

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6189839号
(P6189839)

(45) 発行日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(24) 登録日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.

G02B 21/06 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

F 1

G02B 21/06
G01N 21/64

Z

請求項の数 9 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2014-523230 (P2014-523230)
 (86) (22) 出願日 平成24年7月31日 (2012.7.31)
 (65) 公表番号 特表2014-524589 (P2014-524589A)
 (43) 公表日 平成26年9月22日 (2014.9.22)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2012/003254
 (87) 國際公開番号 WO2013/020663
 (87) 國際公開日 平成25年2月14日 (2013.2.14)
 審査請求日 平成27年7月10日 (2015.7.10)
 (31) 優先権主張番号 102011109653.5
 (32) 優先日 平成23年8月6日 (2011.8.6)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 506151659
 カールツァイスマイクロスコピーゲ
 ーエムベーハー
 CARL ZEISS MICROSCO
 PY GMBH
 ドイツ連邦共和国 07745 イエナ
 カールツァイスープロメナーデ 10
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 照明アレイを備えるレーザ走査顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レーザ走査顕微鏡 (LSM) であって、
 少なくとも 1 つの光源であって、照明光線路が、前記少なくとも 1 つの光源から試料の
 方向に延びる、前記少なくとも 1 つの光源と、
 試料光、好ましくは蛍光光を検出器構成体に伝達するための少なくとも 1 つの検出光線
 路と、
 照明光線路と検出光線路とを分離するメインカラーフィルタと、
 少なくとも 2 つのマイクロレンズの光源グリッドを形成するためのマイクロレンズアレ
 イと、
 照明光と試料との間に、少なくとも一方向で相対運動を形成するスキャナと、
 顕微鏡対物レンズとを備え、
 前記レンズアレイが、該照明光線路と該検出光線路との共通部分内に配置され、
 前記光源グリッドを用いて励起、散乱および反射のうちの少なくとも一方によって生成
 され、前記レンズアレイによって視準化された試料光の複数の光線が、検出方向において
 、異なる角度で単一のピンホールにフォーカスされる、レーザ走査顕微鏡。

【請求項 2】

前記レンズアレイは、前記メインカラーフィルタと前記スキャナとの間に配置されてい
 る、請求項 1 に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項 3】

10

20

照明方向において、前記レンズアレイには、拡張された、好ましくは視準化された光線を形成するための光学系が前置され、

該光線は、該レンズアレイの複数のレンズによってその横断面において捕捉される、請求項1または2に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項4】

拡張された光線からミニレンズにより形成された照明スポットを、前記スキャナと走査光学系とを介して、前記顕微鏡対物レンズの前方の中間画像に伝達するための伝達光学系が設けられている、請求項1～3のいずれか一項に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項5】

検出方向において、レンズアレイにより視準化された個別の光線が、第2のレンズ構成体を介して前記单一のピンホールにフォーカスされる、請求項1～4のいずれか一項に記載のレーザ走査顕微鏡。 10

【請求項6】

前記单一のピンホールには、検出器構成体が後置され、

該検出器構成体は、各個別の光線に1つの検出器を割り当てる、請求項1～5のいずれか一項に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項7】

照明方向における前記单一のピンホールの前方には、好ましくはHFTの前方には、視準化された個別の光線を形成するための第3のレンズ構成体が設けられ、

該個別の光線は、前記レンズアレイの個別のレンズに当たる、請求項1～6のいずれか一項に記載のレーザ走査顕微鏡。 20

【請求項8】

前記第3のレンズ構成体は、2つのレンズグリッドから成り、

該2つのレンズグリッドは、個別の光線のテレセントリックな光線路を形成する、請求項7のいずれか一項に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項9】

照明部には、シングルスポット照明とマルチスポット照明とを切り替えるための切り替えユニットが設けられている、請求項1～8のいずれか一項に記載のレーザ走査顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、複数のスポットにより同時に試料をラスタ化し、画像記録時間の短縮を可能にするレーザ走査顕微鏡に関する。

