

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4386462号
(P4386462)

(45) 発行日 平成21年12月16日 (2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月9日 (2009.10.9)

(51) Int. Cl. F 1
GO 2 B 21/00 (2006.01) GO 2 B 21/00
GO 2 B 26/12 (2006.01) GO 2 B 26/10 1 O 2

請求項の数 8 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平10-501198	(73) 特許権者	エボテク ビオシステム アーゲー
(86) (22) 出願日	平成9年6月11日 (1997.6.11)		ドイツ, ハンブルク デー—2 2 5 2 5
(65) 公表番号	特表2001-502066 (P2001-502066A)		シュナッケンブルガレー 1 1 4
(43) 公表日	平成13年2月13日 (2001.2.13)	(74) 代理人	弁理士 河野 登夫
(86) 国際出願番号	PCT/EP1997/003022		
(87) 国際公開番号	W01997/048001	(72) 発明者	フメル, ステファン
(87) 国際公開日	平成9年12月18日 (1997.12.18)		ドイツ, ハンブルク デー—2 2 6 0 7
審査請求日	平成16年4月2日 (2004.4.2)		グロース フロトベカー シュトラーセ
(31) 優先権主張番号	19623230.9		1
(32) 優先日	平成8年6月11日 (1996.6.11)	(72) 発明者	カスク, ピート
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		エストニア, ハルク エーエー 3 0 5 1
			ウウス 5—3
		審査官	下村 一石
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被観察ボリュームの光学測定のための共焦点顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

励起光を発生する光源と、
 光源から照射された励起光を反射するダイクロイックミラーと、
 ダイクロイックミラーにより反射された励起光を受光し、該光を被観察ボリュームに焦点を絞り込む、機械的開口を有する対物レンズ配列と、
 被観察ボリュームから、ダイクロイックミラーを通過してきた光を受光するレンズ配列及び検出器を有する観察用光学品配列と
 を備えた、被観察ボリュームの光学検知のための共焦点顕微鏡において、
 光源とダイクロイックミラーとの間に、励起光を平行光にして広げるための調整用光学品が配列されており、
 ダイクロイックミラーと対物レンズ配列との間に、標準位置を中心として振動するように配列された対物レンズ側偏向ミラーを有する偏向ミラー配列が配置されており、
 これにより、対物レンズ側偏向ミラーの振動によって、反射されたそれぞれの励起光の光軸が、対物レンズ配列の機械的開口の領域に存在する実質的に共通の交点で交わり、
 対物レンズ側偏向ミラーの振動軸が、対物レンズ側偏向ミラーがその標準位置にある場合に、対物レンズ側偏向ミラーが含まれる平面と、反射された励起光の光軸の前記共通の交点を通るとともに、反射光の光軸に垂直である平面とが交差する線分に一致し、
 対物レンズ側偏向ミラーにおける励起光の入射角は、対物レンズ側偏向ミラーにより反射された励起光の総ての光軸がほぼ交わる前記交点が、対物レンズ配列の機械的開口の中心

10

20

領域に位置せしめられるように選定されている

ことを特徴とする被観察ボリュームの光学検知のための共焦点顕微鏡。

【請求項 2】

偏向ミラー配列は、標準位置を中心として振動するように配列された光源側偏向ミラーを含み、

光源側偏向ミラーの振動角度範囲は、該光源側の平面偏向ミラーによって反射された励起光の光軸の総てが実質的に一の交点で交差するように制限されており、

光源側偏向ミラーの振動軸が、光源側偏向ミラーがその標準位置にある場合に、光源側偏向ミラーにより規定される平面と、反射された励起光の光軸の共通の前記交点を通るとともに、反射光の光軸に垂直である平面とが交差する線分に一致し、

対物レンズ側偏向ミラーにおける励起光の入射角は、光源側偏向ミラーにより反射された励起光の総ての光軸がほぼ交わる前記交点が、対物レンズ側偏向ミラーにより規定される平面に位置せしめられるように選定されている

ことを特徴とする請求項 1 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 3】

偏向ミラー配列の対物レンズ側偏向ミラー及び光源側偏向ミラーは、それぞれ標準位置の両側に 5° ずつまで振動することができることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 4】

