047 】

すなわち、ダイクロイックミラー D M 1 としては、水銀光源 6 からの励起光（波長が 500 nm 以下）を反射する一方、レーザー光源 12 から送られてくるレーザー光や標本 1 から発せられる光（波長が 500 nm 超）を透過するものが使用される（図 6 参照）。また、ダイクロイックミラー D M 2 としては、レーザー光源 12 からのレーザー光（波長が 800 nm 以下）を反射する一方、標本 1 から発せられる光（波長が 800 nm 超）を透過するものが使用される（図 4 参照）。

#### 【 0048 】

従って、このような構成とすれば、第 1 の落射照明光学系光路の C a g e d 試薬解除用のレーザー光源 3 からのレーザー光をキューブ C V 1 のダイクロイックミラー D M 1 を介して標本 1 側に導入し、同時に、第 3 の落射照明光学系光路の励起光照射用の水銀ランプ 9 からの励起光をキューブ C V 2 のダイクロイックミラー D M 2 およびキューブ C V 2 のダイクロイックミラー D M 2 を介して標本 1 側に導入することにより、C a g e d 試薬解除及び蛍光観察による C a g e d 試薬解除実験を行うことができ、一方、第 2 の落射照明光学系光路の励起光照射用の水銀ランプ 6 からの励起光をキューブ C V 1 のダイクロイックミラー D M 1 を介して標本 1 側に導入し、同時に、第 3 の落射照明光学系光路のレーザートラップ用のレーザー光源 12 からのレーザー光をキューブ C V 2 のダイクロイックミラー D M 2 を介して標本 1 側に導入することにより蛍光観察及びレーザートラップによる微小物体の捕捉・微小力計測などのレーザートラップ実験を選択的に行なうことができるようになり、標本操作をともない、これら 2 種類の実験が選択的に可能で、汎用性のある落射蛍光顕微鏡が提供できる。3040

#### 【 0049 】

なお、この第 1 の実施の形態では、倒立型顕微鏡について述べたが、一般の正立型顕微鏡にも適用することができる。また、今回用いた光源の種類、波長、数、配置については必ずしも同一でなくてもよい。また、各照明光学系光路と観察光学系光路（光軸 31）との交差角度は、90°である必要はなく、また、互いに異なった角度であってもよい。さらに、今回用いたダイクロイックミラーの特性は必ずしも同一でなくてもよく、所望の光束の波長特性に適したものであれば、ダイクロイックプリズムや他の適當な波長分別手段を50

適用してもよい。また、ダイクロイックミラーの光軸への挿脱機構は、キューブターレット C T およびスライダー S V と同一でなくてもよく、他のどのような挿脱機構であってもよい。そして結像レンズ 15, 16 をスライダー S V に取り付けずに、どちらか一方を顕微鏡本体の光軸上の所定位置に固定するようにしてよい。

#### 【 0 0 5 0 】

( 第 2 の実施の形態 )

図 7 は、本発明の第 2 の実施の形態の概略構成を示すもので、図 1 と同一部分には、同符号を付している。

#### 【 0 0 5 1 】

この場合、図 7 は、図 1 の構成からレーザー光源 12、コレクタレンズ 13、全反射ミラー 14、スライダー S V 、ダイクロイックミラー DM 2 、キューブ CV 2 を除去したもので、その他は、図 1 と同様である。 10

#### 【 0 0 5 2 】

このように構成した第 2 の実施の形態は、端的に言えば図 1 の構成からレーザー光源 12 を取り外し、キューブ CV 2 を外したものである。

#### 【 0 0 5 3 】

このため、スライダー S V を切り換えて結像レンズ 16 を光軸 31 に挿入し、また、キューブターレット C T のターレットを回転し、キューブの入っていない部分を光軸 31 の位置に合わせるか、もしくは、キューブ CV 1 を外すことによって観察光学系の平行光束光路中（対物レンズ 2 から結像レンズ 16 の間）に余分な光学素子の入らない状態を作り出せば、簡易的な操作のみで通常の倒立型顕微鏡に切り換えることができる。 20

#### 【 0 0 5 4 】

このようにすれば、単一の励起光のみを標本に照射する通常の蛍光観察では使用しないダイクロイックミラーやバリアフィルタを観察光路から取り除くことにより、使われないキューブが観察光路に入っているが故に、ある範囲の波長帯の蛍光は観察光路から反射され、除去されてしまうような予期せぬ不具合を未然に防ぐことができる。また、余分な光学素子を除去することで、微弱蛍光観察時の光量ロスを未然に防ぎ、その他蛍光観察と他の検鏡法とを組み合わせた観察像の劣化も防ぐことが出来る。

