

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4804726号
(P4804726)

(45) 発行日 平成23年11月2日 (2011. 11. 2)

(24) 登録日 平成23年8月19日 (2011. 8. 19)

(51) Int. Cl.

F 1

G O 2 B 21/06 (2006. 01)

G O 2 B 21/06

G O 1 N 21/64 (2006. 01)

G O 1 N 21/64

E

請求項の数 9 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2004-178253 (P2004-178253)
 (22) 出願日 平成16年6月16日 (2004. 6. 16)
 (65) 公開番号 特開2006-3521 (P2006-3521A)
 (43) 公開日 平成18年1月5日 (2006. 1. 5)
 審査請求日 平成19年6月14日 (2007. 6. 14)

(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 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74) 代理人 100084618
 弁理士 村松 貞男
 (74) 代理人 100100952
 弁理士 風間 鉄也
 (72) 発明者 鶴田 博士
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ
 リンパス株式会社内
 (72) 発明者 中田 竜男
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ
 リンパス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 走査型光学観察装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 光子励起波長の観察用励起レーザ光を発生する第1のレーザ光源と、
 多光子励起波長の観察用励起レーザ光を発生する第2のレーザ光源と、
 これら第1および第2のレーザ光源からの観察用励起レーザ光の光路を合成する第1の
 光学素子と、

前記第1の光学素子で合成された光路の観察用励起レーザ光を標本上で2次元走査する
 第1の走査手段と、

多光子励起波長の刺激用レーザ光を発生する第3のレーザ光源と、

前記刺激用レーザ光を標本上で2次元走査する第2の走査手段と、

前記第1および第2の走査手段からの光路の交差位置に配置され、これら第1および第
 2の走査手段からのレーザ光の光路を合成する第2の光学素子と

を具備し、

前記第1の光学素子は、前記第1のレーザ光源からの観察用レーザ光の波長と前記第2
 のレーザ光源からの観察用励起レーザ光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性で
 あり、

前記第2の光学素子は、前記第1及び第2のレーザ光源からのそれぞれの観察用励起レ
 ーザ光の波長と前記第3のレーザ光源からの刺激用レーザ光の波長の一方を反射し他方を
 透過する波長特性であり、

さらに共焦点ピンホールを有する第1の蛍光検出手段を前記第1の走査手段と前記第1

10

20

の光学素子との間で分岐された光路上に備え、

前記第2の光学素子は、さらに前記第1のレーザ光源の1光子励起波長または前記第2のレーザ光源の多光子励起波長のそれぞれの観察用励起レーザ光により励起され前記標本より発せられる蛍光波長を前記第1の走査手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有し

、

さらに共焦点ピンホールを有しない第2の蛍光検出手段と、

前記第2の光学素子から前記標本までの光路に挿脱可能に配置され、第2のレーザ光源からの観察用励起レーザ光により多光子励起され前記標本より発せられる蛍光波長を前記第2の蛍光検出手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有する第3の光学素子と

を具備し、

前記第3の光学素子は、前記第2及び第3のレーザ光源からのそれぞれのレーザ光の波長を前記標本へ向けて反射又は透過し、前記多光子励起された蛍光の波長を前記第2の蛍光検出手段へ向けて透過又は反射する波長特性であることを特徴とする走査型光学観察装置。

【請求項2】

1光子励起波長の観察用励起レーザ光を発生する第1のレーザ光源と、

多光子励起波長の観察用励起レーザ光を発生する第2のレーザ光源と、

これら第1および第2のレーザ光源からの観察用励起レーザ光の光路を合成する第1の光学素子と、

前記第1の光学素子で合成された光路の観察用励起レーザ光を標本上で2次元走査する第1の走査手段と、

多光子励起波長の刺激用レーザ光を発生する第3のレーザ光源と、

前記刺激用レーザ光を標本上で2次元走査する第2の走査手段と、

前記第1および第2の走査手段からの光路の交差位置に配置され、これら第1および第2の走査手段からのレーザ光の光路を合成する第2の光学素子と

を具備し、

前記第1の光学素子は、前記第1のレーザ光源からの観察用レーザ光の波長と前記第2のレーザ光源からの観察用励起レーザ光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性であり、

前記第2の光学素子は、前記第1及び第2のレーザ光源からのそれぞれの観察用励起レーザ光の波長と前記第3のレーザ光源からの刺激用レーザ光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性であり、

さらに共焦点ピンホールを有する第1の蛍光検出手段を前記第1の走査手段と前記第1の光学素子との間で分岐された光路上に備え、

前記第2の光学素子は、さらに前記第1のレーザ光源の1光子励起波長または前記第2のレーザ光源の多光子励起波長のそれぞれの観察用励起レーザ光により励起され前記標本より発せられる蛍光波長を前記第1の走査手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有し

、

さらに共焦点ピンホールを有しない第2の蛍光検出手段と、

前記第2の光学素子から前記標本までの光路に挿脱可能に配置され、第2のレーザ光源からの観察用励起レーザ光により多光子励起され前記標本より発せられる蛍光波長を前記第2の蛍光検出手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有する第3の光学素子と

を具備し、

前記標本は、前記多光子励起された蛍光として互いに波長の異なる第1蛍光と第2蛍光を発し、

前記第3の光学素子は、前記第2及び第3のレーザ光源からのそれぞれのレーザ光の波長を前記標本へ向けて反射又は透過するとともに、前記第1蛍光及び前記第2蛍光の一方の蛍光を前記第2の蛍光検出手段へ向けて透過又は反射し、他方の蛍光を前記第2の光学素子へ向けて反射又は透過する波長特性であることを特徴とする走査型光学観察装置。

【請求項3】

前記第 1、第 2、第 3 レーザ光源からのそれぞれのレーザー光の波長を λ_1 、 λ_2 、 λ_3 とし、前記標本から発生する蛍光の波長を λ_f とするとき、

$\lambda_1 < \lambda_3 < \lambda_2$ かつ $\lambda_f < \lambda_3$ であり、

前記第 2 の光学素子は前記 λ_3 の波長とそれ以外の前記 λ_1 、 λ_2 及び λ_f の波長の一方を反射し他方を透過する特性であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の走査型光学観察装置。

【請求項 4】

1 光子励起波長の観察用励起レーザー光を発生する第 1 のレーザー光源と、
多光子励起波長の観察用励起レーザー光を発生する第 2 のレーザー光源と、
これら第 1 および第 2 のレーザー光源からの観察用励起レーザー光の光路を合成する第 1 の光学素子と、

前記第 1 の光学素子で合成された光路の観察用励起レーザー光を標本上で 2 次元走査する第 1 の走査手段と、

多光子励起波長の刺激用レーザー光を発生する第 3 のレーザー光源と、

前記刺激用レーザー光を標本上で 2 次元走査する第 2 の走査手段と、

前記第 1 および第 2 の走査手段からの光路の交差位置に配置され、これら第 1 および第 2 の走査手段からのレーザー光の光路を合成する第 2 の光学素子と

を具備し、

前記第 1 の光学素子は、前記第 1 のレーザー光源からの観察用レーザー光の波長と前記第 2 のレーザー光源からの観察用励起レーザー光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性であり、

前記第 2 の光学素子は、前記第 1 及び第 2 のレーザー光源からのそれぞれの観察用励起レーザー光の波長と前記第 3 のレーザー光源からの刺激用レーザー光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性であり、

さらに共焦点ピンホールを有する第 1 の蛍光検出手段を前記第 1 の走査手段と前記第 1 の光学素子との間で分岐された光路上に備え、

前記第 2 の光学素子は、さらに前記第 1 のレーザー光源の 1 光子励起波長または前記第 2 のレーザー光源の多光子励起波長のそれぞれの観察用励起レーザー光により励起され前記標本より発せられる蛍光波長を前記第 1 の走査手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有し

