

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4128387号  
(P4128387)

(45) 発行日 平成20年7月30日 (2008. 7. 30)

(24) 登録日 平成20年5月23日 (2008. 5. 23)

(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

G O 1 N 21/64

G

請求項の数 10 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2002-112303 (P2002-112303)  
 (22) 出願日 平成14年4月15日 (2002. 4. 15)  
 (65) 公開番号 特開2003-307682 (P2003-307682A)  
 (43) 公開日 平成15年10月31日 (2003. 10. 31)  
 審査請求日 平成17年4月14日 (2005. 4. 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4番2号  
 (74) 代理人 100058479  
 弁理士 鈴江 武彦  
 (74) 代理人 100084618  
 弁理士 村松 貞男  
 (74) 代理人 100091351  
 弁理士 河野 哲  
 (74) 代理人 100100952  
 弁理士 風間 鉄也  
 (72) 発明者 土屋 敦宏  
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オ  
 リンパス光学工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 顕微鏡装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標本を照明する光源と、

前記光源からの照明光を偏向するとともに、この偏向角度を変更可能にしたスキャナと、

前記スキャナで偏向される照明光の光路に配置され、前記標本の像を投影する対物レンズと、

前記スキャナと前記対物レンズとの間に配置され、前記スキャナで偏向された照明光を前記対物レンズを介して前記標本上に集光させる第1の投影レンズと、

前記スキャナと前記対物レンズとの間に配置され、前記スキャナで偏向された照明光を前記対物レンズの瞳面上に集光させる第2の投影レンズと、

を具備し、前記第1および第2の投影レンズを選択的に前記光路に挿入可能にしたことを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 2】

前記第1および第2の投影レンズを収納したユニット構成のレンズ収納手段を有し、

該レンズ収納手段を前記スキャナと前記対物レンズとの間の光路に挿脱可能にしたことを特徴とする請求項1記載の顕微鏡装置。

【請求項 3】

前記スキャナは、前記第2の投影レンズが前記光路に挿入された状態で、前記照明光の偏向角度の可変を所定角度で停止可能にしたことを特徴とする請求項1または2記載の顕

10

20

微鏡装置。

【請求項 4】

標本を照明する光源と、

前記光源からの照明光を偏向するとともに、この偏向角度を変更可能にしたスキャナと

、

前記スキャナで偏向される照明光の光路に配置され、前記標本の像を投影する対物レンズと、

前記スキャナと前記対物レンズとの間に配置され、前記スキャナで偏向された照明光を前記対物レンズを介して前記標本上に集光させる第 1 の状態と前記照明光を前記対物レンズの瞳面上に集光させる第 2 の状態を切換可能なレンズ手段とを具備し、

前記スキャナは前記第 2 の状態のときに対物像面と共役であることを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 5】

前記レンズ手段が前記第 1 の状態のときに前記標本からの光を受光する第 1 の受光素子と、

前記レンズ手段が前記第 2 の状態のときに前記標本からの光を受光する第 2 の受光素子と、

前記第 2 の状態のときに前記標本からの光を前記第 2 の受光素子へ導くダイクロイックミラーとを備え、

前記第 1 の状態のときに前記標本からの光を前記第 1 の受光素子で受光して L S M 画像を取得し、前記第 2 の状態のときに前記標本からの光を前記第 2 の受光素子で受光してエバネッセント蛍光画像を取得するようにしたことを特徴とする請求項 4 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 6】

前記第 2 の状態において、前記スキャナの偏向角度の停止位置を変化させることによりエバネッセント光のしみだし深さを可変することを特徴とする請求項 5 に記載の顕微鏡装置

。

【請求項 7】

前記第 2 の状態において、前記スキャナの偏向角度を変化させることにより前記対物レンズの瞳面上の集光位置を可変することを特徴とする請求項 4 ～ 6 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 8】

前記第 2 の状態において、前記対物レンズの種類に応じて前記スキャナの偏向角度の停止位置を可変することを特徴とする請求項 5 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 9】

前記第 2 の投影レンズが挿入されているとき、前記スキャナは対物像面と共役であることを特徴とする請求項 1 ～ 3 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 10】

標本を照明する光源と、

前記光源からの照明光を偏向するとともに、この偏向角度を変更可能にしたスキャナと

、

前記スキャナで偏向される照明光の光路に配置され、前記標本の像を投影する対物レンズとを備え、前記対物レンズによって集光される前記照明光を前記スキャナによって走査することにより前記標本の走査画像を形成する顕微鏡装置において、

前記スキャナと前記対物レンズとの間に配置され、前記照明光を前記対物レンズの瞳面上に集光させるとともに前記スキャナと対物像面を共役関係にする投影レンズを具備し、

前記スキャナで偏向された前記照明光を前記投影レンズを介して前記対物レンズの瞳面の周辺に集光させることによって、前記標本のエバネッセント照明を可能にしたことを特徴とする顕微鏡装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、レーザ顕微鏡によるコンフォーカル画像（LSM画像）と蛍光顕微鏡によるエバネッセント蛍光画像を選択的に取得可能な顕微鏡装置に関するものである。

**【0002】****【従来の技術】**

最近、生体細胞の機能解析が盛んに行われるようになってきている。これら細胞の機能解析の中で、特に、細胞膜の機能を観察するために、細胞膜およびその近傍からのエバネッセント蛍光画像を取得する蛍光顕微鏡が注目されるようになってきている。

