(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3694956号

(P3694956)

(45)発行日　平成17年9月14日(2005.9.14)　(24)登録日　平成17年7月8日(2005.7.8)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
G02B 21/06	G02B 21/06	
G01N 21/27	G01N 21/27	E
G01N 21/64	G01N 21/64	E
G02B 21/00	G02B 21/00	

請求項の数 1　(全 11 頁)

(21)出願番号　特願平8-18366
(22)出願日　平成8年1月9日(1996.1.9)
(65)公開番号　特開平9-189864
(43)公開日　平成9年7月22日(1997.7.22)
審査請求日　平成14年2月25日(2002.2.25)

(73)特許権者　000004112
株式会社ニコン
東京都千代田区丸の内３丁目２番３号
(74)代理人　100091557
弁理士　木内　修
(72)発明者　黒岩　義典
東京都千代田区丸の内３丁目２番３号　株式会社ニコン内

審査官　山村　浩

(56)参考文献　特開平０４－１５９５１０（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－１６４９６９（ＪＰ，Ａ）
特開昭５６－１３１９４０（ＪＰ，Ａ）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】光走査型顕微鏡

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

レーザ光を発する光源と、ダイクロイックミラーと、前記ダイクロイックミラーで分離された前記レーザ光を生物試料上で２次元的に走査する走査手段と、前記ダイクロイックミラーで分離された前記生物試料からの蛍光を検出する蛍光検出手段と、この蛍光検出手段の出力と前記走査手段から得られる走査位置情報とに基づき前記生物試料の蛍光画像を得る画像取得手段とを備えた光走査型顕微鏡において、

前記光源と前記ダイクロイックミラーとの間の光路中に配置され、前記走査手段により走査された前記レーザ光が前記生物試料へ向かうのを阻止する第１の状態と前記レーザ光が前記生物試料へ向かうのを許す第２の状態とを切換える光ビーム切換手段と、

前記画像取得手段で得られる前記蛍光画像を表示するモニタで表示された蛍光画像上の任意の少なくとも一部の領域を指定する領域指定手段と、

前記蛍光画像を構成する各画素に対応するデータメモリ部を有する制御回路とを備え、

前記データメモリ部は、前記領域指定手段で指定された領域内の全ての画素に対応する全てのアドレスに、前記光ビーム切換手段を前記第２の状態にするためのデータを予め記憶し、

前記制御回路は、前記走査手段からの走査位置情報に対応する前記データメモリ部のデータに基づいて前記光ビーム切換手段を前記第２の状態にする

ことを特徴とする光走査型顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【０００１】
【発明の属する技術分野】
この発明は光走査型顕微鏡に関する。
【０００２】
【従来の技術】
生物試料に光を照射し、生物試料に起きる現象を観察する顕微鏡として光走査型顕微鏡が知られている。
【０００３】
上記光走査型顕微鏡、例えばレーザ走査型顕微鏡では、通常レーザ光を長方形や正方形のように２次元的に走査するが、分解能を上げるためにレーザ光が回折しない限界のスポットまで絞り、そのスポット径に見合うように試料面上を走査するため、走査には高精度に動作可能なスキャニングユニットとその制御装置とが必要となる。
【０００４】
しかし、スキャニングユニットを用いてレーザ光を走査する場合、走査の折り返し部で加速度が１８０°変化し、機械式のスキャナを用いたときは、慣性によってミラーのウォブリング、歪が発生し易いため、走査制御が非常に難く、通常は画像を取得したい範囲よりもやや広めに走査し、スキャナの両端の折り返し部を画像取得に使わないようにしている。
【０００５】
特に、レゾナントスキャナのように高速のスキャナを用いたときは、加速度の変化が大きいため、より広めに走査している。
【０００６】
【発明が解決しようとする課題】
ところで、生物試料はレーザ光のように強い光を受けると、退色を起こし、蛍光量が落ちてしまうため、生物試料を蛍光観察する場合、余計な光を生物試料に与えないことが重要である。
【０００７】
しかし、従来の光走査型顕微鏡においては、上記したように画像を取得したい範囲よりもやや広めに走査しているため、試料はどうしても画像を取得したい範囲を越えてレーザ光が照射され、画像を取得したくない部分にまでダメージを与えてしまう。
【０００８】
この事態を解消するため、従来においてはスキャニングユニットと試料との間の一次結像面（試料と共役な面）に画像を取得する範囲外を遮光するためのマスクを置いて試料が照射されないようにしていたが、試料は様々な形状をしており各形状毎にマスクを用意するのは煩雑であり、マスクを正確に試料の形状に合わせるのは非常に困難である。また、試料に正確に合わせるには複雑な機構を必要とするため調整が難しく、しかも調整の間に余計なレーザ光を試料に照射してしまうという問題があった。
【０００９】
この発明はこのような事情に鑑みてなされたもので、その課題は画像を取得したい範囲以外への光の照射を確実かつ容易に阻止できる光走査型顕微鏡を提供することである。
【００１０】
【課題を解決するための手段】
上記課題を解決するため請求項１に記載の発明の光走査型顕微鏡は、レーザ光を発する光源と、ダイクロイックミラーと、前記ダイクロイックミラーで分離された前記レーザ光を生物試料上で２次元的に走査する走査手段と、前記ダイクロイックミラーで分離された前記生物試料からの蛍光を検出する蛍光検出手段と、この蛍光検出手段の出力と前記走査手段から得られる走査位置情報とに基づき前記生物試料の蛍光画像を得る画像取得手段とを備えた光走査型顕微鏡において、前記光源と前記ダイクロイックミラーとの間の光路中に配置され、前記走査手段により走査された前記レーザ光が前記生物試料へ向かうのを阻止する第１の状態と前記レーザ光が前記生物試料へ向かうのを許す第２の状態とを切換え