、
さらに共焦点ピンホールを有しない第 2 の蛍光検出手段と、

前記第 1 の走査手段から前記第 2 の光学素子までの光路に挿脱可能に配置され、第 2 のレーザー光源からの観察用励起レーザー光により多光子励起され前記標本より発せられる蛍光波長を前記第 2 の蛍光検出手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有する第 3 の光学素子と

を具備し、

前記第 3 の光学素子は、前記第 2 のレーザー光源からのレーザー光の波長を前記標本へ向けて反射又は透過し、前記多光子励起された蛍光の波長を前記第 2 の検出手段へ向けて透過又は反射する波長特性であることを特徴とする走査型光学観察装置。

【請求項 5】

前記第 1、第 2、第 3 レーザ光源からのそれぞれのレーザー光の波長を λ_1 、 λ_2 、 λ_3 とし、前記標本から発生する蛍光の波長を λ_f とするとき、

$\lambda_1 < \lambda_3 < \lambda_2$ かつ $\lambda_f < \lambda_3$ であり、

前記第 2 の光学素子は前記 λ_3 の波長とそれ以外の前記 λ_1 、 λ_2 及び λ_f の波長の一方を反射し他方を透過する特性であることを特徴とする請求項 4 記載の走査型光学観察装置。

【請求項 6】

1 光子励起波長の観察用励起レーザー光を発生する第 1 のレーザー光源と、

多光子励起波長の観察用励起レーザー光を発生する第 2 のレーザー光源と、

これら第 1 および第 2 のレーザー光源からの観察用励起レーザー光の光路を合成する第 1 の

光学素子と、

前記第 1 の光学素子で合成された光路の観察用励起レーザ光を標本上で 2 次元走査する第 1 の走査手段と、

多光子励起波長の刺激用レーザ光を発生する第 3 のレーザ光源と、

前記刺激用レーザ光を標本上で 2 次元走査する第 2 の走査手段と、

前記第 1 および第 2 の走査手段からの光路の交差位置に配置され、これら第 1 および第 2 の走査手段からのレーザ光の光路を合成する第 2 の光学素子と

を具備し、

前記第 1 の光学素子は、前記第 1 のレーザ光源からの観察用レーザ光の波長と前記第 2 のレーザ光源からの観察用励起レーザ光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性であり、

10

前記第 2 の光学素子は、前記第 1 及び第 2 のレーザ光源からのそれぞれの観察用励起レーザ光の波長と前記第 3 のレーザ光源からの刺激用レーザ光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性であり、

前記第 3 のレーザ光源からの多光子励起波長の刺激用レーザ光を多光子励起波長の観察用励起レーザ光として使用可能にしたことを特徴とする走査型光学観察装置。

【請求項 7】

共焦点ピンホールを有しない蛍光検出手段と、

前記第 1 の走査手段から前記標本までの間の光路に配置されて前記第 3 の光源からのレーザ光を前記標本に照射することにより発する蛍光を前記蛍光検出手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有する第 3 の光学素子と

20

を具備することを特徴とする請求項 6 記載の走査型光学観察装置。

【請求項 8】

前記第 3 の光学素子は、前記第 1 のレーザ光源からのレーザ光を標本に照射する場合には光路から退避することを特徴とする請求項 1、2 及び 4 のいずれかひとつに記載の走査型光学観察装置。

【請求項 9】

前記第 1 乃至第 3 の光学素子は、ダイクロイックミラーであることを特徴とする請求項 1、2、4 及び 6 のいずれかに記載の走査型光学観察装置。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、標本を励起してその反応光を観察するための観察用レーザ光を発生する励起光源と標本に刺激を与えるための刺激用レーザ光源を備えた走査型光学観察装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、走査型光学観察装置として、特許文献 1 に開示されるように、蛍光観察を行なうための観察用励起レーザ光を試料上の光軸に垂直な面内で走査させるための観察用励起レーザ光走査手段と、試料に刺激を与えるための刺激用レーザ光を試料平面の任意の位置に照射するための刺激用レーザ光走査手段の 2 組の光走査手段を有する走査型レーザ顕微鏡が知られている。

40

【0003】

ところで、このような走査型レーザ顕微鏡では、蛍光観察に用いられる C a g e d 手法などに有効とされる刺激用レーザとして、1 光子励起波長の刺激用レーザが用いられることがあるが、かかる 1 光子励起波長の刺激用レーザは、標本上で刺激を与えたい位置以外にも光が通過して刺激を与えてしまうことがある。このため、最近になって、散乱が多い厚い標本を使った光刺激を行う蛍光観察においては、標本の集光面のみでしか 2 光子励起が発生しないことで標本の正確な点のみに刺激を与えることが可能な 2 光子励起波長の赤外パルスレーザを発生する刺激用レーザ光源が用いられている。

50

【 0 0 0 4 】

また、蛍光観察を行なうための観察用励起レーザについても、標本への光による障害を抑えて標本深部の観察ができるなどの利点から、2光子励起波長を発生させる赤外パルスレーザを使用し、近赤外波長で紫外光励起用の蛍光試薬を励起させて蛍光を発生させるようにした励起用レーザ光源も用いられている。また、一方で、蛍光観察においては、効率の良くない2光子励起より、S/Nの良い画像が取得可能な、1光子励起による蛍光観察も必要とされている。

【特許文献1】特開平10-206742号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【 0 0 0 5 】

しかし、特許文献1に開示された走査型レーザ顕微鏡は、1種類の観察用励起レーザ光源や刺激用レーザ光源を組み合わせ使用して蛍光観察を行なうもので、上述したように2光子励起による光刺激の他に、1光子励起による蛍光観察や2光子励起による蛍光観察などの多様化された観察方法を採用しようとする、観察用励起レーザ波長に対応した複数の光学素子として、例えば波長分離用ダイクロイックミラーを用意し、観察方法に応じて、これらダイクロイックミラーを最適なものに切換え、または交換するなどの必要が生じる。

【 0 0 0 6 】

ところが、これら光学素子は、光路への切換え、または、交換の際に、反射角度や折返し位置の固体差により、光軸がずれることがある。このことは、光学素子を最適なものに取り換えたことによる刺激用レーザ光と観察用励起レーザ光の光路のずれにより、刺激用レーザ走査手段と観察用励起レーザ走査手段によるレーザ走査位置にもずれを生じることになる。この結果、試料内で狙った位置（ポイントまたは領域）に正確に刺激レーザ光を照射できなくなってしまうという問題を生じる。

20

【 0 0 0 7 】

本発明は上記事情に鑑みてなされたもので、レーザ光源を切換えても標本内の目的とする位置に、それぞれのレーザ光を位置ずれを生じることなく正確に照射できる走査型光学観察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】

30

【 0 0 0 8 】

請求項1記載の発明は、1光子励起波長の観察用励起レーザ光を発生する第1のレーザ光源と、多光子励起波長の観察用励起レーザ光を発生する第2のレーザ光源と、これら第1および第2のレーザ光源からの観察用励起レーザ光の光路を合成する第1の光学素子と、前記第1の光学素子で合成された光路の観察用励起レーザ光を標本上で2次元走査する第1の走査手段と、多光子励起波長の刺激用レーザ光を発生する第3のレーザ光源と、前記刺激用レーザ光を標本上で2次元走査する第2の走査手段と、前記第1および第2の走査手段からの光路の交差位置に配置され、これら第1および第2の走査手段からのレーザ光の光路を合成する第2の光学素子とを具備し、前記第1の光学素子は、前記第1のレーザ光源からの観察用レーザ光の波長と前記第2のレーザ光源からの観察用励起レーザ光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性であり、前記第2の光学素子は、前記第1及び第2のレーザ光源からのそれぞれの観察用励起レーザ光の波長と前記第3のレーザ光源からの刺激用レーザ光の波長の一方を反射し他方を透過する波長特性であり、さらに共焦点ピンホールを有する第1の蛍光検出手段を前記第1の走査手段と前記第1の光学素子との間で分岐された光路上に備え、前記第2の光学素子は、さらに前記第1のレーザ光源の1光子励起波長または前記第2のレーザ光源の多光子励起波長のそれぞれの観察用励起レーザ光により励起され前記標本より発せられる蛍光波長を前記第1の走査手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有し、さらに共焦点ピンホールを有しない第2の蛍光検出手段と、前記第2の光学素子から前記標本までの光路に挿脱可能に配置され、第2のレーザ光源からの観察用励起レーザ光により多光子励起され前記標本より発せられる蛍光波長を前