【背景技術】

【0002】

この種の顕微鏡は、たとえば特許文献1に記載されている。多重光線を形成する装置は、たとえば特許文献2に記載されている。図5は例として、ZEISS社 LSM710に基づくLSM光線路を示す。付加的に特許文献3を開示の構成部分として参照されたい。この文献は、さらなるLSM光線路を詳細に記述する。共焦点走査顕微鏡はレーザモジュールを含み、このレーザモジュールは好ましくは複数のレーザ光源から成り、これらのレーザ光源は波長の異なる照明光を形成する。照明光が照明光線として入力結合される走査装置は、メインカラースプリッタ、x-yスキャナ、および走査対物レンズ並びに顕微鏡対物レンズを有し、これにより照明光線を光線偏向によって、顕微鏡ユニットの顕微鏡台上に存在する試料の上に案内する。これにより形成され、試料から発する測定光線が、メインカラーフィルタと結像光学系とを介して、少なくとも1つの検出チャネルの少なくとも1つの検出絞り（検出ピンホール）に向けられる。 40

【0003】

2つのレーザまたはレーザ群LQ1とLQ2の光は、図5ではそれぞれ、照明光線と検出光線路の分離のためのメインカラーフィルタHFT1とHFT2を介し、まず、好まし

50

くはX方向およびY方向のための2つの独立したガルバノメータ走査ミラーから成るスキヤナにより、(図示しない)走査光学系SCOの方向へ、そしてこの走査光学系と顕微鏡対物レンズOとを介して、通常のように試料に達する。メインカラーフィルタは、切り替え可能な二色性フィルタホイールとして構成することができ、波長の選択をフレキシブルにするため交換可能である。試料光は、スプリッタHFT1、HFT2を通過し、検出部Dの方向に達する。ここで検出光はまず、ピンホールに前置および後置されたピンホール光学系PHOを介してピンホールPHと、不所望の光線成分を狭帯域にろ波除去するためのフィルタ構成体Fであって、たとえばノッチフィルタから成るフィルタ構成体とを通過し、ビームスプリッタBS、ミラーMおよびさらなる偏向部を介して、検出光線をスペクトル分解するためのグリッドGに達する。前記ビームスプリッタBSは、任意選択で透過成分に関して相応に接続されれば、外部検出モジュールへの出力結合を可能にする。グリッドGにより分解された拡散スペクトル成分は結像ミラーIMによって視準化され、検出構成体の方向に達する。検出構成体は、縁部領域にある個々のPMT1、PMT2と、中央に配置されたマルチチャネル検出器MPMTから成る。マルチチャネル検出器の代わりに別の個別検出器を使用することもできる。レンズL1の前方には光軸に対して垂直に移動可能な2つのプリズムP1、P2が縁部領域に配置されている。これらのプリズムは、スペクトル成分の一部を統合し、統合されたスペクトル成分はレンズL1を介して個々のPMT1およびPMT2にフォーカスされる。検出光線の残りの部分は、PMT1とPMT2の面を通過した後、第2のレンズL2を介して視準化されスペクトル分解されて、MPMTの個々の検出チャネルに向けられる。プリズムP1、P2の移動によって、試料光のどの部分をMPMTによりスペクトル分解して検出し、どの部分をプリズムP1、P2を介して統合してPMT1とPMT2により検出するかをフレキシブルに調整することができる。10

【0004】

レーザ走査顕微鏡の制限要因はその走査速度である。現在のシステムにより、平均的条件下で約5～10画像/秒を走査することができる。

画像記録時間を短縮するためのアプローチは、レゾナントスキヤナの使用である。この原理によりビデオ速度が達成される。しかしながらレゾナントスキヤナは別の欠点を有し、たとえば走査周波数が固定されている。極めて基本的に、走査速度が高い場合にはピクセル時間も非常に短く、そのため試料からの十分な光を検出できるようにするために、この時間における強度も非常に大きくならなければならない。これにより1つのスポットによるLSMの速度が基本的に制限される。20

