

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6632993号
(P6632993)

(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)

(24) 登録日 令和1年12月20日(2019.12.20)

(51) Int. Cl.	F I
GO 2 B 21/00 (2006.01)	GO 2 B 21/00
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 E
GO 1 N 21/65 (2006.01)	GO 1 N 21/65
GO 2 B 26/10 (2006.01)	GO 2 B 26/10 104

請求項の数 10 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2016-563052 (P2016-563052)	(73) 特許権者	516290391
(86) (22) 出願日	平成27年4月17日 (2015.4.17)		ホリバ ジョヴァン イボン エスアーエ
(65) 公表番号	特表2017-519235 (P2017-519235A)		ス
(43) 公表日	平成29年7月13日 (2017.7.13)		フランス国 91160 ロンジュモウ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2015/051055		リュ デュ キャナル 16-18
(87) 国際公開番号	W02015/159035	(74) 代理人	100092277
(87) 国際公開日	平成27年10月22日 (2015.10.22)		弁理士 越場 隆
審査請求日	平成30年4月13日 (2018.4.13)	(74) 代理人	100155446
(31) 優先権主張番号	1453479		弁理士 越場 洋
(32) 優先日	平成26年4月17日 (2014.4.17)	(72) 発明者	フレッテル, エマニュエル
(33) 優先権主張国・地域又は機関	フランス (FR)		フランス国 59170 クルワ リュ
			ルイス ミシエル 37

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学ビーム走査検鏡のための装置及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

光学ビーム(2)を発するように構成される少なくとも1つの光源(20)と、
 検鏡装置の長手方向光軸(10)に従って配置された、入射瞳を有する顕微鏡対物レンズ(1)であって、前記瞳は前記長手方向光軸(10)上に中心(O)を有し、前記長手方向光軸(10)を横断する物体平面(11)において前記光学ビーム(2)を結像するように構成される顕微鏡対物レンズ(1)と、

前記物体平面(11)における少なくとも1つの空間方向(X, Y)に従って前記光学ビーム(2)を角度変位させる手段と、

を備えた光学ビーム走査検鏡装置であって、

前記光学ビーム(2)を角度変位させる手段が、前記光源(20)と前記顕微鏡対物レンズ(1)との間で前記光学ビーム(2)の光路上に直列に配置された第1のミラー(M-X Y 1)と第2のミラー(M-X Y 2)とで構成され、

前記第1のミラー(M-X Y 1)は、第1のミラー(M-X Y 1)を第1の回転軸(X)の周りで第1の所定の回転角(R X 1)に従って傾斜させ且つ前記第1の回転軸(X)を横切る第2の回転軸(Y)の周りで第3の所定の回転角(R X 3)に従って傾斜させるように構成された2つの回転軸を有するアクチュエータ(25)上に搭載され、

前記第2のミラー(M-X Y 2)は、第1の回転軸(X)の周りを前記の第1の所定の回転角(R X 1)の関数で第2の所定の回転角(R X 2)に従って傾斜させ且つ前記第1の回転軸(X)を横切る第2の回転軸(Y)の周りを前記の第3の所定の回転角(R

X 3) の関数で第 4 の所定の回転角 (R X 4) に従って傾斜させるように構成された 2 つの回転軸を有するアクチュエータ (2 6) 上に搭載され、

前記顕微鏡対物レンズ (1) の前記瞳の中心 (O) の回りを回動させることにより前記光学ビーム (2) の軸 (1 2) を角度傾斜させ、前記長手方向光軸 (1 0) に対する前記光学ビーム (2) の前記軸 (1 2) の傾斜角範囲で前記光学ビーム (2) が前記顕微鏡対物レンズ (1) の前記瞳の前記中心 (O) にセンタリングされたままで、前記物体平面 (1 1) における前記 2 つ方向 (X、Y) に従って前記光学ビームを変位させる、
ことを特徴とする光学ビーム走査検鏡装置。

【請求項 2】

前記第 1 のミラー (M - X Y 1) のアクチュエータ (2 5) が圧電式又はボイスコイル式であり、及び/又は、前記第 2 のミラー (M - X Y 2) のアクチュエータ (2 6) が圧電式又はボイスコイル式である請求項 1 に記載の光学ビーム走査検鏡装置。

10

【請求項 3】

前記第 1 のミラー (M - X Y 1) の前記アクチュエータ (2 5) が、位置信号を供給する位置センサを備え、前記第 2 のミラー (M - X Y 2) の前記アクチュエータ (2 6) が位置センサを備え、前記装置は、前記第 1 のミラー (M - X Y 1) の前記アクチュエータ (2 5) の前記位置信号の関数として、前記第 2 のミラー (M - X Y 2) の前記アクチュエータ (2 6) の制御信号を駆動するように構成される位相ロックループシステムを備える、請求項 1 又は 2 に記載の光学ビーム走査検鏡装置。

20

【請求項 4】

前記第 2 の回転角 (R X 2) が、前記第 1 の回転角 (R X 1)、前記第 1 のミラー (M - X Y 1) と前記第 2 のミラー (M - X Y 2) との間の距離 B、及び前記第 2 のミラー (M - X Y 2) と前記顕微鏡対物レンズ (1) の前記入射瞳の前記中心 (O) との間の距離 A の関数である、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の光学ビーム走査検鏡装置。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの光源 (2 0) は、レーザ源式及び/又は発光ダイオード式の 1 つ又は複数のソースを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の光学ビーム走査検鏡装置。

【請求項 6】

前記光源 (2 0) と前記顕微鏡対物レンズ (1) との間に配置されるビーム拡大器 (3 1) を更に備え、前記ビーム拡大器 (3 1) は固定及び/又は可変倍率を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の光学ビーム走査検鏡装置。

30

【請求項 7】

前記顕微鏡対物レンズの前記物体平面 (1 1) の像を形成し、及び/又は光学ビーム走査を用いて走査される試料のゾーンを表示するように構成されるビューカメラ (9) を更に備える、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の光学ビーム走査検鏡装置。

【請求項 8】

前記検鏡装置が前記物体平面 (1 1) と光学的に共役する平面に配置される共焦点孔 (3 4) を備え、前記少なくとも 1 つの光源と前記顕微鏡対物レンズとの間に配置されて前記光学ビーム (2) をコリメートして、コリメート光学ビームを形成する手段を備え、前記第 1 のミラー (M - X Y 1) 及び前記第 2 のミラー (M - X Y 2) は、前記コリメート光学ビームの前記光路上に直列に配置される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の光学ビーム走査検鏡装置。

40

【請求項 9】

前記検鏡装置が、前記光学ビームの角度変位の関数として、前記試料上の前記光学ビーム (2) の反射、透過、及び/又は散乱により信号を測定し解析するように構成されるラマン分光計、コヒーレント反ストークスラマン分光計、蛍光分光計、フォトルミネッセンス分光計、又はカソードルミネッセンス分光計と組み合わせられる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の光学ビーム走査検鏡装置。

【請求項 10】

50

下記 (a) ~ (e) のステップを有する光学ビーム走査検鏡方法：

- (a) 光源により光学ビーム (2) を発するステップと、
 (b) 前記光源と顕微鏡対物レンズ (1) との間で前記レーザービーム (2) の光路上に直列に配置された第 1 のミラー (M - X Y 1) で、次に、第 2 のミラー (M - X Y 2) で前記レーザービーム (2) を光学的に反射し、
 (c) 第 1 のミラー (M - X Y 1) を第 1 の回転軸 (X) の周りで第 1 の所定の回転角 (R X 1) に従って傾斜させ且つ前記第 1 の回転軸 (X) を横切る第 2 の回転軸 (Y) の周りで第 3 の所定の回転角 (R X 3) に従って傾斜させるステップと、
 (d) 前記第 2 のミラー (M - X Y 2) を前記第 1 の回転軸 (X) の周りを前記第 1 の所定の回転角 (R X 1) の関数で第 2 の所定の回転角 (R X 2) に従って傾斜させ且つ前記第 1 の回転軸 (X) を横切る同じ第 2 の回転軸 (Y) の周りを前記第 3 の所定の回転角 (R X 3) の関数で第 4 の所定の回転角 (R X 4) に従って傾斜させて、長手方向光軸 (1 0) に対する前記光学ビーム (2) の前記軸 (1 2) の傾斜角範囲での前記顕微鏡対物レンズ (1) の瞳の中心 (0) の回りの回動によって前記光学ビーム (2) の前記軸 (1 2) を角度傾斜させるステップと、
 (e) 物体平面 (1 1) における 2 つの空間方向 (X、Y) に従って前記光学ビーム (2) を変位させるように、前記物体平面 (1 1) で前記顕微鏡対物レンズ (1) によって前記光学ビーム (2) を結像するステップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に光学ビーム走査式又は光学ビーム角度変位式の検鏡 (microscopie a balayage de faisceau optique ou a déplacement angulaire de faisceau optique) のための装置及び方法の分野に関する。

【0002】

本発明は、より詳細には、走査レーザービームラマン顕微分光の装置及び方法に関する。

【0003】

本発明は、フォトルミネッセンス、蛍光、又はカソードルミネッセンス検鏡等の他の形態の光学ビーム走査光学検鏡にも適用される。走査光学検鏡のこれらの装置では、光学走査ビームは、例えば、T C S P C (時間相関単一光子計数) 型の蛍光分光計のように、レーザービーム又は発光ダイオード (LED) によって発せられるビームであることができる。

【背景技術】

【0004】

特に、[特許文献 1] (欧州特許第 1 9 8 3 3 3 2 A 号公報) において、分光撮像方法及び試料表面走査調査システムが既知である。この [特許文献 1] には、スキャナとも呼ばれる走査デバイスを備えて、直交方向に従って励起レーザービームの角度変位を介して、固定された試料の表面を調査する分光撮像装置が記載されている。より正確には、この [特許文献 1] には、顕微鏡対物レンズとラマン分光系の注入 - 阻止フィルタとの間に挿入されるように、共焦点顕微鏡の管に配置された走査デバイスが記載されている。走査デバイスは、レーザービームの光路上に直列に配置される 2 つのガルバノミラーを備える。2 つのガルバノミラーは、相互に横断する回転軸を有して、試料の表面上で、直交方向に従ってレーザービームを角度変位させる。2 つのミラーを有する光学系は、一方向で動作して、試料の表面の異なるポイントに位置するように、励起レーザービームを角度変位させる。光の逆戻りにより、2 つのミラーを有するこの光学系は、逆方向で動作して、ラマン後方散乱ビームを収集し、それを検出システム、例えば、ラマン分光系の方向において伝達する。このシステムの利点は、レーザー源及び検出システムが固定されたままであることである。この装置では、ラマン分光系により、約 1 0 分で、約 5 0 × 5 0 個の点という分解能で、試料表面の部分の像を取得することができる。

【0005】

他の特許文献には、ビーム走査検鏡装置が記載されている（例えば〔特許文献2〕（国際公開第2010/069987号公報）〔特許文献3〕（米国特許第2005/128476号明細書）〔特許文献4〕（日本国特許第2001091848号公報）を参照）。

【0006】

試料上の走査ゾーンの寸法は、特に、使用される顕微鏡対物レンズの倍率に依存する。ミラーの回転振幅が同じ場合、顕微鏡対物レンズの倍率の変更により、試料上の走査表面の広がりを変更することができる。

【0007】

使用される顕微鏡対物レンズは、異なるタイプのものであることができる：可視範囲及び/又は紫外線範囲用に構成された長撮像距離（長撮像距離又はLWD）を有する標準。

10

【0008】

しかし、顕微鏡対物レンズの倍率に関係なく、実際には、試料表面上のレーザビームの角度変位によってアクセス可能な表面の広がり明らかに、顕微鏡対物レンズの光学視野未満であることが観測される。本文書では、物体視野は、顕微鏡対物レンズの焦点面における光学視野を意味する。

【0009】

したがって、倍率対物レンズ100X、50X、及び10X等の様々な顕微鏡対物レンズが使用される。各顕微鏡対物レンズは、開口数（又はNA）、焦点距離、フィールド数（又はFN）、及び直径によって定義される。