40

50

記第 2 の蛍光検出手段へ向けて反射又は透過する波長特性を有する第 3 の光学素子とを具備し、前記第 3 の光学素子は、前記第 2 及び第 3 のレーザ光源からのそれぞれのレーザ光の波長を前記標本へ向けて反射又は透過し、前記多光子励起された蛍光の波長を前記第 2 の蛍光検出手段へ向けて透過又は反射する波長特性であることを特徴としている。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、各種のレーザ光源を切換えても標本内の目的とする位置に、それぞれのレーザ光を位置ずれを生じることなく正確に照射できる走査型光学観察装置を提供できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明の実施の形態を図面に従い説明する。

【0016】

(第 1 の実施の形態)

図 1 は、本発明の第 1 の実施の形態の走査型光学観察装置における走査型レーザ顕微鏡の概略構成を示している。

【0017】

図において、1 は第 1 のレーザ光源として、1 光子励起波長の観察用励起レーザ光を発生する観察用可視レーザユニットで、この観察用可視レーザユニット 1 は、可視レーザコンバイナを構成するもので、レーザ光源として 488 nm の波長のレーザ光を発振するアルゴンレーザ 2 と、633 nm の波長のレーザ光を発振するヘリウムネオンレーザ 3 を有している。ヘリウムネオンレーザ 3 からのレーザ光の光路上には、反射ミラー 4 が配置されている。また、アルゴンレーザ 2 からのレーザ光の光路上には、反射ミラー 4 で反射されるレーザ光との交点上にダイクロイックミラー 5 が配置されている。ダイクロイックミラー 5 は、これら 2 つのレーザ光路を合成するもので、アルゴンレーザ 2 からのレーザ光を透過し、反射ミラー 4 で反射されるレーザ光を反射するようになっている。また、ダイクロイックミラー 5 により合成されたレーザ光の光路上には、レーザラインフィルタ 6 が配置されている。このレーザラインフィルタ 6 は、アルゴンレーザ 2 から発せられる 488 nm のレーザ波長とヘリウムネオンレーザ 3 から発せられる 633 nm のレーザ光を選択可能にしている。

【0018】

一方、7 は第 2 のレーザ光源として、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光を発生する観察用赤外レーザユニットで、この観察用赤外レーザユニット 7 は、赤外パルスレーザを有し、820 nm ~ 1000 nm までのレーザ光を選択的に出力可能になっている。

【0019】

観察用赤外レーザユニット 7 からのレーザ光の光路上には、反射ミラー 8 が配置されている。また、観察用可視レーザユニット 1 からのレーザ光の光路上には、反射ミラー 8 で反射されるレーザ光との交点上に第 1 の光学素子としてダイクロイックミラー 9 が配置されている。ダイクロイックミラー 9 は、これら 2 つのレーザ光路を合成するもので、反射ミラー 8 で反射される観察用赤外レーザユニット 7 からの 2 光子励起波長のレーザ光を透過し、観察用可視レーザユニット 1 からの 1 光子励起波長のレーザ光を反射するような特性を有し、これらレーザ光を合成して同軸に導くようにしている。

【0020】

ダイクロイックミラー 9 により出射されたレーザ光の光路上には、ダイクロイックミラー 10 が配置されている。ダイクロイックミラー 10 は、ダイクロイックミラー 9 からのレーザ光を反射し、後述する標本 23 から発せられる蛍光（検出光）を透過するようになっている。

【0021】

ダイクロイックミラー 10 の反射光路には、第 1 の走査手段として、観察用励起レーザ光走査手段 11 が配置されている。この観察用励起レーザ光走査手段 11 は、直交する 2

10

20

30

40

50

方向に光を偏向するための２枚のミラー１１ａ、１１ｂを有し、これらのミラー１１ａ、１１ｂにより標本２３上の観察用励起レーザ光を２次元方向に走査するようになっている。

【００２２】

また、ダイクロイックミラー１０の検出光（蛍光）の透過光路には、第１の光検出手段を構成する共焦点レンズ１２、共焦点ピンホール１３および内部蛍光検出器１４が配置されている。この場合、第１の光検出手段では、１光子励起による蛍光観察を行う場合は、共焦点ピンホール１３を絞って内部蛍光検出器１４により蛍光検出を行ない、２光子励起による蛍光観察を行う場合は、散乱光をより多く拾うため、共焦点ピンホール１３を開放して、内部蛍光検出器１４により蛍光検出を行なうようになっている。

10

【００２３】

一方、１５は、第３のレーザ光源としての刺激用レーザユニットで、この刺激用レーザユニット１５は、赤外パルスレーザを有し、標本２３の特定部位に２光子励起による化学反応（ケージド試薬の解除）を与えるための７２０ｎｍの２光子励起波長の刺激用レーザ光が出力可能になっている。刺激用レーザユニット１５からの刺激用レーザ光の光路には、反射ミラー１６を介して第２の走査手段としての刺激用レーザ光走査手段１７が配置されている。この刺激用レーザ光走査手段１７は、刺激用レーザ光を標本２３上の任意領域に２次元走査することや、標本２３上の任意のポイントで固定照射することを可能としたもので、２枚のミラー１７ａ、１７ｂで構成されている。これらのミラー１７ａ、１７ｂは、刺激用レーザ光を２次元方向に走査するようになっている。

20

【００２４】

刺激用レーザ光走査手段１７から出射される刺激用レーザ光の光路上には、観察用励起レーザ光走査手段１１から出射されるレーザ光の光路との交点上に第２の光学素子としてダイクロイックミラー１８が配置されている。このダイクロイックミラー１８は、観察用励起レーザ光走査手段１１からのレーザ光を透過し、刺激用レーザ光走査手段１７からの刺激用レーザ光を反射するような特性を有するものである。具体的には、図２に示すように観察用可視レーザユニット１から出射される４８８ｎｍおよび６３３ｎｍの波長、これら４８８ｎｍ、６３３ｎｍの励起波長により標本２３より発せられる１光子励起蛍光の波長を含む可視波長（４５０～６７０ｎｍ）および観察用赤外レーザユニット７から出射される８２０ｎｍ～１０００ｎｍまでの２光子励起波長を透過し、刺激用レーザユニット１

30

【００２５】

ダイクロイックミラー１８により出射されたレーザ光の光路上には、光学素子切換え手段としてターレット１９が配置されている。このターレット１９は、第３の光学素子としてのダイクロイックミラー２０と反射ミラー２１を有し、不図示の電動機構によりダイクロイックミラー２０または反射ミラー２１を選択的に光路上に挿入するようになっている。この場合、ダイクロイックミラー２０は、図３に示すように観察用赤外レーザユニット７から出射される８２０ｎｍ～１０００ｎｍまでの２光子励起波長と刺激用レーザユニット１５から出射される７２０ｎｍの２光子励起波長を反射し、これら観察用赤外レーザユニット７および刺激用レーザユニット１５の２光子励起波長により標本２３より発せられる

