(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3539436号
(P3539436)
(45)発行日　平成16年7月7日(2004.7.7)　(24)登録日　平成16年4月2日(2004.4.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
G02B 21/16	G02B	21/16	
G01N 21/27	G01N	21/27	E
G01N 21/64	G01N	21/64	E
G02B 21/06	G02B	21/06	
G02B 26/10	G02B	26/10	C

請求項の数 5　(全 9 頁)

(21)出願番号　特願平5-348803
(22)出願日　平成5年12月27日(1993.12.27)
(65)公開番号　特開平7-199075
(43)公開日　平成7年8月4日(1995.8.4)
審査請求日　平成12年12月26日(2000.12.26)

(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４３番２号
(74)代理人　100058479
弁理士　鈴江　武彦
(72)発明者　相方　隆
東京都渋谷区幡ヶ谷２丁目４３番２号　オリンパス光学工業株式会社内
(72)発明者　佐々木　浩
東京都渋谷区幡ヶ谷２丁目４３番２号　オリンパス光学工業株式会社内

審査官　山村　浩

最終頁に続く

(54)【発明の名称】走査型レーザ顕微鏡装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

少なくとも紫外線域の波長と可視域の波長のレーザビームを出射しこの紫外線域の波長のレーザビームによって励起される蛍光色素を含む試料に照射するレーザ光源手段と、

前記試料により反射されるレーザビームを分離し励起された蛍光を測光用光路上に配置された複数の光検出器に導く測光分離手段と、

前記光検出器への前記可視域の波長のレーザビームの入射を防ぐ光学手段と、

前記試料を透過した前記可視域の波長のレーザビームを検出する為の透過観察光学系及び透過検出系を具備したことを特徴とする走査型レーザ顕微鏡装置。

【請求項２】

前記複数の光検出器により取得された複数の蛍光像の測光強度比分布を擬似化し、前記透過観察像をモニタに重ねて表示することを特徴とする請求項１に記載の走査型レーザ顕微鏡装置。

【請求項３】

前記紫外線域の波長が約３５１ｎｍであり、かつ前記可視域の波長のレーザビームの波長が約５１５ｎｍであることを特徴とする請求項１または請求項２に記載の走査型レーザ顕微鏡装置。

【請求項４】

前記光学手段は、中心波長４８０ｎｍの蛍光のみを通過するダイクロイックフィルターであることを特徴とする請求項３に記載の走査型レーザ顕微鏡装置

【請求項５】
前記光学手段は、中心波長４０５ｎｍの蛍光と５１５ｎｍの可視光を反射又は透過により取り出すダイクロイックミラーと、このダイクロイックミラーにより取り出した４０５ｎｍの蛍光のみを透過させるダイクロイックフィルターとからなることを特徴とする請求項４に記載の走査型レーザ顕微鏡装置。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は複数の蛍光観察光学系と検光検出系と透過観察光学系及び透過検出系を具備した走査型レーザ顕微鏡装置に関する。
【０００２】
【従来の技術】
従来、一般の走査型レーザ顕微鏡で、試料に照射されたレーザの反射光を利用した、蛍光観察と、前記レーザで、試料を透過した透過光を利用した透過観察の両方を行うものは、特開昭６１－２１９９１９号公報に示されている。
【０００３】
図７はその公報の従来例を示す図で、レーザ発振器３０から出射されたレーザビーム３１は、ビームスプリッタ３２を透過して、対物レンズ３９の瞳位置と共役な位置に設けられたガルバノメータミラー３３，３４、瞳伝送レンズ３５，３６を通り、さらに、瞳投影レンズ３７、結像レンズ３８、対物レンズ３９を通り、試料４０上でレーザスポットとなる。このレーザスポットはガルバノメータミラー３３，３４によりＸ－Ｙ２次元に走査される。
【０００４】
そこで、蛍光観察等に用いる反射光を検出する場合は、対物レンズ３９、結像レンズ３８、瞳投影レンズ３７、ガルバノメータミラー３３，３４を戻り、ビームスプリッタ３２で反射され、集光レンズ４１を通り、その後方の検出器４２により検出される。
【０００５】
また、透過光を検出する場合はコンデンサレンズ４３を通り、検出器４４により検出される。
【０００６】
なお、６０は焦点遮光板、６１はピンホール、６２は偏光板、６３はバリアフィルター、６４はミラー、６５は光源、６６はプリズム、６７は接眼レンズ、６９は光源、７０は透過照明用ビームスプリッター、７１はバリアフィルター、７２は偏光板である。
【０００７】
また、複数の波長のレーザを同時発振させ、複数の波長による像を検出する従来の技術としてＷＯ９２／０２８３０１（1992年2月20日に国際公開された文献）に示されているものがあり、図８はこれを説明するための図で、複数波長を同時に発振するレーザ発振器４５からのレーザビームは試料５１に照射されて反射光となり、反射光はダイクロイックミラー４８で長波長側と短波長側に分け、２つのフォトマルチプライヤ４６，４７で検出している。
【０００８】
４９は励起フィルターユニットで、レーザ発振器４５から出射した複数波長のうち、必要とする波長を選択的に透過させる特性を有するバンドパスフィルター５０が入っている。ダイクロッイックミラー４８で反射されたレーザ光は試料５１に照射され、試料５１からの蛍光は、ダイクロッイックミラー４８を透過してミラー５２で反射される。ミラー５２で反射された蛍光は、ダイクロッイックミラー５３で短波長と長波長に分光され、ダイクロッイックミラー５３で反射した短波長はフィルター５４を透過してフォトマルチプライヤ４７に入射し、透過した長波長はフィルター５５を透過してフォトマルチプライヤ４６に入射する。例えば、試料５１から発生した蛍光の波長が５００ｎｍ～５４０ｎｍ、５８５ｎｍ～６５０ｎｍとすると、５００ｎｍ～５４０ｎｍの蛍光はダイクロッイックミラー

