

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6684875号  
(P6684875)

(45) 発行日 令和2年4月22日(2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年4月1日(2020.4.1)

(51) Int.Cl.		F I
GO1J 3/44	(2006.01)	GO1J 3/44
GO1J 3/26	(2006.01)	GO1J 3/26
GO1N 21/65	(2006.01)	GO1N 21/65

請求項の数 6 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2018-171147 (P2018-171147)	(73) 特許権者	598072179 株式会社片岡製作所 京都府京都市南区久世築山町140番地
(22) 出願日	平成30年9月13日(2018.9.13)	(74) 代理人	100085338 弁理士 赤澤 一博
(65) 公開番号	特開2020-41960 (P2020-41960A)	(74) 代理人	100148910 弁理士 宮澤 岳志
(43) 公開日	令和2年3月19日(2020.3.19)	(72) 発明者	鈴木 正美 京都府京都市南区久世築山町204-1 株式会社片岡製作所内
審査請求日	平成30年9月13日(2018.9.13)	審査官	横尾 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分光分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料に臨み、当該試料に光を照射した結果二次元的に拡張した平面領域で生ずる応答光を入射させる対物レンズと、

前記対物レンズを通過した応答光を入射させこれを p 偏光成分と s 偏光成分とに分離する第一の偏光ビームスプリッタと、

入射する光のうちの一部の波長成分のみを透過させるものであり、前記第一の偏光ビームスプリッタから出射した一方の光を入射させるとともに、その光の光軸に対して交わる角度を操作可能な第一の多層膜フィルタと、

入射する光のうちの一部の波長成分のみを透過させるものであり、前記第二の偏光ビームスプリッタから出射した他方の光を入射させるとともに、その光の光軸に対して交わる角度を操作可能な第二の多層膜フィルタと、

前記第一の多層膜フィルタを透過した光及び前記第二の多層膜フィルタを透過した光をそれぞれ入射させて両者を重畳した出力光を得る第二の偏光ビームスプリッタと、

前記第二の偏光ビームスプリッタから出射した出力光を入射させる結像レンズと、

前記結像レンズを通過した出力光を受光することにより前記平面領域の画像を一度に獲得するイメージセンサと

を具備する分光分析装置。

【請求項2】

前記第二の多層膜フィルタとして、前記第一の多層膜フィルタと同等の特性を有するフィ

ルタを用いることとし、

前記第二の多層膜フィルタの姿勢及び当該第二の多層膜フィルタの回転軸の向きを、同フィルタを通過する光の光軸回りに、前記第一の多層膜フィルタの姿勢及び当該第一の多層膜フィルタに対して90°変位させる請求項1記載の分光分析装置。

【請求項3】

前記対物レンズから前記イメージセンサまでの間に回折格子分光器が存在しない請求項1または2記載の分光分析装置。

【請求項4】

前記応答光が、光を照射した対象の試料から発生するラマン散乱光である請求項1、2または3記載の分光分析装置。

10

【請求項5】

前記応答光が、ポンプ光及びストークス光であるスーパーコンティニウム光を対象の試料に照射した結果発生する、コヒーレントアンチストークスラマン散乱光である請求項4記載の分光分析装置。

【請求項6】

前記第一の多層膜フィルタ及び前記第二の多層膜フィルタがそれぞれ、入射する光の入射角が45°またはその近傍の角度のときに近赤外光を透過させるものである請求項5記載の分光分析装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、入力光に含まれる波長成分のうちの任意の波長成分を出力光として抽出することのできる分光分析装置に関する。

【背景技術】

【0002】

近時、体性幹細胞や胚性幹細胞（ES細胞（embryonic stem cells））、人工多能性幹細胞（iPS細胞（induced pluripotent stem cells））を用いた再生医療技術及び創薬の研究開発が勃興している。この種の研究開発においては、必要となる目的細胞や組織を効率よく量産できることが極めて重要となる。

30

【0003】

患者の傷ついた組織や臓器を補う再生医療の目的で用いる細胞集合体に不良のまたは不要な細胞が混交していると、本来の効用を発揮できないおそれがあるだけでなく、腫瘍化その他の患者の健康に悪影響を及ぼすことにもなりかねない。しかしながら、不要細胞が混入している培養容器を丸ごと廃棄することは、目的細胞または組織の収率（歩留まり）の低下につながり、再生医療のコストを高騰させる。目的細胞または組織の収率を改善するには、培養容器内に存在する不要細胞を死滅させて除去し、残りの細胞を無駄にせず利用することが望ましい。

