(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3579166号

(P3579166)

(45)発行日　平成16年10月20日(2004.10.20)　(24)登録日　平成16年7月23日(2004.7.23)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
G02B 21/00	G02B	21/00	
G02B 7/28	G02B	7/11	J
G03B 13/36	G03B	3/00	A

請求項の数 5　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願平8-27009
(22)出願日　平成8年2月14日(1996.2.14)
(65)公開番号　特開平9-218355
(43)公開日　平成9年8月19日(1997.8.19)
審査請求日　平成14年8月9日(2002.8.9)

(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
(72)発明者　中川　修二
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　山村　浩

最終頁に続く

(54)【発明の名称】走査型レーザ顕微鏡

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

標本に対してレーザ光を走査し、該走査に応じた標本像の共焦点検出と非共焦点検出を可能にした走査型レーザ顕微鏡において、

前記標本像の非共焦点検出により広い範囲の合焦位置を求める非共焦点光検出手段と、

この非共焦点光検出手段で求められた前記広い範囲の合焦位置の範囲内で、共焦点検出により狭い範囲の合焦位置を求める共焦点光検出手段とを具備したことを特徴とする走査型レーザ顕微鏡。

【請求項２】

前記非共焦点光検出手段による非共焦点検出は、輝度出力が最大値で、一定レベルになる状態を検出し、前記共焦点光検出手段による共焦点検出は、輝度出力が最大値になる状態を検出することを特徴とする請求項１記載の走査型レーザ顕微鏡。

【請求項３】

更に複数の対物レンズと、前記非共焦点検出手段の前であって、前記対物レンズの焦点位置に配置した、穴径を変更可能な穴系変更手段とを備え、前記対物レンズの倍率に応じて前記穴径を変更することを特徴とする請求項１または２記載の走査型レーザ顕微鏡。

【請求項４】

更に複数の対物レンズと、前記非共焦点検出手段の前に設けた複数の受光エリアとを備え、前記対物レンズの倍率に応じて前記受光エリアを選択し、信号を取り出すことを特徴とする請求項１記載の走査型レーザ顕微鏡。

【請求項５】
更に対物レンズと、前記標本と前記対物レンズとの相対距離を検出する相対距離検出手段と、広い範囲又は狭い範囲の合焦位置を検出する動作時に、前記相対距離検出手段からの信号により、前記標本と前記対物レンズが衝突しないように合焦位置を求める動作を停止する衝突防止手段とを備えたことを特徴とする請求項１または２記載の走査型レーザ顕微鏡。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、画像の合焦点調整機能を有する走査型レーザ顕微鏡に関するものである。
【０００２】
【従来の技術】
従来、標本に対してレーザ光を走査するとともに、この走査に応じた標本像を画像化するものとして、走査型レーザ顕微鏡が知られている。このような走査型レーザ顕微鏡では、レーザ走査されている標本の透過光または反射光を光電子倍増管やフォトダイオードなどの光電変換器により光電変換信号に変換し、この光電変換信号をＡ／Ｄ変換回路で量子化した後、メモリに記憶するようにしている。また、このような走査型レーザ顕微鏡には、画像の合焦点調整を自動的に行う合焦点調整機能を有するものがあり、一例として、特開平４－６１３３４号公報に開示されるように、共焦点画像形成用のリニアイメージセンサを用い、このリニアイメージセンサに入射する光束の一部を受光して試料の焦点情報を検出する合焦検出装置を設けていて、この合焦検出装置の出力信号により対物レンズと試料との間の距離を合焦点に対して制御するようにしている。
【０００３】
【発明が解決しようとする課題】
ところが、このように構成したものでは、共焦点画像形成用のリニアイメージセンサに入射する光束の一部を合焦検出装置に入射するようにしているため、共焦点画像形成用リニアイメージセンサへの光量が減少してしまい、例えば微弱な光の標本については標本像が見えなくなることがある。また、合焦調整を精度よく行うには、共焦点画像形成用リニアイメージセンサと合焦検出装置との光学的合焦位置の調整が必要で、この調整が不十分の場合は、標本像の合焦ができないことから、面倒な調整作業を強いられるなど、合焦点制御に手間と時間が掛かってしまう。さらに、レーザ走査による共焦点画像によりピント合せを行うことができるが、共焦点画像は、焦点深度が極端に浅いため、使いづらいばかりか、合焦位置が判断できずに、時として、対物レンズを標本にぶつけてしまう危険性がある。
【０００４】
本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、合焦調整を精度よく、しかも速やかに行うことができる焦点調整機能を有する走査型レーザ顕微鏡を提供することを目的とする。
【０００５】
【課題を解決するための手段】
請求項１記載の発明は、標本に対してレーザ光を走査し、該走査に応じた標本像の共焦点検出と非共焦点検出を可能にした走査型レーザ顕微鏡において、前記標本像の非共焦点検出により広い範囲の合焦位置を求める非共焦点光検出手段と、この非共焦点光検出手段で求められた前記広い範囲の合焦位置の範囲内で、共焦点検出により狭い範囲の合焦位置を求める共焦点光検出手段とにより構成している。
【０００６】
請求項２記載の発明は、請求項１記載において、前記非共焦点光検出手段による非共焦点検出は、輝度出力が最大値で、一定レベルになる状態を検出し、前記共焦点光検出手段による共焦点検出は、輝度出力が最大値になる状態を検出するようにしている。
【０００７】
請求項３記載の発明は、請求項１または２記載において、複数の対物レンズと、前記非共

