

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-141311

(P2011-141311A)

(43) 公開日 平成23年7月21日(2011.7.21)

(51) Int.Cl.
G02B 21/06 (2006.01)F1
G02B 21/06テーマコード(参考)
2H052

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2010-346 (P2010-346)
(22) 出願日 平成22年1月5日(2010.1.5)(71) 出願人 000004112
株式会社ニコン
東京都千代田区有楽町1丁目12番1号
(74) 代理人 100082131
弁理士 稲本 義雄
(74) 代理人 100121131
弁理士 西川 孝
(72) 発明者 福武 直樹
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
Fターム(参考) 2H052 AA07 AA09 AB06 AB24 AB27
AC14 AC15 AC34

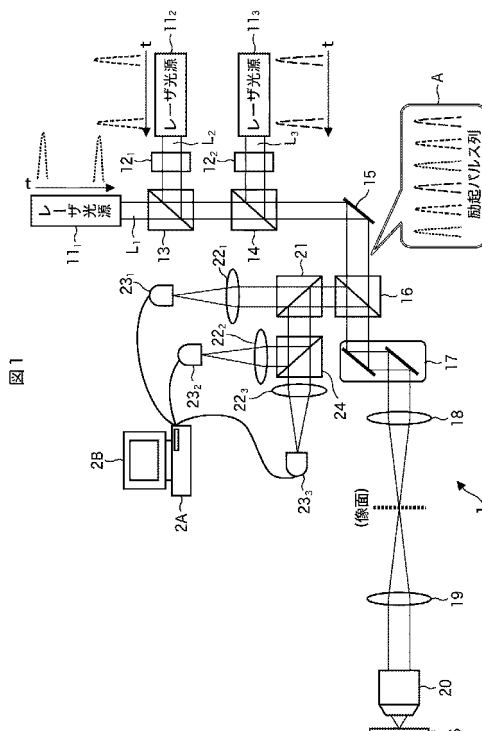
(54) 【発明の名称】 多光子顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】複数種類の色素で染色した試料について、各色素から発生する蛍光を検出して画像化する際に、各画像が互いにずれないようにする。

【解決手段】レーザ光源11₁ないし11₃から射出される3種類の超短パルス光L₁、L₂、L₃は、ダイクロイックミラー13及び14により混合され、遅延回路12₁及び12₂により超短パルス光L₁、L₂、L₃が順番に等間隔に並ぶように調整される。レーザ走査部17により超短パルス光L₁、L₂、L₃が、3種類の色素で染色された試料S上に集光されて走査され、それにより励起された色素から発生する3種類の異なるスペクトルを有する蛍光の強度が、ダイクロイックミラー21及び24により分離され、光検出部23₁ないし23₃により同時に検出されることで、1回の励起光焦点走査で、同時に各色素から発生する蛍光に対応する蛍光画像を取得できる。本発明は、2光子励起蛍光顕微鏡に適用できる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

中心波長が互いに異なるに固定されたパルス光を射出する複数のレーザ光源と、

前記複数のレーザ光源からそれぞれ射出される複数のパルス光を 2 次元的に走査する走査手段と、前記複数のパルス光を複数種類の色素で染色された試料に集光する対物レンズとを有する照明光学系と、

前記走査手段によって走査し、前記対物レンズで集光する前記試料上の各集光位置ごとに、前記中心波長が互いに異なる前記複数のパルス光が順次照射されるように、前記複数のパルス光が前記試料へ向かうタイミングを調整する調整手段と、

前記中心波長が互いに異なる前記複数のパルス光に応じて励起された前記試料の複数種類の色素からそれぞれ発生する複数の蛍光を、前記対物レンズを介して検出する検出手段と

を備えることを特徴とする多光子顕微鏡。

【請求項 2】

前記調整手段は、前記複数のレーザ光源からそれぞれ射出される前記複数のパルス光のうちの基準のパルス光に対して他のパルス光を遅延させて、前記複数のパルス光が異なる中心波長ごとに交互に順番に繰り返されるように調整し、

