

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

異なる波長の極短パルスレーザ光を出射可能なパルスレーザ光源と、  
該パルスレーザ光源から発せられた極短パルスレーザ光を試料に照射し、試料において発せられた蛍光を観察する観察装置本体と、

前記パルスレーザ光源と観察装置本体との間に配置され、パルスレーザ光源から発せられる極短パルスレーザ光のオンオフあるいは出力調整を行う音響光学装置と、

該音響光学装置と前記パルスレーザ光源との間に配置され、音響光学装置に入射される極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度を変更可能にする入射側アライメント調節装置と、

10

前記パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長に基づいて、前記入射側アライメント調節装置を制御する制御装置とを備える多光子励起型観察装置。

## 【請求項 2】

前記音響光学装置と前記観察装置本体との間に配置され、前記音響光学装置から出射された極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度を変更可能にする出射側アライメント調節装置を備え、

前記制御装置が、前記パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長に基づいて、前記出射側アライメント調節装置を制御する請求項 1 に記載の多光子励起型観察装置。

## 【請求項 3】

20

前記出射側アライメント調節装置が、極短パルスレーザ光を偏向する 1 以上のミラーと、該ミラーの角度および位置を変更するミラー移動機構とを備える請求項 2 に記載の多光子励起型観察装置。

## 【請求項 4】

前記入射側アライメント調節装置が、極短パルスレーザ光を偏向する 1 以上のミラーと、該ミラーの角度および位置を変更するミラー移動機構とを備える請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の多光子励起型観察装置。

## 【請求項 5】

前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長と、ミラー移動機構の作動状態とを対応づけて記憶するメモリ装置を備え、極短パルスレーザ光の波長に応じて、前記メモリ装置に記憶されている作動状態にミラー移動機構を調節する請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の多光子励起型観察装置。

30

## 【請求項 6】

前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長に応じて、前記音響光学装置の駆動周波数を調節する請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の多光子励起型観察装置。

## 【請求項 7】

群速度分散を補償する分散補償装置を備え、

前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長に応じて、前記分散補償装置による分散補償量を調節する請求項 1 から請求項 6 のいずれかに記載の多光子励起型観察装置。

## 【請求項 8】

40

前記音響光学装置と前記入射側アライメント調節装置との間に配置され、極短パルスレーザ光の光束径を音響光学装置の有効範囲内に入射可能に縮小させる入射補正装置を備え、

該入射補正装置が、複数のレンズと、該レンズのうち少なくとも 1 枚のレンズを光軸方向に移動させるレンズ移動機構とを備え、

前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長に応じて前記レンズ移動機構を作動させる請求項 4 から請求項 7 のいずれかに記載の多光子励起型観察装置。

## 【請求項 9】

前記出射側アライメント調節装置と観察装置本体との間に配置され、極短パルスレーザ光の光束径とビームダイバージェンスとを調節する入射調節装置を備え、

50

該入射調節装置が、複数のレンズと、該レンズのうち少なくとも１枚のレンズを光軸方向に移動させるレンズ移動機構とを備え、

前記制御装置が、前記極短パルスレーザー光の波長に応じて前記レンズ移動機構を作動させる請求項１から請求項８のいずれかに記載の多光子励起型観察装置。

【請求項１０】

異なる波長の極短パルスレーザー光を出射可能なパルスレーザー光源と、

前記パルスレーザー光源から発せられる極短パルスレーザー光のオンオフあるいは出力調整を行う音響光学装置と、

該音響光学装置と前記パルスレーザー光源との間に配置され、音響光学装置に入射される極短パルスレーザー光の光軸の位置および角度を調節する入射側アライメント調節装置と、

前記パルスレーザー光源から出射される極短パルスレーザー光の波長に基づいて、前記入射側アライメント調節装置を制御する制御装置とを備える多光子励起型観察用光源装置。

10

【請求項１１】

前記音響光学装置の後段に配置され、音響光学装置から出射された極短パルスレーザー光の光軸の位置および角度を調節する出射側アライメント調節装置と備え、

前記制御装置が、前記パルスレーザー光源から出射される極短パルスレーザー光の波長に基づいて、前記出射側アライメント調節装置を制御する請求項１０に記載の多光子励起型観察用光源装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【０００１】

本発明は、多光子励起型観察装置および多光子励起型観察用光源装置に関するものである。

【背景技術】

【０００２】

従来、生体等の試料にその表面から励起光を照射して、試料の表面下の比較的深い位置から発せられる蛍光を検出することにより、細胞等の機能を観察する装置として、多光子励起型の観察装置が知られている（例えば、特許文献１参照。）。

この特許文献１においては、試料に照射する励起光の強度を調節し、あるいはオンオフするための手段として、音響光学変調器（ＡＯＭ：Acoust Optical Modulator）のような音響光学素子を用いることが開示されている。

30

【特許文献１】特開平１０－５１２９５９号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００３】

音響光学素子は、一般に約１ｃｍ角の二酸化テルルやモリブデン酸塩からなる結晶であり、入射されたレーザー光を変調させることができる有効範囲は比較的狭い。音響光学素子に入射される極短パルスレーザー光が音響光学素子の有効範囲から外れると、迷光の混入等に起因してビーム形状が劣化するという問題がある。ビーム形状が劣化すると、試料の集光位置における点像分布関数（ＰＳＦ：Point Spread Function）が悪化し、試料の集光位置における光子密度が低下し、多光子励起効果を効率よく発生させることができないという問題がある。

40

【０００４】

しかしながら、極短パルスレーザー光は、一般には略平行光であると考えられているが、厳密には、光軸方向に沿う特定の位置に光束径が最も小さくなるビームウエストを備えるとともに、該ビームウエストの位置から離れるに従って、所定の広がり角度で光束径が大きくなるビームダイバージェンスを備えている。したがって、多光子励起効果を効率よく発生させ、鮮明な多光子励起画像を取得するためには、このようにビームウエスト位置に依存して光束径が変化する極短パルスレーザー光の光軸を、音響光学素子の比較的狭い有効範囲内に精度よく一致させる必要がある。