る光ビーム切換手段と、前記画像取得手段で得られる前記蛍光画像を表示するモニタで表示された蛍光画像上の任意の少なくとも一部の領域を指定する領域指定手段と、前記蛍光画像を構成する各画素に対応するデータメモリ部を有する制御回路とを備え、前記データメモリ部は、前記領域指定手段で指定された領域内の全ての画素に対応する全てのアドレスに、前記光ビーム切換手段を前記第２の状態にするためのデータを予め記憶し、前記制御回路は、前記走査手段からの走査位置情報に対応する前記データメモリ部のデータに基づいて前記光ビーム切換手段を前記第２の状態にすることを特徴とする。

【００１１】

制御回路が走査位置情報に基づき走査範囲内の所定の部分領域で光ビーム切換手段を第２の状態にするので、画像を取得したい範囲と光ビームが照射される範囲が一致し、画像を取得したい範囲以外に光ビームが照射されない。また、走査手段による走査範囲は、光ビームが照射される範囲より広いので、走査手段のスキャン制御が容易であり、良好な画像を得ることができる。

【００１６】

【発明の実施の形態】

以下、この発明の実施の形態を図面に基づいて説明する。

【００１７】

図１はこの発明の第１実施形態に係るレーザ走査型顕微鏡のブロック構成図である。

【００１８】

レーザ走査型顕微鏡１は、レーザ光を発する光源２と、ステージ３に載置された試料４上でレーザ光ＬＢを２次元的に走査させる水平スキャナ（例えば、ガルバノスキャナ）５及び垂直スキャナ（例えば、レゾナントスキャナ）６と、ＣＰＵ７の画像取得開始指令７ａに基づいて水平スキャナ５及び垂直スキャナ６の駆動を制御するスキャナ制御回路２０と、試料４の蛍光を検出し、入力した蛍光を光強度を表す信号９ａに変換する蛍光検出手段である蛍光検出器９と、蛍光検出器９の信号９ａとスキャナ制御回路２０から得られる走査位置情報２０ａ（水平同期信号ＨＤ、垂直同期信号ＶＤ、ピクセルクロックＰＣ）に基づき試料４の画像化を図る画像処理回路１０と、試料４へ向かうレーザ光ＬＢを遮断する遮光状態（第１の状態）と試料４へ向かう光ビームＬＢを透光させる（第２の状態）とに切換える光ビーム切換手段である高速シャッタ、例えばＡＯＭ（音響光学変調器）１１と、スキャナ制御回路２０から得られる走査位置情報２０ａに基づいてＡＯＭ１１の遮光状態と透光状態を切換える制御回路である切換制御回路３０と、レーザ光と蛍光を分離するダイクロイックミラー１３と、レーザ光をカットするバリアフィルタ１４とからなる。