前記検出手段は、前記試料の複数種類の色素から発生した複数の異なるスペクトルを有する蛍光を、異なるスペクトルを有する蛍光ごとに同時に検出する

ことを特徴とする請求項 1 に記載の多光子顕微鏡。

【請求項 3】

前記調整手段は、前記複数のレーザ光源からそれぞれ射出される複数のパルス光を、所定のタイミングで透過させて、前記複数のパルス光が異なる中心波長ごとに所定の個数を単位として順番に繰り返されるように調整し、

前記検出手段は、前記試料の複数種類の色素から発生した複数の異なるスペクトルを有する蛍光を、前記調整手段による透過のタイミングに同期させて順番に検出する

ことを特徴とする請求項 1 に記載の多光子顕微鏡。

【請求項 4】

前記レーザ光源は、共振器長が短く、超短パルス光を射出する超短パルスレーザ光源である

ことを特徴とする請求項 1 ないし 3 の何れか一項に記載の多光子顕微鏡。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、多光子顕微鏡に関する。

【背景技術】**【0002】**

通常、2 光子励起蛍光顕微鏡では、試料を色素で染色して、近赤外線のパルス状のレーザ（パルス光）で色素を 2 光子吸収により励起し、発生する蛍光を検出することで、画像化が行われる（例えば、特許文献 1 参照）。このとき、励起光の焦点近傍からのみ蛍光が発生するため、線形共焦点顕微鏡と異なり、検出器前にピンホールを配置しなくても 3 次元分解能力をもつという特徴がある。

【0003】

このような 2 光子励起蛍光顕微鏡では、しばしば複数種類の色素で試料を染色し、それぞれの色素の 2 光子吸収効率の高い波長の光で励起することで、各色素から発生する波長の異なる蛍光を検出し、色素ごとに画像化することが行われる。

【0004】

2 光子励起蛍光顕微鏡において、各色素の画像を得る場合には、複数の波長に可変可能な波長可変光源により波長を変えるか、あるいは波長の異なる複数の光源を用意して、順次励起波長を変えてレーザ走査をすることで画像を取得するのが、一般的である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第2848952号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、画像を取得するに際して、上記の方法によりレーザ走査を行う場合、ガルバノミラーなどの走査手段が要因となり試料の同一の場所を走査しても、走査範囲が例えば、1回目と2回目とで完全には一致せず、多少ずれるのが普通である。そのため、取得した各画像には互いにずれが生じることとなり、この画像のずれを起こさない方法が要求されていた。

10

【0007】

本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、複数種類の色素で染色した試料について、各色素から発生する蛍光を検出して画像化する際に、各画像が互いにずれないようにするものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の多光子顕微鏡は、中心波長が互いに異なるに固定されたパルス光を射出する複数のレーザ光源と、前記複数のレーザ光源からそれぞれ射出される複数のパルス光を2次元的に走査する走査手段と、前記複数のパルス光を複数種類の色素で染色された試料に集光する対物レンズとを有する照明光学系と、前記走査手段によって走査し、前記対物レンズで集光する前記試料上の各集光位置ごとに、前記中心波長が互いに異なる前記複数のパルス光が順次照射されるように、前記複数のパルス光が前記試料へ向かうタイミングを調整する調整手段と、前記中心波長が互いに異なる前記複数のパルス光に応じて励起された前記試料の複数種類の色素からそれぞれ発生する複数の蛍光を、前記対物レンズを介して検出する検出手段とを備えることを特徴とする。

20

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、画像のずれを防止できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本発明の第1の実施の形態である2光子励起蛍光顕微鏡の構成の例を示すブロック図である。

【図2】本発明の第2の実施の形態である2光子励起蛍光顕微鏡の構成の例を示すブロック図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

【0012】

図1は、本発明の第1の実施の形態である2光子励起蛍光顕微鏡の構成の例を示すブロック図である。

40

【0013】

2光子励起蛍光顕微鏡1は、2光子吸収の原理を利用して、試料Sに対して単光子励起の場合の励起光の2倍の波長を有する光子を同時に2光子照射することにより、試料Sからの蛍光を観察する多光子顕微鏡である。

