

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5131071号  
(P5131071)

(45) 発行日 平成25年1月30日(2013.1.30)

(24) 登録日 平成24年11月16日(2012.11.16)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>G02B 21/16</b>	<b>(2006.01)</b>	GO2B 21/16	
<b>G02B 7/28</b>	<b>(2006.01)</b>	GO2B 7/11	N
<b>G02B 21/00</b>	<b>(2006.01)</b>	GO2B 7/11	J
		GO2B 21/00	

請求項の数 7 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2008-187403 (P2008-187403)
(22) 出願日	平成20年7月18日 (2008.7.18)
(65) 公開番号	特開2010-26241 (P2010-26241A)
(43) 公開日	平成22年2月4日 (2010.2.4)
審査請求日	平成23年7月19日 (2011.7.19)

(73) 特許権者	000004112 株式会社ニコン 東京都千代田区有楽町1丁目12番1号
(74) 代理人	100072718 弁理士 古谷 史旺
(74) 代理人	100116001 弁理士 森 俊秀
(72) 発明者	小松 亮介 東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株式会社ニコン内

審査官 堀井 康司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光顕微鏡装置及び焦点検出装置

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対物レンズを介して標本へ励起光を照射し、その標本で発生した蛍光を前記対物レンズを介して検出する観察用光学系と、

前記対物レンズを介して前記標本へ焦点検出用の光を照射し、その標本で反射した前記光を前記対物レンズを介して検出する焦点検出用光学系と、

前記焦点検出用光学系が照射する光の波長である焦点検出波長を、互いに異なる少なくとも2種類の波長の間で切り換える第1切換手段とを備え、

前記観察用光学系の光路と前記焦点検出用光学系の光路との交差箇所には波長分離ミラーが配置され、

前記第1切換手段は、

前記交差箇所に配置される波長分離ミラーを、分離波長の互いに異なる少なくとも2種類の波長分離ミラーの間で交換する

ことを特徴とする蛍光顕微鏡装置。

## 【請求項 2】

請求項1に記載の蛍光顕微鏡装置において、

前記観察用光学系が照射する励起光の波長である励起波長と、前記観察用光学系が検出する蛍光の波長である観察波長との組み合わせを、互いに異なる少なくとも2種類の組み合わせの間で切り換える第2切換手段を更に備えた

ことを特徴とする蛍光顕微鏡装置。

10

20

**【請求項 3】**

請求項2に記載の蛍光顕微鏡装置において、  
前記観察用光学系の励起光路と観察光路との交差箇所には波長分離ミラーが配置され、  
前記第2切換手段は、  
前記交差箇所に配置される波長分離ミラーを、分離波長の異なる少なくとも2種類の波長分離ミラーの間で交換する  
ことを特徴とする蛍光顕微鏡装置。

**【請求項 4】**

請求項2又は請求項3に記載の蛍光顕微鏡装置において、  
前記第1切換手段は、  
前記第2切換手段に連動する  
ことを特徴とする蛍光顕微鏡装置。

10

**【請求項 5】**

請求項1～請求項4の何れか一項に記載の蛍光顕微鏡装置において、  
前記焦点検出波長の切り換え先である前記2種類の波長の一方は赤外域の波長であり、  
他方は可視光域の波長である  
ことを特徴とする蛍光顕微鏡装置。

**【請求項 6】**

対物レンズを介して標本へ焦点検出用の光を照射し、その標本で反射した前記光を前記対物レンズを介して検出する焦点検出用光学系と、  
前記焦点検出用光学系が照射する光の波長である焦点検出波長を、互いに異なる少なくとも2種類の波長の間で切り換える切換手段とを備え、  
前記標本の観察に供される観察用光学系の光路と前記焦点検出用光学系の光路との交差箇所には波長分離ミラーが配置され、  
前記切換手段は、  
前記交差箇所に配置される波長分離ミラーを、分離波長の互いに異なる少なくとも2種類の波長分離ミラーの間で交換する  
ことを特徴とする焦点検出装置。

20

**【請求項 7】**

請求項6に記載の焦点検出装置において、  
前記焦点検出波長の切り換え先である前記2種類の波長の一方は赤外域の波長であり、  
他方は可視光域の波長である  
ことを特徴とする焦点検出装置。

30

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、対物レンズの焦点検出機能を備えた蛍光顕微鏡装置、及び焦点検出装置に関する。

**【背景技術】****【0002】**

特許文献1には、生体顕微鏡に搭載されるスリット投影式の焦点検出装置が開示されている。スリット投影式の焦点検出装置は、特許文献1の図1に示すとおり、照明されたスリット(特許文献1の符号22)からの射出光を対物レンズ(特許文献1の符号12)の瞳の一部のみへ投光する。このとき標本(特許文献1の符号18)上にはスリット像が形成され、標本上で反射した光は対物レンズの瞳の他の一部を介してCCD(特許文献1の符号30)上にスリット像を形成する。この状態で対物レンズのデフォーカス量(対物レンズの焦点面と標本表面との位置関係)が変化すると、スリット像の形成位置がCCD上で移動する。よって、スリット投影式の焦点検出装置は、そのCCDの出力信号に応じてデフォーカス信号を生成する。

40

**【0003】**

50

このように、対物レンズを介して焦点検出用の光（AF光）を標本へ照射する焦点検出装置は、顕微鏡の中で観察像を生成するための光学系（観察用光学系）への影響を防ぐために、AF光の波長を観察光の波長域（可視光域）から外れた波長（例えば近赤外波長）に設定している。

【特許文献1】特開2004-70276号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、この焦点検出装置を使用して蛍光観察を行った場合、標本を染色した蛍光試薬の種類に依っては焦点検出精度が低下する可能性のあることが判明した。 10

【0005】

そこで本発明は、蛍光試薬の種類に依らずに高精度な焦点検出を行うことのできる蛍光顕微鏡装置、及びその蛍光顕微鏡装置に好適な焦点検出装置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】

本発明の蛍光顕微鏡装置は、対物レンズを介して標本へ励起光を照射し、その標本で発生した蛍光を前記対物レンズを介して検出する観察用光学系と、前記対物レンズを介して前記標本へ焦点検出用の光を照射し、その標本で反射した前記光を前記対物レンズを介して検出する焦点検出用光学系と、前記焦点検出用光学系が照射する光の波長である焦点検出波長を、互いに異なる少なくとも2種類の波長の間で切り換える第1切換手段と、を備えたことを特徴とする。 20

