

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4573524号
(P4573524)

(45) 発行日 平成22年11月4日 (2010. 11. 4)

(24) 登録日 平成22年8月27日 (2010. 8. 27)

(51) Int. Cl. F 1
G 0 2 B 21/00 (2006. 01) G O 2 B 21/00
G 0 2 B 21/06 (2006. 01) G O 2 B 21/06

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2003-427415 (P2003-427415)	(73) 特許権者	000000376
(22) 出願日	平成15年12月24日 (2003. 12. 24)		オリンパス株式会社
(65) 公開番号	特開2005-189290 (P2005-189290A)		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
(43) 公開日	平成17年7月14日 (2005. 7. 14)	(74) 代理人	100091351
審査請求日	平成18年12月22日 (2006. 12. 22)		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	顕谷 昭典
			東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4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】 走査型レーザー顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標本に対して光ビームを走査するための第一、第二の走査光学系と、
 標本の共焦点走査画像を得るための一つの検出光学系とを備えており、
前記第一、第二の走査光学系は、それぞれ、光ビームを発するレーザー光源と、光ビームを走査する走査光学ユニットとを有しており、

前記検出光学系は、第一の走査光学系の走査光学ユニットを介して標本と光学的に結合されており、共焦点ピンホールと、前記共焦点ピンホールを通過した光を検出する光検出器とを有しており、

前記第一、第二の走査光学系によって走査される光ビームの収束点から発生した光が前記第一の走査光学系の走査光学ユニットを介して前記検出光学系によって収束される点の位置である共焦点位置と前記共焦点ピンホールの位置とを前記検出光学系の光軸に直交する方向に移動させて一致させるための共焦点位置調整手段と、

走査光学系ごとの振幅と周期を同一にするための制御手段とをさらに備えており、

前記共焦点位置調整手段は、前記第一の走査光学系によって走査される光ビームが前記第一の走査光学系の走査光学ユニットを介して収束される共焦点位置と前記共焦点ピンホールの位置とが一致する状態と、前記第二の走査光学系によって走査される光ビームが前記第一の走査光学系の走査光学ユニットを介して収束される共焦点位置と前記共焦点ピンホールの位置とが一致する状態とに前記制御手段によって調整可能である、走査型レーザー顕微鏡。

10

20

【請求項 2】

請求項 1 において、前記共焦点位置調整手段は、前記共焦点ピンホールを検出光学系の光軸にほぼ直交する方向に移動させるピンホール移動手段を備えている、走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 3】

請求項 2 において、前記制御手段は、走査光学系ごとの前記共焦点ピンホールの位置を記憶しておく、走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 4】

請求項 3 において、前記制御手段に対して情報を入力するための入力手段をさらに備えており、前記制御手段は、入力された情報に対応する前記共焦点ピンホールの位置を読み出して、その位置に前記共焦点ピンホールを配置するようにピンホール移動手段を制御する、走査型レーザー顕微鏡。

10

【請求項 5】

請求項 1 において、前記共焦点位置調整手段は、前記共焦点ピンホールに向かう光ビームの光路を横切って配置された平行平板と、前記検出光学系の光軸に対する前記平行平板の傾斜角度を調整するための角度調整手段とを備えており、前記平行平板の傾斜角度を調整することにより、前記共焦点位置を検出光学系の光軸と直交する方向に調整可能である、走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 6】

請求項 5 において、前記制御手段は、走査光学系ごとの前記平行平板の傾斜角度を記憶しておく、走査型レーザー顕微鏡。

20

【請求項 7】

請求項 6 において、前記制御手段に対して情報を入力するための入力手段をさらに備えており、前記制御手段は、入力された情報に対応する前記平行平板の傾斜角度を読み出し、その傾斜角度に前記平行平板の傾斜角度を合わせるように角度調整手段を制御する、走査型レーザー顕微鏡。

【請求項 8】

請求項 1 において、前記第一、第二の走査光学系は、それぞれ、前記レーザー光源からの光ビームを適宜遮断する遮断手段を備えている、走査型レーザー顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、走査型レーザー顕微鏡に関する。

【背景技術】

【0002】

走査型レーザー顕微鏡は、レーザー光ビームを走査し光学系と対物レンズを介して標本の X 軸、Y 軸方向に走査しながら照射し、標本からの蛍光または反射光を再び対物レンズと走査光学系を介して検出器で検出して蛍光または反射光の二次元の輝度情報を得る顕微鏡である。また、この輝度情報を X-Y 走査位置に対応させてディスプレイなどに輝点の二次元分布として表示することによって、標本の蛍光像または反射光像を観察することも可能である。このレーザー顕微鏡の内、共焦点走査型レーザー顕微鏡は、検出光学系の標本と共役な位置に被測定光の回折限界程度の径の開口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するものである。この共焦点走査型レーザー顕微鏡は、合焦面の情報だけを検出できるので、三次元情報を得ることができる。また、非合焦面の情報をカットすることによって、極めてシャープな画像を得ることができる。

40

【0003】

さらに、最近では標本内の特定部位にイオン物質を出現させることができるケージド試薬が提案されている。ケージド試薬は空と異なるケージド基の中に、イオン物質を包含させたもので、標本内に注入した後、紫外線を照射することによってケージド基が開裂するため、所望の特定部位にイオン物質を出現させることができる。

50

【0004】

特開平10-206742号公報は、蛍光指示薬とケージド試薬とを標本内に導入し、特定部位のケージド試薬を開裂させ、蛍光指示薬からの蛍光を観察する装置を開示している。この装置は、蛍光指示薬を励起して蛍光像を得るための走査光学系と、ケージド試薬を開裂させるための走査光学系とを備えている。