焦点検出手段の前であって、前記対物レンズの焦点位置に配置した、穴径を変更可能な穴系変更手段とを備え、前記対物レンズの倍率に応じて前記穴径を変更するようにしている。

また、請求項４記載の発明は、請求項１または２記載において、複数の対物レンズと、前記非共焦点検出手段の前に設けた複数の受光エリアとを備え、前記対物レンズの倍率に応じて前記受光エリアを選択し、信号を取り出するようにしている。

また、請求項５記載の発明は、請求項１または２記載において、対物レンズと、前記標本と前記対物レンズとの相対距離を検出する相対距離検出手段と、広い範囲又は狭い範囲の合焦位置を検出する動作時に、前記相対距離検出手段からの信号により、前記標本と前記対物レンズが衝突しないように合焦位置を求める動作を停止する衝突防止手段とを備えている。

【０００８】

この結果、請求項１または２記載の発明によれば、まず、標本像の非共焦点検出により比較的広い範囲についての合焦位置を求め、この非共焦点検出で求めた合焦範囲内で、共焦点検出によりさらに狭い範囲の合焦位置を求めるようにしたので、所望する部分の合焦位置を精度よく、しかも速やかに検出することが可能になる。

また、請求項３記載の発明によれば、非共焦点光検出手段の前に配置した穴系変更手段を、対物レンズに合わせて大きめな穴系とすることにより大まかな合焦位置を求め、次に小さい穴系とすることにより狭い範囲での合焦位置を求めることで、所望する部分の合焦位置を速やかに、且つ精度良く検出することができる。

また、請求項４記載の発明によれば、非共焦点光検出手段の前に配置した複数の受光エリアにおいて、対物レンズ倍率が低倍の場合は上下画素を追加し、高倍時には上下画素の追加を最小限とすることにより、１つの光検出器で合焦位置を検出することができる。

また、請求項５記載の発明によれば、標本と対物レンズとの相対距離を検出しているので、これらが衝突しないことを確認しながら、合焦位置を求めることができる。

【０００９】

【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。

（第１の実施の形態）

図１は、第１の実施の形態の概略構成を示している。この場合、光源１とピンホール２によって点状光源を構成し、この点光源を収差のよく補正された対物レンズ３を通して観察試料４上に点状光として結像し、試料４を照明するようになっている。そして、試料４を透過した該試料４からの点状光を、収差のよく補正されたコンデンサレンズ５を通して光検出器７に与えるようにする。

【００１０】

なお、８は試料４を載置するステージである。

この場合、光検出器７の受光面の前面の結像位置にピンホール６を着脱可能に配置していて、ピンホール６を配置した状態では、コンデンサレンズ５からの点状光をピンホール６上に結像し、この結像された点状光をピンホール６を通して光検出器７で検出することで、共焦点を検出する共焦点センサとして動作させるようにし、また、ピンホール６を取り除いた状態では、コンデンサレンズ５からの点状光を直接光検出器７で検出することで、非共焦点を検出する非共焦点センサとして動作させるようにしている。

【００１１】

なお、ここでは試料４をラスター走査のように２次元走査することにより、２次元画像を得るようにしている。

しかして、まず、ピンホール６を結像位置から取り除き、試料４上の点光源が、コンデンサレンズ５により直接光検出器７に集光するように、対物レンズ３を光軸方向に移動しながら光検出器７の輝度出力により非共焦点を検出するようにする。

【００１２】

この場合、対物レンズ３の光軸方向の移動量と、輝度出力の変化の関係は、図２中ａに示

すようになって、輝度出力分布が最大値で一定レベルを呈するようになると、合焦位置と判断するが、この合焦位置は比較的広い範囲で求められる。

【００１３】

そして、かかる合焦位置が求められた時点で、ピンホール６を結像位置に挿入する。この場合、図示実線の光路よりピンホール６上に結像された点状光を、ピンホール６を通して光検出器７で検出するが、対物レンズ３の集光位置よりずれた位置Ｌからの図示破線の光路による光は、ピンホール６を通過せず光検出器７に到達しないようにして、光検出器７からの輝度出力により共焦点を検出するようにする。

【００１４】

この場合、対物レンズ３の試料４方向への移動量と、輝度出力の変化の関係は、図２中ｂに示すようになって、輝度出力分布が最大値を呈すると合焦位置と判断するが、この合焦位置は、極めて狭い範囲で求められるようになる。