【0007】

なお、前記観察用光学系の光路と前記焦点検出用光学系の光路との交差箇所には波長分離ミラーが配置され、前記第1切換手段は、前記交差箇所に配置される波長分離ミラーを、分離波長の互いに異なる少なくとも2種類の波長分離ミラーの間で交換してもよい。

【0008】

また、本発明の蛍光顕微鏡装置は、前記観察用光学系が照射する励起光の波長である励起波長と、前記観察用光学系が検出する蛍光の波長である観察波長との組み合わせを、互いに異なる少なくとも2種類の組み合わせの間で切り換える第2切換手段を更に備えてよい。 30

【0009】

また、前記観察用光学系の励起光路と観察光路との交差箇所には波長分離ミラーが配置され、前記第2切換手段は、前記交差箇所に配置される波長分離ミラーを、分離波長の異なる少なくとも2種類の波長分離ミラーの間で交換してもよい。

【0010】

また、前記第1切換手段は、前記第2切換手段に連動してもよい。

【0011】

また、前記焦点検出波長の切り換え先である前記2種類の波長の一方は赤外域の波長であり、他方は可視光域の波長であってもよい。 40

【0012】

また、本発明の焦点検出装置は、対物レンズを介して標本へ焦点検出用の光を照射し、その標本で反射した前記光を前記対物レンズを介して検出する焦点検出用光学系と、前記焦点検出用光学系が照射する光の波長である焦点検出波長を、互いに異なる少なくとも2種類の波長の間で切り換える切換手段とを備えたことを特徴とする。

【0013】

なお、前記標本の観察に供される観察用光学系の光路と前記焦点検出用光学系の光路との交差箇所には波長分離ミラーが配置され、前記切換手段は、前記交差箇所に配置される波長分離ミラーを、分離波長の互いに異なる少なくとも2種類の波長分離ミラーの間で交換してもよい。

**【0014】**

また、前記焦点検出波長の切り換え先である前記2種類の波長の一方は赤外域の波長であり、他方は可視光域の波長であってもよい。

**【発明の効果】****【0015】**

本発明によれば、蛍光試料に使用された蛍光試薬の種類に依らずに高精度な焦点検出を行うことのできる蛍光顕微鏡装置、及びその蛍光顕微鏡装置に好適な焦点検出装置が実現する。

**【発明を実施するための最良の形態】****【0016】****[実施形態]**

以下、蛍光顕微鏡装置の実施形態を説明する。

**【0017】**

図1は、蛍光顕微鏡装置の構成図である。図1に示すとおり、蛍光顕微鏡装置には観察用光学系3と、焦点検出用光学系2と、第一対物レンズ12と、ステージ40と、入力部43と、駆動部108と、駆動部109と、駆動部202と、CPU41と、メモリ42とが備えられる。なお、第一対物レンズ12は、倍率の異なる複数種類の第一対物レンズの間で交換可能であってもよい。

**【0018】**

ステージ40上には被観察物0として、スライドガラス15及びカバーガラス14に挟まれた標本112が載置されている。標本112は、蛍光試薬A～Dの何れかで染色された生体試料を含む液体である。蛍光試薬A～Dの詳細は後述する。

**【0019】**

観察用光学系3には、観察用照明光学系102と、ホイール101と、観察用結像光学系38とが備えられる。

**【0020】**

ホイール101は、4つのホイール番地1～4を有しており、ホイール番地1～4には、ユーザの用意した互いに種類の異なる蛍光フィルタブロック104-1～104-4が個別に装填される。これら蛍光フィルタブロック104-1～104-4の詳細は後述する。

**【0021】**

ホイール101が駆動部108によって駆動されると、有効なホイール番地がホイール番地1～4の間で切り替わり、これによって観察用光学系3の光路に挿入される蛍光フィルタブロックが蛍光フィルタブロック104-1～104-4の間で切り替わる。

**【0022】**

蛍光フィルタブロック104-1～104-4の各々には、図1に示すとおりバリアフィルタ(BAフィルタ)106、励起フィルタ(EXフィルタ)107、ダイクロイックミラー100が設けられている。

**【0023】**

焦点検出用光学系2には、焦点検出用照明光学系5と、スライダー201と、焦点検出用結像光学系7とが備えられる。

**【0024】**

スライダー201は、2つのスライダー番地1、2を有しており、それらのスライダー番地1、2には、蛍光顕微鏡装置の製造者が用意した互いに種類の異なるAFフィルタブロック105-1、105-2が個別に装着されている。これらAFフィルタブロック105-1、105-2の詳細は後述する。

**【0025】**

スライダー201が駆動部109によって駆動されると、有効なスライダー番地がスライダー番地1、2の間で切り替わり、これによって焦点検出用光学系2の光路に挿入されるAFフィルタブロックがAFフィルタブロック105-1、105-2の間で切り替わ

10

20

30

40

50

る。

【0026】

A F フィルタブロック 105 - 1、105 - 2 の各々には、図 1 に示すとおり X フィルタ 110、Y フィルタ 111、ダイクロイックミラー 16 が設けられている。

【0027】

なお、図 1 に示した入力部 43 は、ユーザが蛍光顕微鏡装置へ各種の指示を入力するときに操作されるマウスやキーボードなどである。入力される指示の 1 つには、ホイール 101 の駆動指示がある。ホイール 101 の駆動指示が入力される際には、駆動先ホイール番地も一緒に入力される。

【0028】

また、入力部 43 は、ユーザが蛍光顕微鏡装置へ各種のデータを入力するときにも使用される。入力されるデータの 1 つには、ホイール 101 の登録データ、すなわちホイール番地 1 ~ 4 に装填された蛍光フィルタブロック 104 - 1 ~ 104 - 4 の特性データがある。図 1 に示した C P U 41 は、この入力部 43 から入力された指示やデータに応じて蛍光顕微鏡装置の各部を制御する。