50

## 【 0 0 0 5 】

本発明は上述した事情に鑑みてなされたものであって、パルスレーザ光源からの極短パルスレーザ光の光束が、音響光学素子の有効範囲外に外れることを防止して、多光子励起効果を効率的に発生させ、鮮明な多光子蛍光画像を得ることができる多光子励起型観察装置および多光子励起観察用光源装置を提供することを目的としている。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 6 】

上記目的を達成するために、本発明は以下の手段を提供する。

本発明は、異なる波長の極短パルスレーザ光を出射可能なパルスレーザ光源と、該パルスレーザ光源から発せられた極短パルスレーザ光を試料に照射し、試料において発せられた蛍光を観察する観察装置本体と、前記パルスレーザ光源と観察装置本体との間に配置され、パルスレーザ光源から発せられる極短パルスレーザ光のオンオフあるいは出力調整を行う音響光学装置と、該音響光学装置と前記パルスレーザ光源との間に配置され、音響光学装置に入射される極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度を変更可能にする入射側アライメント調節装置と、前記パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長に基づいて、前記入射側アライメント調節装置を制御する制御装置とを備える多光子励起型観察装置を提供する。

10

## 【 0 0 0 7 】

本発明によれば、パルスレーザ光源から発せられた極短パルスレーザ光が観察装置本体に供給され、観察装置本体によって、試料に照射されると、試料における多光子励起効果によって、極短パルスレーザ光が集光させられた位置において多光子蛍光が発生する。発生した多光子蛍光は観察装置本体によって検出され、観察される。極短パルスレーザ光は、観察装置本体に入射される前に、音響光学装置を通過するので、音響光学装置によってオンオフあるいは出力調整される。

20

## 【 0 0 0 8 】

この場合において、本発明によれば、パルスレーザ光源から発せられる極短パルスレーザ光の波長が変更されると、制御装置の作動により、音響光学装置とパルスレーザ光源との間に備えられた入射側アライメント調節装置が作動させられる。パルスレーザ光源は、異なる波長の極短パルスレーザ光を出射する際に、その出射方向が変動する場合がある。本発明によれば、パルスレーザ光源からの極短パルスレーザ光の出射方向が変動しても、入射側アライメント調節装置の作動により、音響光学装置に入射される極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度が一定に調節される。これにより、音響光学装置に入射される極短パルスレーザ光が、その有効範囲外に外れることを防止でき、多光子励起効果を効率的に発生させ、鮮明な多光子蛍光画像を得ることができる。

30

## 【 0 0 0 9 】

上記発明においては、前記音響光学装置と前記観察装置本体との間に配置され、前記音響光学装置から出射された極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度を変更可能にする出射側アライメント調節装置を備え、前記制御装置が、前記パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長に基づいて、前記出射側アライメント調節装置を制御することとしてもよい。

40

## 【 0 0 1 0 】

このように構成することで、パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長が変更された場合には、制御装置の作動により出射側アライメント調節装置が作動させられ、音響光学装置から出射された極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度が一定に調節される。これにより、観察装置本体に入射される極短パルスレーザ光の光軸の変動が防止され、試料において多光子励起効果を効率的に発生させることができる。

## 【 0 0 1 1 】

また、上記発明においては、前記出射側アライメント調節装置が、極短パルスレーザ光を偏向する1以上のミラーと、該ミラーの角度および位置を変更するミラー移動機構とを備えることとしてもよい。

50

また、前記入射側アライメント調節装置が、極短パルスレーザ光を偏向する 1 以上のミラーと、該ミラーの角度および位置を変更するミラー移動機構とを備えることとしてもよい。

【0012】

このようにすることで、音響光学装置への入射側および出射側のいずれにおいても、ミラー移動機構の作動によって、1 以上のミラーの角度および位置が調節され、簡易に光軸の位置および角度を 3 次元的に調節することが可能となる。

【0013】

また、上記発明においては、前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長と、ミラー移動機構の作動状態とを対応づけて記憶するメモリ装置を備え、極短パルスレーザ光の波長に応じて、前記メモリ装置に記憶されている作動状態にミラー移動機構を調節することが好ましい。

10

【0014】

このように構成することで、パルスレーザ光源から発せられる極短パルスレーザ光の波長が変動しても、メモリ装置により、極短パルスレーザ光の波長を得ることで、記憶されているミラー移動機構の作動状態に調節することができ、移動機構の作動状態を検出しながら調節する必要がなく、さらに簡易にかつ迅速に極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度を調節することができる。

【0015】

また、上記発明においては、前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長に応じて、前記音響光学装置の駆動周波数を調節することとしてもよい。

20

音響光学装置においては、2 酸化テルル等からなる結晶に入力する音響波の振幅を調節することで、結晶に入射される極短パルスレーザ光の回折強度を調節し、出力される極短パルスレーザ光の強度を変調することができる。この場合に、変調すべき極短パルスレーザ光の波長に応じて結晶に入力する音響波の周波数である駆動周波数を調節することにより、極短パルスレーザ光の波長にかかわらず、略同等の方向に変調された極短パルスレーザ光を出射させることが可能となる。

【0016】

また、上記発明には、群速度分散を補償する分散補償装置を備え、前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長に応じて、前記分散補償装置による分散補償量を調節することとしてもよい。

30

分散補償装置は、複数のプリズムや複数のグレーティングの距離を調節することで、群速度分散を補償するため、群速度分散の分散補償量を調節すると、出射される極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度も変動する。本発明によれば、入射側アライメント調節装置あるいは出射側アライメント調節装置を制御する制御装置により、分散補償装置を調節することによって、分散補償量の調節により生じた極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度の変動も入射側および / または出射側アライメント調節装置によって補正することができる。

【0017】

また、上記発明においては、前記音響光学装置と前記入射側アライメント調節装置との間に配置され、極短パルスレーザ光の光束径を音響光学装置の有効範囲内に入射可能に縮小させる入射補正装置を備え、該入射補正装置が、複数のレンズと、該レンズのうち少なくとも 1 枚のレンズを光軸方向に移動させるレンズ移動機構とを備え、前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長に応じて前記レンズ移動機構を作動させることとしてもよい。

