

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年8月2日(02.08.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/138794 A1

(51) 国際特許分類:
G02B 21/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/002482

(22) 国際出願日: 2017年1月25日(25.01.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: オリンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1928507 東京都八王子市石川町2951番地 Tokyo (JP).

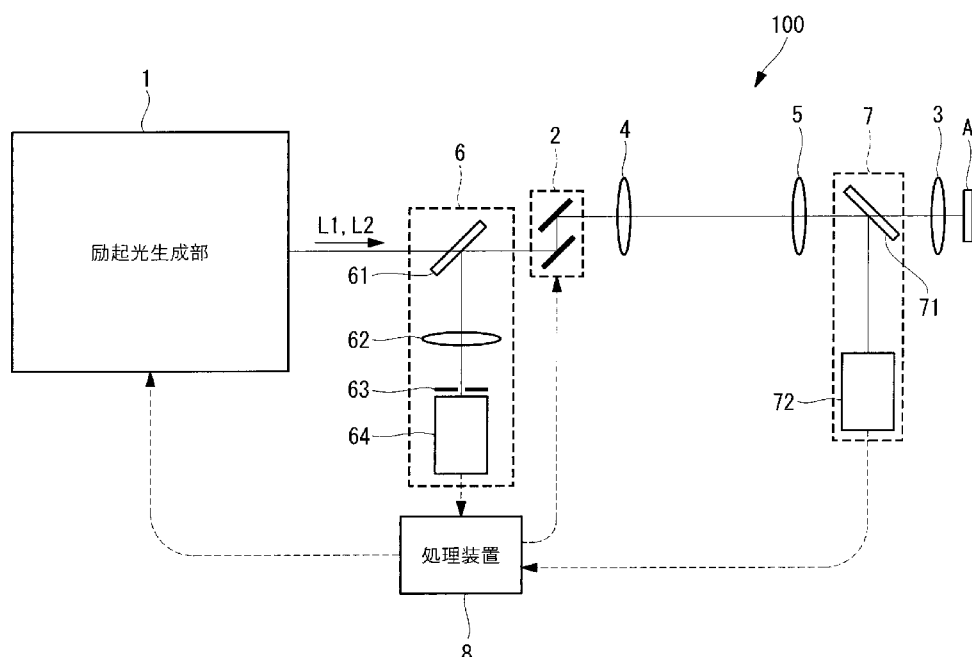
(72) 発明者: 土井 厚志 (DOI, Atsushi); 〒1928507 東京都八王子市石川町2951番地 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 上田 邦生, 外 (UEDA, Kunio et al.); 〒2208137 神奈川県横浜市西区みなとみらい2-2-1 横浜ランドマークタワー37F Kanagawa (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,

(54) Title: OPTICAL-SCANNING-TYPE MICROSCOPE DEVICE AND METHOD FOR MEASURING DISTANCE BETWEEN SPOTS IN OPTICAL-SCANNING-TYPE MICROSCOPE DEVICE

(54) 発明の名称: 光走査型顕微鏡装置および光走査型顕微鏡装置におけるスポット間距離測定方法



- 1 Excitation light generating unit
8 Processing device

(57) Abstract: This optical-scanning-type microscope device (100) is provided with a light source unit (1) for outputting two illumination lights (L1, L2) having a relative angle to each other, a scanning unit (2) for scanning the two illumination lights (L1, L2), an objective optical system (3) for radiating the scanned two illumination lights (L1, L2) to a sample (A) and condensing the illumination lights (L1, L2) at mutually different condensing positions, a detection optical system (6)

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

for detecting a signal light generated in the condensing position, and an angle detection unit (7) for detecting the relative angle between the two illumination lights (L1, L2) in an approximate pupil position of the objective optical system (3).

(57) 要約: 本発明の光走査型顕微鏡装置 (100) は、互いに相対角度を有する2つの照明光 (L1, L2) を出力する光源部 (1) と、2つの照明光 (L1, L2) を走査する走査部 (2) と、走査される2つの照明光 (L1, L2) を試料 (A) に照射し互いに異なる集光位置に集光させる対物光学系 (3) と、集光位置において発生した信号光を検出する検出光学系 (6) と、対物光学系 (3) の略瞳位置における2つの照明光 (L1, L2) 間の相対角度を検出する角度検出部 (7) とを備える。

明 細 書

発明の名称：

光走査型顕微鏡装置および光走査型顕微鏡装置におけるスポット間距離測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、互いに異なる位置に集光する2つの照明光を走査する光走査型顕微鏡装置および該光走査型顕微鏡装置におけるスポット間距離測定方法に関するものである。

背景技術

[0002] 従来、2つの照明光を試料の互いに異なる位置に集光させて2つのスポットを形成し、2つのスポットを走査する光走査型顕微鏡が提案されている（例えば、特許文献1参照。）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2015／163261号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 特許文献1の光走査型顕微鏡において、2つのスポット間の距離の正確な制御が重要であるが、2つのスポット間の距離を把握することが難しい。特に、試料が存在しない状態では、2つのスポット間の距離の把握がさらに困難である。

[0005] 本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、互いに異なる位置に集光する2つの照明光を走査する光走査型顕微鏡装置であって、試料が存在しない状態においても2つの照明光のスポット間の距離を測定することができる光走査型顕微鏡装置および光走査型顕微鏡装置におけるスポット間距離測定方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 上記目的を達成するため、本発明は以下の手段を提供する。

本発明の一態様は、互いに相対角度を有する2つの照明光を出力する光源部と、該光源部から出力された前記2つの照明光を走査する走査部と、該走査部によって走査される前記2つの照明光を試料に照射し互いに異なる集光位置に集光させる対物光学系と、前記集光位置において発生した信号光を検出する検出光学系と、前記対物光学系の略瞳位置における前記2つの照明光間の相対角度を検出する角度検出部とを備える光走査型顕微鏡装置である。

[0007] 本態様によれば、光源部から発せられた2つの照明光が、走査部によって走査されながら対物光学系から試料に照射されると、照明光の各照射位置において信号光が発生し、該信号光が検出光学系によって検出される。したがって、検出された信号光の強度と照明光の照射位置とを対応づけることによって試料の画像を生成することができる。

[0008] この場合に、相対角度を有する2つの照明光は、互いに異なる角度で対物光学系の瞳に入射し、相対角度に応じた距離だけ離れた2つの集光位置に集光してスポットを形成する。したがって、対物光学系の略瞳位置で角度検出部によって検出される2つの照明光間の相対角度に基づいて、試料が存在しない状態においてもスポット間の距離を測定することができる。

[0009] 上記態様においては、前記対物光学系の略瞳位置における前記2つの照明光間の相対角度を調整する角度調整部を備えていてもよい。前記角度調整部が、前記角度検出部によって検出された相対角度に基づき、前記2つの照明光間の相対角度を所定の角度に自動調整してもよい。

このようにすることで、角度検出部によって検出された2つの照明光間の相対角度に基づき、当該相対角度を手動または自動で調整することができる。

[0010] 上記態様においては、前記角度検出部が、前記対物光学系の略瞳位置と光学的に共役な位置に配置され、前記2つの照明光の干渉縞を撮影して干渉縞画像を取得するカメラを備えていてもよい。

対物光学系の瞳位置と共役なカメラの位置には、2つの照明光間の相対角度に応じたパターンの干渉縞が形成される。したがって、干渉縞画像内の干渉縞のパターンに基づいて2つの照明光間の相対角度を検出することができる。また、2つの照明光がパルス光である場合、2つの照明光のパルスタイミングが同時であるときには干渉縞が形成され、2つの照明光のパルスタイミングが非同時であるときには干渉縞が形成されない。したがって、干渉縞の有無に基づいて、2つの照明光のパルスタイミングの同時および非同時を検出することができる。

[0011] 上記態様においては、前記角度検出部が、前記干渉縞画像に基づいて前記相対角度を算出してもよい。

このようにすることで、2つの照明光間の相対角度を干渉縞画像から定量的に検出することができる。

[0012] 上記態様においては、前記角度検出部が、前記カメラに入射する前記2つの照明光の偏光状態を変化させる偏光変更素子を備えていてもよい。

偏光方向が互いに直交する2つの照明光は干渉縞を形成しない。光源部からの2つの照明光の偏光方向が互いに直交する場合にも、偏光変更素子によって2つの照明光の偏光方向を互いに直交しないように調整することで、干渉縞を形成させてスポット間の距離の測定を行うことができる。

[0013] 上記態様においては、前記角度検出部が、前記カメラに入射する前記2つの照明光間の相対角度を変化させる角度変更素子を備えていてもよい。

このようにすることで、相対角度の検出に適した干渉縞が形成されるように該干渉縞を調整することができる。

[0014] 上記態様においては、前記干渉縞画像のコントラストに基づいて前記2つの照明光の光路長差を算出する光路長差算出部を備えていてもよい。

2つの照明光がパルス光である場合、干渉縞の明暗のコントラストは、2つの照明光の相対的なパルスタイミング、すなわち2つの照明光の光路長差に応じて変化する。したがって、干渉縞画像のコントラストに基づき、2つの照明光の光路長差を算出することができる。

[0015] 上記態様においては、前記光路長差算出部によって算出された光路長差に基づいて、前記2つの照明光間の光路長差を調整する光路長差調整部を備えていてもよい。