【0005】

別のアプローチは、「スキヤニングディスク」システムを使用することである。(たとえばZeiss社のCell Observer SD)このシステムは、共焦点ピンホールとして用いられる複数のホールを備える回転ディスクを使用する。ホールの数は非常に多くすることができ、高い画像記録が達成可能である。しかしながらこのシステムではフレキシビリティが非常に小さく、たとえばホールの大きさを適合することはできない。同様にx yスキヤナの全ての利点、たとえば可変の画像サイズおよびズームファクタが失われてしまう。検出される光強度は非常に小さい。30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第6028306号

【特許文献2】独国特許公開公報第19904592号

【特許文献3】独国特許公開公報第19702753号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、上記欠点をなくして走査速度を上昇させることである。40

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の課題は独立請求項の特徴によって解決される。好ましい改善形態は従属請求項の対象である。

以下に示す本発明は、従来のスキャナにおいて使用するための複数のスポットの形成および検出の問題を解決する。n個のスポットによる走査によって画像記録時間は、1つの個別スポットスキャナにより必要となる時間の $1/n$ に短縮される。フレキシビリティは走査スポットの所定のラスタによってだけ制限される。

【0009】

複数のスポットを形成するための主要要素は、n個のレンズを備えるレンズアレイである。 10

欧州特許出願公開第785447号明細書では、フィルタリングのためのレンズアレイが検出部に設けられている。日本特許出願公開第10311950号明細書には、「ピンホールアレイ」としてのホールプレートと共同作用するマイクロレンズアレイが記載されている。米国特許第6028306号明細書でも同様にピンホールアレイが使用される。

【0010】

本発明によれば1つのレンズアレイだけが、好ましくはメインカラースプリッタとスキャナとの間に、しかしいずれの場合でも共通の照明光線路/励起および検出光線路内に配置されている。大面積の、好ましくは視準化された励起光線によって照明される。照明側では、n個のレンズ数に対応してn個の焦点が発生する。全ての焦点はテレセントリックに照明することができ、レンズの主光線は光学システムの軸に対して平行に延在する。1つのさらなるレンズ(マルチスポット対物レンズ)によって全ての焦点が視準化され、同時に、視準化された光線がシステムに光軸に向かって屈折される。これらの光線は、焦点がテレセントリックに照明される場合、マルチスポットレンズの後方焦点に集まる。このポイントにシステムのスキャナが配置される。さらなる構成は、通常のLSMの構成に対応する。したがって、中間画像を形成する走査対物レンズが続く。この中間画像は、いまや1つだけではなくn個のスポットを励起側に含む。スキャナ偏向によって、これらのスポットは共通に中間画像内で移動される。中間画像は、通常のように対物レンズを介して試料に結像される。試料内には励起により、とりわけ蛍光光が形成される。この蛍光光は、通常のように対物レンズによって中間画像に結像され、スキャナによりデスキャンされる。マルチスポット対物レンズは、別個の検出スポットを備えるさらなる中間画像を形成する。これらのスポットは次に、ミニレンズアレイにより個別に無限大に結像される。この個別の結像によって、全ての個別スポットが実質的に視準化された光線が発生する。これらの光線はメインカラーフィルタを通過し、ピンホール対物レンズによって、好ましくはただ1つのピンホールに結像される。以前は平行に延在していたことにより、全てのスポットはピンホール面に、種々異なる角度の下で「集まる」。これにより、1つの共通のピンホールを全ての光線に対して使用することが可能になる。このピンホールは調整可能な直径を有することができ、この直径は全ての光線に対して実際上、同じように作用する。(光線相互間の角度は非常に小さく、投影された面は全ての光線に対してほとんど同じ大きさである。)光線がピンホールを通過した後、これらの光線は再び分かれる。このことは、各1つの固有の検出器により全ての光線を別個に検出することを可能にする。 20 30 40

