

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4128256号
(P4128256)

(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 21/00 (2006. 01)
G O 2 B 7/28 (2006. 01)
 G O 2 B 21/00
 G O 2 B 7/11 J

請求項の数 3 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平10-53508	(73) 特許権者	000000376
(22) 出願日	平成10年3月5日 (1998. 3. 5)		オリンパス株式会社
(65) 公開番号	特開平11-249022		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
(43) 公開日	平成11年9月17日 (1999. 9. 17)	(74) 代理人	100058479
審査請求日	平成17年3月4日 (2005. 3. 4)		弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100084618
			弁理士 村松 貞男
		(74) 代理人	100100952
			弁理士 風間 鉄也
		(74) 代理人	100097559
			弁理士 水野 浩司
		(72) 発明者	荒井 祐仁
			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】 走査型レーザ顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料に対してレーザビームを走査しながら照射し、該試料からの光量に応じた検出信号から画像情報を得るようにした走査型レーザ顕微鏡において、
 前記試料に対するレーザビームの走査速度を切換え制御可能にするとともに、前記試料が非合焦位置にあると、該試料が合焦位置にある場合に比べ、前記点光源の走査速度を高速に切換える走査速度制御手段を有し、
 この走査速度制御手段の高速制御の下で、前記試料に対する検出信号に基づいて前記試料の合焦位置を設定することを特徴とする走査型レーザ顕微鏡。

【請求項 2】

さらに、試料からの検出信号として走査範囲内の平均的な光量を得るためのフィルタ手段を有することを特徴とする請求項 1 記載の走査型レーザ顕微鏡。

【請求項 3】

さらに、試料からの検出信号から前記試料の合焦位置を検出する合焦位置検出手段と、この合焦位置検出手段の検出出力に応じて前記試料に対する焦点位置を調整する焦点位置調整手段とを有することを特徴とする請求項 1 記載の走査型レーザ顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料に対してレーザビームを走査しながら照射し、該試料からの光を検出する

10

20

ことで画像情報を得るようにした走査型レーザ顕微鏡に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

走査型レーザ顕微鏡は、レーザビームなどの点光源を対物レンズを介して試料のX軸、Y軸方向に走査しながら照射し、試料からの蛍光または反射光を再び対物レンズ、光学系を介して光検出器で検出し、2次元像の濃淡情報を得、この濃淡情報の2次元の分布を、点光源のX-Y走査位置に対応させてCRTモニタやカラープリンタなどの画像出力装置に輝点の分布として表示することにより画像情報として観察できるようにしている。

【0003】

また、このような走査型レーザ顕微鏡には、検出器を有する検出光学系の試料と共役な位置に、照明光あるいは被測定光の回折限界程度の径を持つ絞りを設けることによって、焦点の合っている面の情報のみを検出可能にした共焦点走査型レーザ顕微鏡も知られている。

10

【0004】

このような共焦点走査型レーザ顕微鏡では、合焦面の情報のみを検出できるため、試料に傷を付けることなく、光学的に断層像、つまり3次元情報が得られ、しかも、非合焦面の情報をカットすることで、非常にシャープな像が得られるという特徴を持っている。

【0005】

ところで、一般的な光学顕微鏡では、非合焦面の情報の変化から、目的とする試料位置が現在の焦点位置から上下方向のいずれに有るか、大まかに見当付けることができる。例えば、特開昭59-182409号公報や特開昭64-42416号に開示される光学顕微鏡は、デフォーカス量つまり非合焦面からの情報を用いて素早く合焦させるオートフォーカス機能が取付けられており、それにより簡単に合焦位置を得ることができる。

20

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

ところが、上述した共焦点走査型レーザ顕微鏡では、光学顕微鏡のような非合焦面の情報が得られないため、目的とする試料を合焦位置に移動させるには、オペレータの経験と作業時間を要するという問題があった。

【0007】

そのため、例え上述した光学顕微鏡と同様の原理のオートフォーカス機能を共焦点顕微鏡に取付けようとしても、共焦点走査型レーザ顕微鏡では、非合焦面の情報を得ることができないために適用することができない。

30

【0008】

また、このような共焦点走査型レーザ顕微鏡では、点光源を試料面上で走査することで、2次元情報を画像化しているため、1枚の画像を得るのに1秒から数秒もの時間がかかり、さらに合焦位置の検索を困難にしている。