【0029】

図 2 は、蛍光顕微鏡装置の光学系部分を詳しく示す図である。図 2 において図 1 に示す要素と同じ要素には同じ符号が付されている。ここでは、ホイール番地 1 及びスライダー番地 1 がそれぞれ有効である（つまり蛍光フィルタブロック 104 - 1 及び A F フィルタブロック 105 - 1 がそれぞれ光路に挿入されている）場合の光路を説明する。

【0030】

図 2 に示すとおり観察用光学系 3 には、少なくとも蛍光試薬 A ~ D の励起波長と同じ波長成分を含んだ光を射出する光源（例えば、水銀ランプ、白色レーザなど）102a と、コレクタレンズ 102b、102c と、蛍光フィルタブロック 104 - 1 と、第二対物レンズ 38a と、リレーレンズ 38b と、少なくとも 400 nm ~ 850 nm の波長域に感度を有する撮像素子 38c とが配置される。このうち光源 102a からコレクタレンズ 102c までの要素が観察用照明光学系 102 を構成し、第二対物レンズ 38a から撮像素子 38c までの要素が観察用結像光学系 38 を構成する。

【0031】

一方、焦点検出用光学系 2 には、少なくとも後述する 2 種類の A F 光と同じ波長成分を含んだ光を射出する光源（例えば、白色 LED など）5a と、コレクタレンズ 5b と、スリット板 5c と、コレクタレンズ 5d と、瞳制限マスク 5e と、ハーフミラー 5f と、A F フィルタブロック 105 - 1 と、第二対物レンズ 7a と、リレー用レンズ 7b と、瞳制限マスク 7c と、リレー用レンズ 7d と、シリンドリカルレンズ 7e と、少なくとも後述する 2 種類の A F 光の波長域に感度を有するラインセンサ 7d とが配置される。なお、ラインセンサの代わりに撮像素子が使用されてもよい。このうち光源 5a から瞳制限マスク 5e までの要素が焦点検出用照明光学系 5 を構成し、第二対物レンズ 7a からラインセンサ 7d までの要素が焦点検出用結像光学系 7 を構成する。

【0032】

観察用光学系 3 の光源 102a から射出した光は、コレクタレンズ 102b、102c を介して EX フィルタ 107 へ入射する。入射した光の一部の波長成分が EX フィルタ 107 を透過し、励起光としてダイクロイックミラー 100 へ入射する。その励起光は、ダイクロイックミラー 100 で反射した後に Y フィルタ 111 を透過し、ダイクロイックミラー 16 へ入射し、そのダイクロイックミラー 16 を透過する。その励起光は、第一対物レンズ 12 を介して被観察物 0 へ入射し、標本 112 に含まれる蛍光物質を励起する。標本 112 で発生した蛍光は、第一対物レンズ 12 を介してダイクロイックミラー 16 へ入射し、ダイクロイックミラー 16 を透過する。その蛍光は、Y フィルタ 111 を透過した後にダイクロイックミラー 100 へ入射し、ダイクロイックミラー 100 を透過する。その蛍光は、BA フィルタ 106 を透過し、第二対物レンズ 38a、リレーレンズ 38b を介して撮像素子 18c へ入射し、撮像素子 18c 上に標本 112 の蛍光像を形成する。

10

20

30

40

50

**【0033】**

撮像素子 18c の出力信号は、図 1 の C P U 4 1 経由で不図示のモニタへ出力される。ユーザは、そのモニタ上で標本 112 の蛍光像を観察することができる。

**【0034】**

一方、焦点検出用光学系 2 の光源 5a から射出した光は、コレクタレンズ 5b、スリット板 5c、コレクタレンズ 5d、瞳制限マスク 5e、ハーフミラー 5f を介して X フィルタ 110 へ入射する。入射した光の一部の波長成分が X フィルタ 110 を透過し、A F 光としてダイクロイックミラー 16 へ入射する。その A F 光は、ダイクロイックミラー 16 で反射し、第一対物レンズ 12 を介して被観察物 0 へ入射し、カバーガラス 14 の表面にスリット像を形成する。カバーガラス 14 の表面で反射した A F 光は、第一対物レンズ 12 を介してダイクロイックミラー 16 へ入射し、そのダイクロイックミラー 16 で反射する。その A F 光は、X フィルタ 110 を透過し、ハーフミラー 5f、第二対物レンズ 7a、リレー用レンズ 7b、瞳制限マスク 7c、リレー用レンズ 7d、シリンドリカルレンズ 7e を介してラインセンサ 7d へ入射し、ラインセンサ 7d 上にスリット板 5c のスリット像を形成する。10

**【0035】**

ここで、ラインセンサ 7d の長手方向とスリット像の長手方向とは交差しており、ラインセンサ 7d におけるスリット像の位置は、第一対物レンズ 12 のデフォーカス量（対物レンズの焦点面と標本表面との位置関係）に応じてラインセンサ 7d の長手方向へ移動する。20

**【0036】**

ラインセンサ 7d の出力信号は、不図示の信号処理回路によってデフォーカス信号に変換されてから図 1 の C P U 4 1 経由で駆動部 202 へ入力される。駆動部 202 は、そのデフォーカス信号に応じてステージ 40 を上下動させることにより、被観察物 0 に対する第一対物レンズ 12 の焦点調節を行う。

**【0037】**

図 3 は、ホイール番地 1 ~ 4 に装填された蛍光フィルタブロック 104 - 1 ~ 104 - 4 を詳しく説明する図である。蛍光フィルタブロック 104 - 1 は、蛍光試薬 A の使用時に使用される蛍光フィルタブロックであり、蛍光フィルタブロック 104 - 2 は、蛍光試薬 B の使用時に使用される蛍光フィルタブロックであり、蛍光フィルタブロック 104 - 3 は、蛍光試薬 C の使用時に使用される蛍光フィルタブロックであり、蛍光フィルタブロック 104 - 4 は、蛍光試薬 D の使用時に使用される蛍光フィルタブロックである。30

**【0038】**

図 4 は蛍光試薬 A の特性を示す図であり、図 5 は蛍光試薬 B の特性を示す図であり、図 6 は蛍光試薬 C の特性を示す図であり、図 7 は蛍光試薬 D の特性を示す図である。各図中、符号 S<sub>E</sub> で示すのは蛍光試薬の吸収スペクトルであり、符号 S<sub>F</sub> で示すのは蛍光試薬の発光スペクトルである。