【0005】

また、特開平2000-275529号公報は、標本面への走査を精度良く行なうため、複数の走査光学系の走査を同期させることを開示している。

【特許文献1】特開平10-206742号公報

【特許文献2】特開平2000-275529号公報

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、このような公知の装置では、複数の走査光学系のうち一つ以外の走査光学系はすべて標本刺激用として使用されている。このため、それらの走査光学系を用いた共焦点走査画像を得ることができない。

【0007】

特開平10-206742号公報に開示されている装置は、蛍光指示薬を励起して蛍光像を得るための走査光学系（第一走査光学系）と、ケージド試薬を開裂させるための走査光学系（第二走査光学系）と、共焦点ピンホールとこれを通じた光を検出する光検出器を含む検出光学系とを備えている。共焦点ピンホールは第一走査光学系に対して位置調整されている。第二走査光学系の光軸は、ダイクロイックミラーによって、第一走査光学系の光軸に結合されている。

20

【0008】

通常、ダイクロイックミラーの組み付けは角度誤差を伴う。ダイクロイックミラーの組み付け角度誤差があると、第一走査光学系の光軸と第二走査光学系の光軸は完全には一致しない。従って、第一走査光学系の光ビームの照射位置と第二走査光学系の光ビームの照射位置とは異なる。

【0009】

その結果、第二走査光学系の光ビームの照射によって発生した標本からの蛍光は、第一走査光学系に対して適切な位置に配置されている共焦点ピンホールを通ることができない。つまり、第二走査光学系による蛍光は、共焦点ピンホールでけられてしまうため、共焦点ピンホールの後方に配置された光検出器で検出できない。

30

【0010】

ここでは、ダイクロイックミラーの組み付け誤差について述べたが、第二走査光学系の組み付け誤差によっても、共焦点位置はずれる。また、複数のダイクロイックミラーを切り換えて使用する構成では、ダイクロイックミラーごとに組み付け誤差が異なるため、選択されたダイクロイックミラーに応じて共焦点位置が変わる。

【0011】

本発明は、このような実状を考慮して成されたものであり、その目的は、複数の走査光学系のいずれからの光ビームについても共焦点走査画像を得ることのできる走査型レーザー顕微鏡を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の走査型レーザー顕微鏡は、標本に対して光ビームを走査するための第一、第二の走査光学系と、標本の共焦点走査画像を得るための少なくとも一つの検出光学系とを備えている。第一、第二の走査光学系は、それぞれ、光ビームを発するレーザー光源と、光ビームを走査する走査光学ユニットとを有している。検出光学系は、第一の走査光学系の走査光学ユニットを介して標本と光学的に結合されている。検出光学系は、共焦点ピンホールと、共焦点ピンホールを通過した光を検出する光検出器とを有している。走査型レー

50

ザー顕微鏡は、さらに、第一、第二の走査光学系によって走査される光ビームの収束点から発生した光が第一の走査光学系の走査光学ユニットを介して前記検出光学系によって収束される点の位置である共焦点位置と検出光学系の共焦点ピンホールの位置とを前記検出光学系の光軸に直交する方向に移動させて一致させるための共焦点位置調整手段と、走査光学系ごとの振幅と周期を同一にするための制御手段とを備えている。共焦点位置調整手段は、第二の走査光学系によって走査される光ビームが第一の走査光学系の走査光学ユニットを介して収束される共焦点位置と共焦点ピンホールの位置とを一致させる状態と、第一の走査光学系によって走査される光ビームが第一の走査光学系の走査光学ユニットを介して収束される共焦点位置と前記共焦点ピンホールの位置とを一致させる状態とに前記制御手段によって調整可能である。

10

【発明の効果】

【0013】

本発明の走査型レーザー顕微鏡によれば、複数の走査光学系のいずれからの光ビームについても共焦点走査画像を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、図面を参照しながら本発明の実施形態について説明する。

【0015】

第一実施形態

図1は、本発明の第一実施形態の走査型レーザー顕微鏡の光学系のブロック図である。走査型レーザー顕微鏡100は、標本105が載置されるステージ101と、ステージ101に載置された標本105に対して第一光ビームを走査する第一走査光学系Aと、ステージ101に載置された標本105に対して第二光ビームを走査する第二走査光学系Bとを備えている。

20

【0016】

第一走査光学系Aと第二走査光学系Bは、ステージ101の上方に配置された対物レンズ102と結像レンズ103を共通に含んでいる。

【0017】

第一走査光学系Aは、さらに、第一光ビームを射出する第一レーザー光源部111と、第一レーザー光源部111からの第一光ビームを適宜遮断するための第一レーザーシャッター112と、第一光ビームを偏向するためのダイクロイックミラー部113と、第一光ビームを走査するための第一走査光学ユニット114と、第一光ビームを収束させる瞳投影レンズ115と、第一光ビームを対物レンズ102と結像レンズ103に方向付けるミラー116とを備えている。

30

【0018】

第一走査光学ユニット114は、例えば、一本の軸の周りに回転可能な可変ミラー114aと、可変ミラー114aの軸にほぼ直交する一本の軸の周りに回転可能な可変ミラー114bとを備えている。

【0019】

第二走査光学系Bは、第二光ビームを射出する第二レーザー光源部121、第二レーザー光源部121からの第二光ビームを適宜遮断するための第二レーザーシャッター122、第二光ビームを走査するための第二走査光学ユニット124、第二光ビームを収束させる瞳投影レンズ125と、第一光ビームを対物レンズ102と結像レンズ103に方向付けるためのダイクロイックミラー部127とを備えている。

40

【0020】

第二走査光学ユニット124は、例えば、一本の軸の周りに回転可能な可変ミラー124aと、可変ミラー114aの軸にほぼ直交する一本の軸の周りに回転可能な可変ミラー124bとを備えている。

