



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104215612 B

(45)授权公告日 2018.07.31

(21)申请号 201410223168.9

(22)申请日 2014.05.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104215612 A

(43)申请公布日 2014.12.17

(30)优先权数据

2013-113572 2013.05.30 JP

(73)专利权人 索尼公司

地址 日本东京

(72)发明人 藤田五郎 原雅明

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
11240

代理人 余刚 吴孟秋

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G02B 21/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 202814861 U, 2013.03.20, 说明书第
[0009]、[0015]、[0017]、[0022]段以及图1.

US 2003218114 A1, 2003.11.27, 全文.

CN 101122610 A, 2008.02.13, 全文.

US 2007/0081234 A1, 2007.04.12, 说明书
第[0029]、[0032]、[0039]–[0043]、[0045]段, 以
及图1、2A、5.US 2001/0015411 A1, 2001.08.23, 说明书
第[0010]、[0030]、[0033]段.

US 2012320184 A1, 2012.12.20, 全文.

CN 102376318 A, 2012.03.14, 说明书第
[0023]–[0029]段, 第[0069]、[0071]、[0078]–
[0083]段以及图1、6、7A–7E、10.

CN 102402993 A, 2012.04.04, 全文.

CN 102830097 A, 2012.12.19, 全文.

审查员 李新科

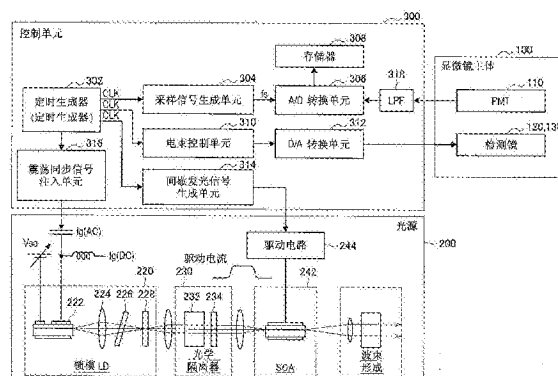
权利要求书2页 说明书11页 附图8页

(54)发明名称

激光扫描显微镜系统

(57)摘要

本发明公开了激光扫描显微镜系统。该系统包括:锁模激光器单元,被配置为发射具有预定频率的激光束;间歇发光单元,被配置为以预定间歇发光周期间歇地发出从锁模激光器单元中发射的激光束;检测器,被配置为将荧光物质转换为电信号,该荧光物质接收间歇发出的激光束并且接着从对象中被激发;以及A/D转换单元,被配置为以与间歇发光周期同步的采样周期采样电信号。



1. 一种激光扫描显微镜系统,包括:
锁模激光器单元,被配置为发射具有预定频率的激光束;
间歇发光单元,被配置为以预定间歇发光周期间歇地发出从所述锁模激光器单元发射的所述激光束,并且放大从所述锁模激光器单元发射的所述激光束的幅度;
检测器,被配置为将荧光物质转换为电信号,所述荧光物质接收间歇发出的所述激光束并且接着从对象中被激发;以及
A/D转换单元,被配置为以与所述间歇发光周期同步的采样周期采样所述电信号。
2. 根据权利要求1所述的激光扫描显微镜系统,其中,与所述采样和所述间歇发光相关的频率和相位均是相同的。
3. 根据权利要求1所述的激光扫描显微镜系统,其中,所述锁模激光器单元发射用于双光子激发的所述激光束。
4. 根据权利要求1所述的激光扫描显微镜系统,其中,向所述A/D转换单元提供所述采样周期的采样信号与向所述间歇发光单元提供所述间歇发光周期的间歇发光信号是相同信号。
5. 根据权利要求1所述的激光扫描显微镜系统,进一步包括:
采样信号生成单元,被配置为生成向所述A/D转换单元提供所述采样周期的采样信号;
以及
间歇发光信号生成单元,被配置为生成向所述间歇发光单元提供所述间歇发光周期的间歇发光信号,
其中,基于同一时钟生成所述采样信号与所述间歇发光信号。
6. 根据权利要求1所述的激光扫描显微镜系统,其中,所述锁模激光器单元或所述间歇发光单元仅在预定有效发光周期期间使所述激光束入射到所述对象上。
7. 根据权利要求6所述的激光扫描显微镜系统,进一步包括:
第一检测镜,被配置为在所述对象的表面的第一方向上利用所述激光束执行扫描;
第二检测镜,被配置为在与所述对象的所述表面的所述第一方向正交的第二方向上利用所述激光束执行扫描;以及
检测镜控制单元,被配置为控制所述第一检测镜和所述第二检测镜,
其中,当在所述第一方向的所述扫描完成时,所述检测镜控制单元将所述激光束返回至所述第一方向的起始位置并且通过一行所述激光束在所述第二方向上执行所述扫描,并且接着在所述第一方向上再次执行所述扫描,以及
其中,所述有效发光周期是在所述第一方向执行所述扫描的周期的至少一部分。
8. 根据权利要求1所述的激光扫描显微镜系统,进一步包括:
低通滤波器,被配置为对从所述检测器中输出的所述电信号执行频带限制以及将所述电信号输入到所述A/D转换单元,
其中,所述低通滤波器以所述采样的频率建立奈奎斯特采样定理的方式执行所述频带限制。
9. 根据权利要求8所述的激光扫描显微镜系统,其中,所述低通滤波器以所述频带限制等于或小于 $1/2$ 的所述采样的频率的方式执行所述频带限制。
10. 根据权利要求1所述的激光扫描显微镜系统,进一步包括:

光学调制单元,被配置为根据控制电流的量级来放大从所述锁模激光器单元发射的所述激光束。

激光扫描显微镜系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2013年5月30日提交的日本在先专利申请JP2013-113572的权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种激光扫描显微镜系统。

背景技术

[0004] 例如,在现有技术中,日本专利第5007092号公开了这样一种扫描显微镜,其包括扫描对象并且在振荡脉冲频率与采样频率之间执行同步的扫描装置。

发明内容

[0005] 近几年,由于利用半导体激光器的MOPA式光源,已经开发了具有100W以上的高输出的显微镜。然而,在其中生物对象为测量目标的情况下,强大的激光束不幸地损伤生物对象。

[0006] 为了抑制对生物对象的损伤,降低激光束的平均功率并且增大峰值功率是有效的。因此,可以考虑通过间歇地发出激光束来抑制对生物对象的损伤。

[0007] 然而,在激光扫描显微镜中,对象中的激发的荧光物质通过诸如PMT的检测器转换为电信号。然而,当间歇地发出激光束时,取决于转换后的A/D转换的采样的获取的图像可能不幸劣化。

[0008] 在日本专利第5007092中,描述了在振荡脉冲频率与采样频率之间执行同步。然而,未提及执行间歇发光时的间歇发光周期。此外,在日本专利第5007092号中公开的技术中,甚至在执行高速采样与脉冲发光同步时,并没有实现提高分辨率并且难以增加信号量。

[0009] 因此,希望在间歇地发出激光束时通过最佳采样由对象中激发荧光物质转换的电信号来抑制图像中的劣化。

[0010] 根据本公开的实施方式,提供一种激光扫描显微镜系统,包括:锁模激光器单元,被配置为发射具有预定频率的激光束;间歇发光单元,被配置为以预定间歇发光周期间歇地发出从锁模激光器单元中发射的激光束;检测器,被配置为将荧光物质转换为电信号,该荧光物质接收间歇地发出的激光束并且接着从对象中被激发;以及A/D转换单元,被配置为以与间歇发光周期同步的采样周期采样电信号。

[0011] 与采样和间歇发光相关的频率与相位可以是相同的。

[0012] 锁模激光器单元可以发射用于双光子激发的激光束。

[0013] 向A/D转换单元提供采样周期的采样信号以及向间歇发光单元提供间歇发光周期的间歇发光信号可以是相同的信号。

[0014] 激光扫描显微镜系统可以进一步包括:采样信号产生单元,被配置为产生向A/D转换单元提供采样周期的采样信号,以及间歇发光信号产生单元,被配置为产生向间歇发光

单元提供间歇发光周期的间歇发光信号。可以基于同一时钟产生采样信号与间歇发光信号。

[0015] 锁模激光器单元或间歇发光单元可使激光束仅在预定有效发光周期期间入射到对象上。

[0016] 激光扫描显微镜系统可进一步包括：第一检测镜，被配置为在对象的表面的第一方向上执行激光束扫描；第二检测镜，被配置为在与对象的表面的第一方向正交的第二方向上执行激光束扫描；以及检测镜控制单元，被配置为控制第一检测镜和第二检测镜。当在第一方向的扫描完成时，检测镜控制单元可以将激光束返回至第一方向的起始位置并且通过一行激光束在第二方向上执行扫描，以及然后可在第一方向上再次执行扫描。有效发光周期可以为在第一方向执行扫描的周期的至少一部分。