【００１５】

従って、このようにすれば、最初に、ピンホール６を結像位置から取り除いて、光検出器７より非共焦点を検出することで大まかな合焦位置を求め、この時点からピンホール６を光検出器７の受光面に配置して、非共焦点検出による大まかな合焦位置の範囲において、さらに光検出器７より共焦点を検出して、狭い範囲での合焦位置を求めるようにしたので、共焦点検出のみで合焦位置を求めるのと比べ、所望する部分の合焦位置を速やかに、且つ精度よく検出することができる。また、非共焦点検出と共焦点検出を組み合わせているので、微弱な光の標本についても正確に合焦位置を求めることができる。

（第２の実施の形態）

図３は、本発明の第２の実施の形態の概略構成を示すもので、ここでは、走査型共焦点顕微鏡に本発明を適用した例を示している。

【００１６】

図において、２１は顕微鏡本体で、この顕微鏡本体２１は、レーザ光源２２、ミラー２３、ハーフミラー２４、２次元走査機構２５、レボルバ２６、対物レンズ２７、ステージ２８、試料２９、レンズ３０，ピンホール板３１、共焦点光検出器３２、ハーフミラー３８、レンズ３９および非共焦点光検出器４０などを有し、また、このような顕微鏡本体２１に対し画像メモリ３３Ａ、３３Ｂ、画像判定回路３３Ｃを有する画像処理ユニット３３、ＸＹ走査駆動制御回路３４、Ｚ走査駆動制御回路３５、コンピュータ３６、モニタ３７および共焦点／非共焦点用切り替えＳＷ４１を接続している。

【００１７】

この場合、レーザ光源２２は、試料２９の表面を走査するスポット光としてのレーザ光を発生するためのもので、このレーザ光源２２からのレーザ光をミラー２３により反射させ２次元走査機構２５に導くようにしている。２次元走査機構２５は、ミラー２３より与えられたレーザ光源２２からのレーザ光を試料２９上に２次元走査するためのもので、例えばＸ軸方向走査用のガルバノミラーとＹ軸方向走査用のガルバノミラーを有していて、ＸＹ走査駆動制御回路３４の制御によりスポット光をＸＹ方向に走査すべく、これらガルバノミラーをＸ軸方向およびＹ軸方向に振ることで対物レンズ２７に対するスポット光の光路をＸＹ方向に振らせるようになっている。レボルバ２６は、倍率の異なる複数の対物レンズ２７を保持するもので、レボルバ２６の切り替えにより、複数の対物レンズ２７のうち所望の倍率を持つものを顕微鏡の観察光路中に選択挿入するようにしている。

【００１８】

そして、この選択挿入された対物レンズ２７を通して２次元走査機構２５により２次元走査されたスポット光をステージ２８上の試料２９に照射するようにしている。

【００１９】

一方、試料２９からの反射光、蛍光、透過光などの観察情報光を、対物レンズ２７を通して２次元走査機構２５に戻し、この２次元走査機構２５を介してハーフミラー２４、３８に戻すようにしている。これらハーフミラ２４、３８は、２次元走査機構２５に対するレーザ光源２２の出射光路上に設けられた半透明鏡であって、２次元走査機構２５を介して