このようにすることで、光路長差算出部によって算出された光路長差に基づき、試料における2つの照明光の相対的なパルスタイミングを調整することができる。

[0016] 本発明の他の態様は、互いに相対角度を有する2つの照明光を対物光学系から試料に照射し互いに異なる集光位置に集光する前記2つの照明光を走査する光走査型顕微鏡装置において、前記集光位置に形成される前記2つの照明光のスポット間の距離を測定するスポット間距離測定方法であって、前記対物光学系の略瞳位置における前記2つの照明光間の相対角度を検出する工程を含む光走査型顕微鏡装置におけるスポット間距離測定方法である。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、互いに異なる位置に集光する2つの照明光を走査する光走査型顕微鏡装置において、試料が存在しない状態においても2つの照明光のスポット間の距離を測定することができるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]本発明の第1の実施形態に係る光走査型顕微鏡装置の全体構成図である。

[図2]対物レンズおよびカメラに入射する2つのレーザ光を説明する図である。

[図3]図1の光走査型顕微鏡装置における励起光生成部の構成図である。

[図4]図1の光走査型顕微鏡装置における励起光生成部の変形例の構成図である。

[図5]図1の光走査型顕微鏡装置によるスポット間距離測定方法を示すフローチャートである。

[図6A]図1の光走査型顕微鏡装置における干渉縞計測部の変形例の構成図である。

[図6B]図1の光走査型顕微鏡装置における干渉縞計測部の他の変形例の構成図である。

[図6C]図1の光走査型顕微鏡装置における干渉縞計測部の他の変形例の構成図である。

[図7]2つのレーザ光間の相対角度の変化に伴う干渉縞のパターンの変化を説明する図である。

[図8A]カメラによって取得された干渉縞画像の一例を示す図である。

[図8B]図8Aの干渉縞画像のFFT結果を示す図である。

[図9]本発明の第2の実施形態に係る光走査型顕微鏡装置の全体構成図である。

[図10]図9の光走査型顕微鏡装置における励起光生成部の構成図である。

[図11A]第1および第2のレーザ光のパルスタイミングが同時であるときに、カメラの位置に形成される干渉縞の一例を示す図である。

[図11B]第1および第2のレーザ光のパルスタイミングが非同時であるときに、カメラの位置に形成される第1および第2のレーザ光の像の一例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] (第1の実施形態)

本発明の第1の実施形態に係る光走査型顕微鏡装置100について図1から図8Bを参照して説明する。

本実施形態に係る光走査型顕微鏡装置100は、レーザ光(照明光)L1、L2を試料Aに照射し該レーザ光L1、L2の波長と略等しい励起波長を有する蛍光物質を励起する1光子励起蛍光観察用のレーザ走査型共焦点顕微鏡装置である。

[0020] 光走査型顕微鏡装置100は、図1に示されるように、2つのレーザ光L1、L2を出力するとともに該2つのレーザ光L1、L2間の相対角度を調整可能な励起光生成部(光源部)1と、レーザ光L1、L2を走査する走査部2と、該走査部2によって走査されたレーザ光L1、L2を試料Aに照射

するとともにレーザ光 L_1 、 L_2 の集光位置で生じた蛍光（信号光）を集める対物レンズ（対物光学系）3と、走査部2と対物レンズ3との間に配置され走査部2から対物レンズ3の瞳位置へレーザ光 L_1 、 L_2 をリレーする瞳投影レンズ4および結像レンズ5と、対物レンズ3によって集められた蛍光を検出して検出信号に変換する検出光学系6と、対物レンズ3の瞳位置と光学的に共役な位置におけるレーザ光 L_1 、 L_2 の干渉縞を計測する干渉縞計測部（角度検出部）7と、検出信号に基づいて試料Aの蛍光画像を作成するとともに干渉縞に基づいてレーザ光 L_1 、 L_2 間の相対角度を算出する処理装置（角度検出部）8とを備えている。

[0021] 励起光生成部1の構成については、後で詳述する。

走査部2は、例えば、非平行な軸線回りに揺動可能に近接配置された2枚のガルバノミラーを有する近接ガルバノスキャナであり、レーザ光 L_1 、 L_2 を該レーザ光 L_1 、 L_2 の光軸に交差する2軸方向に走査する。

瞳投影レンズ4および結像レンズ5は、走査部2が対物レンズ3の瞳位置と光学的に共役な位置に配置されるように構成され、走査部2によって走査されたレーザ光 L_1 、 L_2 を対物レンズ3の瞳位置へリレーする。

[0022] 相対角度 θ を有する第1および第2のレーザ光 L_1 、 L_2 は、図2に示されるように、互いに異なる角度で対物レンズ3に入射し、互いに異なる集光位置 P_1 、 P_2 に集光されてスポットを形成する。2つのスポット間（集光位置 P_1 、 P_2 間）の距離は、レーザ光 L_1 、 L_2 間の相対角度 θ に応じて決まる。2つのスポットで発生した蛍光は、対物レンズ3によって集められ、レーザ光 L_1 、 L_2 と同一の光路を逆方向に進む。

[0023] 検出光学系6は、励起光生成部1と走査部2との間に配置され、レーザ光 L_1 、 L_2 を透過させ、蛍光を反射することによって蛍光をレーザ光 L_1 、 L_2 の光路から分岐するダイクロイックミラー61と、該ダイクロイックミラー61によって分岐された蛍光を集光させる集光レンズ62と、第1のレーザ光 L_1 の集光位置 P_1 と光学的に共役な位置に配置されたピンホール63と、該ピンホール63を通過した蛍光を検出し蛍光の強度に相当する検出

信号を処理装置 8 に送信する光検出器 6 4 とを備えている。

[0024] 干渉縞計測部 7 は、結像レンズ 5 と対物レンズ 3 との間に配置された無偏光ビームスプリッタ 7 1 と、対物レンズ 3 の瞳位置と光学的に共役な位置に配置されたデジタルカメラ 7 2 とを備えている。

無偏光ビームスプリッタ 7 1 は、結像レンズ 5 から対物レンズ 3 に向けて射出されたレーザ光 L_1 , L_2 の一部（例えば、1 %）を、カメラ 7 2 に向けて分岐する。

[0025] 対物レンズ 3 の瞳とカメラ 7 2 は、互いに光学的に共役な位置関係にあるので、対物レンズ 3 の瞳位置における第 1 および第 2 のレーザ光 L_1 , L_2 間の相対角度と、カメラ 7 2 の位置における第 1 および第 2 のレーザ光 L_1 , L_2 間の相対角度とは、互いに等しくなる。したがって、カメラ 7 2 の位置には、瞳位置における第 1 および第 2 のレーザ光 L_1 , L_2 間の相対角度 θ に応じた干渉縞が形成される。カメラ 7 2 は、干渉縞を撮影して干渉縞画像を取得し、干渉縞画像を処理装置 8 に送信する。

[0026] カメラ 7 2 は、対物レンズ 3 の瞳位置と光学的に共役な他の位置に配置されていてもよい。例えば、任意の位置に配置されたカメラ 7 2 から走査部 2 にレーザ光 L_1 , L_2 をリレーするように構成されていてもよい。

[0027] 処理装置 8 は、光検出器 6 4 から受信した検出信号と走査部 2 によるレーザ光 L_1 の走査位置とを対応づけることによって、蛍光画像を生成する。

また、処理装置 8 は、干渉縞計測部 7 から受信した干渉縞画像を解析して、対物レンズ 3 の瞳位置における第 1 および第 2 のレーザ光 L_1 , L_2 間の相対角度 θ を算出する。干渉縞の明暗の周期とレーザ光 L_1 , L_2 間の相対角度 θ との間には一定の関係が存在するので、干渉縞画像内の干渉縞の明暗の周期に基づいて相対角度 θ を算出することができる。次に、処理装置 8 は、相対角度 θ を 2 つのスポット間の距離に換算し、得られた距離が所定の距離と一致するように相対角度 θ を調整するための制御信号を励起光生成部 1 に送信する。所定の距離は、例えば、図示しない入力手段を介してユーザによって設定された距離である。

このような画像生成、演算および制御の処理を実行する処理装置 8 は、例えば、コンピュータによって実現される。

[0028] 次に、励起光生成部 1 について説明する。

励起光生成部 1 は、図 3 に示されるように、連続波のレーザ光を発する単一のレーザ光源 11 と、レーザ光源 11 から射出されたレーザ光のビーム径を対物レンズ 3 の瞳径に合わせてサイズ調整するビーム径調整光学系 12 と、レーザ光源 11 からのレーザ光を偏光に応じて 2 つに分割する第 1 の偏光ビームスプリッタ (PBS) 13 と、レーザ光源 11 と第 1 の PBS 13 との間に配置され第 1 の PBS 13 に入射するレーザ光の偏光方向を調整する 1/2 波長板 14 と、第 1 の PBS 13 によって分割された 2 つのレーザ光 L1, L2 を同軸に合波する第 2 の偏光ビームスプリッタ (PBS) 15 と、合波されたレーザ光 L1, L2 を第 2 の PBS 15 から走査部 2 へリレーするリレーレンズ 16 とを備えている。第 2 の PBS 15 とリレーレンズ 16 との間には、レーザ光 L1, L2 を円偏光に変換する 1/4 波長板 17 が設けられていてもよい。

[0029] 第 1 の PBS 13 によって分割される 2 つのレーザ光 L1, L2 の光量比は、第 1 の PBS 13 に入射するレーザ光の偏光方向に応じて決まる。1/2 波長板 14 は、例えば、2 つのレーザ光 L1, L2 の光量が等しくなるように、第 1 の PBS 13 の 2 つの偏光軸に対してレーザ光の偏光方向を 45° に調整する。

[0030] 第 1 の PBS 13 によって分割された 2 つのレーザ光 L1, L2 の内、第 1 のレーザ光 L1 が第 2 の PBS 15 を透過し、第 2 のレーザ光 L2 が第 2 の PBS 15 によって反射されることによって、第 1 および第 2 のレーザ光 L1, L2 は互いに合波されるようになっている。符号 20 は、第 1 および第 2 のレーザ光 L1, L2 の光路を形成するミラーである。