【0004】

そこで、集光性に優れたレーザ光により、増殖した細胞中の不要細胞のみを選択的に死滅させることが行われるようになった（下記特許文献1を参照）。

40

【0005】

細胞培養容器内に存在する生細胞の集合体のうちのどの細胞が目的細胞であり、どの細胞が不要細胞であるかを分別するために、従来は顕微鏡を使用して観察、また画像を撮影して解析を行っていた。だが、個々の細胞の素性を確実にかつ速やかに判定することは容易ではない。

【0006】

細胞の素性を判別する手法として、スーパーコンティニウム（supercontinuum）光を用いたコヒーレントアンチストークスラマン散乱（coherent anti-Stokes Raman scattering）を利用し、遺伝子発現によ

50

り合成されたタンパク質の種類等を知得することが有力視されている。SC光は、高強度かつ広帯域のいわば「白色」のレーザ光である。このSC光をストークス光としてポンプ光に重畳して対象の細胞に照射し、得られるCARS光を回折格子分光器により分光してそのスペクトルを分析することにより、細胞内の分子種や分子構造を同定できるのみならず、細胞の生命活性をも選択的にモニタできることが明らかとなってきた（下記非特許文献1を参照）。

【0007】

CARS光の分光分析を実行する場合、回折格子分光器から出力される回折光をCCDやCMOS等のイメージセンサに入力する。イメージセンサ上の受光素子であるフォトダイオードの位置がCARS光に含まれるスペクトルの波長に対応し、そのフォトダイオードが受光した光の強度が当該波長成分の強さということになる。

10

【0008】

このような回折格子分光器を使用する方法では、1 $\mu$ m幅程度の狭小なスポット範囲を調査することはできても、二次元的に拡張した平面領域を一度に観察することはできない。平面領域のイメージングを行うためには、光軸に対して相対的に試料を移動させながら、多数回の分光分析を反復して実行しなければならない。従って、例えば細胞培養ディッシュ内で増殖させた細胞集合体の全体像を獲得するまでに長い時間を要することとなり、実用面で難がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0009】

【特許文献1】特許第6090891号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】加納 英明、“スーパーコンティニューム光を用いたコヒーレントラマン分光”、[online]、MOLECULAR SCIENCE（分子科学会学会誌）、[平成30年9月1日検索]、インターネット<URL：<http://j-molsci.jp/article/2007#1/A0005.pdf>>

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0011】

本発明は、回折格子分光器を使用せず、任意の波長成分を含む出力光を得ることができ、しかもその波長成分を速やかに変化させることができる分光分析装置を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明では、試料に臨み、当該試料に光を照射した結果二次元的に拡張した平面領域で生ずる応答光を入射させる対物レンズと、前記対物レンズを通過した応答光を入射させこれをp偏光成分とs偏光成分とに分離する第一の偏光ビームスプリッタと、入射する光のうちの一部の波長成分のみを透過させるものであり、前記第一の偏光ビームスプリッタから出射した一方の光を入射させるとともに、その光の光軸に対して交わる角度を操作可能な第一の多層膜フィルタと、入射する光のうちの一部の波長成分のみを透過させるものであり、前記第二の偏光ビームスプリッタから出射した他方の光を入射させるとともに、その光の光軸に対して交わる角度を操作可能な第二の多層膜フィルタと、前記第一の多層膜フィルタを透過した光及び前記第二の多層膜フィルタを透過した光をそれぞれ入射させて両者を重畳した出力光を得る第二の偏光ビームスプリッタと、前記第二の偏光ビームスプリッタから出射した出力光を入射させる結像レンズと、前記結像レンズを通過した出力光を受光することにより前記平面領域の画像を一度に獲得するイメージセンサとを具備する分光分析装置を構成した。

40

【0013】

50

前記第二の多層膜フィルタとして、前記第一の多層膜フィルタと同等の特性を有するフィルタを用いる場合、前記第二の多層膜フィルタの姿勢及び当該第二の多層膜フィルタの回転軸の向きを、同フィルタを通過する光の光軸回りに、前記第一の多層膜フィルタの姿勢及び当該第一の多層膜フィルタに対して90°変位させる。

