

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5999121号
(P5999121)

(45) 発行日 平成28年9月28日(2016.9.28)

(24) 登録日 平成28年9月9日(2016.9.9)

(51) Int.Cl.

F 1

GO2B 21/00	(2006.01)	GO2B 21/00
GO2B 3/00	(2006.01)	GO2B 3/00
GO1N 21/64	(2006.01)	GO1N 21/64

A
Z

請求項の数 6 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2014-27918 (P2014-27918)
(22) 出願日	平成26年2月17日 (2014.2.17)
(65) 公開番号	特開2015-152836 (P2015-152836A)
(43) 公開日	平成27年8月24日 (2015.8.24)
審査請求日	平成27年5月1日 (2015.5.1)

(73) 特許権者	000006507 横河電機株式会社 東京都武蔵野市中町2丁目9番32号
(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(74) 代理人	100108578 弁理士 高橋 詔男
(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人	100094400 弁理士 鈴木 三義
(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】共焦点光スキャナ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数のピンホールを有する光フィルタリング手段と、照明光を試料上に走査する走査手段とを含む共焦点光スキャナであって、

前記光フィルタリング手段は、ディスク形状の本体と、該本体の一方の主面側に配された前記ピンホールと、該本体の他方の主面において前記ピンホールと略同軸をなす位置に配されたマイクロレンズとを備え、前記照明光の開口数を入射する前の開口数から減少させて射出するとともに、前記試料側から入射する戻り光の開口数を入射する前の開口数から増大させて射出し、

前記走査手段は、前記ディスク形状の本体を回転させるモーターであることを特徴とする共焦点光スキャナ。

10

【請求項 2】

前記マイクロレンズは、凸レンズ状を成しており、前記ディスク形状の本体の前記試料側に位置する主面に配されたことを特徴とする請求項 1 に記載の共焦点光スキャナ。

【請求項 3】

前記マイクロレンズは、凹レンズ状を成しており、前記ディスク形状の本体の前記試料と反対側に位置する主面に配されたことを特徴とする請求項 1 に記載の共焦点光スキャナ。

【請求項 4】

前記マイクロレンズは、前記ディスク形状の本体の前記試料側に位置する主面に凸レン

20

ズ状を成しており、

前記ピンホールは、前記ディスク形状の本体の前記試料と反対側に位置する主面に形成された凹状のミラーの中心と同軸を成すように配されていることを特徴とする請求項1に記載の共焦点光スキャナ。

【請求項5】

前記光フィルタリング手段と前記走査手段に加えて、中間変倍光学系を備えることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載の共焦点光スキャナ。

【請求項6】

前記光フィルタリング手段は、前記試料から入射する光の開口数を、前記光フィルタリング手段に入射する前の1.2~4倍に変換して出射することを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項に記載の共焦点光スキャナ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、画像処理による偽解像やアーティファクトの影響が抑制された超解像画像を高速(リアルタイム)に取得できる共焦点光スキャナに関する。

【背景技術】

【0002】

以下では、共焦点光スキャナの技術分野において先行する3つの従来技術について、図面を参照して説明する。本発明者は、これらの従来技術から未解決の課題を導出し、その課題を解決する手段として有効な構成を備えた共焦点光スキャナの開発に成功した。

【0003】

(A) 従来技術1

近年、光学系の解像限界(Abbeの回折限界)を超える解像度で、試料画像を得る技術(以降、超解像技術と呼ぶ)が開発・実用化されている。そのような超解像技術の一例として、特許文献1に記載された手法が挙げられる。

【0004】

(A1) 従来技術1の構成および動作

図16は、従来の共焦点光スキャナの一構成例を示す模式図である。この図面は、特許文献1の実施形態4(図10A)に相当する。以下では、図16を用いて構成および動作を説明する。

共焦点光スキャナ100は、多数のマイクロレンズ102aが規則的に配設されたマイクロレンズディスク102と、マイクロレンズ102aに対向する位置に遮光マスク103bの開口部であるピンホール103aが配設されたピンホールディスク103と、マイクロレンズディスク102とピンホールディスク103とを回転させるモーター104とを備えている。

【0005】

光源装置105は、図示しないレーザー等の光源と光学系から成り、コリメートされた照明光を出射する。共焦点光スキャナ100に入射した照明光は、マイクロレンズディスク102上の多数のマイクロレンズ102aにより、多数の照明光ビームレット(Beamlet)に分割される。分割された照明光は、ビームスプリッタ106を透過し、ピンホールディスク103上の多数のピンホール103aのうち、通過したマイクロレンズ102aに対向する位置にあるピンホールを通過する。尚、照明光がピンホール103aを効率良く通過するよう、ピンホール103aはマイクロレンズ102aの焦点面に配設されている。

【0006】

ピンホールディスク103を通過した照明光は、対物レンズ107により試料108上に集光される。試料108は、照明光に基づく戻り光を発する。特に蛍光試料観察の場合、試料108は、蛍光色素等を用いて特定の構造を染色したものであり、照明光により蛍光色素分子が励起され、照明光より長波長の蛍光を発する。

10

20

30

40

50

【0007】

対物レンズ107により捉えられた戻り光は、共焦点光スキャナ100のピンホールディスク103上に集光される。このとき、対物レンズ107の試料側焦点面からの戻り光のみが、ピンホール103aを通過する。一方、焦点面以外からの戻り光は、ピンホール103a上に焦点を結ばないため、ピンホールディスク103の遮光マスク103bにより遮られ、大部分はピンホール103aを通過できない。

【0008】

ピンホール103aを通過した戻り光はビームスプリッタ106により反射される。特に蛍光観察の場合、ビームスプリッタ106は照明光を透過し、照明光より波長の長い蛍光である戻り光を反射する、ショートパス特性の波長分光ビームスプリッタである。ビームスプリッタ106を反射した戻り光は、撮像レンズ109によりカメラ110上に結像する。10

【0009】

同時に、モーター104によりマイクロレンズディスク102とピンホールディスク103とを回転させ、試料108全体を照明光により走査する。これにより試料108の共焦点像（光学的断層像）をカメラ110を用いて撮像可能としている。

【0010】

このとき、遮光マスク103bのピンホールパターンにより空間強度分布を変調された照明光が試料108に投影される。これにより、試料108からの戻り光は、光学系の解像限界を超える高周波成分の一部が、解像限界以下の周波数にシフトされている。更に、戻り光が遮光マスク103bのピンホールパターンを通過する構成としたことにより、シフトした帯域が元の高周波成分に復調される。従って、カメラ110には、光学系の解像限界を超えた高周波成分を持つ共焦点像が撮像される。但し、光学系の解像限界を超えた高周波成分は、低周波成分に比べ弱いコントラストしか持たず、画像上で十分に視認することができないため、画像処理ボード111及びPCI2で高周波強調処理を施し表示する。この結果、光学系の解像限界を超えた高周波成分を十分視認可能な共焦点像を得ることができる。20

【0011】**(A2) 従来技術1の課題**

上述のように、光学系の解像限界を超えた高周波成分を十分視認可能な共焦点像を得るために、カメラにより撮影された共焦点像に高周波強調処理を施す必要がある。このため、カメラで撮影された共焦点像に含まれるノイズ成分により、様々な偽解像やアーティファクト（artifact）を生じてしまう。30

「自然」を観察する自然科学の分野（たとえばマイクロスコープを用いて、生物標本、細胞などを観察する分野）においては、「人工のもの（観測・解析において発生したデータの歪み、エラーなど）」が発生する場合がある。アーティファクトとは、この「人工のもの」を意味する。

【0012】

また、高周波強調処理の強度や帯域といったパラメータは白明なものではなく、処理結果の画像に偽解像やアーティファクトを含まないように、パラメータを個々の画像において試行錯誤する必要がある。更には、処理の結果、視認できた高周波成分が、実際の試料の微細構造を反映したものであるのか、或いは、偽解像によるものであるのかを判別することができない。40

【0013】

また、高周波強調処理による解像度の向上は、撮影された画像の面内（XY面内）のみであり、画像に対し垂直な光軸方向（Z軸方向）の解像度は向上しない。従って、試料の立体構造を詳細に観察することが困難である。

【0014】

また、高周波強調処理には長い処理時間を要するため、リアルタイムで超解像画像を表示することが困難である。更に、高周波強調処理を行うためには高性能のPCと画像処理50

ボードが必要となり、装置構成が複雑かつ高価になるという課題もあった。

【0015】

(B) 従来技術2

超解像効果を有する共焦点顕微鏡の一例として、たとえば非特許文献1に記載された「Image Scanning Microscopy (ISM)」方式が挙げられる。以下では、図17を用いて構成および動作を説明する。

【0016】

(B1) 従来技術2の構成および動作

図17は、従来の共焦点顕微鏡一構成例を示す模式図である。以下では、図17を用いて構成および動作を説明する。

10

ISM方式の共焦点顕微鏡は、従来技術1と同様の共焦点光スキャナを用いる。この共焦点光スキャナ200は、光源装置205にシャッタ205aを備え、また、モーター204とシャッタ205a及びカメラ210の同期制御を行う同期制御装置213を備える。

【0017】

シャッタ205aは、一回の撮影あたり数マイクロ秒の短時間のみ、光源装置205からの照明光をストロボ状に通過させる。この短時間の照明期間においては、モーター204により回転しているピンホールディスク203が略止まった状態と見なせる。ゆえに、カメラ210が照明期間と同じ短時間のみ撮影する構成をとることにより、照明光が試料208を走査せずに略止まった状態の共焦点像（非走査共焦点像）を得ることができる。この非走査共焦点像は、遮光マスク203bのピンホールパターン上の、多数のピンホール203aの位置に対応する試料208の位置からの戻り光のみが撮影されるので、1枚の画像上に多数の輝点が記録されたものとなる。

20

【0018】

同期制御装置213を用いてモーター204とシャッタ205a及びカメラ210の同期制御を行いながら、上記の非走査共焦点像を数百枚、撮影する。

その際、画像ごとに多数の輝点の位置が少しずつ異なり、かつ、全画像を合わせると輝点が画像全体を埋め尽くすよう、モーター204の回転に対するシャッタ205aの開閉タイミングを一定間隔ずつ、ずれるように同期制御を行う。

30

【0019】

このようにして得られた数百枚の非走査共焦点像に対し、次のような画像処理を施す。非走査共焦点像に記録された多数の輝点の全てについて輝点の中心座標を求め、輝点近傍のピクセルについて、中心までの距離が元の1/2となるようシフトする。言い換えれば、多数の輝点をそれぞれ1/2のサイズとなるよう縮小する画像処理を施す。最後に、輝点の縮小処理を施した数百枚の非走査共焦点像を全て足し合わせることで、超解像画像が得られる。

【0020】

以下、図18及び図19を参照して、超解像画像が得られる理由を説明する。図18は二次元イメージセンサー（カメラ）を用いた共焦点光学系を表した模式図である。簡単のため、照明側と撮像側を左右に分けて図示しており、点光源から試料面までが照明側、試料面から像面までが撮像側である。また、簡単のため対物レンズの倍率を1倍としているが、この仮定は議論的一般性を損なうものではない。倍率を1倍と仮定することで、試料面と像面とを上下逆の等スケールの座標で扱うことができる。