[0031] 第 2 の PBS (角度調整部) 15 は、レーザ光 L1, L2 の光軸に直交する方向 (図 3 の紙面に垂直な方向) の揺動軸回りに揺動可能に設けられている。第 2 の PBS 15 の揺動軸回りのチルト角が変化したときに、第 2 の P

B S 1 5 からの第 1 のレーザ光 L 1 の射出角度は無視できるほど小さいが、第 2 の P B S 1 5 からの第 2 のレーザ光 L 2 の射出角度は変化する。したがって、第 2 の P B S 1 5 のチルト角によって、第 1 および第 2 のレーザ光 L 1 , L 2 間の相対角度を調整することができる。

[0032] 第 2 の P B S 1 5 には、該第 2 の P B S 1 5 を揺動軸回りに揺動させて該第 2 の P B S 1 5 のチルト角を変更するためのモータ 1 8 が設けられている。処理装置 8 からの制御信号に従ってモータ 1 8 が駆動して第 2 の P B S 1 5 のチルト角を変更することによって、第 1 および第 2 のレーザ光 L 1 , L 2 間の相対角度 θ が自動調整されるようになっている。

[0033] 第 2 の P B S 1 5 は、リレーレンズ 1 6 によって走査部 2 と光学的に共役な位置に配置されている。すなわち、第 2 の P B S 1 5 は、走査部 2 を介して対物レンズ 3 の瞳位置と光学的に共役な位置に配置されているので、第 2 の P B S 1 5 のチルト角によって、対物レンズ 3 の瞳位置における第 1 および第 2 のレーザ光 L 1 , L 2 間の相対角度を調整してスポット間の距離を制御することができる。

[0034] なお、図 3 に示される励起光生成部 1 の光路構成は一例であり、互いに相対角度を有する 2 つのレーザ光 L 1 , L 2 を出力することが可能な限りにおいて、任意の光路構成を採用することができる。例えば、図 3 には、レーザ光の分割光路の一例としてマッハツェンダー型が示されているが、マイケルソン型等の他の方式の光路を採用してもよい。また、レーザ光の分割および合波には、P B S 1 3 , 1 5 に代えて、無偏光ビームスプリッタを用いてもよい。また、単一のレーザ光を分割して 2 つのレーザ光 L 1 , L 2 を生成する構成に代えて、図 4 に示されるように、第 1 のレーザ光 L 1 および第 2 のレーザ光 L 2 をそれぞれ発する 2 つのレーザ光源 1 1 A , 1 1 B を備える構成を採用してもよい。

[0035] 次に、このように構成された光走査型顕微鏡装置 1 0 0 の作用について説明する。

本実施形態に係る光走査型顕微鏡装置 1 0 0 を用いて試料 A の蛍光観察を

行うには、図5に示されるように、ユーザが2つのスポット間の距離を設定する（ステップS1）。処理装置8は、第1および第2のレーザ光L1、L2間の相対角度を、ユーザによって設定された距離に相当する角度に設定し、設定された相対角度が2つのレーザ光L1、L2に付与されるように第2のPBS15のチルト角を設定する（ステップS2）。

[0036] 次に、レーザ光源11からレーザ光の出力を開始する（ステップS3）。励起光生成部1において、レーザ光源11から出力されたレーザ光は、1／2波長板14によって偏光方向が調整され、第1のPBS13によって2つに分割された後に第2のPBS15によって合波される。合波に際して、2つのレーザ光L1、L2には、ステップS2で設定された相対角度が付与される。

[0037] 第2のPBS15において相対角度が付与された2つのレーザ光L1、L2は、リレーレンズ16によって走査部2へリレーされ、該走査部2によって走査され、走査部2から対物レンズ3の瞳位置へ瞳投影レンズ4および結像レンズ5によってリレーされる。2つのレーザ光L1、L2は、相対角度を有する状態で対物レンズ3に入射し、ステップS1で設定された距離だけ離れた2つの集光位置P1、P2にそれぞれ結ばれてスポットを形成する。

[0038] 試料Aの2つの集光位置P1、P2で発生した蛍光は、対物レンズ3によって集められ、無偏光ビームスプリッタ71、結像レンズ5、瞳投影レンズ4および走査部2を経由してダイクロイックミラー61まで戻り、該ダイクロイックミラー61によってレーザ光L1、L2の光路から分離される。

[0039] そして、例えば特許文献1に適用する場合、ピンホール63と光学的に共役な第1のレーザ光L1の集光位置P1で発生した蛍光は、集光レンズ62によって集光されてピンホール63を通過し、光検出器64によって検出され、検出信号が処理装置8に送信される。処理装置8において、検出信号に基づいて試料Aの蛍光画像が生成される。一方、ピンホール63と光学的に非共役な第2のレーザ光L2の集光位置P2で発生した蛍光は、ピンホール63を通過することができず該ピンホール63において遮断される。

[0040] ここで、対物レンズ3に入射する前のレーザ光L1、L2の一部を用いて、該レーザ光L1、L2間の相対角度 θ が干渉縞計測部7および処理装置8によって検出される。すなわち、レーザ光L1、L2の一部が対物レンズ3よりも前で無偏光ビームスプリッタ71によってカメラ72に向けて分岐される。対物レンズ3の瞳位置と光学的に共役なカメラ72の位置では、レーザ光L1とレーザ光L2とが互いに干渉することによって、相対角度 θ に応じたパターンの干渉縞が形成され、干渉縞画像がカメラ72によって取得される（ステップS4）。そして、処理装置8において、取得された干渉縞画像から相対角度 θ が算出され（ステップS5）、相対角度 θ がステップS2で設定された角度からずれているときには、設定された角度と一致するようにモータ18によって第2のPBS15のチルト角が自動調整される（ステップS6）。これにより、スポット間の距離が、ステップS1で設定された距離に維持されるように自動制御される。

[0041] このように、本実施形態によれば、対物レンズ3の瞳位置と光学的に共役な位置においてレーザ光L1、L2の干渉縞を計測することによって、レーザ光L1、L2間の相対角度 θ を実測し、実測された相対角度 θ から2つのスポット間の距離を把握することができるという利点がある。また、実測された相対角度 θ が設定された角度と一致するように第2のPBS15のチルト角をフィードバック制御することで、スポット間の距離をユーザが設定した距離に正確に制御することができるという利点がある。また、試料Aに照射される前のレーザ光L1、L2の干渉縞を利用するので、試料Aの有無に関わらず2つのスポット間の距離を容易に把握することができるという利点がある。

[0042] また、対物レンズ3の瞳位置において、干渉縞は、2つのレーザ光L1、L2が相対的にチルトまたはシフトしたときに現れる。ただし、PBS15は対物レンズ3の瞳位置に光学的に共役であるため、PBS15のチルト角が変化した場合も対物レンズ3の瞳位置におけるレーザ光L1、L2の相対的なシフトは生じず、レーザ光L1、L2間の相対角度が干渉縞に支配的に

影響する。したがって、干渉縞の計測から得られるレーザ光 L 1, L 2 間の相対角度に基づいて、スポット間の距離を精度良く測定することができるという利点がある。

[0043] ここで、レーザ光 L 1, L 2 の干渉縞を利用したスポット間の距離の測定精度について説明する。

開口数 1.05、倍率 30 倍、瞳径 12.6 mm の対物レンズ 3 と、波長 $\lambda = 488 \text{ nm}$ のレーザ光 L 1, L 2 とを使用すると仮定する。カメラ 7 2 によって取得される干渉縞画像の解析において、 $\lambda / 10$ 周期の干渉縞の明暗のコントラストは検知可能である。 $\lambda / 10$ 周期の干渉縞に相当する相対角度 θ は、直径 12.6 mm の瞳に入射する第 1 および第 2 のレーザ光 L 1, L 2 間の光路長差と相対角度 θ との幾何学的関係から以下のように算出される。

$$\begin{aligned}\theta &= \arctan \left((488 [\text{nm}] / 10) / 12.6 [\text{mm}] \right) \\ &= 2.2 \times 10^{-4} [\text{deg}]\end{aligned}$$

相対角度 $\theta = 2.2 \times 10^{-4}$ を 2 つのスポット間の距離に換算すると、約 23 nm となる。すなわち、干渉縞画像を用いてレーザ光 L 1, L 2 の波長 λ よりも十分に小さいスポット間の距離の変化を検知することができ、スポット間の距離を高い精度で測定することができることが分かる。

[0044] なお、ピンホール 6 3 と光学的に非共役な集光位置 P 2 に集光する第 2 のレーザ光 L 2 は、例えば、集光位置 P 1 において発生した蛍光に基づく蛍光画像のノイズ除去に利用される。

具体的には、第 1 のレーザ光 L 1 は、集光位置 P 1 のみならず、試料 A 内の集光位置 P 1 までの経路でも蛍光を発生させる。そのため、ピンホール 6 3 を通過して光検出器 6 4 によって検出される蛍光には、集光位置 P 1 以外の位置で発生した蛍光の一部がノイズ光として含まれる。

[0045] 一方、第 2 のレーザ光 L 2 も、集光位置 P 2 のみならず、試料 A 内の集光位置 P 2 までの経路でも蛍光を発生させる。ピンホール 6 3 とは光学的に非共役な集光位置 P 2 で発生した蛍光は、ピンホール 6 3 を通過できずに遮断