**【0039】**

図 4（及び図 3）に示すとおり、蛍光試薬 A の励起波長（吸収スペクトル S<sub>E</sub> のピーク）は 489 nm、蛍光波長（発光スペクトル S<sub>F</sub> のピーク）は 508 nm である。40

**【0040】**

図 5（及び図 3）に示すとおり、蛍光試薬 B の励起波長（吸収スペクトル S<sub>E</sub> のピーク）は 514 nm、蛍光波長（発光スペクトル S<sub>F</sub> のピーク）は 527 nm である。

**【0041】**

図 6（及び図 3）に示すとおり、蛍光試薬 C の励起波長（吸収スペクトル S<sub>E</sub> のピーク）は 590 nm、蛍光波長（発光スペクトル S<sub>F</sub> のピーク）は 615 nm である。

**【0042】**

図 7（及び図 3）に示すとおり、蛍光試薬 D の励起波長（吸収スペクトル S<sub>E</sub> のピーク）は 735 nm、蛍光波長（発光スペクトル S<sub>F</sub> のピーク）は 779 nm である。

**【0043】**1020304050

これらの図4、図5、図6、図7を比較すると明らかなどおり、蛍光試薬A、B、Cの吸収スペクトル $S_E$ 及び発光スペクトル $S_F$ は可視光域内(700nm以下)に略収まっているのに対し、蛍光試薬Dの吸収スペクトル $S_E$ 及び発光スペクトル $S_F$ は可視光域内(700nm以下)に収まらず、近赤外域(700nm超)に及ぶ。従来の焦点検出装置において焦点検出精度が低下するのは、このような蛍光試薬Dを使用したときであった。

#### 【0044】

図8はホイール番地1に装填された蛍光フィルタブロック104-1の特性を示す図であり、図9はホイール番地2に装填された蛍光フィルタブロック104-2の特性を示す図であり、図10はホイール番地3に装填された蛍光フィルタブロック104-3の特性を示す図であり、図11はホイール番地4に装填された蛍光フィルタブロック104-4の特性を示す図である。各図中、符号EXで示すのがEXフィルタ107の分光透過特性であり、符号BAで示すのがBAフィルタ106の分光透過特性であり、符号DCで示すのがダイクロイックミラー100の分光透過特性である(ダイクロイックミラー100の分光透過特性において透過率がゼロである波長域は、反射波長域である。)。

10

#### 【0045】

なお、図8には蛍光試薬Aの吸収スペクトル $S_E$ 及び発光スペクトル $S_F$ を重畠表示し、図9には蛍光試薬Bの吸収スペクトル $S_E$ 及び発光スペクトル $S_F$ を重畠表示し、図10には蛍光試薬Cの吸収スペクトル $S_E$ 及び発光スペクトル $S_F$ を重畠表示し、図11には蛍光試薬Dの吸収スペクトル $S_E$ 及び発光スペクトル $S_F$ を重畠表示した。

20

#### 【0046】

図8(及び図3)から明らかなどおり、蛍光フィルタブロック104-1のEXフィルタ107は、蛍光試薬Aの吸収波長域の主要部に相当する波長域(460nm~500nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、蛍光フィルタブロック104-1のBAフィルタ106は、蛍光試薬Aの発光波長域の主要部に相当する波長域(510nm~560nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、蛍光フィルタブロック104-1のダイクロイックミラー100の分離波長は、蛍光試薬Aの吸収波長域の主要部と蛍光試薬Aの発光波長域の主要部との境界に相当する波長(505nm)に設定されている。

#### 【0047】

したがって、蛍光フィルタブロック104-1には、励起光の波長を蛍光試薬Aに適した波長に設定し、かつ被観察物0から観察用結像光学系38へ入射可能な光(観察光)の波長域を蛍光試薬Aに適した波長域に設定する機能がある。

30

#### 【0048】

また、図9(及び図3)から明らかなどおり、蛍光フィルタブロック104-2のEXフィルタ107は、蛍光試薬Bの吸収波長域の主要部に相当する波長域(490nm~510nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、蛍光フィルタブロック104-2のBAフィルタ106は、蛍光試薬Bの発光波長域の主要部に相当する波長域(520nm~560nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、蛍光フィルタブロック104-2のダイクロイックミラー100の分離波長は、蛍光試薬Bの吸収波長域の主要部と蛍光試薬Bの発光波長域の主要部との境界に相当する波長(515nm)に設定されている。

40

#### 【0049】

したがって、蛍光フィルタブロック104-2には、励起光の波長を蛍光試薬Bに適した波長に設定し、かつ被観察物0から観察用結像光学系38へ入射可能な光(観察光)の波長域を蛍光試薬Bに適した波長域に設定する機能がある。

#### 【0050】

また、図10(及び図3)から明らかなどおり、蛍光フィルタブロック104-3のEXフィルタ107は、蛍光試薬Cの吸収波長域の主要部に相当する波長域(520nm~560nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、蛍光フィルタブロック104-3のBAフィルタ106は、蛍光試薬Cの発光波長域の主要部に相当する波長域(600nm~660nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、蛍光フィルタブロック1

50

04-3のダイクロイックミラー100の分離波長は、蛍光試薬Cの吸収波長域の主要部と蛍光試薬Bの発光波長域の主要部との境界に相当する波長(595nm)に設定されている。

#### 【0051】

したがって、蛍光フィルタブロック104-3には、励起光の波長を蛍光試薬Cに適した波長に設定し、かつ被観察物0から観察用結像光学系38へ入射可能な光(観察光)の波長域を蛍光試薬Cに適した波長域に設定する機能がある。

#### 【0052】

また、図11(及び図3)から明らかなとおり、蛍光フィルタブロック104-4のEXフィルタ107は、蛍光試薬Dの吸収波長域の主要部に相当する波長域(670nm~750nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、蛍光フィルタブロック104-4のBAフィルタ106は、蛍光試薬Dの発光波長域の主要部に相当する波長域(770nm~850nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、蛍光フィルタブロック104-4のダイクロイックミラー100の分離波長は、蛍光試薬Dの吸収波長域の主要部と蛍光試薬Dの発光波長域の主要部との境界に相当する波長(750nm)に設定されている。