５３で反射し、フィルター５４で余分な光が除かれ、フォトマルチプライヤ４７に入射する。一方、５８５ｎｍ～６５０ｎｍの蛍光は、ダイクロッイックミラー５３を透過し、フィルター５５で余分な光が取り除かれ、フォトマルチプライヤ４６に入射する。

【０００９】

【発明が解決しようとする課題】

近年、蛍光観察と透過観察を、同時に行い、細胞等の全体像に、蛍光像を重ねて観察する要求が高まっている。特に、色素Ｉｎｄｏ－１を使用したカルシウムイオンCa^{2+}濃度測定（以下Ｉｎｄｏ－１観察と称する）と、透過観察を同時に行う等、複数波長を測光し、透過観察も同時にできる蛍光顕微鏡装置が望まれている。

【００１０】

ここで、色素Ｉｎｄｏ－１を使用したCa^{2+}濃度測定の概要について説明する。すなわち、３５１nmの励起光で、４０５nmと４８０nmの中心波長の蛍光を得て、それらを測光し、その比によりカルシウム濃度を求めるものである。例えば、４０５nmの比率が高いとカルシウム濃度が低く、４８０nmの比率が高いとカルシウム濃度が高いことになる。

【００１１】

しかし、図７の従来の技術では、複数波長の測光、観察ができない。また一度に複数波長のレーザを発振できないので、透過観察を励起光に用いた短波長域の紫外線で行うことになり、その場合透過検出系及び透過光学系を短波長光対応としなければならず高価となる。

【００１２】

また、図８の従来の技術では透過検出系がないので、透過観察ができない。

【００１３】

本発明の目的は、前記不具合を解消し、２波長が正確に測光されたＩｎｄｏ－１観察と可視光による透過観察を同時に行うことができる走査型レーザ顕微鏡装置を提供することにある。

【００１４】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するため、本発明の走査型レーザ顕微鏡装置は、少なくとも紫外線域の波長と可視域の波長のレーザビームを出射しこの紫外線域の波長のレーザビームによって励起される蛍光色素を含む試料に照射するレーザ光源手段と、前記試料により反射されるレーザビームを分離し励起された蛍光を測光用光路上に配置された複数の光検出器に導く測光分離手段と、前記光検出器への前記可視域の波長のレーザビームの入射を防ぐ光学手段と、前記試料を透過した前記可視域の波長のレーザビームを検出する為の透過観察光学系及び透過検出系を具備したことを特徴とする。