[0017] 激光扫描显微镜系统可以进一步包括：低通滤波器，被配置为对从检测器中输出的电信号执行频带限制以及将电信号输入到A/D转换单元。低通滤波器可以按针对采样频率建立的奈奎斯特采样定理的方式执行频带限制。

[0018] 低通滤波器可以按采样频率的1/2以下的频带限制的方式执行频带限制。

[0019] 根据本公开的实施方式，因此，可以在间歇地发出激光束时通过最佳采样由对象中激发荧光物质转换的电信号来抑制图像中的劣化。

附图说明

[0020] 图1是示出根据本公开实施方式的显微镜系统的实例的示意图；

[0021] 图2是详细地示出光源的配置的示意图；

[0022] 图3是示出通过间歇发光增大激光峰值功率时的特征的示意图；

[0023] 图4是示出显微镜主体的配置的示意图；

[0024] 图5是示出使用光栅扫描方案产生二维图像的方法的示意图；

[0025] 图6是示出其中采样周期比间歇发光周期T短的情况的示意图；

[0026] 图7是示出其中采样周期比间歇发光周期长的情况的示意图；

[0027] 图8是示出其中使得采样周期与间歇发光周期T相同的情况的示意图。

具体实施方式

[0028] 下文中，将参照附图对本发明的优选实施方式进行详细说明。注意，在本说明书和附图中，基本具有相同功能和结构的结构元件将用相同参考号表示，并且这些结构元件的重复说明将被省略。

[0029] 将按以下顺序进行说明。

[0030] 1. 显微镜系统

[0031] 2. 光源的配置的实例

[0032] 3. 显微镜系统的配置的实例

[0033] 4. 采样周期与间歇发光周期之间的关系

[0034] 5. 其中使得采样周期与间歇驱动周期相同的配置的实例

[0035] 6. 低通滤波器的配置

[0036] 7. 激光束的光脉冲与激光束的调制之间同步

[0037] 8. 光学分辨率与采样频率之间的关系

[0038] 【1. 显微镜系统】

[0039] 首先,将参考图1描述根据本公开的实施方式的显微镜系统。图1是示出根据实施方式的显微镜系统的实例的示意图。显微镜系统是用于生物分析的激光扫描显微镜,具体是包括双光子激发光源的显微镜系统。如图1所示,显微镜系统1000被配置为包括显微镜主体100、光源200、以及控制单元300。

[0040] 显微镜主体100被配置为激光扫描显微镜并且沿测量样品的垂直方向、水平方向以及深度方向三维地扫描测量样品S以产生对应测量样品S的扩展图像组的图像数据组。因此,显微镜主体100被配置为包括光电倍增管(PMT)和检测镜。稍后将详细地描述显微镜主体100的配置。

[0041] 光源200使用脉冲激光器并且是被配置为包括激光器(锁模激光二极管(在下文中,称作MLLD))的主振荡功率放大器(MOPA)式光源,该激光器包括外部谐振器和半导体光学放大器(SOA)。近几年,由于利用半导体激光器的MOPA式光源,已经开发了具有100W以上的高输出的显微镜。光源具有包括低价和小型化的特征。因此,当光源安装于中间范围(middle range)的多光子显微镜上时,增大了在广泛的各种研究组织的应用性,并且因而期望在医药领域有可观的贡献。在实施方式中,将描述使用这种MOPA式光源的显微镜系统,具体地,使用双光子激发光源的显微镜系统。

[0042] 控制单元300具有控制显微镜主体100和光源200的功能。稍后将详细地描述控制单元300的配置。

[0043] 【2. 光源的配置的实例】

[0044] 图2是详细地示出光源200的配置的示意图。光源200被配置为包括MOPA210和波长转换模块(OPO)250,在MOPA210中,锁模振荡式激光器和光学放大器组合。MOPA210包括:锁模激光器单元(锁模激光二极管)220、光学隔离器单元230、以及光学放大器单元(SOA单元)240。

[0045] 图2的下部示出了从锁模激光器单元220、光学放大器单元240以及波长转换模块250输出的激光束的脉冲波形L1、L2和L3以及下面描述的用于间歇驱动的脉冲波形。

[0046] 锁模激光器单元220被配置为包括:半导体激光器222以及元件,即,穿过从半导体激光器222发射的激光束的透镜224、带通滤波器226、以及镜(mirror)228。带通滤波器226的功能是透射给定波长范围内的光并且不透射范围外的光。外部谐振器(空间谐振器)被配置于半导体激光器222的后侧镜与镜228之间,并且从锁模激光器单元220发射的激光束的频率是由外部谐振器的路径长度决定的。因而,由于可将激光束的频率强制锁定为特定频率,所以可锁定激光束的模式。

[0047] 锁模激光器单元220可通过配置外部谐振器将短脉冲与比常规半导体激光器长的周期(例如,约1GHz)同步。因此,从锁模激光器单元220输出的激光束L1具有低平均功率和高峰值,并且从而对生物对象的损伤变小并且光子效率变高。

[0048] 光学隔离器单元230布置于锁模激光器单元220的后级。光学隔离器单元230被配置为包括光学隔离器232与镜234。光学隔离器单元230具有防止从后级上的光学部件等反射的光入射到半导体激光器222上的功能。

[0049] 光学放大器单元(SOA单元)240用作光学调制单元,其放大并调制从半导体激光束

222发射的激光束并且布置于光学隔离单元230的后级。因为从锁模激光器单元220输出的激光束具有相对较小的功率,所以通过光学放大单元240放大激光束。光学放大单元240被配置为包括半导体光学放大器(SOA),即,半导体光学放大器242以及控制半导体光学放大器242的SOA驱动器244。半导体光学放大器242是小型并低成本的光学放大器并可用作光闸以及打开光和关闭光的光开关。在实施方式中,通过半导体激光光学放大器242的开(ON)和关(OFF)调制从半导体激光器222发射出的激光束。

[0050] 在光学放大器单元(SOA单元)240中,根据控制电流(直流)的量级放大激光束。此外,光学放大器单元240在放大时通过由图2所示的脉冲波形P1的控制电流以预定周期T执行间歇驱动打开和关闭具有脉冲波形L1的激光束并且输出间歇激光束(脉冲波形L2)。通过以这种方式产生具有期望时序和周期的脉冲波形,可以实现与系统具有的控制信号的同步。因此,例如,在MOPA式光源的情况下,通过在放大前级上的振荡单元的脉冲的后级上的半导体光学放大器242(其中,半导体光学放大器缩写为SOA)中执行间歇驱动能够实现间歇驱动。在MOPA式光源的情况中,光学放大器单元240(半导体光学放大器242)用作间歇发光单元。

[0051] 在实施方式中,因为使用MLLD,例如,从半导体激光器222输出的激光束的频率是在约500MHz至约1GHz的范围内并且其脉冲宽度在0.5[ps]至约1.0[ps]的范围内。正如下述,除与SOA单元的间歇驱动的同步之外,通过注入来自振荡同步信号注入单元316的传输同步信号,从半导体激光器222输出的振荡脉冲也可与系统具有的控制信号同步。并且,当使用TiSa时,激光束的振荡频率在约40MHz至约80MHz的范围内并且其脉冲宽度在0.1[ps]至约0.2[ps]的范围内。另一方面,通过使用MLLD,可以输出具有高振荡频率的激光束。

[0052] 在实施方式中,例如,从光学放大器单元240输出的激光束的波长是405nm。因为405nm的波长是光吸收较大的波长,波长高密度被转换为到达生物对象内部并且产生具有双光子效应的波长(约900nm至约1300nm)。因此,从光学放大器单元240输出的激光束被输入至后级上的波长转换模块250以便其波长被波长转换模块250的LB0252转换。

[0053] 例如,波长转换模块250的LB0252将输入激光束(脉冲波形L2)转换成两个波长。接下来,从波长转换模块250中输出两个转换的波长中具有更长的波长的激光束(脉冲波形L3)。在实施方式中,波长转换模块250不是必不可少的构成部件并且也可使用从光学放大器单元240输出的激光束作为最终的光照射对象(测量样品S)。

[0054] 顺便提及,在利用激光显微镜观察生物对象中,为了降低对对象的损伤,降低激光的平均功率并且增大激光的峰值功率是有效的。并且,包含在使用半导体激光器的MOPA式光源中的激光器芯片尺寸小,并且因此,考虑由于由高功率的负载引起的发热施加操作限制。

[0055] 因为根据实施方式的光源200输出间歇激光束(脉冲波长L2)并且执行间歇操作,所以与未执行间歇操作的情况相比,尽管平均功率相同,但也能够增加发光时的峰值。并且,通过执行间歇操作,可以抑制由高功率的负载引起的发热。

[0056] 在实施方式中,用作双光子激发光源200的光源200激发具有双光子的荧光物质。具体地,在使用双光子激发光源的显微镜中,已知品质因数FOM($= (\text{峰值功率})^2 \times \text{脉冲宽度} \times \text{频率} = \text{峰值功率} \times \text{平均功率}$)。根据品质因数,输出可与峰值功率和平均功率的乘积成比例地增加。因此,在利用激光显微镜观察生物对象中,为了将对对象的损伤抑制到尽可能小