されるが、集光位置P 2以外の位置で発生した蛍光の一部は、ピンホール6 3を通過して光検出器6 4によって検出される。このときに検出される蛍光の発生範囲の大部分は、第1のレーザ光L 1によるノイズ光の発生範囲と一致する。

[0046] したがって、第2のレーザ光L 2のみを試料Aに照射しながら光検出器6 4によって検出された蛍光に基づいて、ノイズ光の情報のみを含むノイズ画像を得ることができる。そして、ノイズ画像を用いて蛍光画像に含まれるノイズを除去することができる。第2のレーザ光L 2のみを試料Aに照射するためには、例えば、第1のレーザ光L 1と第2のレーザ光L 2との光量比が0 : 100となるように1 / 2波長板1 4の回転角度を調整すればよい。

[0047] 本実施形態において、干渉縞計測部7は、図6 Aから図6 Cに示されるように、無偏光ビームスプリッタ7 1とカメラ7 2との間に、変倍光学系7 4、偏光変更素子7 5および角度変更素子7 6を備えていてもよい。変倍光学系7 4、偏光変更素子7 5および角度変更素子7 6は、適宜組み合わせて使用してもよい。

図6 Aの干渉縞計測部7は、カメラ7 2の位置に形成される干渉縞を光学的に拡大または縮小するための変倍光学系7 4を備えている。

[0048] 図6 Bの干渉縞計測部7は、第1および第2のレーザ光L 1, L 2の偏光状態を変更する偏光変更素子7 5を備えている。第1のレーザ光L 1の偏光方向と第2のレーザ光L 2の偏光方向とが互いに直交しているとき、第1のレーザ光L 1と第2のレーザ光L 2の干渉縞は生じない。このような場合には、偏光変更素子7 5によって、第1のレーザ光L 1の偏光方向と第2のレーザ光L 2の偏光方向とが非直交となるように調整することで、干渉縞を観測することができる。

[0049] 図6 Cの干渉縞計測部7は、無偏光ビームスプリッタ7 1と偏光変更素子7 5との間に、第1および第2のレーザ光L 1, L 2間の相対角度を変更する角度変更素子7 6、例えばロシヨン偏光プリズムを備えている。ロシヨン偏光プリズムは、該ロシヨン偏光プリズムに入射した、偏光方向が互いに直

交する2つのレーザ光のうち、一方を直進させ、他方を斜めに射出する。したがって、ロション偏光プリズムを透過した第1および第2のレーザ光L1, L2間の相対角度 θ には、オフセット角度が加えられる。角度変更素子76は、使用するか否かを選択したり、オフセット角度を変更したりすることができるように構成されていてもよい。

[0050] 干渉縞の明暗の周期およびコントラストは、レーザ光L1, L2間の光路長差に応じて変化する。したがって、相対角度 θ の検出に適した干渉縞が形成されるように、ロション偏光プリズムによって2つのレーザ光L1, L2間の相対角度にオフセットを与えて光路長差を調整することで、相対角度 θ の検出精度を向上することができる。また、レーザ光L1, L2が重なっている（第2のPBS15によって付与される相対角度がゼロである）ときにも、干渉縞を生じさせてスポット位置の検出を行うことができる。本変形例において、オフセット角度を加味して相対角度 θ が算出される。

[0051] 図7は、図6Cの角度変更素子76を備える変形例において、レーザ光L1, L2間の相対角度 θ の変化に伴う干渉縞の変化の一例を示している。

第2のPBS15によってレーザ光L1, L2に付与される相対角度 θ がゼロであるときであっても、カメラ72に入射するレーザ光L1, L2には角度変更素子76によってオフセット角度が与えられているので、干渉縞（図7の「チルト無し」参照。）が生じる。

[0052] 第2のPBS15によって相対角度 θ を変化させたときに、干渉縞（図7の「X方向チルト（+）」および「X方向チルト（-）」参照。）の明暗の周期が小さくまたは大きくなり、干渉縞画像内の縞の数が増減する。レーザ光L1, L2の光路上の光学素子のアライメントのずれ等が要因でレーザ光L1, L2が、第2のPBS15による第2のレーザ光L2のチルト方向とは垂直な方向（Y方向）に傾斜しているときには、時計方向または反時計方向に回転した干渉縞（図7の「Y方向チルト（+）」および「Y方向チルト（-）」参照。）が得られる。したがって、干渉縞の明暗の周期および回転角に基づいて、第1および第2のレーザ光L1, L2間の相対角度 θ および

Y方向のチルト角を特定することができる。

[0053] 本実施形態においては、処理装置8による干渉縞画像の解析に、高速フーリエ変換（FFT）を用いてもよい。図8Bは、図8Aに示される干渉縞のFFT結果を示している。図8Bに示されるように、フーリエ空間には、DC成分に加えて、干渉縞の空間周波数に対応する位置にスポットQ1、Q2が現れる。スポットQ1、Q2間の距離dが相対角度 θ に相当し、スポットQ1、Q2を結ぶ線分の傾斜角 δ が第2のレーザ光L2のチルト方向に相当する。したがって、干渉縞画像のFFT解析によって、相対角度 θ およびチルト方向を容易に検出することができる。

[0054] 本実施形態においては、干渉縞画像から算出される相対角度 θ に基づいて第2のPBS15のチルト角を処理装置8が自動調整することとしたが、これに代えて、またはこれに加えて、ユーザが第2のPBS15のチルト角を調整することができるように構成されていてもよい。ユーザは、例えば、ディスプレイに表示された干渉縞画像を観察しながら、第2のPBS15のチルト角を調整してもよい。

[0055] （第2の実施形態）

次に、本発明の第2の実施形態に係る光走査型顕微鏡装置200について図9から図11Bを参照して説明する。なお、本実施形態においては、第1の実施形態と異なる構成について説明し、第1の実施形態と共通する構成については、同一の符号を付して説明を省略する。

[0056] 本実施形態に係る光走査型顕微鏡装置200は、レーザ光L1、L2の波長の略1/2倍の励起波長を有する蛍光物質を励起する2光子励起蛍光観察用のレーザ走査型顕微鏡装置である。2光子励起においては励起光としてパルスレーザ光L1、L2が用いられるので、2つのパルスレーザ光L1、L2間のタイミングの制御が必要となり、そのためにレーザ光L1、L2間の光路長差の調整が必要となる。光走査型顕微鏡装置200は、レーザ光L1、L2間の光路長差を調整する機構をさらに備える点で、第1の実施形態と主に異なっている。

[0057] 光走査型顕微鏡装置200は、図9に示されるように、励起光生成部10と、走査部2と、対物レンズ3と、瞳投影レンズ4と、結像レンズ5と、検出光学系60と、干渉縞計測部7と、処理装置8とを備えている。

検出光学系60は、ダイクロイックミラー61と、集光レンズ62と、光検出器64とを備え、ピンホールを備えていない。

[0058] 励起光生成部10は、図10に示されるように、パルス状のレーザ光を発生するレーザ光源111と、ビーム径調整光学系12と、第1のPBS13と、1/2波長板14と、第2のPBS15と、リレーレンズ16と、第1のPBS13と第2のPBS15との間の第2のレーザ光L2の光路に設けられた光路長調整光学系（光路長差調整部）19とを備えている。第2のPBS15とリレーレンズ16との間に、1/4波長板17が設けられていてもよい。

[0059] 光路長調整光学系19は、一对のミラー19a, 19bを図示しないモータによって矢印Bの方向に移動させることで第2のレーザ光L2の光路長を変化させる。これにより、第2のPBS15による合波後の第1および第2のレーザ光L1, L2のパルスのタイミングが同時または非同時となるように、第1および第2のレーザ光L1, L2間の光路長差が調整されるようになっている。

[0060] レーザ光L1, L2間の光路長差がゼロであり、対物レンズ3の瞳位置における2つのレーザ光L1, L2のパルスタイミングが同時であるときには、図11Aに示されるように、カメラ72の位置に干渉縞が形成されるので、干渉縞画像内の明暗のコントラストが高くなる。一方、レーザ光L1, L2間に光路長差が存在し、対物レンズ3の瞳位置における2つのレーザ光L1, L2のパルスタイミングが非同時であるときには、図11Bに示されるように、カメラ72の位置に干渉縞が形成されないので、干渉縞画像内の明暗のコントラストが低くなる。

[0061] 処理装置8は、干渉縞画像内の明暗のコントラストの強度に基づき、瞳位置におけるレーザ光L1, L2のパルスタイミングが同時または非同時にな

るように、光路長調整光学系 19 のモータを駆動してレーザ光 L1, L2 間の光路長差を調整する。

[0062] また、光路長調整光学系 19 によって第 2 のレーザ光 L2 の光路長を漸次変化させたときに、干渉縞の明暗のコントラストの強度は、レーザ光 L1, L2 のパルス幅に相当する周期で漸次変化し、第 1 のレーザ光 L1 と第 2 のレーザ光 L2 とが時間的に完全に一致したときにコントラストが最大となり、第 1 のレーザ光 L1 と第 2 のレーザ光 L2 とが時間的に完全に分離したときにコントラストが最小となる。すなわち、干渉縞画像の明暗のコントラストの強度は、レーザ光 L1, L2 間の光路長差と相関する。このような干渉縞画像のコントラストと光路長差との相関関係に基づいて、処理装置（光路長差算出部）8 は、干渉縞画像からレーザ光 L1, L2 間の光路長差を算出してもよい。

[0063] また、光路長調整光学系 19 によって光路長を漸次変化させながら取得された干渉縞画像のコントラストの強度のプロファイルには、レーザ光 L1, L2 のパルス幅およびレーザ光 L1, L2 間のパルスの時間差の情報が含まれる。処理装置 8 は、プロファイルを用いてレーザ光 L1, L2 のパルス幅を測定してもよく、レーザ光 L1, L2 同士のパルスの重なり幅を測定してもよい。