【００１７】

【作用】

本発明によれば、紫外線域の波長と可視域の波長のレーザビームを試料に照射し、紫外線域の波長のレーザビームによって励起された試料からくる蛍光が測光分離手段により分離され、この分離された蛍光がそれぞれ光検出器により検出され、かつ光検出器への可視域の波長のレーザビームの入射が光学手段により防がれるので、２波長が正確に測光されたＩｎｄｏ－１観察と可視光による透過観察を同時に行うことができる。

【００２０】

【実施例】

以下、本発明の実施例について図面を参照して説明する。図１は、本発明の走査型レーザ顕微鏡装置の第１実施例の光学系を示す図である。本実施例は、概略少なくとも３５１ｎｍと５１５ｎｍの波長のレーザビームを出射し試料１０に照射するレーザ光源手段、例えばマルチラインアルゴンレーザ光源０１、ビームエクスパンダ０２、レーザラインフィルター０３、ダイクロイックミラー０４、ガルバノメータスキャナ０５，０６、瞳投影レンズ０７、プリズム０８、対物レンズ０９からなるものと、

試料１０により反射されるレーザビームを分離し、各々を測光用光路上に配置された複数

のフォトマルチプライヤ２０，２６に導く測光分離手段、例えば対物レンズ０９、プリズム０８、瞳投影レンズ０７、ガルバノメータスキャナ０５，０６、ダイクロイックミラー０４、集光レンズ１６、ダイクロイックミラー１７、吸収フィルター１８、共焦点ピンホール１９、反射ミラー２２、吸収フィルター２４、共焦点ピンホール２５からなるものと、
フォトマルチプライヤ２６への透過観察用可視光の入射を防ぐ光学手段、例えばダイクロイックフィルター２３とで構成され、透過観察光学系及び透過検出系を具備したものである。

【００２１】
マルチラインアルゴンレーザ光源０１から発振された波長の中で、Ｉｎｄｏ－１観察用の３５１ｎｍと、透過観察用の５１５ｎｍの２つのレーザビームを、同時に、試料１０に照射させ、得られた蛍光の中心波長４０５ｎｍと４８０ｎｍは測光用ダイクロイックミラー０４により分離され、かつ各フォトマルチプライヤ２０，２６へ導かれて検出する。

【００２２】
また、試料１０を透過した５１５ｎｍのレーザビームは、透過観察光学系により、透過検出部１４へ導かれる。さらに、試料１０に反射し、測光用光路にきた５１５ｎｍのレーザビームは、ダイクロイックフィルター２３により５１５ｎｍの可視光の入射が防がれ、フォトマルチプライヤ２６には入射されず、カットされる。

【００２３】
以上のような構成で２波長が正確に測光されたＩｎｄｏ－１観察と、可視光による透過観察を同時に行うことができる、走査型レーザ顕微鏡装置となる。

【００２４】
以下、本実施例について、図２～図４を詳細に説明する。図１のマルチラインアルゴンレーザ光源０１から３５１ｎｍ、３６４ｎｍ、４８８ｎｍ、５１５ｎｍの波長のレーザビームがそれぞれ同時に発振される。

【００２５】
この各レーザビームは、ビームエクスパンダ０２により、所定径に拡大され、レーザラインフィルター０３により、３５１ｎｍと５１５ｎｍの波長のレーザビームが得られる。この場合、レーザラインフィルター０３の透過特性は、図２に示すようになっており、３６４ｎｍと４８８ｎｍがカットされ、３５１ｎｍと５１５ｎｍの波長のレーザビームが得られる。

【００２６】
レーザラインフィルター０３により得られたレーザビームは、図３に示す透過、反射の特性をもつダイクロイックミラー０４により図の下方に反射され、ガルバノメータスキャナ０５，０６に入射され、ここでＸ，Ｙ方向に偏向される。ガルバノメータスキャナ０５，０６で偏向されたレーザビームは、瞳投影レンズ０７、接眼観察光路へ導くプリズム０８、対物レンズ０９を通り、試料１０に照射される。

【００２７】
試料１０を透過した可視光の５１５ｎｍのレーザビームは、コンデンサレンズ１１、反射ミラー１２、コレクタレンズ１３を通り、透過検出部１４で検出され、第３のフレームメモリ１５に蓄積される。