【0009】

そこで、従来、合焦位置の検索を少しでも容易に行えるようにするため、1画面当たりの走査本数を減少させることで、1画像の取得に要する時間を短縮するなどの方法が考えられている。ところが、これまで用いられている方法では、走査により取得した画像を表示しながら試料の位置を調整するようにしているため、操作時間の短縮が十分でなく、また、試料に対して不必要に光を照射するようになるため試料に対してダメージを与えるなどの問題があった。

40

本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、簡単かつ迅速に合焦位置を得ることができる走査型レーザ顕微鏡を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

ところで、一般に、走査型レーザ顕微鏡に用いられるスキャナとしては、ガルバノメータミラー（以下ガルバノ）が用いられる。このガルバノの走査の直線性を考慮すると、数百Hz以下の低い繰り返し周波数で駆動することが求められるが、走査線数が数百本から数

50

千本程度である画像の取得には、上述したように1秒から数秒の時間が必要となる。しかし、走査の直線性を無視した場合、ガルバノは、通常の画像取得時の数倍から十倍程度の周波数まで駆動信号に応答可能である。また、試料が合焦位置にある場合は、大きな測定信号が得られるのに対し、試料が非合焦位置にある場合は、測定信号が無信号である。

【0011】

以上の点に着目して、本発明では、以下のように構成している。

請求項1記載の発明は、試料に対してレーザビームを走査しながら照射し、該試料からの光量に応じた検出信号から画像情報を得るようにした走査型レーザ顕微鏡において、前記試料に対するレーザビームの走査速度を切り換え制御可能にするとともに、前記試料が非合焦位置にあると、該試料が合焦位置にある場合に比べ、前記点光源の走査速度を高速に切 10
換える走査速度制御手段を有し、この走査速度制御手段の高速制御の下で、前記試料に対する検出信号に基づいて前記試料の合焦位置を設定するようにしている。

【0012】

請求項2記載の発明は、請求項1記載において、さらに、試料からの検出信号として走査範囲内の平均的な光量を得るためのフィルタ手段を有している。

請求項3記載の発明は、請求項1記載において、さらに、試料からの検出信号から前記試料の合焦位置を検出する合焦位置検出手段と、この合焦位置検出手段の検出出力に応じて前記試料に対する焦点位置を調整する焦点位置調整手段とを有している。

【0013】

この結果、請求項1記載の発明によれば、通常の画像取得に比べて高速な更新時間で試料 20
からの検出信号を得られるので、敏速な合焦操作を行うことができ、しかも、試料に対し不必要な光の照明時間を短くできる。

【0014】

請求項2記載の発明によれば、試料上の走査範囲内での平均的な光量を検出信号として得られるので、的確な合焦操作を行うことができる。

請求項3記載の発明によれば、操作者の経験を必要としていた合焦操作をすべて自動化することができる。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を図面に従い説明する。 30

（第1の実施の形態）

図1は、本発明が適用される共焦点走査型レーザ顕微鏡の概略構成を示している。

【0016】

この場合、レーザ発振器1からのレーザビーム（照明光）をビームエキスパンダ2を通して、ビームスプリッタやダイクロイックミラーなどの光路分割素子3で反射させ、ガルバノなどを用いたX方向スキャナ4およびY方向スキャナ5に入射させ2次元走査するように偏向させ、さらにY方向スキャナ5を出射したレーザビームを瞳投影レンズ6、結像レンズ7を介して対物レンズ8に入射させ、試料9面を2次元走査させるようにしている。

【0017】

そして、試料9からの蛍光（または反射光）をレーザビームと同じ光路をたどって光路分割素子3に戻し、今度は、この光路分割素子3、共焦点光学系10を透過させ、ダイクロイックミラーや干渉フィルタなどの波長選択素子11を介して光電変換回路12で受光する 40
ようにしている。

【0018】

ここでは、簡単のため、光電変換回路12が一つの場合を示しているが、複数の波長選択素子11と光電変換回路12により複数の蛍光波長を測定可能としたものにも適用できる。

【0019】

光電変換回路12は、波長選択素子11を介して受光した試料9からの蛍光（または反射光）を輝度情報を示す電気信号に変換するもので、この輝度情報をローパスフィルタ13 50