【0011】

本発明の主要な要素および利点は以下のとおりである。

- ・1つのレンズアレイによる複数のスポットの形成
- ・同じレンズアレイを、複数の検出スポットの平行視準化に使用すること
- ・使用される立体角を利用した、複数の検出スポットに対する1つの共通のピンホール
- ・ミニレンズアレイを使用することの結果としての、光線の平行化によるメインカラーフィルタ上の小さな角度スペクトル(このことは、光線が通常の二色性である場合、フィルタのエッジ急峻度を改善する)

検出は、別個の光線路によって行うことも可能である。ピンホール対物レンズと個々の 50

ピンホールの代わりに、ピンホールレンズアレイとピンホールアレイが使用される。この実施形態の利点は、チャネル間のクロストークが小さいことである。小さな欠点は手間暇が掛かることであり、付加的なレンズアレイと、とりわけピンホールアレイが必要になる。全てのスポットがそれらのピンホールに中心で当たるようにするため、全ての光線路は互いに正確に整合されなければならない。

【0012】

スポットサイズと間隔との比率は、レンズアレイのレンズの大きさ、レンズアレイのレンズの間隔、およびレンズアレイのレンズの焦点距離によって自由に設定することができる。有利にはレンズアレイは、別のレンズアレイと交換可能にすることができる。最適の励起作用を達成するために、レンズアレイのレンズは可及的に密でなければならない。なぜならレンズの間の領域に当たる励起光は使用されないからである。充填係数が小さくなければならない場合、励起光線路で前方に位置するテレスコープアレイによって、効率を理論限界まで上昇させることができる。このために、入力側に高い充填係数を有するテレスコープアレイが導入され、スポットは同時に縮小される。そして出力側には光線が間隔を置いて発生する。この間隔は、レンズアレイに応じて選択される。多くの場合、少数のスポットによる走査が必要なこともある。原理的に励起光線路は簡単に遮光され、これにより比較的少数のミニレンズが照明される。残りの励起光は失われる。改善された変形例は、たとえば視準化された励起光線を縮小する可変光学系を使用することにより得られる。これは有利には交換コリメータの導入により達成される。交換コリメータは2つのレンズを含んでおり、これらの両方がファイバからの光を視準化する。比較的小さなレンズが、コリメータレンズとの交換で横断面から拡張する光を形成し、この横断面は複数の個別レンズを捕捉し、ここでは光線束がレンズアレイの1つのレンズだけを照明する。このようにして1つスポットだけが発生し、システム全体は通常のLSMのように動作する。この1つのスポットの励起強度はn倍の大きさであり得る。検出側では対応の検出器を読み出すだけで十分である。それにもかかわらず、たとえば試料の厚さについての付加的な情報を獲得するために、他の複数の検出器をともに読み出すことができる。

10

20

【0013】

スポットの形成は、HFTの前方の照明装置に移すこともできよう。この場合、検出側には別個の焦点が発生し、これらの焦点はピンホールアレイにより弁別することができる。このような変形例は、検出光線路中の構成素子を最少にし、したがって検出光損失を最小にする。しかし面倒な構成素子が必要であり、ミニレンズアレイの誤差は補償されない。なぜなら構成素子が励起側でしか使用されないからである。