与えられる試料２９からの反射光を光検出系に導くためのものである。
【００２０】
ハーフミラ２４を介して得た２次元走査機構２５からの例えば反射光をレンズ３０で集光し、ピンホール板３１に与えるようにしている。このピンホール板３１は、所定径のピンホールを開けたもので、共焦点光検出器３２の受光面の前面の結像位置に、そのピンホールを位置させるように配置している。また、共焦点光検出器３２は、ピンホール板３１のピンホールを介して得られる光をその光量対応の電気信号に変換する光検出素子からなっている。
【００２１】
一方、ハーフミラ３８を介して得た２次元走査機構２５からの反射光をレンズ３９で集光し、非共焦点光検出器４０の受光面に与えるようにしている。この非共焦点光検出器４０は、ピンホールを通さないで得られる光を、その光量対応の電気信号に変換するフォトマル、フォトダイオードなどの光検出素子からなっている。
【００２２】
Ｚ走査駆動制御回路３５は、コンピュータ３６または画像判定回路３３Ｃにより制御されるもので、倍率の異なる複数の対物レンズ２７を保持するレボルバ２６を、その高さ方向、すなわちＺ軸方向に基準幅単位で移動制御させるためのものである。また、Ｚ走査駆動制御回路３５は、レボルバ２６をＺ軸方向に基準幅単位で移動制御するごとにカウントを１づつ進める機能と、このカウント値を画像処理ユニット３３に与える機能をも有している。
【００２３】
画像処理ユニット３３の画像メモリ３３Ａ、３３Ｂは、それぞれ１フレーム分の容量を持つ画像メモリで、例えば５１２画素×５１２画素×８ビット（２５６階調）構成で１フレーム分としたメモリである。また、画像処理ユニット３３は、この１フレーム分の容量を持つ２つの画像メモリ３３Ａ，３３Ｂの他に、画像判定回路３３Ｃも有している。
【００２４】
そして、切り替えＳＷ４１を介して共焦点光検出器３２または共焦点光検出器４０からの出力信号を受けると、画像メモリ３３Ａ、３３Ｂのうち、画像メモリ３３Ａは、反射光の電気信号（輝度信号）を保存するようにしている。この場合、スポット光の現在のＸＹ走査位置に対応する画素位置に８ビットデータとして記憶保存するようにしている。この場合の記憶は、前回のその位置での輝度信号より今回の輝度信号のレベルが高い場合に、その画素位置の記憶情報として保存するようにして、高さの異なる画像の足し込みを可能にしている。また、画像メモリ３３Ｂには、スポット光の現在のＸＹ走査位置に対応する画素位置にＺ軸走査方向の情報、具体的にはＺ走査駆動制御回路３５からレボルバ２６が何回移動したかを数えた回数の値が与えられ、画像メモリ３３Ａの記憶データから前回のその位置での輝度信号より今回の輝度信号のレベルが高い場合に、画像メモリ３３Ｂに対して前記回数の値をデータとして更新、記憶保存するようにしている。このようにして画像メモリ３３Ｂでは、各画素位置において、その画素位置で最大輝度を示すデータがある時のレボルバ移動回数値をＺ走査方向の情報（この情報は高さ位置を示すことになる。）として記憶している。
【００２５】
なお、画像処理ユニット３３に対してのスポット光の現在のＸＹ層位置情報は、ＸＹ走査駆動制御回路３４より与えられている。
画像判定回路３３Ｃは、自動画像形成の際の自動範囲設定と、その設定値のコンピュータ３６への伝達とＺ走査駆動制御回路３５の制御を担うものである。
【００２６】
そして、画像処理ユニット３３は、これら画像メモリ３３Ａ、３３Ｂの記憶データを読み出してコンピュータ３６に与えるといった処理も行うようにしている。
【００２７】
コンピュータ３６は、これらＸＹ走査駆動制御回路３４、Ｚ走査駆動制御回路３５および

画像処理ユニット３３の各制御を行うと共に、画像データの保存、再生、編集などを行うなどの制御や処理の中枢を担うものである。モニタ３７は、コンピュータ３６の画像表示端末であり、必要な情報の表示や画像の表示などに使用される。

【００２８】

また、コンピュータ３６は、画像処理ユニット３３に対する共焦点光検出器３２の出力と非共焦点光検出器４０の出力の切り替えを行う切り替えＳＷ４１の切り替え動作も制御するようにもしている。

【００２９】

しかして、このような構成において、合焦開始をコンピュータ３６が検出すると、図４に示すフローチャートが実行され、まず、切り替えＳＷ４１により非共焦点光検出器４０からの出力を画像処理ユニット３３に与えるように設定して、非共焦点光検出器４０を合焦用センサとして用いるようにする（ステップ４０１）。

【００３０】

そして、上述したようにレーザ光源２２からのレーザ光を２次元走査機構２５により２次元走査するとともに、このレーザ光をスポット光として対物レンズ２７を通してステージ２８上の試料２９に照射し、この試料２９からの反射光を対物レンズ２７を通し、ハーフミラー３８よりレンズ３９を介して非共焦点光検出器４０の受光面に集光することにより、非共焦点光検出器４０からの出力を画像データとして、画像処理ユニット３３に取り込み、画像メモリ３３Ａにデータを格納する。そして、任意のラインの画像データをコンピュータ３６に取り込み、該任意ラインの画像の輝度出力が最大となる画素位置を求める（ステップ４０２、４０３）。

【００３１】

この場合の任意の１ラインは、例えば画像中央付近やユーザの選択した任意のラインデータを取り込んでもよい。また、合焦用に必要なデータは１ラインなので、Ｙ軸方向スキャンを止め、ある１ラインのみのデータを画像メモリ３３Ａに取り込むようにしてもよい。

【００３２】

このようにして、モニタとなる１画素を決定したならば、非共焦点光検出器４０の出力が増加する方向に対物レンズ２７と試料２９との間を制御する（ステップ４０４）。つまり、非共焦点光検出器４０を合焦検出用センサとし、輝度出力が最大となるように対物レンズ２７と試料２９との間を制御する。

【００３３】

ここで１ラインの中の最大となる画素出力を求めず、１ラインの画素出力平均値が最大となるような対物レンズ２７と試料２９との間を制御してもよいし、また、１ラインの任意のブロックの画素平均値が最大となるように対物レンズ２７と試料２９との間を制御（Ｚレボ制御）してもよい。