并且增大输出,降低平均功率并且增大峰值功率是有效的。因此,在实施方式中,通过执行间歇操作降低占空比(占空比=脉冲宽度×频率)并且增大峰值功率。

[0057] 图3是示出通过间歇发光增大激光峰值功率时的特征的示图。图3的上部示出单光子激发情况下的特征。上部左侧的特征显示连续发光的峰值功率以及其右侧的特征显示当占空比设置为50%时间歇发光的峰值功率。因此在间歇发光的情况中,当间歇发光的占空比设置为50%时,能够输出连续发光的信号强度(I_0)的两倍的信号强度($2 \times I_0$)。

[0058] 图3的中部示出双光子激发的情况中的特征。左侧的特征显示连续发光的峰值功率以及右侧的特征显示当占空比设置为50%时间歇发光的峰值功率。在双光子激发的情况中,品质因数FOM按峰值功率的平方增加。因此,在间歇发光的情况中,双光子激发的信号强度($=4 \times I_0^2$)是连续发光的信号强度($=I_0^2$)的四倍。另外,甚至在脉冲发光点和脉冲非发光点的平均信号强度中,双光子激发的平均信号强度($=2 \times I_0^2$)是连续发光的信号强度($=I_0^2$)的两倍。因此,在实施方式中,通过在双光子激发光源200中执行间歇驱动,可以增大峰值功率和平均信号强度。

[0059] 图3的下部的特征示出将中部的特征经由频带限制的低通滤波器(图1中示出的低通滤波器(LPF)318)而获得的信号。在A/D转换之前执行频带限制的低通滤波器执行的处理。因此,当开/关的占空比为50%(1/2)时,A/D转换之前的信号幅度变成1/2。因此,在双光子激发的间歇发光中能够获得2倍的信号幅度。并且,当开/关的占空比为1/n并且峰值功率变成n倍时,通过双光子激发获得变成n倍的信号幅度。因此,占空比优选较小。然而,在实践中,因为从光源200所获得的峰值功率存在上限,所以适当选择等于或小于1的适当值作为占空比。

[0060] 【3.显微镜系统的配置的实例】

[0061] 稍后将参照图4描述显微镜主体100的配置。图4示出了使用两种检测镜的共焦荧光显微镜的配置的实例。显微镜主体100通过两个检测镜在目标样品S上二维地执行光束扫描。

[0062] 从光源200发射的激发光通过安装在诸如透镜的光学系统中以及共轭位置处的小孔,并随后通过传递激发光并且反射荧光的二向色镜。已经通过二向色镜的激发光穿过诸如透镜的光学系统以便X坐标由控制测量样品的X方向的扫描的X方向检测镜120控制,以及Y坐标接着由控制Y方向扫描的Y方向检测镜130控制,然后通过物镜聚光在测量样品S上的期望XY坐标处。

[0063] 从测量样品发出的荧光被Y方向检测镜130和X方向检测镜120反射,跟踪与激发光相同的路径并且被二向色镜反射。由二向色镜反射的荧光穿过安装在共轭位置处的小孔并随后被引导至诸如光电倍增管(PMT)的检测器110。

[0064] 这里,用于控制测量样品的聚光位置的两个检测镜的旋转轴被连接至镜,如图4示意性所示。在检测镜120和130中,根据输入电压的量级控制旋转轴的旋转量并且可以高速和高精度改变镜面面对的角度。

[0065] 图4示出单光子激发的情况。在双光子激发的情况中,因为没必要使光通过检测镜和小孔,所以从测量样品发出的荧光可被引导至安装在物镜的后级的诸如光电倍增管(PMT)的检测器。

[0066] 在图4示出的激光扫描显微镜中,根据两个检测镜120和130的操作方法的组合扫

描测量样品的XY平面时激发光移动的方式是不同的。在下文中,将参照图5描述使用光栅扫描方案的二维图像的生成方法,光栅扫描方案是最普通的扫描方案。在光栅扫描方案的情况下,用X方向检测镜120在水平方向上执行扫描并且返回到检测器110的返回光在将设定为图像信息的中心部分而不是返回的附近采样。

[0067] 例如,在下面的描述中,在其上限定图5中示出的坐标系统的测量样品S的样品平面上,假设控制X方向上的扫描的检测镜120的操作速度比控制Y方向上的扫描的检测镜130的操作速度更快。

[0068] 在图5的上部中示出的图示意性地示出在假设样品平面的左上位置为扫描的起始点时激发光如何在XY方向上移动。

[0069] 在光栅扫描方案中,如图5中的测量样品S的样品平面所示,在旋转X方向检测镜120期间执行荧光的检测(图像的获取)以便激发光在X方向上从样品平面的左端移动至右端。在光栅扫描方案中,在X方向检测镜120操作期间Y方向检测镜130停止。

[0070] 基本上,当激发光到达样品平面的右端时,荧光的检测暂停并且X方向检测镜120改变旋转轴的旋转角度直至对应于左端的位置。在此期间,Y方向检测镜130以一行在Y轴正方向上移动一步。当这种操作重复行数时并且激发光到达样品平面的右下处时,X方向检测镜120和Y方向检测镜130通过大幅旋转每个旋转轴将位置返回至扫描的起始位置以便产生一个二维图像(帧)。

[0071] 在这样的光栅扫描方案中,在X方向检测镜120操作的同时Y方向检测镜130停止。因此,其中形成所产生的二维图像的单位(图像形成单位)的形状是图5的上部示出的矩形形状。

[0072] 图5的下部示出的曲线图是显示Y坐标如何随着时间而变化的时序图。当 T_{frame} 是获得一帧图像的所必需的时间时,时间被表示为以下等式11,如从图5的下部中的时序图中显而易见。这里,在以下等式11中, T_{scan} 表示一个扫描时期, N_y 表示Y方向上行的数量,以及 T_{Y_all} 表示Y方向上的返回时间。

[0073] $T_{\text{frame}} = (T_{\text{scan}}) \times N_y + T_{Y_all} \cdots$ (等式11)

[0074] 这里,扫描周期 T_{scan} ,有效扫描时间 T_{eff} ,以及返回时间 T_{back} 具有以下等式12中表达的关系。当 T_y 是Y方向中一行移动时间时,Y方向上的返回时间 T_{Y_all} 被表示为以下等式13。这里,以下等式12中的返回时间 T_{back} 表示从有效扫描区(例如,图5的上部中的样品平面上X方向中的实线表示的区)的末端移动到下一个周期的有效扫描区的起始点所必须的总时间。

[0075] $T_{\text{eff}} = T_{\text{scan}} - T_{\text{back}} \cdots$ (等式12)

[0076] $T_{Y_all} = T_y \times N_y \cdots$ (等式13)

[0077] 例如,将考虑在X方向的检测镜120的扫描频率 F_{scan} 是7.8kHz的情况。在这种情况下,扫描周期 T_{scan} 被表达为扫描频率 F_{scan} 的倒数, $T_{\text{scan}} = 1/F_{\text{scan}} = 1.28 \times 10^{-4}$ 秒。并且,当该检测镜的有效扫描时间 T_{eff} 基于扫描频率被表示为{扫描周期 $T_{\text{scan}} \times (1/3)$ }时,有效扫描时间是 4.27×10^{-5} 秒以及返回时间 T_{back} 是 $1.28 \times 10^{-4} - 4.27 \times 10^{-5} = 8.53 \times 10^{-5}$ 秒。

[0078] 并且,当Y方向检测镜130在Y方向的返回时间 T_y 是 1×10^{-6} 并且Y方向上行的数量 N_y 为512,从上述等式11可知拍摄一帧所必须的时间 T_{frame} 是 6.62×10^{-2} 秒。因为在这样的扫描系统中,帧速率表示为 T_{frame} 的倒数的值,帧速率=15.1(帧/s)。

[0079] 在图5中示出的光栅扫描方案中,如图5的上部中的样品平面所示,在X方向检测镜

120°旋转并且激发光在X方向从样品平面的左端移动至右端的周期中,使光源200仅在有效扫描时间 T_{eff} 发出光。就是说,在X方向的双程扫描中,仅在获取到图像的有效扫描时间 T_{eff} 期间打开光源200并且在除了有效扫描时间 T_{eff} 之外的期间和方向改变期间关闭电源。在这时,以约50Hz至约10kHz的范围内的频率执行光源200的开/关。因此,因为通过使光源200仅在有效扫描时间 T_{eff} 期间使光源200发出光而周期性地发光以及通过上述脉冲波形P1的间歇驱动,可降低激光器的平均功率并增大峰值功率。

[0080] 另外,当显微镜主体100不是图像获取模式时,假设关闭光源200。在此时,可通过关闭光学放大器单元240关闭光源200或者可关闭MLLD本身。

[0081] 【4. 采样周期和间歇发光周期之间的关系】

[0082] 诸如检测光子的光电倍增管(PMT)的检测器110是模拟元件并将所引入的光子光电地转换为电信号(电流值或电压值)。所转换的电信号经受预定采样周期的A/D转换。经受A/D转换的信号对应一个像素图像信息。图6至图8是示出采样周期以及脉冲波形P1的间歇发光周期T的特征的示图。