【0014】

2光子励起蛍光顕微鏡1は、レーザ光源11₁、ないし11₃、遅延回路12₁及び12₂、ダイクロイックミラー13、14、16、21、及び24、ミラー15、レーザ走査部17、走査レンズ18、第2対物レンズ19、対物レンズ20、結像レンズ22₁、ない

50

し 2 2₃、並びに光検出部 2 3₁ ないし 2 3₃ を含むようにして構成される。

【 0 0 1 5 】

レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ としては、例えば、超小型レーザが用いられる。この超小型レーザは、パルス幅がフェムト秒単位の（例えば100フェムト秒の）超短パルス光を射出する超短パルスレーザにより構成される。より具体的には、超小型レーザは、例えば、多層膜ミラーにより構成される負分散ミラー、レーザ結晶、過飽和吸収ミラー（SESAM）、及び、SESAMと組み合わせたイットリビウム（Yb）ベースの固体レーザなどにより構成され、ソリトンモードロッキング（ソリトン型モード同期）技術を用いることにより、共振器長を数cmと短くしても、モードロッキング状態を安定して維持することが可能な小型の超短パルスレーザにより構成される。このような小型超短パルスレーザの詳細については、例えば、「山添省吾，加藤雅紀，笠松直史，“小型超短パルスレーザ”、富士フィルム研究報告No.54、2009年、P.43-46」（以下、非特許文献 1 という）などに記載されている。

10

【 0 0 1 6 】

非特許文献 1 に記載されている小型超短パルスレーザは、超短パルス光の波長が固定されているため、波長を変更するための可動部を設ける必要がなく、超短パルス光の射出角度が安定しており、さらに上述した技術的特徴により、従来の波長が可変の超短パルスレーザと比較して非常に小さくすることができる。また、この小型超短パルスレーザは、共振器長が短いため、従来の超短パルスレーザと比較して、超短パルス光の繰り返し周波数を大幅に高く設定することができる。例えば、非特許文献 1 には、共振器長を5cm未満とし、超短パルス光の最大繰り返し周波数を2.9GHzに設定できることが記載されている。

20

【 0 0 1 7 】

以上のように構成されるレーザ光源 1 1₁，1 1₂，1 1₃ は、異なる中心波長（波長 1₁，1₂，1₃）に固定された超短パルス光 L₁，L₂，L₃ をそれぞれ射出する。なお、本実施の形態では、試料 S は、3 種類の色素で染色されているものとし、それらの色素の 2 光子吸収効率の高い波長の光として、超短パルス光 L₁，L₂，L₃ が用いられているものとする。

【 0 0 1 8 】

レーザ光源 1 1₁ から射出された超短パルス光 L₁（波長 1₁）は、ダイクロイックミラー 1 3 及び 1 4 を透過して、ミラー 1 5 に到達する。

30

【 0 0 1 9 】

レーザ光源 1 1₂ から射出された超短パルス光 L₂（波長 1₂）は、遅延回路 1 2₁ により所定の時間だけ遅延された後、ダイクロイックミラー 1 3 によりダイクロイックミラー 1 4 の方向に反射され、ダイクロイックミラー 1 4 を透過して、ミラー 1 5 に到達する。

【 0 0 2 0 】

レーザ光源 1 1₃ から射出された超短パルス光 L₃（波長 1₃）は、遅延回路 1 2₂ により所定の時間だけ遅延された後、ダイクロイックミラー 1 3 によりミラー 1 5 の方向に反射され、ミラー 1 5 に到達する。