を介してA/D変換回路14でデジタルデータに変換してデータ処理装置15に試料9に対する検出信号として入力するようにしている。ここで、ローパスフィルタ13は、後述するX方向スキャナ4の駆動波形の周波数と同等あるいはそれ以下で、Y方向スキャナ5の駆動波形の周波数以上のカットオフ周波数を有するものが用いられる。

【0020】

データ処理装置15は、A/D変換回路14からのデジタルデータを処理した後、CRTモニター16に画像情報を表示させるようにしている。また、データ処理装置15は、試料9が焦点位置にある場合と非焦点位置にある場合のそれぞれA/D変換回路14から与えられる輝度情報の変化に応じて走査制御装置17に指令を与え、走査駆動回路18、19の動作設定を制御させるようにしている。ここで、走査駆動回路18は、X方向スキャナ4を駆動するためのもので、走査駆動回路19は、Y方向スキャナ5を駆動するためのものである。

10

【0021】

次に、このように構成した実施の形態の動作を説明する。

まず、試料9が焦点の合った位置に配置されている状態で、通常の画像を取得する場合を説明する。

【0022】

この場合、走査制御装置17の指示により、走査駆動回路18には、図2(a)に示すような400Hz程度のX方向スキャナ4の駆動波形を出力する波形データが書き込まれ、同時に走査駆動回路19には、同図(b)に示すようなY方向スキャナ5の駆動波形を出力する波形データが書き込まれる。

20

【0023】

この状態で、レーザ発振器1からレーザビームが発せられると、ビームエキスパンダ2を通して、光路分割素子3で反射され、X方向スキャナ4およびY方向スキャナ5で2次元走査され、瞳投影レンズ6、結像レンズ7、そして対物レンズ8を通して試料9面で2次元走査される。

【0024】

この場合、X方向スキャナ4およびY方向スキャナ5による試料9での走査は、図4(a)に示すように試料9面の上方から下方に向けて、一方向の走査線が順次走査されるようになる。

30

【0025】

この状態で、試料9からの蛍光（または反射光）は、レーザビームと同じ光路をたどって光路分割素子3に戻され、光路分割素子3、共焦点光学系10、さらには波長選択素子11を介して光電変換回路12で受光され、上述のX-Y走査に同期された輝度情報を示す電気信号に変換され、さらにローパスフィルタ13を介してA/D変換回路14でデジタルデータに変換され、データ処理装置15で、2次元画像情報として処理された後、CRTモニター16に表示される。

【0026】

このような一連の動作は、試料9が焦点の合っている状態、つまり合焦していることが条件であり、A/D変換回路14からは、試料9の輝度情報が出力データとして出力され、データ処理装置15によりCRTモニター16に画像情報が表示されている。

40

【0027】

ところが、試料9が焦点の合っていない状態、つまり非合焦位置にあると、A/D変換回路14への入力は無入力状態となり、これに伴いCRTモニター16上には画像が表示されなくなる。

【0028】

操作者は、画像が表示されなくなったこと、つまり非合焦位置にあることを認識すると、走査制御装置17に対して走査駆動回路18に、上述した通常の画像取得の場合と比べて十分高速な繰り返し周波数の駆動波形、ここでは、図3(a)に示す1KHz程度のX方向スキャナ4の駆動波形を出力する波形データを書き込み、同時に走査駆動回路19に、

50

同図（b）に示すY方向スキャナ5の駆動波形を出力する波形データを書き込ませる操作を行う。また、無入力状態をデータ処理装置15が自動的に認識し、上記指示を走査操作制御装置17に行なうようにしてもよい。この場合のX方向スキャナ4の駆動波形は、ガルバノの特性を考慮して正弦波のような対称性の高い波形により繰り返し周波数を上げることが望ましい。

【0029】

この状態から走査駆動回路18、19によりX方向スキャナ4およびY方向スキャナ5の高速走査を開始すると、レーザ光源1からのレーザビームは、図4（b）に示すように試料9面で2次元走査され、これにともない光電変換回路12からの電気信号がA/D変換回路14に入力される。