20

【0010】

光学視野の最大幅は、対物レンズの前面と試料との間の距離に対応する前面距離に従って計算される。

【0011】

実際には、顕微鏡対物レンズの光学視野の最大幅は、以下の公式を適用することによって計算される。

$$\text{視野の幅} = \text{フィールド数} / \text{倍率}$$

【0012】

以下の〔表1〕は、OLYMPUS製のMPLAN N 100X、50X、及び10X型の異なる対物レンズのそれぞれのパラメータの値を示す。

30

【0013】

【表1】

	Olympus MPLAN N 100X	Olympus MPLAN N 50X	Olympus MPLAN N 10X
開口数	0.90	0.75	0.25
焦点距離	1.8mm	3.6mm	18mm
フィールド数	22mm	22mm	22mm
レンズ径	3.24mm	5.4mm	9mm
光学視野の 最大幅	220 μ m	440 μ m	2200 μ m

40

表1:異なる顕微鏡対物レンズの光学特性

【0014】

上記表中に示される光学視野の最大幅は、顕微鏡対物レンズを通して撮像する光学視野の長さに対応する。

【0015】

しかし、実際には、これらの顕微鏡対物レンズのそれぞれ1つを通してのレーザビームの走査又は角度変位によりアクセス可能な視野幅は、実際には明らかに、考慮される対物

50

レンズの視野の最大幅未満である。

【0016】

したがって、有効にアクセス可能なOlympus MPLAN N 50X対物レンズの場合、Duoscanと呼ばれる2軸レーザ走査検鏡装置の視野幅が、約 $\pm 27 \mu\text{m}$ であり、一方、この対物レンズの光学視野の最大幅が $440 \mu\text{m}$ であることが実験で測定されている。同様に、Olympus MPLAN N 10X対物レンズの場合、Duoscanのレーザ走査視野は約 $200 \mu\text{m}$ であり、一方、この対物レンズの光学視野の最大幅は $2200 \mu\text{m}$ である。

【0017】

レーザ走査によってアクセス可能な視野幅へのこの制限は、光学構成要素のアパーチャ上のレーザビームのピネットに起因する。この影響を制限するために、レーザビームの直径を低減する必要があり、この低減は空間分解能(ラムダ/NA)を低減する有害な影響を有し、その理由は、顕微鏡対物レンズの有効開口数が瞳を部分的に覆うことによって低減するためである。

10

【0018】

試料上のレーザ走査ビームの空間調査ゾーンを拡大するために、様々な解決策が提案されている。第1の解決策の本質は、倍率を低減するように顕微鏡対物レンズを変更することにある。倍率を変更することの欠点は、測定の空間分解能が対物レンズの倍率に比例することである。別の解決策の本質は、レーザビームの軸の角度傾斜による走査と、顕微鏡対物レンズに対する試料の相対変位とを組み合わせることにある。

20

【0019】

しかし、顕微鏡対物レンズの変更又は試料ホルダの変位は、時間がかかる。さらに、これらの動作は、検鏡装置によって撮像される視野の不連続変更を誘導する。一連の連続した像が一般に得られ、これらの一連の連続した像は、良好な空間分解能で広いゾーンでの試料の完全な像を形成するための再結合が難しい。

【0020】

別の制限は、走査によって得られるラマン分光法の測定の品質である。実際に、走査ラマン顕微分光法の測定の品質が、さらに同一の測定取得パラメータで、走査なしで行われる測定の品質未満であることが観測される。

さらに、カメラの像上で、試料上の走査ビームの位置を直接見ることは可能ではない。したがって、例えば、バイオチップ測定用途において、レーザビームのロケーションを制御することが難しい。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0021】

【特許文献1】欧州特許第1983332A号公報

【特許文献2】国際公開第2010/069987号公報

【特許文献3】米国特許第2005/128476号明細書

【特許文献4】日本国特許第2001091848号公報

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

本発明の目的の1つは、走査検鏡装置において光学ビーム走査によってアクセス可能な視野の幅を増大して、この検鏡装置の光学視野の最大幅に近づくことである。

【0023】

本発明の目的の1つは、測定の空間分解能又は測定の品質を変更せずに、測定視野の空間的広がりを増大させることである。

【0024】

本発明の別の目的は、測定の取得時間をなお短縮しながら、走査ラマン顕微分光法の測定品質を改善することである。

50

【 0 0 2 5 】

本発明の別の目的は、入射レーザービーム及びラマン散乱ビームの強度損失を制限することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 6 】

従来技術の上記欠点を解消するために、本発明は、光学ビーム走査検鏡装置であって、光学ビームを発するように構成される少なくとも1つの光源と、入射瞳を有する顕微鏡対物レンズであって、顕微鏡対物レンズは、検鏡装置の長手方向光軸に従って配置され、瞳は、長手方向光軸上に中心を有し、顕微鏡対物レンズは、長手方向光軸を横断する物体平面において上記光学ビームを結像するように構成される、顕微鏡対物レンズと、物体平面における少なくとも1つの空間方向(X, Y)に従って光学ビームを角度変位させる手段とを備える、光学ビーム走査検鏡装置を提案する。

10

【 0 0 2 7 】

より詳細には、本発明によると、上記光学ビームを角度変位させる手段が、

- レーザ源と顕微鏡対物レンズとの間でレーザービームの光路上に直列に配置される第1の反射光学手段及び第2の反射光学手段と、

- 第1の所定の回転角に従って、上記第1の反射光学手段を傾斜させるように構成される第1の角度傾斜手段と、

- 顕微鏡対物レンズの瞳の中心の回りを旋回することにより、光学ビームの軸を角度傾斜させるように、上記第1の回転角の関数として、第2の所定の回転角に従って上記第2の反射光学手段を傾斜させるように構成される第2の角度傾斜手段であって、上記光学ビームは、物体平面における上記少なくとも1つ方向に従って光学ビームを変位させるように、長手方向光軸に対する光学ビームの軸の傾斜角範囲にわたり、顕微鏡対物レンズの瞳の中心にセンタリングされたままである、第2の角度傾斜手段とを備える光学ビーム走査検鏡装置が提案される。

20

【 0 0 2 8 】

本発明は、有利なことには、光学ビーム走査検鏡装置において顕微鏡対物レンズの焦点面での光学ビームの変位の振幅を増大できるようにする。

【 0 0 2 9 】

特定の実施形態では、上記光学ビームを角度変位させる手段は、

- レーザ源と顕微鏡対物レンズとの間でレーザービームの光路上に直列に配置される第3の反射光学手段及び第4の反射光学手段と、

- 第3の所定の回転角に従って、上記第3の反射光学手段を傾斜させるように構成される第3の角度傾斜手段と、

- 顕微鏡対物レンズの瞳の中心の回りを旋回することにより、光学ビームの軸を角度傾斜させるように、上記第3の回転角の関数として、第4の所定の回転角に従って上記第4の反射光学手段を傾斜させるように構成される第4の角度傾斜手段であって、上記光学ビームは、物体平面における別の方向に従って光学ビームを変位させるように、長手方向光軸に対する光学ビームの軸の傾斜角範囲にわたり、顕微鏡対物レンズの瞳の中心にセンタリングされたままである、第4の角度傾斜手段とを更に備える。

30

40

【 0 0 3 0 】

本発明による光学ビーム走査検鏡装置の他の非限定的で有利な特徴は、以下である。

- 第1の反射光学手段及び第3の反射光学手段は、同じ第1のミラーによって形成され、

- 第2の反射光学手段及び第4の反射光学手段は、同じ第2のミラーによって形成され、

- 第1のミラーは、例えば、圧電式又はボイスコイル式の2つの回転軸を有するアクチュエータに搭載され、及び/又は第2の平面鏡は、例えば、圧電式又はボイスコイル式の2つの回転軸を有するアクチュエータに搭載され、

50

- 第1の反射光学手段は、第1のミラーから形成され、第2の反射光学手段は、第2のミラーから形成され、

- 第3の反射光学手段は、第3のミラーから形成され、第4の反射光学手段は、第4のミラーから形成され、

- 第1のミラーは、例えば、ガルバノ式の1つの回転軸を有するアクチュエータに搭載され、第2のミラーは、1つの回転軸を有するアクチュエータに搭載され、第3のミラーは、1つの回転軸を有するアクチュエータに搭載され、及び/又は第4のミラーは、1つの回転軸を有するアクチュエータに搭載され、

- 第1のミラーのアクチュエータは、位置信号を供給する位置センサを備え、第2のミラーのアクチュエータは位置センサを備え、本装置は、第1のミラーのアクチュエータの位置信号の関数として、第2のミラーのアクチュエータの制御信号を駆動するように構成される位相ロックループシステムを備え、及び/又は第3のミラーのアクチュエータは、別の位置信号を供給する別の位置センサを備え、第4のミラーのアクチュエータは、別の位置センサを備え、本装置は、第3のミラーのアクチュエータの位置信号の関数として、第4のミラーのアクチュエータの制御信号を駆動するように構成される位相ロックループシステムを備え、

- 第2の回転角は、第1の回転角、第1の反射光学手段と第2の反射光学手段との間の距離B、及び第2の反射光学手段と顕微鏡対物レンズの入射瞳の中心との間の距離Aの関数であり、

- 本検鏡装置は、異なる倍率を有する複数の顕微鏡対物レンズを備え、

- 上記少なくとも1つの光源は、レーザ源式及び/又は発光ダイオード式の1つ又は幾つかのソースを含む。

【0031】

本発明による光学ビーム走査検鏡装置の特定の実施形態では、本装置は、

- 上記少なくとも1つの光源と顕微鏡対物レンズとの間に配置されるビーム拡大器であって、固定及び/又は可変倍率を有する、ビーム拡大器と、

- 顕微鏡対物レンズの物体平面の像を形成し、及び/又は光学ビーム走査を用いて走査される試料のゾーンを表示するように構成されるビューカメラと、

- 物体平面において試料を照明するように構成される白色光源と、

- 物体平面と光学的に共役する平面に配置される共焦点孔及び、少なくとも1つの光源と顕微鏡対物レンズとの間に配置されて光学ビームをコリメートして、コリメート光学ビームを形成する手段と

を更に備え、第1の反射光学手段及び第2の反射光学手段は、コリメート光学ビームの光路上に直列に配置される。

【0032】

特定の有利な実施形態では、本光学ビーム走査検鏡装置は、レーザビームの角度変位中、試料上のレーザビームの反射、透過、及び/又は散乱により信号を測定し解析するように構成されるラマン分光計、コヒーレント反ストークスラマン分光計(CARS)、蛍光分光計、フォトルミネッセンス分光計、又はカソードルミネッセンス分光計と組み合わせられる。

【0033】

本発明は、以下のステップを含む光学ビーム走査検鏡方法も提案する：

- 少なくとも1つの光源により光学ビームを発するステップ、

- 上記光学ビームを第1の反射光学手段で光学的に反射し、次に、第2の反射光学手段で光学的に反射するステップであって、第1の反射光学手段及び第2の反射光学手段は、上記少なくとも1つの光源と顕微鏡対物レンズとの間で光学ビームの光路上に直列に配置される、光学的に反射するステップ、

- 第1の所定の回転角に従って、上記第1の反射光学手段を傾斜させるステップ、

- 長手方向光軸に対する光学ビームの軸の傾斜角範囲にわたり、顕微鏡対物レンズの瞳の中心の回りを回転することにより、光学ビームの軸を角度傾斜させるように、第1の回

10

20

30

40

50

転角の関数として、第2の所定の回転角に従って上記第2の反射光学手段を傾斜させるステップ、並びに

- 物体平面における少なくとも1つの空間方向に従って上記光学ビームを変位させるように、上記顕微鏡対物レンズにより、物体平面において上記光学ビームを結像するステップ。

【0034】

したがって、本発明の方法では、顕微鏡対物レンズの光軸に対する光学ビームの傾斜に関係なく、顕微鏡対物レンズの瞳の中心での光学走査ビームの位置を制御することができる。

【0035】

特定の実施形態では、本光学ビーム走査検鏡方法は、以下のステップを更に含む：

- 上記光学ビームを第3の反射光学手段に光学的で反射し、次に、第4の反射光学手段で光学的に反射するステップであって、第3の反射光学手段及び第4の反射光学手段は、上記少なくとも1つの光源と上記顕微鏡対物レンズとの間で光学ビームの光路上に直列に配置される、光学的に反射するステップ、