【 0 0 2 1 】

すなわち、遅延回路 1 2₁ 及び 1 2₂ によって、超短パルス光 L₁ に対して超短パルス光 L₂，L₃ をそれぞれ所定の時間だけ遅延させて、ダイクロイックミラー 1 3 及び 1 4 により混合することで、図中の励起パルス列 A に示すように、3 種類の超短パルス光 L₁，L₂，L₃ が等間隔で順番に繰り返されるようにタイミングを調整する。例えば、励起パルス列 A では、図中右側から左側を時間の方向として、超短パルス光 L₁，L₂，L₃，L₁，L₂，L₃，・・・が異なる中心波長ごとに順番に繰り返されている。以下、調整された超短パルス光 L₁，L₂，L₃ を、超短パルス光 L と称して説明する。

40

【 0 0 2 2 】

超短パルス光 L は、ミラー 1 5 によりダイクロイックミラー 1 6 の方向に反射された後、ダイクロイックミラー 1 6 を透過して、例えばガルバノミラーにより構成されるレーザ

50

走査部 17 に入射する。

【0023】

レーザ走査部 17 は、ダイクロイックミラー 16 からの超短パルス光 L を、3 種類の色素で染色されている試料 S の $X-Y$ 平面（試料 S に照射される超短パルス光 L の光軸に対し直交する平面）で走査させる。すなわち、レーザ走査部 17 による 2 次元的な走査によって、超短パルス光 L は、走査レンズ 18 及び第 2 対物レンズ 19 を経て対物レンズ 20 により集光され、試料 S 上にスポットを形成する。

【0024】

これにより、3 種類の色素で染色された試料 S では、超短パルス光 L のスポットが形成された領域（集光位置）ごとに、中心波長が異なる 3 種類の超短パルス光 L_1, L_2, L_3 により順番に励起されて、各色素からスペクトル（波長）の異なる蛍光が発せられることになる。すなわち、レーザ走査部 17 によって、試料 S 上のある一点（集光位置）に対して、中心波長が異なる 3 種類の超短パルス光 L_1, L_2, L_3 が順番に照射され、ある一点についての照射が終了すると、次の点以降の点についても同様に照射が繰り返される。

10

【0025】

このようにして励起された色素から発生する蛍光（3 種類の異なるスペクトルを有する蛍光）は、観察光となって、対物レンズ 20、第 2 対物レンズ 19、及び走査レンズ 18 を経てレーザ走査部 17 に入射する。レーザ走査部 17 は、試料 S に照射した超短パルス光 L を走査したときと同様の角度で試料 S からの蛍光を反射することで、その蛍光をデスキャンしてダイクロイックミラー 16 に入射する。

20

【0026】

ダイクロイックミラー 16 は、レーザ走査部 17 から入射した、試料 S の励起された色素から発生する 3 種類の異なるスペクトルを有する蛍光を、ダイクロイックミラー 21 の方向に反射させて、ダイクロイックミラー 21 及び 24 により、その蛍光の強度を分離させる。すなわち、ダイクロイックミラー 21 は、ダイクロイックミラー 16 から入射された蛍光のうち、超短パルス光 L_1 により励起されて発生した蛍光を透過し、それ以外の蛍光をダイクロイックミラー 24 の方向に反射させる。

【0027】

ダイクロイックミラー 21 により透過された蛍光は、結像レンズ 22₁ を通過して、光検出部 23₁ に入射する。光検出部 23₁ は、例えば PMT (photo multiplier tube: 光電子増倍管) などにより構成され、結像レンズ 22₁ により光検出部 23₁ の受光面において結像した蛍光を受光し、その蛍光の強度に応じた電気信号を出力する。

30

【0028】

ダイクロイックミラー 24 は、ダイクロイックミラー 21 により反射された蛍光のうち、超短パルス光 L_2 により励起されて発生した蛍光を結像レンズ 22₂ の方向に反射し、それ以外の超短パルス光 L_3 により励起されて発生した蛍光を透過する。

【0029】

ダイクロイックミラー 24 により反射された蛍光は、結像レンズ 22₂ を通過して、例えば PMT などにより構成される光検出部 23₂ に入射され、その蛍光の強度に応じた電気信号として出力される。一方、ダイクロイックミラー 24 により透過された蛍光は、結像レンズ 22₃ を通過して、例えば PMT などにより構成される光検出部 23₃ に入射され、その蛍光の強度に応じた電気信号として出力される。