【００２８】
また、試料１０に照射され、蛍光発光した４０５ｎｍと４８０ｎｍの中心波長の蛍光及び、試料１０を透過せずに一部反射してきた５１５ｎｍの可視光は、対物レンズ０９、瞳投影レンズ０７を通り、ガルバノメータスキャナ０６，０５を反射する。

【００２９】
そして、前述した、図３の特性を持つダイクロイックミラー０４により、４０５ｎｍと４８０ｎｍの中心波長の蛍光は透過する。また、ダイクロイックミラー０４は、可視光の５１５ｎｍを反射させる特性を有しているが、反射率が１００％をものを製造することは、困難であり、現実には反射率が１００％でない。従って、試料１０より反射してきた５１

５ｎｍの可視光の一部もダイクロイックミラー０４を透過する。
【００３０】
そして、集光レンズ１６を通り、図４に示す、反射透過特性を持つ、ダイクロイックミラー１７により中心波長４０５ｎｍの光は反射され、吸収フィルター１８を通り、さらに共焦点ピンホール１９を通り、第１のフォトマルチプライヤ２０により４０５ｎｍの蛍光は測光され、かつ第１のフレームメモリ１の２１により蓄積される。
【００３１】
一方、ダイクロイックミラー１７を透過した４８０ｎｍの蛍光及び５１５ｎｍの可視光は、反射ミラー２２で反射され、ダイクロイックフィルター２３に入射され、ここで４８０ｎｍの蛍光が透過し、５１５ｎｍの可視光がカットされる。そして、ダイクロイックフィルター２３を透過した４８０ｎｍの蛍光は、吸収フィルター２４、共焦点ピンホール２５を順次通り、フォトマルチプライヤ２６により４８０ｎｍの蛍光は測光され、第２のフレームメモリ２７に蓄積される。
【００３２】
前述したように、Ｉｎｄｏ－１観察は、３５１ｎｍの励起光で、発光する蛍光４０５ｎｍと４８０ｎｍの強度比により、カルシウムイオン濃度を測定する方法である。
【００３３】
このため、以上述べた実施例の走査型レーザ顕微鏡装置ではＩｎｄｏ－１観察に必要な、３５１ｎｍのレーザビーム及び透過観察に用いる５１５ｎｍのレーザビームを同時に得られ、蛍光の４０５ｎｍと４８０ｎｍの光をフレームメモリ２１とフレームメモリ２７に蓄積でき、また、５１５ｎｍの透過光は、フレームメモリ１５に蓄積でき、フレームメモリ１の２１とフレームメモリ２の２７の測光強度比分布を疑似化し、モニタ表示したものに、フレームメモリ１５の透過像を重ねることにより、Ｉｎｄｏ－１観察と透過観察を同時に行える。その時、また、測光系では、試料１０より反射してくる５１５ｎｍの反射光をダイクロイックフィルタ２３によりカットされるので、フォトマルチプライヤ２６に、測光の邪魔をする５１５ｎｍが入射しないので、正確な測光が可能となる。
【００３４】
また、透過観察系においては、透過検出部１４の波長が可視光の５１５ｎｍであるので、透過光学系に収差補正、透過率等において、紫外線域に対応した光学系を用いる必要がなく、安価な透過光学系が得られる。
【００３５】
次に、図５を参照して本発明の走査型レーザ顕微鏡装置の第２実施例について説明する。
【００３６】
第２実施例は、前述の第１実施例の測光系を以下のように変更したものであり、これ以外の構成は、第１実施例と同一である。すなわち、マルチラインアルゴンレーザ光源０１から、対物レンズ０９を通り、透過検出を行う経路１１，１２，１３，１４，１５と、蛍光が試料１０より発光し、瞳伝送レンズにはいるまでは、図１と同じ構成なので説明は省略する。試料１０より発せられた中心波長４０５ｎｍと４８０ｎｍの蛍光及び、５１５ｎｍの可視光は、瞳伝送レンズ１６を通る。
【００３７】
そして、図６に示す透過、反射特性を持つダイクロイックミラー２８により、４０５ｎｍの蛍光と５１５ｎｍの可視光は反射される。この反射された蛍光と可視光は、４０５ｎｍを透過し５１５ｎｍをカットする特性を持つダイクロイックフィルター２９により４０５ｎｍの蛍光のみ透過し、吸収フィルター１８を通り、さらに、共焦点ピンホール２０を通り、フォトマルチプライヤ２０により、４０５ｎｍの蛍光が測光され、フレームメモリ２１により蓄積される。
【００３８】
一方、前記ダイクロイックミラー２８を透過した４８０ｎｍの蛍光は、反射ミラー２２で反射され、吸収フィルタ２４を通り、さらに共焦点ピンホール２５を通り、フォトマルチプライヤ２６により、４８０ｎｍの蛍光が、測光され、フレームメモリ２７により蓄積さ