[0083] 图6示出了采样周期比间歇发光周期T短的情况。换言之,图6示出了采样频率比间歇发光频率高的情况。在图6的下部的特征中,实线表示的特征代表由检测器100执行光电转换之后的电信号以及虚线表示连接采样值的特征。在这种情况下,因为在非发光时间执行采样,即,非激发时间,在某些情况下,所获得的图像是明暗在相邻像素中交替的图像(斑点模样图像,即,所谓的牙缺损的图像)。

[0084] 图7示出了采样周期比间歇发光周期T长的情况。换言之,图7示出了采样频率比间歇发光频率低的情况。如图6所示一样,实线表示的特征代表由检测器100执行光电转换之后的电信号以及虚线表示连接采样值的特征。在这种情况下,光电转换后的电信号包括频率高于采样频率的电信号。因此,尽管电信号最初是恒定电平信号,对各种值进行采样,因而正确的波形可能由于混迭的影响不会再现。因而,当采样周期与间歇发光周期T异步时,信号电平不恒定。并且,当采样周期与间歇发光周期T同步时,原始信号电平恒定。然后,在异步情况中,由于不必要的激发出现褪色。当观察生物对象时,也可能出现诸如不必要的激发、待观察的细胞等的灭绝的不利影响。

[0085] 图8示出使得采样周期与间歇发光周期T相同的情况。即,图8示出了采样频率与间歇发光频率相同的情况。在图8中,使得相位相同以便在间歇发光周期T的峰值处执行采样。因而,当采样周期与间歇发光周期T同步时,可获得正确的信号并且褪色也可被抑制到尽可能的小。

[0086] 例如,采样频率 f_s 是在约100kHz至约10MHz的范围内。基本上,从显微镜系统1000的规格确定采样频率 f_s 并使得间歇发光频率与采样频率 f_s 相同。另一方面,可以先确定间歇发光频率并且可使得采样频率与间歇发光频率相同。

[0087] 并且,除了以上说明以外的脉冲发光,扫描束的开/关信号、或者图像获取的开/关信号也优选地与A/D转换的采样周期同步,但并非必须同步。

[0088] 为了使采样周期与间歇发光周期T同步,认为图1的光学放大器单元240的开/关周期与对检测器110(诸如光电倍增管(PMT))所检测的电信号执行A/D转换的A/D转换电路的采样周期相同。即,通过SOA驱动器244无变化地向A/D转换电路输入相同的开/关时钟,可以可靠地使采样周期与间歇发光周期T相同。因而,使得与采样和间歇发光有关的频率和相位

相同。

[0089] 如图2所示,从波长转换模块250输出的激光束L3在间歇发光的发光周期内以脉冲形状发出。图8示出在将脉冲处理成低通滤波器(图1示出的低通滤波器318)看不见的脉冲的程度之后的光发射。在这时,如以下详细地描述,低通滤波器的频带限制优选地等于或小于采样频率的 $1/2$ 。例如,当采样频率是1MHz时,将低通滤波器的频带限制设置为最大500kHz。这样,可以设立奈奎斯特采样定理。因此,允许采样周期与间歇驱动周期之间的相位偏移。

[0090] 【5. 使得采样周期与间歇驱动周期相同的配置的实例】

[0091] 接下来,将参考图1描述使得采样周期和间歇驱动周期相同的配置。如图1所示,控制单元300被配置为包括:定时生成器302、采样信号生成单元304、A/D转换单元306、存储器308、电束控制单元310、D/A转换单元312、间歇发光信号生成单元314、振荡同步信号注入单元316以及低通滤波器(LPF)318。

[0092] 如图1所示,定时生成器302生成时钟CLK并且采样信号生成单元304基于时钟CLK生成具有采样频率 f_s 的采样信号。并且,间歇发光信号生成单元314基于时钟CLK生成具有间歇发光的周期 T 的间歇发光信号。因而,能够使得通过采样信号生成单元340生成的采样信号与通过间歇发光信号生成单元314生成的间歇发光信号同步。例如,当采样信号生成单元304将时钟CLK用作采样频率 f_s 而无改变并且间歇发光信号生成单元314将时钟CLK用作间歇发光信号的频率而无改变时,采样周期与间歇发光周期 T 变得相同。

[0093] 通过检测器110的光电转换获得的电信号被输入至低通滤波器318。如上所述,低通滤波器318对输入信号执行频带限制以便建立奈奎斯特采样定理,并且将信号输出至A/D转换单元306。A/D转换单元306以采样频率 f_s 对输入信号执行A/D转换。SOA驱动器244以间歇发光信号的频率打开及关闭激光束(脉冲波形L1)并且输出间歇激光束(脉冲波形L2)。

[0094] 并且,电束控制单元310从定时生成器302接收时钟信号CLK的输入并生成检测镜控制信号以控制检测镜120和130。检测镜控制信号经受D/A转换单元312的D/A转换,并且经受D/A转换的检测镜控制信号控制检测镜120和130。因而,也可基于时钟CLK控制检测镜120和130。如上所述,在光栅扫描方案中,使光源200仅在有效扫描时间 T_{eff} 发光。因此,间歇发光信号生成单元314基于时钟CLK仅在光栅扫描的有效扫描时间 T_{eff} 生成间歇发光信号并在除了有效扫描时间 T_{eff} 以外时间的期间关闭间歇发光信号。同样地,采样信号生成单元304基于时钟CLK仅在有效扫描时间 T_{eff} 生成采样信号。因此,采样信号和间歇发光信号在检测镜的操作周期变得同步。因此,通过在除了有效扫描时间 T_{eff} 以外的时间期间关闭采样信号和间歇发光信号,能够降低平均功率并且因而增加峰值功率。

[0095] 【6. 低通滤波器的配置】

[0096] 安装在A/D转换单元306的前级的低通滤波器318执行检测器(PMT)110的输出的频带限制为满足奈奎斯特采样定理的频率。更具体地,低通滤波器318执行检测器110的输出的频带限制为采样频率的 $1/2$ 至 $1/3$ 的频率。例如,当采样频率为1GHz时,检测器110的输出将经受约300kHz至约500kHz的频带限制。当采样频率可变时,低通滤波器318的频带也与采样频率成比例地变化。

[0097] 通过对检测器110的输出执行满足奈奎斯特采样定理的频率的频带限制,可以可靠地防止采样结果中包含不必要的信号并且因而可靠地改善图像的再现。

[0098] 【7. 激光束的振荡光脉冲与激光束的调制之间的同步】

[0099] 接下来将描述激光束的振荡光脉冲与间歇发光信号的周期之间的关系。在实施方式中,激光束的振荡光脉冲也可与定时生成器302的时钟CLK同步。

[0100] 从锁模激光器单元220发射出的激光束的振荡频率是由光速和上述外部谐振器的路径长度决定的。从定时生成器302注入的信号也被视为具有与谐振器的频率几乎相同的频率。然而,通过提供通过来自振荡同步信号注入单元316的传输同步信号的注入系统所具有的相位信息,可以将系统具有的相位信息与外部谐振器同步。

[0101] 因此,振荡同步信号注入单元316基于定时生成器302的时钟信号CLK将与时钟CLK同步的振荡同步信号发送至偏置Tee的电容器。提供振荡同步信号作为半导体激光器222的增益电流 I_g 的AC成分。

[0102] 因为提供与时钟CLK同步的振荡同步信号作为半导体激光器222的增益电流 I_g 的AC成分,从半导体激光器222发射的激光束的振荡光脉冲可与时钟CLK同步。

[0103] 如上所述,振荡同步信号注入单元316为半导体激光器222供应与时钟CLK同步的振荡同步信号。因而,可以将从半导体激光器222发射的激光束的振荡光脉冲与时钟CLK同步。

[0104] 如上所述,间歇发光信号生成单元314基于时钟CLK为间歇发光生成间歇发光信号并使用间歇发光信号驱动光学放大器单元240,在与时钟CLK同步中打开及关闭待驱动的光学放大器单元240并且在与时钟CLK同步中调制激光束。因而,可以将从半导体激光器222发射的激光束的振荡光脉冲与激光束的调制同步。因而,甚至在激光束具有相当高的脉冲光频率时,可以容易地将激光束的振荡光脉冲与激光束的调制同步并且从而获取期望的图像。

[0105] 另外,通过振荡同步信号注入单元316的激光束的振荡光脉冲的同步是任意的,并且可以不执行同步。具体地,当激光束的振荡光脉冲的周期与间歇发光信号的周期显著不同时,可以获取期望图像而不执行同步。