10

【0030】

この場合、A/D変換回路14の入力側には、X方向スキャナ4の駆動波形の周波数と同等あるいはそれ以下で、Y方向スキャナ5の駆動波形の周波数以上のカットオフ周波数を有するローパスフィルタ13が設けられることにより、A/D変換回路14からの出力データは、X方向走査1ライン分ないしY方向走査1フレーム内の平均的な光量を表すことになる。

【0031】

そして、データ処理装置15により、これら1ライン分ないし1フレーム内の平均光量を示すデータの時間的変化をCRTモニター16に、例えば棒グラフや折れ線グラフとして表示する。

20

【0032】

操作者は、これらグラフ内容を参照し、試料9を載置したステージあるいは対物レンズ8を光軸方向で移動し、試料9と対物レンズ8の相対距離を変化させながら合焦操作を行う。そして、合焦位置に達してA/D変換回路14への入力が立ち上がると、この時のA/D変換回路14の出力データの上昇に伴うCRTモニター16上に表示されたグラフの変化から、操作者は、試料が焦点位置に到達した合焦を認識することができる。

【0033】

そして、この合焦状態から、走査制御装置17より、走査駆動回路18に図2（a）に示すX方向スキャナ4の駆動波形を出力する波形データを書き込むとともに、走査駆動回路19に、同図（b）に示すY方向スキャナ5の駆動波形を出力する波形データをそれぞれ書き込み、再びX方向スキャナ4およびY方向スキャナ5により試料9上でレーザビームを2次元走査させることにより、CRTモニター16に試料9の2次元画像情報を表示させる。

30

【0034】

従って、このようにすれば、走査制御装置17によりX方向スキャナ4およびY方向スキャナ5による試料9に対するレーザビームの走査速度を切換え可能にするとともに、試料9が非合焦位置にあると、この試料9が合焦位置にある場合に比べ、レーザビームの走査速度を高速に切換えるようにし、この高速制御の下で、試料9に対する検出信号に基づいて試料9と対物レンズ8の相対距離を変化させながら試料9の合焦位置を設定するようにしたので、通常の画像取得に比べて数倍から十倍程度もの高速な更新時間で試料9からの検出信号が得られ、敏速な合焦操作を行うことができる。この場合にY方向スキャナ5の駆動波形の周波数を上げることで、X方向スキャナ4の走査密度を下げるようにすれば、さらに走査の高速化を得られるので、さらに敏速な合焦操作を実現できる。この結果として、試料9に対し不必要な光の照明時間を短くできるので、試料9に対してダメージを与えるような不都合も回避できる。

40

【0035】

また、X方向スキャナ4の駆動波形の周波数と同等あるいはそれ以下で、Y方向スキャナ5の駆動波形の周波数以上のカットオフ周波数を有するローパスフィルタ13を設けることにより、試料9の検出信号は、X方向走査1ライン分ないしY方向走査1フレーム内の平均的な光量として得られるので、さらに的確な合焦操作を行うことができる。

50

【0036】

なお、Y方向スキャナ5の駆動波形の周波数を変えることで、X方向スキャナ4の走査密度を任意に変化できることから、測定対象に応じてY方向スキャナ5の駆動波形の周波数を任意に設定できるようにしてもよい。

(第2の実施の形態)

第1の実施の形態では、操作者は、1ラインまたは1フレーム内の平均光量を示すグラフを参照しながら合焦操作を行うようにしているため、操作に対してある程度の経験が必要であった。

【0037】

そこで、この第2の実施の形態では、合焦動作を自動化したものである。

10

図5は、本発明の第2の実施の形態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説明を省略する。

【0038】

この場合、試料9と対物レンズ8の焦点位置を相対的に移動させる焦点位置調整手段20と、A/D変換回路14からの出力データから合焦位置を判断する合焦位置検出手段21を設けて、これら焦点位置調整手段20と合焦位置検出手段21により合焦操作の自動化を実現している。

【0039】

ところで、一般的な顕微鏡では、観察対象の試料をステージに載置し、試料と対物レンズの焦点位置との相対位置を調整するため焦準機構が設置されている。特に、正立型顕微鏡では、対物レンズを上下に移動することで、試料と対物レンズの焦点位置との相対位置を調整するようにしているが、これらの調整動作を電動化するため、駆動源としての電動モータや圧電素子を用いた piezoアクチュエータが通常用いられている。