40

【0018】

このように構成することで、極短パルスレーザ光の波長が変化したときには、制御装置の作動により、レンズ移動機構の作動によりレンズ間距離を調節し、あるいは、複数のレンズを移動させることにより、光束径の縮小率および / またはビームダイバージェンスを調節することができる。したがって、極短パルスレーザ光の波長の変動等により、極短パ

50

ルスレーザ光のビームウエストの位置が光軸方向に変動しても、移動機構の作動により光束径の縮小率および／またはビームダイバージェンスを調節することができ、音響光学装置の有効範囲内に確実に入射させて、効率的に多光子励起効果を生じさせることが可能となる

【0019】

さらに、上記発明においては、前記出射側アライメント調節装置と観察装置本体との間に配置され、極短パルスレーザ光の光束径とビームダイバージェンスとを調節する入射調節装置を備え、該入射調節装置が、複数のレンズと、該レンズのうち少なくとも1枚のレンズを光軸方向に移動させるレンズ移動機構とを備え、前記制御装置が、前記極短パルスレーザ光の波長に応じて前記レンズ移動機構を作動させることとしてもよい。

10

【0020】

このように構成することで、レンズ移動機構の作動によりレンズ間距離を調節し、あるいは、複数のレンズを移動させることにより、光束径および／またはビームダイバージェンスを簡易に調節することができる。したがって、パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長等の変動により、極短パルスレーザ光のビームウエストの位置が光軸方向に変動しても、一定のビームウエスト位置において、効率的に多光子励起効果を生じさせることが可能となる。

【0021】

また、本発明は、異なる波長の極短パルスレーザ光を出射可能なパルスレーザ光源と、前記パルスレーザ光源から発せられる極短パルスレーザ光のオンオフあるいは出力調整を行う音響光学装置と、該音響光学装置と前記パルスレーザ光源との間に配置され、音響光学装置に入射される極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度を調節する入射側アライメント調節装置と、前記パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長に基づいて、前記入射側アライメント調節装置を制御する制御装置とを備える多光子励起型観察用光源装置を提供する。

20

【0022】

本発明によれば、パルスレーザ光源から発せられた極短パルスレーザ光は、音響光学装置を通過させられることにより、音響光学装置によってオンオフあるいは出力調整される。この場合において、本発明によれば、パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長が変更された場合に、制御装置の作動により入射側アライメント調節装置が作動させられて、極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度が調節されるので、音響光学装置の有効範囲内に、極短パルスレーザ光全体を入射させることができる。その結果、音響光学装置から出力される強度変調等された極短パルスレーザ光の試料の集光位置における点像分布関数が悪化することを防止した極短パルスレーザ光を出射することができる。

30

【0023】

上記発明においては、前記音響光学装置の後段に配置され、音響光学装置から出射された極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度を調節する出射側アライメント調節装置と備え、前記制御装置が、前記パルスレーザ光源から出射される極短パルスレーザ光の波長に基づいて、前記出射側アライメント調節装置を制御することとしてもよい。

【0024】

このように構成することで、制御装置の作動により、音響光学装置から出射された極短パルスレーザ光の光軸の位置および角度が出射側アライメント調節装置によって調節されるので、極短パルスレーザ光の波長にかかわらず、一定の光軸位置および角度を有する極短パルスレーザ光を出射することができる。

40

【発明の効果】

【0025】

本発明によれば、パルスレーザ光源から発せられる極短パルスレーザ光の波長等が変化しても、音響光学装置の有効範囲内から外れることなく極短パルスレーザ光を入射させて、多光子励起効果を効率的に発生させ、鮮明な多光子蛍光画像を得ることができるという効果を奏する。

50

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0026】

以下、本発明の一実施形態に係る多光子励起型観察装置について図1～図6を参照して説明する。

本実施形態に係る多光子励起型観察装置1は、多光子励起型顕微鏡であって、図1に示されるように、光源装置（多光子励起型観察用光源装置）2と、該光源装置2の後段に配置される蛍光顕微鏡本体（観察装置本体）3とを備えている。

## 【0027】

前記光源装置2は、異なる波長の極短パルスレーザ光Lを出射可能な波長可変のパルスレーザ光源4と、該パルスレーザ光源4から発せられる極短パルスレーザ光Lの群速度分散を補償する分散補償光学系5と、分散補償された極短パルスレーザ光Lのオンオフあるいは強度変調する音響光学装置6と、該音響光学装置6とパルスレーザ光源4との間に配置され、音響光学装置6に入射させる極短パルスレーザ光Lを調節する入射補正装置7と、音響光学装置6から出射され、前記蛍光顕微鏡本体3に入射される極短パルスレーザ光Lを調節する顕微鏡入射補正装置8と、これらを制御する制御装置9とを備えている。

## 【0028】

前記分散補償光学系5は、例えば、一对のプリズム10, 11とミラー12とから構成されている。図2に示されるように、プリズム10, 11どうしの間隔を調節することで、波長ごとに分散補償量を調節して、パルスレーザ光源4から蛍光顕微鏡本体3の対物レンズ3aに至る全光学系における群速度分散を補償するようになっている。この際に、光路長の調節により、光軸がシフトし、波長の変化によって光軸の角度が変動するので、プリズム10, 11およびミラー12の位置および角度を矢印に示すように調節することにより、出射される極短パルスレーザ光Lの光軸の位置および角度が調節されるようになっている。

図中、符号13は、パルスレーザ光源4から発せられた極短パルスレーザ光Lを反射して分散補償光学系5に指向させる一方、分散補償光学系5から出力された極短パルスレーザ光Lの光軸から外れた位置に配置されているミラーである。

## 【0029】

前記入射補正装置7は、アライメント調節装置14とビーム整形光学系15とを備えている。

前記アライメント調節装置14は、図3に示されるように、例えば、2枚のミラー14a, 14bとこれらミラー14a, 14bをそれぞれ移動させる2つのミラー移動機構16, 17とを備えている。第1のミラー14aは、第1の方向Z<sub>1</sub>から矢印のように入射されてきた極短パルスレーザ光Lを、該第1の方向Z<sub>1</sub>に略直交する第2の方向Z<sub>2</sub>に偏向させるようになっている。また、第2のミラー14bは、第2の方向Z<sub>2</sub>に入射される極短パルスレーザ光Lを、第1の方向Z<sub>1</sub>および第2の方向Z<sub>2</sub>に略直交する第3の方向Z<sub>3</sub>に偏向させて出射するようになっている。