【0021】

第一レーザーシャッター112と第二レーザーシャッター122は、例えば、一般に広

50

く知られている機械的なシャッターで構成されるが、これに限定されるものではなく、A O T Fなどの音響光学素子、電気光学素子（E O M）、液晶シャッターなどで構成されてもよい。

【0022】

第二走査光学系Bの光軸はダイクロイックミラー部127によって第一走査光学系Aの光軸に合成されている。つまり、ダイクロイックミラー部127とステージ101の間では、第一走査光学系Aの光軸と第二走査光学系Bの光軸はほぼ一致している。

【0023】

ここで、第一走査光学系Aの光軸は、第一レーザー光源部111から射出され、ステージ101に載置された標本105に到達する第一光ビームが通る経路を意味し、第二走査光学系Bの光軸は、第二レーザー光源部121から射出され、ステージ101に載置された標本105に到達する第二光ビームが通る経路を意味している。

【0024】

第一走査光学系Aの瞳投影レンズ115の焦点位置は、第一走査光学系Aの光路上における結像レンズ103の焦点位置と一致するように配置されている。同様に、第二走査光学系Bの瞳投影レンズ125の焦点位置は、第二走査光学系Bの光路上における結像レンズ103の焦点位置と一致するように配置されている。

【0025】

第一レーザー光源部111は、一つのレーザー光源で構成されてもよいが、好ましくは複数のレーザー光源を含んでいる。このため、ダイクロイックミラー部113は、第一レーザー光源部111内の複数のレーザー光源にそれぞれ対応している複数のダイクロイックミラーを含んでいる。第一レーザー光源部111内の使用されるレーザー光源に対応しているダイクロイックミラーが選択的に光路上に配置される。

【0026】

同様に、第二レーザー光源部121も、一つのレーザー光源で構成されてもよいが、好ましくは複数のレーザー光源を含んでいる。このため、ダイクロイックミラー部127は、第二レーザー光源部121内の複数のレーザー光源にそれぞれ対応している複数のダイクロイックミラーを含んでいる。第二レーザー光源部121内の使用されるレーザー光源に対応しているダイクロイックミラーが選択的に光路上に配置される。

【0027】

ダイクロイックミラー部113とダイクロイックミラー部127は同じ構成をしている。図2は、ダイクロイックミラー部の構成を模式的に示している。図2に示されるように、ダイクロイックミラー部は、複数のダイクロイックミラー151と、ダイクロイックミラー151を支持している支持台152と、支持台152を回転させるためのモーター153と、支持台152の移動を検出したときにダイクロイックミラー151の切り換えの認識信号を出力するダイクロイックミラー切換認識用センサー154とを備えている。

【0028】

ダイクロイックミラー151は、ハーフミラーなどのビームスプリッターであってもよい。

【0029】

走査型レーザー顕微鏡100は、さらに、標本105の共焦点走査画像を得るための検出光学系Cを備えている。検出光学系Cは、標本105で発生した蛍光を選択的に透過する測光フィルター131と、標本105からの蛍光ビームを収束させるレンズ132と、共焦点ピンホール133と、共焦点ピンホール133を通過した蛍光を検出する光検出器134とを備えている。光検出器134は例えば光電変換素子で構成される。

【0030】

検出光学系Cは、第一走査光学系Aの第一走査光学ユニット114を介して標本105と光学的に結合されている。言い換えれば、検出光学系Cの光軸はダイクロイックミラー部113によって第一走査光学系Aの光軸と合成されている。つまり、ダイクロイックミラー部113と標本105の間では、検出光学系Cの光軸と第一走査光学系Aの光軸はほ

10

20

30

40

50

ば一致している。

【0031】

ここで、検出光学系Cの光軸は、ステージ101に載置された標本105から発生し、共焦点ピンホール133を通過して光検出器134に到達する蛍光が通る経路を意味している。

【0032】

このため、ダイクロイックミラー部113は、第一レーザー光源部111からの第一光ビームは反射するが、標本105で発生した蛍光は透過する。つまり、ダイクロイックミラー部113内のダイクロイックミラーは、第一レーザー光源部111内の対応するレーザー光源が発する光は反射するが、第一レーザー光源部111内の対応するレーザー光源からの光によって発生された蛍光と第二レーザー光源部121内のレーザー光源からの光によって発生された蛍光は透過する。

10

【0033】

走査型レーザー顕微鏡100は、さらに、共焦点ピンホール133を検出光学系Cの光軸にほぼ直交する方向に移動させるためのXY微動ステージ135を備えている。XY微動ステージ135は、第一走査光学系と第二走査光学系の所望の一つの共焦点位置と検出光学系C内の共焦点ピンホール133の位置とを一致させる共焦点位置調整手段を構成している。

【0034】

ここで、走査光学系の共焦点位置とは、その走査光学系によって走査される光ビームの収束点から発生した蛍光が、第一走査光学系Aの第一走査光学ユニット114を介して検出光学系Cによって収束される点の位置である。

20

【0035】

走査型レーザー顕微鏡100は、さらに、コントロールユニット141と、情報を表示するためのディスプレイ142と、コントロールユニット141に対して情報を入力するための入力手段143とを備えている。

【0036】

コントロールユニット141は、第一レーザーシャッター112と第二レーザーシャッター122の開閉制御、第一走査光学ユニット114と第二走査光学ユニット124の走査制御、XY微動ステージ135の移動制御、ダイクロイックミラー部113とダイクロイックミラー部127の切り換え制御を行ったり、光検出器134、ダイクロイックミラー部113、ダイクロイックミラー部127、入力手段143から情報を取得したり、ディスプレイ142に情報を出力したり、共焦点ピンホール133の位置を記憶したりする。