[0064] 本実施形態によれば、対物レンズ 3 の瞳位置と光学的に共役な位置においてレーザ光 L1, L2 の干渉縞を計測することによって、レーザ光 L1, L2 のパルスタイミングの同時および非同時を把握することができるという利点がある。また、試料 A に照射される前のレーザ光 L1, L2 の干渉縞を利用するので、試料 A の有無に関わらず、2 つのレーザ光 L1, L2 のパルスタイミングの同時および非同時を把握することができるという利点がある。

本実施形態の作用およびその他の効果は、第 1 の実施形態と同様であるので、説明を省略する。

[0065] 本実施形態においては、処理装置 8 が干渉縞画像に基づいて光路長調整光学系 19 に光路長差の自動調整を行わせることとしたが、これに代えて、ま

たはこれに加えて、ユーザが光路長調整光学系 19 を移動させて光路長差を調整することができるように構成されていてもよい。ユーザは、例えば、ディスプレイに表示された干渉縞画像を観察しながら、光路長調整光学系 19 を操作してもよい。

[0066] 第 1 および第 2 の実施形態においては、蛍光観察用の光走査型顕微鏡装置 100, 200 について説明したが、照明光として励起光以外の光を用い、信号光として蛍光以外の光を検出してもよい。

符号の説明

[0067] 1, 10 励起光生成部（光源部）
2 走査部
3 対物レンズ（対物光学系）
6, 60 検出光学系
7 干渉縞計測部（角度検出部）
8 処理装置（角度検出部、光路長差算出部）
15 第 2 の偏光ビームスプリッタ（角度調整部）
19 光路長調整光学系（光路長差調整部）
72 カメラ
75 偏光変更素子
76 角度変更素子
100, 200 光走査型顕微鏡装置

請求の範囲

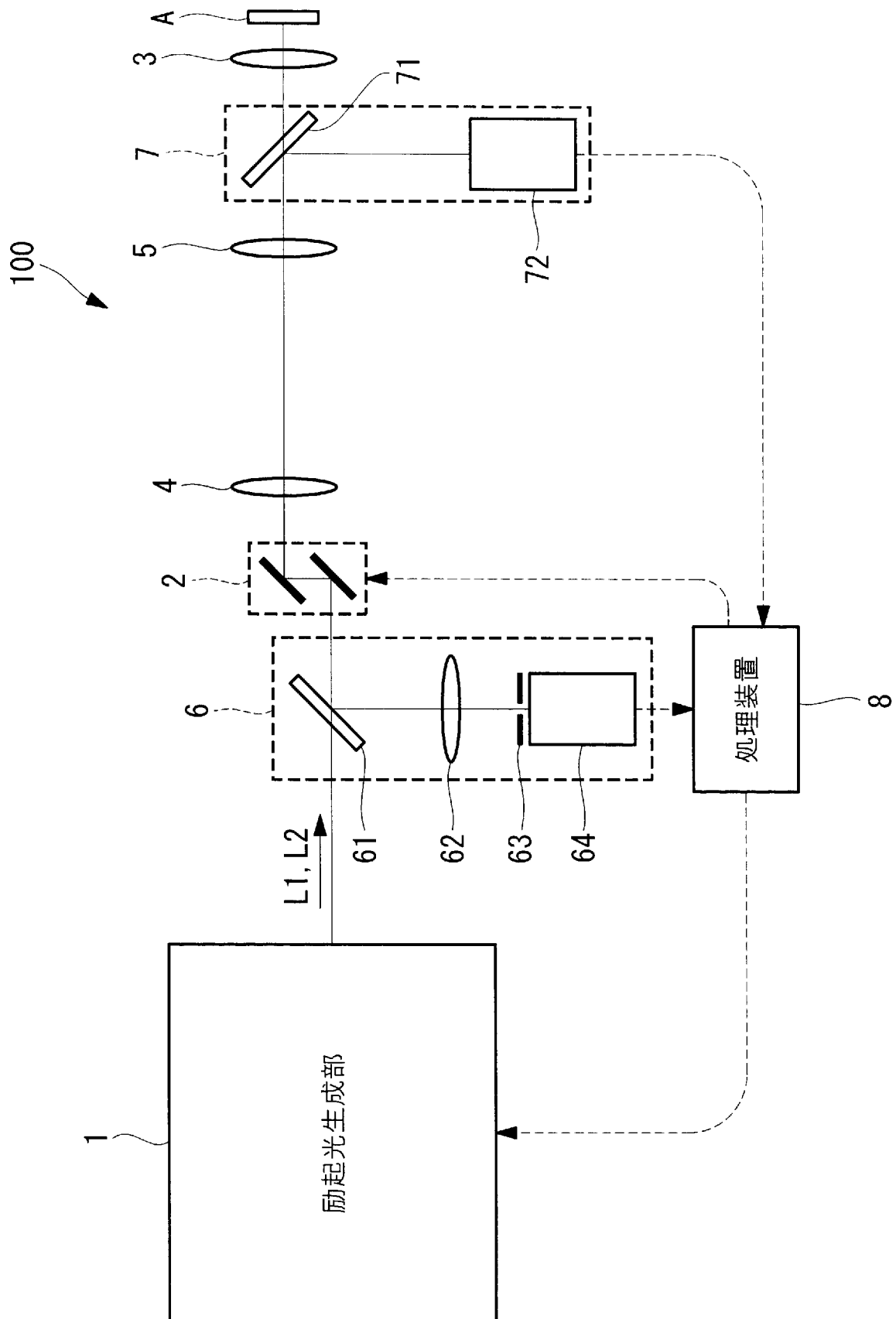
- [請求項1] 互いに相対角度を有する2つの照明光を出力する光源部と、
該光源部から出力された前記2つの照明光を走査する走査部と、
該走査部によって走査される前記2つの照明光を試料に照射し互いに異なる集光位置に集光させる対物光学系と、
前記集光位置において発生した信号光を検出する検出光学系と、
前記対物光学系の略瞳位置における前記2つの照明光間の相対角度を検出する角度検出部とを備える光走査型顕微鏡装置。
- [請求項2] 前記対物光学系の略瞳位置における前記2つの照明光間の相対角度を調整する角度調整部を備える請求項1に記載の光走査型顕微鏡装置。
- [請求項3] 前記角度調整部が、前記角度検出部によって検出された相対角度に基づき、前記2つの照明光間の相対角度を所定の角度に自動調整する請求項2に記載の光走査型顕微鏡装置。
- [請求項4] 前記角度検出部が、前記対物光学系の略瞳位置と光学的に共役な位置に配置され、前記2つの照明光の干渉縞を撮影して干渉縞画像を取得するカメラを備える請求項1から請求項3のいずれかに記載の光走査型顕微鏡装置。
- [請求項5] 前記角度検出部が、前記干渉縞画像に基づいて前記相対角度を算出する請求項4に記載の光走査型顕微鏡装置。
- [請求項6] 前記角度検出部が、前記カメラに入射する前記2つの照明光の偏光状態を変化させる偏光変更素子を備える請求項4または請求項5に記載の光走査型顕微鏡装置。
- [請求項7] 前記角度検出部が、前記カメラに入射する前記2つの照明光間の相対角度を変化させる角度変更素子を備える請求項4から請求項6のいずれかに記載の光走査型顕微鏡装置。
- [請求項8] 前記干渉縞画像のコントラストに基づいて前記2つの照明光の光路長差を算出する光路長差算出部を備える請求項4から請求項7のい

れかに記載の光走査型顕微鏡装置。

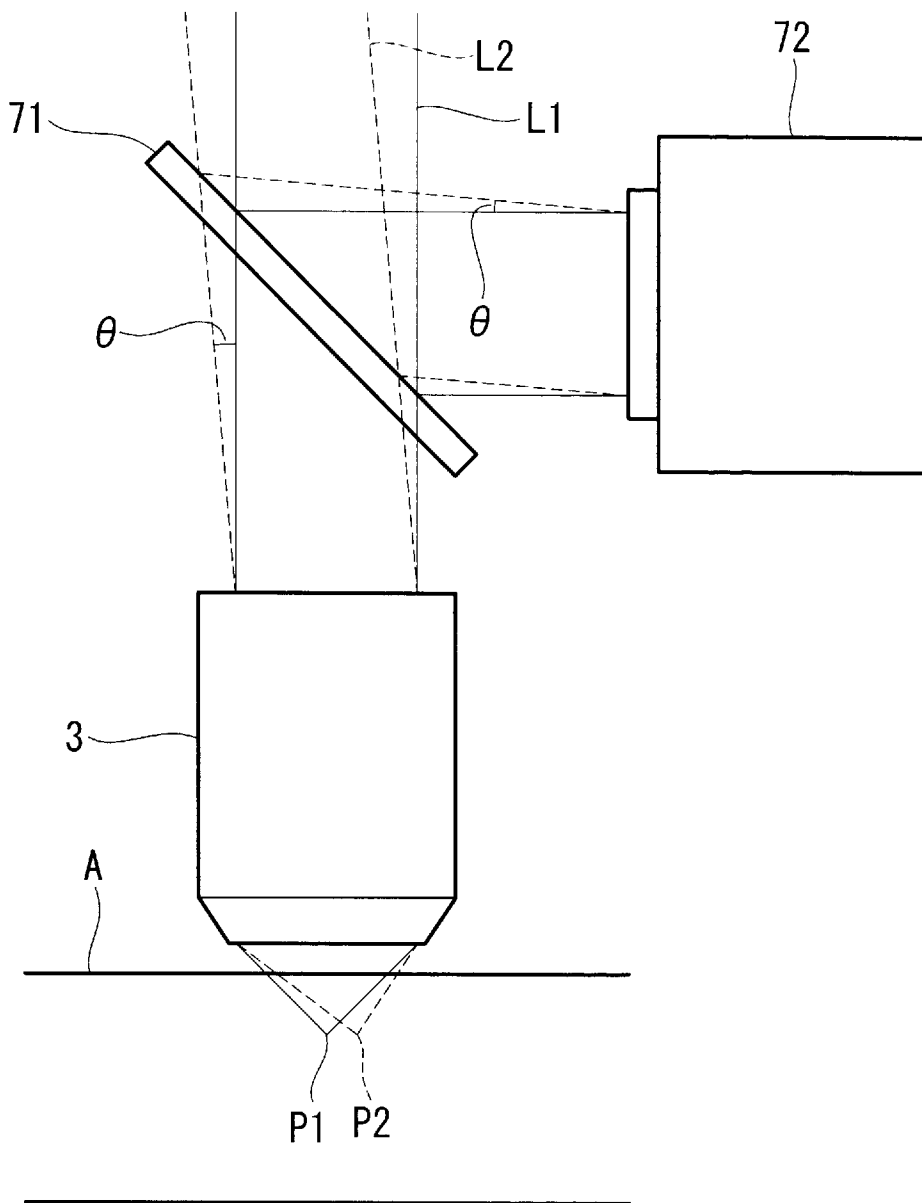
[請求項9] 前記光路長差算出部によって算出された光路長差に基づいて、前記2つの照明光間の光路長差を調整する光路長差調整部を備える請求項8に記載の光走査型顕微鏡装置。