10

#### 【0053】

したがって、蛍光フィルタブロック104-4には、励起光の波長を蛍光試薬Dに適した波長に設定し、かつ被観察物0から観察用結像光学系38へ入射可能な光(観察光)の波長域を蛍光試薬Dに適した波長域に設定する機能がある。

20

#### 【0054】

図12は、スライダー番地1、2に装填されたAFフィルタブロック105-1、105-2を詳しく説明する図である。

#### 【0055】

図13は、AFフィルタブロック105-1の特性を示す図であり、図14は、AFフィルタブロック105-2の特性を示す図である。各図中、符号Yで示すのはYフィルタ111の分光透過特性であり、符号Xで示すのはXフィルタ110の分光透過特性であり、符号DCで示すのがダイクロイックミラー16の分光透過特性である(ダイクロイックミラー16の分光透過特性において透過率がゼロである波長域は、反射波長域である。)。

30

#### 【0056】

図13(及び図12)から明らかなとおり、AFフィルタブロック105-1のXフィルタ110は、近赤外域(730nm~770nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、AFフィルタブロック105-1のダイクロイックミラー16は、近赤外域(730nm~770nm)の光を反射し、それ以外の光を透過する機能がある。また、AFフィルタブロック105-1のYフィルタ111は、近赤外域よりも短い波長域(700nm以下)の光を選択的に透過する機能がある。

#### 【0057】

したがって、AFフィルタブロック105-1には、(1)AF光の波長を近赤外域に設定し、(2)AF光とは異なる波長の光が被観察物0から焦点検出用結像光学系7へ向かうのを防ぎ、(3)AF光が観察用光学系3へ入射するのを防ぎ、(4)AF光とは異なる波長の光が被観察物0と観察用光学系3との間で行き交うのを妨げない、という機能がある。このような特性のAFフィルタブロック105-1は、蛍光試薬A、B、Cの何れかと共に使用されるべきものである。

40

#### 【0058】

一方、図14(及び図12)から明らかなとおり、AFフィルタブロック105-2のXフィルタ110は、緑光域(520nm~560nm)の光を選択的に透過する機能がある。また、AFフィルタブロック105-2のダイクロイックミラー16は、緑光域(520nm~560nm)の光を反射し、それ以外の光を透過する機能がある。また、AFフィルタブロック105-2のYフィルタ111は、緑光域(520nm~560nm)

50

)以外の光を選択的に透過する機能がある。

#### 【0059】

したがって、AFフィルタブロック105-2には、(1)AF光の波長を緑光域に設定し、(2)AF光とは異なる波長の光が被観察物0から焦点検出用結像光学系7へ向かうのを防ぎ、(3)AF光が観察用光学系3へ入射するのを防ぎ、(4)AF光とは異なる波長の光が被観察物0と観察用光学系3との間で行き交うのを妨げない、という機能がある。このような特性のAFフィルタブロック105-2は、蛍光試薬Dと共に使用されるべきものである。

#### 【0060】

ここで仮に、蛍光試薬Dの使用時(つまり蛍光フィルタブロック104-4の使用時)にAFフィルタブロック105-1を使用してしまった場合は、蛍光フィルタブロック104-4によって設定される観察光の波長域(770nm~850nm)と、AFフィルタブロック105-1によって設定されるAF光の波長域(730nm~770nm)とが重複するので、AFフィルタブロック105-1は、観察光の一部(AF光と同じ波長の成分)がAF光と共に焦点検出用結像光学系7へ入射するのを防ぐことができない。この場合、ラインセンサ7d上に不要なスポット像(第一対物レンズ12のデフォーカス量に応じて移動しない不要なスポット像)が形成されてしまうので、ラインセンサ7上のスリット像の位置を高精度に検出することができなくなる。この問題は、従来の焦点検出装置では回避できなかった。

#### 【0061】

しかし、本実施形態の蛍光顕微鏡装置は、AFフィルタブロックをAFフィルタブロック105-1、105-2の間で切り替えることが可能なので、蛍光試薬A、B、C、Dの何れかが使用されるときにはAFフィルタブロック105-1を使用し、蛍光試薬Dが使用されるときにはAFフィルタブロック105-2を使用する、といった切り換え使用を行えば、観察光の波長域とAF光の波長域との重複を避けることができる、焦点検出精度の低下は生じない。

#### 【0062】

したがって、AFフィルタブロック105-1、105-2の切り換えさえ適切に行われば、蛍光試薬の種類に依らず常にピントの合った蛍光像が生成されることになる。

#### 【0063】

図15は、メモリ42が格納している登録テーブルの内容を示す図である。なお、登録テーブルは、入力部43を介してユーザが入力した登録データに基づきCPU41が予め作成したものである。

#### 【0064】

図15に示すとおり、登録テーブルには、ホイール番地1~4の波長特性を示す情報と、ホイール番地1~4の各々の適正スライダー番地を示す情報とが格納されている。

#### 【0065】

ホイール番地1の波長特性は、ホイール番地1に装填された蛍光フィルタブロック104-1のダイクロイックミラー100の分離波長であり、本実施形態では、その分離波長を505nmとしたのでメモリ42の記憶値は「505」となる。

#### 【0066】

ホイール番地2の波長特性は、ホイール番地2に装填された蛍光フィルタブロック104-2のダイクロイックミラー100の分離波長であり、本実施形態では、その分離波長を515nmとしたのでメモリ42の記憶値は「505」となる。

#### 【0067】

ホイール番地3の波長特性は、ホイール番地3に装填された蛍光フィルタブロック104-3のダイクロイックミラー100の分離波長であり、本実施形態では、その分離波長を595nmとしたのでメモリ42の記憶値は「595」となる。

#### 【0068】

ホイール番地4の波長特性は、ホイール番地4に装填された蛍光フィルタブロック10

10

20

30

40

50

4 - 4 のダイクロイックミラー 100 の分離波長であり、本実施形態では、その分離波長を 750 nm としたのでメモリ 42 の記憶値は「750」となる。

#### 【0069】

また、ホイール番地 1 の適正スライダー番地は、ホイール番地 1 が有効であるときに有効とすべきスライダー番地である。本実施形態では、ホイール番地 1 に装填されている蛍光フィルタブロック 104 - 1 は蛍光試薬 A の使用時に使用されるものであり、その蛍光試薬 A の使用時に使用される A F フィルタブロックは A F フィルタブロック 105 - 1 であり、その装着先はスライダー番地 1 である。よって、ホイール番地 1 の適正スライダー番地は「1」となる。