20

【0040】

この第2の実施の形態では、焦点位置調整手段20での試料9と対物レンズ8の焦点位置との相対位置を調整するたの駆動源として、上述の piezoアクチュエータが用いられる。また、合焦位置検出手段21は、A/D変換回路14から出力される測定信号に応じたデジタルデータと、予め設定された合焦検出レベルとを比較する機能を有し、A/D変換回路14からの測定信号に応じたデータが合焦検出レベル以上になった位置を合焦位置として、合焦検出信号を焦点位置調整手段20に出力するようにしている。なお、合焦位置検出手段21は、図示破線で示すようにA/D変換回路14の入力側に接続して、A/D変換回路14に入力されるアナログ信号から合焦位置を検出するようにもできる。

30

【0041】

このような構成において、合焦位置を検出するには、この場合も、走査制御装置17から高速な走査波形が指示され、走査駆動回路18、19によりXスキャナ4およびYスキャナ5が高速走査を開始する。すると、焦点位置調整手段20では、最初に、試料9と対物レンズ8の相対距離を離れる方向に移動し、所定距離離れた所で、今度は、一定の速度で試料9と対物レンズ8の相対距離を近付けて行く。この時の移動速度は、共焦点効果による光学的な深さ(Z)方向の分解能、Xスキャナ4およびYスキャナ5での走査速度、ローパスフィルタ14のカットオフ周波数などにより適宜調整する必要があるが、具体的には、Y方向スキャナ5が1フレーム分走査する間に、Z方向の分解能と同等あるいは、その数倍の移動速度が望ましい。

40

【0042】

この状態で、試料9と対物レンズ8との間の距離が近付いていって、試料9の一部が焦点位置に入ってA/D変換回路14の出力データに変化が現れると、合焦位置検出手段21では、A/D変換回路14の測定信号に応じたデータと予め設定された合焦検出レベルとを比較し、この時のデータが合焦検出レベル以上になると、この位置を合焦位置と判断し、合焦検出信号を焦点位置調整手段20に出力する。これにより、焦点位置調整手段20は、このときの合焦検出信号により試料9と対物レンズ8の相対距離の移動を停止する。また、この合焦検出信号によりスキャン制御装置17は、高速走査を停止し、通常の画像

50

取得のための走査を開始するようになり、第 1 の実施の形態で述べたように C R T モニタ 1 6 には、試料 9 面が表示されるようになる。

【0 0 4 3】

従って、このようにすれば、これまで、ある程度操作者の経験を必要としていた合焦操作を自動化できるので、さらに敏速かつ確実な合焦操作を実現できる。

なお、上述した実施の形態では、ガルバノメータミラーについて述べたが、音響光学系スキャナを用いたものにも適用することができる。

【0 0 4 4】

【発明の効果】

以上述べたように、本発明によれば、通常の画像取得に比べて高速な更新時間で試料からの検出信号を得られるので、敏速な合焦操作を行うことができ、しかも、試料に対し不必要な光の照明時間を短くできるので、試料に対してダメージを与えるような不都合も回避できる。

【0 0 4 5】

また、試料上の走査範囲内の平均的な光量を検出信号として得られるので、的確な合焦操作を行うことができる。

さらに操作者の経験を必要としていた合焦操作をすべて自動化することができるので、さらに敏速かつ確実な合焦操作を実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の第 1 の実施の形態の概略構成を示す図。

【図 2】第 1 の実施の形態の X、Y 方向スキャナの駆動波形を示す図。

【図 3】第 1 の実施の形態の X、Y 方向スキャナの駆動波形を示す図。

【図 4】第 1 の実施の形態の動作を説明するための図、

【図 5】本発明の第 2 の実施の形態の概略構成を示す図。

【符号の説明】

- 1 … レーザ発振器、
- 2 … ビームエキスパンダ、
- 3 … 光路分割素子、
- 4 … X 方向スキャナ、
- 5 … Y 方向スキャナ、
- 6 … 瞳投影レンズ、
- 7 … 結像レンズ、
- 8 … 対物レンズ、
- 9 … 試料、
- 1 0 … 共焦点光学系、
- 1 1 … 波長選択素子、
- 1 2 … 光電変換回路、
- 1 3 … ローパスフィルタ、
- 1 4 … A / D 変換回路、
- 1 5 … データ処理装置、
- 1 6 … C R T モニター、
- 1 7 … 走査制御装置、
- 1 8、1 9 … 走査駆動回路、
- 2 0 … 焦点位置調整手段、
- 2 1 … 合焦位置検出手段。