【００３４】

このＺレボ制御する際に、試料２９と対物レンズ２７の位置関係をコンピュータ３６で演算し、試料２９と対物レンズ２７が衝突しないように制御することが必要である。

【００３５】

このような制御を以下のように実行される。

この場合の条件は、ステージ２８位置を任意の位置に固定し、Ｚレボ制御のみで合焦位置を求めるものとする。また、Ｚレボの初期位置を最上限として、この位置を基準位置とする。

【００３６】

そして、この基準位置からステージ２８の位置までの距離をｌとし、また、対物位置を、Ｚレボ原点位置からのＺレボ移動量とＺレボの長さと対物の長さの和により求め、この対物位置をｌｍとする。ここで、Ｚレボ位置は、Ｚレボ公差と対物の公差による誤差を含む。また、試料２９の厚みをｄとし、合焦のターゲットによりその厚みは変わる。このターゲットの厚みはユーザにより定義することとする。

【００３７】

これにより、試料２９と対物レンズ２７の間の距離は、
Ｗｄ　＝ｌ－ｌｍ－ｄ
で求められる。この場合、それぞれの値は、公差による誤差を含んでいる。
【００３８】
そして、Ｗｄ　が負になる場合に、試料２９と対物レンズ２７の間で衝突が起きる可能性がある。
このようにして、試料２９と対物レンズ２７の位置関係をコンピュータ３６で演算しつつ、これらが衝突しないことを確認しながら、合焦位置を求める制御を続ける（ステップ４０５）。
【００３９】
ここで、ステップ４０５で、試料２９と対物レンズ２７が衝突する危険を判断すると、ステップ４０６で、ＡＦエラーを発生し、ＡＦ動作を停止すると同時に、モニタ３７上でユーザに警告を与えるようになる。
【００４０】
その後、非共焦点光検出器４０の輝度出力が最大となって、上述した図２のａに示すように一定の出力値に落ち着くようになれば、合焦位置が検出されたものと見做して、非共焦点光検出器４０による合焦位置検出を終了する（ステップ４０７）。
【００４１】
次に、切り替えＳＷ４１の切り替えにより共焦点光検出器３２からの出力を画像処理ユニット３３に与えるように設定して、共焦点光検出器３２を合焦用センサとして用いるようにする（ステップ４０８）。
【００４２】
そして、この場合も共焦点光検出器３２の出力が増加する方向に対物レンズ２７と試料２９との間を制御する（ステップ４０９）。つまり、共焦点光検出器３２を合焦検出用センサとし、輝度出力が最大となるように対物レンズ２７と試料２９との間を制御する。この制御には、山登り式を用い、共焦点光検出器３２が最大値を検出した後、出力値が減少方向に変化したことを検出すると、Ｚ方向の移動を逆移動して合焦位置を追い込むようにする。
【００４３】
この場合も試料２９と対物レンズ２７の位置関係をコンピュータ３６で演算しつつ、これらが衝突しないことを確認しながら、合焦位置を求める制御を続ける（ステップ４１０）。
【００４４】
ここでも、ステップ４１０で、試料２９と対物レンズ２７が衝突する危険を判断すると、ステップ４１１で、ＡＦエラーを発生し、ＡＦ動作を停止すると同時に、モニタ３７上でユーザに警告を与えるようになる。
【００４５】
その後、共焦点光検出器３２の輝度出力の最大値が、上述した図２のｂに示すように極めて狭い範囲で得られることで、合焦位置が検出されたものと見做して合焦位置検出を終了する（ステップ４１２、４１３）。
【００４６】
従って、このようにすれば、最初に非共焦点光検出器４０を合焦用センサとして用い、輝度出力が最大値となる広い範囲を大まかな合焦位置として求め、この状態から共焦点光検出器３２を合焦用センサとして切り替えて、大まかな合焦位置の範囲について、さらに輝度出力が最大値となる狭い範囲での合焦位置を求めるようにしたので、所望する部分の合焦位置を精度よく、しかも速やかに検出することができるようになる。また、非共焦点光検出器４０と共焦点光検出器３２により合焦用センサを切り替えており、これらセンサを組み合わせて用いているので、例え微弱な光の標本についても正確に合焦位置を求めることができる。
（第３の実施の形態）

この第３実施の形態では、レボルバ２６に取り付けられた複数の対物レンズ２７の倍率に応じたピンホールを有するピンホール板４２を非共焦点光検出器４０の手前に配置するようにしている。この場合、ピンホール板４２は、図５に示すように例えば３段階に径の異なるピンホール４２ａ、４２ｂ、４２ｃを有し、また、側縁に沿ってクリック４２ｄを設けて対物倍率に応じてピンホールを光軸上に選択挿入可能にしている。この場合のピンホール板４２の移動は、コンピュータ３６の指示により電動切り替えにより実行される。

【００４７】

次に、ピンホール径を変えた場合の効果について説明する。対物レンズの焦点深度は倍率が低くなるほど、焦点深度は大きくなることはよく知られている。図２の非共焦点光学系での光軸方向の強度分布ａについても同じようなことがいえ、対物レンズの倍率が低くなればなるほど、光軸方向の距離が大きくなる。また、共焦点についても同様である。