- 第3の所定の回転角に従って、上記第3の反射光学手段を傾斜させるステップ、

- 長手方向光軸に対する光学ビームの軸の傾斜角範囲にわたり、顕微鏡対物レンズの瞳の中心の回りを旋回することにより、光学ビームの軸を角度傾斜させるように、第3の回転角の関数として、第4の所定の回転角に従って上記第4の反射光学手段を傾斜させるステップ、並びに

- 物体平面における少なくとも1つの別の空間方向に従って上記光学ビームを変位させるように、上記顕微鏡対物レンズにより、物体平面において上記光学ビームを結像するステップ。

【0036】

本発明は、試料の表面を走査して、試料の像を形成するように、レーザービーム角度変位検鏡法、例えば、ラマン顕微分光法、フォトルミネッセンス、CARS（コヒーレント反ストークスラマン散乱）型のラマン顕微分光法、マイクロCARS、ラマンプローブ、又は2光子顕微分光法を介する撮像において特に有利に適用される。

【0037】

本発明は、光学ビーム、例えばレーザービームの変位が離散ステップで実行されて、レーザービームを表面の所定の点に向ける検鏡法、例えば、バイオチップを解析する用途にも特に有利に適用される。ステップでの不連続レーザービーム走査は、同じ表面上で100µm毎に、試料、例えば生物学的試料（バイオチップ）をプローブし、次に、測定及び単発解析（例えば、ラマン分光法）を行えるようにするか、又は極微試料の局所走査を介して測定を行えるようにする。これらの用途では、本発明は、バイオチップを変位させずに、レーザービームの変位ステップでの精度がより高い状態で、より大きな視野を調査し、ひいては、多数の極微試料をプローブできるようにする。

【0038】

本発明は、光学ビームの連続走査を用いる検鏡法での使用にもある。

【0039】

特定の有利な実施形態では、光学ビームの連続走査は、CCD型の検出器と同期されて、例えば、走査試料の表面の像を素早く形成するように、走査線の記録を電子メモリに素早く転送する。

【0040】

マクロスロットと呼ばれる別の実施形態では、光学ビームの連続走査は、解析される試料の所定のゾーンにわたる測定を平均し、可能であれば、特定の信号が検出される試料のゾーンをより精密に解析するように、例えば、光電子増倍管（PMT）型の検出器で検出される信号の統合と組み合わせられる。

【0041】

本発明の光学ビーム走査検鏡のシステム及び方法は、線、正方形、円等に従った試料上

10

20

30

40

50

の全ての形態の走査と互換性を有する。

【0042】

本発明は、以下の説明に現れるものであり、独立して又は任意の技術的に許容される組合せで考慮されなければならない特徴にも関連する。

【0043】

非限定的な例として与えられるこの説明は、添付される図面を参照して、本発明をいかに実行することができるかのよりよい理解を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】と

【図2】従来技術により、レーザービームを走査して、試料上のレーザービームの位置を変位させるか、又は試料を走査することの原理を図で示す。

【図3】と

【図4】従来技術により、2つの走査軸を有するレーザービーム走査検鏡装置でのレーザー走査ビームのビネット現象を示す。

【図5】本発明による走査検鏡装置の対物レンズ上にレーザービームを走査することを図で示す。

【図6】本発明の第1の実施形態によるレーザービーム走査系を示す。

【図7】本発明の第2の実施形態による、2つの走査軸を有するデバイスを備えるラマン顕微分光装置を図で示す。

【図8】本発明の第2の実施形態によるミラーの代替の構成を示す。

【図9】図8のミラーを有するシステムの2つの走査軸を有する系での光線のプロット図を示す。

【図10】～

【図15】本発明の第2の実施形態による、2つのレーザービーム走査軸を有する系でのミラーの様々な代替の構成を示す。

【図16】～

【図18】本発明の第3の実施形態による、2つの走査軸に従ったレーザービーム走査系を示す。

【図19】～

【図22】本発明のレーザー走査検鏡装置を用いて得られる様々な測定値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0045】

【図1】及び【図2】は、レーザービームを走査して、試料上のレーザービームの位置を変位させるか、又は試料を走査することの原理を図で示す。

【0046】

顕微鏡対物レンズ1は、検鏡装置の光軸10上に配置される。試料4は、顕微鏡対物レンズ1から距離Dのところにある試料ホルダ3上に配置される。レーザー源はコリメートレーザービーム2を発する。平面鏡(図示せず)は、顕微鏡対物レンズ1の方向にレーザービームを反射する。顕微鏡対物レンズ1は、レーザービームを顕微鏡対物レンズ1の焦点面11においてレーザービームを結像する。

【0047】

本書での慣例により、顕微鏡対物レンズ1の光軸10は、直交系XYZにおいて軸Zに平行し、顕微鏡対物レンズ1の焦点面11はXY平面にある。

【0048】

レーザービームの軸は、ビームの伝搬の長手方向光軸であるものとして定義される。ガウス空間分布のレーザービームの場合、レーザービームの軸12は、レーザービームの中心に配置される。

【0049】

【図1】では、レーザービーム2の軸12は、顕微鏡対物レンズ1の軸10と平行し、軸

10

20

30

40

50

10でセンタリングされる。レーザービームは、顕微鏡対物レンズの焦点X0で結像される。

【0050】

[図2]では、レーザービーム2の軸12は、例えば、レーザービーム2の経路上に配置される平面鏡によって角度傾斜され、このミラーは、レーザービームが焦点面11の第2の点X1で結像するように、回転移動可能である。レーザービームの走査中、レーザー源(図示せず)及び顕微鏡対物レンズは、一般に固定され、ミラーのみが回転移動可能である。ミラーの回転軸は、例えば、Y軸に平行し、一般に、ミラーの反射面に近い。ミラーが回転すると、レーザービーム2は角度変位する。したがって、顕微鏡対物レンズ1の光軸10に相對したレーザービーム2のこの角度変位により、点X0とX1との間の試料4の表面を連続して又は段階的に走査することが可能になる。しかし、ミラーの回転に起因するこの角度変位は、顕微鏡対物レンズ1の瞳の中心Oに相對するレーザービームの軸12の偏心を生み出す。

10

【0051】

レーザービーム2の傾斜角が第1の閾値よりも大きい場合、ビネット現象が観測され、レーザービームの部分が、顕微鏡対物レンズの瞳の縁部によって遮断される。ビネット現象は、傾斜角が第2の閾値である、レーザービームの完全な遮断まで、レーザービームの傾斜角に伴って増大する。レーザービームの部分又は完全遮断閾値は、対物レンズの瞳のアーチャ及びレーザービームの広がり依存する。ビームの部分遮断が観測され、この部分遮断は励起レーザービームの強度を徐々に低減し、光の逆戻りにより、ラマンビームの強度が検出される。したがって、ビネット現象が、試料上のビームの角度変位によりアクセス可能なゾーンを制限することが観測される。

20

【0052】

1つの軸を有する走査系でビネットを抑えるために、1つの可能性は、励起レーザービームの直径を低減することである。しかし、レーザービームの直径の低減は、焦点でのビームの直径の増大を生み出し、これは、ビーム走査検鏡装置の空間分解能の低減を生じさせる。

【0053】

[図1]及び[図2]に示される等の1つの走査軸を有するシステムでは、ビネット効果は、回転移動可能なミラーを顕微鏡対物レンズ1のより近くにすることにより、低減することができる。

30

【0054】

しかし、ビーム走査検鏡装置は一般に、1つの走査軸に限定されない。

【0055】

したがって、大半のビーム走査検鏡装置は、2つの直交回転軸の回りでのビームの傾斜を組み合わせ、横断方向に従って試料表面にわたりビームを角度変位させる。

【0056】

[図3]及び[図4]は、2つの軸を有するビーム走査の原理及びその制限の解析を示すために、2つの軸を有する走査系を備える検鏡装置を側面図として図で示す。[図1]及び[図2]と同じ参照符号が、[図1]及び[図2]と同じ要素を示す。走査系は、レーザービーム2の光路上に直列に配置される第1の平面鏡M-X及び第2の平面鏡M-Yを備える。第1のミラーM-Xは、例えばガルバノモータ15が設けられ、焦点面11でのX軸に従ってレーザービーム2の角度変位を誘導するように、例えばY軸に平行する、第1の軸の回りを回転移動可能である。第2のミラーM-Yは、ガルバノモータ16が設けられ、焦点面11でのY軸に従ってレーザービーム2の角度変位を誘導するように、例えばX軸に平行する、第2の軸の回りを回転移動可能である。モータ15及び16は、所定の回転を実行し、試料の表面上で定義された形状を有する経路を実行するように、制御される。

40

【0057】

ラマン検鏡法では、レーザー走査ビームは、試料によるラマン放射を誘導する励起ビーム

50

でもある。後方散乱構成では、ラマン散乱ビームは、入射励起ビームの方向において収集され、この放射 - 受け取り方向は固定される。ラマンビームは一般に、阻止フィルタ、ノッチフィルタ、エッジフィルタ、又はボリュームブラッグ格子（若しくはVBG）型のフィルタにより、ラマン散乱ビームから分離される。レイリー散乱に相対してラマン信号の強度が非常に低いいため、ラマン散乱では優れた信号対雑音比が必要になることが分かっている。したがって、十分な照明強度を有するビームを用いて試料を照明し、ラマン散乱ビームの最大部分を収集することが必須である。

【0058】

しかし、ラマン散乱顕微分光法での信号対雑音比は限られているように見え、これは、完全な像を得るための取得時間を増大させる。加えて、試料上の対象野も、顕微鏡対物レンズの公称野よりもはるかに狭い視野に制限される。

10

【0059】

本発明の枠組みの中では、信号対雑音比及び走査野の制限は、以下のように解析される。

【0060】

[図3]及び[図4]に示されるように、第1のミラーM-X及び第2のミラーM-Yは、レーザ源（[図示せず]）と顕微鏡対物レンズ1との間で、レーザビーム2の光路上に直列に配置される。ここで、顕微鏡対物レンズの軸は、顕微鏡の光軸10と混同される。静止時、すなわち、ゼロ傾斜角であるとき、第1のミラーM-X及び第2のミラーM-Yは、レーザビームの軸12が顕微鏡対物レンズ1の光軸10と混同されるように、すなわち、レーザビームの光軸が、顕微鏡対物レンズ1の光軸10でセンタリングされ、光軸10と平行するように配置されると考えられる。

20

【0061】

試料上のレーザビームを、光軸10と顕微鏡対物レンズ1の焦点面11との交点に配置される点X0から、X軸に沿った点X2に変位させることが求められる。レーザビーム2を変位させるために、ガルバノモータ15は、Y軸の回りの第1のミラーM-Xの角度傾斜DELTA-Xを誘導するように制御される。ソースからの入射ビームは、動かないままである。ミラーM-Xの表面で反射されたビームは、Y軸回りで $2 \times \text{DELTA-X}$ に等しい角度だけの回転を受ける。したがって、第1のミラーM-Xによって反射したビームは、第2のミラーM-Yの表面上で変位される。第2のミラーM-Yは再び、顕微鏡対物レンズ1の方向でレーザビームを反射する。第2のミラーM-Yによって反射したビームは、顕微鏡対物レンズ1の瞳上で角度的及び側方に変位される。顕微鏡対物レンズ1への入射レーザビームの軸は、顕微鏡対物レンズ1の光軸10に相対して $2 \times \text{DELTA-X}$ に等しい角度だけ、傾斜する。したがって、顕微鏡対物レンズ1は、顕微鏡対物レンズ1の焦点面と、対物レンズの瞳の中心Oが通り、対物レンズ上の入射コリメートレーザビームの軸12に平行する直線22との交点には位置される点X2において、レーザビームを結像する。

30

【0062】

同様に、X軸に平行する軸の回りの回転軸RYによる第2のミラーM-Yの回転は、 $2 \times \text{DELTA-Y}$ に等しいレーザビームの角度変位を生じさせる。したがって、第2のミラーM-Yの回転は、対物レンズ1の瞳上のレーザビームの角度変位と、方向Yにおいて結像されるビームの変位とを生じさせる。

40

【0063】

しかし、傾斜角DELTA-Xが閾値よりも大きい場合、[図3]において、対物レンズの瞳の外にあるレーザビームの光線13が、点X2で結像されないことが観測される。したがって、試料上の入射レーザビームの強度は低減する。ピネット現象は、視野の縁部で測定される点で、信号対雑音比の低下を説明することができ、これは、特定の閾値よりも大きな傾斜角に対応する。第1のミラーM-Xの傾斜角が別の閾値よりも大きい場合、レーザビームは、顕微鏡対物レンズの瞳によって完全に遮断される。