30

【0037】

以下、走査型レーザー顕微鏡100の動作について述べる。

【0038】

標本105は、第一レーザー光源部111からの光によって励起される蛍光指示薬と、第二レーザー光源部121からの光によって励起される蛍光指示薬とが導入され、ステージ101上に配置される。

40

【0039】

第一レーザー光源部111からの第一光ビームは、第一レーザーシャッター112が開状態であれば第一レーザーシャッター112を通過し、ダイクロイックミラー部113によって第一走査光学ユニット114へ導かれ、第一走査光学ユニット114によって任意の方向に走査される。第一光ビームは、さらに、瞳投影レンズ115、ミラー116、ダイクロイックミラー部127、結像レンズ103、対物レンズ102を介して、標本105の断面106上に収束される。第一光ビームの収束点は、第一走査光学ユニット114によって断面106上を二次元走査される。

【0040】

第一光ビームが断面106上を走査されることによって、標本105内の蛍光指示薬が

50

励起されて蛍光が発生する。対物レンズ102によって捕らえられた蛍光は、第一光ビームと同じ光路を逆向きに進み、結像レンズ103、ダイクロイックミラー部127を透過し、ミラー116、瞳投影レンズ115、第一走査光学ユニット114を介してダイクロイックミラー部113へ導かれる。蛍光は、ダイクロイックミラー部113によって透過され、検出光学系Cへ導入される。

【0041】

検出光学系Cにおいて、蛍光は、測光フィルター131によって特定の波長成分が選択的に透過され、レンズ132と共焦点ピンホール133によって断面106からの光のみが選択されて、光検出器134へ入射する。

【0042】

光検出器134からの出力信号は、コントロールユニット141へ導かれ、走査制御に同期してデジタル信号に変換され、走査位置に対応してディスプレイ142上に表示される。表示された画像は、断面106での蛍光画像（蛍光輝度の二次元分布）、すなわち所望のイオン濃度の断面106内での分布を示している。

【0043】

一方、第二レーザー光源部121からの第二光ビームは、第二レーザーシャッター122が開状態であれば第二レーザーシャッター122を通過し、第二走査光学ユニット124、瞳投影レンズ125、ダイクロイックミラー部127を介して第一走査光学系Aからの光軸と合成される。第二光ビームは、結像レンズ103と対物レンズ102を透過して、標本105の断面106上に収束される。

【0044】

このときの、断面106上での第二光ビームの照射位置は、コントロールユニット141によって第二走査光学ユニット124を制御することによって、第一走査光学系の走査位置とは独立に選択することができる。

【0045】

第二光ビームが断面106上を走査されることによって、標本105内の蛍光指示薬が励起されて蛍光が発生する。対物レンズ102によって捉えられた蛍光は、第一走査光学系Aの第一光ビームの照射によって発生した蛍光と同様の経路を通り、光検出器134に入射する。

【0046】

光検出器134からの蛍光輝度信号はコントロールユニット141でA/D変換され蛍光画像としてディスプレイ142へ出力して表示される。

【0047】

次に、第一走査光学系Aと第二走査光学系Bの共焦点位置の補正について述べる。つまり、第一走査光学系Aと第二走査光学系Bの共焦点位置と共焦点ピンホール133の位置とをそれぞれ一致させる動作について説明する。

【0048】

まず、第二走査光学系Bの共焦点位置と共焦点ピンホール133の位置とを一致させる場合について説明する。

【0049】

コントロールユニット141からの第一走査光学ユニット114と第二走査光学ユニット124の制御信号を調整して、第一走査光学ユニット114と第二走査光学ユニット124の振幅と周期を同一にする。

【0050】

コントロールユニット141からの信号によって第一レーザーシャッター112を閉じ、第二走査光学系Bからの第二光ビームだけが標本105に照射されるようにする。コントロールユニットからの信号によってダイクロイックミラー部113とダイクロイックミラー部127内のモーター153を駆動して所望のダイクロイックミラー151に切り換える。

【0051】

コントロールユニット141は、ダイクロイックミラー切換認識用センサー154からの切り換えの認識信号を受けると、光検出器134から出力される光量信号をモニターしながらXY微動ステージ135を駆動して共焦点ピンホール133をXY方向に例えば一定のパターンに従ってスライド移動させて、光検出器134で検出される光量が最も大きくなるピンホール位置を探し出す。

【0052】

さらに、コントロールユニット141は、探し出したピンホール位置を、そのとき使用されている、ダイクロイックミラー部127内のダイクロイックミラーとダイクロイックミラー部113内のダイクロイックミラーと第二レーザー光源部121内のレーザー光源とに対応させて記憶する。

10

【0053】

記憶されたピンホール位置は、それに対応するダイクロイックミラー部127内のダイクロイックミラーとダイクロイックミラー部113内のダイクロイックミラーと第二レーザー光源部121内のレーザー光源とが入力手段143から設定された際にコントロールユニット141によって読み出され、コントロールユニット141は、XY微動ステージ135を駆動して共焦点ピンホール133の位置を、呼び出したピンホール位置に合わせる。

【0054】

入力手段143から設定されたダイクロイックミラーとレーザー光源の組み合わせが新しい場合には、前述した動作に従って、そのダイクロイックミラーとレーザー光源の組み合わせに対応した新しいピンホール位置を探し出して記憶する。

20

【0055】

第一走査光学系Aの共焦点位置の補正は、第二レーザーシャッター122を閉じ、第一レーザーシャッター112を開く点が異なるだけで、そのほかは第二走査光学系Bの共焦点位置の補正と同様である。

【0056】

このように使用する走査光学系と使用するレーザー光源とに応じて共焦点ピンホール133の位置を調節することによって、第一走査光学系Aの第一光ビームについての共焦点走査画像と第二走査光学系Bの第二光ビームについての共焦点走査画像とを取得することができる。