れる。

【００３９】

以上の述べたように、第１実施例では、５１５ｎｍの可視光を、４８０ｎｍの蛍光と、図１のダイクロイックフィルタ２３で分離しているのに対し、第２実施例では、図５のダイクロイックミラー２８で、４０５ｎｍの蛍光と、５１５ｎｍの可視光を反射により取り出し、４０５ｎｍと、５１５ｎｍをダイクロイックフィルター２９で分離しているので、可視光と測光用蛍光の分離波長幅が第１実施例の４８０ｎｍの蛍光と５１５ｎｍの可視光の分離波長幅より広いため、より確実な、分離ができ、より正確な測光ができる。

【００４０】

もちろん、第１実施例で述べた効果は同様に得られることはいうまでもない。

【００４１】

【発明の効果】

本発明によれば、Ｉｎｄｏ－１観察と、可視光による透過観察を同時に行え、測光側では試料から反射してくる可視光の影響のない正確な測光が可能で、透過観察側では、可視光にのみ対応させた安価な検出系を持つ走査型レーザ顕微鏡装置を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明の走査型レーザ顕微鏡装置の第１実施例の概略構成を示す図。

【図２】図１のレーザラインフィルタの透過特性を示す図。

【図３】図１のダイクロイックミラーの透過、反射特性を示す図。

【図４】図１のダイクロイックミラーの透過、反射特性を示す図。

【図５】本発明の走査型レーザ顕微鏡装置の第２実施例の概略構成を示す図。

【図６】図５のダイクロイックミラーの透過、反射特性を示す図。

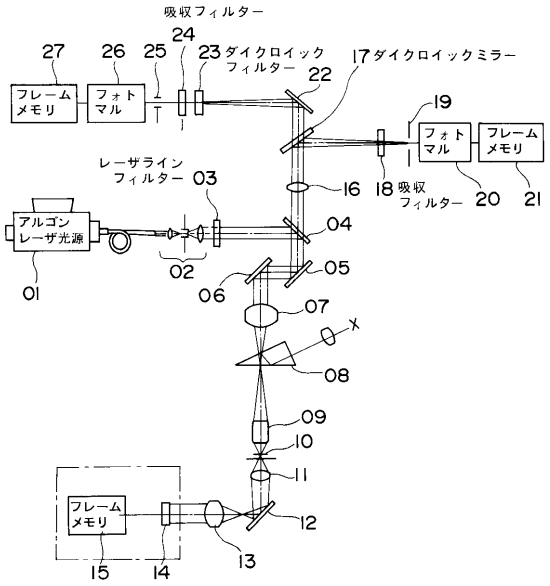
【図７】従来の技術を説明するための図。

【図８】従来の技術を説明するための図。

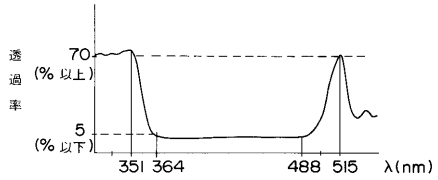
【符号の説明】

０１…マルチラインアルゴンレーザ光源、０２…ビームエクスパンダ、０３…レーザラインフィルタ、０４…ダイクロイックミラー、０５，０６…ガルバノメータスキャナ、０７…瞳投影レンズ、０８…接瞳観察光路へ導くプリズム、０９…対物レンズ、１０…試料、１１…コンデンサレンズ、１２…反射ミラー、１３…コレタクレンズ、１４…透過検出部、１５…フレームメモリ３、１６…集光レンズ、１７…ダイクロイックミラー、１８…吸収フィルター、１９…共焦点ピンホール、２０…フォトマルチプライヤ、２１…フレームメモリ１、２２…反射ミラー、２６…ダイクロイックフィルター、２４…吸収フィルター、２５…共焦点ピンホール、２６…フォトマルチプライヤ、２７…フレームメモリ２、２８…ダイクロイックミラー、２９…ダイクロイックフィルター、３０…レーザ発振器、３１…レーザビーム、３２…ビームスプリッタ、３３，３４…ガルバノメータミラー、３５，３６…瞳伝送レンズ、３７…瞳投影レンズ、３８…結像レンズ、３９…対物レンズ、４０…試料、４１…集光レンズ、４２…検出器、４３…コンデンサレンズ、４４…検出器、４５…レーザ発振器、４６，４７…フォトマルチプライヤ。