40

【００２６】

ダイクロイックミラー２０（または反射ミラー２１）の反射光路には、観察用励起レーザ光または刺激用レーザ光の走査光学系を構成する対物レンズ２２が配置されている。この場合、観察用励起レーザ光走査手段１１から出射される観察用励起レーザ光は、ダイクロイックミラー２０（または反射ミラー２１）で反射し、対物レンズ２２を介して不図示のステージに載置された標本２３の焦点位置に結像される。また、標本２３から発生された蛍光（検出光）は、ダイクロイックミラー２０（または反射ミラー２１）まで戻るようになっている。また、刺激用レーザ光走査手段１７から出射される刺激用レーザ光は、ダ

50

イクロイックミラー 20 (または反射ミラー 21) で反射し、標本 23 上の任意領域で 2 次元走査されたり、任意のポイントで固定照射されるようになっている。

【0027】

この場合、標本 23 には、蛍光指示薬として、例えばカルシウムイオン指示薬の f l u o - 3 が使用されている。

【0028】

ダイクロイックミラー 20 の透過光路には、第 2 の光検出手段としての外部蛍光検出器 24 が配置されている。この第 2 の光検出手段は、例えば、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光により、散乱光が多い厚い標本 23 をより明るく観察したいような場合、標本 23 より発せられる蛍光 (検出光) を複数のミラーやレンズなどの光学素子を經由せると損失が大きく極めて微弱なものになってしまうため、ダイクロイックミラー 20 のみを経由して外部蛍光検出器 24 により蛍光検出を行なうようにしている。

10

【0029】

なお、第 2 の光検出手段としての外部蛍光検出器 24 と標本 23 の間の光路には走査手段がないので、第 2 の光検出手段にピンホールを設けることはできないが、2 光子 (多光子) 励起による蛍光を検出する場合には、2 光子 (多光子) 励起現象が生じる領域がレーザ光の集光位置の極近傍だけであることからピンホールがなくても光学的スライス像を取得することができる。

【0030】

次に、このように構成した第 1 の実施の形態の作用を説明する。

20

【0031】

まず、1 光子励起光を使用して内部蛍光検出器 14 で蛍光検出を行なう場合を説明する。

【0032】

この場合、不図示の電動機構によりターレット 19 を駆動し、反射ミラー 21 を光路上に位置させる。

【0033】

この状態で、観察用可視レーザユニット 1 のアルゴンレーザ 2 から 488 nm の波長のレーザ光とヘリウムネオンレーザ 3 から 633 nm の波長のレーザ光が発せられると、このうち 488 nm のレーザ波長がレーザラインフィルタ 6 により選択される。この 488 nm のレーザ波長は、観察用励起レーザ光として、ダイクロイックミラー 9 で反射し、さらにダイクロイックミラー 10 で反射し、観察用励起レーザ光走査手段 11 に入射し、2 次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー 18 を透過し、反射ミラー 21 で反射して対物レンズ 22 に入射し、標本 23 に集光される。

30

【0034】

標本 23 に観察用励起レーザ光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発せられる。ここでは、蛍光指示薬としてカルシウムイオン指示薬の f l u o - 3 が使われているので、レーザー波長 488 nm により蛍光波長 530 nm の蛍光を発する。

【0035】

標本 23 からの波長 530 nm の蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ 22 を透過し、反射ミラー 21 で反射され、ダイクロイックミラー 18 を透過し、観察用励起レーザ光走査手段 11、ダイクロイックミラー 10 を透過し、共焦点レンズ 12 を介して共焦点ピンホール 13 面に結像される。この場合、共焦点ピンホール 13 は、共焦点効果を得るため、回折径程度に絞られている。共焦点ピンホール 13 を通過した蛍光は、内部蛍光検出器 14 で検出され電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピューターにより処理され、画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。

40

【0036】

次に、刺激用レーザユニット 15 より 720 nm の波長の刺激用レーザ光を発生すると、刺激用レーザ光は、刺激用レーザ光走査手段 17 を介してダイクロイックミラー 18 で反射し、さらに反射ミラー 21 で反射して対物レンズ 22 に入射し、標本 23 に集光され

50

る。この状態で、刺激用レーザ光走査手段 17 により、刺激用レーザ光を標本 23 上の任意領域で 2 次元走査したり、任意のポイントを固定照射して、標本 23 の特定部位に 2 光子励起による化学反応（ケージド試薬の解除）を発生させる。そして、このときの影響により反応する標本 23 の経時変化などを上述した内部蛍光検出器 14 で検出し、不図示の表示装置に画像表示する。

【0037】

次に、2 光子励起光を使用して内部蛍光検出器 14 で蛍光検出を行なう場合を説明する。

【0038】

この場合、観察用赤外レーザユニット 7 より 850 nm のレーザ波長を選択して出射すると、この 850 nm のレーザ波長は、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として反射ミラー 8 で反射し、ダイクロイックミラー 9 を透過し、さらにダイクロイックミラー 10 で反射して、観察用励起レーザ光走査手段 11 に入射し、2 次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー 18 を透過し、反射ミラー 21 で反射して対物レンズ 22 に入射し、標本 23 に集光される。

10

【0039】

標本 23 に 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発せられる。ここで蛍光指示薬としてカルシウムイオン指示薬の f l u o - 3 が使われているので、レーザ波長 850 nm により蛍光波長 530 nm の蛍光を発する。

【0040】

20

標本 23 からの波長 530 nm の蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ 22 を透過し、反射ミラー 21 で反射され、ダイクロイックミラー 18 を透過し、観察用励起レーザ光走査手段 11、ダイクロイックミラー 10 を透過し、共焦点レンズ 12 を介して共焦点ピンホール 13 面に結像される。この場合、共焦点ピンホール 13 は、より多くの散乱光を拾うことができるように開放されている。共焦点ピンホール 13 を通過した蛍光は、内部蛍光検出器 14 で検出され電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピュータにより処理され、画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。

【0041】

一方、刺激用レーザユニット 15 より 720 nm の波長の刺激用レーザ光を発生して標本 23 上の特定部位に 2 光子励起による化学反応（ケージド試薬の解除）を発生させる場合は、上述したと同様である。

30

【0042】

次に、例えば散乱光が多い厚い標本 23 の蛍光観察において、2 光子励起光を使用して外部蛍光検出器 24 で蛍光検出を行う場合を説明する。

【0043】

この場合、不図示の電動機構によりターレット 19 を駆動し、ダイクロイックミラー 20 を光路上に位置させる。

【0044】

この状態から、観察用赤外レーザユニット 7 より 850 nm のレーザ波長を選択して出射すると、この 850 nm のレーザ波長は、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として反射ミラー 8 で反射し、ダイクロイックミラー 9 を透過し、さらにダイクロイックミラー 10 で反射して、観察用励起レーザ光走査手段 11 に入射し、2 次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー 18 を透過し、ダイクロイックミラー 20 で反射して対物レンズ 22 に入射し、標本 23 に集光される。

40

【0045】

標本 23 に 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発せられる。ここで蛍光指示薬としてカルシウムイオン指示薬の f l u o - 3 が使われているので、レーザ波長 850 nm により蛍光波長 530 nm の蛍光を発する。

【0046】

標本 23 からの波長 530 nm の蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ 22 を透過し、

50

ダイクロイックミラー 20 を透過して外部蛍光検出器 24 で検出され電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピュータにより処理され、画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。

【0047】

一方、刺激用レーザユニット 15 より 720 nm の波長の刺激用レーザ光を発生して標本 23 上の特定部位に 2 光子励起による化学反応（ケージド試薬の解除）を発生させる場合は、上述したと同様である。