30

【0057】

図3は、第一走査光学系Aを用いて得られる共焦点走査画像範囲161と、第二走査光学系Bを用いて得られる共焦点走査画像範囲162とを示している。

【0058】

また、例えば第二走査光学系Bによる第二光ビームの走査の間、第二レーザーシャッター122の開閉を制御して第二光ビームを適宜遮断することによって、標本105に対する光ビームの照射領域を調整することもできる。これにより、取得する共焦点走査画像範囲を制限することができる。図4は、このような制御において第二走査光学系Bを用いて得られる共焦点走査画像範囲164を示している。共焦点走査画像範囲164は、第二走査光学系Bの第二光ビームの走査範囲163のうち、第二レーザーシャッター122が開いている状態に対応している。

40

【0059】

本実施形態の走査型レーザー顕微鏡100によれば、使用する走査光学系と使用するレーザー光源とに応じて共焦点ピンホール133の位置を調節することによって、一つの検出光学系で第一走査光学系Aによる共焦点走査画像と第二走査光学系Bによる共焦点走査画像とを取得することができる。

【0060】

言い換えれば、本実施形態によれば、既存の走査型レーザー顕微鏡100に別の走査光学系を追加し、その走査光学系を用いて共焦点走査画像を取得することができる。従って、新しく開発された蛍光色素に対してその蛍光色素を励起するための走査光学系を新しく

50

付け加える場面において良好に適用できる。

【0061】

第二実施形態

図5は、本発明の第二実施形態の走査型レーザー顕微鏡の光学系のブロック図である。図5において、図1に示された部材と同一の参照符号で指示された部材は同様の部材であり、その詳しい説明は省略する。

【0062】

図5に示されるように、本実施形態の走査型レーザー顕微鏡200は、検出光学系Cに加えて、標本105の共焦点走査画像を得るための別の検出光学系Dをさらに備えている。検出光学系Dは、共焦点ピンホール233と、共焦点ピンホール233を通過した蛍光を
10
検出する光検出器234と、ダイクロイックミラー部236とを備えている。光検出器234は、光検出器134と同様に、例えば光電変換素子で構成される。

【0063】

検出光学系Dの光軸はダイクロイックミラー部236によって検出光学系Cの光軸と合成されている。つまり、ダイクロイックミラー部236と標本105の間では、検出光学系Cの光軸と検出光学系Dの光軸はほぼ一致している。

【0064】

ここで、検出光学系Dの光軸は、ステージ101に載置された標本105から発生し、共焦点ピンホール233を通過して光検出器234に到達する蛍光が通る経路を意味して
20
いる。

【0065】

ダイクロイックミラー部236は、第一走査光学系Aによる第一光ビームの照射によって標本105から発生した蛍光と、第二走査光学系Bによる第二光ビームの照射によって標本105から発生した蛍光とを分離する。例えば、ダイクロイックミラー部236は、第一走査光学系Aからの第一光ビームによって発生した蛍光は透過し、第二走査光学系Bからの第二光ビームによって発生した蛍光は反射する。

【0066】

そのため、ダイクロイックミラー部236は、第一走査光学系Aの第一レーザー光源部111内のレーザー光源と第二走査光学系B内の第二レーザー光源部121内のレーザー光源との組み合わせに対応している複数のダイクロイックミラーを含んでいる。第一レーザー光源部111内の使用されるレーザー光源と第二レーザー光源部121内の使用されるレーザー光源との組み合わせに対応しているダイクロイックミラーが選択的に光路上に配置される。
30

【0067】

ダイクロイックミラー部236の構成は、ダイクロイックミラー部113またはダイクロイックミラー部127と同様である。

【0068】

また、走査型レーザー顕微鏡200は、第一実施形態のコントロールユニット141に代えて、コントロールユニット241を備えている。そのほかの構成は、第一実施形態と同じである。
40

【0069】

コントロールユニット241は、第一実施形態のコントロールユニット141の機能に加えて、さらに、XY微動ステージ235を移動制御したり、ダイクロイックミラー部236を切り換え制御したり、光検出器234とダイクロイックミラー部236から情報を取得したり、共焦点ピンホール233の位置を記憶したりする機能を有している。

【0070】

本実施形態の走査型レーザー顕微鏡200では、例えば、第一走査光学系Aによる第一光ビームの照射によって標本105から発生した蛍光を検出光学系Cによって検出する動作と同時に、第二走査光学系Bによる第二光ビームの照射によって標本105から発生した蛍光を検出光学系Dによって検出することができる。
50

【0071】

以下、第一走査光学系Aによって発生された蛍光を検出光学系Cで検出すると同時に、第二走査光学系Bによって発生された蛍光を検出光学系Dで検出する動作について説明する。

【0072】

第一レーザーシャッター112と第二レーザーシャッター122が共に開かれる。第一走査光学ユニット114と第二走査光学ユニット124は振幅と周期が同一に調整される。

【0073】

第一レーザー光源部111からの第一光ビームは、第一レーザーシャッター112を通過し、ダイクロイックミラー部113で偏向され、第一走査光学ユニット114、瞳投影レンズ115、ミラー116、ダイクロイックミラー部127、結像レンズ103、対物レンズ102を通り、標本105の断面106上に収束される。第一光ビームの収束点は、第一走査光学ユニット114によって断面106上を二次元走査される。

10

【0074】

第一光ビームの照射によって標本105内の対応する蛍光指示薬が励起されて蛍光が発生する。対物レンズ102によって捕らえられた蛍光は、結像レンズ103、ダイクロイックミラー部127、ミラー116、瞳投影レンズ115、第一走査光学ユニット114、ダイクロイックミラー部113、測光フィルター131、レンズ132を通り、ダイクロイックミラー部236を透過し、共焦点ピンホール133に到達する。断面106からの蛍光だけが、共焦点ピンホール133を通過し、光検出器134に入射する。