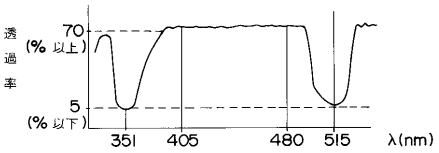
【図１】



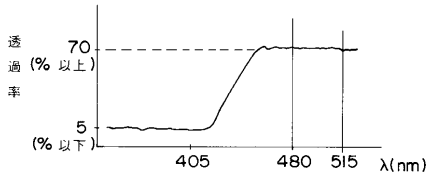
【図２】



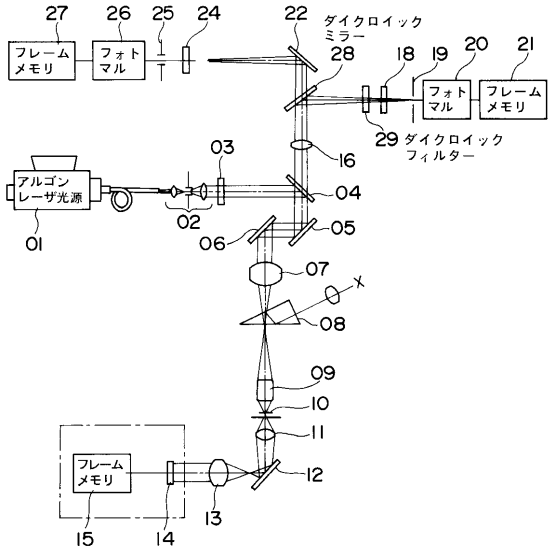
【図３】



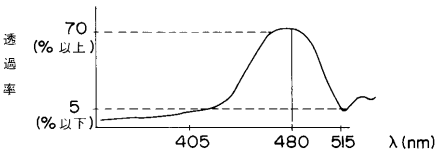
【図４】



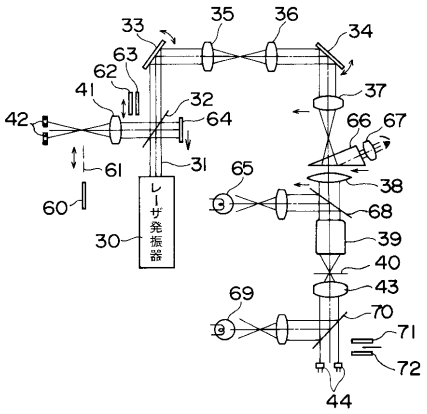
【図５】



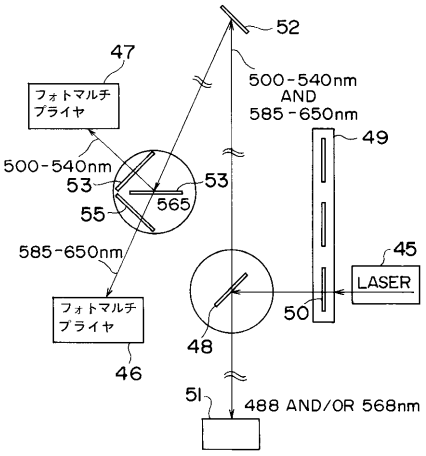
【図６】



【図７】



【図８】


52
47
フォトマルチプライヤ
500-540nm
AND
585-650nm
49
500-540nm
53
53
565
55
585-650nm
45
LASER
50
フォトマルチプライヤ
48
46
51
488 AND/OR 568nm

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０４－３４０５１５（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－０１３０８３（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－０２８５４２（ＪＰ，Ａ）
特表平０５－５０１４５８（ＪＰ，Ａ）
特開昭５１－０４４９４２（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
G02B21/00-21/36