【0048】

従って、このようにすれば、観察用可視レーザユニット 1 から発せられる 1 光子励起波長の観察用励起レーザ光と観察用赤外レーザユニット 7 から発せられる 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光のそれぞれの光路をダイクロイックミラー 9 により合成し、さらに刺激用レーザユニット 15 から発せられる 2 光子励起波長の刺激用レーザ光の光路をダイクロイックミラー 18 により合成し、これら合成された光路を介して、それぞれのレーザ光を標本 23 内に照射し、可視レーザによる 1 光子励起観察、赤外パルスレーザによる 2 光子励起観察、さらには、刺激用レーザによる 2 光子励起による化学反応を得られるようにしたので、観察用可視レーザユニット 1、観察用赤外レーザユニット 7、さらに刺激用レーザユニット 15 の切換えの際に、ダイクロイックミラーなどの光学素子の切換え、交換などを一切必要とすることがなくなり、これら光学素子の光路への切換え、交換の際に、反射角度や折返し位置の固体差に原因する光軸ずれを確実に防止することができる。つまり、観察用可視レーザユニット 1、観察用赤外レーザユニット 7、刺激用レーザユニット 15 などのレーザ光源を切換えても、標本 23 内の目的とする位置に、それぞれのレーザ光を位置ずれを生じることなく正確に照射することができる。これにより、標本 23 の特定の部位に 2 光子励起により化学反応を与えて、その影響を含めて 1 光子または 2 光子励起波長による蛍光観察を行うような場合も、複数のダイクロイックミラーを必要とせず、容易に 1 光子蛍光画像や 2 光子蛍光画像を取得できる走査型レーザー顕微鏡を実現できる。

【0049】

また、内部蛍光検出器 14 と外部蛍光検出器 24 による蛍光検出を切換える目的で、光路中でダイクロイックミラー 20、反射ミラー 21 を切換える場合も、これらダイクロイックミラー 20、反射ミラー 21 の切換えは、観察用可視レーザユニット 1、観察用赤外レーザユニット 7、刺激用レーザユニット 15 からのレーザ光の光路を合成した後の光路上で行われるので、これらダイクロイックミラー 20、反射ミラー 21 を切換えても、それぞれのレーザ光の光路の相対位置関係に変化を生じることがなく、これにより、内部蛍光検出器 14 と外部蛍光検出器 24 を切換えても標本内の目的とする位置に、それぞれのレーザ光を位置ずれを生じることなく正確に照射できる。

【0050】

（第 2 の実施の形態）

次に、本発明の第 2 の実施の形態を説明する。

【0051】

図 4 は、本発明の第 2 の実施の形態の走査型光学観察装置における走査型レーザー顕微鏡の概略構成を示すもので、図 1 と同一部分には、同符号を付している。

【0052】

この場合、観察用励起レーザ光走査手段 11 とダイクロイックミラー 18 との間の光路の平行光束中に第 3 の光学素子としてのダイクロイックミラー 25 が配置されている。このダイクロイックミラー 25 は、不図示の電動機構により光路上に挿脱可能になっている。また、ダイクロイックミラー 25 は、図 5 に示すように観察用赤外レーザユニット 7 から出射される 820 nm ~ 1000 nm までの 2 光子励起波長を透過し、観察用赤外レーザユニット 7 からの励起波長により標本 23 より発せられる 530 nm の 2 光子励起蛍光を反射するような特性を有している。

【0053】

ダイクロイックミラー 25 の反射光路には、反射ミラー 26 を介して第 2 の光検出手段としての外部蛍光検出器 24 が配置されている。図示例では、ダイクロイックミラー 25 は、光路上に配置されている。

【 0 0 5 4 】

また、ダイクロイックミラー 18 と対物レンズ 22 との間には、反射ミラー 27 が配置されている。

【 0 0 5 5 】

その他は、図 1 と同様である。

【 0 0 5 6 】

次に、このように構成した第 2 の実施の形態の作用を説明する。

10

【 0 0 5 7 】

まず、1 光子励起光を使用して内部蛍光検出器 14 で蛍光検出を行なう場合を説明する。

【 0 0 5 8 】

この場合、不図示の電動機構によりダイクロイックミラー 25 を移動し、光路上から退避させる。

【 0 0 5 9 】

この状態で、観察用可視レーザユニット 1 のアルゴンレーザ 2 から 488 nm の波長のレーザ光とヘリウムネオンレーザ 3 から 633 nm の波長のレーザ光が発せられると、このうち 488 nm のレーザ波長がレーザラインフィルタ 6 により選択される。この 488 nm のレーザ波長は、観察用励起レーザ光として、ダイクロイックミラー 9 で反射し、さらにダイクロイックミラー 10 で反射し、観察用励起レーザ光走査手段 11 に入射し、2 次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー 18 を透過し、反射ミラー 27 で反射して対物レンズ 22 に入射し、標本 23 に集光される。

20

【 0 0 6 0 】

標本 23 に観察用励起レーザ光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発せられる。ここで、蛍光指示薬としてカルシウムイオン指示薬の $\text{f l u o} - 3$ が使われているので、レーザー波長 488 nm により蛍光波長 530 nm の蛍光を発する。

【 0 0 6 1 】

標本 23 からの波長 530 nm の蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ 22 を透過し、反射ミラー 27 で反射され、ダイクロイックミラー 18 を透過し、観察用励起レーザ光走査手段 11、ダイクロイックミラー 10 を透過し、共焦点レンズ 12 を介して共焦点ピンホール 13 面に結像される。この場合、共焦点ピンホール 13 は、共焦点効果を得るため、回折径程度に絞られている。共焦点ピンホール 13 を通過した蛍光は、内部蛍光検出器 14 で検出され電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピューターにより処理され、画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。

30

【 0 0 6 2 】

次に、刺激用レーザユニット 15 より 720 nm の波長の刺激用レーザ光を発生すると、刺激用レーザ光は、刺激用レーザ光走査手段 17 を介してダイクロイックミラー 18 で反射し、さらに反射ミラー 27 で反射して対物レンズ 22 に入射し、標本 23 に集光される。この状態で、刺激用レーザ光走査手段 17 により、刺激用レーザ光を標本 23 上の任意領域で 2 次元走査したり、任意のポイントを固定照射して、標本 23 の特定部位に 2 光子励起による化学反応（ケージド試薬の解除）を発生させる。そして、このときの影響により反応する標本 23 の経時変化などを上述した内部蛍光検出器 14 で検出し、不図示の表示装置に画像表示する。

40

【 0 0 6 3 】

次に、2 光子励起光を使用して内部蛍光検出器 14 で蛍光検出を行なう場合を説明する。

【 0 0 6 4 】

この場合、観察用赤外レーザユニット 7 より 850 nm のレーザ波長を選択して出射す

50

ると、この850nmのレーザ光は、2光子励起波長の観察用励起レーザ光として反射ミラー8で反射し、ダイクロイックミラー9を透過し、さらにダイクロイックミラー10で反射して、観察用励起レーザ光走査手段11に入射し、2次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー18を透過し、反射ミラー27で反射して対物レンズ22に入射し、標本23に集光される。

【0065】

標本23に2光子励起光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発せられる。ここでも蛍光指示薬としてカルシウムイオン指示薬のfluo-3が使われているので、レーザ波長850nmにより蛍光波長530nmの蛍光を発する。

【0066】

標本23からの波長530nmの蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ22を透過し、反射ミラー27で反射され、ダイクロイックミラー18を透過し、観察用励起レーザ光走査手段11、ダイクロイックミラー10を透過し、共焦点レンズ12を介して共焦点ピンホール13面に結像される。この場合、共焦点ピンホール13は、より多くの散乱光を拾うことができるように開放されている。共焦点ピンホール13を通過した蛍光は、内部蛍光検出器14で検出され電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピュータにより処理され、画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。

【0067】

一方、刺激用レーザユニット15より720nmの波長の刺激用レーザ光を発生して標本23上の特定部位に2光子励起による化学反応(ケージド試薬の解除)を発生させる場合は、上述したと同様である。