## 【0030】

第1のミラー移動機構16は、前記第1の方向Z<sub>1</sub>に沿って第1のミラー14aを並進移動させる第1の並進機構16aと、前記第3の方向Z<sub>3</sub>に平行な軸線回りに第1のミラー14aを揺動させる第1の揺動機構16bとを備えている。第2のミラー移動機構17は、前記第3の方向に沿って第2のミラー14bを並進移動させる第2の並進機構17aと、前記第1の方向Z<sub>1</sub>に平行な軸線回りに第2のミラー14bを揺動させる第2の揺動機構17bとを備えている。第1、第2の並進機構16a, 17aは、例えば、モータ16c, 17cおよびボールネジ16d, 17dにより駆動され、第1、第2の揺動機構16b, 17bは、例えば、モータ16e, 17eにより構成されている。

## 【0031】

これにより、極短パルスレーザ光Lの光軸の角度が、第1の方向Z<sub>1</sub>に対して、第1の方向Z<sub>1</sub>および第2の方向Z<sub>2</sub>を含む平面内においてずれている場合には、第1の揺動機構16bを作動させてその角度を調節し、第1の方向Z<sub>1</sub>に対して第2の方向Z<sub>2</sub>および

10

20

30

40

50

第3の方向 $Z_3$ を含む平面内においてずれている場合には、第2の揺動機構17bを作動させてその角度を調節することができるようになっている。また、アライメント調節装置14から出射される極短パルスレーザ光Lの光軸の位置が第1の方向 $Z_1$ にずれている場合には、第1の並進機構16aを作動させ、第2の方向 $Z_2$ にずれている場合には第2の並進機構17aを作動させて、その位置ずれを調節することができるようになっている。

【0032】

これにより、アライメント調節装置14から出射される極短パルスレーザ光Lは、入射される極短パルスレーザ光Lの光軸の角度および位置の如何にかかわらず、その光軸の角度および位置を精度よく一定の位置に調節することができるようになっている。

【0033】

また、ビーム整形光学系15は、分散補償光学系5を通過し、アライメント調節装置14によって位置合わせされた極短パルスレーザ光Lの光束径を絞り、音響光学装置6の結晶18(図4参照)の有効範囲X内に漏れなく入射させるように構成されている。

本実施形態においては、ビーム整形光学系15は、例えば、図4に示されるように、両凸レンズ19と平凹レンズ20とを組み合わせたガリレイ型のビームエキスパンダと、両凸レンズ19および平凹レンズ20をそれぞれ光軸方向に移動可能に支持するレンズ移動機構21, 22とにより構成されている。また、ビーム整形光学系15は、パルスレーザ光源4と音響光学装置6との間に、その中央よりも音響光学装置6側に配置されていることが好ましい。また、ビーム整形光学系15は、音響光学装置6の100~1000mmの位置に配置されていることがさらに好ましい。

【0034】

前記音響光学装置6は、図4~図6に示されるように、例えば、AOMであって、2酸化テルルからなる結晶18と、該結晶18を固定するケース23と、結晶18に接着された圧電素子からなるトランスデューサ24と、該トランスデューサ24に inputsする電気信号Eを伝達する音響波発生用電気回路25と、前記結晶18に接着されたヒートシンク(放熱部材)26とを備えている。結晶18とケース23との間、結晶18とヒートシンク26との間には、例えば、シリコングリースのようなサーマルコンパウンドあるいはインジウム箔からなる界面材27が介在させられている。また、図6中、符号28は、トランスデューサ24から発せられ、結晶18内を伝播した音響波を吸収する吸音材である。

【0035】

結晶18を挟んで対向するケース23の一对の側壁にはそれぞれ開口部29が設けられており、一の開口部29から極短パルスレーザ光Lを入射させ、結晶18を通過した極短パルスレーザ光Lを他の開口部29から出射させるようになっている。

前記ヒートシンク26は、例えば、アルミニウムあるいはアルミニウム合金のような熱伝導率の高い材質からなり、図5に示されるように、平行間隔をあけて配置される複数の平板状のフィン26aを備えている。

【0036】

前記顕微鏡入射補正装置8は、アライメント調節装置30と、視準光学系31とを備えている。

アライメント調節装置30は、例えば、図3に示されるアライメント調節装置14と同一構造を有し、蛍光顕微鏡本体3に入射させる極短パルスレーザ光Lの光軸の位置と偏向を精度よく調節することができるようになっている。

【0037】

また、視準光学系31は、例えば、図4に示されるビーム整形光学系15と同一構造を有し、極短パルスレーザ光Lが、蛍光顕微鏡本体3の対物レンズ3aの瞳位置に瞳径と略同等の光束径で入射されるように、出射される極短パルスレーザ光Lの光束径およびビームダイバージェンスを調節することができるようになっている。

【0038】

極短パルスレーザ光Lは、光束径W、波面の曲率RおよびビームダイバージェンスDが $W = R \cdot D$ となる関係を有している。これら3つの変数W, R, Dはいずれも極短パルス

10

20

30

40

50



レーザ光 L の波長  $\lambda$ 、ビームウエスト位置における光束径  $W_0$ 。およびビームウエスト位置からの光軸方向距離の関数である。したがって、これら 3 つの変数  $W$ 、 $R$ 、 $D$  のうち、いずれか 2 つを決定することにより、極短パルスレーザ光 L を一意に決定することができる。すなわち、光束径  $W$  とビームダイバージェンス  $D$  とを調節することは、光束径  $W$  と波面の曲率  $R$  とを調節すること、および、波面の曲率  $R$  とビームダイバージェンス  $D$  とを調節することと等価である。