20

【0075】

光検出器134からの出力信号は、コントロールユニット241によって、第一走査光学ユニット114による走査位置に同期させて処理され、標本105の断面106の蛍光画像（蛍光輝度の二次元分布）が形成される。蛍光画像はディスプレイ142に表示される。

【0076】

一方、第二レーザー光源部121からの第二光ビームは、第二レーザーシャッター122、第二走査光学ユニット124、瞳投影レンズ125を通り、ダイクロイックミラー部127で偏向され、結像レンズ103、対物レンズ102を通り、標本105の断面106上に収束される。第二光ビームの収束点は、第二走査光学ユニット124によって断面106上を二次元走査される。

30

【0077】

第二光ビームの照射位置は、第二走査光学ユニット124によって、第一走査光学ユニット114による第一光ビームの照射位置とは独立に設定される。

【0078】

第二光ビームの照射によって標本105内の対応する蛍光指示薬が励起されて蛍光が発生する。対物レンズ102によって捕らえられた蛍光は、結像レンズ103、ダイクロイックミラー部127、ミラー116、瞳投影レンズ115、第一走査光学ユニット114、ダイクロイックミラー部113、測光フィルター131、レンズ132を通り、ダイクロイックミラー部236で偏向され、共焦点ピンホール233に到達する。断面106からの蛍光だけが、共焦点ピンホール233を通過し、光検出器234に入射する。

40

【0079】

光検出器234からの出力信号は、コントロールユニット241によって、第二走査光学ユニット124による走査位置に同期させて処理され、標本105の断面106の蛍光画像（蛍光輝度の二次元分布）が形成される。蛍光画像はディスプレイ142に表示される。

【0080】

本実施形態においても、第一レーザー光源部111と第二レーザー光源部121でのレーザー光源の切り換えと、ダイクロイックミラー部113とダイクロイックミラー部12

50

7とダイクロイックミラー部236でのダイクロイックミラーの切り換えとに応じて、第一走査光学系Aと第二走査光学系Bの共焦点位置の補正、すなわち、共焦点ピンホール133と共焦点ピンホール233の位置調整が行なわれる。

【0081】

第一走査光学系Aと第二走査光学系Bの共焦点位置の補正は、第一実施形態と同様に行なわれる。

【0082】

例えば、第二走査光学系Bの共焦点位置の補正は、光検出器234から出力される光量信号をモニターしながらXY微動ステージ235を駆動して共焦点ピンホール233をXY方向に例えば一定のパターンに従ってスライド移動させて、光検出器234で検出される光量が最も大きくなるピンホール位置を探し出すことによって行なわれる。

10

【0083】

そのピンホール位置は、ダイクロイックミラー部127内のダイクロイックミラーとダイクロイックミラー部113内のダイクロイックミラーとダイクロイックミラー部236内のダイクロイックミラーと第二レーザー光源部121内のレーザー光源とに対応させて記憶される。

【0084】

記憶されたピンホール位置は、それに対応するダイクロイックミラー部127内のダイクロイックミラーとダイクロイックミラー部113内のダイクロイックミラーとダイクロイックミラー部236内のダイクロイックミラーと第二レーザー光源部121内のレーザー光源とが入力手段143から設定された際に読み出される。コントロールユニット241は、XY微動ステージ235を駆動して共焦点ピンホール233の位置を、呼び出したピンホール位置に合わせる。

20

【0085】

第一走査光学系Aの共焦点位置の補正は、共焦点ピンホール233の位置調整と同様であり、上述した説明の中の共焦点ピンホール233と光検出器234とXY微動ステージ235と第二レーザー光源部121内のレーザー光源とを、それぞれ、共焦点ピンホール133と光検出器134とXY微動ステージ135と第二レーザー光源部121内のレーザー光源とに置き換えることによって理解できよう。

【0086】

このように、本実施形態は、第一実施形態の利点に加えて、二つの蛍光画像を同時に得ることができるという利点を有している。このため、二重染色された試料について同時に異なる色の画像を得ることができる。

30

【0087】

本実施形態では、例えば共焦点ピンホール133と共焦点ピンホール233の位置をそれぞれ第一走査光学系Aと第二走査光学系Bに対応させて調整しておき、走査光学系を切り換えに応じて検出光学系を切り換えることによって、第一実施形態では必要であった走査光学系の切り換え時の共焦点ピンホールの位置調整を必要としない。

【0088】

ここでは、第一走査光学系Aによって発生された蛍光を検出光学系Cで検出し、第二走査光学系Bによって発生された蛍光を検出光学系Dで検出する動作について説明したが、もちろん、第一走査光学系Aによって発生された蛍光を検出光学系Dで検出し、第二走査光学系Bによって発生された蛍光を検出光学系Cで検出してもよい。

40

【0089】

また、第一走査光学系Aと第二走査光学系Bの一方によって発生された蛍光を検出光学系Cと検出光学系Dの両方で検出してもよい。

【0090】

第三実施形態

図6は、本発明の第三実施形態の走査型レーザー顕微鏡の光学系のブロック図である。図6に示されるように、本実施形態の走査型レーザー顕微鏡300は、所望の一つの走査

50

光学系の共焦点位置と検出光学系の共焦点ピンホールの位置とを一致させる共焦点位置調整手段として、第一実施形態のXY微動ステージ135に代えて、平行平板ユニット350を備えている。また、走査型レーザー顕微鏡300は、第一実施形態のコントロールユニット141に代えて、コントロールユニット341を備えている。そのほかの構成は、第一実施形態と同じである。