#### 【 0 0 5 5 】

なお、図 7 に示す構成で、レーザートラップを使用したい場合には、図 7 のスライダー S V のキューブ CV 2 を、図 8 に示すようにキューブ CV 2 に変更し、また、水銀光源 9 に代えてレーザー光源 12 を用いればよい。 30

#### 【 0 0 5 6 】

このような構成にすれば、レーザートラップ及び蛍光観察が同時に行えるとともに、上述したと同様な効果を期待することができる。また、このような実施の形態においては、使用したい光源に合わせてスライダー S V に取り付けるキューブを他のものに変えてよい。

#### 【 0 0 5 7 】

なお、この第 2 の実施の形態では、倒立型顕微鏡について述べたが、一般の正立型顕微鏡にも適用することができる。また、今回用いた光源の種類、波長、数、配置については必ずしも同一でなくてもよい。また、各照明光学系光路と観察光学系光路（光軸 31 ）との交差角度は、90° である必要はなく、また、互いに異なった角度であってもよい。さらに、今回用いたダイクロイックミラーの特性は必ずしも同一でなくてもよく、所望の光束の波長特性に適したものであれば、ダイクロイックプリズムや他の適当な波長分別手段を適用してもよい。また、ダイクロイックミラーの光軸への挿脱機構は、キューブターレット C T およびスライダー S V と同一でなくてもよく、他のどのような挿脱機構であってもよい。そして結像レンズ 15, 16 をスライダー S V に取り付けずに、どちらか一方を顕微鏡本体の光軸上の所定位置に固定するようにしてよい。 40

#### 【 0 0 5 8 】

( 第 3 の実施の形態 )

図9は、本発明の第3の実施の形態の概略構成を示すもので、図1と同一部分には、同符号を付している。

#### 【0059】

この場合、図9は、図1に示すスライダーSVに代え、スライダーSVを延長して結像レンズ19を新たに加えたスライダーSVを設けたもので、その他は、図1と同様である。

#### 【0060】

このように構成した第3の実施の形態は、スライダーSVを切り換えることにより、図示しない位置決め機構によりキューブCV2, CV2および結像レンズ19を観察光学系の平行光束光路中に挿入することができる。

10

#### 【0061】

このようにすれば、第1の実施の形態で述べた効果を何ら損なうことなく、さらに第2の実施の形態で述べた効果を得ることができる。すなわち、簡単に述べると簡易的切り換えのみで、様々な光束の選択的使用が可能で、通常の倒立型顕微鏡としての使用も可能な倒立型顕微鏡を提供できる。

#### 【0062】

また、この第3の実施の形態では、倒立型顕微鏡について述べたが、一般的の正立型顕微鏡にも適用することができる。また、今回用いた光源の種類、波長、数、配置については必ずしも同一でなくてもよい。また、各照明光学系光路と観察光学系光路（光軸31）との交差角度は、90°である必要はなく、また、互いに異なった角度であってもよい。さらに、今回用いたダイクロイックミラーの特性は必ずしも同一でなくてもよく、所望の光束の波長特性に適したものであれば、ダイクロイックプリズムや他の適当な波長分別手段を適用してもよい。また、ダイクロイックミラーの光軸への挿脱機構は、キューブターレットCTおよびスライダーSVと同一でなくてもよく、他のどのような挿脱機構であってもよい。そして結像レンズ15, 16, 19はスライダーSVに取り付けられている必要はなく、例えば、結像レンズ15, 16, 19のうち、いずれか一つを顕微鏡本体の光軸上に固定し、他の2つを除外しても良い。

20

#### 【0063】

##### (第4の実施の形態)

図10は、本発明の第4の実施の形態の概略構成を示すもので、図2と同一部分には、同符号を付している。

30

#### 【0064】

この場合、図10は、図2の構成の対物レンズ2と点O1との間の観察光学系光路の光軸31上に点O4を設け、この点O4が光軸の反射点となるようにダイクロイックミラーDM1を有するキューブCV1を配置し、このダイクロイックミラーDM1により反射された第4の落射照明光学系光路の光軸35上にリレーレンズ22、コレクタレンズ21、レーザー光源20を同一直線上に配置している。その他は、図2と同様である。