【0064】

50

類似する制限が、顕微鏡対物レンズ 1 上の第 2 のミラー M - Y によるレーザービームの角度 Δ - Y による傾斜から生じる。

【 0 0 6 5 】

したがって、単軸走査系と同様に、2 つの軸を有する走査系も、顕微鏡対物レンズの瞳上の第 1 の軸及び / 又は第 2 の軸の角度変位に起因するビネット現象により制限されるおそれがある。

【 0 0 6 6 】

他方、[図 4] は、2 つの走査軸を有する系でのレーザービームの別のビネット効果を示す。[図 4] は、第 1 のミラー M - X 及び第 1 のガルバノモータ 1 5 により、角度 Δ - X だけ傾いたレーザービームを示す。第 2 のミラー M - Y の表面上のレーザービームの変位は、レーザービームの光線 1 4 が第 2 のミラー M - Y の瞳の外に配置されるようなものである。したがって、第 2 のミラー M - Y は、顕微鏡対物レンズの方向において光線 1 4 を反射することができない。したがって、この光線 1 4 は、試料上の点 X 3 で結像しない。[図 4] のレーザービームの傾斜を外挿することにより、レーザービームが、傾斜角 Δ - X が傾斜角の第 2 の閾値よりも大きい場合、第 2 のミラー M - Y の瞳によって完全に遮断されることが観測される。

【 0 0 6 7 】

したがって、第 2 のミラー M - Y の寸法により、2 つの軸を有する走査系も、第 2 のミラー M - Y の瞳に相対するビームの角度変位に起因したビネット現象により制限されるおそれがある。

【 0 0 6 8 】

同様に、励起レーザービームに相対する第 1 のミラー M - X の角度傾斜も、レーザービームの直径が第 1 のミラー M - X の瞳の見かけの直径よりも大きい場合、ビネット現象を生じさせるおそれがある。

【 0 0 6 9 】

したがって、この解析の結果は、2 軸による走査検鏡装置では、X 軸及び / 又は Y 軸それぞれに沿った焦点面でのレーザービームの変位が、第 1 のミラー M - X の瞳、第 2 のミラー M - Y の瞳、及び / 又は顕微鏡対物レンズの瞳に起因したビネット効果により制限されることである。

【 0 0 7 0 】

より一般には、検鏡装置での走査によるレーザービームの変位は、レーザービームの光路上に直列に配置される異なる光学構成要素で形成される光学系に起因するビネット現象により、横視野及び強度において制限される。これらのビネット現象は、特に走査ミラー M - X、M - Y、及び / 又は顕微鏡対物レンズ 1 に起因するものと見られる。

【 0 0 7 1 】

しかし、2 つの走査軸を有する系では、レーザービームの光路上に直列に配置される 2 つの反射ミラー M - X、M - Y の負担は、ビネット効果が大きいままである限りは、第 1 のミラーと顕微鏡対物レンズとの間の距離を効果的に低減することができない。

【 0 0 7 2 】

2 つのビーム走査軸を有するラマン検鏡装置の使用中的な主な問題が、[図 3] 及び [図 4] に関連して示されるように、顕微鏡対物レンズ 1 の入射口にある瞳に伴うものであることは、この解析に由来する。顕微鏡対物レンズの瞳上に届くビームの部分 1 3 は、対物レンズのアーチャを通過せず、その理由は、ビームのこの部分 1 3 が瞳の物理的制限を超えて変位される（[図 3]）ためである。したがって、励起レーザービームの部分は失われる。ラマン後方散乱を測定する構成では、光の逆戻りの適用を介して、後方散乱ビームの部分も、顕微鏡対物レンズの瞳によって遮断される。励起レーザービーム及びラマン散乱ビームの強度低減は、検出されるラマン散乱信号の強度の低減を誘導する。さらに、第 1 のミラー M - X によって反射されたビームの別の部分 1 4 は、第 2 のミラーの瞳外にそれ、顕微鏡対物レンズの方向には反射されない。同様に、ラマン後方散乱ビームの部分は、第 2 のミラー M - Y の縁部によって遮断される。励起レーザービーム 1 4 及び対応する後方

10

20

30

40

50

散乱ビームのこの他の部分も、検出されるラマン散乱信号の低減を誘導する。さらに、試料の方向に反射されないビーム 1 3 及び 1 4 は、他の表面で反射されるおそれがあり、したがって、寄生ビームの原因となるおそれがあり、寄生ビームも、検出されるラマン散乱信号の信号対雑音比の低減の一因となる。

【 0 0 7 3 】

本発明の枠組みの中で提案される解決策の原理について、[図 5] に関連してこれより説明するものとする。この図では、レーザビームの角度傾斜は、顕微鏡対物レンズ 1 の入射瞳の中心 O の回りでレーザビームの軸を旋回することによって実行される。したがって、レーザビームは、ビームの走査中、顕微鏡対物レンズの瞳上にセンタリングされたままである。この角度傾斜は、ピネット現象を低減して、入射レーザビームの強度損失を制限し、ビーム走査によってアクセス可能な視野ゾーンを増大できるようにする。

10

【 0 0 7 4 】

この変位は、各走査軸に 2 つのミラーを実装することによって得られ、2 つのミラーは、光学ビーム 2 の光路上に直列に配置される。例えば、第 1 のミラー M - X 1 は、焦点面において X 軸を辿る走査を誘導するように角度傾斜され、第 2 のミラー M - X 2 は、顕微鏡対物レンズ 1 の瞳上のビームを再センタリングするように、同じ走査軸 X に従って角度傾斜される。

【 0 0 7 5 】

顕微鏡対物レンズの光軸 1 0 に相対するビームの軸 1 2 の傾斜角 θ での、試料上の焦点面でのビームの変位 X は、以下の式により計算される。

20

$$X = f \cdot \tan(\theta) \quad (I)$$

【 0 0 7 6 】

以下の [表 2] 中、ビームの変位 X は、異なる顕微鏡対物レンズの傾斜角の関数として、その式から推測される。

【 0 0 7 7 】

【表 2】

θ (度)	100X	50X	10X
1	31 μ m	62 μ m	314 μ m
1.5	47 μ m	94 μ m	471 μ m
2	63 μ m	125 μ m	628 μ m
2.5	78 μ m	157 μ m	785 μ m
3	94 μ m	189 μ m	943 μ m

30

表 2:対物レンズ上のビームの傾斜角の関数としての変位

【 0 0 7 8 】

[表 2] は、1 0 X の対物レンズの場合、最大光学視野幅 2 . 2 m m を示し、この視野幅は、ビーム X の視野の半分の幅又は 1 . 1 m m の側方変位に対応する。表 2 中、この 1 0 X の対物レンズの軸上でセンタリングされたビームの軸の 3 度の傾斜角 θ が、 $2 \times 9 4 3 \mu m$ 、すなわち、 $1 8 8 6 \mu m$ の視野幅をカバーすること、すなわち、実際に光学視野幅の限界に達することを可能にすることが観測される。しかし、3 度というビーム軸の傾斜角は、ミラーでの反射と、1 . 5 度の角度だけのこのミラーの回転とにより、得ることができる。

40

【 0 0 7 9 】

[図 6] ~ [図 1 8] は、なお顕微鏡対物レンズの入射瞳の中心 O へのレーザビームのセンタリングを維持しながら、顕微鏡対物レンズの入射瞳の中心 O 回りのレーザビームの旋回により、1 つ又は 2 つの軸を辿る走査ビームを取得できるようにする異なる実施形態を示す。

【 0 0 8 0 】

[図 6] は、本発明の第 1 の実施形態による、1 つの走査レーザビーム軸を有するシス

50

テムを示す。走査系は、第1の平面鏡M - X 1及び第2の平面鏡M - X 2を備える。第1のミラーM - X 1及び第2のミラーM - X 2は、例えば、共焦点顕微鏡の共焦点管内のレーザービーム源と顕微鏡対物レンズ1との間で、レーザービーム2の光路上に直列に配置される。第1のミラーM - X 1は、例えばY軸に平行する、軸の回りを回転移動可能である。第2のミラーM - X 2は、軸の回りを回転移動可能であり、その軸は、より好ましくは、第1のミラーM - X 1の回転軸に平行し、したがって、Y軸に平行する。有利なことには、第1のモータ21は第1のミラーM - X 1の回転を制御し、第2のモータ22は第2のミラーM - X 2の回転を制御する。モータ21、22は、例えば、ガルバノモータ又はステッピングモータである。好ましくは、制御システム(図示せず)が、第1のミラーM - X 1と第2のミラーM - X 2との組合せられた角度変位を駆動する。

10

【0081】

限定ではなく例示として、[図6]は、第1のミラーM - X 1及び第2のミラーM - X 2の様々な傾斜角を示す。

【0082】

走査系のミラーの第1の向きでは、第1のミラーM - X 1は傾斜角 $R X 1 - 0$ を有し、第2のミラーM - X 2は傾斜角 $R X 2 - 0$ を有する。ミラーのこの第1の向きでは、入射レーザービーム2は、方向120において第1のミラーM - X 1で反射され、次に、方向200において第2のミラーM - X 2で反射される。第1のミラーM - X 1の傾斜角 $R X 1 - 0$ 及び第2のミラーの傾斜角 $R X 2 - 0$ は、方向200におけるレーザービームが、顕微鏡対物レンズ1の光軸10と位置合わせされ、顕微鏡対物レンズ1の入射瞳の中心Oでセンタリングされるようなものである。この第1の構成では、顕微鏡対物レンズは、レーザービームを焦点 $X 0 - 0$ で結像する。逆戻りを介して、点 $X 0 0$ によって後方散乱したビームは、軸200に沿って伝搬し、第2のミラーM - X 2によって反射され、次に、入射レーザービーム2の方向において第1のミラーM - X 1によって反射される。

20

【0083】

[図6]に示されるミラーの第2の向きでは、第1のミラーM - X 1は傾斜角 $R X 1 - 1$ を有し、第2のミラーM - X 2は傾斜角 $R X 2 - 1$ を有する。ミラーのこの第2の向きでは、軸12の入射レーザービームは、方向121において第1のミラーM - X 1で反射され、次に、方向211において第2のミラーM - X 2で反射される。第1のミラーM - X 1の傾斜角 $R X 1 - 1$ 及び第2のミラーの傾斜角 $R X 2 - 1$ は、方向211におけるレーザービームが、なお顕微鏡対物レンズ1の入射瞳の中心Oにセンタリングされたままでありながら、顕微鏡対物レンズ1の光軸に対して傾斜するようなものである。有利なことには、第1のミラーM - X 1はビームの軸の傾斜を生じさせ、第2のミラーM - X 2は、ビーム211の傾斜軸を対物レンズの瞳の中心に再センタリングする。この第2の構成では、顕微鏡対物レンズ1は、レーザービームを点 $X 1 1$ で結像する。したがって、試料上の点 $X 0 0$ から点 $X 1 1$ へのビームの軸の角度変位が得られる。逆戻りを介して、方向211において伝搬する点 $X 1 1$ によって後方散乱したビームは続けて、方向121においてミラーM - X 2によって反射され、次に、入射ビーム2の方向においてミラーM - X 1によって反射される。

30

【0084】

同様に、[図6]に示されるミラーの第3の構成では、第1のミラーM - X 1は傾斜角 $R X 1 - 2$ を有し、第2のミラーM - X 2は傾斜角 $R X 2 - 2$ を有する。ミラーのこの第3の向きでは、入射レーザービーム2は、方向122において第1のミラーM - X 1で反射され、次に、方向222において第2のミラーM - X 2で反射される。第1のミラーM - X 1の傾斜角 $R X 1 - 2$ 及び第2のミラーの傾斜角 $R X 2 - 2$ は、方向222におけるレーザービームが、なお顕微鏡対物レンズ1の入射瞳の中心Oにセンタリングされたままでありながら、顕微鏡対物レンズ1の光軸に対して傾斜するようなものである。したがって、第1のミラーM - X 1はビームの軸の傾斜を生じさせ、第2のミラーM - X 2は、ビーム222の傾斜軸を対物レンズの瞳の中心に再センタリングする。この第3の構成では、顕微鏡対物レンズ1は、レーザービームを点 $X 2 2$ で結像する。したがって、試料上の点 $X 2$