**【0003】**

この種の蛍光顕微鏡は、光源にレーザ光を使用することが多く、このため、最近では、レーザ顕微鏡によるコンフォーカル画像（LSM画像）と、蛍光顕微鏡によるエバネッセント蛍光画像を選択的に取得可能な顕微鏡装置が考えられている。

10

**【0004】**

図3は、走査型レーザ顕微鏡の概略構成を示すもので、レーザ光源1から発せられるレーザ光を集光レンズ2で光ファイバ3の入射端に集光し、光ファイバ3を通して出射端より出射される光をコリメートレンズ4で平行光に変換し、ダイクロイックミラー5を透過してスキャナ6に入射する。そして、瞳投影レンズ7によりスキャナ6を対物レンズ9の射出瞳面9aに投影するとともに、スキャナ6で偏向されたレーザ光を結像レンズ8、対物レンズ9を通してステージ10に載置された標本11上に集光してXY方向にスキャンさせ、標本11からの光を上述と逆の光路を通してダイクロイックミラー5に入射し、こ

20

**【0005】**

一方、図4は、蛍光顕微鏡の概略構成を示すもので、レーザ光源1から発せられるレーザ光を集光レンズ2で光ファイバ3の入射端に集光し、光ファイバ3を通して出射端より出射される光束をエバネッセント投光管17まで導光し、このエバネッセント投光管17内部のコリメートレンズ18で平行光に変換した後、対物像投影レンズ19によりダイクロイックミラー20を介して対物レンズ9の瞳位置9aに集光させる。そして、光ファイバ3の出射端を図示矢印方向に移動させることで、射出瞳面9a上でのレーザ光の集光位置を対物レンズ9の瞳中心から周辺までの範囲で移動させ、レーザ光の集光位置が対物レンズ9の瞳の中心付近にあるときは、レーザ光が光軸とほぼ平行に標本11を照明して通常の蛍光観察を可能とし、また、レーザ光の集光位置が対物レンズ9の瞳の周辺にあるときは、レーザ光が光軸に対して斜めから標本11を照明することでエバネッセント蛍光観察を可能にしている。この場合、標本11は細胞などの上にカバーガラスを貼り付けた状態になっており、レーザ光の集光位置が対物レンズ9の瞳の周辺に集光されると、細胞とカバーガラスの境界面で全反射が起きる臨界角以上の角度で照明がなされ、この全反射した際に境界面で細胞側に100nm～200nm程度しみでる照明光を利用して細胞のエバネッセント蛍光観察が行われる。そして、エバネッセント照明された蛍光観察像は結像レンズ21を介して接眼レンズ22やCCD23により観察される。

30

40

**【0006】****【発明が解決しようとする課題】**

ところが、LSM画像とエバネッセント蛍光画像を選択的に取得するために、これら走査型レーザ顕微鏡と蛍光顕微鏡のそれぞれの構成を各別に用意したのでは、構成が複雑になるばかりか、操作も面倒になり、さらに、装置全体が大型となって大きな設置スペースが必要となるなど経済的に不利になる欠点がある。

**【0007】**

一方、特開平6-27385号公報には、光源からの光を標本上の対物レンズを介して集光して標本をスポット照明する第1の光路と、光源からの光を対物レンズの瞳面付近に集光して標本の視野を大きな光束径で照明する第2の光路を選択的に切換え可能にした顕微

50

鏡が開示されている。

【 0 0 0 8 】

ところが、上述したレーザ顕微鏡による L S M 画像と蛍光顕微鏡によるエバネッセント蛍光画像を取得するための動作を行わせた場合、スキャンユニット内部で第 1 および第 2 の光路を切換えるようになるため、光路切換えのための光学素子が多数必要となり、それだけ構成が複雑になるとともに、そのための内部スペースの確保も必要となって顕微鏡自身が大型化するなどの問題が生じる。

【 0 0 0 9 】

そこで、特願 2 0 0 1 - 2 1 4 3 7 3 号明細書に開示されるように、レーザ光を対物レンズの瞳位置に集光させる集光レンズと、レーザ光に対して平行に所定距離オフセットさせ、対物レンズの中心からオフセットさせた位置にレーザ光を入射させるための透明な平行平板をレーザ光の光路に挿脱可能に設け、これら集光レンズと平行平板を光路から外した状態では、通常のレーザ顕微鏡として L S M 画像の取得を可能とし、一方、集光レンズと平行平板を光路上に挿入した状態では、平行平板を回転させ対物レンズの瞳面上でレーザ光の集光位置を変更することにより、エバネッセント照明によるエバネッセント蛍光画像の取得を可能として、L S M 画像とエバネッセント蛍光画像を選択的に取得できるようにしたものが考えられている。

10

【 0 0 1 0 】

しかしながら、このように構成したものは、エバネッセント蛍光観察を行うため対物レンズの瞳面上でレーザ光をスキャンするスキャナとして、専用の平行平板を用意しなければならないばかりか、この平行平板を精度よく回転駆動するための駆動手段も必要となるため、その分構成が複雑となり、価格的にも高価になるという問題が生じる。