【0014】

前記対物レンズから前記イメージセンサまでの間に回折格子分光器が存在しなくとも、各多層膜フィルタを透過した波長成分を含む出力光による平面領域の画像を一時に獲得することができる。

【0015】

前記応答光は、例えば、光を照射した対象の試料から発生するラマン散乱光である。特に、前記応答光は、ポンプ光及びストークス光であるスーパーコンティニューム光を対象の試料に照射した結果発生する、コヒーレントアンチストークスラマン散乱光であることがある。

10

【0016】

対象の試料が生細胞その他の生体試料であるとき、前記第一の多層膜フィルタ及び前記第二の多層膜フィルタはそれぞれ、例えば入射する光の入射角が45°またはその近傍の角度のときに近赤外光を透過させるように設計したものとする。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、回折格子分光器を使用せず、任意の波長成分を含む出力光を得られ、しかもその波長成分を速やかに変化させることのできる分光分析装置を実現することが可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】本発明の一実施形態の分光分析装置の構成を示す図。

【図2】同実施形態の分光分析装置における多層膜フィルタの入射光の入射角と透過光の波長との関係を例示する図。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の一実施形態を、図面を参照して説明する。図1に、本実施形態の分光装置の構成を示している。本分光装置は、光101を照射した試料0から発せられる応答光102に含まれる波長スペクトルの分光分析を行うためのものである。

30

【0020】

応答光102は、試料0に光101を照射した結果試料0から放たれるラマン散乱光である。特に、本実施形態では、CARSを利用して生体試料0の調査、判別を行うことを趣旨としている。故に、試料0に照射する光101はポンプ光にストークス光を重畳したものであり、応答光102はCARS光である。

【0021】

ポンプ光及びストークス光101はそれぞれ、ピコ秒レーザやフェムト秒レーザといった超短パルスレーザである。ポンプ光には、近赤外光、例えば波長1064nmのレーザを用いる。ストークス光には、様々な波長成分を万遍なく含んだSC光を用いる。SC光の発生には、フォトリック結晶ファイバ（photonic crystal fiber）と呼ばれる非線形光ファイバや、テーパ状ファイバと呼ばれる通常の光ファイバを伸延してコアを極細に変形させたものを使用する。本実施形態では、ポンプ光用のレーザ光源が発振するレーザをビームスプリッタ等により複数に分割し、一方をそのままポンプ光とし、他方をPCFまたはテーパ状ファイバに入射させてSC光を得、それらを重畳した上で試料0に照射する。

40

【0022】

本実施形態の分光装置は、試料0に臨む対物レンズ1と、対物レンズ1を通過した応答光102を入力光としてこれを入射させる第一の偏光ビームスプリッタ2と、第一の偏光

50

ビームスプリッタ2から出射する入力光102のp偏光成分103を入射させる第一の多層膜フィルタ3と、第一の偏光ビームスプリッタ2から出射する入力光102のs偏光成分104を入射させる第二の多層膜フィルタ4と、第一の多層膜フィルタ3を透過した光105及び第二の多層膜フィルタ4を透過した光106をそれぞれ入射させて両者を重畳した出力光107を得る第二の偏光ビームスプリッタ7と、第二の偏光ビームスプリッタ7から出射する出力光107を入射させる結像レンズ8と、結像レンズ8を通過した出力光107を受光して撮像を行うイメージセンサ9とを具備する。

#### 【0023】

第一の多層膜フィルタ3及び第二の多層膜フィルタ4はそれぞれ、これに入射する光103、104に含まれる一部の波長成分105、106のみを透過させるものである。各フィルタ3、4は、典型的にはバンドパスフィルタとして機能する干渉フィルタである。尤も、多層膜フィルタ3、4として、干渉フィルタ以外のフィルタ、例えばダイクロイックフィルタを採用することを妨げるものではない。一般的な多層膜フィルタ3、4は、透明基板の表面に誘電体光学薄膜を多層に重ねた構造をなし、入射光が多層膜を通過する過程での膜内多重反射による干渉現象により、所定の波長を選択的に透過させ、それ以外の波長を透過させない、そして極めて急峻な分光透過率変化を達成している。