40

【0030】

光検出部 23₁ ないし 23₃ から出力された電気信号は、パーソナルコンピュータ 2A に入力される。これらの電気信号は、それぞれ超短パルス光 L_1 ないし L_3 により励起されて発生した蛍光の強度に応じたものとなるので、光検出部 23₁ ないし 23₃ から同時に出力される電気信号は、同一の集光位置における色素から発生した蛍光の強度となる。従って、パーソナルコンピュータ 2A は、光検出部 23₁ ないし 23₃ から同時に出力される電気信号に対して所定の画像処理を施すことで、観察画像として、各色素から発生す

50

る蛍光画像を生成することができる。パーソナルコンピュータ 2 A は、生成した蛍光画像をモニタ 2 B に表示したり、蛍光画像のデータを記録したりする。なお、この蛍光画像であるが、試料 S 上のある一点において、3 種類の超短パルス光 L により色素が励起されれば 3 種類の色素から発生する蛍光が検出され、3 種類のうちの 2 種類の超短パルス光 L により色素が励起されれば 2 種類の色素から発生する蛍光が検出され、3 種類のうちの 1 種類の超短パルス光 L により色素が励起されれば 1 種類の色素から発生する蛍光が検出されるので、それらの検出された電気信号に対応する画像となる。また、3 種類の超短パルス光 L をあてても発現しない試料 S 上の点からは、蛍光が検出されないことになる。

【0031】

そして、この蛍光画像は、試料 S 上のある一点に対する走査を複数回行わずに、1 回の走査により取得したものであるため、複数回の走査により走査範囲が一致しないといったことは起こらない。これにより、3 種類の色素で染色した試料 S について、各色素から発生する蛍光を検出して画像化するに際して、各画像が互いにずれることを防止できる。

【0032】

以上のように、図 1 の 2 光子励起蛍光顕微鏡 1 においては、レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ から射出された異なる中心波長（波長 1₁, 1₂, 1₃）を有する同一繰り返し 3 種類の超短パルス光 L₁, L₂, L₃ が、ダイクロイックミラー 1 3 及び 1 4 により混合され、遅延回路 1 2₁ 及び 1 2₂ により 3 種類の超短パルス光 L₁, L₂, L₃ が順番に等間隔に並ぶように調整される。そして、超短パルス光 L₁, L₂, L₃ が、3 種類の色素で染色された試料 S 上に集光されて 2 次元的に走査され、それにより励起された色素から発生する 3 種類の異なるスペクトルを有する蛍光の強度が、ダイクロイックミラー 2 1 及び 2 4 により分離され、スペクトルが異なる蛍光ごとに、3 つの光検出部 2 3₁ ないし 2 3₃ により同時に検出される。これにより、1 回の励起光焦点走査で、同時に各色素から発生する蛍光に対応する蛍光画像が取得される。

【0033】

このように、第 1 の実施の形態である 2 光子励起蛍光顕微鏡 1 では、複数種類の色素で染色した試料 S を超短パルス光 L で励起して、各色素から発生する蛍光を検出して画像化するに際して、各画像の測定範囲が一致するので、画像のずれを防止することができる。

【0034】

また、2 光子励起蛍光顕微鏡 1 では、レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ として、従来と比べて共振器長が短く、超短パルス光の繰り返し周波数を大幅に高く設定することが可能な小型超短パルスレーザを用いるため、波長が固定された小型超短パルスレーザを複数用意する必要があるが、高価な波長可変光源を用いる場合と比べて、安価に構成することができる。