20

【 0 0 1 1 】

そこで、さらに L S M 画像を取得するために用いられるスキャナを利用できないものか考えられるが、特願 2 0 0 1 - 2 1 4 3 7 3 号明細書のものでは、エバネッセント蛍光観察の状態、スキャナよりレーザ光源側の光路にエバネッセント蛍光観察のための集光レンズが挿入されるだけで、スキャナを対物像面に投影することができないので、レーザ光の集光点をシフトさせるため、僅かにスキャナを動かしてレーザ光をスキャンさせると、視野の周辺で、いわゆるケラレが発生してしまい適切なエバネッセント照明ができない。

【 0 0 1 2 】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、簡単な構成で、しかも確実に L S M 画像とエバネッセント蛍光画像を選択的に取得可能にした顕微鏡装置を提供することを目的とする。

30

【 0 0 1 3 】

【課題を解決するための手段】

請求項 1 記載の発明は、標本を照明する光源と、前記光源からの照明光を偏向するとともに、この偏向角度を変更可能にしたスキャナと、前記スキャナで偏向される照明光の光路に配置され、前記標本の像を投影する対物レンズと、前記スキャナと前記対物レンズとの間に配置され、前記スキャナで偏向された照明光を前記対物レンズを介して前記標本上に集光させる第 1 の投影レンズと、前記スキャナと前記対物レンズとの間に配置され、前記スキャナで偏向された照明光を前記対物レンズの瞳面上に集光させる第 2 の投影レンズと、を具備し、前記第 1 および第 2 の投影レンズを選択的に前記光路に挿入可能にしたことを特徴としている。

40

【 0 0 1 4 】

請求項 2 記載の発明は、請求項 1 記載の発明において、前記第 1 および第 2 の投影レンズを収納したユニット構成のレンズ収納手段を有し、該レンズ収納手段を前記スキャナと前記対物レンズとの間の光路に挿脱可能にしたことを特徴としている。

【 0 0 1 5 】

請求項 3 記載の発明は、請求項 1 または 2 記載の発明において、前記スキャナは、前記第 2 の投影レンズが前記光路に挿入された状態で、前記照明光の偏向角度の可変を所定角度

50

で停止可能にしたことを特徴としている。

【 0 0 1 6 】

この結果、本発明によれば、レンズ切換え手段により、L S M画像の観察の場合は、第1の投影レンズを光路上に切換えてスキャナで偏向される照明光を標本上に集光させ、エバネッセント蛍光観察の場合は、第2の投影レンズを光路上に切換えてスキャナで偏向される照明光を対物レンズの瞳面上に集光させるようにしたので、簡単な構成で、しかも確実にL S M画像とエバネッセント蛍光画像を選択的に取得することができる。

【 0 0 1 7 】

また、本発明によれば、レンズ収納手段は、光路に対して挿脱可能なユニット構成になっているので、従来用いられている走査型レーザ顕微鏡を僅かに改造してレンズ切換え手段を装着できる構成とするだけで、適用することができる。

【 0 0 1 8 】

さらに、本発明によれば、スキャナの偏向角度の停止位置を決定するだけで、エバネッセント蛍光観察の際のエバネッセント照明の調節を行うことができる。

また請求項4記載の発明は、標本を照明する光源と、前記光源からの照明光を偏向するとともに、この偏向角度を変更可能にしたスキャナと、前記スキャナで偏向される照明光の光路に配置され、前記標本の像を投影する対物レンズと、前記スキャナと前記対物レンズとの間に配置され、前記スキャナで偏向された照明光を前記対物レンズを介して前記標本上に集光させる第1の状態と前記照明光を前記対物レンズの瞳面上に集光させる第2の状態を切換可能なレンズ手段とを具備し、前記スキャナは前記第2の状態のときに対物像面と共役であることを特徴としている。

請求項5の発明は、請求項4記載の発明において、前記レンズ手段が前記第1の状態のときに前記標本からの光を受光する第1の受光素子と、前記レンズ手段が前記第2の状態のときに前記標本からの光を受光する第2の受光素子と、前記第2の状態のときに前記標本からの光を前記第2の受光素子へ導くダイクロイックミラーとを備え、前記第1の状態のときに前記標本からの光を前記第1の受光素子で受光してL S M画像を取得し、前記第2の状態のときに前記標本からの光を前記第2の受光素子で受光してエバネッセント蛍光画像を取得するようにしたことを特徴としている。

請求項6の発明は、請求項5記載の発明において、前記第2の状態において前記スキャナの偏向角度の停止位置を変化させることによりエバネッセント光のしみだし深さを可変

することを特徴としている。

請求項7の発明は、請求項4～6記載の発明において、前記第2の状態において前記スキャナの偏向角度を変化させることにより前記対物レンズの瞳面上の集光位置を可変

することを特徴としている。

請求項9の発明は、請求項1～3記載の発明において、前記第2の投影レンズが挿入されているとき、前記スキャナは対物像面と共役であることを特徴としている。

請求項10の発明は、標本を照明する光源と、前記光源からの照明光を偏向するとともに、この偏向角度を変更可能にしたスキャナと、前記スキャナで偏向される照明光の光路に配置され、前記標本の像を投影する対物レンズとを備え、前記対物レンズによって集光される前記照明光を前記スキャナによって走査することにより前記標本の走査画像を形成する顕微鏡装置において、前記スキャナと前記対物レンズとの間に配置され、前記照明光を前記対物レンズの瞳面上に集光させるとともに前記スキャナと対物像面を共役関係にする投影レンズを具備し、前記スキャナで偏向された前記照明光を前記投影レンズを介して前記対物レンズの瞳面の周辺に集光させることによって、前記標本のエバネッセント照明を可能にしたことを特徴としている。