【0068】

次に、例えば散乱光が多い厚い標本23の蛍光観察において、2光子励起光を使用して外部蛍光検出器24で蛍光検出を行う場合を説明する。

【0069】

この場合、不図示の電動機構によりダイクロイックミラー25を光路上に挿入する。

【0070】

この状態から、観察用赤外レーザユニット7より850nmのレーザ波長を選択して出射すると、この850nmのレーザ波長は、2光子励起波長の観察用励起レーザ光として反射ミラー8で反射し、ダイクロイックミラー9を透過し、さらにダイクロイックミラー10で反射して、観察用励起レーザ光走査手段11に入射し、2次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー25、ダイクロイックミラー18を透過し、反射ミラー27で反射して対物レンズ22に入射し、標本23に集光される。

【0071】

標本23に2光子励起波長の観察用励起レーザ光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発せられる。ここでも蛍光指示薬としてカルシウムイオン指示薬のfluo-3が使われているので、レーザ波長850nmにより蛍光波長530nmの蛍光を発する。

【0072】

標本23からの波長530nmの蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ22を透過し、反射ミラー27で反射し、ダイクロイックミラー18を透過し、ダイクロイックミラー25で反射し、反射ミラー26を介して外部蛍光検出器24で検出され電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピュータにより処理され、画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。

【0073】

一方、刺激用レーザユニット15より720nmの波長の刺激用レーザ光を発生して標本23上の特定部位に2光子励起による化学反応(ケージド試薬の解除)を発生させる場合は、上述したと同様である。

【0074】

従って、このようにしても、観察用可視レーザユニット1から発せられる1光子励起波長の観察用励起レーザ光と観察用赤外レーザユニット7から発せられる2光子励起波長の

10

20

30

40

50

観察用励起レーザ光のそれぞれの光路をダイクロイックミラー 9 により合成し、さらに刺激用レーザユニット 15 から発せられる 2 光子励起波長のレーザ光の光路をダイクロイックミラー 18 により合成し、これら合成された光路を介して、それぞれのレーザ光を標本 23 内に照射するようにしたので、第 1 の実施の形態と同様な効果を得ることができる。
【0075】

また、内部蛍光検出器 14 と外部蛍光検出器 24 による蛍光検出を切替える目的で、光路中にダイクロイックミラー 25 が挿脱されるが、このダイクロイックミラー 25 の光路への挿脱は、観察用励起レーザ光走査手段 11 とダイクロイックミラー 18 との間の平行光束中で行われるので、ダイクロイックミラー 25 を挿脱しても、それぞれのレーザ光の光路の相対位置関係に変化を生じることがなく、これにより、内部蛍光検出器 14 と外部
10 蛍光検出器 24 を切替えても標本内の目的とする位置に、それぞれのレーザ光を位置ずれを生じることなく正確に照射できる。

【0076】

(第 3 の実施の形態)

次に、本発明の第 3 の実施の形態を説明する。

【0077】

図 6 は、本発明の第 3 の実施の形態の走査型光学観察装置における走査型レーザ顕微鏡の概略構成を示すもので、図 1 と同一部分には、同符号を付している。

【0078】

この場合、標本には、蛍光指示薬として、上述したカルシウムイオン指示薬の f l u o
- 3 を使用した標本 23 と、例えば D A P I と A l e x a 4 8 8 を使用した多重染色標本
20 28 が適用される。

【0079】

また、刺激用レーザユニット 15 から出射される 2 光子励起波長の刺激用レーザ光を 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として使用する。

【0080】

さらに、ダイクロイックミラー 18 より出射されるレーザ光の光路上に配置されるターレット 19 には、ダイクロイックミラー 20 と反射ミラー 21 の他に、第 4 の光学素子としてのダイクロイックミラー 29 が設けられ、不図示の電動機構により、これらのうち一つを選択的に光路上に挿入可能にしている。
30

【0081】

この場合、ダイクロイックミラー 29 は、図 7 に示すように観察用赤外レーザユニット 7 から出射される 820nm ~ 1000nm までの 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光と刺激用レーザユニット 15 から出射される 720nm の 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光を反射し、これら観察用赤外レーザユニット 7 および刺激用レーザユニット 15 からの 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光により多重染色標本 28 より発せられる蛍光波長の 456nm を透過し、520nm を反射するような特性を有している。

【0082】

その他は、図 1 と同様である。

【0083】

次に、このように構成した第 3 の実施の形態の作用を説明する。
40

【0084】

この場合、標本 23 の蛍光観察については、不図示の電動機構によりターレット 19 を駆動して反射ミラー 21 またはダイクロイックミラー 20 を光路上に挿入する。これ以降の動作は、上述した実施の形態と同様であり、ここでの説明は省略する。

【0085】

次に、多重染色標本 28 の蛍光観察について説明する。

【0086】

まず、観察用赤外レーザユニット 7 と刺激用レーザユニット 15 にそれぞれ備えられた赤外パルスレーザによる 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光を使用して、内部蛍光検出
50

器 1 4 により蛍光検出を行なう場合を説明する。この場合、不図示の電動機構によりターゲット 1 9 を駆動して反射ミラー 2 1 を光路中に挿入する。

【 0 0 8 7 】

この状態で、観察用赤外レーザユニット 7 より 8 2 0 n m のレーザ波長を選択して出射すると、この 8 2 0 n m のレーザ波長は、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として反射ミラー 8 で反射し、ダイクロイックミラー 9 を透過し、さらにダイクロイックミラー 1 0 で反射して、観察用励起レーザ光走査手段 1 1 に入射し、2 次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー 1 8 を透過し、反射ミラー 2 1 で反射して対物レンズ 2 2 に入射し、多重染色標本 2 8 に集光される。

【 0 0 8 8 】

また、刺激用レーザユニット 1 5 より 7 2 0 n m の波長のレーザ光を発生すると、この 7 2 0 n m のレーザ波長光は、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として刺激用レーザ光走査手段 1 7 を介してダイクロイックミラー 1 8 で反射し、さらに反射ミラー 2 1 で反射して対物レンズ 2 2 に入射し、標本 2 3 に集光される。

【 0 0 8 9 】

多重染色標本 2 8 にそれぞれの 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発せられる。ここでは、蛍光指示薬として D A P I と A l e x a 4 8 8 をが使われているので、2 光子励起レーザ波長 8 2 0 n m により A l e x a 4 8 8 が波長 5 2 0 n m の蛍光を発し、2 光子励起レーザ波長 7 2 0 n m により D A P I が波長 4 5 6 n m の蛍光を発する。

【 0 0 9 0 】

多重染色標本 2 8 からの蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ 2 2 を透過し、反射ミラー 2 1 で反射され、ダイクロイックミラー 1 8 を透過し、観察用励起レーザ光走査手段 1 1、ダイクロイックミラー 1 0 を透過し、共焦点レンズ 1 2 を介して共焦点ピンホール 1 3 面に結像される。この場合、共焦点ピンホール 1 3 は、より多くの散乱光を拾うことができるように開放されている。共焦点ピンホール 1 3 を通過した蛍光は、内部蛍光検出器 1 4 で検出される。内部蛍光検出器 1 4 は、蛍光波長の検出チャンネルを 2 チャンネルに分離するための不図示の分光ダイクロイックミラーが設けられていて、検出した蛍光波長から 5 2 0 n m と 4 5 6 n m の蛍光波長を分離する。そして、これら分離された蛍光は、電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピューターにより処理され、それぞれ画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。

【 0 0 9 1 】

次に、外部蛍光検出器 2 4 により蛍光検出を行なう場合を説明する。この場合、不図示の電動機構によりターゲット 1 9 を駆動してダイクロイックミラー 2 0 を光路中に挿入する。

【 0 0 9 2 】

この状態で、観察用赤外レーザユニット 7 より 8 2 0 n m のレーザ波長を選択して出射すると、この 8 2 0 n m のレーザ波長は、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として反射ミラー 8 で反射し、ダイクロイックミラー 9 を透過し、さらにダイクロイックミラー 1 0 で反射して、観察用励起レーザ光走査手段 1 1 に入射し、2 次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー 1 8 を透過し、ダイクロイックミラー 2 0 で反射して対物レンズ 2 2 に入射し、多重染色標本 2 8 に集光される。