【００１９】

なお、上記蛍光検出器９のサンプリング周波数は１０ＭＨｚ程度である。

【００２０】

また、上記画像処理回路１０は、Ａ／Ｄ変換素子、フレームメモリ、Ｄ／Ａ変換素子等の画像化するための回路及びＣＰＵからの操作で画像にラインを重ね書きするためのオーバーレイメモリ回路からなる。

【００２１】

また、高速シャッタとしては、ＡＯＭ１１に限られるものではなく、正確なサンプリング周波数や遮光を得られるものであればよく、例えばＥＯＭ（Ｅｌｅｃｔｒｏ Ｏｐｔｉｃ Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ）やMOM（Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｏｐｔｉｃ Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ）を用いることもできる。

【００２２】

レーザ光源２から照射されたレーザ光ＬＢは、ＡＯＭ１１を通過した後、ダイクロイックミラー１３で反射され、水平スキャナ５及び垂直スキャナ６へ導かれ、スキャナ制御回路２０によって試料４上で２次元走査される。レーザ光ＬＢの照射によって励起され試料４から発せられた蛍光は、レーザ光ＬＢの光路を逆行し、水平スキャナ５及び垂直スキャナ６でデスキャニングされ、ダイクロイックミラー１３を透過し、レーザ光と分離される。ダイクロイックミラー１３を透過した蛍光はバリアフィルタ１４で完全に蛍光だけとなり

、蛍光検出器９に入射する。
【００２３】
図２はスキャナ制御回路の詳細ブロック図であり、この図を参照してスキャナ制御回路の動作を説明する。
【００２４】
スキャナ制御回路２０は垂直同期信号発生回路２１と、垂直スキャナ駆動回路２２と、水平同期信号発生回路２３と、水平スキャナ駆動回路２４と、ピクセルクロック発生回路２５と、１水平ラインカウント回路２６と、１フレームカウント回路２７とからなる。
【００２５】
垂直同期信号発生回路２１は、システムをコントロールしているＣＰＵ７から画像取得開始指令７ａを受けて垂直走査を開始させる垂直同期信号ＶＤを出力する。
【００２６】
垂直スキャナ駆動回路２２は、垂直同期信号ＶＤを入力すると、垂直スキャナ６の駆動信号（ノコギリ波）ＶＤＤを出力し、垂直スキャナ６を駆動する。
【００２７】
垂直同期信号発生回路２１からの垂直同期信号ＶＤは同時に水平同期信号発生回路２３に入力され、水平同期信号発生回路２３は水平走査を開始させる水平同期信号ＨＤを出力する。
【００２８】
水平スキャナ駆動回路２４は、水平同期信号ＨＤを入力し、水平スキャナ５の駆動信号（ノコギリ波）ＨＤＤを出力し、水平スキャナ５を駆動する。
【００２９】
水平同期信号ＨＤは同時にピクセルクロック発生回路２５に入力し、ピクセルクロック発生回路２５は蛍光データをサンプリングするピクセルクロックＰＣを画像処理回路１０へ出力する。
【００３０】
１水平ラインカウント回路２６は、水平同期信号ＨＤとピクセルクロックＰＣを入力し、水平同期信号ＨＤの入力に同期してピクセルクロックＰＣのカウントを開始し、予め設定されたクロック数（１水平ラインの１周期に当たるピクセルクロックの数、例えば５４０）をカウントし終えると、トリガ信号ＴＲ１を出力する。
【００３１】
水平同期信号発生回路２３は、トリガ信号ＴＲ１を入力すると、次のラインを走査するための水平同期信号ＨＤを出力する。
【００３２】
１フレームカウント回路２７は、垂直同期信号ＶＤと水平同期信号ＨＤとを入力し、垂直同期信号ＶＤの入力に同期して水平同期信号ＨＤのカウントを開始し、予め設定された数（１フレームの１周期に当たる水平同期信号の数、例えば、５００）をカウントし終えると、トリガ信号ＴＲ２を出力する。
【００３３】
垂直同期信号発生回路２１はトリガ信号ＴＲ２を入力すると、次のフレームの走査を開始し、垂直同期信号ＶＤを出力する。
【００３４】
スキャナ制御回路２０は、上記のようにして、水平スキャナ５と垂直スキャナ６とを、例えば同期信号発生器を用いて同期をとって駆動することでレーザ光ＬＢを２次元的に走査する。
【００３５】
この際、ＣＰＵ７は水平スキャナ５及び垂直スキャナ６が実際に画像を取得する範囲よりも広く（５４０×５００）レーザ光ＬＢを走査するように画像取得開始指令７ａを出力している。したがって、走査の折り返し付近の画像は画像を取得する範囲外となるため、ミラーのウォブリングや、ミラーの歪の影響を受けない。