【0035】

なお、レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ から射出される超短パルス光 L₁, L₂, L₃ であるが、図 1 の励起パルス列に示したように、完全に等間隔である必要はなく、それらのパルス列が重ならない程度に遅延回路 1 2₁ 及び 1 2₂ により遅延量を調整すればよい。この場合、試料 S 上の一点あたり、3 種類のパルスが同数入射するように、レーザ走査部 1 7 を構成するガルバノミラーと光検出部 2 3₁ ないし 2 3₃ を同期させる制御を行うことになる。ただし、超短パルス光 L は、高繰り返しのパルスレーザであるため、仮に同期をとらず連続的にガルバノミラーでレーザ走査したとしても、たかだかパルス 1 つ分の誤差しかのらないので、大きな問題にはならない。

【0036】

また、第 1 の実施の形態では、3 つのレーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ により、中心波長の異なる 3 種類の超短パルス光 L₁, L₂, L₃ を試料 S に照射して、それにより得られる蛍光を、3 つの光検出部 2 3₁ ないし 2 3₃ により検出する例について説明したが、超短パルス光 L の数は 3 種類に限られるものではない。すなわち、3 種類の超短パルス光 L は一例であって、中心波長の異なる複数種類の超短パルス光 L を試料 S に照射できればよく、2 光子励起蛍光顕微鏡 1 では、超短パルス光 L の種類に応じたレーザ光源 1 1、遅延

10

20

30

40

50

回路 1 2、及び光検出部 2 3、並びにその他の光学部材が配置されることになる。その場合、試料 S は、複数種類の超短パルス光 L に対応した複数種類の色素で染色されることになる。

【0037】

図 2 は、本発明の第 2 の実施の形態である 2 光子励起蛍光顕微鏡の構成の例を示すブロック図である。なお、図中、図 1 と対応する部分については同一の符号を付してあり、その説明は適宜省略する。

【0038】

図 2 の 2 光子励起蛍光顕微鏡 5 1 は、図 1 の 2 光子励起蛍光顕微鏡 1 と比較して、遅延回路 1 2₁ 及び 1 2₂ の代わりに、レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ から射出される超短パルス光 L₁、L₂、L₃ の順番を調整するためのシャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ と、それらのシャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ を制御するためのコントローラ 6 1 が設けられる点が変わる。また、光検出部 2 3 の数が、3 つから 1 つに減少し、それに伴って結像レンズ 2 2 も 1 つになり、さらに、光検出部 2 3 だけに蛍光を結像させればよいから、ダイクロイックミラー 2 1、2 4 が取り除かれている点も異なる。

【0039】

シャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ は、例えば、AOM(音響光学素子)や AOFT(音響光学可変フィルタ)等の高速シャッタ素子であり、コントローラ 6 1 の制御にしたがって、レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ から射出された超短パルス光 L₁ ないし L₃ による試料 S の照射を、それぞれオン/オフにより調整する。

【0040】

すなわち、シャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ は、レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ から射出される超短パルス光 L₁ ないし L₃ をそれぞれ順番に透過させることで、ダイクロイックミラー 1 3 及び 1 4 で混合させたとき、図中の励起パルス列 B に示すように、3 種類の超短パルス光 L₁、L₂、L₃ が、所定の個数ずつ順番に繰り返されるようにタイミングを調整する。例えば、励起パルス列 B では、図中右側から左側を時間の方向として、超短パルス光 L₁、L₁、L₂、L₂、L₃、L₃、・・・のように、超短パルス光 L₁、L₂、L₃ が 2 個ずつ順番に繰り返されている。なお、各超短パルス光 L の繰り返し個数の単位は任意であり、さらにその単位が各超短パルス光ごとに必ずしも一致することを要しない。なぜなら、例えば、超短パルス光 L₁、L₂、L₃ がそれぞれ、10 個、10 個、11 個ずつの単位で繰り返されたとしても、ただだかパルス 1 つ分の誤差しかのらないため、特に観察には影響は及ぼさないからである。