#### 【0065】

このように構成した第4の実施の形態では、レーザー光源20として、Caged試薬解除用の波長337nmのN<sub>2</sub>レーザー光源を用いると、レーザー光源20より発振されたレーザー光は、コレクタレンズ21、リレーレンズ22を通って、上述したダイクロイックミラーDM1の特性により上方に反射され、標本1の観察視野内の所定位置を照射する。

40

#### 【0066】

つまり、このようにすることで、蛍光観察、レーザートラップ使用時にCaged試薬解除を追加できるようにし、第1の実施の形態で説明した各光学素子の波長特性を利用して3つの光源を同時に使用することができる。

#### 【0067】

これにより、励起光を照射し、細胞内部の蛍光観察を行いながら、細胞内の任意のタンパク質にN<sub>2</sub>レーザーを照射して、Caged試薬を解除し、活性化したタンパク質にI

50

Rレーザーを照射して光学的に捕捉し、微小力計測を行なうことが可能になり、細胞内物質の挙動を分子レベルで解析する細胞生理学の分野において非常に有効である。つまり、このように専門分野の探求においては、様々な光源を同時にいくつも使用したいことが多々あるが、図10のような構成をとることにより、上述した学問的メリットの大きい装置を提供することができる。

#### 【0068】

なお、第4の実施の形態ではレーザートラップ用のダイクロイックミラーDM2は、その他の光軸上のダイクロイックミラーの中で一番下に配置されているが、どの位置に配置されていてもよい。また、光軸上のダイクロイックミラーは追加してもよい。キューブCV1は、単独で存在するが、なんらかの機構を用いてキューブCV1の位置に複数のキューブが挿脱できるようにしてもよい。10

#### 【0069】

また、この第4の実施の形態では、倒立型顕微鏡について述べたが、一般の正立型顕微鏡にも適用することができる。また、今回用いた光源の種類、波長、数、配置については必ずしも同一でなくてもよい。また、各照明光学系光路と観察光学系光路（光軸31）との交差角度は、90°である必要はなく、また、互いに異なった角度であってもよい。さらに、今回用いたダイクロイックミラーの特性は必ずしも同一でなくてもよく、所望の光束の波長特性に適したものであれば、ダイクロイックプリズムや他の適当な波長分別手段を適用してもよい。また、ダイクロイックミラーの光軸への挿脱機構は、キューブターレットCTおよびスライダーSVと同一でなくてもよく、他のどのような挿脱機構であってもよい。そして結像レンズ15, 16をスライダーSVに取り付けずに、どちらか一方を顕微鏡本体の光軸上の所定位置に固定するようにしてもよい。20

#### 【0070】

##### (第5の実施の形態)

前述した各実施の形態が正立型顕微鏡にも適用可能である旨は既に述べた通りである。そこで、本発明をその正立型顕微鏡で構成した場合の一実施形態を図11を参照して説明する。

#### 【0071】

図11は、本発明を正立型顕微鏡で構成した実施の形態の概略構成を示している。図において、1は観察すべき標本であり、この標本の上方に、対物レンズをはじめとする落射照明および観察光学系が配置されている。30

#### 【0072】

ここに示した結像レンズ15より対物レンズ側にある落射照明光学系の構成要素に付した記号は、図1において示した構成要素の記号に対応して同一の構成要素であることを示している。すなわち、第1の実施の形態で示した図1の倒立型顕微鏡における落射照明光学系をおおよそ反転した態様で構成されている。

#### 【0073】

結像レンズ15の上方には光路分割プリズムPrが配置され、この光路分割プリズムPrを透過した観察光は、写真装置やTVカメラ等の撮像面Ph上で結像される。一方、光路分割プリズムPrを反射した観察光は、接眼レンズOcの手前で結像され、接眼レンズOcを通した目視観察を行うよう正在している。40

#### 【0074】

このように構成した実施の形態の動作は、前述の第1の実施の形態で示した動作と全く同じであり、すなわち、正立型顕微鏡においても同様の効果を得ることができる。

#### 【0075】

以上、各実施の形態で述べたことをまとめると以下の通りとなる。

本発明の落射蛍光顕微鏡は、複数の落射照明光を選択的に標本に照射することにより、標本の光学的操作と蛍光観察を同時に可能にした落射蛍光顕微鏡において、前記標本に対する観察光学系光路に交点を介して交差する方向に配置された第1の落射照明光学系光路と、前記観察光学系光路の前記第1の落射照明光学系光路と同一の交点で前記観察光学系光50