[請求項10] 互いに相対角度を有する2つの照明光を対物光学系から試料に照射し互いに異なる集光位置に集光する前記2つの照明光を走査する光走査型顕微鏡装置において、前記集光位置に形成される前記2つの照明光のスポット間の距離を測定するスポット間距離測定方法であって、
前記対物光学系の略瞳位置における前記2つの照明光間の相対角度を検出する工程を含む光走査型顕微鏡装置におけるスポット間距離測定方法。

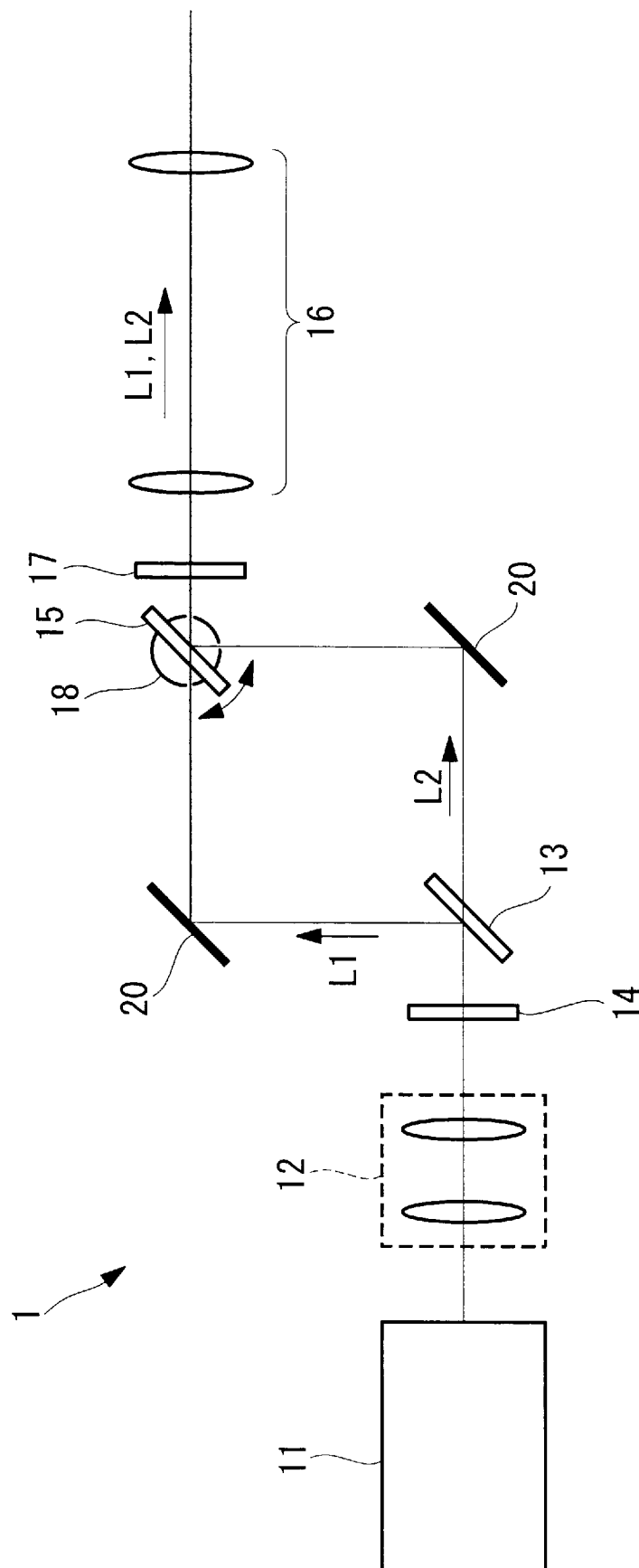
[図1]



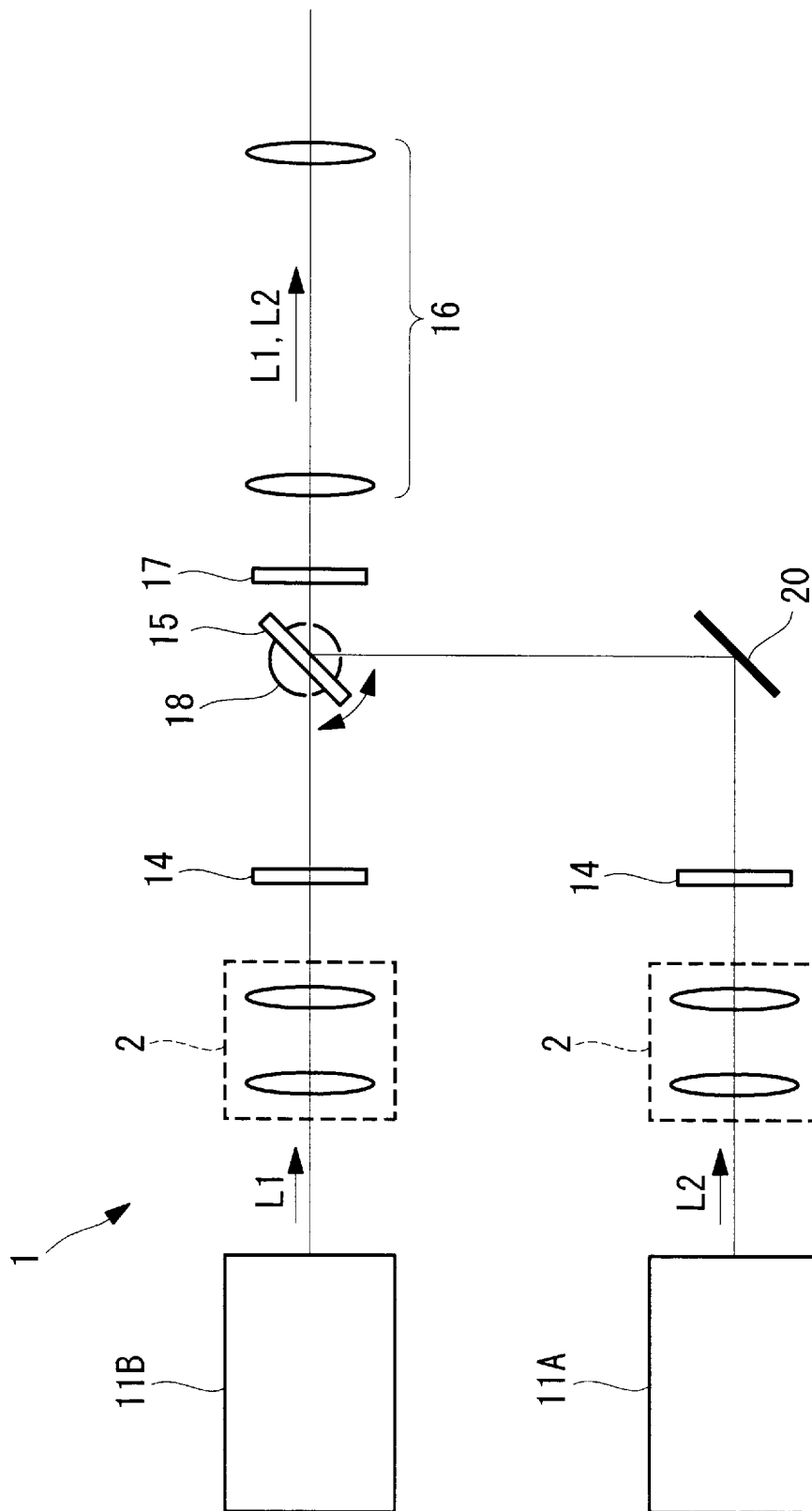
[図2]