30

【0014】

以下本発明の有利な実施形態を、図1～4に基づき詳細に説明する。

以下の参照符号が使用される。

F：ファイバ

KO：ファイバコリメータレンズ

Hf t：顕微鏡のメインカラーフィルタ

LA1...n>：nの個別レンズから成るレンズアレイ

L：マルチスポットレンズ

40

SC：スキヤナ

SCO：スキヤナ対物レンズ

ZB：中間画像

O：顕微鏡対物レンズ

DE：検出光線路

PHO：ピンホール対物レンズ

PH：個別ピンホール

ZB1、ZB2：中間画像面

DE1...n：n個の個別検出器から成る検出器アレイ

PHA：ピンホールアレイ

50

M L A P H : ピンホール・マイクロレンズアレイ

M L T : ミニレンズ・テレスコープ

A W : 交換コリメータ

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】(a)は特定部分の試料方向における照明方向成分を示し、(b)は特定部分における試料光を検出する検出方向成分を示し、(c)は特定部分における検出器全高の光線路を示す。

【図2】(a)は特定部分の試料方向における照明方向成分を示し、(b)は特定部分における試料光を検出する検出方向成分を示し、(c)は特定部分における検出器全高の光線路を示す。

10

【図3】(a)は特定部分の試料方向における照明方向成分を示し、(b)は特定部分における試料光を検出する検出方向成分を示し、(c)は特定部分における検出器全高の光線路を示す。

【図4】(a)は特定部分の試料方向における照明方向成分を示し、(b)は特定部分における試料光を検出する検出方向成分を示し、(c)は特定部分における検出器全高の光線路を示す。

【図5】L S M光線路を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

20

図1～4は、共通にそれぞれ、(a)特定部分の試料方向における照明方向成分、(b)特定部分における試料光を検出する検出方向成分、(c)特定部分における検出器全高の光線路を示す。それぞれ図1(a)、図2(a)、図3(a)、図4(a)に基づき、参照符号に基づいて図示されたエレメントは、参照符号がなくても、図1(b)、図2(b)、図3(b)および図4(b)の構成部分に対応する。照明光がファイバFから拡散して出射し、コリメータKOを介して視準化され、顕微鏡のメインカラーフィルタHFTにより試料の方向に反射され、レンズアレイLAに達する。LAにより中間画像ZB1に形成された照明スポットは、マルチスポットレンズLを介して視準化され、光軸に対して屈折され、テレセントリックな照明の場合、スキャナSCが配置されているLの後方焦点に集まる。スキャナ対物レンズSCOの後方の中間画像ZB2に形成された焦点はさらに、図示しない顕微鏡対物レンズOを介して試料に結像され、これにより少なくとも一次元スキャナによって照明スポットが試料上で移動される。試料から発する光は、同じエレメントを介して検出部DEの方向に達する。検出部はそれぞれ図1(c)、図2(c)、図3(c)、図4(c)の部分に詳細に図示されている。HFTにおける照明光線路および検出光線路は入れ替えて良く、その場合、照明光はHFTを透過して試料の方向に達し、HFTは試料光を検出部の方向に反射する。

30

【0017】

図1(c)では、LAの通過後に視準化された個別の光線がピンホール対物レンズによってピンホールの面に集束される。したがって、ただ1つのピンホールが必要なだけである。PHOの焦点距離の2倍の位置には、照明された個々の試料スポットに対応する検出器DE1...nがあり、これらは試料により形成された蛍光分布を検出する。

40

【0018】

図2(c)では、個別ピンホールの代わりにLAのマイクロレンズの焦点にピンホールアレイが使用され、このピンホールアレイには検出器アレイDE1...nがさらに後置されている。

【0019】

図3(a)では、ファイバコリメータKOに加えて、順番に配置された2つのミニレンズアレイから成るテレスコープアレイがHTFの前方に、視準化された個々の光線束を形成するために後置されている。光線はさらにMLAを介して試料方向に達する。