路と交差する方向に配置された第2の落射照明光学系光路と、第1のダイクロイックミラーを有するキューブおよび第2のダイクロイックミラーを有するキューブを備え、前記観察光学系光路と前記第1および第2落射照明光学系光路との交点に所望のキューブを挿脱可能に配置する第1の可動体と、前記観察光学系光路に、前記第1および第2の落射照明光学系光路と異なる交点を介して交差する方向に配置された第3の落射照明光学系光路と、第3のダイクロイックミラーを有するキューブを備え、前記観察光学系光路と前記第3の落射照明光学系光路との交点にそのキューブを挿脱可能に配置する第2の可動体により構成している。

#### 【0076】

前記落射蛍光顕微鏡において、前記第1のダイクロイックミラーは、前記第1の落射照明光学系光路からの光を前記標本の方へ反射する一方、前記標本から発せられる蛍光を透過するものであることが望ましい。また、前記第2のダイクロイックミラーは、前記第2の落射照明光学系光路からの光を前記標本の方へ反射する一方、前記標本から発せられる蛍光を透過するものであることが望ましい。また、前記第3のダイクロイックミラーは、前記第3の落射照明光学系光路からの光を前記標本の方へ反射する一方、前記標本から発せられる蛍光を透過するものであることが望ましい。

#### 【0077】

前記落射蛍光顕微鏡において、前記第1の可動体は例えばキューブターレットである。また、前記第2の可動体は例えばスライダーである。

#### 【0078】

前記落射蛍光顕微鏡は、前記第1の落射照明光学系光路を形成するレーザー光源をさらに具備していてもよい。また、前記落射蛍光顕微鏡は、前記第2の落射照明光学系光路を形成する水銀光源をさらに具備していてもよい。また、前記落射蛍光顕微鏡は、前記第3の落射照明光学系光路を形成するレーザー光源および水銀光源のうちの少なくとも一方をさらに具備していてもよい。

#### 【0079】

前記落射蛍光顕微鏡は、前記第3の落射照明光学系光路に交点を介して交差する方向に配置された第4の落射照明光学系光路をさらに具備していてもよい。この場合、前記落射蛍光顕微鏡は、前記第3の落射照明光学系光路と前記第4の落射照明光学系光路との交点に全反射ミラーを挿脱可能に配置するスライダーをさらに具備していてもよい。

#### 【0080】

##### 【発明の効果】

以上詳述したように、本発明によれば、落射照明光学系の独立した光路を複数有し、これら落射照明光学系光路を選択し、Cage試薬解除用のレーザー光源、励起光照射用の水銀ランプおよびレーザートラップ用のレーザー光源などを組み合わせることにより、各自の落射照明光路の用途が限定されない、汎用性に富んだ落射蛍光顕微鏡を提供できる。