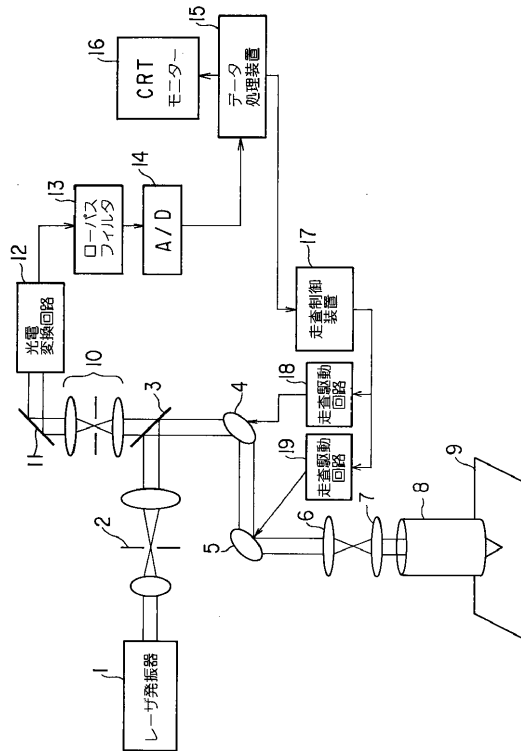
10

20

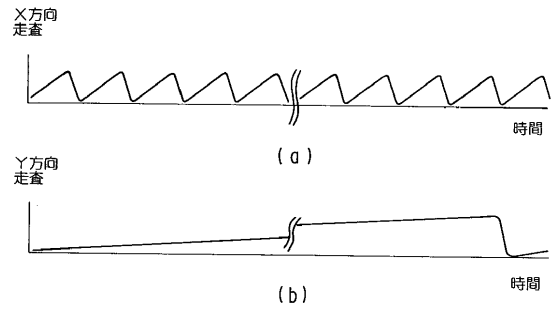
30

40

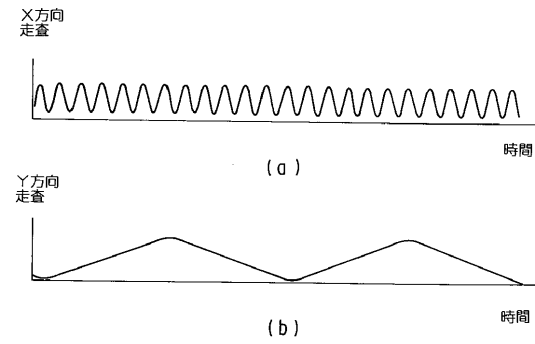
【図 1】



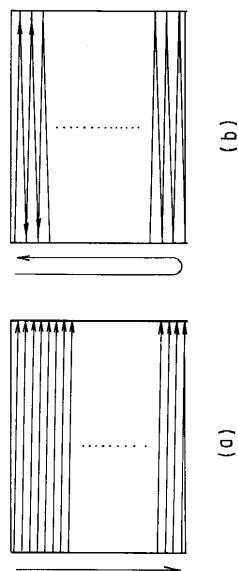
【図 2】



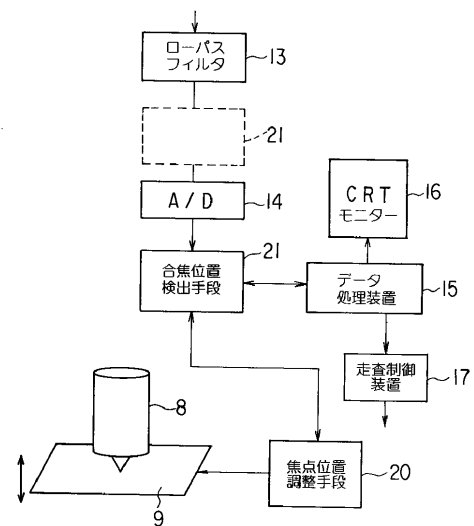
【図 3】



【図 4】



【図 5】



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 9-68413 (JP, A)
特開平 9-325278 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G02B 21/00
G02B 21/06-21/36