【 0 0 9 3 】

また、刺激用レーザユニット 1 5 より 7 2 0 n m の波長のレーザ光を発生すると、この 7 2 0 n m のレーザ波長光も、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として刺激用レーザ光走査手段 1 7 を介してダイクロイックミラー 1 8 で反射し、さらにダイクロイックミラー 2 0 で反射して対物レンズ 2 2 に入射し、多重染色標本 2 8 に集光される。

【 0 0 9 4 】

多重染色標本 2 8 にそれぞれの 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発せられる。ここでは、蛍光指示薬として D A P I と A l e

10

20

30

40

50

x a 4 8 8 をが使われているので、2 光子励起レーザ波長 8 2 0 n m により A l e x a 4 8 8 が波長 5 2 0 n m の蛍光を発生し、2 光子励起レーザ波長 7 2 0 n m により D A P I が波長 4 5 6 n m の蛍光を発生する。

【 0 0 9 5 】

多重染色標本 2 8 からの蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ 2 2 を透過し、ダイクロイックミラー 2 0 を透過して外部蛍光検出器 2 4 で検出される。

【 0 0 9 6 】

外部蛍光検出器 2 4 についても、蛍光波長の検出チャンネルを 2 チャンネルに分離するための不図示の分光ダイクロイックミラーが設けられていて、検出した蛍光波長から 5 2 0 n m と 4 5 6 n m の蛍光波長を分離する。そして、これら分離された蛍光は、電気信号 10 に変換される。電気信号は、不図示のコンピュータにより処理され、それぞれ画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。

【 0 0 9 7 】

次に、内部蛍光検出器 1 4 と外部蛍光検出器 2 4 により同時に蛍光検出を行なう場合を説明する。この場合、不図示の電動機構によりターレット 1 9 を駆動してダイクロイックミラー 2 9 を光路中に挿入する。

【 0 0 9 8 】

この状態で、観察用赤外レーザユニット 7 より 8 2 0 n m のレーザ波長を選択して出射すると、この 8 2 0 n m のレーザ波長は、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として反射ミラー 8 で反射し、ダイクロイックミラー 9 を透過し、さらにダイクロイックミラー 1 0 で反射して、観察用励起レーザ光走査手段 1 1 に入射し、2 次元方向に偏向され、ダイクロイックミラー 1 8 を透過し、ダイクロイックミラー 2 9 で反射して対物レンズ 2 2 に入射し、多重染色標本 2 8 に集光される。 20

【 0 0 9 9 】

また、刺激用レーザユニット 1 5 より 7 2 0 n m の波長のレーザ光を発生すると、この 7 2 0 n m のレーザ波長光も、2 光子励起波長の観察用励起レーザ光として刺激用レーザ光走査手段 1 7 を介してダイクロイックミラー 1 8 で反射し、さらにダイクロイックミラー 2 9 で反射して対物レンズ 2 2 に入射し、標本 2 3 に集光される。

【 0 1 0 0 】

多重染色標本 2 8 にそれぞれの 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光が照射されると、蛍光指示薬が励起され蛍光が発生される。ここでは、蛍光指示薬として D A P I と A l e x a 4 8 8 をが使われているので、2 光子励起レーザ波長 8 2 0 n m により A l e x a 4 8 8 が波長 5 2 0 n m の蛍光を発生し、2 光子励起レーザ波長 7 2 0 n m により D A P I が波長 4 5 6 n m の蛍光を発生する。 30

【 0 1 0 1 】

多重染色標本 2 8 からの蛍光は、先の光とは逆に、対物レンズ 2 2 を透過し、ダイクロイックミラー 2 9 に入射する。この場合、ダイクロイックミラー 2 9 は、多重染色標本 2 8 より発生される蛍光波長の 4 5 6 n m を透過し、5 2 0 n m を反射するような特性を有している。

【 0 1 0 2 】

これにより、ダイクロイックミラー 2 9 を反射した 5 2 0 n m の蛍光は、ダイクロイックミラー 1 8 を透過し、観察用励起レーザ光走査手段 1 1、ダイクロイックミラー 1 0 を透過し、共焦点レンズ 1 2 を介して共焦点ピンホール 1 3 面に結像される。そして、共焦点ピンホール 1 3 を通過した蛍光は、内部蛍光検出器 1 4 で検出され電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピュータにより処理され、画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。 40

【 0 1 0 3 】

また、ダイクロイックミラー 2 9 を透過した 4 5 6 n m の蛍光は、外部蛍光検出器 2 4 で検出され電気信号に変換される。電気信号は、不図示のコンピュータにより処理され、画像データとして不図示の表示装置で画像表示される。 50

【 0 1 0 4 】

従って、このようにしても、観察用赤外レーザユニット 7 から発せられる 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光と刺激用レーザユニット 15 から出射される 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光のそれぞれの光路をダイクロイックミラー 18 により合成し、これら合成された光路を介して、それぞれの観察用励起レーザ光を標本 23 内に照射するようにしたので、第 1 の実施の形態と同様な効果を得ることができる。

【 0 1 0 5 】

また、内部蛍光検出器 14 と外部蛍光検出器 24 による蛍光検出を切換える目的で、光路中にダイクロイックミラー 29 を挿脱する場合も、ダイクロイックミラー 29 の挿脱は、観察用赤外レーザユニット 7 および刺激用レーザユニット 15 からの 2 光子励起波長の観察用励起レーザ光の光路を合成した後の光路上で行われるので、ダイクロイックミラー 29 を光路上に出し入れしても、それぞれのレーザ光の光路の相対位置関係に変化を生じることがなく、これにより、内部蛍光検出器 14 と外部蛍光検出器 24 を切換えても標本内の目的とする位置に、それぞれのレーザ光を位置ずれを生じることなく正確に照射できる。

【 0 1 0 6 】

なお、本発明は、上記実施の形態に限定されるものでなく、実施段階では、その要旨を変更しない範囲で種々変形することが可能である。

【 0 1 0 7 】

さらに、上記実施の形態には、種々の段階の発明が含まれており、開示されている複数の構成要件における適宜な組み合わせにより種々の発明が抽出できる。例えば、実施の形態に示されている全構成要件から幾つかの構成要件が削除されても、発明が解決しようとする課題の欄で述べた課題を解決でき、発明の効果の欄で述べられている効果が得られる場合には、この構成要件が削除された構成が発明として抽出できる。

【 0 1 0 8 】

なお、上述した実施の形態には、以下の発明も含まれる。

【 0 1 0 9 】

ここで、 1：第 1 レーザ光源（観察用可視、実施の形態では 488nm と 633nm）、 2：第 2 レーザ光源（2 光子励起観察用、実施の形態では 820 ~ 1000nm）、 3：第 3 レーザ光源（2 光子励起刺激用、実施の形態では 720nm）、 f1：第 1 ~ 第 3 レーザ光の標本への照射により発生する蛍光の波長、とする。

【 0 1 1 0 】

(1) 第 1 乃至第 3 レーザ光を発生する第 1 乃至第 3 レーザ光源と、
第 1、第 2 レーザ光を合成する第 1 合成手段（ダイクロイックミラー 9）と、
第 1 合成手段で合成された光路の光を走査する第 1 走査手段と、
第 3 レーザ光を走査する第 2 走査手段と、
第 1 走査手段からの光路と第 2 走査手段からの光路を合成する第 2 合成手段（ダイクロイックミラー 18）と、

1 < 3 < 2 かつ f1 < 3 であって、

前記第 2 合成手段は、 3 のみを反射し、残りの波長（少なくとも 1、 f1、 2）を透過する特性を有する。

【 0 1 1 1 】

(2) (1) 記載において、第 1 および第 2 光源と第 1 走査手段との間で分岐された光路上に配置された共焦点ピンホールを有する第 1 の蛍光検出手段を備えている。