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1の実施の形態の概略構成を示す図。

【図2】第1の実施の形態の概略構成を示す図。

【図3】第1の実施の形態に用いられるダイクロイックミラーDM1の分光透過率特性を示す図。

【図4】第1の実施の形態に用いられるダイクロイックミラーDM2の分光透過率特性図。

【図5】第1の実施の形態に用いられるダイクロイックミラーDM2、励起フィルタEX2、バリアフィルタBA2の分光透過率特性図。

【図6】第1の実施の形態に用いられるダイクロイックミラーDM1、励起フィルタEX1、バリアフィルタBA1の分光透過率特性図。

【図7】本発明の第2の実施の形態の概略構成を示す図。

【図8】第2の実施の形態を一部変形した概略構成を示す図。

【図9】本発明の第3の実施の形態の概略構成を示す図。

10

20

30

40

50

【図10】本発明の第4の実施の形態の概略構成を示す図。

【図11】本発明の第5の実施の形態の概略構成を示す図。

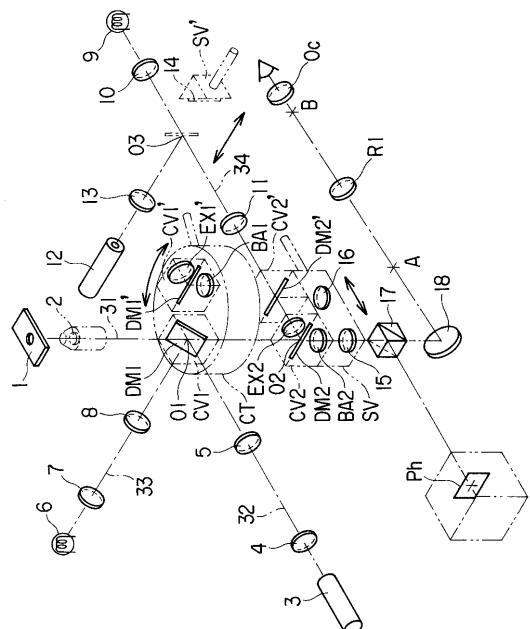
【図12】従来の落射蛍光顕微鏡の一例の概略構成を示す図。

【図13】従来の落射蛍光顕微鏡の他の例の概略構成を示す図。

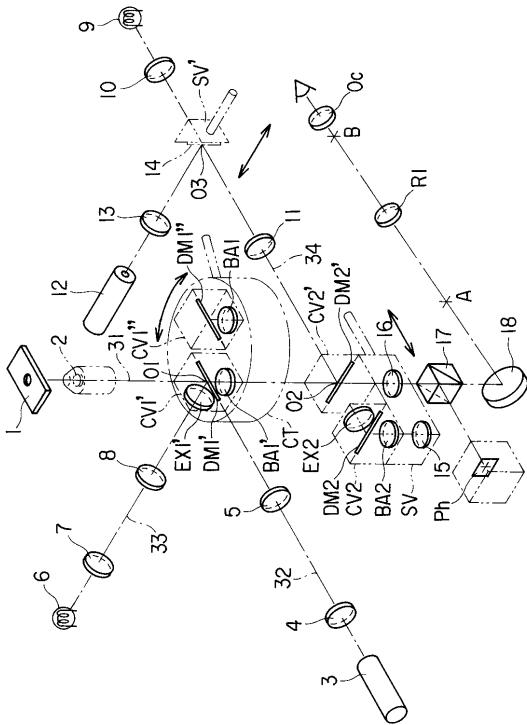
【符号の説明】

- 1 ... 標本、  
2 ... 対物レンズ、  
3 ... レーザー光源、  
4 ... コレクタレンズ、  
5 ... リレーレンズ、  
6 ... 水銀光源、  
7 ... コレクタレンズ、  
8 ... リレーレンズ、  
9 ... 水銀光源、  
10 ... コレクタレンズ、  
11 ... リレーレンズ、  
12 ... レーザー光源、  
13 ... コレクタレンズ、  
14 ... 全反射ミラー、  
15 , 16 ... 結像レンズ、  
17 ... ハーフプリズム、  
18 ... 全反射ミラー、  
19 ... 結像レンズ、  
20 ... レーザー光源、  
21 ... コレクタレンズ、  
22 ... リレーレンズ、  
31 , 32 , 33 , 34 , 35 ... 光軸、  
B A 1 , B A 1 , B A 2 ... バリアフィルタ、  
C T ... キューブターレット、  
C V 1 , C V 1 , C V 1 , C V 2 , C V 2 ... キューブ、  
D M 1 , D M 1 , D M 2 , D M 2 ... ダイクロイックミラー、  
E X 1 , E X 2 ... 励起フィルタ、  
O c ... 接眼レンズ、  
P h ... 受光面、  
P r ... 光路分割プリズム、  
R 1 ... リレーレンズ、  
S V , S V , S V ... スライダー。  
10  
20  
30