#### 【0039】

前記制御装置 9 には、パルスレーザ光源 4 から出射される極短パルスレーザ光 L の波長とその波長  $\lambda$  が選択されたときの前記各調節装置（分散補償光学系 5、アライメント調節装置 14、30、ビーム整形光学系 15、視準光学系 31 および音響光学装置 6）の最適な作動状態 Y、例えば、分散補償光学系 5 のプリズム 10、11 の位置および角度、アライメント調節装置 14、30 のミラー移動機構 16、17 の移動位置、ビーム整形光学系 15 および視準光学系 31 を構成するレンズ移動機構 21、22 の移動位置、音響光学装置 6 のトランスデューサ 24 により結晶 18 に入力する音響波の周波数等とを対応づけて記憶するメモリ装置 32 が備えられている。各調節装置の作動状態 Y は相互に関連している場合があるので、全ての調節装置に対して、波長  $\lambda$  と作動状態 Y とが設定されていることが好ましい。

#### 【0040】

そして、パルスレーザ光源 4 から出射される極短パルスレーザ光 L の波長  $\lambda$  が、例えば、パルスレーザ光源 L から出力される波長情報（あるいは、外部から入力される極短パルスレーザ光の波長情報）によって取得されると、制御装置 9 は、取得された波長情報に基づいてメモリ装置 32 内を検索し、波長  $\lambda$  に対応する作動状態 Y となるように各調節装置を自動調節するようになっている。

#### 【0041】

これにより、パルスレーザ光源 4 の波長  $\lambda$  の変化にかかわらず、簡易かつ精度よく極短パルスレーザ光 L を漏れなく音響光学装置 6 の結晶 18 の有効範囲 X 内に通過させ、あるいは、対物レンズ 3a の瞳位置に瞳径と略同等の極短パルスレーザ光 L を入射させて、試料 A における多光子励起効果を効率的に発生させることができるようになっている。

#### 【0042】

前記蛍光顕微鏡本体 3 は、極短パルスレーザ光 L を 2 次元的に走査する（例えば、近接ガルバノミラーのような）ガルバノミラー 33、走査された極短パルスレーザ光 L を集光して中間像を結像させる瞳投影レンズ 34、中間像を結像した極短パルスレーザ光 L を集光して略平行光にする結像レンズ 35、略平行光にされた極短パルスレーザ光 L を集光して試料 A に結像させる対物レンズ 3a、試料 A において発せられ対物レンズ 3a により集光された多光子蛍光 F を極短パルスレーザ光 L から分岐するダイクロイックミラー 36、分岐された多光子蛍光 F を集光する集光レンズ 37、集光された多光子蛍光 F を検出する光電子増倍管（PMT）38 とを備えている。符号 39、40 はミラーである。

#### 【0043】

このように構成された本実施形態に係る多光子励起型観察装置 1 の作用について、以下に説明する。

本実施形態に係る多光子励起型観察装置 1 によれば、パルスレーザ光源 4 から発せられる極短パルスレーザ光 L の波長  $\lambda$  が決定されると、その波長情報  $\lambda$  がパルスレーザ光源 4 から、あるいは、外部の入力装置（図示略）から制御装置 9 に入力される。

制御装置 9 においては、入力された極短パルスレーザ光 L の波長情報  $\lambda$  に基づいて、メモリ装置 32 内を検索され、その波長情報  $\lambda$  に関連づけて記憶されている各調節装置の作動状態 Y が取得される。制御装置 9 は、取得された作動状態 Y となるように各調節装置を制御する。

#### 【0044】

具体的には、まず、パルスレーザ光源 4 から出射される極短パルスレーザ光 L の波長  $\lambda$  が決定されると、パルスレーザ光源 4 から出射される極短パルスレーザ光 L の多光子励起

10

20

30

40

50

型観察装置 1 の光学系全体における群速度分散量が定まるので、その群速度分散を補償するような分散補償量となる作動状態 Y に分散補償光学系 5 が制御される。分散補償光学系 5 においては、2 つのプリズム 10, 11 間の距離および 2 つのプリズム 10, 11 の角度およびミラー 12 の位置が制御装置 9 により指示される作動状態 Y となるように制御される。これにより、適正に分散補償された極短パルスレーザー光 L が分散補償光学系 5 から出力される。

【0045】

次に、パルスレーザー光源 4 から出射される極短パルスレーザー光 L の波長 が決定されると、パルスレーザー光源 4 からの出射方向および分散補償光学系 5 から出射方向が決定される。したがって、制御装置 9 は、メモリ装置 32 から取得したミラー移動機構 16, 17 の作動状態 Y となるようにアライメント調節装置 14 を制御して、ビーム整形光学系 15 に入射される極短パルスレーザー光 L の光軸の位置および角度が、極短パルスレーザー光 L の波長 の如何にかかわらず一定となるように調節する。

10

【0046】

また、パルスレーザー光源 4 から出射される極短パルスレーザー光 L の波長 が決定されると、分散補償光学系 5 から出力される極短パルスレーザー光 L のビームウエスト位置およびビームダイバージェンスが決定される。したがって、制御装置 9 は、メモリ装置 32 から取得したレンズ移動機構 21, 22 の作動状態 Y となるようにビーム整形光学系 15 を制御して、出射される極短パルスレーザー光 L の光束径を調節する。

【0047】

20

この場合において、ビーム整形光学系 15 は、極短パルスレーザー光 L の光束径を縮小して、音響光学装置 6 の結晶 18 の有効範囲 X 内に入射させるように構成されているので、極短パルスレーザー光 L が漏れなく結晶 18 を通過させられる。

【0048】

また、パルスレーザー光源 4 から出射される極短パルスレーザー光 L の波長 が決定されると、音響光学装置 6 からの変調後の極短パルスレーザー光 L の出射方向が所定方向となるような音響波の周波数が決定される。したがって、制御装置 9 は、メモリ装置 32 から取得した音響波発生用電気回路 25 の作動状態 Y となるように音響光学装置 6 を制御して、オンオフあるいは出力調節された極短パルスレーザー光 L を所定方向に出力させる。

【0049】

30

音響光学装置 6 においては、音響波発生用電気回路 25 の作動により、所定周波数の電気信号 E がトランスデューサ 24 に入力され、トランスデューサ 24 において発生させられた音響波によって、結晶 18 内における極短パルスレーザー光 L の音響光学効果が発生する。また、トランスデューサ 24 により発生する音響波の振幅を変更することにより、結晶 18 内における極短パルスレーザー光 L の回折強度を変化させ、音響光学装置 6 から出射される極短パルスレーザー光 L の強度を、音響波の振幅に応じた所定の割合で変調する。