【0091】

図7は、図6に示された平行平板ユニットの一具体例の構成を示している。図7に示されるように、平行平板ユニット350は、共焦点ピンホールに向かう光ビームの光路を横切って配置された平行平板351と、平行平板351をY軸周りに回転させるための回転ステージ354と、平行平板351をX軸周りに回転させるための回転ステージ356とを備えている。回転ステージ354と回転ステージ356は、検出光学系Cの光軸に対する平行平板351の傾斜角度を調整するための角度調整手段を構成している。

10

【0092】

平行平板351は支持棒353を介して回転ステージ354に固定されている。回転ステージ354は回転軸355を介して回転ステージ356に固定されている。

【0093】

平行平板351は回転ステージ354の矢印方向の回転に応じて回転中心352を中心としてY軸周りに回転される。また、平行平板351は回転ステージ356の矢印方向の回転に応じて回転ステージ354と一緒にX軸周りに回転される。

20

【0094】

従って、平行平板351は光軸に対して傾斜可能である。光軸に対して傾斜した平行平板351は、光軸に沿って入射した光ビームを、傾斜方向に平行に移動させる。

【0095】

本実施形態の走査型レーザー顕微鏡300の動作は、第二走査光学系Bの共焦点位置と共焦点ピンホールの位置の補正を除けば、第一実施形態と同様である。以下、第一実施形態と相違している第二走査光学系Bの共焦点位置と共焦点ピンホールの位置の補正の仕方について説明する。

【0096】

本実施形態では、光軸に対する平行平板351の傾斜角度を変化させることによって、平行平板351を通る光ビームを平行移動させることで、所望の走査光学系の共焦点位置を共焦点ピンホール133の位置に一致させる。

30

【0097】

コントロールユニット141は、ダイクロイックミラー切換認識用センサー154から切り換えの認識信号を受けると、光検出器134から出力される光量信号をモニターしながら平行平板351の傾斜角度を変化させて、共焦点ピンホール133を通過して光検出器134で検出される光量が最も大きくなる平行平板351の傾斜角度を探し出す。

【0098】

平行平板351の傾斜角度は例えば一定のパターンに従って変更される。ここでは、光検出器134で検出される光量が最も大きくなる平行平板351の傾斜角度を探し出す代わりに、光検出器134で検出される光量が所定のしきい値を超える平行平板351の傾斜角度を探し出してもよい。

40

【0099】

平行平板351の傾斜角度は、ダイクロイックミラー部127内のダイクロイックミラーの種類とダイクロイックミラー部113内のダイクロイックミラーの種類と走査光学経路とともに、コントロールユニット141に記憶される。この場合では、記憶される走査光学経路は、第二走査光学系Bを通過して標本に至り、さらに標本から第一走査光学系Aの走査光学ユニットを通過して検出光学系Cに至る経路である。

【0100】

記憶された平行平板351の傾斜角度は、そのときのダイクロイックミラー部127

50

内のダイクロイックミラーと走査光学経路の二つの条件がコントロールユニット 141 に入力手段 143 から設定されたときに呼び出され、平行平板ユニット 350 は平行平板 351 を記憶された傾斜角度に調節する。

【0101】

第一走査光学系 A の共焦点位置の補正は、第二レーザーシャッター 122 を閉じ、第一レーザーシャッター 112 を開く点が異なるだけで、そのほかは第二走査光学系 B の共焦点位置の補正と同様に行なわれる。

【0102】

ここでは、平行平板ユニット 350 が一枚の平行平板 351 を持っている例をあげたが、平行平板ユニット 350 は、厚さの異なる複数の平行平板を持っていたりもよい。厚さの異なる平行平板は、同じ傾斜角度に対して、光ビームを光軸に平行に移動させる量が異なる。具体的には、厚い平行平板は、薄い平行平板よりも、光ビームを移動させる。

【0103】

平行平板ユニット 350 が厚さの異なる複数の平行平板を持っている場合、光ビームを移動させる際には、厚い平行平板から薄い平行平板の順に、傾斜角度の調整を行なうとよい。そうすることによって、光ビームを粗く移動させて大まかな調整を行なった後に、光ビームを細かく移動させて微調整を行なうことができる。

【0104】

このように、平行平板ユニット 350 が厚さの異なる複数の平行平板を持つ構成であれば、共焦点位置の粗微動を行なえる。

【0105】

これまで、図面を参照しながら本発明の実施形態を述べたが、本発明は、これらの実施形態に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において様々な変形や変更が施されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図 1】本発明の第一実施形態の走査型レーザー顕微鏡の光学系のブロック図である。

【図 2】ダイクロイックミラー部の構成を模式的に示している。

【図 3】第一走査光学系を用いて得られる共焦点走査画像範囲と、第二走査光学系を用いて得られる共焦点走査画像範囲とを示している。

【図 4】第二走査光学系の光ビームを適宜遮断して得られる共焦点走査画像範囲を示している。

【図 5】本発明の第二実施形態の走査型レーザー顕微鏡の光学系のブロック図である。

【図 6】本発明の第三実施形態の走査型レーザー顕微鏡の光学系のブロック図である。

【図 7】図 6 に示された平行平板ユニットの一具体例の構成を示している。

【符号の説明】

【0107】

100…走査型レーザー顕微鏡、101…ステージ、102…対物レンズ、103…結像レンズ、105…標本、111…第一レーザー光源部、112…第一レーザーシャッター、113…ダイクロイックミラー部、114…第一走査光学ユニット、115…瞳投影レンズ、116…ミラー、121…第二レーザー光源部、122…第二レーザーシャッター、124…第二走査光学ユニット、125…瞳投影レンズ、127…ダイクロイックミラー部、131…測光フィルター、132…レンズ、133…共焦点ピンホール、134…光検出器、135…XY微動ステージ、141…コントロールユニット、142…ディスプレイ、143…入力手段、151…ダイクロイックミラー、152…支持台、153…モーター、154…ダイクロイックミラー切替認識用センサー、200…走査型レーザー顕微鏡、233…共焦点ピンホール、234…光検出器、235…XY微動ステージ、236…ダイクロイックミラー部、241…コントロールユニット、300…走査型レーザー顕微鏡、341…コントロールユニット、350…平行平板ユニット、351…平行