40

【0021】

光軸上の点光源から発した照明光は、対物レンズにより試料面に焦点を結ぶ。このとき、光の回折により、試料面における照明光の強度分布は、図18に示すように、座標0（ゼロ）を中心にして一定の広がりをもつ。この光の広がりは、一般にエアリーディスク（airy disc）と呼ばれる。次に、照明光を試料に照射することにより発生する、試料面上の座標0、d/2、dの3点から発せられた戻り光を考える。尚、この3点は照明光のエアリーディスク内にあるものとする。図18において、像前に描かれた3つの曲線は、試料面

50

上の座標 0、 $d/2$ 、 d から発せられた戻り光の、像面におけるそれぞれの強度分布曲線である。図 18 に示すように、強度分布曲線は、それぞれ像面上座標 0、 $d/2$ 、 d にピークを有し、それぞれのピークの高さは、試料面座標 0、 $d/2$ 、 d における照明光強度に比例する。

【0022】

戻り光は、像面にある二次元イメージセンサー（カメラ）によって受光される。像面上座標 d の位置（図 18 のピクセル 2 にあたる位置）における受光量を考える。図 18 において、試料面上座標 0、 $d/2$ 、 d から発せられた戻り光のそれぞれの強度分布を、像面上座標 d の位置において比較すると、試料面上座標 $d/2$ からの戻り光が最も大きくなることが分かる。つまり、像面上座標 d の位置のピクセルは、試料面上座標 d からの戻り光ではなく、試料面上座標 $d/2$ からの戻り光を最も明るく受光する。このことは、エアリーディスク内という微視的な領域において、試料面から像面へ 2 倍に拡大投影されていることを示している。

10

【0023】

上記の光学的な現象は、数式を用いて次のように説明される。

戻り光が発生する試料面上の位置を x とし、像面上の位置 d における受光量を $I(x)$ と定義した場合、受光量 $I(x)$ は、式(1)により表される。

ここで、 $PSF_{ill}(x)$ 及び $PSF_{img}(x)$ は、それぞれ照明側及び撮像側の点像分布関数である。

【0024】

20

【数1】

$$I(x) = PSF_{ill}(x) \times PSF_{img}(x-d) \quad \dots (1)$$

【0025】

一般に点像分布関数 $PSF(x)$ は、第 1 種ベッセル関数 J_1 と光学系の開口数 NA と波長 λ を用いて、式(2)により表される。

【0026】

【数2】

$$PSF(x) = \left(\frac{J_1(2\pi \cdot NA \cdot x/\lambda)}{\pi \cdot NA \cdot x/\lambda} \right)^2 \quad \dots (2)$$

30

【0027】

式(1)より、 $I(x)$ は、ピーク位置が距離 d だけ異なる 2 つの点像分布関数の積として表されるので、 $I(x)$ の概形は、図 19（横軸：座標、縦軸：光強度）に示すように、 $d/2$ にピークを有する。つまり、像面上座標 d の位置のピクセルは、試料面上座標 $d/2$ からの戻り光を最も明るく受光することが、数式(1)からも示される。

【0028】

40

以上のように、二次元イメージセンサー（カメラ）を用いた共焦点光学系においては、非走査共焦点像の個々の輝点を中心としたエアリーディスク内の領域では、試料面から像面へ 2 倍に拡大投影されている。このため、エアリーディスク領域内を 1/2 に縮小し、試料面上座標と像面上座標とを一致させる補正処理を行うことにより、光学系の解像限界を上回る高周波成分を得ることができる。何故ならば、エアリーディスク領域内を 1/2 に縮小する処理は、光学系の点像分布関数の幅を半分にすることに相当するためである。以上の結果として、光学系の解像限界（回折限界）の 2 倍の解像度を持つ超解像画像を得られる。

【0029】

(B2) 従来技術 2 の課題

50

上述した通り、従来技術 2 の手法は、一枚の超解像画像を得るために、数百枚の非走査共焦点像を撮影する必要がある。その際、一枚の超解像画像につき数十秒の撮影時間を要するため、時間分解能が低く、高速な現象を捉えることが困難であることから、リアルタイムでの超解像画像の表示が極めて難しい。

【0030】

また、高速なシャッタと同期制御装置及び高性能の PC が必要となり、装置構成が複雑かつ高価にならざるを得ない。

また、本手法による解像度の向上は、撮影された画像の面内 (X Y 面内) のみであり、画像に対し垂直な光軸方向 (Z 軸方向) の解像度は向上しない。従って、試料の立体構造を詳細に観察することが困難であるという課題もあった。

10

【0031】

(C) 従来技術 3

超解像効果を有する共焦点顕微鏡の他の一例として、たとえば特許文献 2 に記載された「Multi-Focal Structured Illumination Microscopy」方式が挙げられる。以下では、図 20 を参照して構成および動作を説明する。

【0032】

(C1) 従来技術 3 の構成および動作

共焦点光スキャナ 350 は、多数のマイクロレンズが規則的に配設されたマイクロレンズアレイ 341、352、353 と、ピンホールアレイ 351 と、ガルバノミラー 349 と、ビームスプリッタ 306 と、リレーレンズ 343、344、345 と、ミラー 346、347 を備えている。

20

【0033】

ピンホールアレイ 351 は、マイクロレンズアレイ 341 の個々のマイクロレンズ 341a の焦点位置に光学的に対応する位置 (共役な位置) に、遮光マスク 351b の開口部であるピンホール 351a が配設されている。マイクロレンズアレイ 352 は、ピンホールアレイ 351 の個々のピンホール 351a と対向する位置にマイクロレンズ 352a が配設されている。更に、マイクロレンズアレイ 353 は、マイクロレンズアレイ 352 の個々のマイクロレンズ 352a と対向する位置にマイクロレンズ 353a が配設されている。但し、マイクロレンズ 341a、352a、353a は、レンズ効果を備えていれば他の光学素子 (例えば、フレネルレンズ、回折光学素子など) に置き換える構わないのである。

30

【0034】

ピンホールアレイ 351 とマイクロレンズアレイ 352 との間隔は、マイクロレンズアレイ 352 の個々のマイクロレンズ 352a の焦点距離に等しい。従って、マイクロレンズアレイ 352 は、ピンホールアレイ 351 側から入射した光線を、マイクロレンズアレイ 352 出射後の空間において、平行光に変換する。マイクロレンズアレイ 353 の個々のマイクロレンズ 353a の焦点距離は、マイクロレンズ 352a の 1 / 2 としてある。従って、マイクロレンズアレイ 352 及び 353 は、ピンホールアレイ 351 から入射した光線を、マイクロレンズアレイ 353 出射後の空間において、マイクロレンズ 352 入射前の 2 倍の開口数を持つ光線に変換する。

40

【0035】

光源装置 305 は、図示しないレーザー等の光源と光学系から成り、コリメートされた照明光を出射する。照明光は、マイクロレンズアレイ 341 により、多数の照明光ビームレットに分割される。マイクロレンズアレイ 341 は、照明光ビームレットの開口数が、対物レンズ 307 の開口数を倍率で割った値に近いか、より大きくなるよう設計されていることが望ましい。

【0036】

照明光は、ビームスプリッタ 306 及びリレーレンズ 343 を通過し、ガルバノミラー 349 により反射され、リレーレンズ 344 及び対物レンズ 307 を通過して、試料 308 上に集光される。このとき、ガルバノミラー 349 を変向させることで、試料 308 全体を照明光で走査する。

50

【0037】

試料308は、照明光に基づく戻り光を発する。特に蛍光試料観察の場合、試料308は、蛍光色素等で特定の構造を染色したものであり、照明光により蛍光色素分子が励起され、照明光より長波長の蛍光を発する。

【0038】

対物レンズ307により捉えられた戻り光は、リレーレンズ344を通過し、ガルバノミラー349で反射（デスキャン）され、リレーレンズ343を通過し、ビームスプリッタ306で反射される。特に蛍光観察の場合、ビームスプリッタ306は照明光を透過し、照明光より波長の長い蛍光である戻り光を反射する、ショートパス特性の波長分光ビームスプリッタである。

10

【0039】

ビームスプリッタ306で反射された戻り光は、ピンホールアレイ351上に集光され、ピンホール351aを通過する。このとき、対物レンズ307の試料側焦点面からの戻り光のみがピンホール351aを通過する。一方、焦点面以外からの戻り光はピンホール351a上に焦点を結ばないため、ピンホールアレイ351の遮光マスク351bにより遮られ、大部分はピンホール351aを通過できない。

【0040】

ピンホール351aを通過した戻り光は、マイクロレンズアレイ352、353により、マイクロレンズアレイ352に入射する前の2倍の開口数を持つ光線に変換される。

20

【0041】

マイクロレンズアレイ353を通過した戻り光は、リレーレンズ345、ミラー346、ミラー347を通過して、ガルバノミラー349で反射（リスキャン）され、撮像レンズ348により、カメラ310上に結像する。このとき、リレーレンズ345及び撮像レンズ348の開口数は、マイクロレンズ352、353により2倍の開口数に変換後の戻り光の開口数に近いか、より大きいことが望ましい。

【0042】

同時に、ガルバノミラー349を変向させて、試料308全体を照明光で走査し、更に、試料308からの戻り光をカメラ310上に走査投影することで、試料308の超解像共焦点像をカメラ310で撮像可能としている。

【0043】

30

「従来技術2」は、図18及び図19を参照して上述したように、二次元イメージセンサー（カメラ）を用いた共焦点光学系においては、個々の輝点を中心としたエアリーディスク内の領域では、試料面から像面へ2倍に拡大投影されているため、エアリーディスク領域内を1/2に縮小し、試料面上座標と像面上座標を一致させる補正処理を行うことで、光学系の解像限界を上回る高周波成分を得ることができる。これに対して、「従来技術3」では、エアリーディスク領域内の1/2倍の縮小を光学的に実施している。なぜなら、マイクロレンズアレイ352、353により、対物レンズ307からの戻り光の開口数を2倍に変換することで、式(2)より光学系の点像分布関数の幅が1/2になり、即ち、エアリーディスク領域内が1/2に縮小された形でカメラ310に投影されるためである。

40

【0044】

また、「従来技術2」では、数百枚の非走査共焦点像を撮影し、それらを積算する必要があった。これに対して、「従来技術3」によれば、光学的にエアリーディスク領域内を1/2に縮小した状態でカメラ310に投影されているので、ガルバノミラー349を変向させて試料308全体を照明光で走査する間、一回の撮影のみを行えばよく、短時間で容易に光学系の解像限界（回折限界）の2倍の解像度を持つ超解像共焦点像を得ることができる。

【0045】

(C2) 従来技術3の課題

従来技術3を実施するためには、次の3点が安定に確保することが重要である。

50

・マイクロレンズアレイ 341 を構成する個々のマイクロレンズ 341a の焦点位置と、ピンホールアレイ 351 の個々のピンホール 351a の位置とは、光学的に対応する位置関係（共役）となるよう精密に配置する必要がある。