【0050】

これにより、入射された極短パルスレーザー光 L が結晶 18 を通過してケース 23 の開口部 29 から、所定の強度に変調された状態で出射されることになる。

この場合において、ビーム整形光学系 15 によって極短パルスレーザー光 L が結晶 18 の有効範囲 X 内に漏れなく入射されているので、結晶 18 に入射されない極短パルスレーザー光 L や結晶 18 の側面によって乱反射等される極短パルスレーザー光 L が存在しない。したがって、これらの極短パルスレーザー光 L が迷光となって、正常に結晶 18 を通過する極短パルスレーザー光 L に混入することがない。

40

【0051】

その結果、結晶 18 から出射される極短パルスレーザー光 L における波面の乱れの発生が抑制され、試料 A の集光位置における P S F の悪化が抑制される。すなわち、対物レンズ 3a の前方に形成される試料 A における集光位置において、光子密度の低下が防止され、多光子励起効果を効率的に発生させることが可能となる。

【0052】

50

また、トランスデューサ 24 により結晶 18 に入力する音響波をオンオフすることにより、極短パルスレーザ光 L の出射と遮断とを切り替えてオンオフすることができる。例えば、蛍光顕微鏡本体 3 のガルバノミラー 33 による極短パルスレーザ光 L の 2 次元的な走査と同期させて極短パルスレーザ光 L をオンオフすることにより、試料 A に対して所定の走査範囲のみに極短パルスレーザ光 L を照射することが可能となる。

【0053】

また、極短パルスレーザ光 L は音響光学装置 6 の結晶 18 内を通過させられる際に音響光学効果によって回折させられる。このとき、結晶 18 にはトランスデューサ 24 から音響波が入力されるので、そのエネルギーによって結晶 18 が局所的に発熱する。

【0054】

本実施形態に係る多光子励起型観察装置 1 によれば、結晶 18 自体の熱容量が小さいが、該結晶 18 に熱容量の大きなヒートシンク 26 が接着されているので、結晶 18 において発生した熱はヒートシンク 26 によって吸収される。また、ヒートシンク 26 には複数のフィン 26a が設けられているので、結晶 18 から吸収した熱は、これらのフィン 26a を介して外気に効率的に放散される。これにより、結晶 18 の局所的な温度上昇が抑制され、結晶 18 内の屈折率の変動が大幅に抑制されることになる。

【0055】

結晶 18 の屈折率の変動すると、結晶 18 内における極短パルスレーザ光 L の回折が変化するため、音響光学装置 6 からの出射方向が変化する。したがって、何ら対策を施さない場合には、アライメント調節装置 14, 30 によって極短パルスレーザ光 L の光軸の位置と偏向を厳密に調節しておいても、トランスデューサ 24 から入力される音響波によって、結晶 18 の温度が経時的に変化し、それによって結晶 18 からの出射方向がずれて適正な位置に出射されなくなってしまうことになる。

【0056】

また、結晶 18 に入力する音響波の振幅は、その強度変調の程度やオンオフの頻度等の使用状態によって相違するため、使用状態ごとに極短パルスレーザ光 L の出射方向が変化する。

特に、AOM の場合には、音響波を発生させるためにトランスデューサ 24 に入力する駆動電力が高いこと、および、極短パルスレーザ光 L を入射させる有効範囲の面積が小さいことにより、対策を施さない場合には結晶 18 内は局所的に加熱される。

【0057】

本実施形態によれば、熱容量の大きなヒートシンク 26 によって結晶 18 の温度変化が抑制されるので、音響波を発生させるためにトランスデューサ 24 に入力する駆動電力が高くても、結晶 18 における局所的な加熱状態が防止され、極短パルスレーザ光 L の出射方向を一定に維持することができる。その結果、結晶 18 の経時的な温度変化を検出したり、検出された結晶 18 の温度に基づいてアライメント調節装置 30 をその都度調節したりする必要がなく、簡易な構成で、観察開始時に設定されたアライメント状態のままで、試料 A の適正な照射範囲に極短パルスレーザ光 L を照射して、蛍光観察を行うことができる。

なお、本実施形態においては、ヒートシンク 26 の形態として、平板状のフィン 26a を備えるものを例示したが、これに代えて、他の任意の形態のヒートシンク 26 を採用することができる。

【0058】

また、パルスレーザ光源 4 から出射される極短パルスレーザ光 L の波長 が決定されると、音響光学装置 6 から極短パルスレーザ光 L の出射方向が決定される。したがって、制御装置 9 は、メモリ装置 32 から取得したミラー移動機構 16, 17 の作動状態 Y となるようにアライメント調節装置 30 を制御して、視準光学系 31 に入射される極短パルスレーザ光 L の光軸の位置および角度が、極短パルスレーザ光 L の波長 の如何にかかわらず一定となるように調節する。

【0059】

10

20

30

40

50

また、パルスレーザ光源 4 から出射される極短パルスレーザ光 L の波長 が決定されると、音響光学装置 6 から出力される極短パルスレーザ光 L のビームウエスト位置およびビームダイバージェンスが決定される。したがって、制御装置 9 は、メモリ装置 32 から取得したレンズ移動機構 21, 22 の作動状態 Y となるように視準光学系 31 を制御して、出射される極短パルスレーザ光 L の光束径およびビームダイバージェンスを調節する。

【0060】

視準光学系 31 においては、パルスレーザ光源 4 から発せられ、分散補償光学系 5、アライメント調節装置 14、ビーム整形光学系 15、音響光学装置 6 およびアライメント調節装置 30 を通過してきた極短パルスレーザ光 L の光束径およびビームダイバージェンスを再度補正し直すことにより、蛍光顕微鏡本体 3 の対物レンズ 3a の瞳位置に、その瞳径と略同等の光束径を有するように補正する。これにより、パルスレーザ光源 4 から発せられた極短パルスレーザ光 L を最も無駄なく効率的に試料 A に集光させ、試料 A 内に形成されるビームウエスト位置における光子密度を向上させて、効率的に多光子励起効果を生じさせることができる。