10

20

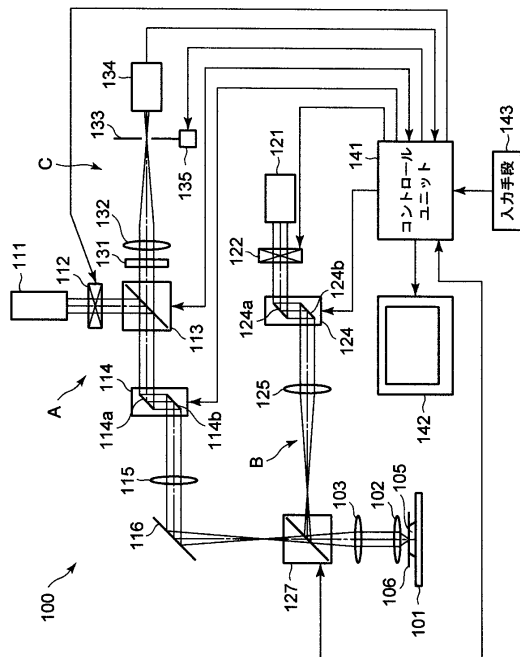
30

40

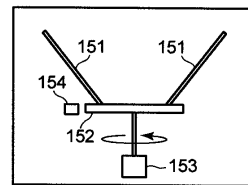
50

平面板、3 5 2 …回転中心、3 5 3 …支持棒、3 5 4 …回転ステージ、3 5 5 …回転軸、3 5 6 …回転ステージ。

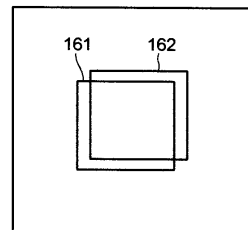
【図 1】



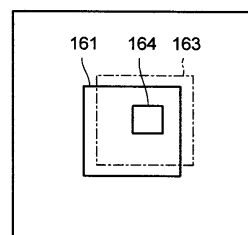
【図 2】



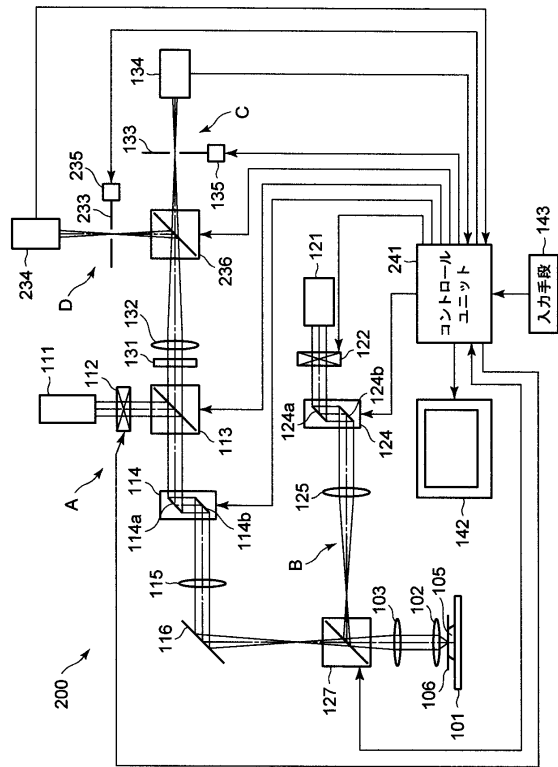
【図 3】



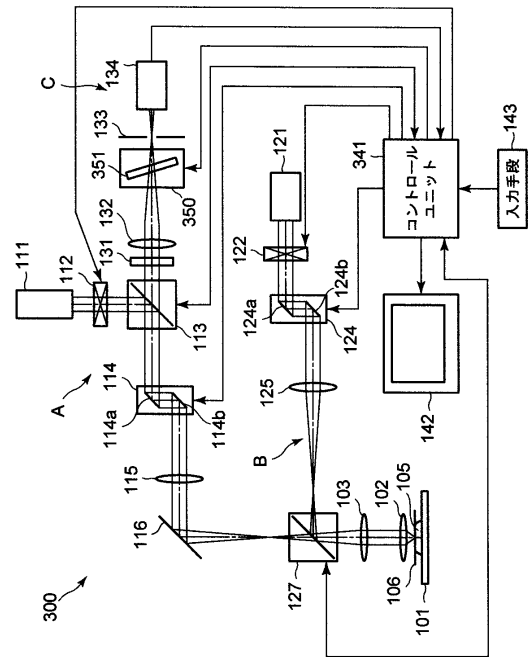
【図 4】



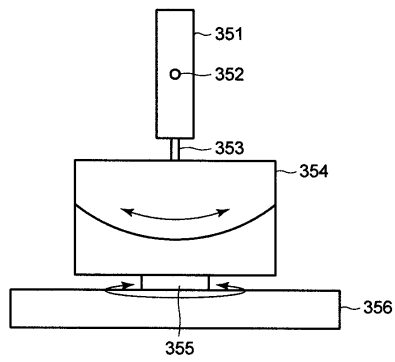
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

審査官 下村 一石

- (56)参考文献 特開平10-206742 (JP, A)
特開2003-315681 (JP, A)
特開2000-028926 (JP, A)
特開2003-185927 (JP, A)
特開2002-014286 (JP, A)
特開平11-237554 (JP, A)
特開平11-231222 (JP, A)
特開2002-277746 (JP, A)
特開平11-052252 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G02B21/00-21/36