#### 【0070】

また、ホイール番地 2 の適正スライダー番地は、ホイール番地 2 が有効であるときに有効とすべきスライダー番地である。本実施形態では、ホイール番地 2 に装填されている蛍光フィルタブロック 104 - 2 は蛍光試薬 B の使用時に使用されるものであり、その蛍光試薬 B の使用時に使用される A F フィルタブロックは A F フィルタブロック 105 - 1 であり、その装着先はスライダー番地 1 である。よって、ホイール番地 2 の適正スライダー番地も「1」となる。

#### 【0071】

また、ホイール番地 3 の適正スライダー番地は、ホイール番地 3 が有効であるときに有効とすべきスライダー番地である。本実施形態では、ホイール番地 3 に装填されている蛍光フィルタブロック 104 - 3 は蛍光試薬 C の使用時に使用されるものであり、その蛍光試薬 C の使用時に使用される A F フィルタブロックは A F フィルタブロック 105 - 1 であり、その装着先はスライダー番地 1 である。よって、ホイール番地 3 の適正スライダー番地も「1」となる。

#### 【0072】

また、ホイール番地 4 の適正スライダー番地は、ホイール番地 4 が有効であるときに有効とすべきスライダー番地である。本実施形態では、ホイール番地 4 に装填されている蛍光フィルタブロック 104 - 4 は蛍光試薬 D の使用時に使用されるものであり、その蛍光試薬 D の使用時に使用される A F フィルタブロックは A F フィルタブロック 105 - 2 であり、その装着先はスライダー番地 2 である。よって、ホイール番地 4 の適正スライダー番地は「2」となる。

#### 【0073】

図 16 は、ホイール 101 の駆動に関する C P U 41 の動作フローチャートである。以下、各ステップを順に説明する。

#### 【0074】

ステップ S11 : C P U 41 は、ホイール 101 の駆動指示及び駆動先ホイール番地がユーザから入力されたか否かを判別する。ユーザは、蛍光試薬 A を使用するときには駆動先ホイール番地として「1」を入力し、蛍光試薬 B を使用するときには駆動先ホイール番地として「2」を入力し、蛍光試薬 C を使用するときには駆動先ホイール番地として「3」を入力し、蛍光試薬 D を使用するときには駆動先ホイール番地として「4」を入力する。C P U 41 は、駆動指示及び駆動ホイール番地が入力された場合にはステップ S12 へ移行し、入力されない場合には待機する。

#### 【0075】

ステップ S12 : C P U 41 は、現時点で有効なホイール番地（駆動元ホイール番地）を駆動部 108 経由でチェックし、メモリ 42 に格納された登録テーブル上で、その駆動元ホイール番地に対応付けられた適正スライダー番地（A）をチェックする。

#### 【0076】

ステップ S13 : C P U 41 は、メモリ 42 に格納された登録テーブル上で、ユーザの入力した駆動先ホイール番地に対応付けられた適正スライダー番地（B）をチェックする。

#### 【0077】

10

20

30

40

50

ステップS14：CPU41は、適正スライダー番地（A）と適正スライダー番地（B）とが同じであるか否かを判別し、同じである場合はステップS16へ移行し、異なる場合はステップS15へ移行する。

#### 【0078】

ステップS15：CPU41は、駆動部109へ指示を与えることによりスライダー201を駆動し、適正スライダー番地（B）を有効にしてからステップS16へ移行する。

#### 【0079】

ステップS16：CPU41は、駆動部108へ指示を与えることによりホイール101を駆動し、駆動先ホイール番地を有効とし、フローを終了する。

#### 【0080】

以上のフローによれば、蛍光フィルタブロック104-1～104-4の切り換えと、AFフィルタブロック105-1、105-2の切り換えとが連動する。具体的には、蛍光フィルタブロック104-1～104-3の何れかが光路に挿入されるときにはAFフィルタブロック105-1が自動的に光路に挿入され、蛍光フィルタブロック104-4が光路に挿入されるときにはAFフィルタブロック105-2が自動的に光路に挿入される。

#### 【0081】

したがって、蛍光顕微鏡装置のユーザは、蛍光フィルタブロック104-～104-4の切り換えさえ適切に行えば、蛍光試薬の種類に依らず常にピントの合った蛍光像を観察することができる。

#### 【0082】

図17は、登録テーブルの作成に関するCPU41の動作フローチャートである。以下、各ステップを順に説明する。

#### 【0083】

ステップS21：CPU41は、番地数*i*を初期値（1）に設定する。

#### 【0084】

ステップS22：CPU41は、ホイール番地*i*に装填された蛍光フィルタブロック104-*i*のダイクロイックミラー100の分離波長*L<sub>i</sub>*の数値をユーザに入力させる。なお、CPU41は、数値を入力させる代わりに蛍光フィルタブロックの種類を入力させ、その種類から分離波長を推定してもよい。

#### 【0085】

ステップS23：CPU41は、ホイール番地*i*が有効とされたときに設定される観察光の最長波長*L<sub>i</sub>*を、例えば*L = L<sub>i</sub> + 100 nm*の式により推定する。

#### 【0086】

ステップS24：CPU41は、推定された最長波長*L<sub>i</sub>*と、スライダー番地1が有効とされたときに設定されるAF光の最短波長*L<sub>AF</sub>*（本実施形態では730nm）とを比較し、前者の方が小さければステップS25へ移行し、後者の方が小さければステップS26へ移行する。

#### 【0087】

ステップS25：CPU41は、ホイール番地*i*の適正スライダー番地を「1」に設定し、ステップS27へ移行する。

#### 【0088】

ステップS26：CPU41は、ホイール番地*i*の適正スライダー番地を「2」に設定し、ステップS27へ移行する。

#### 【0089】

ステップS27：CPU41は、番地数*i*が最大値「4」に達したか否かを判別し、達していないければステップS28へ移行し、達していればフローを終了する。

#### 【0090】

ステップS28：CPU41は、番地数*i*を1だけインクリメントしてステップS22に戻る。

10

20

30

40

50

**【0091】**

以上のフローにおいて、番地数  $i$  が「1」であるときには分離波長  $L_i$  の数値として「505 nm」が入力されるので、観察光の最長波長  $L_i$  は「605 nm」と推定される。この場合、 $L_i < L_{AF}$  が成り立つので、適正スライダー番地は「1」となる。