【００４８】

したがって、低倍の対物レンズを使用した場合、共焦点、非共焦点ともに光軸方向の幅が広がるが、場合によっては図６に示すようになる可能性がある。図６は、非共焦点の輝度が一定になっている範囲で、共焦点の輝度が零になっている範囲Ｘが存在するような状態である。このような関係になっていると、非共焦点光検出器４０の輝度出力が一定になったからといって、すぐに共焦点光検出器３２の出力を利用することができない。したがって、共焦点光検出器３２の輝度出力が発生するまでの間は、非共焦点光検出器４０の光出力を利用せざるを得ないが、出力が一定なので制御に時間がかかる。

【００４９】

図２から明らかなように、同じ対物レンズでもピンホールの有無によってその光軸方向の強度分布に大きな差を生じる。逆にこれは、ピンホールの径によって光軸方向の強度分布を変化させることができることを意味している。したがって、図６のような場合でも本実施の形態のように非共焦点側にピンホールを配置することで、非共焦点の光軸方向の強度分布を破線のように変化させることができる。この結果、問題となる範囲Ｘを無くすことができるため、素早い合焦が可能になる。

【００５０】

しかして、コンピュータ３６は、常時対物レンズ２７についての情報を認識しており、対物レンズ２７の倍率変更の要求を受けると、低倍時はピンホール径の小さなものを選択して輝度が一定になる範囲を狭まるようにし、高倍時はピンホール径の大きなものを選択して輝度が一定となる範囲を広げるようにしている。

【００５１】

このようにすれば、非共焦点光検出器４０側に径の異なるピンホール４２ａ、４２ｂ、４２ｃを有するピンホール板４２を配し、対物レンズ２７の倍率に応じてピンホール４２ａ、４２ｂ、４２ｃのうちの１つを選択するようにしたので、対物レンズ２７が低倍になっても、非共焦点光検出器４０により安定して合焦位置を検出することができるようになる。

【００５２】

この場合、ピンホール可変は、連続的に絞り径を可変可能にした手段を設けるようにしてもよい。

また、本実施の形態では、非共焦点側にピンホールを配置したが、逆に共焦点側に図５のようなピンホールを配置しても構わない。この場合は、はじめに図６の問題となる範囲Ｘが存在しないようにピンホールを大きくしておき、徐々に小さくして合焦の精度を上げるようにしていけばよい。

【００５３】

共焦点と非共焦点に適したピンホールを図５に示すように一枚の板に設けることができるならば、一つの光検出器を共焦点用、非共焦点用に兼用できる。

（第４の実施の形態）

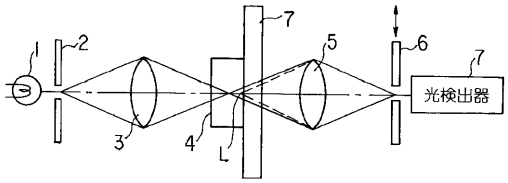
この第４実施の形態では、図３に示す非共焦点光検出器４０について、ピンホール径を可変させずに受光エリアを可変できるようにしている。