【００３６】
図３は切換制御回路の詳細ブロック図であり、この図を参照して切換制御回路の動作を説明する。
【００３７】
切換制御回路３０は有効水平同期信号カウント回路（有効ＨＤカウント回路と称する）３１と、有効ピクセルクロックカウント回路（有効ＰＣカウント回路と称する）３２と、ＡＯＭ駆動回路３３とからなる。
【００３８】
有効ＨＤカウント回路３１は、垂直同期信号ＶＤと水平同期信号ＨＤとを入力し、垂直同期信号ＶＤの入力に同期して水平同期信号ＨＤのカウントを開始し、予め設定された数（画像として有効な垂直同期信号の数、例えば、４８０）までカウントし、カウントしている間は、例えばＨレベルのＨＤイネーブル信号ＨＤＥを出力する。
【００３９】
一方、有効ＰＣカウント回路３２は、水平同期信号ＨＤとピクセルクロックＰＣとを入力し、水平同期信号ＨＤに同期してピクセルクロックをカウントし、予め設定された数（画像として有効な１水平ラインのピクセルクロックの数、例えば５１２）までカウントし、カウントしている間は、例えばＨレベルのピクセルクロックイネーブル信号ＰＣＥを出力する。
【００４０】
ＡＯＭ駆動回路３３は、有効ＨＤカウント回路３１及び有効ＰＣカウント回路３２の出力が共にＨレベルのとき、ＡＯＭ１１を透光状態に駆動する信号３０ａを出力する。
【００４１】
上記第１実施形態の光走査型顕微鏡によれば、水平スキャナ５及び垂直スキャナ６は共に画像取得範囲（５１２×４８０）以上に駆動されるが、実際にレーザ光を走査する領域と画像をサンプリングする上記範囲とを１画素もずれずに一致させることができ（画像取得範囲以外は画像をサンプリングするピクセルクロックに同期して制御されたＡＯＭ１１で遮断される）、生物試料の観察時、生物試料は観察したい領域を含む限られた範囲のみが照射されるため、試料は限られた範囲以外はダメージを受けず、退色を防止できる。
【００４２】
図４はこの発明の第２実施形態に係るレーザ走査型顕微鏡のブロック構成図である。第１の実施形態と同一部分については同一符号を付し、その説明を省略する。
【００４３】
この実施形態の光走査型顕微鏡では、図１の光走査型顕微鏡に画像処理回路１０で得られる画像信号１０ａを再生するモニタ４０と、このモニタ４０に表示された画像の少なくとも一部の領域を指定するポインティングデバイス（領域指定手段）１６とが付加されている。
【００４４】
モニタ４０にはＣＲＴが用いられ、画像処理回路１０は、画面を構成する画素に対応したバッファメモリを持ち、その内容をモニタ４０に常に出力し繰り返し表示する。なお、バッファメモリの内容は動的に変更可能となっている。
【００４５】
ポインティングデバイス１６は、例えばタブレット（デジタイザ）、ライトペン、マウス等であり、ＣＰＵ７に接続されており、画像処理回路１０を介してモニタ画面上の任意の１点を指示することができるようになっている。
【００４６】
図５は切換制御回路の詳細ブロック図である。
【００４７】
切換制御回路３０はピクセルクロックカウンタ３５、メモリ３６、ＡＯＭ駆動回路３７からなる。
【００４８】

ピクセルクロックカウンタ３５は、　垂直同期信号ＶＤとピクセルクロックＰＣとを入力し、垂直同期信号ＶＤの入力に同期してピクセルクロックＰＣのカウント値をリセットし、ピクセルクロックＰＣのカウントを開始し、そのカウント値３５ａを出力する。

【００４９】

メモリ３６は、例えばＲＡＭから構成され、画像の画素サイズと同じかそれ以上で１ビットデータが記憶できる容量を有し、画素単位でアドレスが定義されており、ＣＰＵ７によって画素と対応したアドレスにシャッタコントロールデータ３６ａが後述する方法で予め書込まれている。

