

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 12 月 6 日(06.12.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/164811 A1

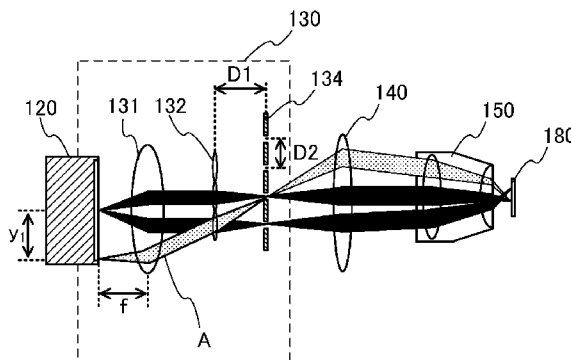
- (51) 国際特許分類:
G02B 21/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/002598
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 13 日(13.04.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-123041 2011 年 6 月 1 日(01.06.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY
CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP];
〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目
Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 永井 健治
(NAGAI, Takeharu). 齊藤 健太 (SAITO, Kenta).
- (74) 代理人: 鷲田 公一 (WASHIDA, Kimihito); 〒
1600023 東京都新宿区西新宿 1-2-3-7 新宿
ファーストウエスト 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[続葉有]

(54) Title: CONFOCAL SCANNER UNIT AND CONFOCAL MICROSCOPE

(54) 発明の名称: 共焦点スキャナユニットおよび共焦点顕微鏡

[図6]



$$\frac{y_1}{f} \geq \frac{D_2}{D_1} \quad \dots (1)$$

(57) Abstract: A confocal scanner unit has: a collimator lens that collimates light emitted from a multimode optical fiber; a micro-lens array disk having multiple micro-lenses that focus the collimated light; and a Nipkow disk that is arranged parallel to the micro-lens array disk and has multiple pinholes at positions corresponding to the light focal points of the multiple micro-lenses. When the focal distance of the collimator lens is f (mm), the radius of the core of the multimode optical fiber is y_1 (mm), the distance between the centers of the micro-lens array disk and the Nipkow disk is D_1 (mm), and the distance between the centers of the pinholes of the Nipkow disk is D_2 (mm), the expression (1) is satisfied.

(57) 要約: 共焦点スキャナユニットは、マルチモード光ファイバから出射された光をコリメートするコリメータレンズと、コリメート光を集光する複数のマイクロレンズを有するマイクロレンズアレイディスクと、マイクロレンズアレイディスクに対して平行に配置され、かつ複数のマイクロレンズの集光点に対応する位置に複数のピンホールを有するニポウディスクとを有する。コリメータレンズの焦点距離を f (mm) とし、マルチモード光ファイバのコアの半径を y_1 (mm) とし、マイクロレンズアレイディスクとニポウディスクとの中心間距離を D_1 (mm) とし、ニポウディスクにおけるピンホール間の中心間距離を D_2 (mm) としたときに、以下の式 (1) が満たされる。



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 添付公開書類:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称 : 共焦点スキャナユニットおよび共焦点顕微鏡

技術分野

[0001] 本発明は、マイクロレンズアレイディスクおよびニポウディスクを用いたマルチビーム方式の共焦点スキャナユニット、ならびに前記共焦点スキャナユニットを有する共焦点顕微鏡に関する。

背景技術

[0002] 蛍光顕微鏡は、生体内のタンパク質や分子などを観察するための必要不可欠のツールとして、生命科学分野の研究で使用されてきた。特に、共焦点（蛍光）顕微鏡は、厚みのある生体サンプルについて一連の断層像を得ることができるため、生体機能の解明に必須のツールとなっている。従来の共焦点顕微鏡では、光源としてレーザを使用していた（共焦点レーザ顕微鏡）。

[0003] 共焦点顕微鏡では、励起光の焦点をスキャンする必要がある。共焦点顕微鏡のスキャン方式は、ガルバノミラー方式とニポウ（Nipkow）ディスク方式とに大別される。ガルバノミラー方式では、試料中の１点にビームを集光して、このビームをラスタースキャンする（シングルビームスキャン）。この方式では、１枚の共焦点画像（１０００×１０００ピクセル）を得るのに１秒程度の時間がかかってしまう。一方、ニポウディスク方式では、ニポウディスクと称される、複数のピンホールが形成された円板を使用する。ニポウディスク方式では、回転しているニポウディスクに励起光を面照射して、多数（例えば、１０００本）のビームを生成する。そして、生成された多数のビームで、並行して試料をスキャンする（マルチビームスキャン）。この方式では、例えば１／２０００秒で１枚の共焦点画像（１０００×１０００ピクセル）を得ることができる。