40

50

2 へのビームの軸の角度変位が得られる。逆戻りを介して、方向 2 2 2 において伝搬する点 X 2 2 によって後方散乱したビームは続けて、方向 1 2 2 においてミラー M - X 2 によって反射され、次に、入射ビーム 2 の方向においてミラー M - X 1 によって反射される。

【 0 0 8 5 】

したがって、第 1 のミラー M - X 1 の回転角と第 2 のミラー M - X 2 の回転角との組合せにより、顕微鏡対物レンズの瞳の中心 O でセンタリングされたままであるビームの角度オフセットを得ることが可能になる。

【 0 0 8 6 】

光軸 1 0 に相対するビームの軸 2 1 1 の傾斜角 θ は、第 2 のミラー M - X 2 の回転角 $R X 2$ の 2 倍に等しい。

10

【 0 0 8 7 】

ミラー M - X 1 の傾斜の関数としてのミラー M - X 2 の回転角を計算するために、以下の式が使用される。

$$R X 2 = ((A r c S I N (- B \times S I N (2 \cdot R X 1) / A) - 2 \times R X 1 + \sqrt{4 - (S I N (2 \cdot R X 1) / A)^2}) / 2) / 4 \quad (I I)$$

式中、

$R X 1$ は、ミラー M - X 1 の回転角 (ラジアン単位) を表し、

$R X 2$ は、ミラー M - X 2 の回転角 (ラジアン単位) を表し、

A は、光線の集束距離 (mm 単位) 又は対物レンズ 1 の焦点距離を表し、

B は、ミラー M - X 1 と M - X 2 との間の距離 (mm 単位) を表す。

20

【 0 0 8 8 】

角度 $R X 1$ 、 $R X 2$ が小さい (実際には、数度未満) 特定の場合、2 つのミラーの移動間に線形関係があることが示される。この場合、ミラーの回転の電子制御システムも線形システムであり、したがって単純である。

【 0 0 8 9 】

最後に、B が A に等しい特定の場合、ミラー M - X 1 とミラー M - X 2 との回転角の比率は 2 に等しく、これは傾斜角 θ とは関係がない。

【 0 0 9 0 】

電子システムは、第 1 のミラー M - X 1 の回転角 $R X 1$ 及び第 2 のミラー M - X 2 の回転角 $R X 2$ をまとめて駆動して、顕微鏡対物レンズの軸上で、傾斜したビームの軸のセンタリングを得るように構成することができる。電子システムは、ミラー M - X 1 及び M - X 2 の構成並びに距離 A 及び B に応じて構成される。

30

【 0 0 9 1 】

[表 2] に示されるように、数度に制限される走査レーザービームの軸 1 2 の傾斜角 θ は、最も一般的な対物レンズの光学視野の全てにわたりビームを角度変位させるのに十分である。しかし、上で示されるように、第 2 のミラーの回転軸 $R X 2$ は、ビームの傾斜角の半分に等しい。そして、第 1 のミラーの回転角 $R X 1$ は、絶対値で、回転角 $R X 2$ の 2 倍に等しい (上記の近似式 (I I I) の適用)。したがって、第 1 及び第 2 のミラーの回転角は、数度に制限されて、なお顕微鏡対物レンズの瞳でセンタリングされたままでありながら、顕微鏡対物レンズの光学視野全体をカバーする。しかし、第 1 のミラーの低回転角により、第 2 のミラーの面上でのビームの変位の広さを制限し、ひいてはビネット効果を制限することができる。

40

【 0 0 9 2 】

ミラー M - X 1 及び M - X 2 のサイズが異なり得ることが観測される。好ましくは、第 2 のミラー M - X 2 は、第 1 のミラー M - X 1 よりも大きなサイズを有する。実際に、第 1 のミラー M - X 1 は、固定方向のままである入射レーザービームでセンタリングされ、一方、第 2 のミラー M - X 2 は、第 1 のミラー M - X 1 の回転中、表面上でレーザービームの変位をオフセットする。

【 0 0 9 3 】

ビームの角度変位の軸 (X) について [図 6] に詳細に示される原理は、2 軸 (X Y)

50

による走査系に一般化される。このために、例えば、ビームの光路上に直列して、例えば、軸 Y の回りを回転移動可能であり、第 1 の方向 X に従った変位を生じさせる（[図 6] に詳細に示されるように）2 つのミラーを有する第 1 の光学系と、例えば、軸 X の回りを回転移動可能であり、横断方向 Y に従った変位を生じさせる 2 つのミラーを有する第 2 の同様の光学系とがある。4 つのミラーは、第 1 の 2 つのミラーによるビームの角度変位が、2 つのミラーを有する第 2 の光学系の入射瞳でセンタリングされたままであり、一方、他方、又は両方の横断軸に従って角度変位が、顕微鏡対物レンズの入射瞳の中心 O でセンタリングされたままであるように配置される。

【 0 0 9 4 】

好ましくは、顕微鏡は共焦点型のものであり、ビーム走査系は、有利なことには、共通レーザ検出路上に配置され、より好ましくは、注入 - 阻止フィルタ 1 8 と顕微鏡対物レンズ 1 との間に配置される。

【 0 0 9 5 】

代替的には、有利さがより低い共焦点顕微鏡では、ビーム走査系はレーザ路のみに配置される。

【 0 0 9 6 】

[図 7] は、本発明の第 2 の実施形態による、2 つの走査軸に沿って走査レーザビームデバイスを備える検鏡装置を側面図として示す。レーザビーム走査検鏡装置は、レーザ源 2 0、フィルタホイール 3 0、レーザビームの経路上にミラー 3 2 を有する光学系、ビーム拡大器 3 1、注入 - 阻止フィルタ 1 8 を備える。ソースレーザ 2 は、1 つ又は幾つかの波長を含むレーザビーム 2 を発する。有利なことには、フィルタホイール 3 0 は、励起ビームに特定の波長を選択できるようにする。検鏡装置は、中心 O を有する入射瞳を有する顕微鏡対物レンズ 1 も備える。試料ホルダ 3 は、対物レンズ 1 の焦点面に配置される試料 4 を支持する。有利なことには、検鏡装置は、顕微鏡対物レンズ 1 の焦点面と光学的に共役する平面に配置される集束レンズ 3 3 及び共焦点孔 3 4 を備える。[図 7] の装置は、分光計 3 5 と、検出器 3 6 と、ラマン散乱ビームの経路上にミラー 3 8 を有する別の光学系とを備える。最後に、[図 7] の装置は、光学系 1 9 及びビューカメラ 9 を備える。[図 7] の装置は、特にラマン顕微分光法に適用される。

【 0 0 9 7 】

より詳細には、検鏡装置は、レーザビームの角度変位又は走査用の光学デバイス 2 9 を備える。ビーム走査用のこの光学デバイス 2 9 は、注入 - 阻止フィルタ 1 8 と顕微鏡対物レンズ 1 との間に配置される。

【 0 0 9 8 】

2 つの走査軸 (X , Y) を有するビーム走査用の光学デバイス 2 9 は、レーザビーム 2 の光路上に直列に配置される平面鏡 M - Y 1、平面鏡 M - X 1、平面鏡 M - Y 2、及び平面鏡 M - X 2 を備える。ミラー M - X 1、M - X 2、M - Y 1、及び M - Y 2 はそれぞれ、アクチュエータ 2 1、2 2、2 3、及び 2 4 によって作動する。詳細に上述したように、Y 軸に平行する軸の回りのミラー M - X 1 及び M - X 2 の組み合わせられた回転移動は、Y 軸に平行し、対物レンズの瞳の中心 O を通る軸の回りの回転により、レーザビームの軸を角度変位できるようにする。同様に、X 軸に平行する軸の回りのミラー M - Y 1 及び M - Y 2 の組み合わせられた回転移動は、X 軸に平行し、対物レンズの瞳の中心 O を通る軸の回りの回転により、レーザビームの軸を角度変位できるようにする。したがって、ミラー M - X 1、M - X 2、M - Y 1、及び M - Y 2 を有する光学系は、なお顕微鏡対物レンズの瞳でセンタリングされたままでありながら、レーザビームのビネットなしで、試料のより大きな表面にわたり 1 つ又は 2 つの横断方向に従ってレーザビームを角度変位できるようにする。

【 0 0 9 9 】

[図 7] では、例として、ビーム拡大器 3 1 が使用される。ビーム拡大器は、光学ビームのサイズを拡大させることが可能な光学系である。ビーム拡大器は、例えば、1 よりも大きな倍率を有するアフォーカル光学系から形成される。光学走査 2 9 の上流でソースビ

10

20

30

40

50

ームの光路上に直列に配置される2つのビーム拡大器を使用することもできる。

【0100】

以下の光学系の表記を想起する。

1) 例えば顕微鏡の、対物レンズの開口数(NA)は、以下の式に従ってレンズの直径及び焦点までの距離に依存する。

【数1】

$$NA = n \cdot \sin(\theta) = \frac{nD/2}{\sqrt{f^2 + D^2/4}} \quad (\text{III})$$

10

2) レーザは、顕微鏡対物レンズ1に入るとき、焦点からの距離での一点で結像する。この点のサイズは、3つの要因：レーザービームのサイズ、対物レンズの直径、及び開口数(NA)に依存することができる。

【0101】

レーザービームがレンズの全てのアパーチャをカバーすることができる場合、すなわち、ビームの直径がレンズの直径以上である場合、焦点でのビームのサイズは、レンズの直径及び開口数(NA)のみに依存する。この場合、焦点の最小直径は、

$$(0.51^*) / NA \quad (\text{IV})$$

に等しいものとして、エアリーの公式によって定義される。

20

【0102】

公式(IV)の適用により、レーザービームの直径がレンズの直径以上である場合、レンズの直径が大きいほど、焦点は小さくなる。

【0103】

レーザービームの直径がレンズの直径未満である場合、レーザービームの直径が大きいほど、焦点は小さくなり、限界として公式(IV)がある。レンズの有効径がレーザービームの直径によって定義されると考えることにより、公式(IV)を適用することもできる。

【0104】

ビーム拡大器31の効果は、対物レンズの入射瞳上のレーザービームの直径を拡大することである。対物レンズの焦点面でのビームのサイズは、回折限界の適用によって特定される。したがって、対物レンズの入射瞳上のコリメートレーザービームの直径が大きいほど、焦点面でのビームの直径は小さくなる。したがって、ビーム拡大器を使用すると、共焦点顕微鏡では、検鏡装置の空間分解能及びラマン信号の信号対雑音比の増大が可能になる。実際に、エアリー点が小さいほど、小さな共焦点孔内で結合することができる光は多くなる。したがって、顕微鏡的分解能を有する撮像用途では、撮像をより高速で実行することが可能になる。

30

【0105】

ビーム拡大器の倍率は、レーザービームの $1/e^2$ での直径が、使用される顕微鏡対物レンズの瞳の直径に達するようレーザービームの直径を増大するように選択され、これは、空間分解能と信号対雑音との歩み寄りに対応する。

40

【0106】

有利なことには、異なるタイプのビーム拡大器が使用される：固定倍率を有するビーム拡大器及び可変倍率を有するビーム拡大器。例えば、入射ビーム2の経路上に直列に配置される2つの拡大器、第1のビーム拡大器は、 $\times 2$ に等しい固定倍率を有し、可変倍率を有する第2のビーム拡大器は、 $\times 1 \sim \times 4.5$ の可変倍率を有する。

【0107】

例えば、対物レンズ10Xは直径9mmを有し、対物レンズ50Xは直径5.4mmを有し、対物レンズ100Xは直径3.24mmを有する。

【0108】

可変倍率を有するビーム拡大器は、幾つかの顕微鏡対物レンズを有する検鏡装置内の、

50

使用される顕微鏡対物レンズの瞳の直径に従って、レーザービームの直径を調整できるようにする。

【0109】

有利なことには、可変倍率を有するビーム拡大器は、可視範囲(400nm~700nm)内のアクロマートタイプのものである。好ましくは、可変倍率31を有するビーム拡大器は、電動化される。有利なことには、光路上でビーム拡大器の直後に配置される自己整合ミラーは、可変倍率を有するビーム拡大器のポインティング誤差を補正できるようにする。