【0041】

レーザ走査部 1 7 には、図中の励起パルス列 B に示す順番で 3 種類の超短パルス光 L₁、L₂、L₃ が入射される。レーザ走査部 1 7 は、それらの超短パルス光 L を、3 種類の色素で染色された試料 S に集光し、2 次元的に走査を行う。すなわち、試料 S 上のある一点(集光位置)に対して、中心波長が異なる 3 種類の超短パルス光 L が所定の単位で繰り返し照射され、ある一点についての 3 種類の超短パルス光 L の照射が終了すると、次の点以降についても同様の照射が繰り返される。そうすると、先に述べたように、試料 S では励起された色素から蛍光が発せられ、その蛍光は、レーザ走査部 1 7 によりデスクャンされた後、ダイクロイックミラー 1 6 に入射される。

【0042】

ダイクロイックミラー 1 6 は、レーザ走査部 1 7 から入射した蛍光を、結像レンズ 2 2 の方向に反射させることで、光検出部 2 3 の受光面には、結像レンズ 2 2 において結像した蛍光が受光される。この蛍光は、3 種類の超短パルス光 L が所定の単位で繰り返し照射されることで、励起された色素から発生する蛍光であり、照射された各超短パルス光 L に応じて 3 種類の異なるスペクトル(波長)を有するものとなる。光検出部 2 3 は、受光した蛍光の強度に応じた電気信号をパーソナルコンピュータ 2 A に出力する。

【0043】

パーソナルコンピュータ 2 A には、光検出部 2 3 からの電気信号とともに、コントロー

10

20

30

40

50

ラ 6 1 から、超短パルス光 L をどの順番で照射しているかを通知するための信号（以下、通知信号という）が入力される。すなわち、コントローラ 6 1 は、シャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ を制御することで、レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ から射出される超短パルス光 L₁ , L₂ , L₃ の順番の調整を行っており、この順番を示す通知信号をパーソナルコンピュータ 2 A に出力することで、パーソナルコンピュータ 2 A は、光検出部 2 3 から時系列で出力される電気信号の示す蛍光の強度を、シャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ の制御、つまり、試料 S に照射している超短パルス光 L に関する情報である通知信号に同期させて順番に取得することができる。

【 0 0 4 4 】

具体的には、コントローラ 6 1 によるシャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ の制御により、例えば、図中の励起パルス列 B に示すように、超短パルス光 L₁ , L₂ , L₃ が 2 個ずつ順番に繰り返される場合、パーソナルコンピュータ 2 A には、それらの超短パルス光 L の順番を示す通知信号と、それらの超短パルス光 L により順番に励起されて発生した蛍光の強度に応じた電気信号が同期して入力されることになる。パーソナルコンピュータ 2 A は、コントローラ 6 1 からの通知信号に基づいて、光検出部 2 3 から入力された電気信号に対して所定の画像処理を施すことで、各色素から発生する蛍光に応じた蛍光画像を生成できる。

10

【 0 0 4 5 】

そして、この蛍光画像は、試料 S 上のある一点に対する走査を複数回行わずに、1 回の走査により取得したものであるため、複数回の走査により走査範囲が一致しないといったことは起こらない。これにより、3 種類の色素で染色した試料 S について、各色素から発生する蛍光を検出して画像化するに際して、各画像が互いにずれることを防止できる。

20

【 0 0 4 6 】

以上のように、図 2 の 2 光子励起蛍光顕微鏡 5 1 においては、レーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ から射出された異なる中心波長（波長₁ , ₂ , ₃）を有する同一繰り返しの 3 種類の超短パルス光 L₁ , L₂ , L₃ が、シャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ を順番に透過するように、コントローラ 6 1 により調整され、ダイクロイックミラー 1 3 及び 1 4 により混合される。そして、所定の個数ずつ順番に繰り返される超短パルス光 L₁ , L₂ , L₃ が、3 種類の色素で染色された試料 S 上に集光されて 2 次元的に走査され、それにより励起された色素から発生する 3 種類の異なるスペクトルを有する蛍光の強度が、コントローラ 6 1 によるシャッタ 6 2₁ ないし 6 2₃ の制御、つまり、試料 S に照射している超短パルス光 L に関する情報である通知信号（超短パルス光 L の透過のタイミング）に同期して順番に検出される。これにより、1 回の励起光焦点走査で、測定範囲の一致した 3 種類の色素から発生する蛍光に対応する蛍光画像が同時に取得される。