【００５４】
この場合、非共焦点光検出器４０は、図７（ａ）に示すように受光エリアをＡ、Ｂ、Ｃの３分割とし、対物レンズ２７の倍率に応じて各受光エリアより取り出す信号を選択するようにしている。すなわち、同図（ｂ）に示すように対物レンズ２７が低倍の場合は、受光エリアをＡのみとし、対物レンズ２７が高倍であれば、受光エリアをＡ、Ｂ、Ｃを選択してＡ＋Ｂ＋Ｃの加算信号取り出すようにしている。
【００５５】
このようにすれば、非共焦点光検出器４０の受光エリアを対物レンズの倍率に応じて変化させるようにできるので、精度出力が最大になって、合焦位置の追い込み精度を上げることができる。
【００５６】
本実施の形態の場合も、上記第３の実施の形態と同様に共焦点側に配置することも可能であり、受光エリアとして共焦点と非共焦点を検出できるエリアを複数設定することにより、一つの光検出器で共焦点と非共焦点用に兼用することも可能である。
（第５の実施の形態）
この第５実施の形態では、図３と同一部分には同符号を付して示す図８に示すように非共焦点光検出器４０の光路中のミラー４３を駆動可能にし、合焦用センサを非共焦点光検出器４０から共焦点光検出器３２に切り替える際に他の位置まで駆動できるようにしている。つまり、ここでのミラー４３は、非共焦点光検出器４０の合焦位置算出の際は、標本像が非共焦点光検出器４０に入射する位置に移動し、その後、非共焦点光検出器４０での合焦位置を検出終了すると、ミラー４９を図示破線位置に移動させて共焦点光検出器３２に１００％標本像が入射するようにしている。このミラー４３の位置移動は、コンピュータ３６が管理し、電動切り替え可能である。
【００５７】
このようにすれば、非共焦点光検出器４０と共焦点光検出器３２のいずれにも、光量を落とさずに標本像を入射することができるので、光量の不足した標本に対しても十分合焦位置を求めることができるようになる。
【００５８】
なお、非共焦点検出系と共焦点検出系は、図３で述べた位置関係であってもよい。この場合は、ミラー２４が移動するようになる。
（第６の実施の形態）
この第６の実施の形態では、光検出器に２次元エリアセンサを使用し、取り込むエリアを可変することで、非共焦点用データと共焦点用データをそれぞれ検出できるようにしている。
【００５９】
図９（ａ）は、このような２次元エリアセンサを用いて実現した合焦検出のための回路構成図で、レーザ光源５１からのレーザ光をビームエクスパンダ５２よりＸ方向ガルバノ機構５３、Ｙ方向ガルバノ機構５５を通し、さらに対物レンズ５６を通して試料５７に入射し、この試料５７からの反射光をミラー５８を介して２次元エリアセンサ５４に与えるようにしている。
【００６０】
この場合、２次元エリアセンサ５４は、例えばＣＣＤからなるもので、同図（ｂ）に示すように複数の撮像素子を複数ライン分配置していて、共焦点用データは、２次元エリアセンサ４５の任意の１ライン（図示破線で示す部分）のうちの１画素相当の撮像素子からの輝度出力を取り込むことで検出するようにし、また、非共焦点用データは、２次元エリアセンサ４５の任意の１ライン（図示破線で示す部分）のうちの１画素相当の撮像素子からの輝度出力に、少なくとも該撮像素子の上下１画素に相当する撮像素子からの輝度出力を加えることで得るようにしている。つまり、対物レンズ５６の倍率に応じて、追加する上下画素に相当する撮像素子からの輝度出力を、例えば、対物倍率が低倍ならば上下画素を追加し、高倍時には上下画素の追加を最小単位とする。

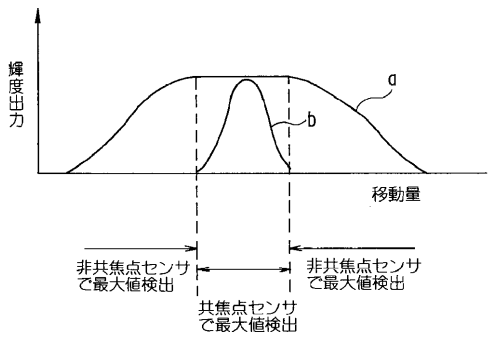
【００６１】
このようにすれば、共焦点用データと非共焦点用データを求めて合焦位置を追い込むことにより、１つの光検出器で合焦位置を求めることができる。
この場合、当然のことながら、全ての画素を使う必要なく、任意の１画素を利用すればよい。上記の実施の形態では、ライン走査を想定しているが、スポットもしくは微小な２次元領域であっても可能である。
【００６２】
【発明の効果】
以上述べたように、本発明によれば標本像の非共焦点検出により比較的広い範囲についての合焦位置を求め、この非共焦点検出で求めた合焦範囲について、さらに共焦点検出により狭い範囲での合焦位置を求めることにより、所望する部分の合焦位置を精度よく、しかも速やかに検出することができる。
また、非共焦点光検出手段と共焦点光検出手段を選択的に切り替えることができるので、合焦位置を自動的に検出することができる。
【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の実施の形態を説明するための図。
【図３】本発明の第２の実施の形態の概略構成を示す図。
【図４】第２の実施の形態の動作を説明するためのフローチャート。
【図５】本発明の第３の実施の形態に用いられるピンホール板の概略構成を示す図。
【図６】第３の実施の形態を説明するための図。
【図７】本発明の第４の実施の形態に用いられる非共焦点光検出器の概略構成を示す図。
【図８】本発明の第５の実施の形態の要部の概略構成を示す図。
【図９】本発明の第６の実施の形態の要部の概略構成を示す図。
【符号の説明】
１…光源、
２…ピンホール、
３…対物レンズ、
４…試料、
５…コンデンサレンズ、
６…ピンホール、
７…光検出器、
２１…顕微鏡本体、
２２…レーザ光源、
２３…ミラー、
２４…ハーフミラー、
２５…２次元走査機構、
２６…レボルバ、
２７…対物レンズ、
２８…ステージ、
２９…試料、
３０…レンズ、
３１…ピンホール板、
３２…共焦点光検出器、
３３…画像処理ユニット、
３３Ａ、３３Ｂ…画像メモリ、
３３Ｃ…画像判定回路、
３４…ＸＹ走査駆動制御回路、
３５…Ｚ走査駆動制御回路、
３６…コンピュータ、

３７…モニタ、
３８…ハーフミラー、
３９…レンズ、
４０…非共焦点光検出器、
４１…切り替えＳＷ、
４２…ピンホール板、
４３…ミラー、
５１…レーザ光源、
５２…ビームエクスパンダ、
５３…Ｘ方向ガルバノ機構、
５４…２次元エリアセンサ、
５５…Ｙ方向ガルバノ機構、
５６…対物レンズ、
５７…試料。