偏向ミラー配列の対物レンズ側偏向ミラー及び光源側偏向ミラーは、それぞれ標準位置の両側に 3° ずつまで振動することができることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 5】

偏向ミラー配列の対物レンズ側偏向ミラー及び光源側偏向ミラーは、それぞれ標準位置の両側に 2° ずつまで振動することができることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 6】

偏向ミラー配列の対物レンズ側偏向ミラー及び光源側偏向ミラーは、それぞれ、長軸と長軸に垂直な直交軸とを有し、丸いふち又は多角形のふちを有する楕円形に設計されており、2つの楕円形の対物レンズ側偏向ミラー及び光源側偏向ミラーが、2つの楕円の長軸が互いに 90° ずれるとともに、 45° で交差するように配列されていることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 7】

偏向ミラー配列の対物レンズ側偏向ミラー及び光源側偏向ミラーは、それぞれ円形であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 8】

光源がレーザ光源であることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の共焦点顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

本発明は、特に蛍光分光法において使用されるような、被観察ボリュームの光学検知のための共焦点顕微鏡に関する。

被観察ボリュームで生じている一連の過程の光学測定に適用される共焦点顕微鏡はPCT/EP 94/00117号公報により周知である。周知の顕微鏡は、特に蛍光相関分光法（FCS: fluorescence correlation spectroscopy）に使用される。周知の顕微鏡は光源を含み、この光源は、特にレーザ光線を発生するレーザ光源である。レーザ光線は、おそらく、レンズ配列によって調整された後で、機械的な開口を有し、観察室に光の焦点を合わせる対物レンズ配列に向けて光線を反射するダイクロイックミラーに照射される。観察室に入射したレーザ光は、その組成に応じて、被観察ボリュームの中の、例えば生物試料の中に蛍光を励起する。結果として生じた蛍光は対物レンズ配列に到達し、そこからダイクロイックミラーを通過して観察用光学配列に照射される。この観察用光学配列によって、被観察ボリュー

10

20

30

40

50

ムの中の一連の過程を光学的に測定することができる。

周知の共焦点顕微鏡は、一般的に、実用には十分であった。しかし、研究すべき試料によっては、試料の中の蛍光の発生を観察し、また試料の中で生じている過程の定量評価を考慮するのに十分な量の（光学的）データを得るために、比較的長い試験時間を必要とする。

本発明の目的は、蛍光分光法に使用されるべき、被観察ボリウム（被観察体）の光学検知のための共焦点顕微鏡の提供にあり、この顕微鏡は、より短時間での試料の光学検知を考慮している。

本発明によれば、

励起光を発生するための光源と、

光源から照射された励起光を反射するダイクロイックミラーと、ダイクロイックミラーにより反射された励起光を受光し、被観察ボリウムにこの光の焦点を合わせる、機械的開口を有する対物レンズ配列と、

被観察ボリウムから来てダイクロイックミラーを通過した光を受光する観察用レンズ配列と

を備えた共焦点顕微鏡により目的が達成される。

本発明によれば、この共焦点顕微鏡は、

ダイクロイックミラーと対物レンズ配列との間に、対物レンズ側に平面偏向ミラーを有する偏向ミラー配列が位置し、このミラーは標準位置を中心として振動するように配置されているので、

対物レンズ側のミラーの振動によって、反射励起光のそれぞれの光軸が、対物レンズ配列の機械的開口の領域における実質的に共通の交点で交差し、

対物レンズ側偏向ミラーが標準位置にある場合、対物レンズ側の偏向ミラーの振動軸が、対物レンズ側偏向ミラーが含まれる平面の交差線に一致し、この平面は反射励起光の光軸の共通の交点を通して広がり、反射光の光軸に垂直である