[0106] 【8. 光分辨率与采样频率之间的关系】

[0107] 激光扫描显微镜的分辨率是由与激发光源的波长 λ [m]成比例的光分辨率决定的。估计光分辨率为 d_o 为 $\lambda/2$ 或 $0.61 \times \lambda$ 。然而,出于简化,当使用 $\lambda/2$ 时,在“ $\lambda=1000\text{nm}$ ”的情况下光分辨率 $d_o=500\text{nm}$ 。当光电转换元件的频带没有限制时,电分辨率 d_e 是由光束速度 v [m/s]和采样频率 f_s [1/s]决定的。

[0108] 在电分辨率 d_e 中,通过奈奎斯特采样定理的采样间隔 $[m]=v/f_s$ 的 $1/2$,并且因而,能够计算电分辨率“ $d_e=v/(2 \times f_s)$ ”。

[0109] 能够从扫描束往复频率与扫描范围计算光束速度 v [m/s]。因此,当基于500Hz的往复频率和1mm的扫描范围执行计算作为代表数时,通过在周期2ms的一半的1ms处扫描1mm的范围获得“ $v=1$ [m/s]”。

[0110] 因此,电分辨率 d_e 在“ $f_s=1\text{MHz}$ ”处变成“ $d_e=1$ [m/s]/ $(2 \times 1\text{E}+6[1/2])=500\text{nm}$ ”,并且因而与光分辨率 d_o 相同。

[0111] 如上所述,甚至当使得光束速度快10倍时,10MHz对于采样频率足够,并且其可理解成使得采样频率变得任意更快是不存在优势的。因此,在日本专利第5007092号中,难以获得在实施方式中描述的优势。甚至在与脉冲发光同步执行高速采样时,没有提高分辨率

并且也难以增加信号量。

[0112] 根据实施方式,如上所述,通过从光源200间歇地发射激光束,间歇发光的周期被配置为与从检测器100所获得的图像的电信号的采样周期相同。因而,可以可靠地防止获取斑点模样图像(patch pattern-like image),即,牙缺损的图像。并且,可以可靠地防止正确的波形由于混迭的影响而不再现。此外,因为能够抑制激光束的不必要的激发,也可以防止诸如由于光毒性而出现待观察的细胞等的灭绝的不利影响。

[0113] 已参考附图详细地描述了本公开的优选实施方式,但本公开的实施方式不限于本公开的技术范围。对本领域技术人员显而易见的是在权利要求书中限定的技术范围内可以出现各种修改或修正并且当然应理解属于本公开的技术范围。

[0114] 另外,本技术还可配置如下。

[0115] (1) 一种激光扫描显微镜系统,包括:

[0116] 锁模激光器单元,被配置为发射具有预定频率的激光束;

[0117] 间歇发光单元,被配置为在预定间歇发光周期中间歇地发出从锁模激光器单元发射的激光束;

[0118] 检测器,被配置为将荧光物质转换为电信号,荧光物质接收间歇发出的激光束并且然后从对象中被激发;以及

[0119] A/D转换单元,被配置为以与间歇发光周期同步的采样周期对电信号采样。

[0120] (2) 根据(1)的激光扫描显微镜系统,其中,与采样和间歇发光相关的频率和相位是相同的。

[0121] (3) 根据(1)的激光扫描显微镜系统,其中,锁模激光器单元发射用于双光子激发的激光束。

[0122] (4) 根据(1)的激光扫描显微镜系统,其中,向A/D转换单元提供采样周期的采样信号以及向间歇发光单元提供间歇发光周期的间歇发光信号可以是相同的信号。

[0123] (5) 根据(1)的激光扫描显微镜系统,进一步包括:

[0124] 采样信号生成单元,被配置为生成向A/D转换单元提供采样周期的采样信号;以及

[0125] 间歇发光信号生成单元,被配置为生成向间歇发光单元提供间歇发光周期的间歇发光信号,

[0126] 其中,基于相同的时钟产生采样信号与间歇发光信号。

[0127] (6) 根据(1)的激光扫描显微镜系统,其中,锁模激光器单元或间歇发光单元仅在预定有效发光周期期间使激光束入射到对象上。

[0128] (7) 根据(6)的激光扫描显微镜系统,进一步包括:

[0129] 第一检测镜,被配置为在对象的表面的第一方向上利用激光束执行扫描;

[0130] 第二检测镜,被配置为在与对象的表面的第一方向正交的第二方向上利用激光束执行扫描;以及

[0131] 检测镜控制单元,被配置为控制第一检测镜和第二检测镜,

[0132] 其中,当在第一方向的扫描完成时,检测镜控制单元将激光束返回至第一方向的起始位置并且通过激光束的一行来在第二方向上执行扫描并且然后在第一方向上再次执行扫描,以及

[0133] 其中,有效发光周期是在第一方向执行扫描的周期的至少一部分。

[0134] (8) 根据 (1) 的激光扫描显微镜系统,进一步包括:

[0135] 低通滤波器,被配置为对从检测器中输出的电信号执行频带限制以及将电信号输入到A/D转换单元,

[0136] 其中,低通滤波器以为采样频率建立奈奎斯特采样定理的方式执行频带限制。

[0137] (9) 根据 (8) 的激光扫描显微镜系统,其中,低通滤波器以频带限制等于或小于 $1/2$ 的采样频率的方式执行频带限制。

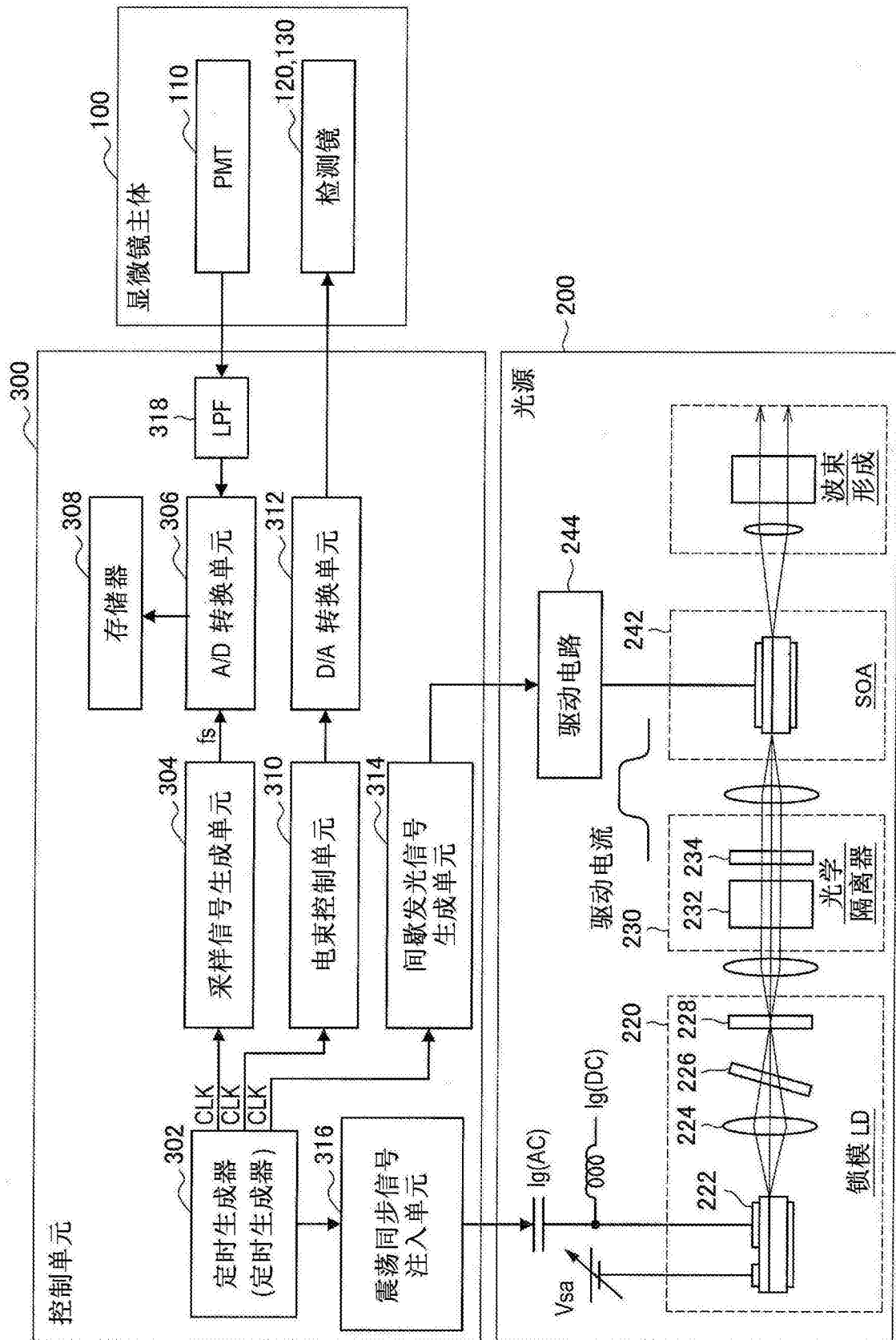


图1

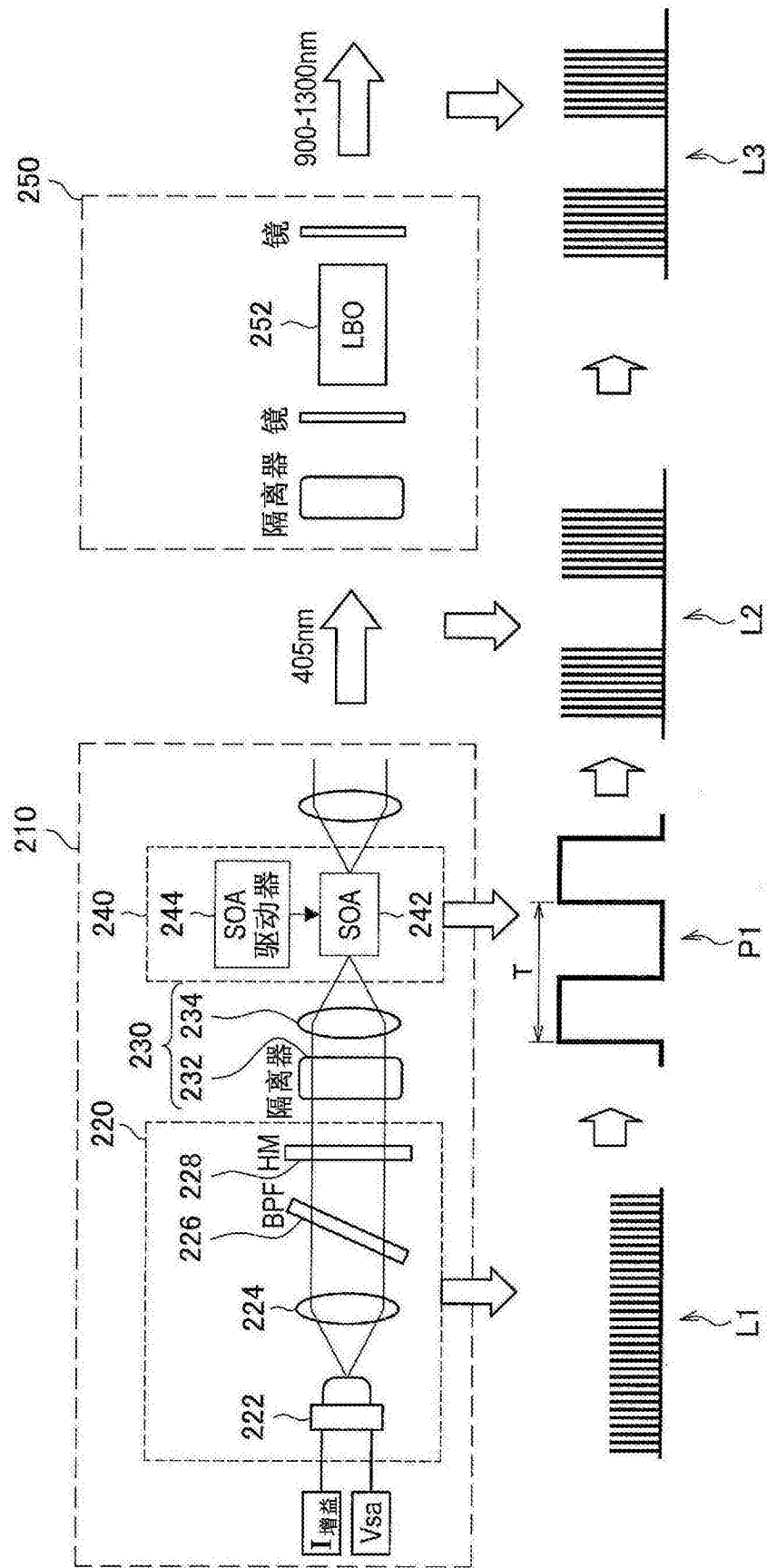


图2

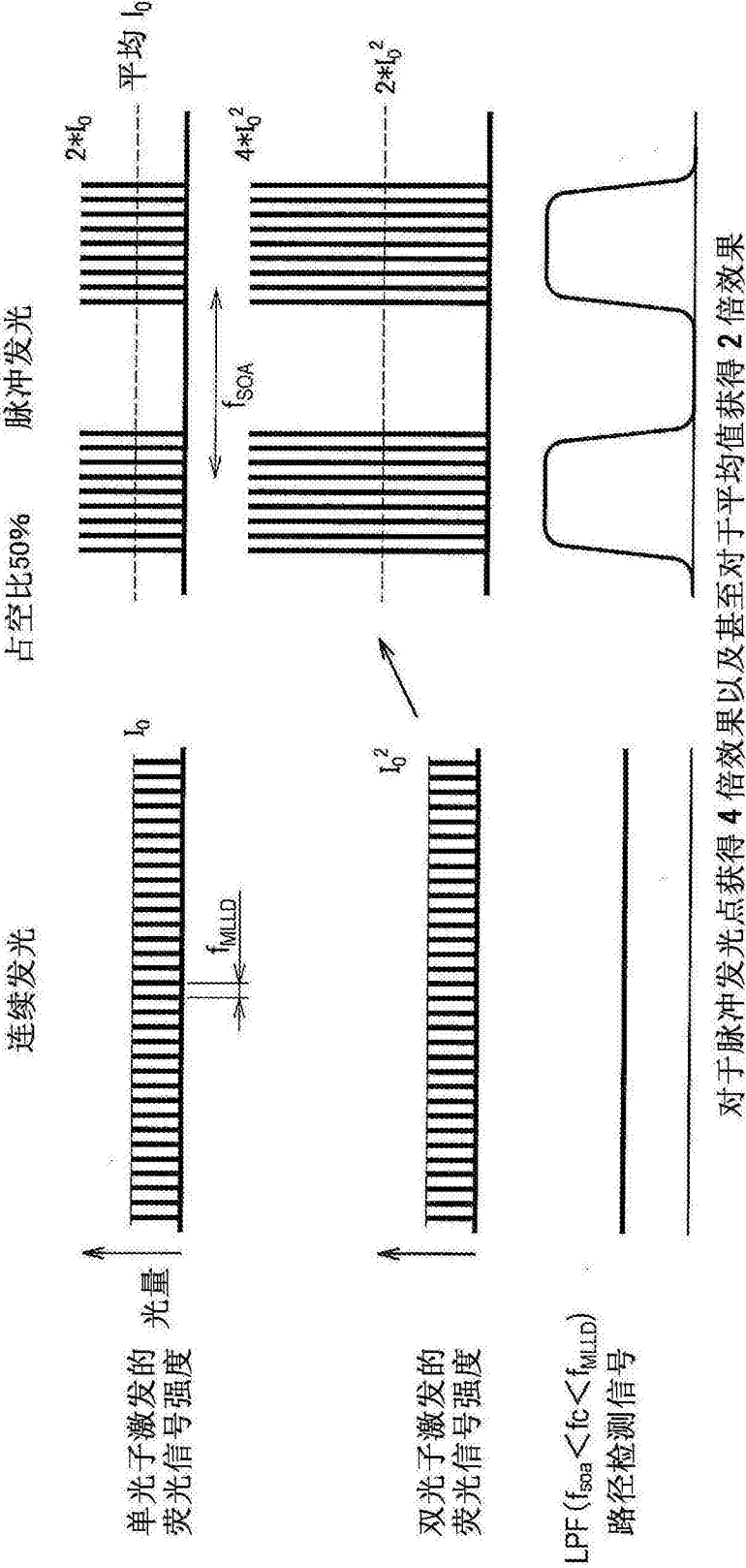


图3

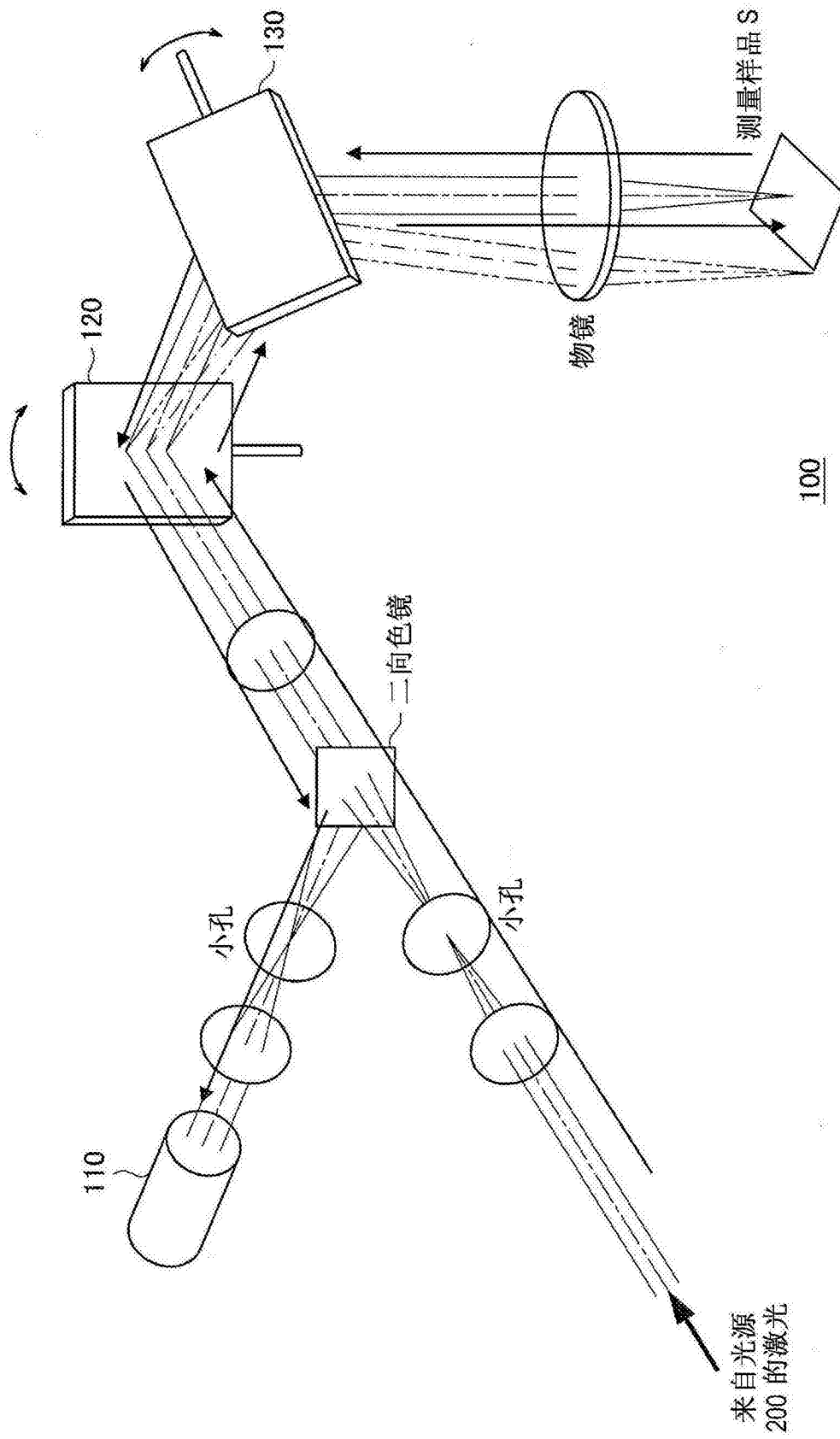


图4