【 0 0 1 9 】

【 発明の実施の形態 】

以下、本発明の一実施の形態を図面に従い説明する。

【0020】

図1は、本発明が適用される正立型の顕微鏡装置の概略構成を示している。

【0021】

図において、31はレーザ光源で、このレーザ光源1から発せられるレーザ光の光路上には、集光レンズ32を介して光ファイバ33の入射端が配置され、集光レンズ32により集光されたレーザ光が入射される。

【0022】

光ファイバ33の出射端には、スキャンユニット34が配置されている。スキャンユニット34は、光ファイバ33内に導出され出射端から出射される光束の光路上に沿ってコリメートレンズ35、ダイクロイックミラー36およびスキャナ37が配置され、光ファイバ33から入射されるレーザ光をコリメートレンズ35で平行光に変換し、ダイクロイックミラー36を透過してスキャナ37に入射するようにしている。スキャナ37は、レーザ光源1からのレーザ光を偏向するとともに、この偏向角度を変更可能にしている。この場合、スキャナ37は、ミラーを回転させるようなタイプのものが用いられ、軸37aを中心に回転可能に支持され、レーザ光を直線方向(例えばX方向)にのみ偏向(スキャン)するようになっている。

10

【0023】

スキャンユニット34のダイクロイックミラー36は、標本47側からの蛍光を反射するもので、反射光路上には、吸収フィルタ38、ピンホール結像レンズ39、ピンホール40、集光レンズ41および受光素子としてのフォトマル42が配置されている。

20

【0024】

スキャナ37で偏向されるレーザ光の光路上には、結像レンズ43、対物レンズ44および顕微鏡本体45のステージ46上の標本47が配置されている。

【0025】

顕微鏡本体45には、対物像を偏向させる鏡筒49と、鏡筒49で偏向された対物像を目視で観察する接眼レンズ48が設けられている。

【0026】

スキャナ37と対物レンズ44との間の光路には、レンズ収納手段としてレンズ収納ユニット51が配置されている。このレンズ収納ユニット51は、第1の投影レンズとしての瞳投影レンズ52、第2の投影レンズとしての対物像投影レンズ53a、53bおよびダイクロイックミラー54を収納したユニット構成をなすもので、これら瞳投影レンズ52、対物像投影レンズ53a、53bおよびダイクロイックミラー54を図示しないレンズ切換え手段により選択的に光路上に切換え可能にしている。

30

【0027】

この場合、瞳投影レンズ52は、LSM画像を取得する際に光路上に挿入されるもので、スキャナ37で偏向されたレーザ光を結像レンズ43、対物レンズ44を介して標本47上に集光させるとともに、スキャナ37を対物レンズ44の射出瞳面44aに投影させるようにしている。ここで、スキャナ37を対物レンズ44の射出瞳面44aと共役の位置に設定しているのは、レーザ光をスキャンした場合に視野の周辺で、いわゆるケラレが発生するのを防止するためである。

40

【0028】

対物像投影レンズ53a、53bは、エバネッセント蛍光画像を取得する際に光路上に挿入されるもので、スキャナ37で偏向されて平行に出射されたレーザ光を結像レンズ43を介して対物レンズ44の射出瞳面44a上に集光させるとともに、スキャナ37を対物像面50へ投影させるようにしている。ここで、スキャナ37を対物像面50と共役の位置に設定しているのは、LSM画像を観察する場合に瞳投影レンズ52によりスキャナ37を対物レンズ44の射出瞳面44aに投影しているのと同じで、こうすることで、レーザ光を偏向した場合の視野の周辺での、いわゆるケラレの発生を防止している。また、対物像投影レンズ53a、53bは、ケプラータイプのアフォーカルコンバータに近いもの

50

で、これら対物像投影レンズ 5 3 a、5 3 b の間に対物レンズ 4 4 の瞳の中間像 4 4 b を結像する内焦点式のものが用いられ、対物レンズ 4 4 の射出瞳面 4 4 a を無限遠に投影するとともに、スキャナ 3 7 を対物像面 5 0 へ投影するなどの働きを小さなスペースで可能にしている。

【 0 0 2 9 】

ダイクロイックミラー 5 4 は、波長選択的に励起光となるレーザ光を透過するとともに、標本 4 7 から発せられる蛍光のみを反射するような特性を有するもので、この反射した蛍光を吸収フィルタ 5 6 を通して C C D 5 5 に入射させるようにしている。また、ダイクロイックミラー 5 4 は、対物像投影レンズ 5 3 a、5 3 b と一体に構成され、対物像投影レンズ 5 3 a、5 3 b とともに光路に挿脱されるようにしている。

10

【 0 0 3 0 】

なお、これら瞳投影レンズ 5 2 と、対物像投影レンズ 5 3 a、5 3 b およびダイクロイックミラー 5 4 の光路に対する具体的な切換え手段は図示していないが、例えば、スライダによるスライド切換え機構やターレットによる回転切換え手段など公知のレンズ切換え手段を用いることができる。