[0004] ニポウディスク方式の共焦点顕微鏡において、ニポウディスクに励起光を直接照射すると、ピンホールを通過できる励起光の割合は１％程度となってしまう、明るい共焦点画像を得ることができない。この問題を解決するため

、マイクロレンズアレイディスクとニポウディスクとを組み合わせ使用する共焦点スキャナユニットが開発されている。

[0005] 図1は、従来の共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。図1に示されるように、従来の共焦点顕微鏡10は、レーザ光源20、シングルモード光ファイバ30、従来の共焦点スキャナユニット40、第1の結像レンズ50、対物レンズ60およびCCDカメラ70を有する。共焦点スキャナユニット40は、コリメータレンズ41、ミラー42、マイクロレンズアレイディスク43、ダイクロイックミラー44、ニポウディスク45および第2の結像レンズ46を有する。

[0006] 図1に示されるように、従来の共焦点顕微鏡10では、レーザ光源20から出射された励起光は、シングルモード光ファイバ30内を伝播し、コリメータレンズ41によりコリメートされる。コリメートされた励起光は、マイクロレンズアレイディスク43のマイクロレンズにより集光され、ニポウディスク45のピンホールを通過する。ピンホールを通過した励起光は、第1の結像レンズ50および対物レンズ60を通過して試料80の焦点面に照射される。試料80から放出された蛍光は、再度ニポウディスク45のピンホールを通過して、ダイクロイックミラー44で反射される。反射した蛍光は、第2の結像レンズ46を通過して、CCDカメラ70により検出される。

[0007] 図1に示されるような従来の共焦点顕微鏡では、光源としてレーザを使用するため、選択できる励起光の波長が限られている。このため、従来の共焦点顕微鏡には、使用するレーザの波長に合わせて蛍光プローブを選択しなければならないという問題がある。また、従来の共焦点顕微鏡には、光源としてレーザを使用するため、セットアップやメンテナンスに要する時間、労力および金銭での負担が非常に大きいという問題もある。これらの問題を解決するために、光源として白色光源（例えば、水銀アークランプやハロゲンランプなど）を使用することが提案されている（例えば、非特許文献1，2参照）。

[0008] たとえば、非特許文献1には、光源としてレーザおよび白色光源（水銀ア

ークランプまたはハロゲンランプ)の両方を備えた共焦点顕微鏡が記載されている。非特許文献1に記載の共焦点顕微鏡では、光源としてレーザを使用する場合には、ニポウディスクを使用して励起光を試料に照射する(共焦点観察)。一方で、光源として水銀アークランプまたはハロゲンランプする場合には、蛍光画像が暗くなることを回避するために、ニポウディスクを使用しないで励起光を試料に照射している(非共焦点観察)。したがって、非特許文献1に記載の共焦点顕微鏡では、白色光源を使用する場合は、ニポウディスクを使用した高速観察を行うことができない。

[0009] 非特許文献2には、光源として水銀アークランプを使用した共焦点顕微鏡が記載されている。図2は、非特許文献2に記載されている従来の共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。図2に示されるように、非特許文献2に記載の共焦点顕微鏡10'は、レーザ光源20(図1参照)の代わりに白色光源20'(水銀アークランプ)を有する。また、共焦点顕微鏡10'は、白色光の光強度のムラを解消するために、シングルモード光ファイバ30(図1参照)の代わりにマルチモード光ファイバ30'を有する。さらに、共焦点顕微鏡10'は、特定波長の蛍光のみを検出するためにフィルタホイール90を有する。非特許文献2に記載の共焦点顕微鏡では、光源として水銀アークランプを使用する場合も、ニポウディスクを使用して励起光を試料に照射する(共焦点観察)。

[0010] 非特許文献2に記載の共焦点顕微鏡を使用することで、使用できる蛍光プローブの種類が制限されることなく、高速で蛍光観察を行うことができる。しかしながら、非特許文献2に記載の共焦点顕微鏡では、励起効率が低くなってしまい、高速観察において十分なシグナルが得られないことがある(後述)。