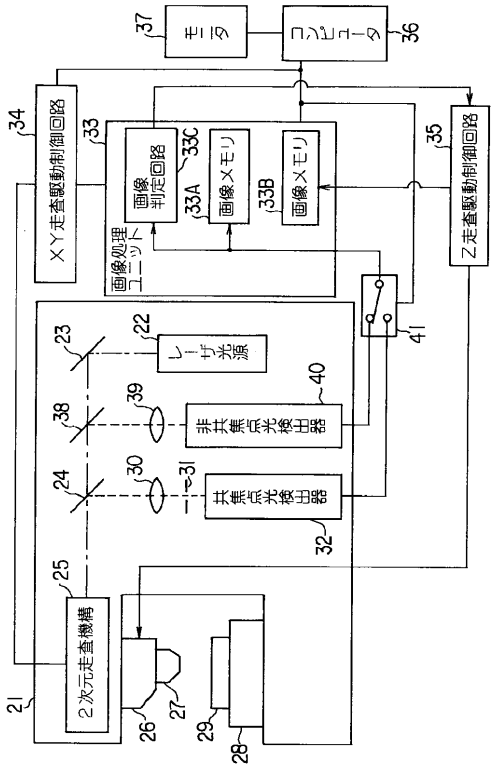
【図１】



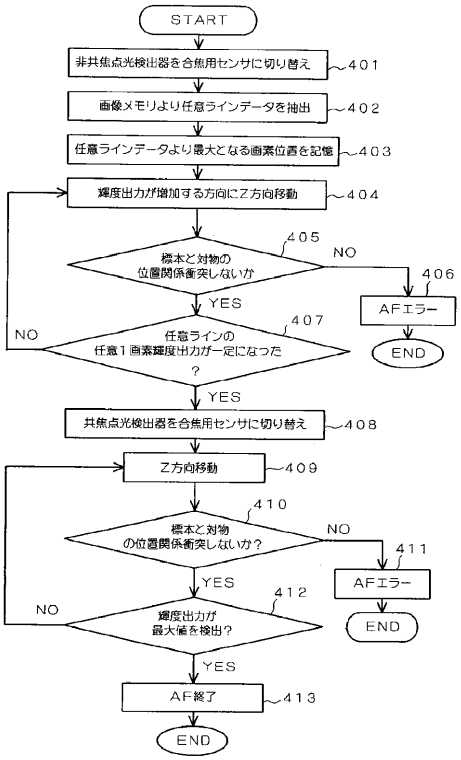
【図２】



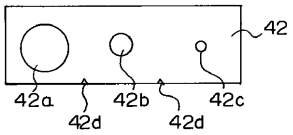
【図３】



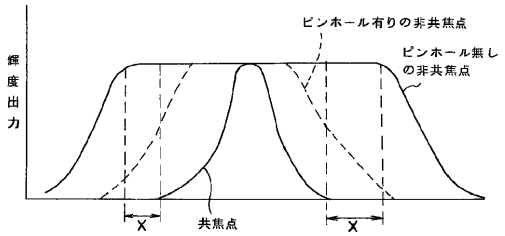
【図４】



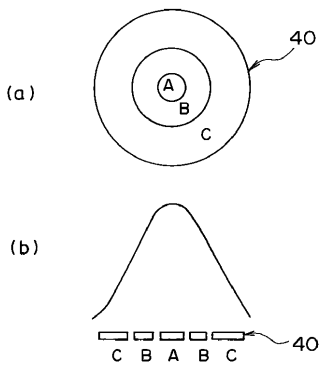
【図５】



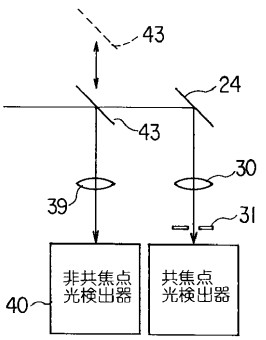
【図６】



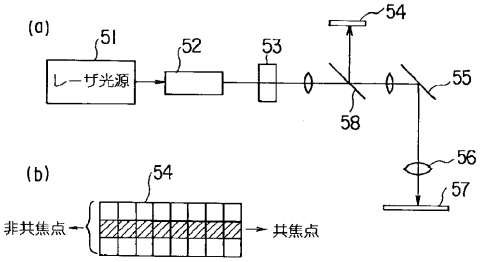
【図７】



【図８】



【図９】



フロントページの続き

(56)参考文献 実開平０５－０９６８１６（ＪＰ，Ｕ）
特開平０２－２４７６０５（ＪＰ，Ａ）
特開平０４－１７７２１１（ＪＰ，Ａ）
特開昭６０－２０４１８１（ＪＰ，Ａ）
特開昭５９－１９２２２１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
G02B 21/00-21/36