【 0 0 3 1 】

また、このように構成されたレンズ収納ユニット 5 1 は、スキャナ 3 7 と対物レンズ 4 4 との間の光路に対して挿脱可能な構成になっている。

【 0 0 3 2 】

このような構成において、まず、L S M 画像の観察を行う場合を説明する。

20

【 0 0 3 3 】

この場合、スキャナ 3 7 と対物レンズ 4 4 との間の光路に、レンズ収納ユニット 5 1 を挿入するとともに、図示しない切換え手段により瞳投影レンズ 5 2 を光路上に挿入する。図面では、光路上に挿入された瞳投影レンズ 5 2 と光路から外された対物像投影レンズ 5 3 a、5 3 b およびダイクロイックミラー 5 4 をそれぞれ破線で表わしている。

【 0 0 3 4 】

レーザ光源 3 1 より発せられる平行のレーザ光は、集光レンズ 3 2 により光ファイバ 3 3 の入射端面に集光され、この光ファイバ 3 3 内を導光され出射端に達する。そして、光ファイバ 3 3 の出射端から出射されたレーザ光は、コリメートレンズ 3 5 により平行光にもどされ、ダイクロイックミラー 3 6 を透過してスキャナ 3 7 に導かれる。

30

【 0 0 3 5 】

この状態で、スキャナ 3 7 は、光軸が折り返される点である軸 3 7 a を中心に回転され、コリメートレンズ 3 5 からのレーザ光は、標本 4 7 に向けて偏向される。ここで、スキャナ 3 7 により偏向されるレーザ光は、図示実線が光軸に平行に偏向された時の光線の状態、図示破線が光軸に対してある角度を持って偏向された時の光線の状態を表している。

【 0 0 3 6 】

スキャナ 3 7 で偏向されたレーザ光は、瞳投影レンズ 5 2、結像レンズ 4 3、対物レンズ 4 4 を介して標本 4 7 上に集光される。

【 0 0 3 7 】

この場合、スキャナ 3 7 は、瞳投影レンズ 5 2 により結像レンズ 4 3 を介して対物レンズ 4 4 の射出瞳面 4 4 a に投影され、対物レンズ 4 4 の射出瞳面 4 4 a と共役な位置に設定されている。

40

【 0 0 3 8 】

このようにして、スキャナ 3 7 で偏向されたレーザ光は、標本 4 7 上に集光されるとともに、スキャナ 3 7 での偏向角度に応じたスキャンがなされる。

【 0 0 3 9 】

一方、標本 4 7 上に集光されたレーザ光により励起され、標本 4 7 から発せられた蛍光は、対物レンズ 4 4、結像レンズ 4 3、瞳投影レンズ 5 2、スキャナ 3 7 と上述したのと逆の光路をたどり、ダイクロイックミラー 3 6 に入射する。そして、このダイクロイックミラー 3 6 により反射されて、吸収フィルタ 3 8 を透過し、ピンホール結像レンズ 3 9 によ

50

り標本 47 の像がピンホール 40 上に結像される。

【0040】

この場合、吸収フィルタ 38 は、励起光となるレーザ光をカットし標本 47 から発せられる観察に必要な蛍光の波長のみを透過するものが用いられている。また、ピンホール 40 は、標本 47 へのフォーカス面以外の画像成分をカットするようにしている。

【0041】

これにより、ピンホール 40 を通過した蛍光は、集光レンズ 41 を介してフォトマル 42 により受光され電気信号に変換される。そして、図示していないが、フォトマルの電気信号から画像を構成するための電気回路やソフトウェアなどの処理により画像として生成されてモニタ上に映し出され、LSM 画像として観察可能となる。

10

【0042】

次に、エバネッセント蛍光観察を行う場合を説明する。

【0043】

この場合、図示しない切換え手段を用いて、瞳投影レンズ 52 を光路から外し、対物像投影レンズ 53 a、53 b およびダイクロイックミラー 54 を光路に挿入する。図面では、光路に挿入された対物像投影レンズ 53 a、53 b、ダイクロイックミラー 54 と、光路から外された瞳投影レンズ 52 をそれぞれ実線で表わしている。

【0044】

この場合も、レーザ光源 31 から出射されたレーザ光は、光ファイバ 33 を介してコリメートレンズ 35 に入射される。次に、コリメートレンズ 35 で平行光束にされたレーザ光は、ダイクロイックミラー 36 を透過する。

20

【0045】

なお、エバネッセント蛍光観察の場合、ダイクロイックミラー 36 は、不要なので、明るさのロスを減らしたければ、光路から外すようにしてもよい。

【0046】

ダイクロイックミラー 36 を透過したレーザ光は、スキャナ 37 に導かれ、このスキャナ 37 で標本 47 側へ向けて偏向される。

【0047】

スキャナ 37 は、LSM 画像の観察の場合と同様に偏向角度が可変となっており、ここでも図示実線が光軸に平行に偏向された時の光線の状態、図示破線が光軸に対してある角度を持って偏向された時の光線の状態を表している。

30

【0048】

ただし、エバネッセント蛍光観察の場合は、LSM 画像の観察の場合と異なり像面をスキャンして画像構築を行う必要がないので、スキャナ 37 は、レーザ光の偏向角度の可変を所定角度の状態では停止される。