【0110】

レーザー源によって発せられるレーザービームの直径は、例えば、Gentec製「Laser Beam Imager」のカメラにより、及びその処理ソフトウェアにより測定することができる。レーザービームの横断寸法は、ビーム拡大器なしで、いわゆる4シグマ法を使用して測定される：X軸に従って1183 μ m及びY軸に従って1261 μ m。

【0111】

次に、可変倍率を有するビーム拡大器の出力におけるレーザービームの直径の測定が、同じ方法を介して行われ、倍率は、製造業者のデータに従って最大(X4.5)に設定される。レーザービームの横断寸法は、ビーム拡大器の出力において測定される：X軸に従って5494 μ m及びY軸に従って5346 μ m。これらの測定値は、平均して4.44倍に対応し、これは、4.5である製造業者によって示される値と一貫する。

【0112】

ビーム拡大器の使用は、共焦点型の検鏡装置で特に容易であり、その場合、ビーム拡大器31は、いかなる他の光学的構成もなく、顕微鏡の共焦点管内に直接挿入することができ、ビーム拡張器は、レーザー経路のみ又は共通のラマンレーザー信号路上に配置される。

【0113】

ビーム拡大器31と、顕微鏡対物レンズの瞳の中心の回りの旋回によるビーム走査系29との組合せは、複合利点の恩恵を受けて、焦点でのレーザービームの空間分解能をなお増大させながら、試料上のビームの角度変位ゾーンの幅を増大できるようにする。したがって、この組合せにより、従来技術による走査レーザービームシステムの2つの主な制限を解決することができる。

【0114】

任意の実施形態による走査レーザービーム検鏡装置は、有利なことには、ラマン顕微分光法での適用において使用される。この用途では、ビームを角度変位させるシステムは、励起レーザービームの光路上、より好ましくは注入-阻止フィルタと顕微鏡対物レンズとの間に配置される。励起ビーム上で、注入-阻止フィルタ18は、顕微鏡対物レンズ1の方向において、ミラーを有する走査系29に入射レーザービーム2を向ける。ミラー、例えば、M-X1、M-Y1、M-X2、M-Y2を有する走査系29は、1つ又は2つの走査軸に従って試料4上のレーザービームを角度変位できるようにする。後方散乱構成では、顕微鏡対物レンズ1は後方散乱ビームを収集し、後方散乱ビームは、入射レーザービームの波長でのレイリー散乱及び波長がオフセットされるラマン散乱ビームを含む。顕微鏡対物レンズ1によって収集されたビームは、ミラー(M-X1、M-Y1、M-X2、M-Y2)を有する走査系29に送られ、次に、注入-阻止フィルタ18に向けられる。構造により、後方散乱ビームは、入射レーザービームの逆光路を辿り、したがって、厳密に入射レーザービームの方向において、ミラーを有する走査系から出射し、この方向は、顕微鏡対物レンズ上の走査ビームの傾斜角に関係なく、固定されたままである。有利なことには、注入-阻止フィルタ18は、レイリー散乱ビームをラマン散乱ビームから空間的に分離する。次に、ミラーを有する光学系38は、ラマン散乱ビームをラマン分光計35に向け、ラマン分光計35は、検出器36の方向においてラマン散乱ビームを空間的に分離して、ラマン後方散乱信号を検出して解析する。

【0115】

このラマン顕微分光装置では、信号対雑音比及び試料上の励起レーザービームの空間分解

10

20

30

40

50

能をなお改善しながら、試料のより大きな表面を解析することが可能である。

【0116】

注入 - 阻止フィルタ18（ノッチ型、エッジ型、ビームスプリッタ、又は落射蛍光フィルタ型）と、共焦点孔34とを備える〔図7〕の装置では、走査ミラーは光路上に配置され、それにより、共焦点顕微鏡の構成に留まることができる。別のビーム拡大器を共焦点路上に総入して、対物レンズの瞳を正確にカバーすることができる。

【0117】

〔図7〕の装置は、集束レンズ19が提供されたカメラ9を更に備える。ビームスプリッタ8、例えばキューブビームスプリッタは、ミラーを有する光学系29と顕微鏡対物レンズ1との間でレーザビームの光路上に配置される。このビームスプリッタ8は、試料及び/又はレーザビームの表面の像を形成するように、試料4での反射及び/又は散乱によって形成されるビーム7をカメラに向けられるようにする。有利なことには、装置は、白色光源（図示せず）も備え、白色光ビームは、白色光で試料4の光学視野を照明するように、顕微鏡の光軸上で、例えばビームスプリッタ8と顕微鏡対物レンズ1との間に挿入される。白色光を用いてのこの照明は、反射及び/又は散乱により、カメラ9を介して試料4のよりよい可視化を可能にする。このようにして、カメラ9は、角度変位中、カメラの光学視野内で試料と、レーザビームの位置とを同時に見られるようにする。有利なことには、カメラの対物レンズの倍率は、レーザビームの角度変位のゾーン全体及び/又は顕微鏡対物レンズの光学視野全体を可視化できるように選択される。代替では、カメラの対物レンズは、フォーカス可変対物レンズである。

【0118】

〔図8〕は、本発明の第2の実施形態の第1の代替による、2つの軸を有する光学ビーム走査系を上面図として示す。この代替では、入射レーザビーム2は、第1のミラーM-X1、第2のミラーM-X2、第3のミラーM-Y1、次に第4のミラーM-Y2によって連続して向けられ反射され、第4のミラーM-Y2によって反射されるビームの軸は、〔図8〕の平面に直交する。〔図9〕は、レイトレーシング図を介して、〔図8〕の2つの走査軸を有する光学系を示す。この構成のミラーは、水平レーザビーム源を使用して、顕微鏡対物レンズ1の軸10に近い軸12を有する走査レーザビームを形成できるようにし、この光軸10は一般に垂直である。この代替の利点は、非常にコンパクトであるとともに、追加の平面反射鏡を追加する必要性を回避することである。

【0119】

〔図10〕及び〔図11〕は、本発明の第2の実施形態による、レーザビームの2つの走査軸を有する系でのミラーの構成の第2の代替をそれぞれ上面図及び側面図として示す。この代替では、入射レーザビーム2は、平面鏡M-X1、平面鏡M-Y1、平面鏡M-X2、及び平面鏡M-Y2によって連続して反射される。第1のミラーM-X1へのレーザビーム2の入射角は、ミラーM-X1の表面への法線に相対して約45度未満、より好ましくは22.5度未満であるように選ばれる。有利なことには、その他のミラーM-Y1、M-X2、及びM-Y2への入射角も、ミラーの見かけの表面を増大するように、可能な限り低くなるように選ばれる。さらに、入射角の制限により、ミラーM-X1、M-Y1、M-X2、及びM-Y2のそれぞれ1つへのレーザビームの見かけの直径又は分散を低減することができる。したがって、この代替では、より広い直径を有する入射レーザビーム2を使用することができ、それにより、特に、走査顕微鏡の空間分解能を改善することができる。閉角を有するこの代替では、ミラーの傾斜に起因して、歪像の影響を低減することができる。実際には、2軸による角度的に対称である45度傾斜ミラー走査は、2軸間で2の平方根としての比率を有する矩形形状を生成する。これは特に、ボイスコイル型のアクチュエータを用いる2つの軸を有するミラーに適用することができる。

【0120】

〔図12〕及び〔図13〕はそれぞれ、本発明の第2の実施形態による、レーザビームの2つの走査軸を有する系でのミラーの構成の第3の代替を上面図及び側面図として示す。この代替では、入射レーザビーム2は、平面鏡M-X1、平面鏡M-Y1、平面鏡M-

X 2、及び平面境 M - Y 2 によって連続して反射され、走査ビームの軸 1 2 は、入射ビーム 2 の方向に全体的に平行する方向に配置される。この代替では、レーザ走査ビームを折り返し、したがって、ビーム走査光学系の妨げを低減することができる。

【 0 1 2 1 】

[図 1 4] 及び [図 1 5] はそれぞれ、本発明の第 2 の実施形態による、2 つの走査レーザビーム軸を有する系でのミラーの構成の第 4 の代替を上面図及び側面図として示す。この代替では、入射レーザビーム 2 は、平面境 M - X 1、平面境 M - Y 1、平面境 M - X 2、平面境 M - Y 2、及び平面反射ミラー 5 によって連続して反射されて、ビームを顕微鏡対物レンズ 1 に向ける。この代替では、走査レーザビームを折り返すことによる空間の節減及びミラーへのビームの入射角の低減の両方が可能であり、それにより、分散を低減し、及び / 又はレーザビームの直径を増大させることができる。

10

【 0 1 2 2 】

[図 1 6] ~ [図 1 8] は、本発明の第 3 の実施形態による、2 つの走査軸によるレーザビーム走査系を示す。[図 1 6] は、第 3 の実施形態の第 1 の代替の上面図であり、[図 1 7] はその側面図である。[図 1 8] は、第 3 の実施形態の第 2 の代替の斜視図を示す。

【 0 1 2 3 】

この実施形態では、第 1 の平面境 M - X Y 1 及び第 2 の平面境 M - X Y 2 が使用される。第 1 のミラー M - X Y 1 は、例えば、圧電式又はボイスコイル (可動コイル又はボイスコイル) 式の 2 つの回転軸を有するアクチュエータ 2 5 に搭載される。したがって、第 1 のアクチュエータ 2 5 は、軸 X 及び / 又は軸 Y の回りの回転を実行できるようにする。好ましくは、X 軸回りの第 1 のアクチュエータ 2 5 の回転軸及び Y 軸回りのこの第 1 のアクチュエータ 2 5 の回転軸は、第 1 のミラー M - X Y 1 の表面の近傍にある点で交差する。同様に、第 2 の平面境 M - X Y 2 は、例えば、圧電式又はボイスコイルの 2 つの回転軸を有するアクチュエータ 2 6 に搭載され、アクチュエータ 2 6 は、軸 X 回り及び / 又は軸 Y 回りの回転を実行できるようにする。好ましくは、X 軸回りの第 2 のアクチュエータ 2 6 の回転軸及び Y 軸回りのこの第 2 のアクチュエータ 2 6 の回転軸は、第 2 のミラー M - X Y 2 の表面の近傍にある別の点で交差する。各軸回りの回転移動は、2 つのミラー M - X Y 1 及び M - X Y 2 で反射されたビームが、顕微鏡対物レンズの瞳の中心 O に位置合わせされた点の周囲を旋回するように、第 1 のアクチュエータと第 2 のアクチュエータとの間で組み合わせられる。この構成では、上述した実施形態でのように 4 つの代わりに、2 つのみのミラーにミラー数を低減することができる。ミラー数の低減により、試料上により多くのレーザ光を運び、より多くのラマン散乱光を収集することができ、したがって、像をより高速で取得することができる。さらに、この第 3 の実施形態では、より大きな直径のミラーを使用することができ、それにより、より大きな振幅及び X、Y、及び / 又は Z でのよりよい空間分解能のレーザビームの角度変位が可能である。最後に、この第 3 の実施形態では、よりよい効率を有するより厚い、例えば誘電ミラーであるミラーを使用することができる。

20

30

【 0 1 2 4 】

比較により、より多くのラマンフローを収集することができ、ビューカメラの視野でピネット現象を生じさせないように、ミラーが小さな直径のものであり、着脱可能に搭載されるデュオスキャンと呼ばれる従来のビーム走査系では、逆に、本発明の系を用いる場合、ミラーは、ラマン信号の収集又はビューカメラの像の視野を制限せず、着脱可能な支持体に搭載される必要はない。したがって、搭載は簡易化される。

40

【 0 1 2 5 】

[図 1 6] 及び [図 1 7] に示される第 1 の代替では、入射レーザビーム 2 の軸は全体的に、ミラーを有する光学系の出力における走査レーザビームの軸 1 2 に平行する。

【 0 1 2 6 】

[図 1 8] に示される第 2 の代替では、入射レーザビーム 2 の軸は全体的に、ミラーを有する光学系の出力における走査レーザビームの軸 1 2 を横断する。

50

【 0 1 2 7 】

この第3の実施形態の利点は、使用されるミラーの数を、先の実施形態での4つの代わりに2つに低減することであり、それにより、レーザ走査ビーム及び収集される信号への強度損失が低減される。これに由来して、[図8]～[図15]に関連して説明された実施形態で使用されるミラーM-X1、M-X2、M-Y1、及びM-Y2よりも大きなミラーM-XY1及びM-XY2を使用することが可能になる。