・ピンホールアレイ 351 の個々のピンホール 351a は、マイクロレンズアレイ 352 の個々のマイクロレンズ 352a の焦点位置に精密に配置する必要がある。

・マイクロレンズアレイ 353 の個々のマイクロレンズ 353a は、マイクロレンズアレイ 352 の個々のマイクロレンズ 352a と同軸となるよう精密に配置する必要がある。

【0046】

以上のように、空間的に隔てて配置された複数のマイクロ光学素子（マイクロレンズアレイ 341、352、353 及びピンホールアレイ 351）のそれぞれを精密に配置する必要があるため、従来技術 3 は、精密な位置・角度調整機構が複数必要となり、構成が複雑かつ高価で、光学調整が困難である。また、従来技術 3 では、複数のマイクロ光学素子が空間的に隔てて配置されているため、温度等の環境変化によって、マイクロ光学素子同士の相対位置が変化し、容易に光学調整が崩れてしまい、長期間、安定して使用することができないという課題もあった。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0047】

【特許文献 1】特開 2012 - 78408 号公報（特許第 5412394 号公報）

【特許文献 2】国際公開第 2013 / 126762 号

20

【非特許文献 1】Schulz, O. et al. Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, Vol.110, pp.21000-21005 (2013)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0048】

本発明は、このような従来の実情に鑑みて考案されたものであり、画像処理による偽解像やアーティファクトの影響が抑制された超解像画像を高速（リアルタイム）に得られ、構成が簡素で安価であり、光学調整が容易で環境安定性が高く、さらには、画像の X Y 面内だけでなく、軸方向（Z 軸方向）にも超解像効果を有し、試料の立体構造を微細観察するのに適した共焦点光スキャナを提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0049】

本発明の請求項 1 に記載の共焦点光スキャナは、複数のピンホールを有する光フィルタリング手段と、光を試料上に走査する走査手段とを含む共焦点光スキャナであって、前記光フィルタリング手段は、平板状の本体、該本体の一方の正面側に配された前記ピンホール、及び、該本体の他方の正面において前記ピンホールと略同軸をなす位置に配されたマイクロレンズ、を備えることを特徴とする。

本発明の請求項 2 に記載の共焦点光スキャナは、請求項 1 において、前記光フィルタリング手段はディスク形状を成しており、前記走査手段はモーターから成り、前記マイクロレンズは凸レンズ状を成す構成を備え、前記マイクロレンズが、前記光フィルタリング手段の前記試料側に位置する正面に配されたことを特徴とする。

40

本発明の請求項 3 に記載の共焦点光スキャナは、請求項 1 において、前記光フィルタリング手段はディスク形状を成しており、前記走査手段はモーターから成り、前記マイクロレンズは凹レンズ状を成す構成を備え、前記マイクロレンズが、前記光フィルタリング手段の前記試料と反対側に位置する正面に配されたことを特徴とする。

本発明の請求項 4 に記載の共焦点光スキャナは、請求項 1 において、前記光フィルタリング手段はアレイ形状を成しており、前記走査手段はガルバノミラーから成り、前記マイクロレンズは凸レンズ状を成す構成を備え、前記マイクロレンズが、前記光フィルタリン

50

グ手段の入射側に位置する主面に配されたことを特徴とする。

本発明の請求項 5 に記載の共焦点光スキャナは、請求項 1 において、前記光フィルタリング手段はアレイ形状を成しており、前記走査手段はガルバノミラーから成り、前記マイクロレンズは凹レンズ状を成す構成を備え、前記マイクロレンズが、前記光フィルタリング手段の出射側に位置する主面に配されたことを特徴とする。

本発明の請求項 6 に記載の共焦点光スキャナは、請求項 1 において、前記光フィルタリング手段はディスク形状の本体から構成され、前記走査手段はモーターから成り、前記マイクロレンズが、該本体の前記試料側に位置する主面に凸レンズ状を成す構成を備え、前記ピンホールが、該本体の前記試料と反対側に位置する主面に形成された凹状のミラーの中心と同軸を成すように配されていることを特徴とする。 10

本発明の請求項 7 に記載の共焦点光スキャナは、請求項 1 乃至 6 のいずれか一項において、前記光フィルタリング手段と前記走査手段に加えて、中間変倍光学系を備えることを特徴とする。

本発明の請求項 8 に記載の共焦点光スキャナは、請求項 1 乃至 7 のいずれか一項において、前記光フィルタリング手段は、前記試料から入射する光の開口数を、前記光フィルタリング手段に入射する前の 1 . 2 ~ 4 倍に変換して出射することを特徴とする。

【発明の効果】

【0050】

本発明の共焦点光スキャナは、複数のピンホールを有する光フィルタリング手段と、光を試料上に走査する走査手段とを含み、前記光フィルタリング手段は、平板状の本体と、該本体の一方の主面に配された前記ピンホールと、該本体の他方の主面において前記ピンホールと略同軸をなす位置に配されたマイクロレンズと、を備えている。 20

かかる構成によれば、マイクロレンズ付きピンホールディスクにより、対物レンズからの戻り光の開口数を変換できるので、光学系の点像分布関数の幅が小さくなり、即ち、エアリーディスク領域内が縮小された形でカメラに投影される。

これにより、本発明は、画像処理による偽解像やアーティファクトの影響が抑制された超解像画像を高速（リアルタイム）に取得できるとともに、構成が簡素で安価であり、光学調整が容易で環境安定性の高い共焦点光スキャナを提供することができる。

また、上記構成からなる共焦点光スキャナは、画像の X Y 面内だけでなく、軸方向（Z 軸方向）にも超解像効果を有することから、試料の立体構造を微細観察する用途に適している。 30

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図 1】本発明に係る共焦点光スキャナの一例（第一実施形態）を模式的に示す図。

【図 2】図 1 において、マイクロレンズ付きピンホールディスクの一部を拡大して示す図。

【図 3】本発明に係る共焦点光スキャナの他の一例（第二実施形態）を模式的に示す図。

【図 4】図 3 において、マイクロレンズ付きピンホールディスクの一部を拡大して示す図。

【図 5】本発明に係る共焦点光スキャナの他の一例（第三実施形態）を模式的に示す図。 40

【図 6】本発明に係る共焦点光スキャナの他の一例（第四実施形態）を模式的に示す図。

【図 7】本発明に係る共焦点光スキャナの他の一例（第五実施形態）を模式的に示す図。

【図 8】本発明に係る共焦点光スキャナの他の一例（第六実施形態）を模式的に示す図。

【図 9】図 8 の変形例（第六実施形態）を模式的に示す図。

【図 10】図 8 の他の変形例（第六実施形態）を模式的に示す図。

【図 11】図 8 の他の変形例（第六実施形態）を模式的に示す図。

【図 12】図 8 の他の変形例（第六実施形態）を模式的に示す図。

【図 13】図 10 において、スキャンディスクの一部を拡大して示す図。

【図 14】図 10 において、スキャンディスクの一部を拡大して示す図。

【図 15】図 10 において、スキャンディスクの一部を拡大して示す図。 50

【図16】従来の共焦点光スキャナの一例（従来技術1）を模式的に示す図。

【図17】従来の共焦点光スキャナの他の一例（従来技術2）を模式的に示す図。

【図18】二次元イメージセンサー（カメラ）を用いた共焦点光学系を模式的に示す図。

【図19】図18の共焦点光学系における点像分布関数PSF（x）を示す図。

【図20】従来の共焦点光スキャナの他の一例（従来技術3）を模式的に示す図。

【発明を実施するための形態】

【0052】

以下では、本発明に係る共焦点光スキャナの一実施形態について、図面に基づいて説明する。

【0053】

<第一実施形態>

本発明に係る共焦点光スキャナの第一実施形態について説明する。

図1は、本実施形態の共焦点光スキャナの一構成例を模式的に示す図である。

この共焦点光スキャナは、複数のピンホールを有する光フィルタリング手段と、光を試料上に走査する走査手段とを備える。

【0054】

そして本実施形態の共焦点光スキャナは、光フィルタリング手段は、平板状の本体と、本体の一方の正面側に配されたピンホールと、他方の正面のピンホールと略同軸をなす位置に配されたマイクロレンズとを備える。

【0055】

光フィルタリング手段はディスク形状をしており、マイクロレンズは凸レンズ状であり、マイクロレンズが光フィルタリング手段の試料側の正面に配されている。すなわち、本実施形態の共焦点光スキャナでは、光フィルタリング手段が、一枚の平板の表裏にピンホールとマイクロレンズとを略同軸に備えている。

【0056】

本実施形態の共焦点光スキャナ20の構成と動作について、図1を参照して説明する。

共焦点光スキャナ20は、多数のマイクロレンズ2aが規則的に配設されたマイクロレンズディスク2と、マイクロレンズ付きピンホールディスク21（光フィルタリング手段）と、それらを回転させるモーター4（走査手段）とを備えている。

【0057】

マイクロレンズ付きピンホールディスク21は、マイクロレンズディスク2の個々のマイクロレンズ2aに対向する位置に、遮光マスク21bの開口部であるピンホール21aが配設される。更に、マイクロレンズ付きピンホールディスク21は、正面に配された個々のピンホール21aと、その正面と反対側に位置する裏面に配されたマイクロレンズ21cとは、略同軸を成すように設けられている。なお、ピンホール21aの中心軸とマイクロレンズ21cの中心軸とのズレ量は、100μm以下であることが望ましい。但し、マイクロレンズ2a及びマイクロレンズ21cは、レンズ効果があれば何れの光学素子でもよく、例えば、フレネルレンズや回折光学素子でも良い。

【0058】

ここで、マイクロレンズ付きピンホールディスク21は、試料から入射する光の開口数を、マイクロレンズ付きピンホールディスク21に入射する前の1.2~4倍に変換して出射する。

なお、以下の説明では、マイクロレンズ付きピンホールディスク21が、試料から入射する光の開口数を、マイクロレンズ付きピンホールディスク21に入射する前の2倍に変換して出射する場合を例に挙げて説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0059】

図2を参照して、マイクロレンズ付きピンホールディスク21の機能を詳細に説明する。図2は、マイクロレンズ付きピンホールディスク21上の一組のピンホール21aとマイクロレンズ21cとを拡大して示した詳細図である。

図2の下方から入射する光線（太い実線）を考えると、この光線は、マイクロレンズ付

10

20

30

40

50

きピンホールディスク 2 1 に入射する以前の空間では、開口数 (Numerical Aperture, NA) が $\sin(\theta)$ で表される収束光線である。即ち、この光線は、光軸に対し θ の傾きを持つ。この光線はマイクロレンズ 2 1 c で屈折されることにより、開口数が $n \times \sin(\theta)$ の光線に変換される。即ち、光軸に対し η の傾きを持つ。但し、 n はマイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 の基材の屈折率である。ここで、マイクロレンズ 2 1 c の曲率半径 r は、この光線がピンホール 2 1 a を出射した後の空間において、開口数が $\sin(2\theta)$ で表される発散光線、即ち、光軸に対し 2θ の傾きを持つ光線となるように決める。