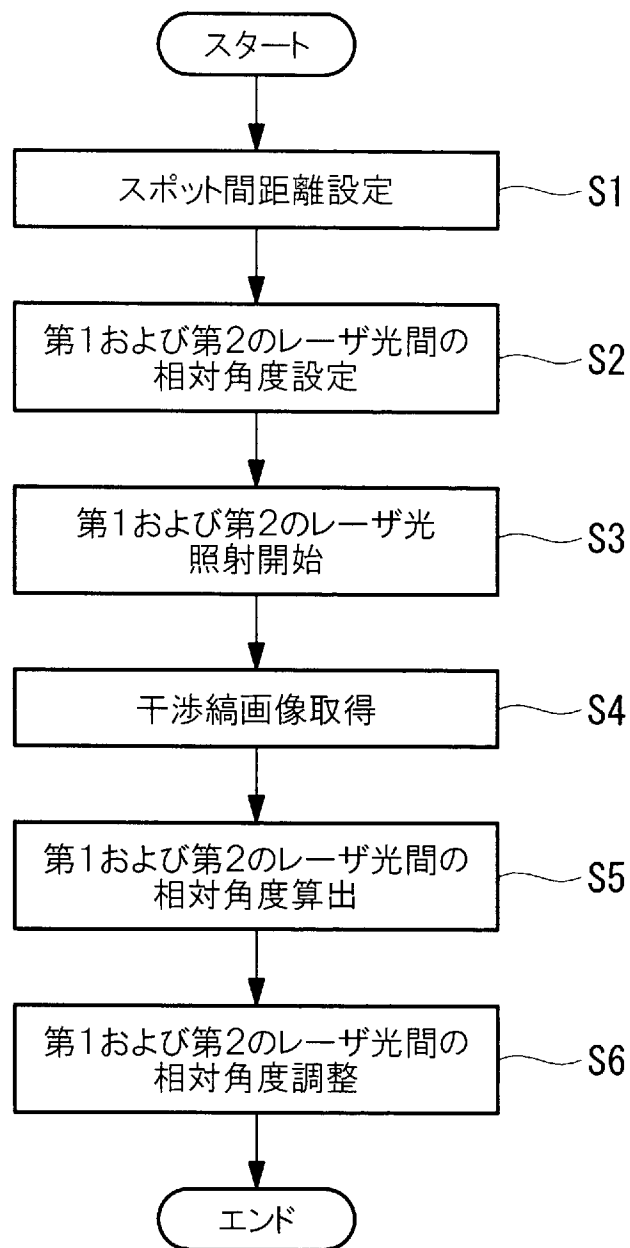
[図3]



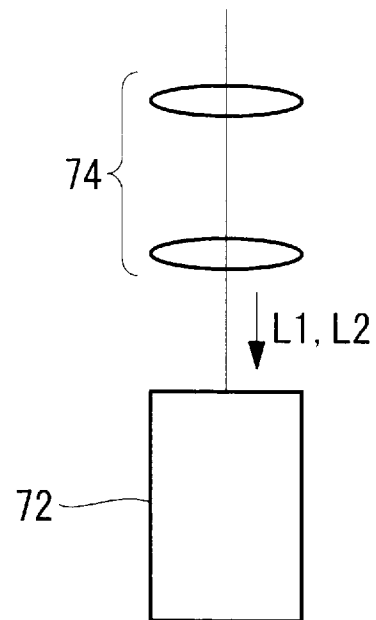
[図4]



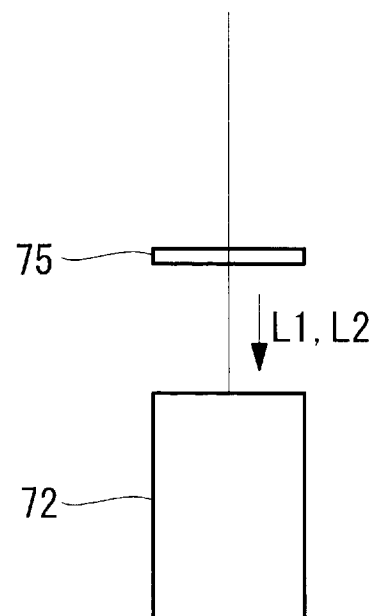
[図5]



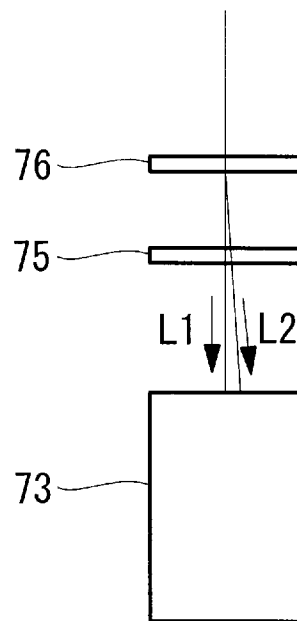
[図6A]



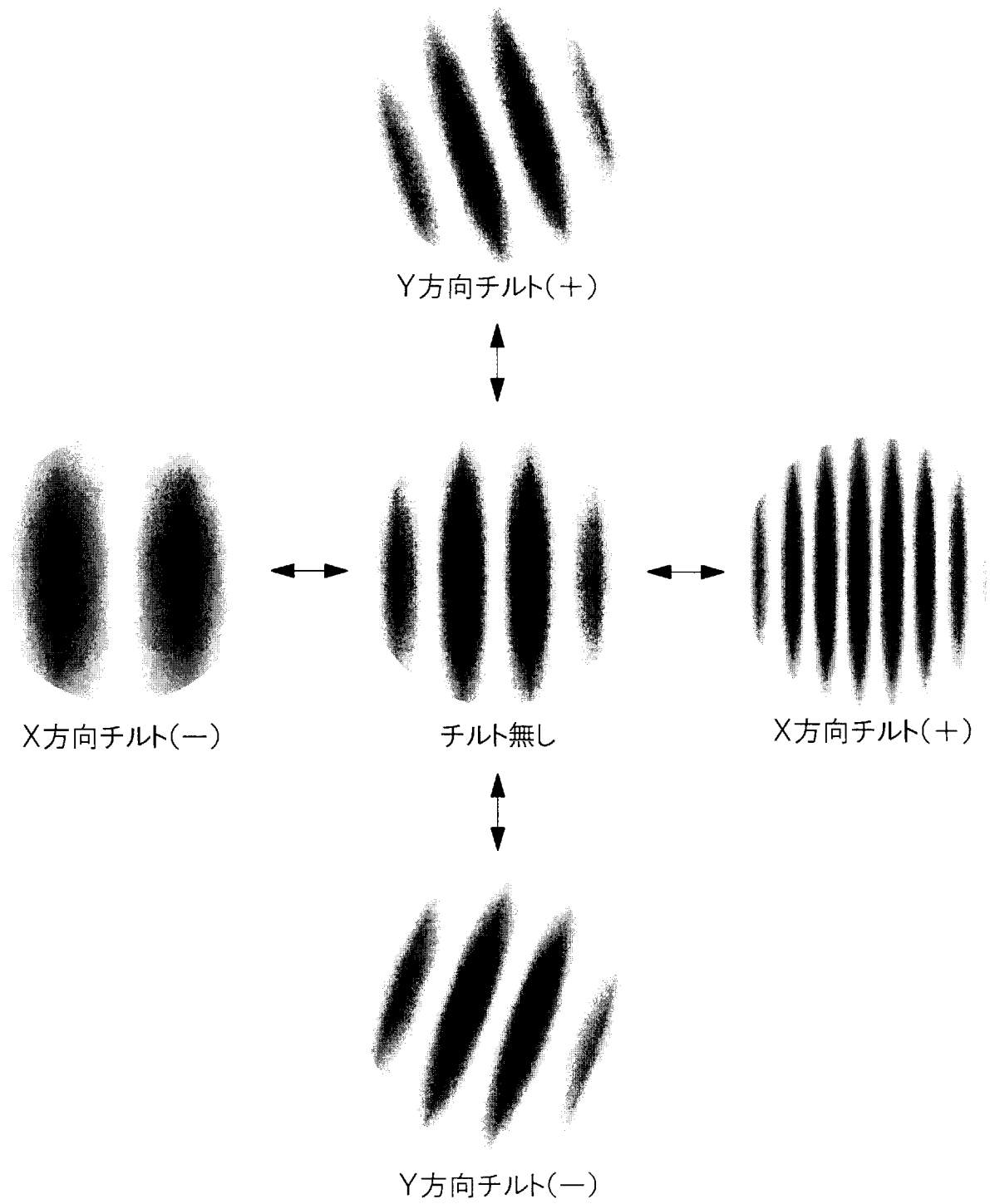
[図6B]



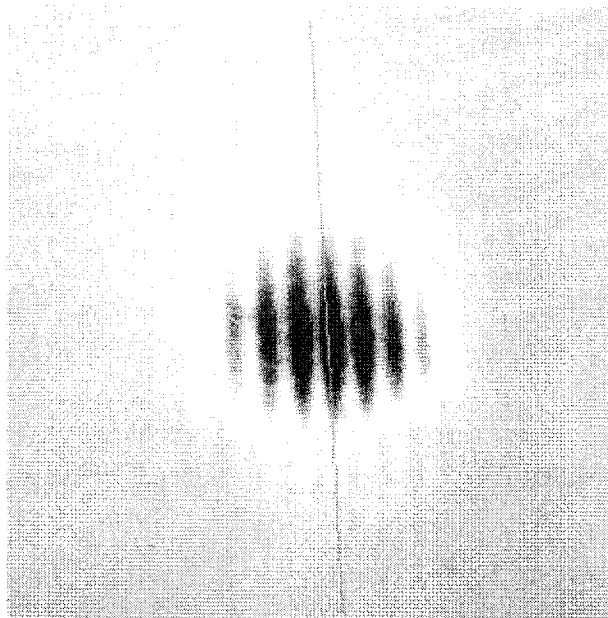
[図6C]