ことを特徴とする。

本発明の共焦点顕微鏡は、少なくとも1つの偏向ミラー（対物レンズ側）を含む偏向ミラー配列を備える。この対物レンズ側偏向ミラーは標準位置を中心として振動するように配列されている。この偏向ミラーを振動させると、励起光が対物レンズ配列に照射する角度が変化する。ここで、本発明は、励起光を対物レンズ配列の開口の中で移動させるので、励起光の光線は、いかなる入射角度の場合でも開口の中心に存在する。言い換えれば、対物レンズ側の偏向ミラーの振動によって、反射された励起光のそれぞれの光軸は、機械的開口の領域の中であって、特に励起光の伝播方向においては対物レンズ配列の後ろに位置する、実質的に共通の交点で交差する。ここで、対物レンズ側偏向ミラーがそれを中心として振動する軸は、対物レンズ側の平面偏向ミラーの存在する平面が交差する線に一致する。この平面は、対物レンズ側偏向ミラーが標準位置にある場合は、反射されたそれぞれの励起光の光軸の共通の交点を通り、反射された励起光の光軸に垂直である。

本発明の顕微鏡を用いて、より大径の、広がった光線を、入射角が変化した時にも励起光線の側面側の部分が削られることなく、対物レンズ配列に入射させることができる。本発明によれば、単に平面偏向ミラーを備えるだけで、即ち、精巧な光学要素を必要とせず、このことが達成される。偏向ミラー配列の偏向ミラーは振動駆動機構を有し、標準位置の両側に、好ましくは5°まで振動し、好ましくは、3°まで、特に望ましくは2°ずつ振動する。適した振動駆動機構は、技術上、広く周知である。

本発明の顕微鏡では、被観察ボリウムとダイクロイックミラーとの間の励起用光学品は、ダイクロイックミラーの後ろに配列されている観察用光学品配列により完全なものになる検知用光学品の部分も構成している。従って、本発明の顕微鏡は、確実に共焦点システムである。

むしろ、本発明の共焦点顕微鏡の偏向ミラー配列は、既存の共焦点顕微鏡のバックアップ用光学品であるので、既存の共焦点顕微鏡の光学的な構成の邪魔にならずに、これらに付け加えられ得る。一般に、既存の共焦点顕微鏡の励起光は、偏向ミラー配列を介して対物

10

20

30

40

50

レンズに直接、入射される広がった平行光である。この目的のために、偏向ミラー配列は、固定された顕微鏡の（筒）の開口の中に、単にねじ込むだけでよい。既存の顕微鏡の対物レンズ配列は、偏向ミラー配列そのものに直接的に搭載されている。

偏向ミラーの使用は、対物レンズ配列により反射された励起光を一次元の逆方向に、即ち、試料を通して線状に、前後に動かすことを可能にする。被観察ボリューム（即ち、焦点を絞った励起光）を、試料を通して二次元的に動かすために、本発明の好適な一実施例は、対物レンズ側偏向ミラーとダイクロイックミラーとの間に配列された、1つの光源側偏向ミラーの追加使用に備える。光源側偏向ミラーもまた、標準位置を中心として振動するので、光源側偏向ミラーが振動した場合、反射されたそれぞれの励起光の光軸は、対物レンズ側偏向ミラーの平面の領域にある、実質的に共通の交点でほぼ交差する。両方の偏向ミラーは互いに直角の振動軸を中心として振動する。光源側偏向ミラーの振動軸は、光源側偏向ミラーの平面と、光源側偏向ミラーが標準位置にある場合に、反射された励起光の光軸の共通の交点を通るとともに、反射光の光軸に垂直である平面とが交わる線分と一致する。互いに垂直な軸を中心として振動する2つの偏向ミラーを使用することにより、焦点を絞られた光は、試料を通して面状に、即ち二次元的に移動することができる。

本発明の共焦点顕微鏡の本質的な特徴は、2つの偏向ミラーの振動軸の独特な配列により、いかなる入射角の励起光も、部分的に削られることなく、対物ライト配列の機械的開口に入射することが実現される。本発明によれば、平面偏向ミラー、即ち単純な構造のミラーだけが使用されている。これらの偏向ミラーは円形であっても楕円形であってもよい。後者の場合、ふちは丸めてあっても、多角形でもよい。それぞれのミラーが、長軸と、長軸に対して垂直な直交軸とを有するような楕円形の偏向ミラーが使用される場合、2つの偏向ミラーは、両方の長軸が互いに90°をなし、また45°で交わるように、位置をずらして配列されることが好ましい。