【0060】

これを満たすマイクロレンズ 2 1 c の曲率半径 r は、以下のように求めることが出来る。
10 マイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 の基材の厚さを t 、マイクロレンズ 2 1 c の中心角の半角を η と定義すると、マイクロレンズ 2 1 c における屈折の法則より、式 (3) に示す関係が成り立つ。

【0061】

【数3】

$$\sin(\phi - \theta) = n \sin(\phi - \eta) \quad \dots (3)$$

【0062】

また、ピンホール 2 1 a 側の面における屈折の法則より、式 (4) に示す関係が成り立つ。
20

【0063】

【数4】

$$\sin(2\theta) = n \sin(\eta) \quad \dots (4)$$

【0064】

さらに、マイクロレンズ 2 1 c 側の面において、光線から光軸までの距離に関しては、式 (5) に示す関係が成り立つ。
30

【0065】

【数5】

$$r \sin(\phi) = t \tan(\eta) \quad \dots (5)$$

【0066】

式 (3) ~ (5) より、マイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 の基材の屈折率 n と厚さ t と光線の入射角 θ とが与えられれば、上記の条件を満たすマイクロレンズ 2 1 c の曲率半径 r を一意に求めることができる。例えば、 $n = 1.5$, $t = 3.0 \text{ mm}$, $\eta = 0.015 \text{ rad}$ とした場合、曲率半径 r は 2.0 mm となる。

【0067】

尚、対物レンズ 7 からマイクロレンズ 2 1 c へと入射する戻り光の開口数は、対物レンズ 7 の開口数を倍率で割った値であり、その値は一般に $0.01 \sim 0.05 \text{ rad}$ の範囲であるから、 $\sin(\theta)$ の近似が成り立つ。つまり、空気中における開口数 $\sin(\theta)$ と、光軸に対する角度 θ とは略等しい。従って、マイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 は、マイクロレンズ 2 1 c 側から入射した光線を、ピンホール 2 1 a 出射後の空間において、入射前の 2 倍の開口数を持つ光線に変換する機能を有すると言える。逆に、ピンホール 2 1 a 側から入射した光線を、マイクロレンズ 2 1 c 出射後の空間において、入射前の 1 / 2 倍の開口数を持つ光線に変換する機能を有すると言える。以上がマイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 の機能の詳細説明である。
40

【0068】

再び、図 1 を参照して説明する。

光源装置 5 は、不図示のレーザー等の光源と光学系から成り、コリメートされた照明光を出射する。共焦点光スキャナ 2 0 に入射した照明光は、マイクロレンズディスク 2 上の
50

多数のマイクロレンズ 2 a により、多数の照明光ビームレットに分割される。分割された光は、ビームスプリッタ 6 を透過し、マイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 上の多数のピンホール 2 1 a のうち、通過したマイクロレンズ 2 a に対向する位置にあるピンホールを通過する。尚、照明光がピンホール 2 1 a を効率良く通過するように、ピンホール 2 1 a は、マイクロレンズ 2 a の焦点面に配設されている。更に、照明光はマイクロレンズ 2 1 c を通過する。その際、上述のようにマイクロレンズ 2 1 c によって、照明光の、個々のビームレットの開口数が 1 / 2 に変換される。ここで、変換後のビームレットの開口数は、対物レンズ 7 の開口数を倍率で割った値に近いか、より大きいことが望ましい。

【 0 0 6 9 】

マイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 を通過した照明光は、対物レンズ 7 により試料 8 上に集光される。試料 8 は、照明光に基づく戻り光を発する。特に蛍光試料観察の場合、試料 8 は蛍光色素等で特定の構造を染色したものであり、照明光により蛍光色素分子が励起され、照明光より長波長の蛍光を発する。

【 0 0 7 0 】

対物レンズ 7 により捉えられた戻り光は、共焦点光スキャナ 2 0 のマイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 上に集光され、マイクロレンズ 2 1 c により 2 倍の開口数に変換され、ピンホール 2 1 a を通過する。このとき、対物レンズ 7 の試料側焦点面からの戻り光のみがピンホール 2 1 a を通過する。一方、焦点面以外からの戻り光はピンホール 2 1 a 上に焦点を結ばないため、マイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 の遮光マスク 2 1 b により遮られ、大部分はピンホール 2 1 a を通過できない。

【 0 0 7 1 】

ピンホール 2 1 a を通過した戻り光は、ビームスプリッタ 6 により反射される。特に蛍光観察の場合、ビームスプリッタ 6 は、照明光を透過し、照明光より波長の長い蛍光である戻り光を反射する、ショートパス特性の波長分光ビームスプリッタである。ビームスプリッタ 6 を反射した戻り光は、撮像レンズ 9 によりカメラ 1 0 上に結像する。このとき、撮像レンズ 9 の開口数は、マイクロレンズ 2 1 c により 2 倍の開口数に変換され、カメラ 1 0 に結像する際の戻り光の開口数に近いか、より大きいことが望ましい。

【 0 0 7 2 】

同時に、モーター 4 によりマイクロレンズディスク 2 とマイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 とを回転させ、試料 8 全体を照明光で走査する。これにより試料 8 の超解像共焦点像をカメラ 1 0 で撮像可能としている。

【 0 0 7 3 】

「従来技術 2」において図 1 8 及び図 1 9 を参照して説明したように、二次元イメージセンサー（カメラ）を用いた共焦点光学系においては、個々の輝点を中心としたエアリーディスク内の領域では、試料面から像面へ 2 倍に拡大投影されている。このため、エアリーディスク領域内を 1 / 2 に縮小し、試料面上座標と像面上座標を一致させる補正処理を行うことで、光学系の解像限界を上回る高周波成分を得ることができる。

【 0 0 7 4 】

これに対し、本実施形態では、エアリーディスク領域内の 1 / 2 倍の縮小を光学的に実施している。なぜなら、マイクロレンズ付きピンホールディスク 2 1 により、対物レンズ 7 からの戻り光の開口数を 2 倍に変換することで、式(2)より、光学系の点像分布関数の幅が 1 / 2 になり、即ち、エアリーディスク領域内が 1 / 2 に縮小された形でカメラ 1 0 に投影されるからである。

【 0 0 7 5 】

さらに、「従来技術 2」においては、数百枚の非走査共焦点像を撮影し、それらを積算する必要があったが、本実施形態によれば、光学的にエアリーディスク領域内を 1 / 2 に縮小した状態でカメラ 1 0 に投影されているので、モーター 4 を回転させて試料 8 全体を照明光で走査する間、一回の撮影のみを行えばよい。これにより、非常に短時間で容易に、光学系の解像限界（回折限界）の 2 倍の解像度を持つ超解像共焦点像を得られる。

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

50

また、「従来技術1」においては、撮影された画像に高周波強調処理を施す必要があつたが、本実施形態によれば、カメラ10で撮影された画像そのものが、光学系の解像限界(回折限界)の2倍の解像度を持つ超解像共焦点像であり、撮影された画像に高周波強調処理を施す必要が無い。このため、カメラで撮影された共焦点像に含まれるノイズ成分による、様々な偽解像やアーティファクトを生じる危険性が無い。従って、高周波強調処理の強度や帯域といったパラメータを試行錯誤する必要が無く、偽解像に惑わされる危険性も無い。

【0077】

また、本実施形態では、光学的に対物レンズ7からの戻り光がカメラ10に投影されるときの開口数を2倍に変換しているため、撮影された画像の面内(XY面内)のみならず、画像に対し垂直な光軸方向(Z軸方向)も解像度が向上する。なぜなら、光軸方向の点像分布関数は、以下に示す式(6)で表され、光軸方向の点像分布関数の幅は開口数の2乗に反比例するためである。従って、本発明は、試料の立体構造を詳細に観察するのに好適である。10

【0078】

【数6】

$$PSF_{\text{axial}}(z) = \left(\frac{\sin(\pi \cdot NA^2 \cdot z / (2\lambda))}{\pi \cdot NA^2 \cdot z / (2\lambda)} \right)^2 \quad \dots (6)$$

20

【0079】

また、本実施形態におけるマイクロレンズ付きピンホールディスク21は、一枚の基板上にピンホール21aとマイクロレンズ21cとを形成してあるため、ピンホール21aとマイクロレンズ21c間の機械的な調整が不要であり、機械的安定性や、温度等の環境変化に対する安定性が非常に良いという優れた特徴をも有する。また、共焦点光スキャナ1は、マイクロレンズディスク2とマイクロレンズ付きピンホールディスク21とをモーター4の同軸上に固定した構造であり、機械的安定性や、温度等の環境安定性、調整性が優れている。30

【0080】

また、本実施形態は、従来の共焦点光スキャナにおけるピンホールディスクをマイクロレンズ付きピンホールディスク21に置き換えたのみであり、装置構成が容易かつ安価である。

【0081】

<第二実施形態>

つぎに、本発明に係る共焦点光スキャナの第二実施形態について説明する。

図3は、本実施形態の共焦点光スキャナの一構成例を模式的に示す図である。

なお、本実施形態においては、上述した第一実施形態と異なる部分について主に説明し、第一実施形態とほぼ同様の部分については、同じ符号を付するとともに、その詳細な説明を省略する。40

【0082】

本実施形態の共焦点光スキャナにおいて、走査手段はモーターであり、光フィルタリング手段はディスク形状をなしており、マイクロレンズは凹レンズ状であり、マイクロレンズが光フィルタリング手段の試料と反対側の正面に配されている。

【0083】

第二実施形態の共焦点光スキャナ30の構成と動作について、図3を参照して説明する。

共焦点光スキャナ30は、多数のマイクロレンズ2aが規則的に配設されたマイクロレンズディスク2と、マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク31(光フィルタリング手段)と、それらを回転させるモーター4(走査手段)とを備えている。マイクロ凹レンズ

50

付きピンホールディスク31は、マイクロレンズディスク2の個々のマイクロレンズ2aに対向する位置にマイクロ凹レンズ31cが配設され、更に、個々のマイクロ凹レンズ31cの裏面に遮光マスク31bの開口部であるピンホール31aが配設されている。但し、マイクロレンズ2a及びマイクロ凹レンズ31cは、レンズ効果があれば何れの光学素子でもよく、例えば、フレネルレンズや回折光学素子でも良い。

【0084】

ここで図4を参照して、マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク31の機能を詳細に説明する。図4は、マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク31上の一組のピンホール31aとマイクロ凹レンズ31cとを拡大して示した詳細図である。