30

【 0 0 4 7 】

このように、第 2 の実施の形態である 2 光子励起蛍光顕微鏡 5 1 では、複数種類の色素で染色した試料 S を超短パルス光 L で励起して、各色素から発生する蛍光を検出して画像化するに際して、各画像の測定範囲が一致するので、画像のずれを防止することができる。

【 0 0 4 8 】

なお、第 2 の実施の形態では、3 つのレーザ光源 1 1₁ ないし 1 1₃ により、中心波長の異なる 3 種類の超短パルス光 L₁ , L₂ , L₃ を試料 S に照射して、それにより得られる蛍光を、1 つの光検出部 2 3 により検出する例について説明したが、超短パルス光 L の数は 3 種類に限られるものではない。すなわち、3 種類の超短パルス光 L は一例であって、中心波長の異なる複数種類の超短パルス光 L が試料 S に照射できればよく、2 光子励起蛍光顕微鏡 5 1 では、コントローラ 6 1 により試料 S に照射している超短パルス光 L に関する情報を取得して光検出部 2 3 から出力される電気信号と同期させることができるので、光検出部 2 3 は 1 つのまま、超短パルス光 L の種類に応じたレーザ光源 1 1 及びシャッタ 6 2、並びにその他の光学部材が配置されることになる。その場合、試料 S は、複数種類の超短パルス光 L に対応する複数種類の色素で染色されることになる。

40

50

【 0 0 4 9 】

なお、本発明の実施の形態は、上述した実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能である。

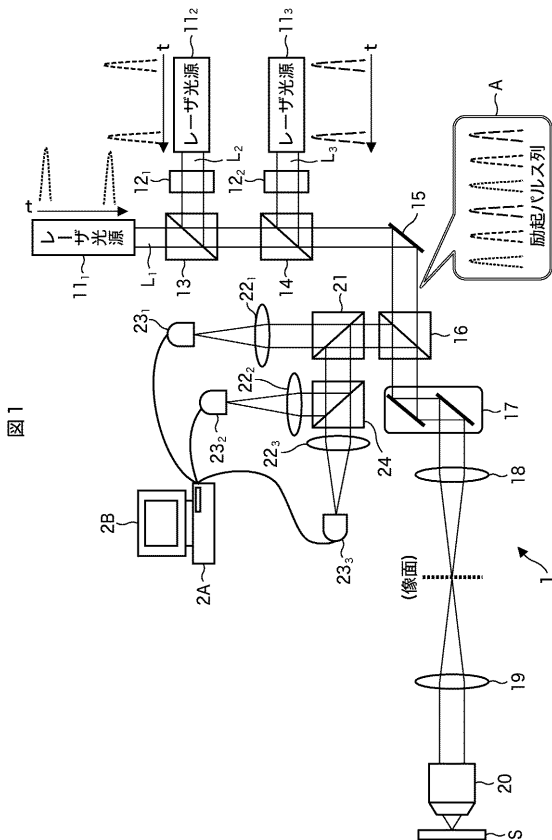
【 符号の説明 】

【 0 0 5 0 】

1, 51 2光子励起蛍光顕微鏡, 2A パーソナルコンピュータ, 2B モニタ,
11₁, 11₂, 11₃ レーザ光源, 12₁, 12₂ 遅延回路, 13, 14,
16, 21, 24 ダイクロイックミラー, 15 ミラー, 17 レーザ走査部,
18 走査レンズ, 19 第2対物レンズ, 20 対物レンズ, 22, 22₁,
22₂, 22₃ 結像レンズ, 23, 23₁, 23₂, 23₃ 光検出部, 61 コ
ントローラ, 62₁, 62₂, 62₃ シャッタ, L₁, L₂, L₃ 超短パルス光

10

【 図 1 】



【 図 2 】