【 0 1 2 8 】

この第3の実施形態の別の利点は、妨げがかなり低減されることである。

【 0 1 2 9 】

特に有利なことには、ミラーM-X1、M-Y1、M-X2、M-Y2、M-XY1、及びM-XY2は、誘電型のものであり、誘電処理は、反射の有効性を増大させるように適合される。好ましくは、誘電ミラーは広いスペクトル帯域幅（例えば、325nm～1100nm、325nm～1700nm、又は325nm～2200nm）を有し、それにより、紫外線（UV）から近赤外線（NIR）までのスペクトル全体に対して同じミラーを使用することが可能になる。

10

【 0 1 3 0 】

レーザビームを走査するシステム及び方法は、異なる構成要素と組み合わせて、追加の利点を提供することができる。

【 0 1 3 1 】

しかし、高走査速度（ボイスコイル式のアクチュエータ又はスキャナの場合、約30Hz）で、様々なスキャナは非制御の位相シフトを受けるおそれがあり、対物レンズの瞳の中心Oへの再センタリングはもはや機能せず、そして、レーザ走査は不規則になりビネット現象を受ける。より高い走査速度（すなわち、最高で数百Hz）でなお動作しながら、この欠陥を修正する手段は、一般に各スキャナが設けられる第1のミラー（例えば、M-X1又はM-XY1）の位置センサからの信号を使用して、第2のミラー（M-X2又はM-XY2）の制御信号の位相を制御することにより、位相ロックループをセットアップし、走査軸毎にこれを行うことである。

20

【 0 1 3 2 】

特に有利なことには、ラマン散乱信号は、[特許文献5]（国際公開第002008128971A2号公報）に記載されるように、幾つかの点にわたって平均されたラマン信号を記録するように、ビームの角度変位中、幾つかの測定点にわたって統合される。本発明の実施形態による、1つ又は2つの軸の走査の使用により、試料上の走査ゾーンを拡大し、及び/又はラマン顕微分光法測定値の空間分解能を増大し、及び/又はラマン顕微分光法測定値の信号対雑音比を増大することができる。

30

【特許文献5】国際公開第002008128971A2号公報

【 0 1 3 3 】

ビーム拡大器が走査レーザビームラマン顕微分光装置で使用される場合、ビーム拡大器は、励起レーザビームの経路上であるが、ラマン散乱ビームの光路外に配置される。有利なことには、ビーム拡大器は、レーザ源と、例えば、注入-阻止フィルタ又はノッチフィルタ型の分割フィルタとの間に配置される。

40

【 0 1 3 4 】

走査ビーム系は、様々な顕微鏡対物レンズと互換性を有する。特に、ミラーを有する顕微鏡対物レンズ、例えば、カセグレン又はシュバルツフィールド型の対物レンズを使用することが可能である。ミラーを有する対物レンズは、アクロマートであるという利点を有し、それにより、よりよい精度での分光測定が可能である。したがって、励起レーザビームとラマン散乱ビームとの分離がより容易である。他方、検鏡法では、顕微鏡対物レンズのアクロマート性は、励起レーザと同じポイントでの軸方向検出を提供し、これは特に、透明試料の場合で重要である。

【 0 1 3 5 】

2軸を用いての走査は、主ミラーの中心ではなく縁部を照明することが可能であるため

50

、カセグレン型の対物レンズにレーザ光をよりよく結合できるようにする。実際に、主ミラーの中心を通るレーザ光線は、逆反射され、解析すべき試料に達せず、大きな損失をもたらす。したがって、本発明は、有利なことには、カセグレン又はシュバルツフィールド型の対物レンズを使用することにより、より多くのレーザ光を試料に伝達させることができる。

【0136】

本発明の走査デバイスは、有利なことには、例えば、[特許文献6]（国際公開第2013/014379A号公報）に記載される等の円錐レンズの系と組み合わせて、円錐形又は円柱形レーザビームを形成することもできる。好ましくは、円錐形又は円柱形ビームのアーチャは、対物レンズの瞳をカバーするのに十分であり、したがって、出力ビームの強度を増大させることができる。このデバイスは、[特許文献7]（仏国特許第1156687号公報）に記載される等の円錐レンズの系で置換されて、高速走査を使用して、円柱形の軸上に光を有さないか、又はごくわずかな光を有する任意のセクション（例えば、管状等）を有する中空円柱形レーザビームを形成することもできる。これには、特に、中心光線を抑制し、軸外の傾斜光線のみを用いて試料を照明するという利点がある。このタイプの照明は、共焦点ラマン信号への基板の寄与を大幅に低減できるようにする。このタイプの照明は、縦球面収差と呼ばれる光学収差を大幅に低減することも可能にし、縦球面収差は、屈折環境での屈折中に出現し、共焦点顕微鏡の空間分解能の低下を誘導する。

【特許文献6】国際公開第2013/014379A号公報

【特許文献7】仏国特許第1156687号公報

【0137】

[図19]～[図22]は、[図7]に関連して説明された実施形態によるレーザ走査検鏡装置を用いて得られる走査幅の様々な測定値を示す。

【0138】

試料4の代わりに、NIST（米国標準技術局）の要件に従ってUKAS（英国認定機関）によって認定される較正パターンが配置される。このテストパターンは、0.01mm毎に離間された目盛りを有する20mm長のスケールを含む。パターンは、パターンの軸に平行する軸に従っての走査中、顕微鏡対物レンズの焦点面でのビームの最大変位を測定できるようにする。

【0139】

2軸による走査検鏡装置での変位ゾーンを測定するために、パターンをX軸に従って向け、次にY軸に従って向けることにより、最大変位の連続測定が行われる。

【0140】

[図19]は、パターンがX軸に平行して向けられた状態の、X軸に平行する軸に従っての走査中、顕微鏡対物レンズ10Xが設けられた走査ビーム検鏡装置上のスケールへのパターンの測定値を示す。より正確には、曲線50は、パターンにわたるX軸に沿ったビームの角度変位に従ってレーザの波長で反射された信号の強度の測定値を表す。[図19]中の丸が付された極大40、41、・・・、49は、パターンのスケールのバー上のレーザの反射に対応する。極大40、41、・・・、49が50μm離間されることが観測される。X軸に従ったパターンにわたるビームの走査幅は、最初の極大40と最後の極大49との間の距離、すなわち、約450μmに対応する。加えて、曲線50の平均レベルは、光学系の均質性を表す。平均レベルが高く、一定であるほど、測定は良好である。

【0141】

[図20]は、パターンがY軸に平行して向けられた状態の、Y軸に平行する軸に従っての走査中、同じ顕微鏡対物レンズ10Xが設けられた同じ検鏡装置上の同じパターンの測定値を示す。曲線150は、パターンにわたるY軸に沿ったビームの角度変位に従ってレーザの波長で反射された信号の強度の測定値を表す。[図20]中の丸が付された極大140、141、・・・、149は、パターンのスケールのバー上のレーザの反射に対応する。極大140、141、・・・、149が50μm離間されることがチェックされる。Y軸に従ったパターン上のビームの走査幅は、最初の極大140と最後の極大149と

の間の距離、すなわち、約 $450\ \mu\text{m}$ に対応する。

【0142】

ビューカメラでの画面捕捉は、X軸に従った走査幅が約 $460\ \mu\text{m}$ であり、約 $470\ \mu\text{m}$ のY軸に従った走査幅ことを確認できるようにする。

【0143】

したがって、対物レンズX10が設けられた従来技術によるDuoScan装置を用いて得られる約 $200\ \mu\text{m}$ の走査幅との比較により、本発明の走査系は、各方向X、Yにおいて約2.2倍高く、視野幅を増大させ、ひいては、走査表面を約4.9倍増大させることができる。

【0144】

[図21]は、パターンがX軸に平行して向けられた状態の、X軸に平行する軸に従った走査中、顕微鏡対物レンズ50Xが設けられた走査ビーム検鏡装置上のスケールへの同じパターンの測定値を示す。[図21]の曲線250上の丸が付された極大240、241、・・・、248は、パターンのスケールのバー上のレーザの反射に対応する。極大241、・・・、248が約 $10\ \mu\text{m}$ 離間されることが観測される。X軸に従ったパターン上のビームの走査幅は、最初の極大241と最後の極大248との間の距離、すなわち、約 $70\ \mu\text{m}$ に対応する。

【0145】

[図22]は、パターンがY軸に平行して向けられた状態の、Y軸に平行する軸に従った走査中、同じ顕微鏡対物レンズ50Xを有する同じ検鏡装置上の同じパターンの測定値を示す。[図22]の曲線350上の丸が付された極大341、342、・・・、348は、パターンのスケールのバー上のレーザの反射に対応する。極大341、342、・・・、348が約 $10\ \mu\text{m}$ 離間されることが観測される。Y軸に従ったパターン上のビームの走査幅は、最初の極大341と最後の極大348との間の距離、すなわち、約 $70\ \mu\text{m}$ に対応する。

【0146】

ビューカメラでの画面捕捉は、X軸に従った対物レンズ50Xを用いた走査幅が約 $70\ \mu\text{m}$ であり、約 $70\ \mu\text{m}$ のY軸に従った走査幅ことを確認できるようにする。

【0147】

したがって、対物レンズX50が設けられた従来技術によるDuoScan装置を用いて得られる走査幅との比較により、本発明の走査系は、各方向X、Yにおいて約2.7倍高く、視野幅を増大させ、ひいては、走査表面を約7.6倍増大させることができる。

【0148】

代替的には、一次元スケールを有するテストパターンを使用する代わりに、それら自体が $0.01 \times 0.01\ \text{mm}$ の正方形で構成される $0.5 \times 0.5\ \text{mm}$ の正方形で構成される二次元での平面テストパターンが使用される。この正方形パターンは、反射により走査される表面の像を形成するのに使用される。像は、パターンの正方形を表示し、パターン上のレーザビームの走査を観測できるようにする。有利なことには、正方形パターンは、白色光で照明されて、レーザビームの位置に関係なく、像を可能にする。

【0149】

対物レンズ10Xを用いる場合、ビームの変位の程度が約 $440\ \mu\text{m} \times 450\ \mu\text{m}$ であることが推定される。走査の縁部での像の暗化は、スキャナに搭載されたミラーの縁部でのピネットに起因するものであり、ビームがミラーの縁部又は対物レンズの瞳の縁部に達したとき、ビームの強度は低減する。

【0150】

対物レンズ50Xの場合、正方形パターンを用いて、使用することができる走査ゾーンが約 $80 \times 75\ \mu\text{m}$ であることが観測される。