図4の下方から入射する光線(太い実線)を考えると、この光線はマイクロ凹レンズ付きピンホールディスク31に入射する以前の空間では、開口数が $\sin(\theta)$ で表される収束光線である。即ち、この光線は、光軸に対し θ の傾きを持つ。この光線はピンホール31aへの入射面で屈折されることにより、開口数が $n \times \sin(\eta)$ の光線に変換される。即ち、光軸に対し η の傾きを持つ。但し、nはマイクロ凹レンズ付きピンホールディスク31の基材の屈折率である。ここで、マイクロ凹レンズ31cの曲率半径rは、この光線がマイクロ凹レンズ付きピンホールディスク31の反対側のマイクロ凹レンズ31cを出射した後の空間において、開口数が $\sin(2\phi)$ で表される発散光線、即ち、光軸に対し 2ϕ の傾きを持つ光線となるように決める。

【0085】

これを満たすマイクロ凹レンズ31cの曲率半径rは、以下のように求めることができます。

【0086】

マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク31の基材の厚さをt、マイクロ凹レンズ31cの中心角の半角を θ とすると、マイクロ凹レンズ31cにおける屈折の法則より、式(7)に示す関係が成り立つ。

【0087】

【数7】

$$\sin(2\theta + \phi) = n \sin(\eta + \phi) \quad \dots (7)$$

30

【0088】

また、遮光マスク31b側の面における屈折の法則より、式(8)に示す関係が成り立つ。

【0089】

【数8】

$$\sin(\theta) = n \sin(\eta) \quad \dots (8)$$

【0090】

さらに、マイクロ凹レンズ31c側の面において、光線から光軸までの距離に関しては、式(9)に示す関係が成り立つ。

【0091】

【数9】

$$r \sin(\phi) = t \tan(\eta) \quad \dots (9)$$

【0092】

式(7)～(9)より、マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク31の基材の屈折率nと厚さtと光線の入射角 θ とが与えられれば、上記の条件を満たすマイクロ凹レンズ31cの曲率半径rを一意に求めることができる。例えば、n = 1.5, t = 3.0 mm,

40
50

= 0 . 0 1 5 r a d とした場合、曲率半径 r は 1 . 0 mm となる。

【 0 0 9 3 】

以上より、マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク 3 1 は、ピンホール 3 1 a 側から入射した光線を、マイクロ凹レンズ 3 1 c 出射後の空間において、入射前の 2 倍の開口数を持つ光線に変換する機能を有すると言える。逆に、マイクロ凹レンズ 3 1 c 側から入射した光線を、ピンホール 3 1 a 出射後の空間において、入射前の 1 / 2 倍の開口数を持つ光線に変換する機能を有すると言える。以上がマイクロ凹レンズ付きピンホールディスク 3 1 の機能の詳細説明である。

【 0 0 9 4 】

再び、図 3 を参照して、説明する。

10

光源装置 5 は、不図示のレーザー等の光源と光学系から成り、コリメートされた照明光を出射する。共焦点光スキャナ 3 0 に入射した照明光は、マイクロレンズディスク 2 上の多数のマイクロレンズ 2 a により、多数の照明光ビームレットに分割される。分割された照明光は、ビームスプリッタ 6 を透過し、マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク 3 1 上の多数のマイクロ凹レンズ 3 1 c のうち、通過したマイクロレンズ 2 a に対向する位置にあるマイクロ凹レンズを通過する。その際、上述のようにマイクロ凹レンズ 3 1 c によって、個々のビームレットの開口数が 1 / 2 に変換される。ここで、変換後のビームレットの開口数は、対物レンズ 7 の開口数を倍率で割った値に近いか、より大きいことが望ましい。更に、照明光はピンホール 3 1 a を通過する。尚、照明光がピンホール 3 1 a を効率良く通過するよう、ピンホール 3 1 a はマイクロレンズ 2 a の焦点面に配設されている。

20

【 0 0 9 5 】

マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク 3 1 を通過した照明光は、対物レンズ 7 により試料 8 上に集光される。試料 8 は、照明光に基づく戻り光を発する。特に蛍光試料観察の場合、試料 8 は蛍光色素等で特定の構造を染色したものであり、照明光により蛍光色素分子が励起され、照明光より長波長の蛍光を発する。

【 0 0 9 6 】

対物レンズ 7 により捉えられた戻り光は、共焦点光スキャナ 3 0 のマイクロ凹レンズ付きピンホールディスク 3 1 上に集光され、ピンホール 3 1 a を通過し、マイクロ凹レンズ 3 1 c により 2 倍の開口数に変換される。このとき、対物レンズ 7 の試料側焦点面からの戻り光のみがピンホール 3 1 a を通過する。一方、焦点面以外からの戻り光はピンホール 3 1 a 上に焦点を結ばないため、マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク 3 1 の遮光マスク 3 1 b により遮られ、大部分はピンホール 3 1 a を通過できない。

30

【 0 0 9 7 】

マイクロ凹レンズ付きピンホールディスク 3 1 を通過した戻り光は、ビームスプリッタ 6 により反射される。特に蛍光観察の場合、ビームスプリッタ 6 は、照明光を透過し、照明光より波長の長い蛍光である戻り光を反射する、ショートパス特性の波長分光ビームスプリッタである。ビームスプリッタ 6 を反射した戻り光は、撮像レンズ 9 によりカメラ 1 0 上に結像する。このとき、撮像レンズ 9 の開口数は、マイクロ凹レンズ 3 1 c により 2 倍の開口数に変換され、カメラ 1 0 に結像する際の戻り光の開口数に近いか、より大きいことが望ましい。

40

【 0 0 9 8 】

同時に、モーター 4 によりマイクロレンズディスク 2 とマイクロ凹レンズ付きピンホールディスク 3 1 とを回転させ、試料 8 全体を照明光で走査する。これにより試料 8 の超解像共焦点像をカメラ 1 0 で撮像可能としている。

【 0 0 9 9 】

このように、本実施形態の共焦点光スキャナにおいても、マイクロレンズ付きピンホールディスクにより、対物レンズ 7 からの戻り光の開口数を 2 倍に変換することで、光学系の点像分布関数の幅が 1 / 2 になり、即ち、エアリーディスク領域内が 1 / 2 に縮小された形でカメラに投影される。

50

【0100】

これにより本実施形態の共焦点光スキャナでは、画像処理による偽解像やアーティファクトの無い超解像画像を高速（リアルタイム）に得られ、構成が容易で安価であり、光学調整が容易で環境安定性の高いものとなる。

このような共焦点光スキャナは、画像のX Y面内だけでなく、軸方向（Z軸方向）にも超解像効果を有し、試料の立体構造を微細観察するのに適している。

【0101】

<第三実施形態>

つぎに、本発明に係る共焦点光スキャナの第三実施形態について説明する。

図5は、本実施形態の共焦点光スキャナの一構成例を模式的に示す図である。 10

なお、本実施形態においては、上述した実施形態と異なる部分について主に説明し、上述した実施形態とほぼ同様の部分については、同じ符号を付するとともに、その詳細な説明を省略する。

【0102】

本実施形態の共焦点光スキャナにおいて、走査手段はガルバノミラーであり、光フィルタリング手段はアレイ形状をなしており、マイクロレンズは凸レンズ状であり、マイクロレンズが光フィルタリング手段の入射側の正面に配されている。

第三実施形態の共焦点光スキャナ40の構成と動作について、図5を参照して説明する。

共焦点光スキャナ40は、多数のマイクロレンズ41aが規則的に配設されたマイクロレンズアレイ41と、マイクロレンズ付きピンホールアレイ42（光フィルタリング手段）と、ガルバノミラー49（走査手段）と、ビームスプリッタ6と、リレーレンズ43・44・45と、ミラー46・47とを備えている。マイクロレンズ付きピンホールアレイ42は、マイクロレンズアレイ41の、個々のマイクロレンズ41aの焦点位置に光学的に対応する位置（共役な位置）に、遮光マスク42bの開口部であるピンホール42aが配設され、更に、個々のピンホール42aの裏面にマイクロレンズ42cが配設されている。但し、マイクロレンズ41a及びマイクロレンズ42cはレンズ効果があれば何れの光学素子でもよく、例えば、フレネルレンズや回折光学素子でも良い。

【0103】

マイクロレンズ付きピンホールアレイ42は、マイクロレンズ42c側から入射した光線を、ピンホール42a出射後の空間において、入射前の2倍の開口数を持つ光線に変換する。なお、本実施形態におけるマイクロレンズ付きピンホールアレイ42は、照明光を走査する機能は無く、試料からの戻り光をフィルタリングするだけの機能となっている。

【0104】

光源装置5は、不図示のレーザー等の光源と光学系から成り、コリメートされた照明光を出射する。照明光はマイクロレンズアレイ41により、多数の照明光ビームレットに分割される。マイクロレンズアレイ41は、照明光ビームレットの開口数が、対物レンズ7の開口数を倍率で割った値に近いか、より大きくなるよう設計されていることが望ましい。

【0105】

照明光はビームスプリッタ6及びリレーレンズ43を通過し、ガルバノミラー49により反射され、リレーレンズ44及び対物レンズ7を通過して、試料8上に集光される。このとき、ガルバノミラー49を変向させることで、試料8全体を照明光で走査することができる。

【0106】

試料8は照明光に基づく戻り光を発する。特に蛍光試料観察の場合、試料8は蛍光色素等で特定の構造を染色したものであり、照明光により蛍光色素分子が励起され、照明光より長波長の蛍光を発する。

【0107】

対物レンズ7により捉えられた戻り光は、リレーレンズ44を通過し、ガルバノミラー 50

4 9で反射(デスキャン)され、リレーレンズ4 3を通過し、ビームスプリッタ6で反射される。特に蛍光観察の場合、ビームスプリッタ6は照明光を透過し、照明光より波長の長い蛍光である戻り光を反射する、ショートパス特性の波長分光ビームスプリッタである。

【0108】

ビームスプリッタ6で反射された戻り光は、マイクロレンズ付きピンホールアレイ4 2上に集光され、マイクロレンズ4 2 cにより2倍の開口数に変換され、ピンホール4 2 aを通過する。このとき、対物レンズ7の試料側焦点面からの戻り光のみがピンホール4 2 aを通過する。一方、焦点面以外からの戻り光はピンホール4 2 a上に焦点を結ばないため、マイクロレンズ付きピンホールアレイ4 2の遮光マスク4 2 bにより遮られ、大部分はピンホール4 2 aを通過できない。10

【0109】

マイクロレンズ付きピンホールアレイ4 2を通過した戻り光は、リレーレンズ4 5・ミラー4 6・ミラー4 7を通して、ガルバノミラー4 9で反射(リスキャン)され、撮像レンズ4 8により、カメラ1 0上に結像する。このとき、リレーレンズ4 5及び撮像レンズ4 8の開口数は、マイクロレンズ4 2 cにより2倍の開口数に変換後の戻り光の開口数に近いか、より大きいことが望ましい。

【0110】

尚、マイクロレンズ付きピンホールアレイ4 2は、ビームスプリッタ6側にピンホール4 2 aを設け、リレーレンズ4 5側に凹レンズであるマイクロレンズ4 2 cを設けた設計としても良い。20