以下、本発明の一実施例を、図とともに詳細に説明する。

図1は、試料を通して被観察ボリュームを動かすことによって検査対象の試料を試験する偏向ミラー配列を有する共焦点顕微鏡の光源、被観察ボリューム、及び検知器の間の光路の概略図、

図2は、被観察ボリュームを一次元的に動かす偏向ミラーの配列を説明するための、偏向ミラー配列の簡略図、

図3は、2つの偏向ミラー、及び対物レンズ配列の斜視図である。

図1は、共焦点顕微鏡10における光路の概略図である。共焦点顕微鏡10は、励起光14を発するレーザ光源12を含む。励起光14は、励起光線を広げ、また平行にする調整用光学品16に入射する。調整用光学品16の後ろで、励起光線は、励起光14の光軸に対して45°の角度に配されているダイクロイックミラー18に照射される。ダイクロイックミラー18は、図2及び3に関連付けて後述される偏向ミラー配列20に向けて励起光を反射する。励起光14は、偏向ミラー配列20から、対物レンズ配列24の機械的開口22を通り、これにより被観察ボリューム26の中に絞り込まれる。被観察ボリューム26の中で、励起光14は検査対象の試料の中に蛍光を励起する。この蛍光は、対物レンズ配列24及び偏向レンズ配列20の中を進んでダイクロイックミラー18に達し、これを通過して観察用光学品配列28に入射する。観察用光学品配列28はレンズ配列30と、検出器32とを含む。

偏向ミラー配列20の構成を、図2及び3を参考にして以下に説明する。偏向ミラー配列20は2つの偏向ミラー34、36を含み、偏向ミラー34は光路上の対物レンズ24に面しており（対物レンズ側偏向ミラー）、一方偏向ミラー36はダイクロイックミラー18と対物レンズ側偏向ミラー34との間に配置されている（光源側偏向ミラー）。図2は、図3の矢符IIの方向から見た側面図であって、光源側偏向ミラー36は簡略のため図示されていない。図2に示すように、励起光14は実質的に45°で、励起光を対物レンズ配列24に向けて反射する対物レンズ側偏向ミラー34に照射され、そこで開口22を通過する。対物レンズ側偏向ミラー34は平面ミラーであり、振動軸40を中心として前後に振動するアーム38の上に配置されている。標準位置（入射した励起光14に対して45°の方向）を中心とした偏向ミラー34の約±2°ずつの振動によって、励起光の偏向が変化し、反射されたそれぞれの励起光の光軸

が交点42で交わる。この交点42は対物レンズ配列24の開口22のすぐ後ろに位置している。これを実現するために、振動軸40は、平面ミラー34により規定される平面46の中に位置している。さらに、振動軸40は、偏向ミラー34が標準位置にある場合に、励起光48に垂直な方向に広がる平面46の中にある。言い換えれば、振動軸40は平面44と46とが交わる線に一致する。

光源側ミラー36は、ミラー34と全く同様にして配置されている。このことは、偏向ミラー36が振動軸52を中心として振動するアーム50の上に搭載されていることを意味している。この振動軸52は、平面偏向ミラー34により規定される平面54と、偏向ミラー36が標準位置にある場合に、偏向ミラー36が振動した時に反射される光の共通の交点を通るとともに、反射光60に垂直である平面56とが交差する線分である。言い換えれば、振動軸52は、平面54と56とが交わる線分に一致する。

10

偏向ミラー配列20の2つの偏向ミラー34及び36は、円形であっても、またふちのかどが残っているか、又はふちが丸められた楕円形であってもよい。2つの偏向ミラー34及び36は、特に、線形倍振動（例えば正弦波形、長方形、三角形、鋸歯形）により駆動される。このような駆動機構はそれ自体が周知である。2つの偏向ミラー34及び36が振動するための周波数、振幅、及び位相関係は別々に調整することができる。これらのパラメーターが何らかの関係で変化すると、検査対象の全領域（試料）を走査するリサーチの図形が生成される。これらの図形は、まったく数学的正確さで資料を提供し、分析のために考慮に入れることができる。