【００５０】

このメモリ３６は、ピクセルクロックＰＣのカウント値３５ａをメモリのアドレスとして入力し、インクリメントされたカウント値が入力する度に、アドレスに書込まれている１ビットのシャッタコントロールデータ３６ａを出力する。

【００５１】

　ＡＯＭ駆動回路３７は、シャッタコントロールデータ３６ａを入力し、このシャッタコントロールデータ３６ａに基づいてＡＯＭ１１を駆動する信号３０ａを出力する。

【００５２】

次に、予め行われる上記メモリ３６へのシャッタコントロールデータの書き込みについて説明する。

【００５３】

図６はモニタ画面上に表示されたラスタスキャンして取得された１フレームの蛍光画面を示す図、図７はシャッタコントロールデータを記憶してあるメモリのマッピングデータを表す図である。なお、図７において、説明を簡略化するため、画素サイズを２５×２５としている。

【００５４】

まず、１フレーム（１画像）だけラスタスキャンして得た蛍光画面４１の全体を図６に示すようにモニタ４０上に表示させる。

【００５５】

次に、このモニタ４０を見ながら、実際に画像を取得したい領域をポインティングデバイス１６を用いてトレースし、図６に示すような軌跡４２で囲まれた領域４３を表示させる。

【００５６】

なお、表示させる領域は１つに限るものではなく、任意の数の領域を指定してもよい。

【００５７】

上記領域４３を画像を取得したい範囲とするとき、ＣＰＵ７は図７に示すように画素と対応したアドレスをたよりにメモリ３６にアクセスし、ＡＯＭ１１の透光状態又は遮光状態を示すシャッタコントロールデータ３６ａをメモリ３６に直接書込む。

【００５８】

図７において、　１　は透光状態にすること、　０　は遮光状態にすることをそれぞれ表している。

【００５９】

　この第２の実施形態の光走査型顕微鏡によれば、水平スキャナ５及び垂直スキャナ６は共に画像取得範囲（領域４３）以上に駆動されるが、実際にレーザ光ＬＢが走査する範囲は、予め行われた走査に基づいてメモリ３６に記憶された領域４３（この領域４３以外は画像をサンプリングするピクセルクロックに同期して制御されたＡＯＭ１１で遮断される）であり、画像をサンプリングする範囲と１画素もずれずに一致させることができる、生物試料の観察時、生物試料は観察したい領域のみに照射されるため、観察したい領域以外の試料はダメージを受けず、退色を防止できる。

【００６０】

なお、上記第１及び第２実施形態では、光路に高速シャッタを配置することで試料への照射を制御しているが、制御方法はこれに限るものではなく、例えば光ビームを光路外へ向

けることで試料への照射を制御するようにしてもよい。

【００６１】

【発明の効果】

以上説明したように、この発明の光走査型顕微鏡によれば、走査手段による走査範囲は光ビームが照射される範囲よりも広いので、走査手段のスキャン制御が容易であり、良好な画像を得ることができるとともに、画像を取得したい範囲と光ビームが照射される範囲とが一致するので、画像を取得したい範囲以外に光ビームが照射されることによる試料への悪影響を防ぐことができる。また、マスクに代えて光ビーム切換手段を採用したので、複雑なマスク作りやマスクの位置合わせが不要となり、画像を取得したい範囲と光ビームが照射される範囲とを一致させる作業が簡単になる。