#### 【0024】

多層膜フィルタ3、4の特徴として、これに入射する光103、104の光軸と交わる角度が変化することで、当該フィルタ3、4を透過する光105、106の波長及び透過しない光の波長が変化することが挙げられる。傾向としては、光103、104が入射するフィルタ3、4の境界面の法線と入射光103、104の光軸とがなす角度である入射角が大きくなるほど、当該フィルタ3、4を透過できる光105、106の波長が短くなる。これは、入射角により光学薄膜内での光路長が伸縮して干渉条件が変化し、その帰結として分光透過率特性が変動するからである。

#### 【0025】

本実施形態では、入射光103、104の入射角が0°よりも大きく90°よりも小さい中間的な所定角度、例えば45°であるときに、近赤外光に属する所定波長の光105、106を透過させ、それ以外の波長の光を透過させないように設計したバンドパスフィルタ3、4を用いる。近赤外光の定義は波長が約700nmないし約2500nmの光であるが、入射角45°またはその近傍の入射角におけるバンドパスフィルタ3、4の透過光105、106の中心波長は、約900nmないし約1300nmの範囲内の値であることが好ましい。図2に、バンドパスフィルタ3に対するp偏光の入射光103の入射角と、当該バンドパスフィルタ3を透過する光105の中心波長及びバンド幅、並びにp偏光成分の透過率の一例を示している。図示例では、入射角45°またはその近傍の入射角における透過光105の中心波長が、ポンプ光の波長に等しいか略等しい1064nmとなっている。また、透過光105のバンド幅は、数nm以下である。

#### 【0026】

このような多層膜フィルタ3、4を、例えばガルバノスキャナモータ等の回転駆動装置により回転軸31、41を中心に回転させ、当該フィルタ3、4に入射する光103、104の入射角を増減させることにより、当該フィルタ3、4を透過する光105、106の波長を変化させることが可能である。生体試料0に対するCARS分光分析を行う場合、透過光105、106の波長を近赤外光に属する範囲内で、特に約900nmないし約1300nmの範囲内で変化させ得ることが好ましい。一方で、波長が900nmを下回る短波長の透過光105、106は、必ずしも必要とされない。

#### 【0027】

本実施形態にあって、第一の多層膜フィルタ3の特性と、第二の多層膜フィルタ4の特性とは同等である。ここに言う「同等の特性」とは、双方のフィルタ3、4の特性の間に個体差のような微少な差が存在することを含んでいるのは勿論である。

#### 【0028】

但し、多層膜フィルタ3、4に入射する光103、104の入射角と、これを透過する

10

20

30

40

50

光105、106の波長との関係は、入射光103、104の偏光方向による影響を受ける。第二の多層膜フィルタ4として、第一の多層膜フィルタ3と同等の特性を有するフィルタを用いる場合、第一の偏光ビームスプリッタ2により二分された光103、104の偏光方向が相異なることを考慮に入れなければならない。本実施形態では、第二の多層膜フィルタ4の姿勢及び回転軸41を、第一の多層膜フィルタ3の姿勢及び回転軸31に対して相対的に、第二の多層膜フィルタ4に入射し透過する光104、106の光軸回りに、90°回転させている。例えば、入射光103、104の光軸を含む仮想的な平面(図1の紙面)に対して、第一の多層膜フィルタ3の回転軸31が直交しているとき、第二の多層膜フィルタ4の回転軸41は当該平面と平行となっている。これにより、入力光102のp偏光成分103が入射する第一の多層膜フィルタ3及び当該フィルタ3を回転駆動する制御系と、s偏光成分104が入射する第二の多層膜フィルタ4及び当該フィルタ4を回転駆動する制御系とを共通化できる。

10

**【0029】**

第二の多層膜フィルタ4を透過した光106は、複数枚の全反射ミラー5、6により反射されて、第一の多層膜フィルタ3を透過した光105と直交または略直交する。各ミラー5、6は、位置や角度の調節が可能となっている。また、ミラー5、6間に、焦点調整用のレンズやビームエキスパンダ等を介在させることを妨げない。

**【0030】**

第二の偏光ビームスプリッタ7は、第一の多層膜フィルタ3を透過した光105の光軸と、第二の多層膜フィルタ4を透過した光106の光軸とが交わる位置に所在する。そして、それらの光105、106の入射を受け、両者を重畳した出力光107を出射する。