先行技術文献

非特許文献

[0011] 非特許文献1：蛭川英男, 外3名, 「機能向上を実現した共焦点スキャナCSU-X1を支える新技術 (New technologies for CSU-X1 confocal scanner un

it)」、横河技報 (Yokogawa technical report)、Vol.52, No.1, pp.13-18

非特許文献2: Saito K, et al., "A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time imaging system for cellular structure and function", Cell Struct. Funct., Vol.33, No.1, pp.133-141.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 以上のように、ニポウディスク方式の共焦点スキャナユニットにおいて、光源として白色光源を使用する場合、試料に光を十分に照射することができず、高速観察において十分なシグナルが得られないという問題がある。

[0013] 本発明の目的は、光源として白色光源を使用する場合であっても、高速観察において十分なシグナルを得られるニポウディスク方式の共焦点スキャナユニット、および前記共焦点スキャナユニットを有する共焦点顕微鏡を提供することである。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者は、マルチモード光ファイバのコアの半径、コリメータレンズの焦点距離、マイクロレンズアレイディスクとニポウディスクとの中心間距離、およびニポウディスクにおけるピンホール間の中心間距離が所定の条件を満たすようにコリメータレンズを選択することで、上記課題を解決できることを見出し、さらに検討を加えて本発明を完成させた。

[0015] すなわち、本発明は、以下の共焦点スキャナユニットに関する。

[1] マルチモード光ファイバから出射された光をコリメートするコリメータレンズと；前記コリメータレンズによりコリメートされた光を集光する複数のマイクロレンズを有するマイクロレンズアレイディスクと；前記マイクロレンズアレイディスクに対して平行に配置され、かつ前記複数のマイクロレンズの集光点に対応する位置に複数のピンホールを有するニポウディスクとを有し；前記コリメータレンズは、前記マルチモード光ファイバの出射端の中心部と前記コリメータレンズの中心部との距離が前記コリメータレン

ズの焦点距離 f となるように配置されており；前記コリメータレンズの焦点距離を f (mm) とし、前記マルチモード光ファイバのコアの半径を y_1 (mm) とし、前記マイクロレンズアレイディスクと前記ニポウディスクとの中心間距離を D_1 (mm) とし、前記ニポウディスクにおける前記ピンホール間の中心間距離を D_2 (mm) としたときに、以下の式 (1) が満たされる、共焦点スキャナユニット。

[数1]

$$\frac{y_1}{f} \geq \frac{D_2}{D_1} \quad \dots (1)$$

[0016] また、本発明は、以下の共焦点顕微鏡に関する。

[2] [1] に記載の共焦点スキャナユニットと；励起光を出射する光源と；前記励起光を前記共焦点スキャナユニットに伝播するマルチモード光ファイバとを有する、共焦点顕微鏡。

[3] 前記光源は、白色光源である、[2] に記載の共焦点顕微鏡。

[4] 前記光源は、LED光源、水銀アークランプ、キセノンアークランプまたはハロゲンランプである、[3] に記載の共焦点顕微鏡。

発明の効果

[0017] 本発明の共焦点スキャナユニットは、光源として白色光源を使用する場合であっても、高速観察において十分なシグナルを得ることができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]市販されている従来の共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。

[図2]非特許文献2に記載されている従来の共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。

[図3]本発明の一実施の形態に係る共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。

[図4]図4A、Bは、式(1)の内容を説明するための模式図である。

[図5]図2に示される従来の共焦点顕微鏡の光学系の構成を示す模式図である。

[図6]図3に示される本発明の共焦点顕微鏡の光学系の構成を示す模式図である。

[図7]実施例で構築した光学系の構成を示す模式図である。

[図8]励起光強度の測定結果を示すグラフである。

[図9]蛍光ビーズの蛍光強度の測定結果を示すグラフである。

[図10]図10A～Fは、HeLa細胞の共焦点蛍光画像の撮影結果である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の実施の形態について、図面を参照して詳細に説明する。以下の説明では、本発明の共焦点スキャナユニットを有する共焦点顕微鏡について説明する。

[0020] 図3は、本発明の一実施の形態に係る共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。図3に示されるように、本実施の形態に係る共焦点顕微鏡100は、光源110、マルチモード光ファイバ120、本発明の共焦点スキャナユニット130、第1の結像レンズ140、対物レンズ150、フィルタホイール160およびCCDカメラ170を有する。

[0021] 光源110は、励起光をマルチモード光ファイバ120に出射する。光源110の種類は、特に限定されず、従来から使用されているレーザ光源だけでなく、白色光源などを使用することもできる。白色光源の例には、LED光源、水銀アークランプ、キセノンアークランプ、ハロゲンランプが含まれる。