【図面の簡単な説明】

【図１】図１はこの発明の第１実施形態に係るレーザ走査型顕微鏡のブロック構成図である。

【図２】図２はスキャナ制御回路の詳細ブロック図である。

【図３】図３は切換制御回路の詳細ブロック図である。

【図４】図４はこの発明の第２実施形態に係るレーザ走査型顕微鏡のブロック構成図である。

【図５】図５は切換制御回路の詳細ブロック図である。

【図６】図６はモニタ画面上に表示されたラスタスキャンして取得された１フレームの蛍光画面を示す図である。

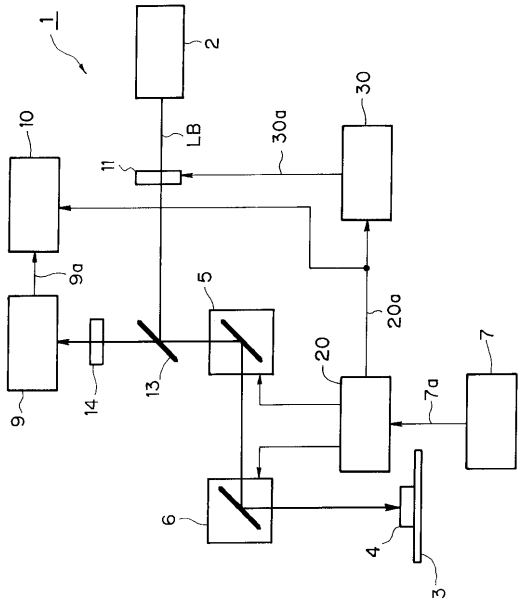
【図７】図７はシャッタコントロールデータを記憶してあるメモリのマッピングデータを表す図である。

【符号の説明】

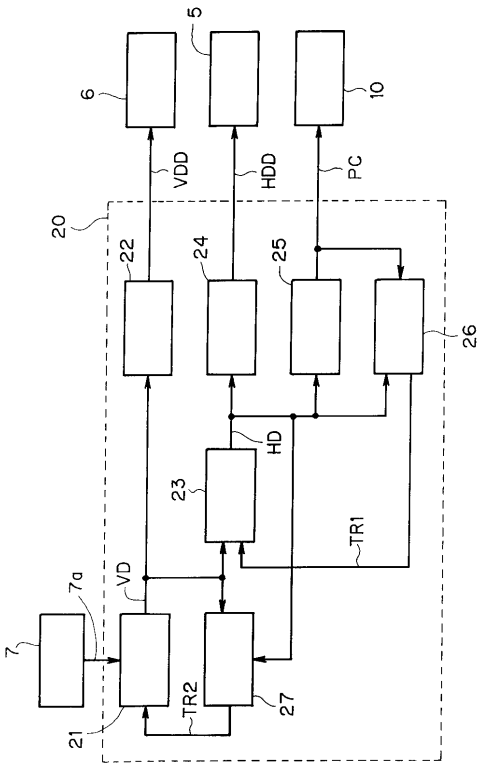
１　レーザ走査型顕微鏡
２　光源
３　ステージ
４　試料
５　水平スキャナ
６　垂直スキャナ
７　ＣＰＵ
９　蛍光検出器
１０　画像処理回路
１１　ＡＯＭ（音響光学変調器）
１３　ダイクロイックミラー
１４　バリアフィルタ
１６　ポインティングデバイス
２０　スキャナ制御回路
２１　垂直同期信号発生回路
２２　垂直スキャナ駆動回路
２３　水平同期信号発生回路
２４　水平スキャナ駆動回路
２５　ピクセルクロック発生回路
２６　１水平ラインカウント回路
２７　１フレームカウント回路
３０　切換制御回路
３１　有効水平同期信号カウント回路（有効ＨＤカウント回路）
３２　有効ピクセルクロックカウント回路（有効ＰＣカウント回路）
３３　ＡＯＭ駆動回路
３５　ピクセルクロックカウンタ
３６　メモリ