【0020】

50

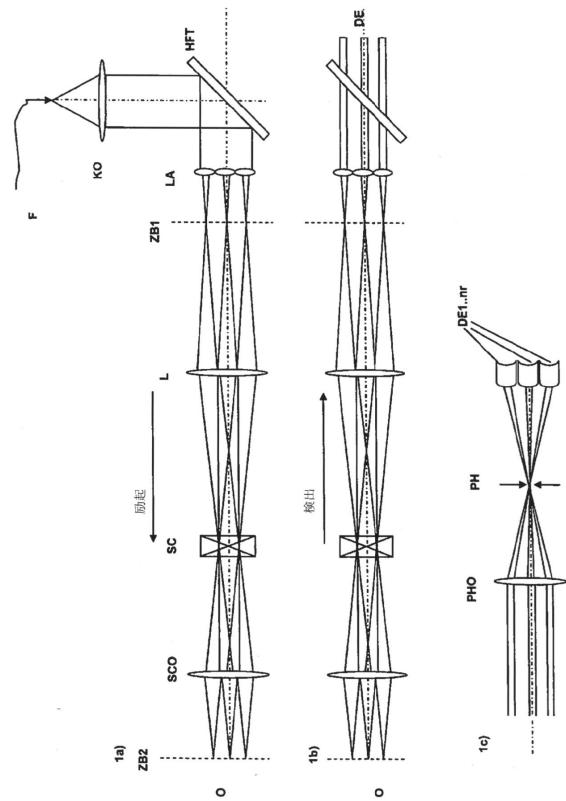
図4(a)には、交換ユニットAWが破線で示されており、これにより図1のコリメータと、ただ1つの中心光線を形成するためのシングルレンズとを交換することができる。中心光線は、TAとLAで中心軸とそれぞれ1つのレンズだけを通過し、これにより試料上に1つのスポット照明を形成する。これによりシングルスポットLSMとマルチスポットLSMとを簡単に切り替えることができる。本発明の前記実施形態は、任意のLSM光線路で実現することができる。図5による光線路の場合、これは、図示のメインカラーフィルタHFT1またはHFT2のうちの1つの後方、かつ照明方向でスキャナの前方が考えられる。

【0021】

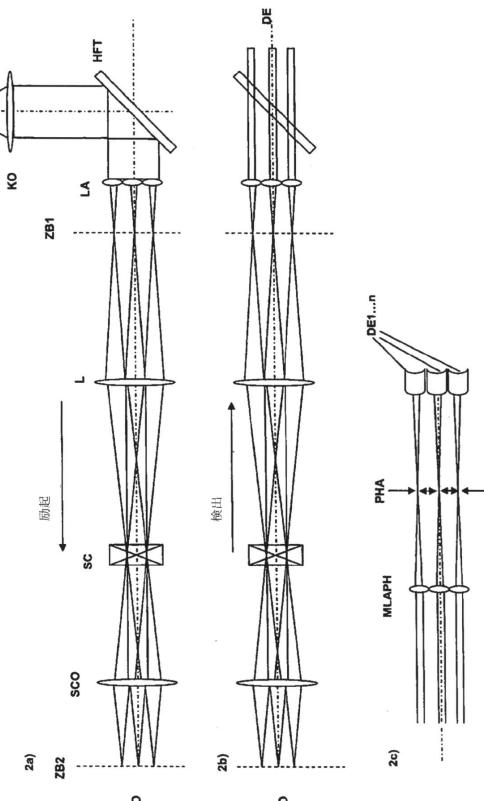
本発明は、記述された実施形態に拘束されるものではなく、当業者であればさらに有利に構成することができる。