[0022] マルチモード光ファイバ120は、光源110から出射された励起光を共焦点スキャナユニット130に伝播する。本発明の共焦点顕微鏡では、励起光の光強度のムラを解消するために、シングルモード光ファイバではなくマルチモード光ファイバを使用する（非特許文献2参照）。

[0023] 共焦点スキャナユニット130は、コリメータレンズ131、マイクロレンズアレイディスク132、ダイクロイックミラー133、ニポウディスク134および第2の結像レンズ135を有する。

[0024] コリメータレンズ131は、マルチモード光ファイバ120から出射され

た励起光をコリメートする。コリメータレンズ131は、マルチモード光ファイバ120の出射端の中心部とコリメータレンズの中心部との距離がコリメータレンズの焦点距離 f となるように配置されている（図6参照）。

[0025] マイクロレンズアレイディスク132は、複数のマイクロレンズが配置された円形状の基板である。複数のマイクロレンズは、ニポウディスク134のピンホールと同じパターンで配置されている。マイクロレンズアレイディスク132およびニポウディスク134は、互いに平行になるように連結ドラムで連結されており、回転軸を中心として一体となって回転することができる。

[0026] ニポウディスク134は、複数のピンホールを有する円形状の遮光基板（ピンホールアレイディスク）である。ニポウディスク134は、マイクロレンズアレイディスク132のマイクロレンズの集光点に対応する位置にピンホールを有する。遮光基板の種類は、特に限定されない。たとえば、遮光基板は、その表面に遮光膜を形成されたガラス基板である。ピンホールの配置方式は、特に限定されないが、照度むらおよびスキャンむらを防ぐ観点から等ピッチ螺旋配置が好ましい。等ピッチ螺旋配置でピンホールを配置した場合、互いに隣接するピンホール間の中心間距離が、同一距離となる（後述する「中心間距離 D_2 」）。

[0027] ダイクロイックミラー133は、マイクロレンズアレイディスク132とニポウディスク134との間に配置されている。ダイクロイックミラー133は、マイクロレンズアレイディスク132側から入射する励起光をニポウディスク134側に通過させる。一方、ダイクロイックミラー133は、ニポウディスク134側から入射する蛍光を第2の結像レンズ135側に反射させる。

[0028] 第2の結像レンズ135は、ダイクロイックミラー133で反射された蛍光をCCDカメラ170に結像させる。

[0029] 第1の結像レンズ140および対物レンズ150は、無限補正光学系を構成する。第1の結像レンズ140および対物レンズ150は、ニポウディス

ク 1 3 4 のピンホールを通過した励起光を試料 1 8 0 の焦点面に集光させる。また、第 1 の結像レンズ 1 4 0 および対物レンズ 1 5 0 は、試料 1 8 0 から放出された蛍光をニポウディスク 1 3 4 のピンホールに集光させる。

[0030] フィルタホイール 1 6 0 は、各種フィルタを有しており、試料 1 8 0 から蛍光のうち、特定波長の蛍光のみを通過させる。

[0031] CCDカメラ 1 7 0 は、フィルタホイール 1 6 0 のフィルタを通過してきた蛍光を検出する。

[0032] 次に、図 3 を参照して、共焦点顕微鏡 1 0 0 の動作について説明する。

[0033] 光源 1 1 0 から出射された励起光は、マルチモード光ファイバ 1 2 0 内を伝播し、マルチモード光ファイバ 1 2 0 の出射端から出射される。共焦点スキャナユニット 1 3 0 内において、励起光は、コリメータレンズ 1 3 1 によりコリメートされ、マイクロレンズアレイディスク 1 3 2 に照射される。励起光は、マイクロレンズアレイディスク 1 3 2 の各マイクロレンズの作用により、ニポウディスク 1 3 4 の対応するピンホールにおいて焦点を結ぶ。ピンホールを通過した励起光は、第 1 の結像レンズ 1 4 0 および対物レンズ 1 5 0 を通過して試料 1 8 0 の焦点面に焦点を結ぶ。

[0034] 励起光を受けた試料 1 8 0 は、蛍光を放出する。試料 1 8 0 から放出された蛍光は、第 1 の結像レンズ 1 4 0 および対物レンズ 1 5 0 を通過して共焦点スキャナユニット 1 3 0 内に戻る。蛍光は、再度ニポウディスク 1 3 4 のピンホールを通過して、ダイクロイックミラー 1 3 3 で反射される。反射した蛍光は、第 2 の結像レンズ 1 3 5 およびフィルタホイール 1 6 0 を通過して、CCDカメラ 1 7 0 により検出される。