10

【0061】

このように、本実施形態に係る多光子励起型観察装置 1 および多光子励起型観察用光源装置 2 によれば、パルスレーザ光源 4 から出射される極短パルスレーザ光 L の波長 が変更されても、制御装置 9 が、その波長情報 に基づいて各調節装置を制御する。したがって、極短パルスレーザ光 L の波長 が変更されても、蛍光顕微鏡本体 3 の対物レンズ 3a の瞳位置に、その瞳径と略同等の光束径を有する極短パルスレーザ光 L を入射させることができ、試料 A における多光子励起効果を効率的に発生させて鮮明な多光子励起画像を得ることができるという効果を奏する。

20

【0062】

また、波長の変更等が生じて、極短パルスレーザ光 L のビームウエスト位置が光軸方向にずれるのを防止でき、波長にかかわらず、試料 A の同一位置にピントを合わせることができる。

さらに、制御装置 9 は、メモリ装置 32 に波長 と対応づけて記憶されている各調節装置の作動状態 Y によって各調節装置を制御する。したがって、波長 が変更されても、簡易かつ迅速に、試料 A において多光子励起効果を効率的に発生させるように極短パルスレーザ光 L を調節することができる。

30

【0063】

なお、本実施形態に係る多光子励起型観察用光源装置においては、分散補償光学系 5 として、2つのプリズム 10, 11 とミラー 12 とを有する構造のものを採用したが、これに代えて、グレーティング対により構成されていてもよい。この場合、グレーティングどうしの間隔を調節することにより、波長ごとに分散補償量を調節して、パルスレーザ光源 4 から蛍光顕微鏡本体 3 の対物レンズ 3a に至る全光学系における群速度分散を補償することができる。

また、プリズム 10, 11 およびミラー 12 の組合せの他、複数のプリズムの組合せ、複数のグレーティングの組合せ、プリズムとグレーティングとの組合せからなる分散補償光学系を採用することにしてもよい。

40

【0064】

また、本実施形態においては、波長 と作動状態 Y とを予め関連づけてメモリ装置 32 に記憶しておくこととしたが、これに代えて、極短パルスレーザ光 L のアライメント状態を測定し、その測定結果をフィードバックしてアライメント調節装置 14, 30 を制御することにしてもよい。このようにすることで、波長 が連続的に変化する場合においても極短パルスレーザ光の光軸の位置および方向が一定となるように調節することができる。

【0065】

また、ビーム整形光学系 15 に入力される極短パルスレーザ光 L あるいはビーム整形光学系 15 から出力される極短パルスレーザ光 L の光束径を測定し、その測定結果に基づいて、所定の光束径やビームダイバージェンスが達成できるようにレンズ移動機構 21, 2

50

2を自動調節することにしてもよい。また、波長の変更により生ずるビームウエスト位置の移動、ビームダイバージェンスの変動を検出し、それぞれ所望のビームウエスト位置およびビームダイバージェンスが達成できるように各調節装置を自動調節することにしてもよい。

【0066】

また、本実施形態に係る多光子励起型観察装置1および多光子励起型観察用光源装置2においては、ガリレイ型のビーム整形光学系15および視準光学系31を採用したが、これに代えて、複数の凸レンズを有するケプラー型のビーム整形光学系15および視準光学系31を採用してもよい。

また、ビーム整形光学系15は、図7に示されるように、一对の凹面鏡41, 42を対向配置することにより構成してもよい。このように構成することで反射光学系によって極短パルスレーザ光Lの光束径を縮小させるので、ビーム整形光学系15を通過する際に群速度分散を生じることがなく、パルス幅が広がることを防止できる。

【0067】

また、図8に示すように、ビーム整形光学系15として、絞り43（あるいはスリットまたはピンホール等の空間フィルタ）を採用してもよい。このようにすることで、簡易な構成により極短パルスレーザ光Lの光束径を縮小させることができ、また調節も簡単であるという利点がある。

【0068】

また、ビーム整形光学系15および視準光学系31が、2以上のレンズにより構成される場合には、レンズ移動機構はその少なくとも1つのレンズを光軸方向に移動させるように構成されていればよい。

【0069】

さらに、極短パルスレーザ光Lの採用し得る波長が有限個に限られる場合には、図9に示されるように、各波長に適合する距離や角度に予め調節された状態に固定されたレンズ群あるいは凹面鏡からなる複数の補正光学ユニット15A, 15B, 15Cと、該補正光学ユニット15A, 15B, 15Cを切り替える切替機構44とを備えるものとしてもよい。この場合においても、波長と補正光学ユニット15A, 15B, 15Cとを対応づけてメモリ装置32に記憶しておき、得られた波長情報に基づいてメモリ装置32内を検索して対応する補正光学ユニット15A, 15B, 15Cを選択し、切替機構44により切り替えることとすれば、上記と同様に、簡易に高精度の多光子蛍光画像を取得することが可能となる。

【0070】

なお、視準光学系31についても同様の構造を採用することができる。また、この構造を採用するビーム整形光学系15および視準光学系31において、補正光学ユニット15A~15Cについては、その数は2以上でよい。

また、視準光学系31, ビーム整形光学系15のレンズ構成は、いずれも図示のような両凸レンズと平凹レンズとの組合せに限られるものではなく、正または負のパワーを持つ任意のレンズの組合せにより構成されるものであってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】本発明の一実施形態に係る多光子励起型観察装置および多光子励起型観察用光源装置を示す全体構成図である。

【図2】図1の多光子励起型観察装置に用いられる分散補償光学系を拡大して示す図である。

【図3】図1の多光子励起型観察装置に用いられるアライメント調節装置を拡大して示す図である。

【図4】図1の多光子励起型観察装置に用いられるビーム整形光学系および音響光学装置を拡大して示す図である。

【図5】図1の多光子励起型観察装置に用いられる音響光学装置の一例を示す斜視図であ

10

20

30

40

50

る。

【図 6】図 3 の音響光学装置の内部構造を示す縦断面図である。

【図 7】図 4 のビーム整形光学系の変形例を示す図である。

【図 8】図 4 のビーム整形光学系の他の変形例を示す図である。

【図 9】図 4 のビーム整形光学系の変形例であって、予め調節された複数の補正光学ユニットを交換する切替機構を備えるビーム整形光学系および音響光学装置を示す図である。