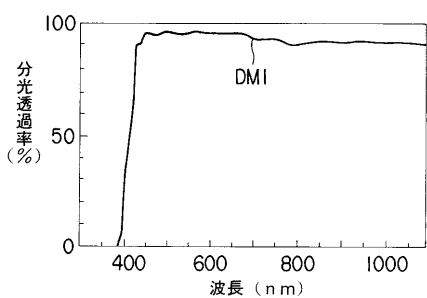
【図1】



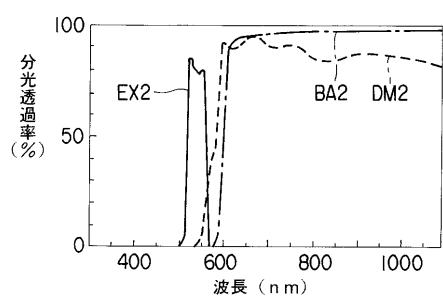
【図2】



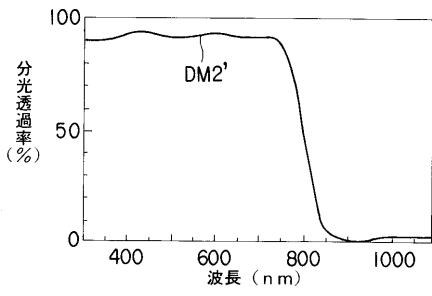
【図3】



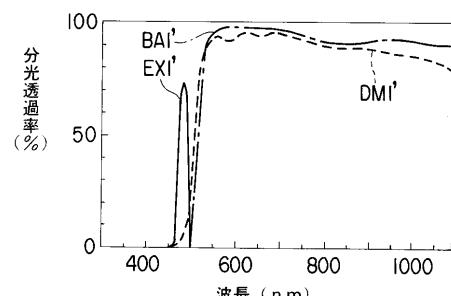
【図5】



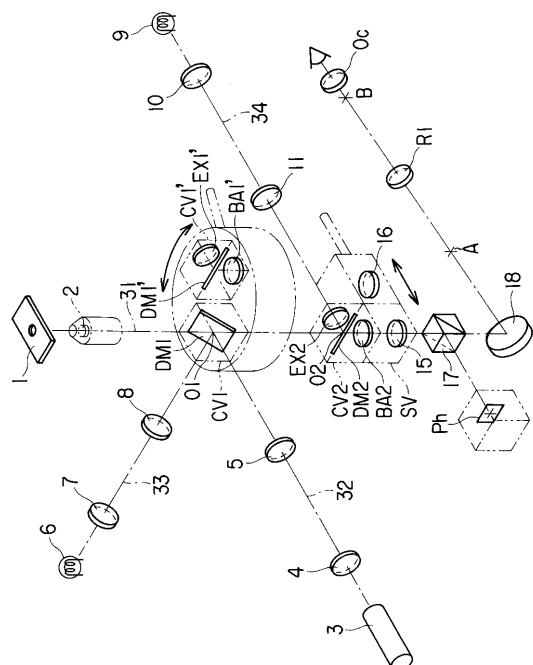
【図4】



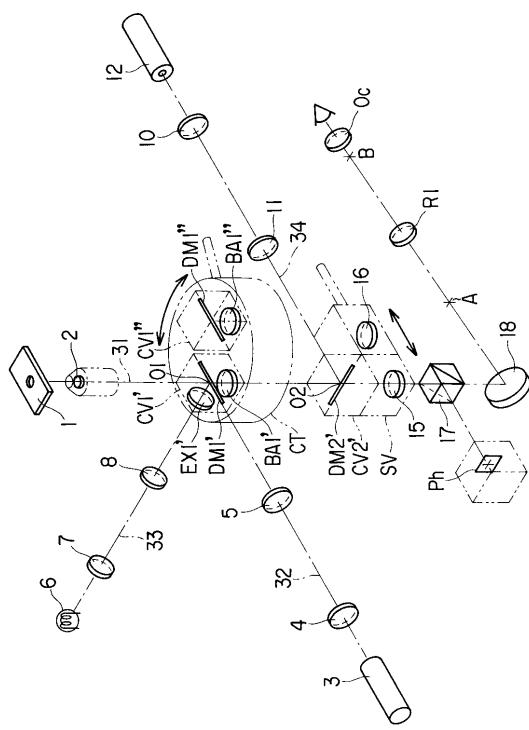
【図6】



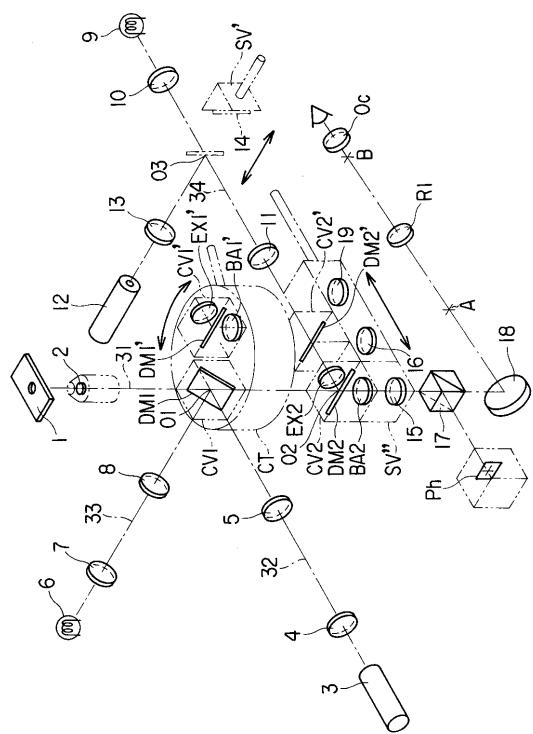
【図7】



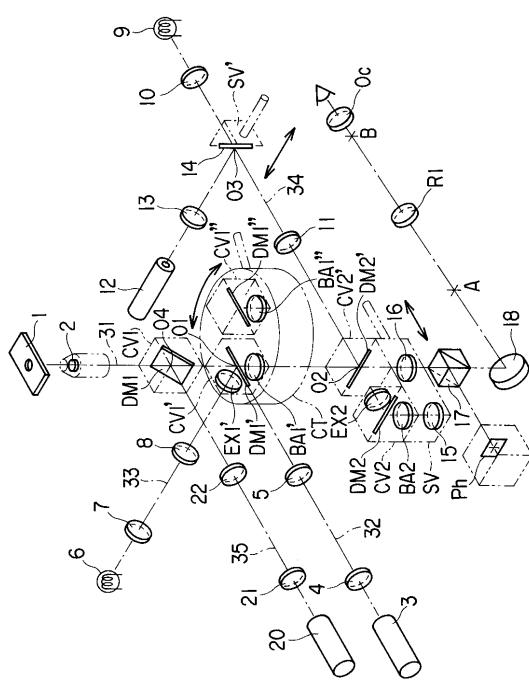
【図8】



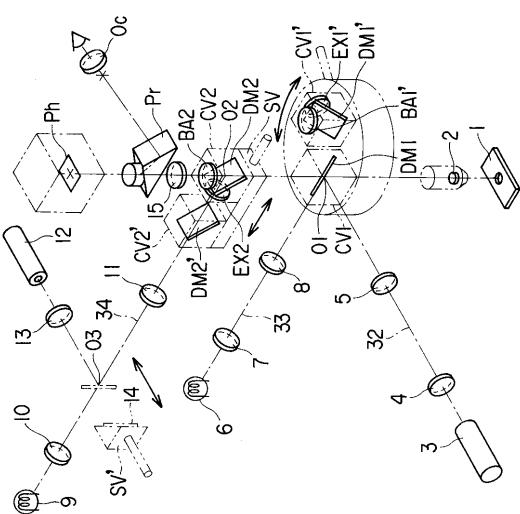