[0035] ここで、マイクロレンズアレイディスク 1 3 2 およびニポウディスク 1 3 4 を回転させると、ピンホールを通過した複数のビーム（励起光）が、試料 1 8 0 の焦点面を並行してスキャンする（マルチビームスキャン）。また、試料 1 8 0 から放出された蛍光は、同じピンホールを通過した後に、CCDカメラ 1 7 0 の撮像面をスキャンする。これにより、試料 1 8 0 の焦点面の蛍光が、CCDカメラ 1 7 0 により検出される。焦点面以外の光は、ピンホ

ールをほとんど通過できないため、CCDカメラ170に到達することができない。したがって、CCDカメラ170は、試料180の焦点面の蛍光のみからなる共焦点画像を撮影することができる。

[0036] 本発明の共焦点スキャナユニット130は、コリメータレンズ131の焦点距離を f (mm)とし、マルチモード光ファイバ120のコアの半径を y_1 (mm)とし、マイクロレンズアレイディスク132とニポウディスク134との中心間距離を D_1 (mm)とし、ニポウディスク134におけるピンホール間の中心間距離を D_2 (mm)としたときに、以下の式(1)が満たされることを特徴とする。

[数2]

$$\frac{y_1}{f} \geq \frac{D_2}{D_1} \quad \cdots (1)$$

[0037] 上記式(1)において、左辺の「 y_1 (mm) / f (mm)」は、コリメータレンズ131によりコリメートされた励起光の拡散角 θ_1 (rad)を意味する。図4Aに示されるように、コリメータレンズ131の焦点面に半径 y_1 (mm)の光源を置いた場合、拡散角 θ_1 は y_1 / f (rad)となる。

[0038] 一方、上記式(1)において、右辺の「 D_2 (mm) / D_1 (mm)」は、図4Bに示される角度 θ_2 (rad)を意味する。図4Bに示されるように、角度 θ_2 (rad)は、マイクロレンズの中心と対応するピンホールの中心とを結ぶ線(光軸)に対する、マイクロレンズの中心と対応するピンホールに隣接するピンホールの中心とを結ぶ線の角度である。

[0039] したがって、上記式(1)は、以下の式(2)と同じ意味である。前述の通り、 θ_1 は、コリメートされた励起光の拡散角 θ_1 (rad)である。また、 θ_2 は、マイクロレンズを通過した励起光が、対応するピンホールに隣接するピンホールを通過するための角度である。

[数3]

$$\theta_1 \geq \theta_2 \quad \cdots (2)$$

[0040] 図5は、図2に示される従来の共焦点顕微鏡10'の光学系の構成を示す模式図である。図5に示されるように、従来の共焦点スキャナユニット40にマルチモード光ファイバ30'を用いて励起光を導入した場合、マルチモード光ファイバ30'のコアの端部（外周近傍）から出射された光Aは、コリメータレンズ41を通過した後、光軸に対して斜めに進むため、ニポウディスク45のピンホールを通過することができない。すなわち、コアの端部から出射された光Aは、励起光として利用できない。これは、従来の共焦点スキャナユニット40の光学系が、理想的な点光源であるレーザ用に設計されているためである。従来の共焦点スキャナユニット40では、コリメータレンズ41として、焦点距離が長く（例えば、100mm）、開口数の小さい（例えば、0.1以下）レンズを使用していた。このように焦点距離が長いコリメータレンズを使用した場合、上記式（1）を満たすことは困難である。

[0041] 本発明者は、このマルチモード光ファイバのコアの端部から出射された光も励起光として利用することができれば、励起効率を高めることができるのではないかと考えた。そこで、本発明者は、鋭意検討した結果、上記式（1）を満たすように光学系を構築すれば、マルチモード光ファイバのコアの端部から出射された光も励起光として利用できることを見出したのである。

[0042] 図6は、図3に示される本発明の共焦点顕微鏡100の光学系の構成を示す模式図である。図6に示されるように、上記式（1）を満たすように光学系を構築すれば（例えば、焦点距離の短いコリメータレンズ131を選択すれば）、マルチモード光ファイバ120のコアの端部から出射された光Aも、コリメータレンズ131を通過した後、ニポウディスク134のピンホールを通過することができる。このとき、コアの端部から出射された光Aは、マイクロレンズを通過した後、当該マイクロレンズに対応するピンホールに隣接するピンホールを斜めに通過する。ピンホールを斜めに通過した光は、ピンホールを真っ直ぐに通過した光と同様に、試料180の焦点面に焦点を結ぶ。したがって、コアの端部から出射された光Aも、励起光として寄与す