**【0092】**

また、以上のフローにおいて、番地数  $i$  が「2」であるときには分離波長  $L_i$  の数値として「515 nm」が入力されるので、観察光の最長波長  $L_i$  は「615 nm」と推定される。この場合も、 $L_i < L_{AF}$  が成り立つので、適正スライダー番地は「1」となる。

**【0093】**

また、以上のフローにおいて、番地数  $i$  が「3」であるときには分離波長  $L_i$  の数値として「595 nm」が入力されるので、観察光の最長波長  $L_i$  は「695 nm」と推定される。この場合も、 $L_i < L_{AF}$  が成り立つので、適正スライダー番地は「1」となる。10

**【0094】**

また、以上のフローにおいて、番地数  $i$  が「4」であるときには分離波長  $L_i$  の数値として「750 nm」が入力されるので、観察光の最長波長  $L_i$  は「850 nm」と推定される。この場合は、 $L_i < L_{AF}$  が成り立たないので、適正スライダー番地は「1」ではなく「2」となる。つまり、図17のフローによれば、図15に示した登録テーブルが自動的に作成される。

**【0095】**

したがって、蛍光顕微鏡装置のユーザは、ホイール101に関する登録データの入力さえ適切に行えば、蛍光試薬の種類に依らず常にピントの合った蛍光像を観察することができる。20

**【0096】****[実施形態の補足]**

なお、上述した実施形態では、設定可能なAF光の波長を、近赤外光と緑光との組み合わせとしたが、近赤外光と他の可視光との組み合わせ、例えば、近赤外光と紫光との組み合わせ、近赤外光と青光との組み合わせ、近赤外光と橙光との組み合わせなどとしてもよい。但し、近赤外光に組み合わされる可視光は、近赤外光から或る程度離れた波長の光であることが望ましい。

**【0097】**

また、上述した実施形態では、設定可能なAF光の波長の一方を近赤外光としたが、設定可能なAF光の波長の双方を可視光としてもよい。但し、その場合も両者の波長は或る程度離れていることが望ましい。30

**【0098】**

また、上述した実施形態では、AF光の波長の切り換え数を2としたが、3以上としてもよい。

**【0099】**

また、上述した実施形態では、AF光の波長が切り換えられた場合に、信号処理回路による演算内容も切り換えられることが望ましい。AF光の波長が変化すると、デフォーカス量とスリット像の移動量との関係が若干変化するからである。40

**【0100】**

また、上述した実施形態の焦点検出用光学系は、被観察物0上へ投影するパターンがスリットであったが、スリット以外のパターンに代えてもよい。但し、その場合であっても、十字パターンのように位置の移動量が検出し易いパターンが選択されることが望ましい。

**【0101】**

また、上述した実施形態の焦点検出用光学系には、スリット投影方式が適用されたが、観察光とは異なる波長のAF光で焦点検出を行う他の方式が適用されてもよい。

**【0102】**

また、上述した実施形態では、AF光の波長の切り換えを1つの光源5aと複数のAF

50

フィルタブロックとの組み合わせにより行ったが、波長の異なる複数の単波長光源により行ってもよい。

#### 【0103】

但し、その場合であっても、AF光とは異なる波長の光が被観察物0から焦点検出用結像光学系7へ向かうのを防ぎ、かつAF光が観察用光学系3へ入射するのを防ぐために、複数のAFフィルタブロックを切り換え使用することが望ましい。

#### 【0104】

また、上述した実施形態では、蛍光フィルタブロックの切り換えと、AFフィルタブロックの切り換えとがそれぞれ電動で行われたが、その一方又は双方が手動で行われてもよい。なお、蛍光フィルタブロックの切り換えが手動で行われる場合であっても、その切り換えにAFフィルタブロックの切り換えを連動させてもよい。また、その連動は、電気的連動、機械的連動の何れが採用されてもよい。

#### 【0105】

また、上述した実施形態では、蛍光フィルタブロックの個数よりもAFフィルタブロックの個数の方が少なかったが、蛍光フィルタ毎にAFフィルタブロックを用意してもよい。その場合は、各蛍光フィルタを、それに適したAFフィルタブロックに予め固定しておくと共に、駆動部109を省略し、蛍光フィルタブロックとAFフィルタブロックとの双方を駆動部108と一緒に駆動するとよい。この場合、蛍光顕微鏡の構成をシンプルにすることができ、また連動に関するCPU41の処理(図16)を省略することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0106】

【図1】蛍光顕微鏡装置の構成図である。

【図2】蛍光顕微鏡装置の光学系部分を詳しく示す図である。

【図3】ホイール番地1～4に装填された4種類の蛍光フィルタブロック104-1～104-4を詳しく説明する図である。

【図4】蛍光試薬Aの特性を示す図である。

【図5】蛍光試薬Bの特性を示す図である。

【図6】蛍光試薬Cの特性を示す図である。

【図7】蛍光試薬Dの特性を示す図である。

【図8】蛍光フィルタブロック104-1の特性を示す図である。

【図9】蛍光フィルタブロック104-2の特性を示す図である。

【図10】蛍光フィルタブロック104-3の特性を示す図である。

【図11】蛍光フィルタブロック104-4の特性を示す図である。

【図12】スライダー番地1、2に装填されたAFフィルタブロック105-1、105-2を詳しく説明する図である。

【図13】AFフィルタブロック105-1の特性を示す図である。

【図14】AFフィルタブロック105-2の特性を示す図である。

【図15】メモリ42が格納している登録テーブルの内容を示す図である。

【図16】ホイール101の駆動に関するCPU41の動作フローチャートである。

【図17】登録テーブルの作成に関するCPU41の動作フローチャートである。

#### 【符号の説明】

#### 【0107】

2...焦点検出用光学系、3...観察用光学系、5...焦点検出用照明光学系、7...焦点検出用結像光学系、102...観察用照明光学系、38...観察用結像光学系、12...第1対物レンズ、40...ステージ、0...被観察物、15...スライドガラス、14...カバーガラス、112...標本、101...ホイール、104...蛍光フィルタブロック、201...スライダー、105...AFフィルタブロック、106...バリアフィルタ(BAフィルタ)、107...励起フィルタ(EXフィルタ)、100...ダイクロイックミラー、110...Xフィルタ、111...Yフィルタ、16...ダイクロイックミラー