【0111】

本構成によれば、マイクロレンズ付きピンホールアレイ4 2を通過した戻り光の開口数は、元の開口数の2倍に変換されているので、エアリーディスク領域内の分布を光学的に1/2の範囲に縮小してカメラ1 0に投影される。従って、光学系の解像限界(回折限界)の2倍の解像度を持つ超解像共焦点像を得られる。

【0112】

また、本構成によれば、マイクロレンズ付きピンホールアレイ4 2を戻り光のみが通過し、照明光は通過しないので、マイクロレンズ付きピンホールアレイ4 2によって照明光の開口数が1/2に変換されることが無い。従って、マイクロレンズ4 1 aの開口数を、対物レンズ7の開口数を倍率で割った値に近いか、より大きい値にするという設計条件を容易に満たせるという優れた効果を有する。30

また、本実施形態におけるマイクロレンズ付きピンホールアレイ4 2は、一枚の基板上にピンホール4 2 aとマイクロレンズ4 2 cとを形成してあるため、ピンホール4 2 aとマイクロレンズ4 2 c間の機械的な調整が不要であり、機械的安定性や、温度等の環境変化に対する安定性、調整性が非常に良いという優れた特徴をも有する。

【0113】

なお、本実施形態では、マイクロレンズが凸レンズ状である場合を例に挙げて説明したが、これに限定されず、マイクロレンズが凹レンズ状であってもよい。この場合、マイクロレンズが光フィルタリング手段の出射側の正面に配されている。40

【0114】

<第四実施形態>

つぎに、本発明に係る共焦点光スキャナの第四実施形態について説明する。

図6は、本実施形態の共焦点光スキャナの一構成例を模式的に示す図である。

なお、本実施形態においては、上述した実施形態と異なる部分について主に説明し、上述した実施形態とほぼ同様の部分については、同じ符号を付するとともに、その詳細な説明を省略する。

【0115】

図6に示すように、本実施形態の共焦点光スキャナ6 0は、第一実施形態の共焦点光スキャナ2 0からマイクロレンズディスク2を除いた構成となっている。50

本実施形態の共焦点光スキャナにおいても、マイクロレンズ付きピンホールディスクにより、対物レンズ7からの戻り光の開口数を2倍に変換することで、光学系の点像分布関数の幅が1/2になり、即ち、エアリーディスク領域内が1/2に縮小された形でカメラに投影される。

これにより本実施形態の共焦点光スキャナでは、画像処理による偽解像やアーティファクトの無い超解像画像を高速（リアルタイム）に得られ、構成が容易で安価であり、光学調整が容易で環境安定性の高いものとなる。

このような共焦点光スキャナは、画像のXY面内だけでなく、軸方向（Z軸方向）にも超解像効果を有し、試料の立体構造を微細観察するのに適している。

特に、本実施形態の構成によれば、マイクロレンズディスクを用いないので、構成が容易で安価である。 10

【0116】

<第五実施形態>

つぎに、本発明に係る共焦点光スキャナの第五実施形態について説明する。

図7は、本実施形態の共焦点光スキャナの一構成例を模式的に示す図である。

なお、本実施形態においては、上述した実施形態と異なる部分について主に説明し、上述した実施形態とほぼ同様の部分については、同じ符号を付するとともに、その詳細な説明を省略する。

【0117】

本実施形態の共焦点光スキャナは、光フィルタリング手段と、走査手段とともに、中間変倍光学系を備える。 20

【0118】

本実施形態の共焦点光スキャナ70の構成と動作について、図7を参照して説明する。

共焦点光スキャナ70は、第一実施形態の構成に加え、中間変倍光学系71を備える。中間変倍光学系71はレンズ71a及びレンズ71bを備え、両者の焦点距離の比は2:1であり、倍率2倍の光学系となっている。但し、中間変倍光学系71の倍率や光学系構成はこれに限るものではなく、例えば、倍率可変のズーム光学系であっても良い。

【0119】

中間変倍光学系71は、レンズ71a側から入射した光線の開口数を、レンズ71b側から出射後の空間において2倍の開口数に変換する。逆に、レンズ71b側から入射した光線の開口数を、レンズ71a側から出射後の空間において1/2倍の開口数に変換する。 30

【0120】

従って、マイクロレンズ2aを出射後の照明光は、マイクロレンズ21cにより開口数が1/2に変換されるが、次に中間変倍光学系71により開口数を2倍に変換されて対物レンズ7へ入射するので、照明光の開口数の変換倍率は、トータルとしては1倍となる。

【0121】

ところで、マイクロレンズ2aの開口数について、対物レンズ7に入射するときの照明光の開口数が、対物レンズ7の開口数を倍率で割った値に近いか、より大きいことが望ましいという設計条件がある。本構成によれば、マイクロレンズ2aの開口数と対物レンズ7へ入射するときの照明光の開口数とが等しくなるので、マイクロレンズ2aの開口数を中間変倍光学系71が無い場合の1/2の開口数としても、この設計条件を満たすことが出来る。一般にマイクロレンズは開口数が小さい方が、安価に製作できるので望ましい。 40

【0122】

次に対物レンズ7から出射した戻り光について考えると、中間変倍光学系71により開口数を1/2に変換され、次にマイクロレンズ21cにより開口数を2倍に変換されるので、戻り光の開口数の変換倍率はトータルとしては1倍となる。

【0123】

ところで、撮像レンズ9の開口数について、撮像レンズ9の開口数は、マイクロレンズ21cにより開口数を2倍に変換されカメラ10に結像する際の、戻り光の開口数に近い 50

か、より大きいことが望ましいという設計条件がある。本構成によれば、対物レンズ7を出射した戻り光の開口数と、撮像レンズ9での戻り光の開口数とが等しくなるので、撮像レンズ9の開口数を中間変倍光学系71が無い場合の1/2の開口数としても、この設計条件を満たすことが出来る。一般に撮像レンズは開口数の小さい方が、安価に製作できるので望ましい。

【0124】

尚、中間変倍光学系71の倍率は2倍に限るものではなく、例えば3倍とした場合には、マイクロレンズ2aや撮像レンズ9の開口数を更に小さくしても前述の設計条件を満たすことが出来る。但し、観察視野の大きさは中間変倍光学系71の倍率に反比例するので、これらの条件を考慮して中間変倍光学系の倍率を決定することが望ましい。

10

【0125】

本構成によれば、マイクロレンズ2aや撮像レンズ9の開口数を小さくでき、安価な共焦点光スキャナを提供できる。

【0126】

<第六実施形態>

つぎに、本発明に係る共焦点光スキャナの第六実施形態について説明する。

図8～図15は、本実施形態の共焦点光スキャナの一構成例を模式的に示す図である。

なお、本実施形態においては、上述した実施形態と異なる部分について主に説明し、上述した実施形態とほぼ同様の部分については、同じ符号を付するとともに、その詳細な説明を省略する。

20

【0127】

本実施形態の共焦点光スキャナにおいて、走査手段はモーターであり、光フィルタリング手段はディスク形状の本体から構成されており、本体の試料側の正面には凸レンズ状であるマイクロレンズを備えており、ピンホールは本体の試料と反対側の正面に形成された凹状のマイクロミラーの中心に配されている。すなわち、第六実施形態は、マイクロミラーとして機能する反射膜にピンホールが形成されている。

【0128】

本実施形態の共焦点光スキャナ構成と動作について、図8～図15を参照して説明する。

共焦点光スキャナ80は、コーナーキューブ81とビームスプリッタ6とレンズ82とスキャンディスク83とモーター4とを備えている。スキャンディスク83は、図13に詳細を示すように、コーナーキューブ81側の面に、多数のマイクロ凹ミラー83bを規則的に配設してあり、個々のマイクロ凹ミラー83bの中心には、光を透過する微小開口であるピンホール83aが形成されている。また、個々のマイクロ凹ミラー83bの裏側にはマイクロレンズ83cが形成されている。但し、マイクロレンズ83cはレンズ効果があれば何れの光学素子でもよく、例えば、フレネルレンズや回折光学素子でも良い。スキャンディスク83はモーター4の回転軸に固定されている。

30

【0129】

スキャンディスク83の機能について、図13～図15を参照して詳細に説明する。図13に詳細を示すように、マイクロ凹ミラー83bはレンズ82側から入射した平行光線を、反射し収束光線に変換する凹面鏡である。但し、ピンホール83aに入射した光は反射せずに透過する。また、図14に詳細を示すように、レンズ82側からピンホール83aに集光されスキャンディスク83に入射した光線を、マイクロレンズ83c出射後の空間において、入射前の1/2倍の開口数を持つ光線に変換する。逆に、図15に詳細を示すように、マイクロレンズ83cは、対物レンズ7側からスキャンディスク83に入射した光線を、ピンホール83a出射後の空間において、入射前の2倍の開口数を持つ光線に変換する。

40

【0130】

光源装置5は、不図示のレーザー等の光源を備え、光ファイバ等によりコーナーキューブ81に照明光を入射する。コーナーキューブ81を出射した照明光は、ビームスプリッタ6

50

タ6を通過し、レンズ82により平行光になり、スキャンディスク83のマイクロ凹ミラー83bに入射する(図9)。照明光はマイクロ凹ミラー83bにより、多数の照明光ビームレットに分割され反射される。マイクロ凹ミラー83bで反射した照明光は、レンズ82及びビームスプリッタ6を通過し、コーナーキューブ81へと入射する(図10)。

【0131】

照明光はコーナーキューブ81内部で反射してから、コーナーキューブ81を出射し、ビームスプリッタ6及びレンズ82を通過し、スキャンディスク83のピンホール83aに集光される。ピンホール83aからスキャンディスク83に入射した照明光は、マイクロレンズ83cによって開口数を1/2に変換されてスキャンディスク83を出射し、対物レンズ7によって試料8上に集光される(図11)。ここで、マイクロ凹ミラー83bは、照明光がピンホール83aに焦点を結び、かつ、マイクロレンズ83cを出射後の照明光の開口数が対物レンズ7の開口数を倍率で割った値に近いか、より大きくなるよう構成されている。10

【0132】

試料8は、照明光に基づく戻り光を発する。特に蛍光試料観察の場合、試料8は蛍光色素等で特定の構造を染色したものであり、照明光により蛍光色素分子が励起され、照明光より長波長の蛍光を発する。

【0133】

対物レンズ7により捉えられた戻り光は、スキャンディスク83上に集光され、マイクロレンズ83cにより2倍の開口数に変換されて、ピンホール83aを出射する。このとき、対物レンズ7の試料側焦点面からの戻り光のみがピンホール83aを通過する。一方、焦点面以外からの戻り光はピンホール83a上に焦点を結ばないため、大部分はピンホール83aを通過できない。20

ピンホール83aを通過した戻り光は、レンズ82を通過し、ビームスプリッタ6で反射される。

【0134】

特に蛍光観察の場合、ビームスプリッタ6は、照明光を透過し、照明光より波長の長い蛍光である戻り光を反射する、ショートパス特性の波長分光ビームスプリッタである。ビームスプリッタ6で反射された戻り光は、撮像レンズ9によりカメラ10上に結像する(図12)。ここで、レンズ82及び結像レンズ9の開口数は、ピンホール83aを出射後の戻り光の開口数に近いか、より大きいことが望ましい。30