20

**【0031】**

出力光107は、結像レンズ8を経てCCDまたはCMOS等のイメージセンサ9に入射する。イメージセンサ9は、その出力光107を受光して撮像する。なお、必要に応じて、試料0に照射する光101の波長成分その他の不要な光を遮断するためのノッチフィルタまたはバンドストップフィルタを、イメージセンサ9の上流に配置してよい。

**【0032】**

本実施形態の受光装置の特長は、対象の試料0における、ポンプ光及びSC光101の照射を受けて励起した平面領域を一時にイメージングできる点にある。その撮像領域の大きさは、対物レンズ1と結像レンズ8の焦点距離やイメージセンサ9の視野サイズ及び画素分解能等にも依存するが、数十 $\mu\text{m}$ 四方ないし2mm四方程度の領域の撮像が可能である。撮影画像の限界分解能は、1 $\mu\text{m}$ 以下を実現できる。

30

**【0033】**

既に述べた通り、出力光107に含まれる波長、即ちCARS光102から抽出される波長は、多層膜フィルタ3、4の入射角によって決定される。多層膜フィルタ3、4の入射角は、人手によらず自動で、かつ高速に変化させることが可能である。多層膜フィルタ3、4の入射角を徐変させる制御を実行しつつ、イメージセンサ9により出力光107を受光し撮像する処理を反復すれば、CARS光102に含まれ得る様々な波長について、平面領域の画像を獲得できる。つまり、平面領域内の各箇所が発生した応答光102の波長スペクトルを短時間で調査することができる。ひいては、平面領域内の各箇所に存在する分子種や分子構造の同定、各箇所に存在する細胞の判別、生命活性のモニタ等を、実用的な所要時間で遂行できる。

40

**【0034】**

対象の試料0の大きさが一度に撮像可能な平面領域の大きさを超えているならば、試料0を照射光101及び応答光102の光軸に対して相対的に変位させながら撮像を繰り返せばよいことは言うまでもない。

**【0035】**

本実施形態では、入射する入力光102をp偏光成分103とs偏光成分104とに分離する第一の偏光ビームスプリッタ2と、入射する光103のうちの一部の波長成分105のみを透過させるものであり、前記第一の偏光ビームスプリッタ2から出射した一方の

50

光 1 0 3 を入射させるとともに、その光 1 0 3 の光軸に対して交わる角度を操作可能な第一の多層膜フィルタ 3 と、入射する光 1 0 4 のうちの一部の波長成分 1 0 6 のみを透過させるものであり、前記第一の偏光ビームスプリッタ 2 から出射した他方の光 1 0 4 を入射させるとともに、その光 1 0 4 の光軸に対して交わる角度を操作可能な第二の多層膜フィルタ 4 と、前記第一の多層膜フィルタ 3 を透過した光 1 0 5 及び前記第二の多層膜フィルタ 4 を透過した光 1 0 6 をそれぞれ入射させて両者を重畳した出力光 1 0 7 を得る第二の偏光ビームスプリッタ 7 とを具備する分光装置を構成した。

【 0 0 3 6 】

多層膜フィルタの入射角を変化させることを通じて当該フィルタを透過する波長成分を選好しようとする、当該フィルタに入射する光の偏光方向によって透過する光の波長が影響を受ける。だが、本実施形態のように、入力光 1 0 2 を一旦 p 偏光成分 1 0 3 と s 偏光成分 1 0 4 とに分離し、それらを別々に多層膜フィルタ 3、4 に入射させ、その透過光 1 0 5、1 0 6 を再度重畳する構造としたことにより、偏光方向の影響を排除した正確な出力光 1 0 7 を抽出することが可能となる。

10

【 0 0 3 7 】

本実施形態によれば、回折格子分光器を使用せず、任意の波長成分を含む出力光 1 0 7 を得られ、しかもその波長成分を速やかに変化させることのできる分光装置を実現できる。