【 0 1 1 2 】

(3) (2) 記載において、標本と第 2 合成手段との間で光路を分岐する光路分岐手段（ダイクロイックミラー 20、25、29）と、この分岐された光路に配置された第 2 の蛍光検出手段を備えている。

【 0 1 1 3 】

(4) (3) 記載において、前記光路分岐手段（ダイクロイックミラー 20）は、前記

10

20

30

40

50

標本と前記第 2 合成手段との間に配置され、第 2 レーザ光と第 3 レーザ光を反射し、 $f1$ (多光子励起により発生した蛍光) を前記第 2 の蛍光検出手段に向けて透過する特性を有する。

【0114】

(5)(3)記載において、前記光路分岐手段(ダイクロイックミラー 25)は、前記第 2 合成手段と前記第 1 走査手段の間に配置され、 $f1$ (多光子励起により発生した蛍光) を前記第 2 の蛍光検出手段に向けて反射し、第 2 レーザ光を透過する特性を有する。

【0115】

(6)(3)記載において、前記光路分岐手段(ダイクロイックミラー 29)は、前記標本と前記第 2 合成手段の間に配置され、第 2 レーザ光と第 3 レーザ光を反射し、第 2 レーザ光による多光子励起により発生した第 1 蛍光と第 3 レーザ光による多光子励起により発生した第 2 蛍光の一方を反射し他方を透過する特性を有する。

【0116】

なお、上述した(1)~(6)で、反射と透過を入れ替えてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図 1】本発明の第 1 の実施の形態の走査型光学観察装置における走査型レーザ顕微鏡の概略構成を示す図。

【図 2】第 1 の実施の形態に用いられるダイクロイックミラーの特性を示す図。

【図 3】第 1 の実施の形態に用いられる他のダイクロイックミラーの特性を示す図。

【図 4】本発明の第 2 の実施の形態の走査型光学観察装置における走査型レーザ顕微鏡の概略構成を示す図。

【図 5】第 2 の実施の形態に用いられるダイクロイックミラーの特性を示す図。

【図 6】本発明の第 3 の実施の形態の走査型光学観察装置における走査型レーザ顕微鏡の概略構成を示す図。

【図 7】第 3 の実施の形態に用いられるダイクロイックミラーの特性を示す図。

【符号の説明】

【0118】

- 1 ... 観察用可視レーザユニット、2 ... アルゴンレーザ
- 3 ... ヘリウムネオンレーザ、4 ... 反射ミラー
- 5 ... ダイクロイックミラー、6 ... レーザラインフィルタ
- 7 ... 観察用赤外レーザユニット、8 ... 反射ミラー
- 9 ... ダイクロイックミラー、10 ... ダイクロイックミラー
- 11 ... 観察用励起レーザ光走査手段、11a、11b ... ミラー
- 12 ... 共焦点レンズ、13 ... 共焦点ピンホール
- 14 ... 内部蛍光検出器、15 ... 刺激用レーザユニット
- 16 ... 反射ミラー、17 ... 刺激用レーザ光走査手段
- 17a、17b ... ミラー、18 ... ダイクロイックミラー
- 19 ... ターレット、20 ... ダイクロイックミラー
- 21 ... 反射ミラー、22 ... 対物レンズ
- 23 ... 標本、24 ... 外部蛍光検出器
- 25 ... ダイクロイックミラー、26 ... 反射ミラー
- 27 ... 反射ミラー、28 ... 多重染色標本
- 29 ... ダイクロイックミラー

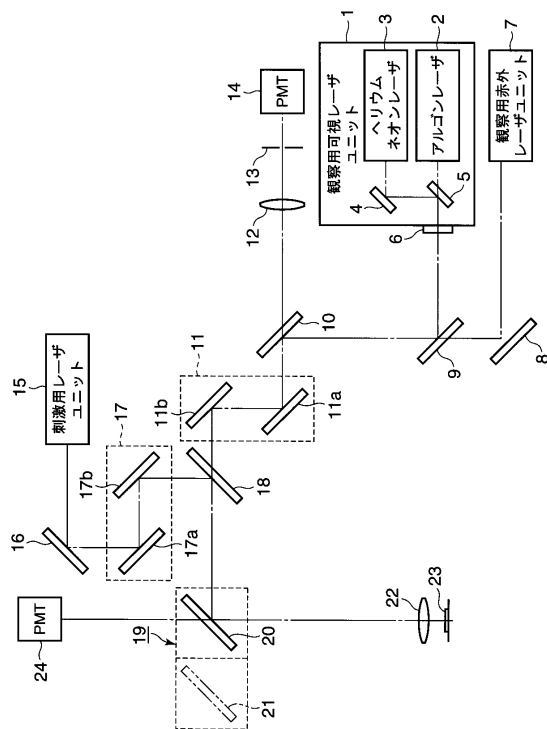
10

20

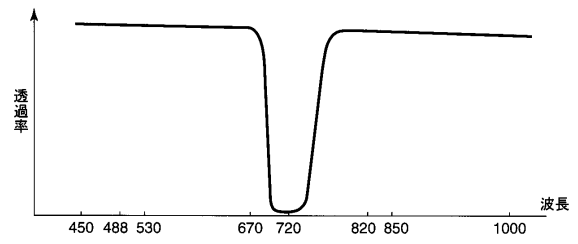
30

40

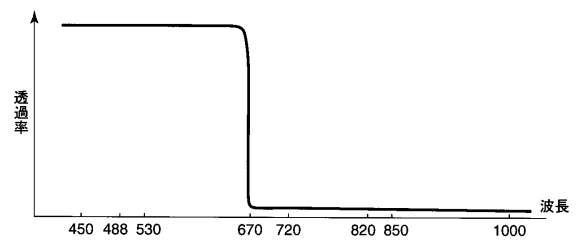
【 図 1 】



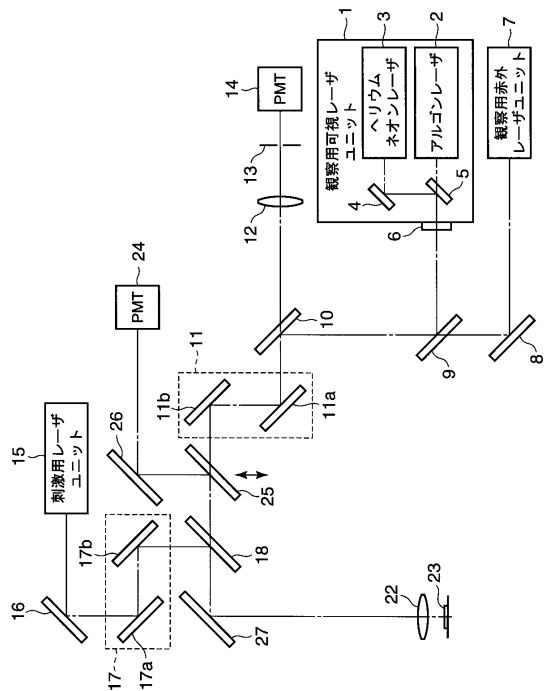
【 図 2 】



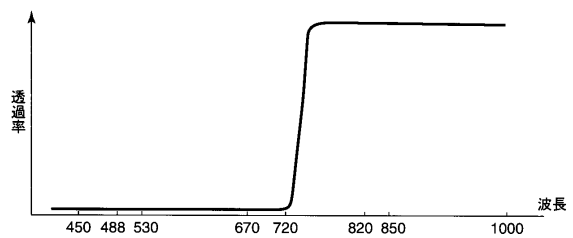
【 図 3 】



【圖 4】



【 図 5 】



フロントページの続き

審査官 荒巻 慎哉

(56)参考文献 特開2004-110017(JP,A)
特開2004-086009(JP,A)
特開平10-206742(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/00 - 21/36
G01N 21/64