【0135】

同時に、モーター4によりスキャンディスク83を回転させ、試料8を照明光で走査する。これにより試料8の超解像共焦点像をカメラ10で撮像可能としている。

【0136】

本構成によれば、スキャンディスク83のピンホール83aを出射した戻り光の開口数は、マイクロレンズ83cに入射する前の戻り光の、開口数の2倍に変換されているので、エアリーディスク領域内の分布を光学的に1/2の範囲に縮小してカメラ10に投影される。従って、光学系の解像限界(回折限界)の2倍の解像度を持つ超解像共焦点像を得られる。40

【0137】

また、本構成によれば、1枚のスキャンディスク83上に、ピンホール83aとマイクロ凹ミラー83bとマイクロレンズ83cとを形成しているため、ピンホール83aとマイクロ凹ミラー83bとマイクロレンズ83cとの間の機械的な調整が不要であり、機械的安定性や、温度等の環境変化に対する安定性が非常に良いという優れた特徴を有する。

【0138】

以上、説明してきたような、本発明の第一～第六の実施形態にかかる共焦点光スキャナによれば、マイクロレンズ付きピンホールディスクにより、対物レンズからの戻り光の開口数を例えば2倍に変換することで、光学系の点像分布関数の幅が1/2になり、即ち、エアリーディスク領域内が1/2に縮小された形でカメラに投影される。50

これにより本発明では、画像処理による偽解像やアーティファクトの無い超解像画像を高速（リアルタイム）に得られ、構成が容易で安価であり、光学調整が容易で環境安定性の高い共焦点光スキャナを提供することができる。

このような共焦点光スキャナは、画像の X Y 面内だけでなく、軸方向（Z 軸方向）にも超解像効果を有し、試料の立体構造を微細観察するのに適している。

【0139】

以上、本発明の共焦点光スキャナについて説明してきたが、本発明はこれに限定されるものではなく、発明の趣旨を逸脱しない範囲で、適宜変更が可能である。

上述した全ての実施形態に係る共焦点光スキャナは、反射型共焦点観察や一光子蛍光共焦点観察のみならず、多光子蛍光観察にも適用することができる。実施形態に係る共焦点光スキャナを用いることにより、超解像多光子蛍光像を撮影可能である。10

【産業上の利用可能性】

【0140】

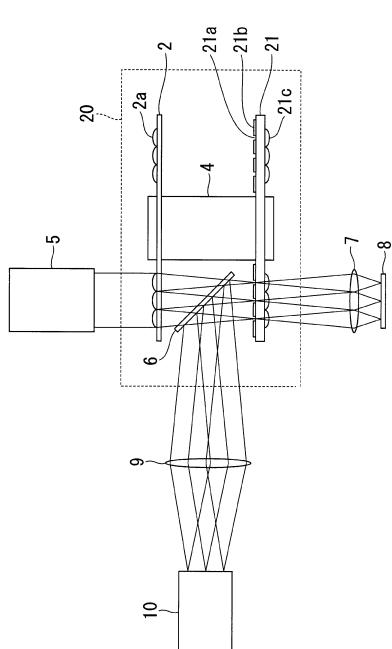
本発明は、共焦点光スキャナに広く適用可能である。

【符号の説明】

【0141】

20, 30, 40, 70, 80 共焦点光スキャナ、2 マイクロレンズディスク、2
a マイクロレンズ、21 マイクロレンズ付きピンホールディスク（光フィルタリング
手段）、21a ピンホール、21b 遮光マスク、21c マイクロレンズ、4 モー
ター（走査手段）。20

【図 1】



【図 2】

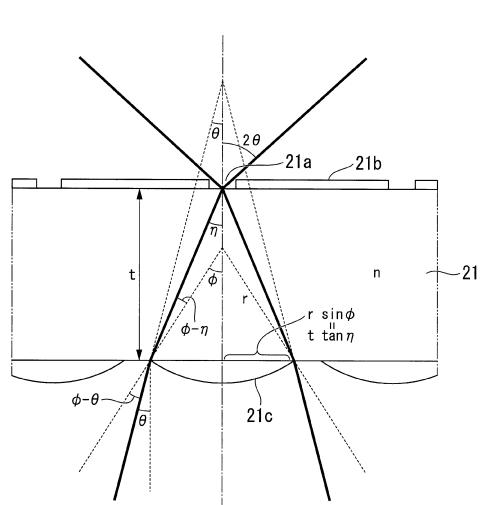
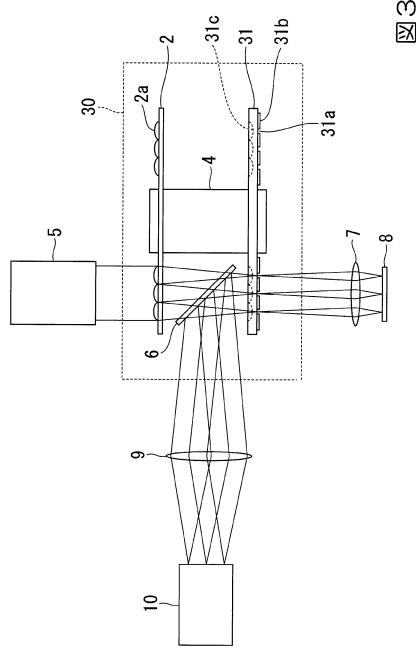


図2

【図3】



【図4】

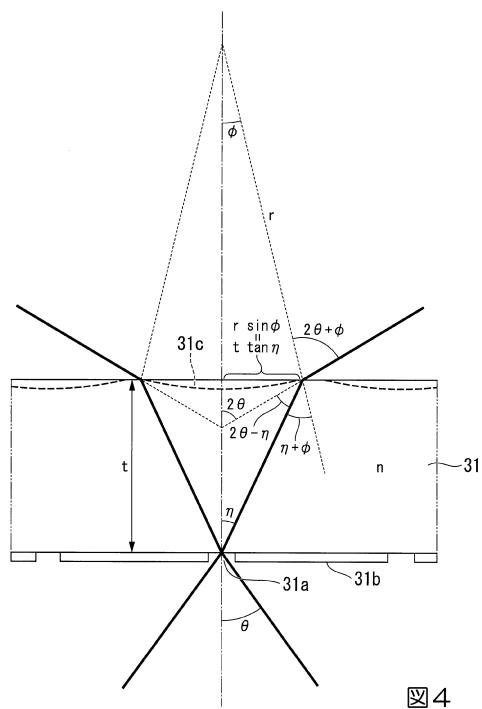
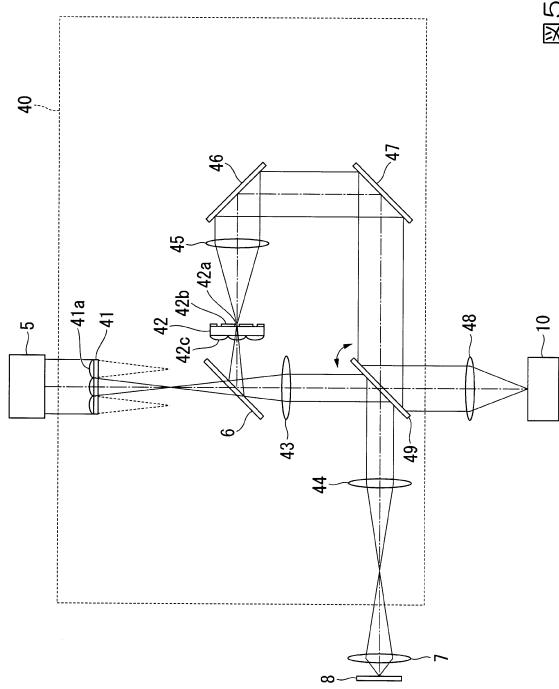