10

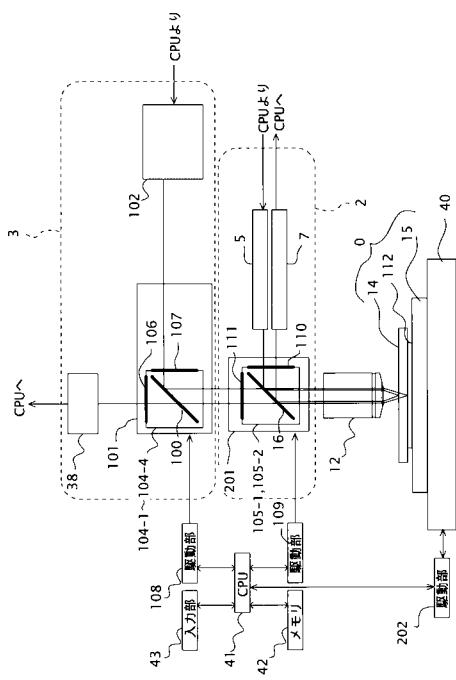
20

30

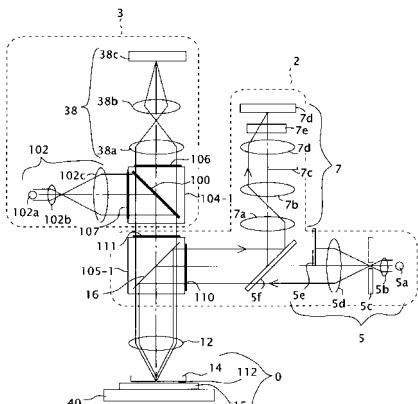
40

50

【図1】



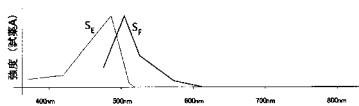
【図2】



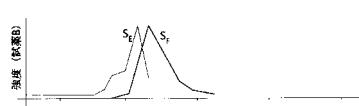
【図3】

蛍光試薬		蛍光2 (EX=510nm) 104	
名前	吸収波長	蛍光波長	備考
A	489nm	569nm	480~500nm 透過 505nm 以上透過 510~560nm 透過
B	514nm	527nm	2 490~510nm 透過 515nm 以上透過 520~560nm 透過
C	590nm	618nm	3 520~560nm 透過 595nm 以上透過 600~660nm 透過
D	735nm	779nm	4 670~750nm 透過 750nm 以上透過 770~850nm 透過

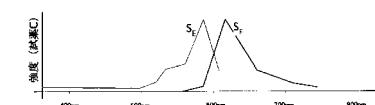
【図4】



【図5】



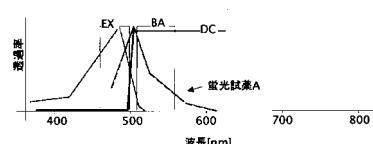
【図6】



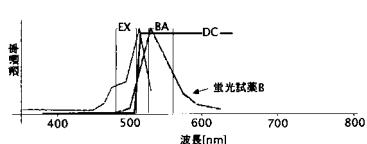
【図7】



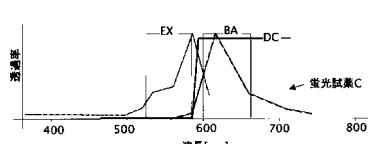
【図8】



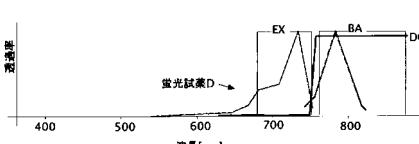
【図9】



【図10】



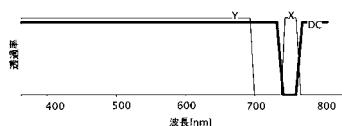
【図11】



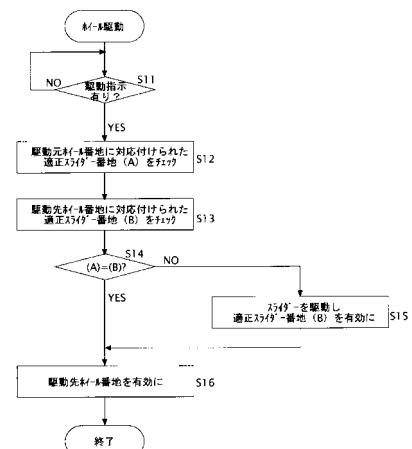
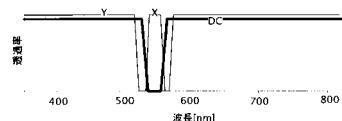
【図12】

AF74679 077405		
レジスト番地	X (レジスト番地) 110	Y (レジスト番地) 16
1	730~770nm 透過	730nm~770nm 透過
2	520~560nm 透過	520nm~660nm 透過

【図13】



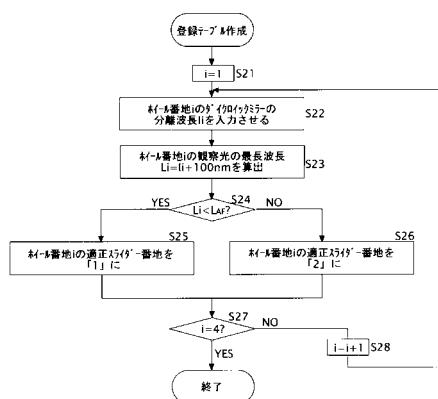
【図14】



【図15】

登録データ		
レジスト番地	波長範囲	記入用紙番号
1	505nm以上透過	100
2	510nm以上透過	505
3	585nm以上透過	515
4	750nm以上透過	595
		750

【図17】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2005-062515(JP,A)  
特開平08-240765(JP,A)  
特開2007-101494(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 02 B 21 / 16  
G 02 B 7 / 28  
G 02 B 21 / 00