【0049】

スキャナ 37 で偏向されたレーザ光は、対物像投影レンズ 53 a、53 b、ダイクロイックミラー 54、結像レンズ 43 を介して対物レンズ 44 の射出瞳面 44 a 上に集光される。

【0050】

この場合、スキャナ 37 は、対物像投影レンズ 53 a、53 b により対物像面 50 へ投影され、対物像面 50 と共役な位置に設定されている。

40

【0051】

これにより、対物レンズ 44 の射出瞳面 44 a 上に集光されるレーザ光は、スキャナ 37 を回転させて偏向角度を変えるのみで、対物レンズ 44 の瞳中心から周辺までの範囲で移動することができる。

【0052】

この場合、図 2 に示すように、対物レンズ 44 の射出瞳面 44 a 上に集光されるレーザ光が対物レンズ 44 の瞳中心付近の a ~ b の範囲にあるときは、レーザ光は、対物レンズ 44 を介して光軸に平行に標本 47 を照明して通常の蛍光観察が可能となる。また、レーザ

50



光が対物レンズ 4 4 の瞳周辺の  $b \sim c$  の範囲にあるときは、レーザ光は、対物レンズ 4 4 を介して標本 4 7 を光軸に対して斜めに照明し、その角度が上述したように臨界角を超えることで、エバネッセント照明となってエバネッセント蛍光観察が可能となる。

【 0 0 5 3 】

この場合、標本 4 7 は、細胞などの上にカバーガラスが貼り付けられた状態になっており、このためカバーガラスの屈折率によってエバネッセント照明になる臨界角は異なり、また、臨界角以上の角度でも、その角度によって細胞とカバーガラスの境界面から細胞側へしみてエバネッセント光のしみだし深さも異なってくる。このしみだし深さは、標本 4 7 の、どの程度の深さまで観察したいかということであり、検鏡者の目的によっても異なる。

10

【 0 0 5 4 】

このようにして、標本 4 7 の条件や、観察したい深さによって、標本 4 7 に照射されるレーザ光の角度は異なってくる。この場合、対物レンズ 4 4 の射出瞳面 4 4 a に集光されるレーザ光は、瞳の周辺に移動するにしたがって光軸に対する標本 4 7 への照射角度が大きくなるので、標本 4 7 の観察したい深さによって対物レンズ 4 4 の射出瞳面 4 4 a での集光位置が異なってくる。また、光軸に対する標本 4 7 への照射角度が同じであっても、対物レンズ 4 4 の種類によっても射出瞳面 4 4 a でのレーザ光の集光位置も異なる。そこで、検鏡者は、これらのことを加味しながら、用途に応じてスキャナ 3 7 の偏向角度を最適な角度に設定してエバネッセント蛍光観察を行うことになる。

【 0 0 5 5 】

20

一方、エバネッセント照明により標本 4 7 から発光した蛍光は、対物レンズ 4 4、結像レンズ 4 3 を介してダイクロイックミラー 5 4 に入射し、このダイクロイックミラー 5 4 より CCD 5 5 へ向けて反射され、吸収フィルタ 5 6 を介して CCD 5 5 の受光面でもある対物像面 5 0 へ投影される。

【 0 0 5 6 】

この場合、吸収フィルタ 5 6 は、励起光となるレーザ光をカットし標本 4 7 から発する観察に必要な蛍光の波長のみを透過するものが用いられている。

【 0 0 5 7 】

これにより、CCD 5 5 で撮像された対物像は、図示しないモニタ上に映し出され、エバネッセント蛍光画像として観察可能となる。

30

【 0 0 5 8 】

従って、このようにすれば、スキャナ 3 7 と対物レンズ 4 4 との間の光路に瞳投影レンズ 5 2 と対物像投影レンズ 5 3 a、5 3 b を収容するレンズ収納ユニット 5 1 を配置し、LSM 画像の観察の場合は、瞳投影レンズ 5 2 を光路上に切換え、スキャナ 3 7 で偏向されたレーザ光を標本 4 7 上に集光させるとともに、スキャナ 3 7 を対物レンズ 4 4 の射出瞳面 4 4 a に投影させ、一方、エバネッセント蛍光観察の場合は、対物像投影レンズ 5 3 a、5 3 b を光路上に切換え、スキャナ 3 7 で偏向されたレーザ光を対物レンズ 4 4 の射出瞳面 4 4 a 上に集光させるとともに、スキャナ 3 7 を対物像面 5 0 へ投影させるようにしたので、従来のスキャンユニット内部で LSM 画像と蛍光顕微鏡によるエバネッセント蛍光画像を取得するため 2 つの光路を切換えるようにしたものとは比べ、光路切換えのための光学素子が必要でなくなり、構成を簡単にできるとともに、無駄な内部スペースを排除でき、顕微鏡自身の小型化も実現できる。また、共通のスキャナ 3 7 により LSM 画像とエバネッセント蛍光画像を選択的に取得できるので、従来のエバネッセント蛍光観察を行うため専用の平行平板と、この平行平板を精度よく回転駆動するための駆動手段を用意する必要のあるものと比べ、構成が簡単で、価格的にも安価にできる。