【図9】



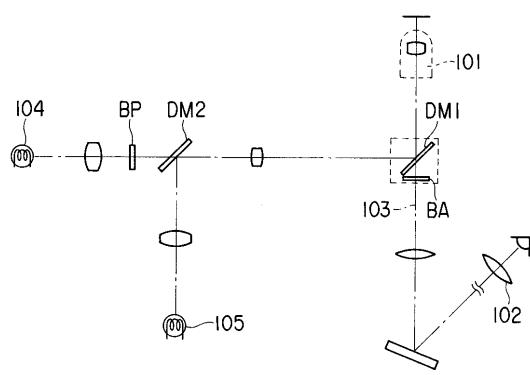
【図10】



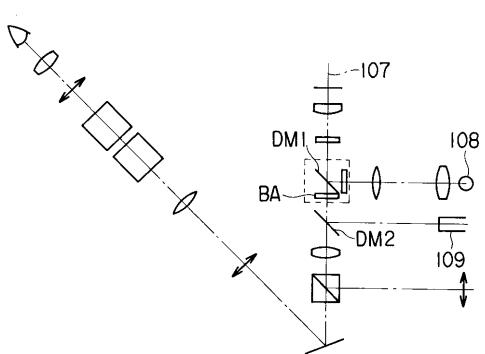
【図 1 1】



【図12】



【図13】



---

フロントページの続き

(72)発明者 青野 寧

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学工業株式会社内

(72)発明者 阿部 勝行

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学工業株式会社内

審査官 原田 英信

(56)参考文献 特開平8-234110(JP,A)

特開平10-206743(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 19/00-21/00

G02B 21/06-21/36