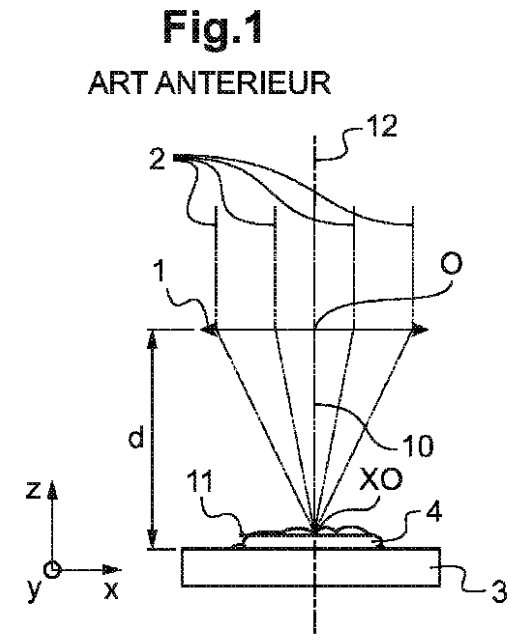
10

20

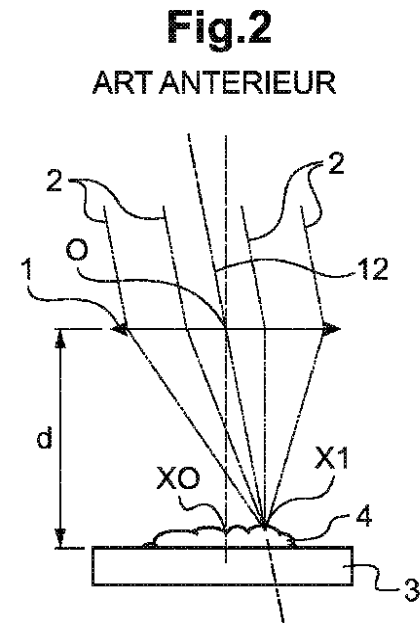
30

40

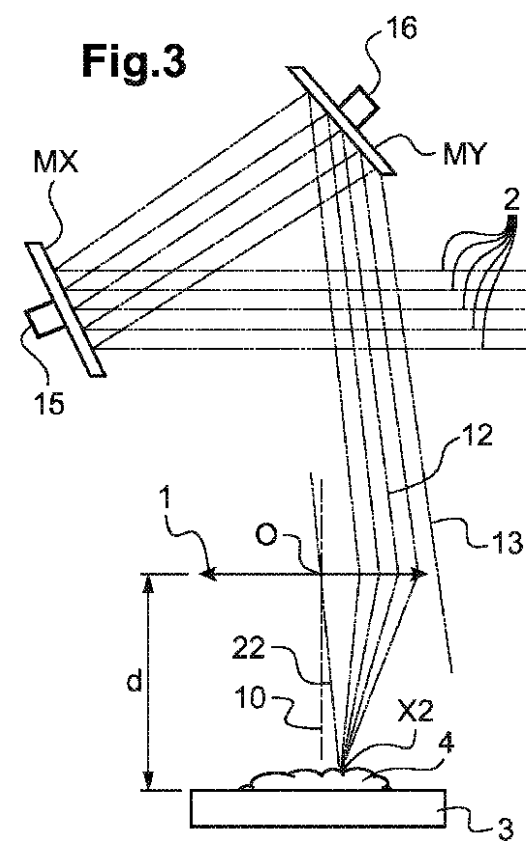
【 図 1 】



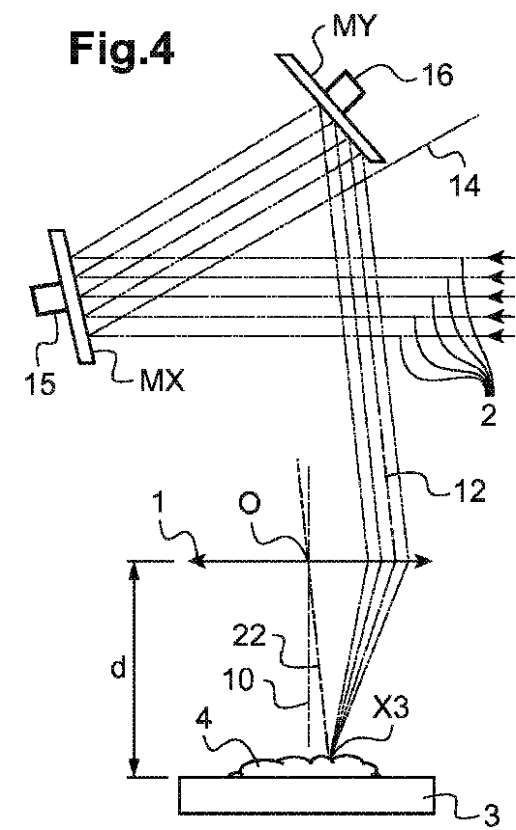
【 図 2 】



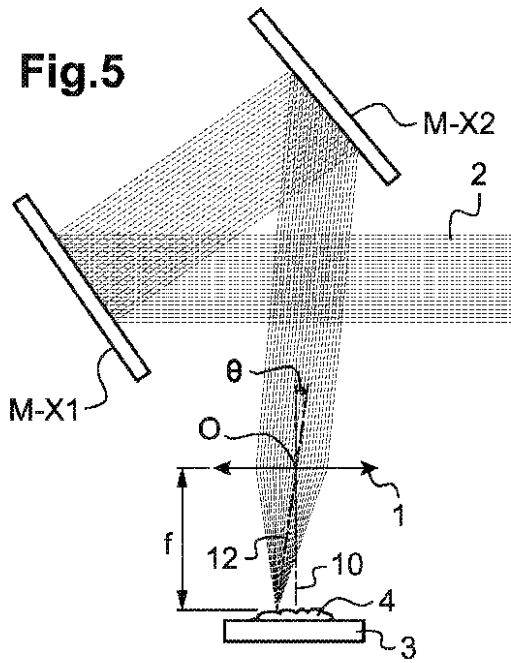
【 図 3 】



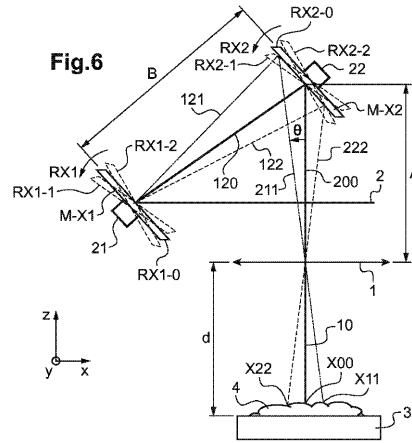
【 図 4 】



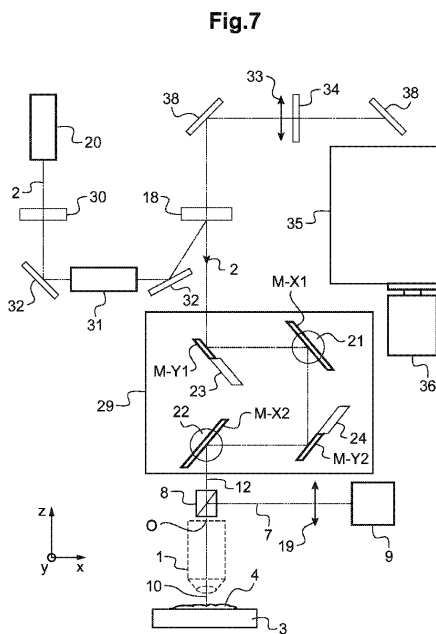
【 図 5 】



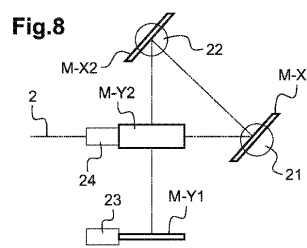
【 図 6 】



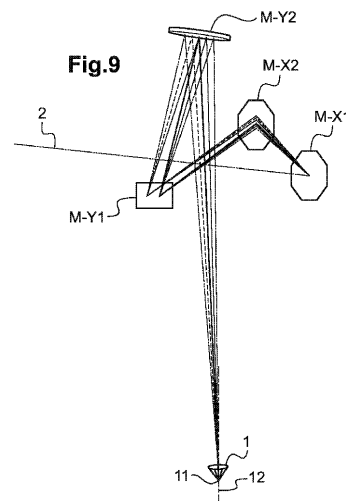
【 図 7 】



【 図 8 】

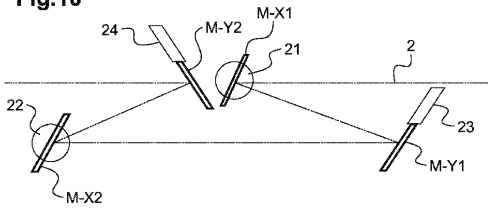


【 図 9 】



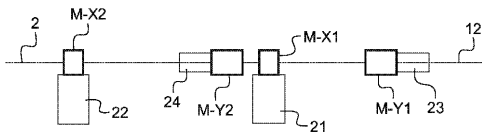
【 図 1 0 】

Fig.10



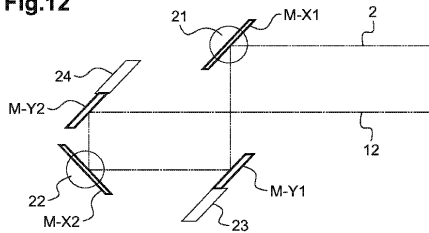
【 図 1 1 】

Fig.11



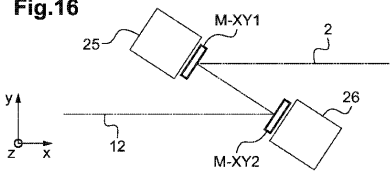
【 図 1 2 】

Fig.12



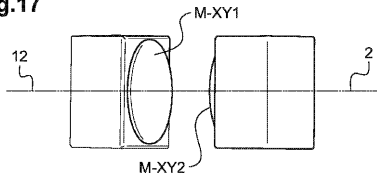
【 図 1 6 】

Fig.16



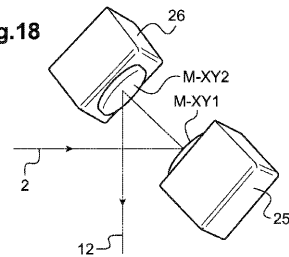
【 図 1 7 】

Fig.17



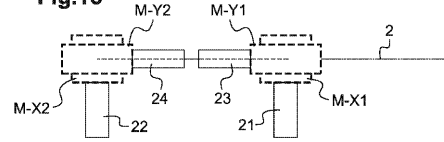
【 図 1 8 】

Fig.18



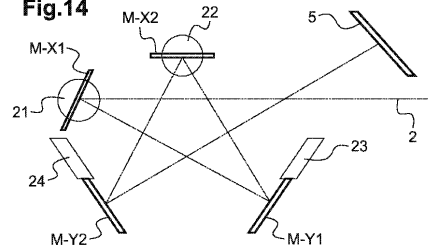
【 図 1 3 】

Fig.13



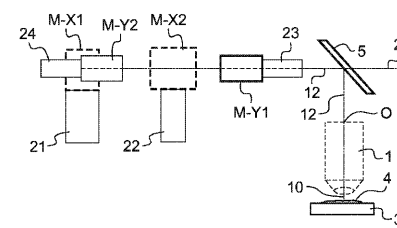
【 図 1 4 】

Fig.14

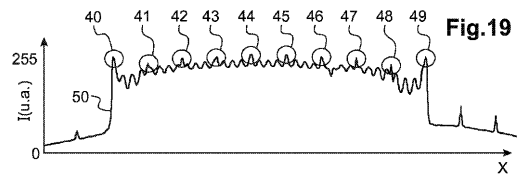


【 図 1 5 】

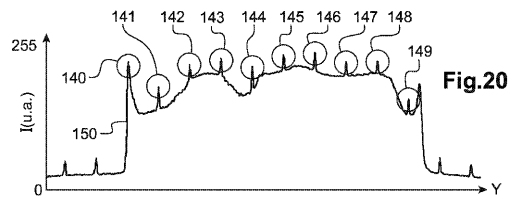
Fig.15



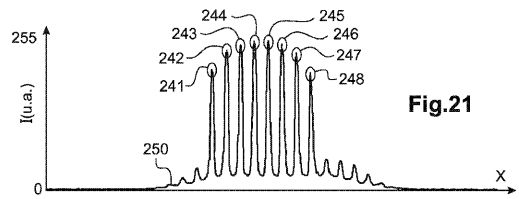
【 図 1 9 】



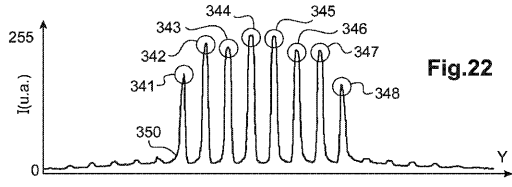
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 2 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 アンドレジェズスキ, ダミアン
フランス国 59650 ヴィレヌーヴ ダスク アレ デ クールシーブ 8/22
- (72)発明者 ヴォアダン, ルネ
フランス国 59310 ブベリー ラ フォレ ルエル クール オ ヴォア 96
- (72)発明者 デ ベティグニ, フィリップ
フランス国 59130 ランベルサ アヴニュ デ マグノリア, 14

審査官 金高 敏康

- (56)参考文献 国際公開第2012/133623(WO, A1)
特開平10-197809(JP, A)
特開2011-007936(JP, A)
米国特許出願公開第2011/0249311(US, A1)
特開2012-022282(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|------|-------|
| G02B | 21/00 |
| G01N | 21/64 |
| G01N | 21/65 |
| G02B | 26/10 |