40

【 0 0 5 9 】

また、スキャナ 3 7 と対物レンズ 4 4 との間の光路に配置されるレンズ収納ユニット 5 1 は、光路に対して挿脱可能なユニット構成になっているので、従来用いられている走査型レーザ顕微鏡を僅かに改造してレンズ収納ユニット 5 1 を装着できる構成とするだけで、実現可能である。

50

## 【 0 0 6 0 】

さらに、L S M画像の観察の場合は、瞳投影レンズ5 2によりスキャナ3 7を対物レンズ4 4の射出瞳面4 4 aに投影させ、エバネッセント蛍光観察の場合は、対物像投影レンズ5 3 a、5 3 bによりスキャナ3 7を対物像面5 0へ投影できるので、レーザ光をスキャンした場合に視野周辺でのケラレの発生を防止でき、適切な照明を行うことができる。

## 【 0 0 6 1 】

さらにまた、スキャナ3 7は、L S M画像の観察では、レーザ光を所定角度の範囲で繰り返して偏向させるように使用され、エバネッセント蛍光観察では、所定の偏向角度の状態で停止して使用されるようになっており、これら動作の切換えはスキャナ3 7の図示しない駆動手段を制御するだけで簡単に得られるので、L S M画像の観察とエバネッセント蛍光観察の切換えを簡単に行うことができ、また、エバネッセント蛍光観察の際のエバネッセント照明の調節も、スキャナ3 7の偏向角度の停止位置を調整するだけで簡単に行うことができる。

10

## 【 0 0 6 2 】

さらにまた、対物像投影レンズ5 3 a、5 3 bとダイクロイックミラー5 4は、一体に構成され、瞳投影レンズ5 2と選択的に光路上に切換えられるようになっているので、L S M画像の観察とエバネッセント蛍光観察をワンタッチ操作で切換えることができる。

## 【 0 0 6 3 】

さらにまた、対物像投影レンズ5 3 a、5 3 bは、ケブラータイプのアフォーカルコンバータに近いもので、これら対物像投影レンズ5 3 a、5 3 bの間に対物レンズ4 4の瞳の中間像4 4 bを結像する内焦点式のものが用いられるので、対物レンズ4 4の射出瞳面4 4 aを無限遠に投影するとともに、スキャナ3 7を対物像面5 0へ投影するなどの働きを小さなスペースで実現できる。

20

## 【 0 0 6 4 】

さらにまた、スキャナ3 7としてミラーを回転させるタイプのもを用いることで、対物レンズ4 4の射出瞳面4 4 aでのレーザ光の集光位置を大きく移動させることができるので、通常の蛍光観察からエバネッセント観察までを簡単に調整することができる。

## 【 0 0 6 5 】

なお、上述した実施の形態では、スキャナ3 7は、1個のみ設け、直線方向へ偏向(スキャン)する場合を示したが、2個設けて2次元的(X Y方向)なスキャンを行うようにしてもよい。また、上述した実施の形態では、瞳投影レンズ5 2と対物像投影レンズ5 3 a、5 3 bを光路に対して交互に挿脱することで切換えを行うようにしたが、レンズ間隔を変更したり、どちらかのレンズの一部だけを挿脱するなどの他の手段を用いてレーザ光の集光位置を変更するようにしてもよい。さらに、上述した実施の形態では、対物像投影レンズ5 3 a、5 3 bとダイクロイックミラー5 4を一体構成として同時に光路から挿脱するようにしているが、必ずしも同時に挿脱する必要はなく、また、ダイクロイックミラー5 4は、結像レンズ4 3と対物レンズ4 4の間に配置してもよい。この場合は、エバネッセント蛍光像を結像させるために、ダイクロイックミラー5 4で反射させた後に別途結像レンズを設けるようにすればよい。さらに、ダイクロイックミラー3 6、5 4は、観察光路側を反射面にして配置されているが、これらダイクロイックミラー3 6、5 4の反射面の面精度の影響による像の劣化を少なくするためには、それぞれフォトマル4 2側とレーザ光源3 1側およびC C D 5 5側とレーザ光源3 1側を逆の配置にしてもよい。さらに、対物レンズ4 4として結像レンズ4 3を用いない有限対物レンズとしてもよい。さらに、上述した実施の形態は、例えば、c a g e d試薬解除装置や、ある1点の蛍光を強制的に退色させるF R A Pなどに応用することもできる。さらに、上述した実施の形態では、一貫して正立型顕微鏡を例に説明したが、同様の構成で倒立型顕微鏡に適用することもできる。