【符号の説明】

【 0 0 7 2 】

A 試料

F 蛍光

L 極短パルスレーザー光  
波長

X 有効範囲

Y 作動状態

1 多光子励起型観察装置

2 多光子励起型観察用光源装置

3 蛍光顕微鏡本体（観察装置本体）

3 a 対物レンズ

4 パルスレーザー光源

5 分散補償光学系（分散補償装置）

7 入射補正装置

8 顕微鏡入射調節装置（入射調節装置）

9 制御装置

1 4 アライメント調節装置（入射側アライメント調節装置）

1 4 a , 1 4 b ミラー

1 6 , 1 7 ミラー移動機構

2 1 , 2 2 レンズ移動機構

3 0 アライメント調節装置（出射側アライメント調節装置）

3 1 視準光学系（入射調節装置）

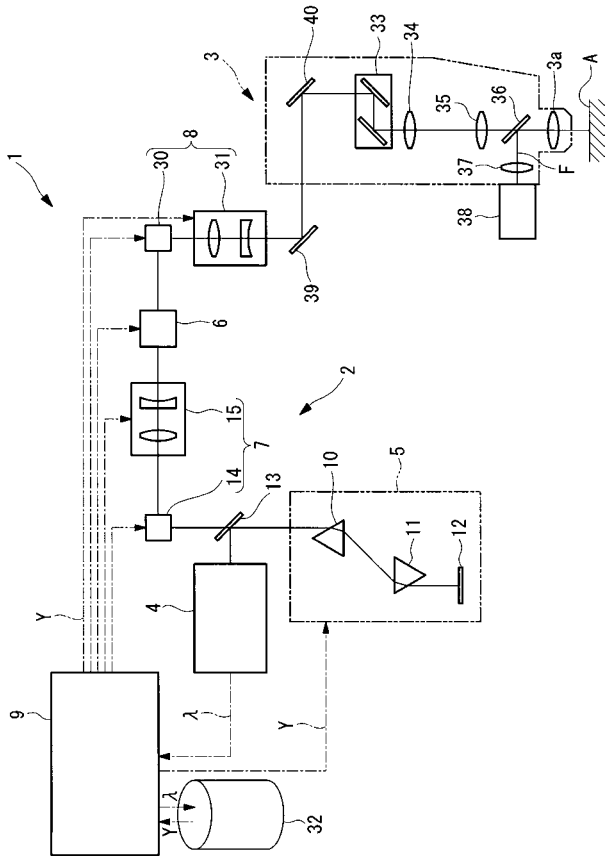
3 2 メモリ装置

10

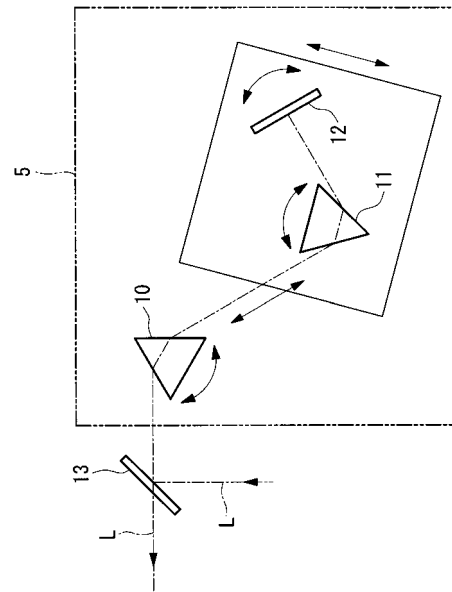
20

30

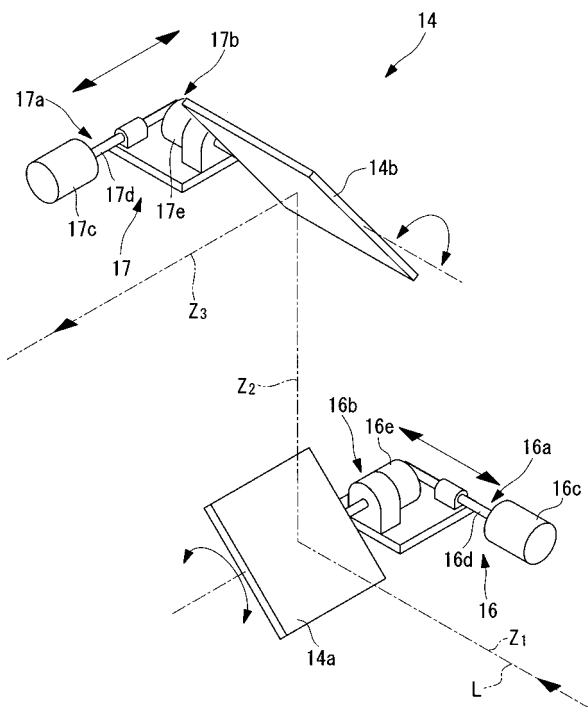
【図 1】



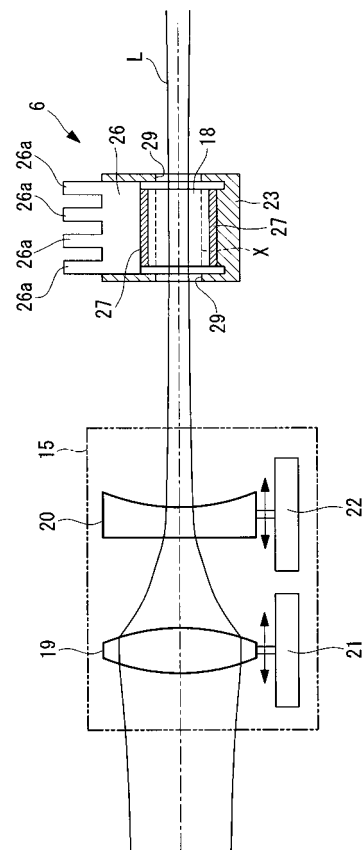
【図 2】



【図 3】



【図 4】







---

フロントページの続き

(72)発明者 佐々木 浩

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内

(72)発明者 中正 英二

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 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 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA01 FA02 FA06 GA02 GB03 GB19 HA01

HA02 HA09 HA15 KA08 KA09 LA02 MA16 NA06

2H052 AA09 AB06 AC27 AC34