10

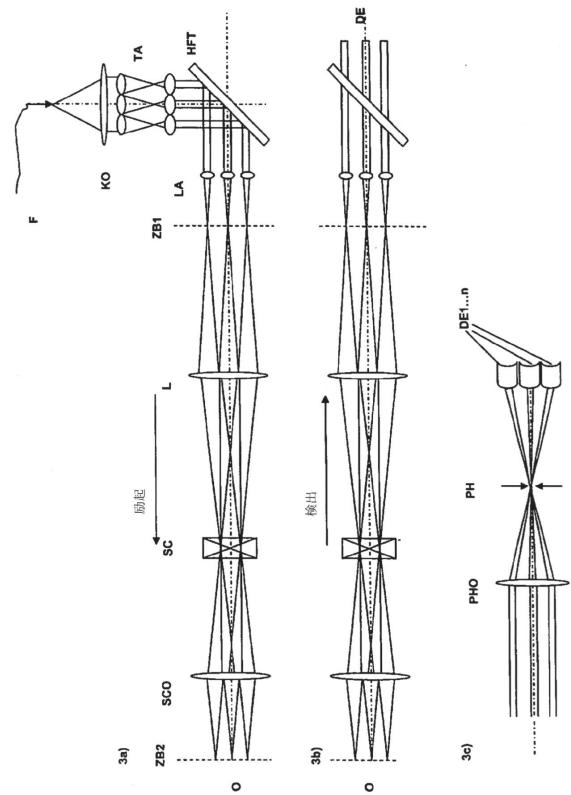
【図1】



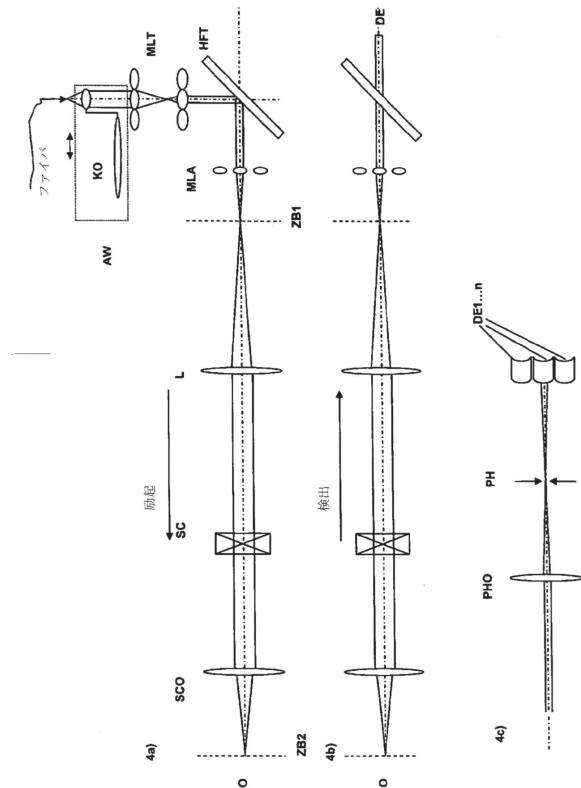
【図2】



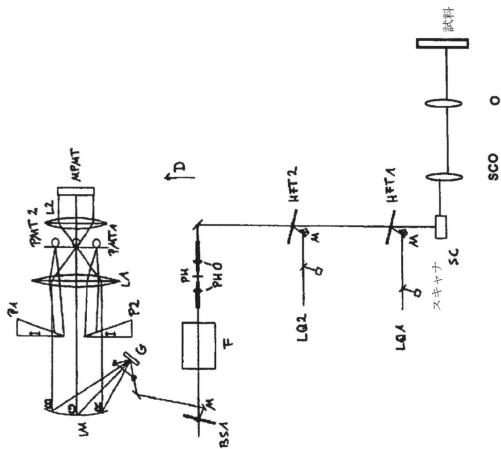
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 バッセ、ウォルフガング
ドイツ連邦共和国 07743 イエナ ノイガッセ 36

審査官 越河 勉

(56)参考文献 特開平10-311950 (JP, A)
特開2000-180139 (JP, A)
特表2005-533996 (JP, A)
米国特許第06288382 (US, B1)
独国特許出願公開第10127137 (DE, A1)
米国特許第06028306 (US, A)
特開平09-219358 (JP, A)
米国特許出願公開第2004/0061042 (US, A1)
米国特許出願公開第2011/0235170 (US, A1)
特開2011-209428 (JP, A)
国際公開第2008/047893 (WO, A1)
米国特許出願公開第2009/0195866 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/06
G01N 21/64