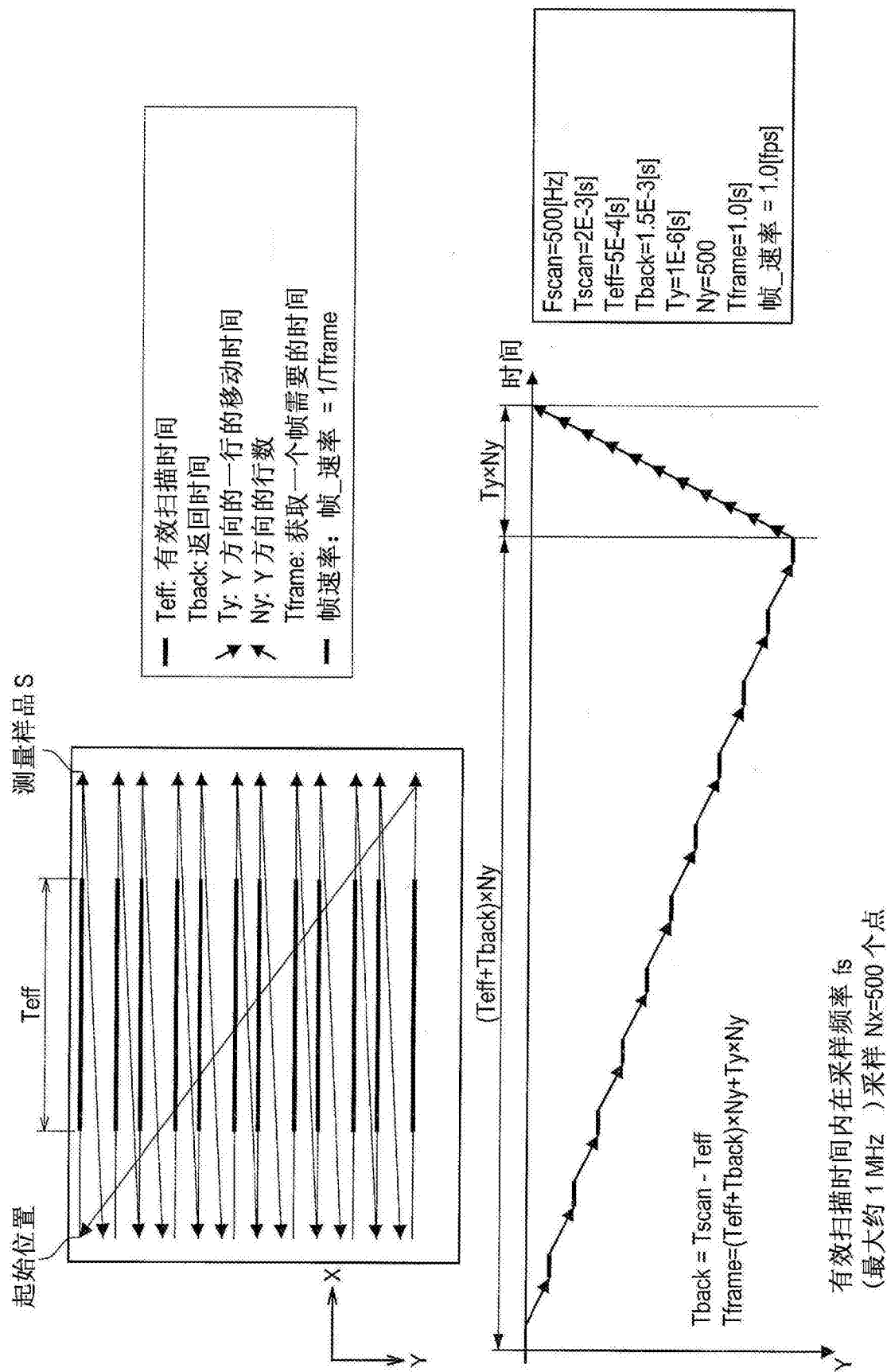


图5

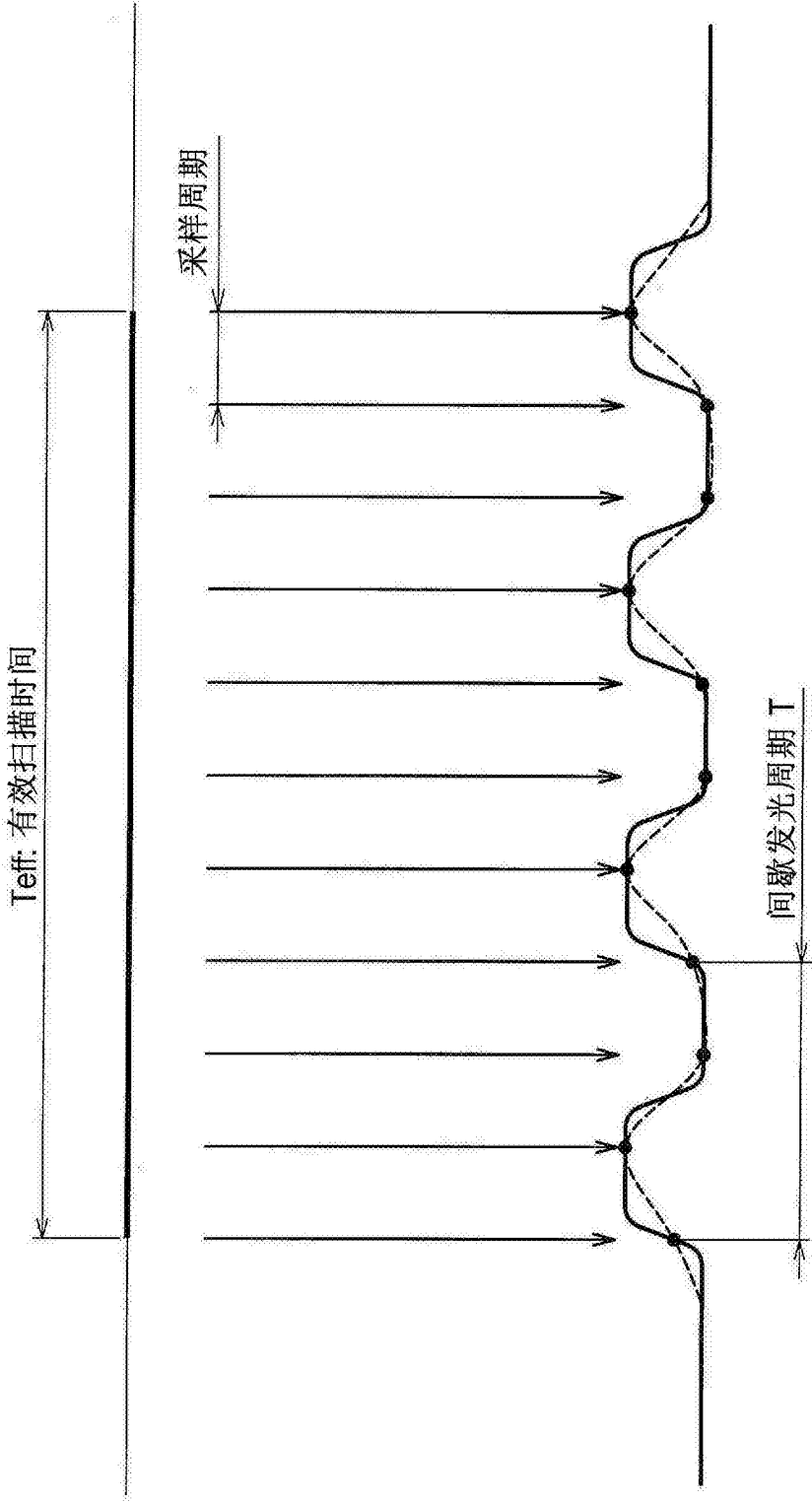


图6

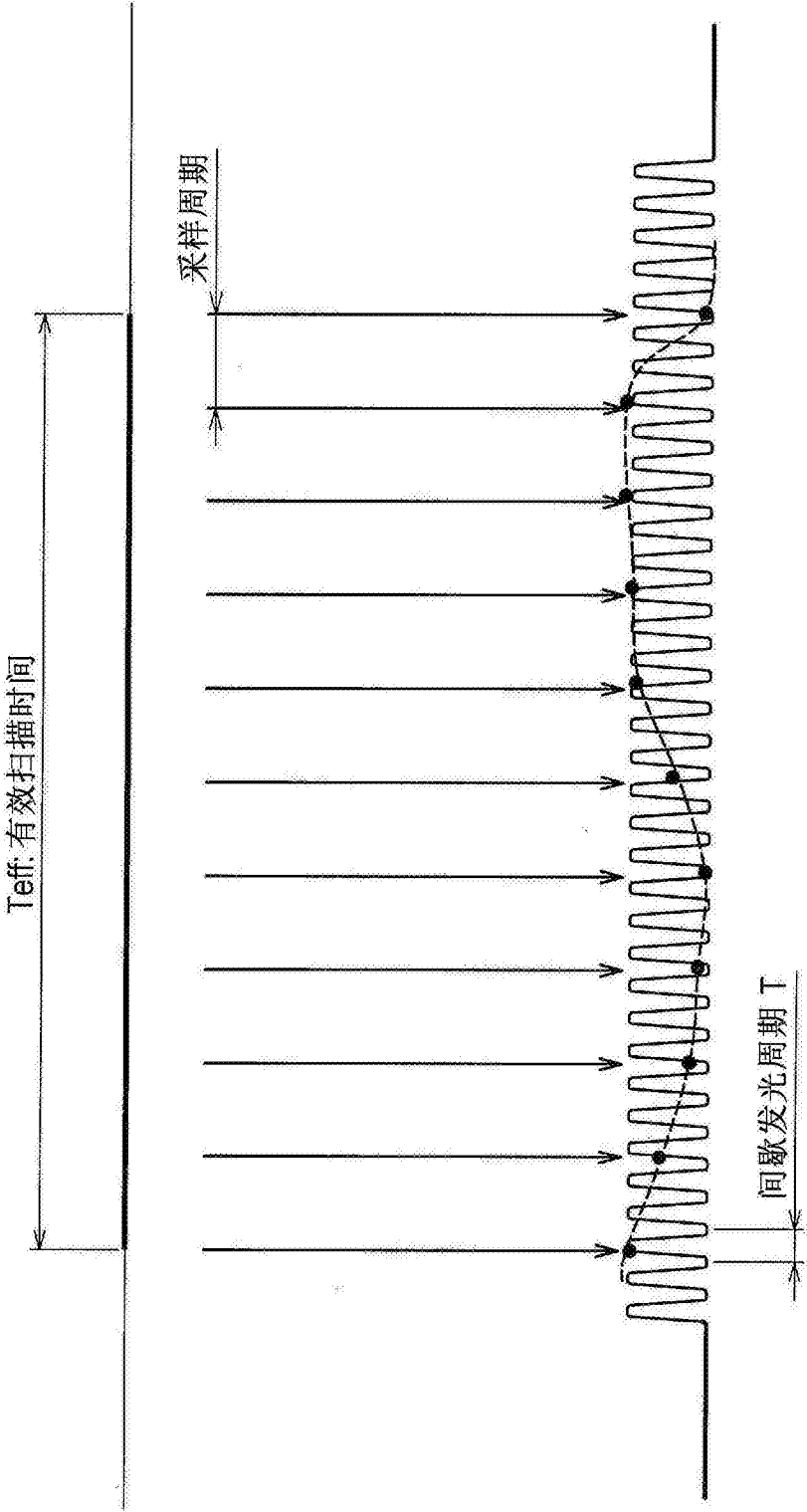


图7

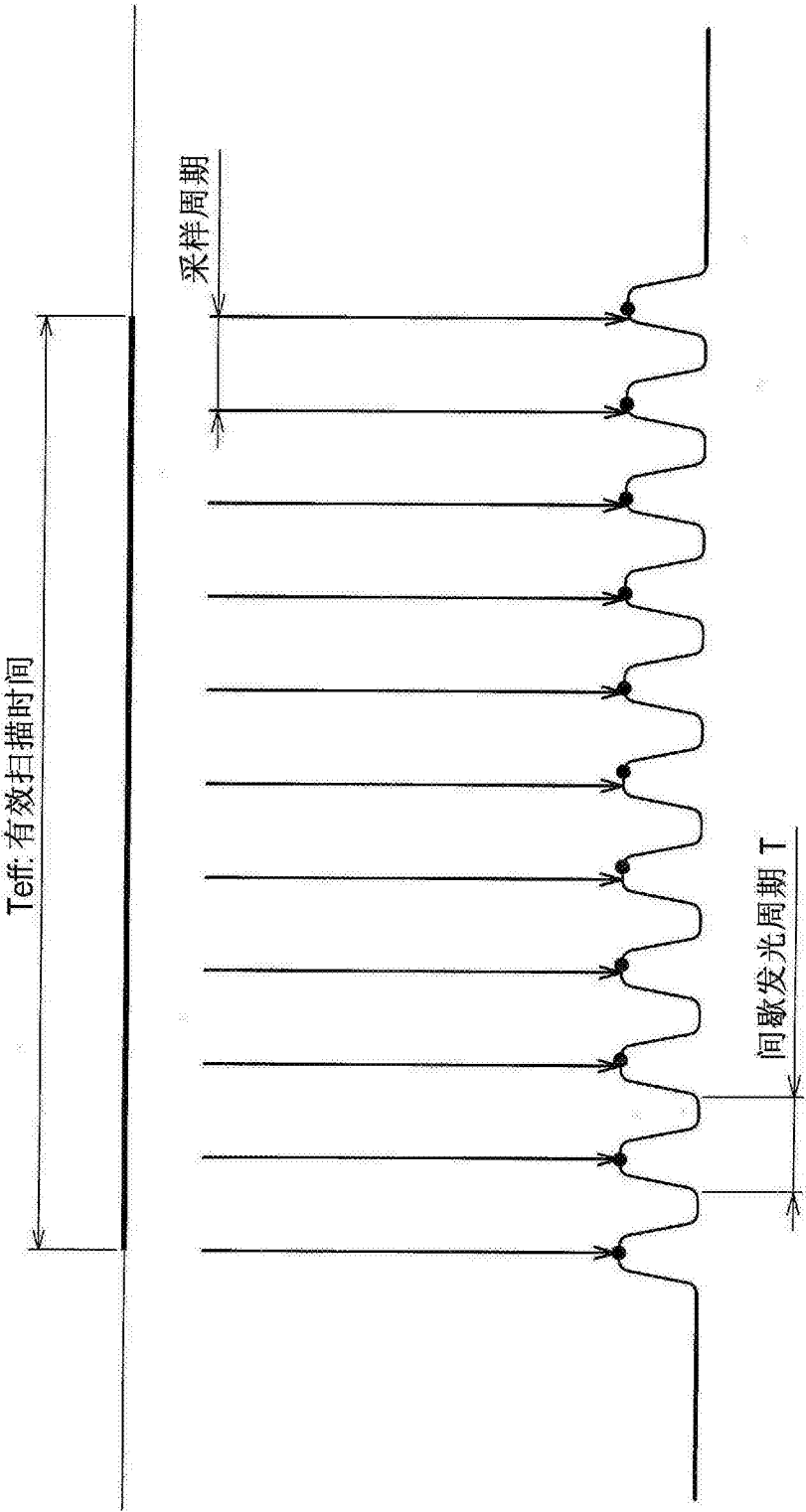


图8