３７　ＡＯＭ駆動回路
４０　モニタ
４１　蛍光画面
４２　軌跡
４３　領域

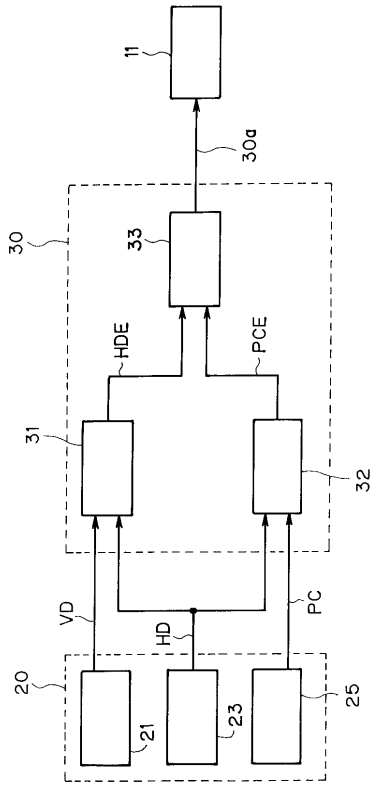
【図１】



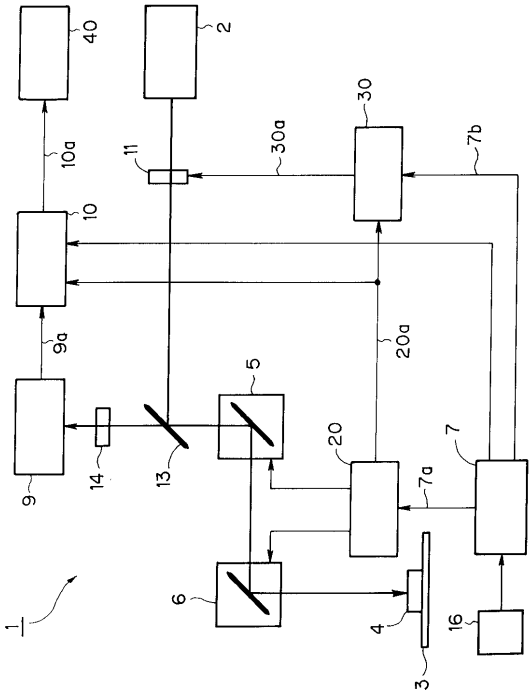
【図２】



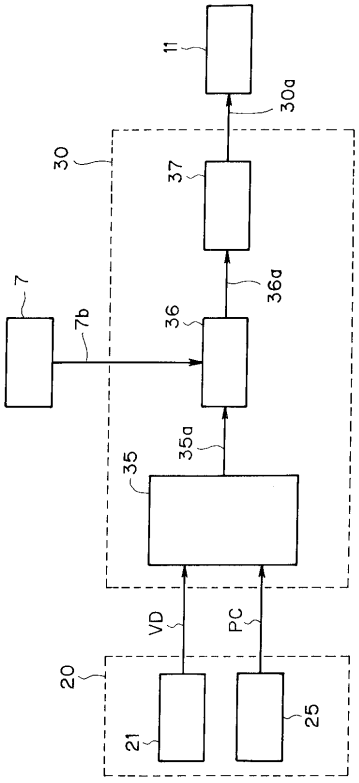
【図３】


11
30a
30
33
HDE
PCE
31
32
VD
HD
PC
20
21
23
25

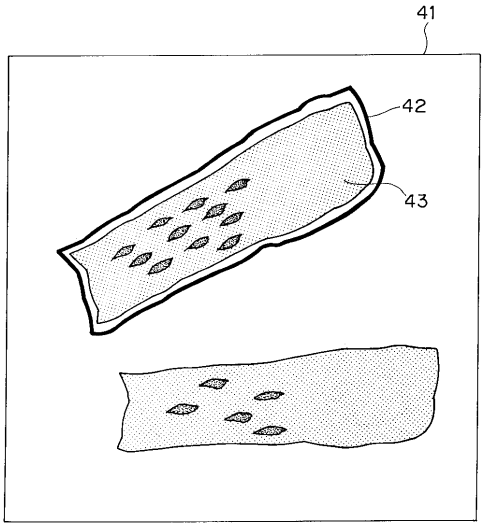
【図４】


40
2
10a
11
30a
30
7b
10
9a
20a
5
9
14
13
20
7
7a
6
4
16
3
1

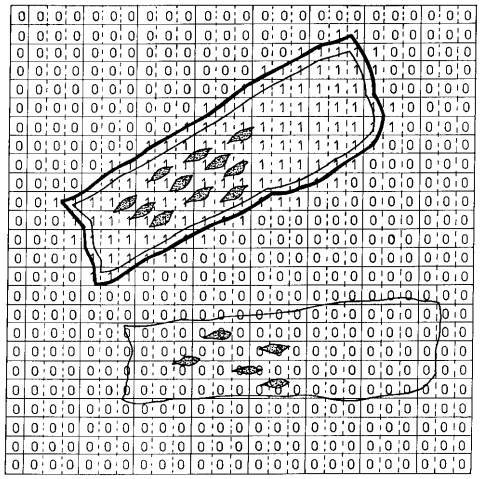
【図５】


11
30a
30
37
36a
7
7b
36
35a
35
VD
PC
20
21
25

【図６】


41
42
43

【図７】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
G02B 21/00-21/36
G01N 21/27
G01N 21/64