【 0 0 3 8 】

なお、本発明は以上に詳述した実施形態に限られるものではない。特に、本発明の実用上の用途は、CARS 分光分析には限定されない。本発明は、CARS ではないラマン分光分析にも当然に適用することができる。その場合、応答光である入力光 1 0 2 は励起光 1 0 1 を試料 0 に照射することで発生するラマン散乱光であり、出力光 1 0 7 はラマン散乱光 1 0 2 に含まれる任意の波長成分である。

20

【 0 0 3 9 】

さらに、本発明は、ラマン分光以外の用途、例えば赤外分光分析にも適用することが可能である。その場合、応答光である入力光 1 0 2 は赤外光 1 0 1 を試料 0 に照射した結果試料 0 に吸収されなかった（試料 0 を透過または試料 0 が反射した）光であり、出力光 1 0 7 はその光 1 0 2 に含まれる任意の波長成分である。

【 0 0 4 0 】

本発明は、ダイレクトイメージング、即ち平面的に拡張する領域を一度に結像させる光学系を実現できるものであるが、小さなスポット領域を走査する形でイメージングを行う用途に用いることも可能である。

30

【 0 0 4 1 】

その他、各部の具体的構成は、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で種々変形が可能である。

【 符号の説明 】

【 0 0 4 2 】

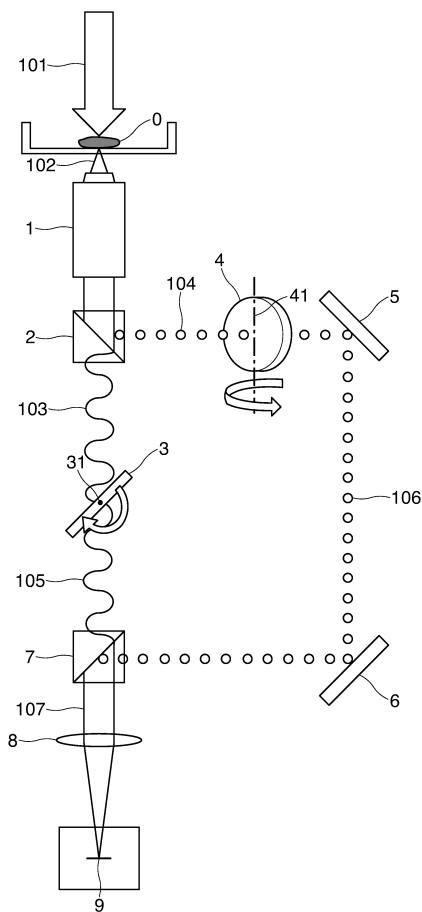
- 0 ... 試料
- 2 ... 第一の偏光ビームスプリッタ
- 3 ... 第一の多層膜フィルタ
- 4 ... 第二の多層膜フィルタ
- 7 ... 第二の偏光ビームスプリッタ
- 9 ... イメージセンサ
- 1 0 1 ... 試料に照射する光
- 1 0 2 ... 入力光（ラマン散乱光、CARS 光）
- 1 0 3 ... p 偏光成分
- 1 0 4 ... s 偏光成分
- 1 0 5 ... 透過光
- 1 0 6 ... 透過光

40

50

1 0 7 ... 出力光

【図 1】



【図 2】

入射角(度)	中心波長(nm)	バンド幅(nm)	p偏光透過率(%)
20	1154.3	0.5	93.37
25	1140.1	0.5	95.59364
30	1123.6	0.6	97.8521
35	1105.1	0.7	97.3262
40	1085	0.8	98.6102
45	1064	1	98.923
50	1042.6	1.3	98.5564
55	1021.6	1.6	98.4894
60	1001.5	2.1	96.9296
65	983.1	2.6	93.66388
70	967	3.1	87.21128

## フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2010-134346(JP,A)  
特開2009-222531(JP,A)  
特開平08-334731(JP,A)  
特開平10-170868(JP,A)  
特開平04-304413(JP,A)  
特開平04-326026(JP,A)  
特開昭62-022034(JP,A)  
米国特許出願公開第2011/0012916(US,A1)  
米国特許出願公開第2018/0188516(US,A1)  
国際公開第2013/188520(WO,A2)  
米国特許出願公開第2018/0180642(US,A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01J 3/00 - 4/04  
G01J 7/00 - 9/04  
G01N 21/64 - 21/65  
G01N 21/78  
G02B 5/28  
G02B 26/00 - 26/08  
G02B 27/00 - 27/64