アーム38, 50の相対的な寸法と、2つの振動軸40及び52の配列及び間隔とは、図3に示された距離によって表されており、同じ長さの間隔及び距離には同一参照符号が付されている。以下の関係が当てはまる。

20

$$L\ 1\ A = L\ 1\ B$$

$$L\ 1\ A = L\ 3\ B$$

$$L\ 3\ B = L\ 1\ B + L\ 2$$

$$L\ 4 = \sqrt{2} \cdot L\ 3\ A$$

$$L\ 5 = \sqrt{2} \cdot L\ 1\ B$$

30

【図 1】

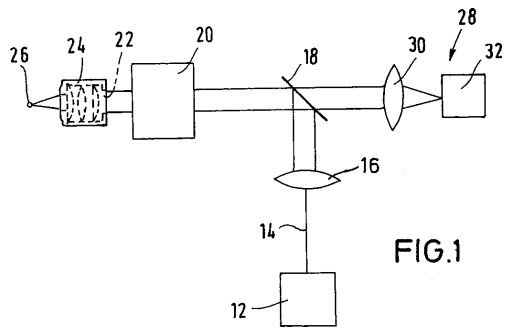
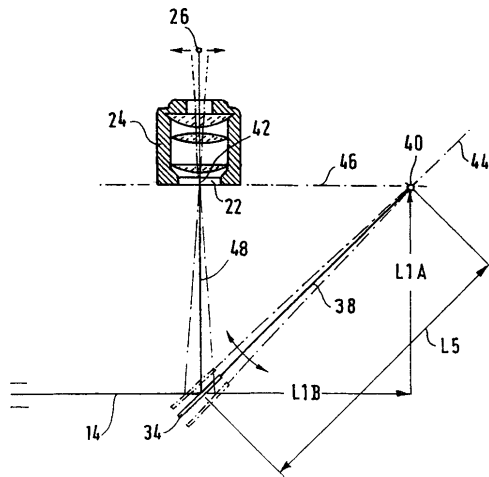
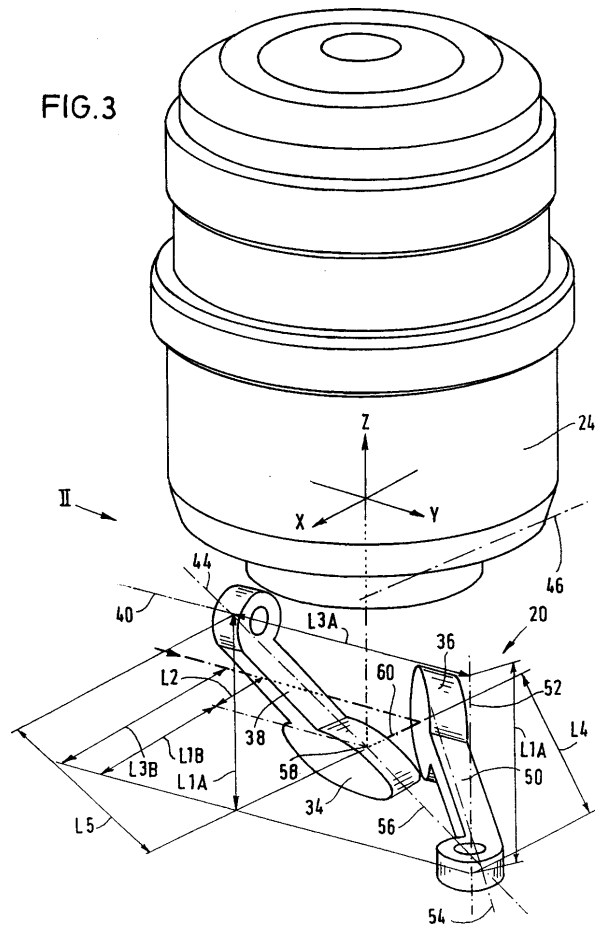


FIG.1



【図 3】

FIG.3



フロントページの続き

(56)参考文献 特表平05-503149(JP,A)
特開平07-270307(JP,A)
特開平06-202023(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
G02B 21/00 - 21/36