30

40

## 【 0 0 6 6 】

その他、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。

50

## 【 0 0 6 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 0 6 8 】

## 【発明の効果】

以上述べたように本発明によれば、簡単な構成で、しかも確実に L S M 画像とエバネッセント蛍光画像を選択的に取得可能にした顕微鏡装置を提供できる。

10

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の一実施の形態の概略構成を示す図。

【図 2】一実施の形態のエバネッセント蛍光観察を説明するための図。

【図 3】従来の走査型レーザ顕微鏡の概略構成を示す図。

【図 4】従来の蛍光顕微鏡の概略構成を示す図

## 【符号の説明】

3 1 ... レーザ光源

3 2 ... 集光レンズ

3 3 ... 光ファイバ

3 4 ... スキャンユニット

20

3 5 ... コリメートレンズ

3 6 ... ダイクロイックミラー

3 7 ... スキャナ

3 7 a ... 軸

3 8 ... 吸収フィルタ

3 9 ... ピンホール結像レンズ

4 0 ... ピンホール

4 1 ... 集光レンズ

4 2 ... フォトマル

4 3 ... 結像レンズ

30

4 4 ... 対物レンズ

4 4 a ... 射出瞳面

4 4 b ... 中間像

4 5 ... 顕微鏡本体

4 6 ... ステージ

4 7 ... 標本

4 8 ... 接眼レンズ

4 9 ... 鏡筒

5 0 ... 対物像面

5 1 ... レンズ収納ユニット

40

5 2 ... 瞳投影レンズ

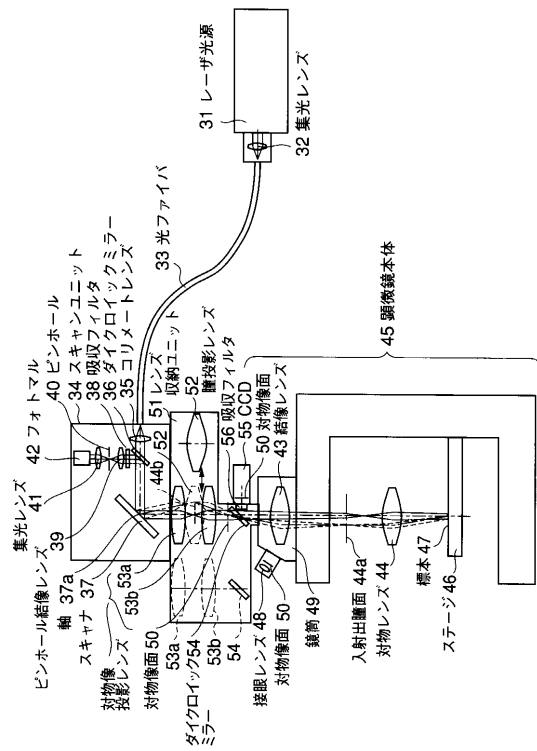
5 3 a . 5 3 b ... 対物像投影レンズ

5 4 ... ダイクロイックミラー

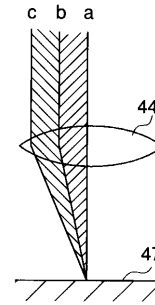
5 5 ... C C D

5 6 ... 吸収フィルタ

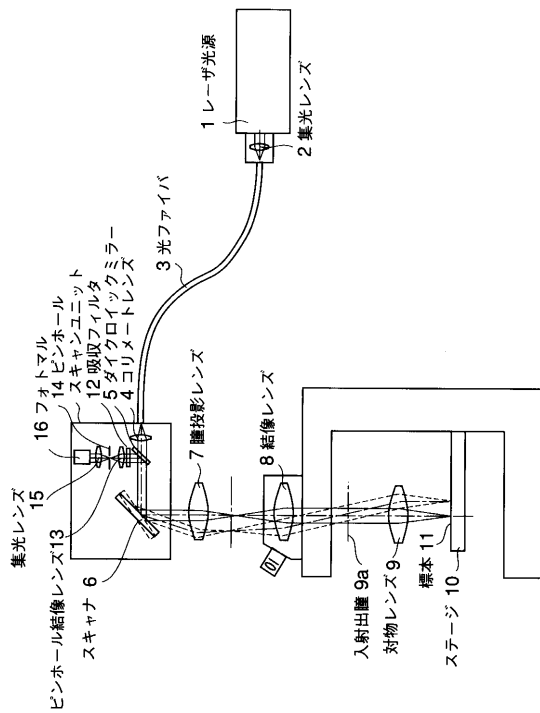
【図 1】



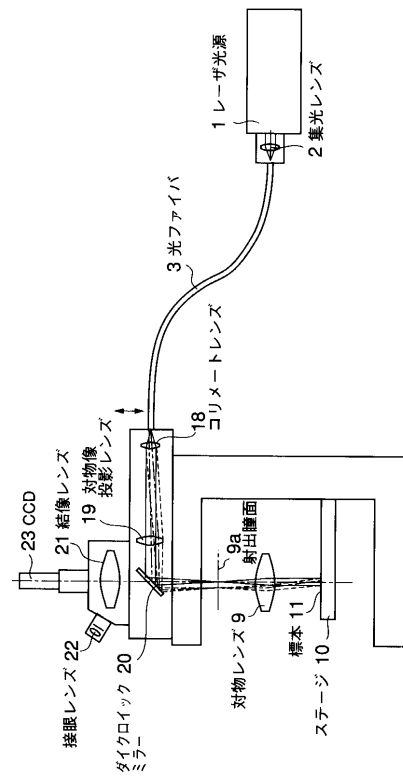
【図 2】



【図 3】



【図 4】



---

フロントページの続き

審査官 瀬川 勝久

- (56)参考文献 特開平 0 9 - 1 5 2 5 5 4 ( J P , A )  
特開 2 0 0 2 - 0 3 1 7 6 2 ( J P , A )  
特開 2 0 0 0 - 0 3 9 5 6 2 ( J P , A )  
特開平 0 6 - 0 5 1 2 0 5 ( J P , A )  
特開平 0 6 - 0 2 7 3 8 6 ( J P , A )  
特開 2 0 0 3 - 0 2 9 1 5 3 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G02B 21/00

G02B 21/06-21/36