図4

【図5】



【図6】

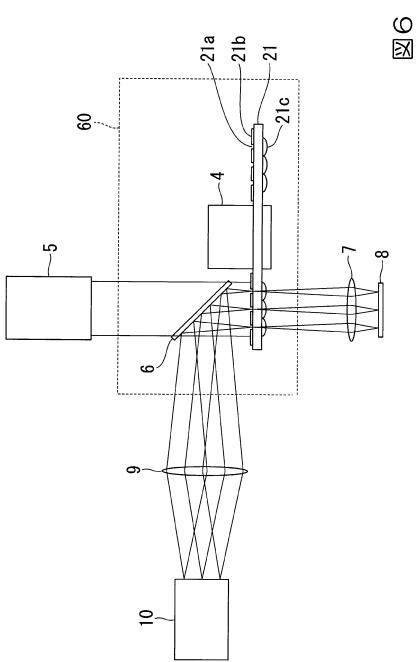


図6

【図7】

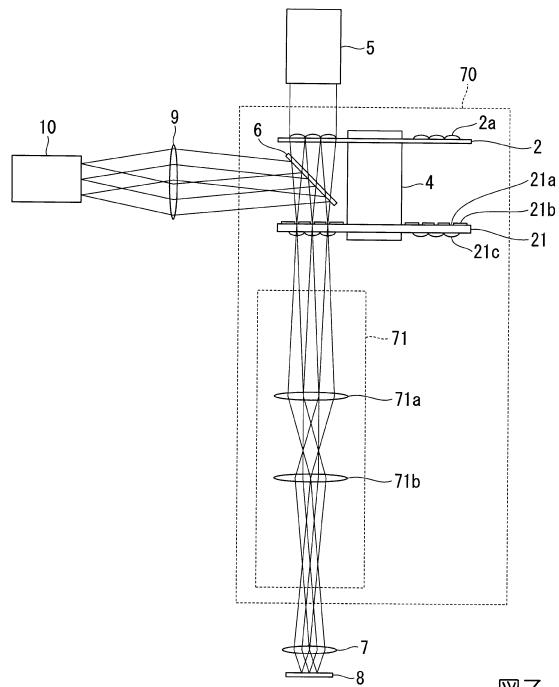


図7

【図8】

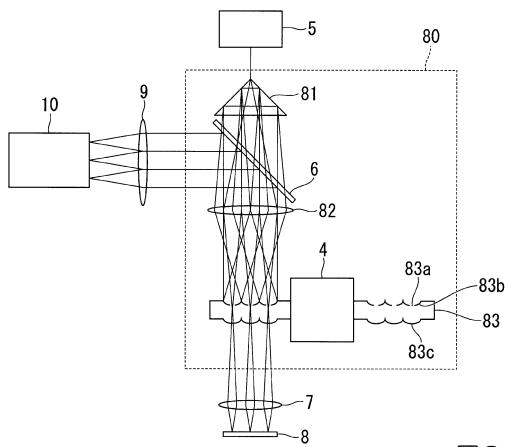


図8

【図9】

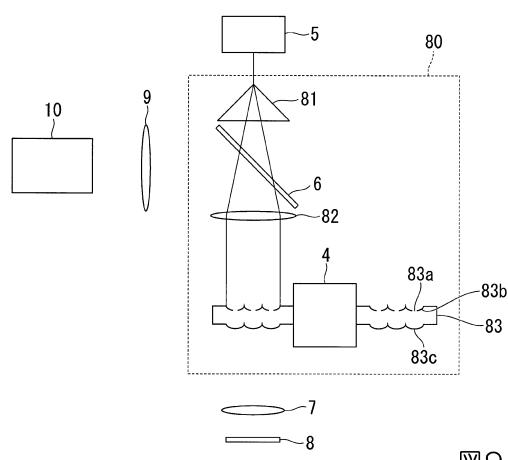


図9

【図10】

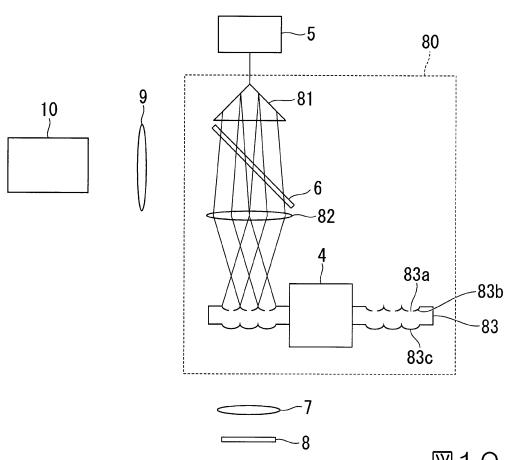


図10

【図11】

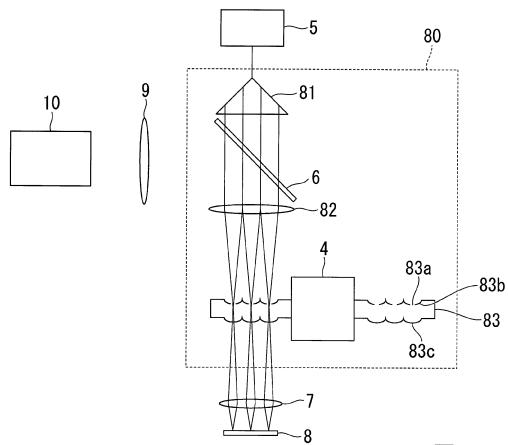


図11

【図12】

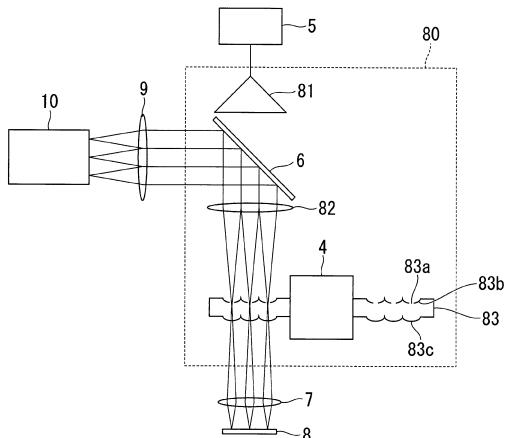


図12

【図13】

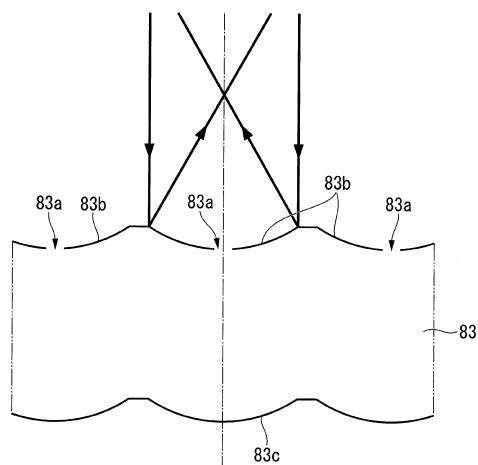


図13

【図14】

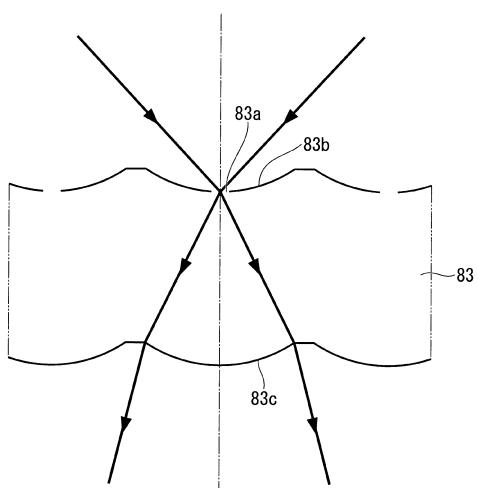


図14

【図15】

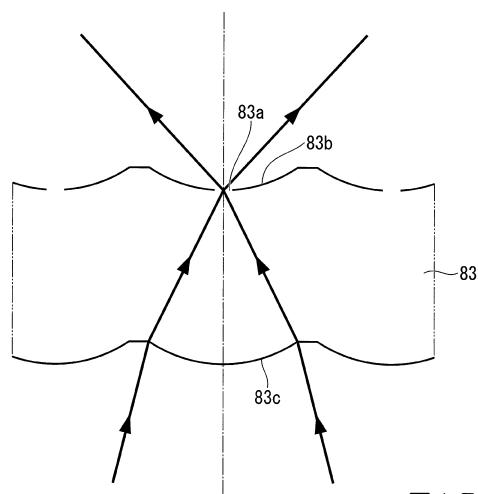


図15

【図16】

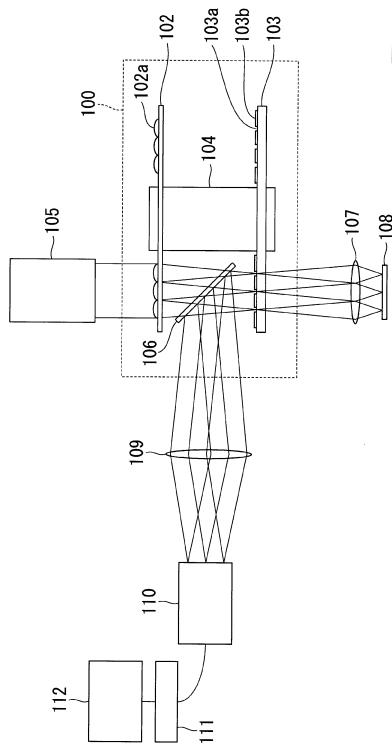


図16

【図17】

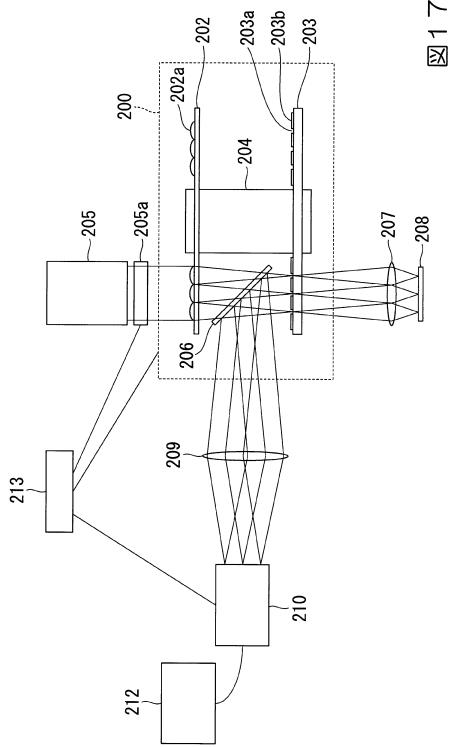


図17

【図18】

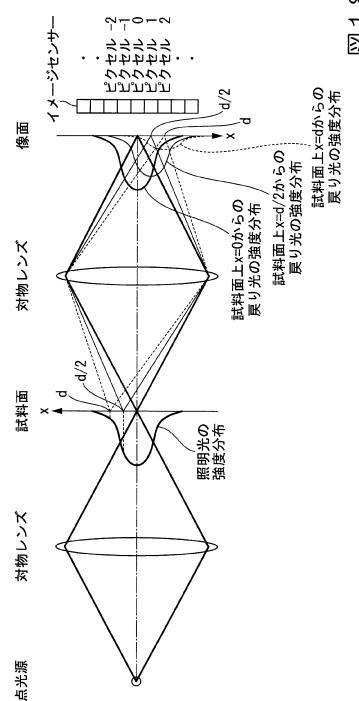
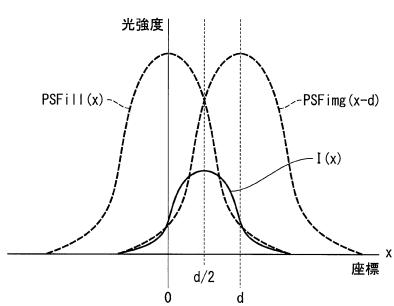


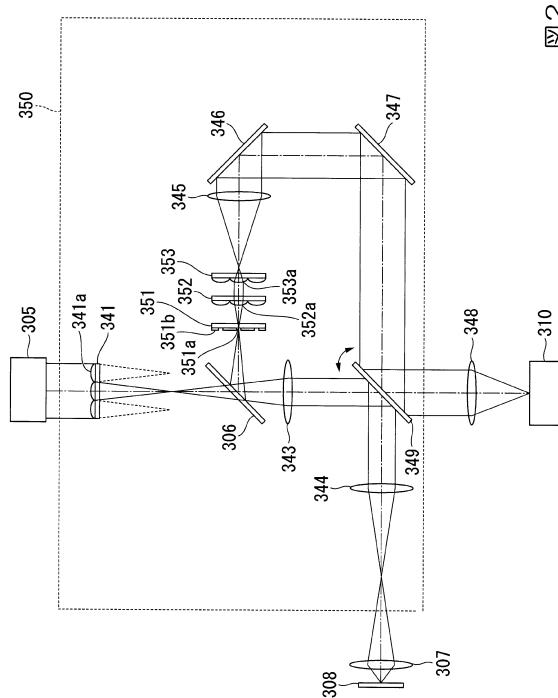
図18

【図19】



19

【図20】



20

フロントページの続き

(72)発明者 東 拓哉

東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会社内

審査官 越河 勉

(56)参考文献 特開平10-062691(JP,A)
特開平09-133870(JP,A)
特開平09-257440(JP,A)
特開平09-230245(JP,A)
特開2001-066124(JP,A)
特開2008-268243(JP,A)
特開2013-113689(JP,A)
実開平04-089906(JP,U)
特表2004-509370(JP,A)
国際公開第2013/126762(WO,A1)
特表2015-513671(JP,A)
国際公開第02/023247(WO,A1)
米国特許第05737084(US,A)
特開2008-122725(JP,A)
特開2004-021259(JP,A)
米国特許出願公開第2003/0231408(US,A1)
特開平06-027397(JP,A)
実開平01-102710(JP,U)
米国特許出願公開第2005/0094261(US,A1)
米国特許出願公開第2006/0052709(US,A1)
米国特許出願公開第2008/0218849(US,A1)
米国特許出願公開第2002/0141051(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/00
G02B 3/00
G01N 21/64