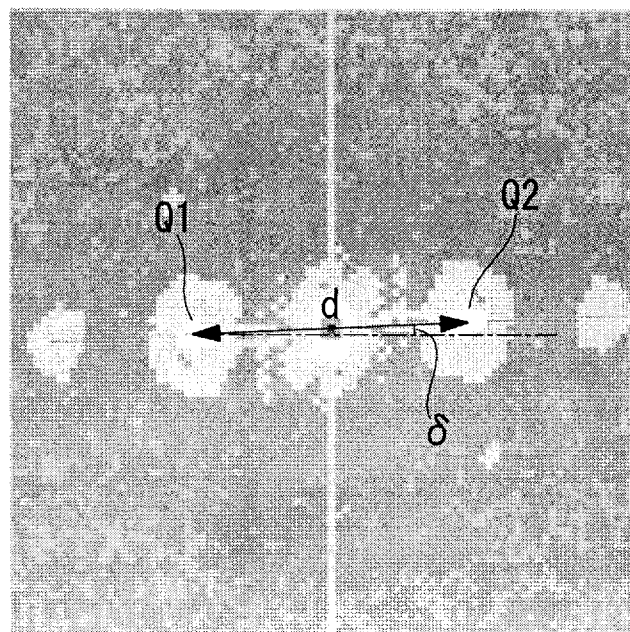
[図7]



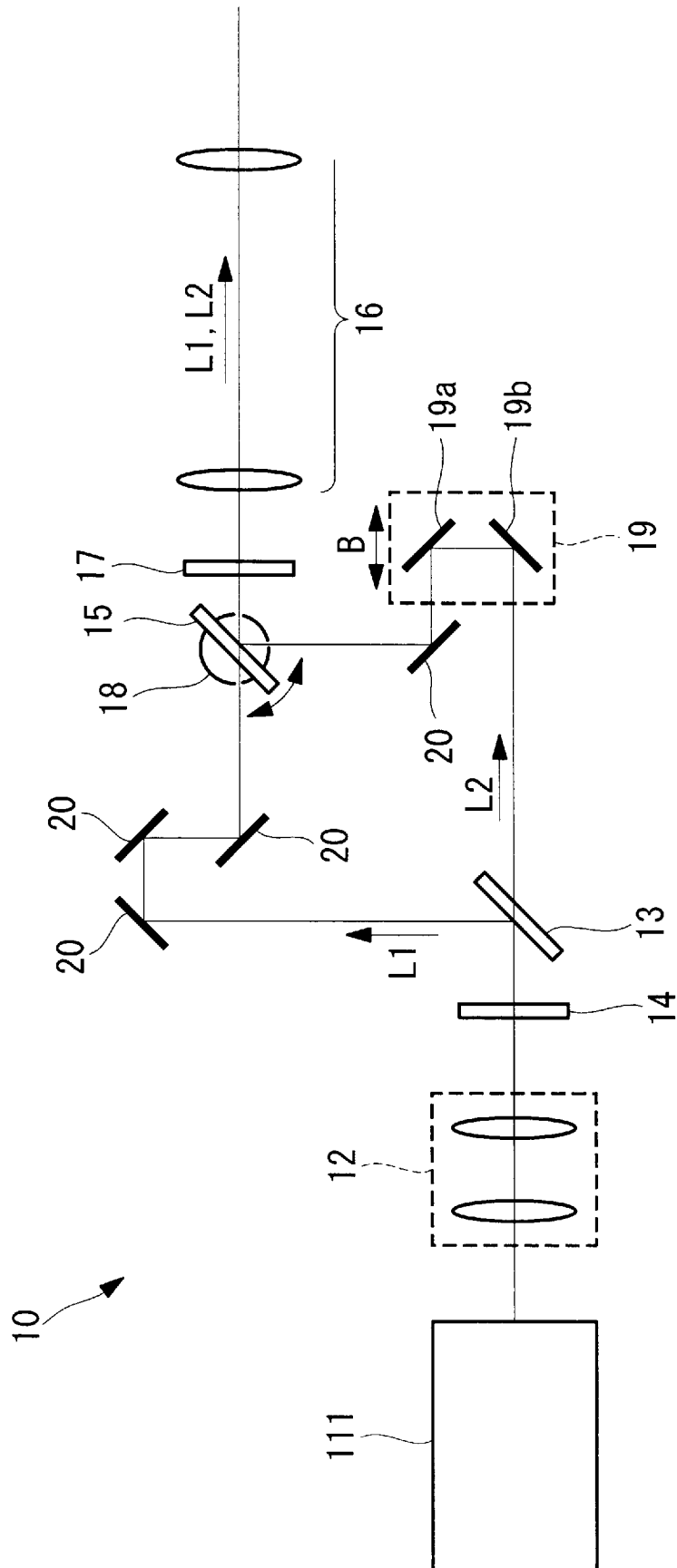
[図8A]



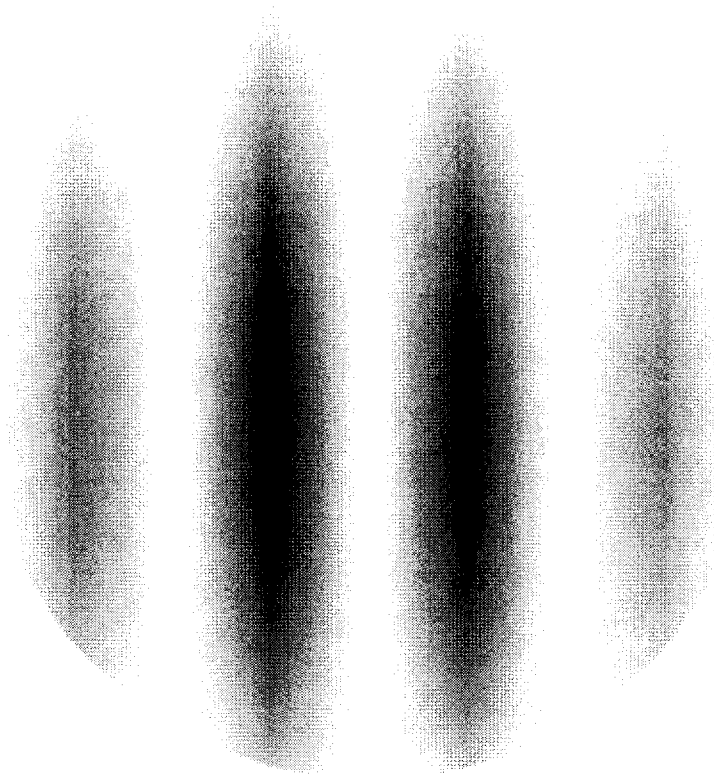
[図8B]



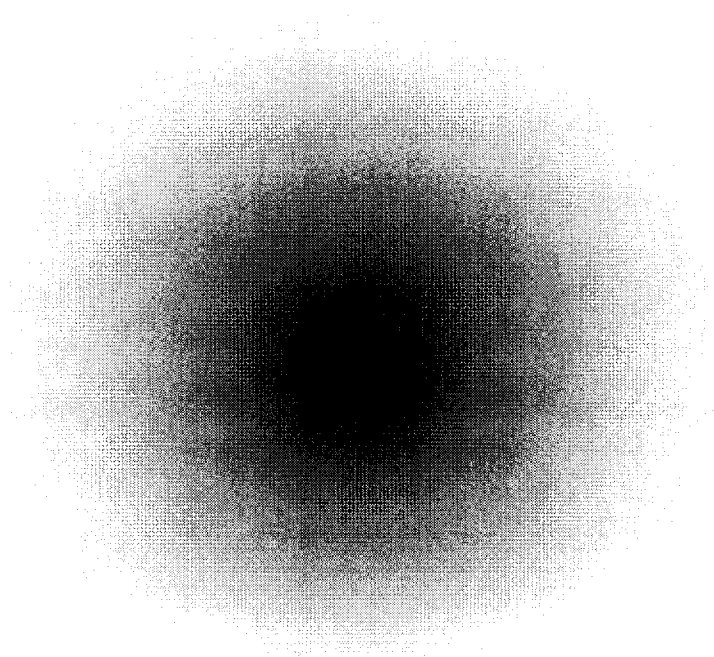
[図10]



[図11A]



[図11B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/002482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B21/00(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G02B21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-128573 A (Olympus Corp.), 30 June 2011 (30.06.2011), claims; entire text; all drawings & US 2011/0267663 A1 all claims, paragraphs, and figures	1-10
A	WO 2016/117415 A1 (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 28 July 2016 (28.07.2016), claims; entire text; all drawings & JP 2016-133637 A	1-10
A	JP 2013-225118 A (Olympus Corp.), 31 October 2013 (31.10.2013), claims; entire text; all drawings & US 2013/0250391 A1 all claims, paragraphs, and figures	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 April 2017 (19.04.17)

Date of mailing of the international search report
09 May 2017 (09.05.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G02B21/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G02B21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2011-128573 A (オリンパス株式会社) 2011.06.30, 特許請求の範囲、全文、全図 & US 2011/0267663 A1, all claims, paragraphs, and figures	1-10
A	WO 2016/117415 A1 (浜松ホトニクス株式会社) 2016.07.28, 請求の範囲、全文、全図 & JP 2016-133637 A	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

19.04.2017

国際調査報告の発送日

09.05.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

越河 勉

2 V

9313

電話番号 03-3581-1101 内線 3271

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2013-225118 A (オリンパス株式会社) 2013. 10. 31, 特許請求の 範囲、全文、全図 & US 2013/0250391 A1, all claims, paragraphs, and figures	1-10