ることができる。

[0043] 以上のように、本発明の共焦点スキャナユニットは、マルチモード光ファイバのコアの端部から出射された光も励起光として利用することができるため、従来の共焦点スキャナユニットよりも励起効率に優れている。

[0044] なお、上記の説明では、本発明の共焦点スキャナユニットを共焦点顕微鏡に適用する例について説明したが、本発明の共焦点スキャナユニットの用途は共焦点顕微鏡に限定されるものではない。たとえば、本発明の共焦点スキャナユニットは、共焦点内視鏡や光干渉断層撮影 (optical coherence tomography ; OCT) 装置などに適用することができる。

[0045] 以下、本発明について実施例を参照して詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

実施例

[0046] 本実施例では、本発明の共焦点スキャナユニットを有する共焦点顕微鏡の性能を評価した結果を示す。

[0047] 1. 光学系の構築

白色光源、マルチモード光ファイバ (APCH1000 ; コアの直径 1 mm、開口数 0.39、長さ 2 m ; Fiberguide industries Inc.)、コリメータレンズ、共焦点スキャナユニット (CSU10 ; 横河電機株式会社)、電動倒立顕微鏡 (エクリプス T i e ; 株式会社ニコン)、フィルタホイール (Ludl Electronic Products Ltd.) および EM-CCD カメラ (ImagEM ; 浜松ホトニクス株式会社) を用いて、光学系を構築した。

[0048] 図 7 は、構築した光学系の構成を示す模式図である。図 7 において、符号 110 は光源 (白色光源)、符号 120 はマルチモード光ファイバ、符号 131 はコリメータレンズ、符号 40 は市販の共焦点スキャナユニット (図 1 参照)、符号 140 は第 1 の結像レンズ、符号 150 は対物レンズ、符号 160 はフィルタホイール、符号 170 は CCD カメラ、符号 180 は試料を示す。

[0049] 図 7 に示されるように、本実施例では、市販の共焦点スキャナユニット 4

0に含まれるコリメータレンズ41（焦点距離100mm以上）の代わりに、倍率4～20倍（焦点距離10～50mm）のレンズをコリメータレンズ131として使用した。図1と図7とを比較するとわかるように、共焦点スキャナユニット40のミラー42を外して、別途設置されたコリメータレンズ131を通過した励起光が共焦点スキャナユニット40のマイクロレンズアレイディスク43に照射されるように、光学系を調整した。いずれのレンズを使用する場合であっても、マルチモード光ファイバ120の出射端は、コリメータレンズ131（またはコリメータレンズ41）の焦点位置に設置した。

[0050] コリメータレンズ131は、倍率4倍のレンズ（Plan Apo 4x；焦点距離50mm、開口数0.20；株式会社ニコン）、倍率10倍のレンズ（Plan Apo 10x；焦点距離20mm、開口数0.45；株式会社ニコン）または倍率20倍のレンズ（Plan Fluor 20x；焦点距離10mm、開口数0.50；株式会社ニコン）を使用した。また、顕微鏡の対物レンズ150は、倍率40倍の油浸レンズ（Plan Fluor 40x；開口数1.30；株式会社ニコン）を使用した。

[0051] 前述の通り、本実施例ではコアの直径が1mmのマルチモード光ファイバを使用している。したがって、倍率4倍のレンズ（焦点距離50mm）を使用した場合、拡散角 θ_1 は0.010radとなる。同様に、倍率10倍のレンズ（焦点距離20mm）を使用した場合、拡散角 θ_1 は0.025radとなり、倍率20倍のレンズ（焦点距離10mm）を使用した場合、拡散角 θ_1 は0.050radとなる。また、共焦点スキャナユニット40に含まれるコリメータレンズ41（焦点距離100mm以上）を使用した場合、拡散角 θ_1 は0.005rad以下となる。

[0052] 一方、共焦点スキャナユニット40に含まれるマイクロレンズアレイディスク43とニポウディスク45との中心間距離D1は、10mmである。また、ニポウディスク45の隣接するピンホールの中心間距離D2は、0.25mmである。したがって、図4Bに示される角度 θ_2 （= $D2/D1$ ）は、0.025radとなる。

[0053] 2. 励起光の強度の評価

本発明の共焦点顕微鏡について励起光量を評価するために、対物レンズ 150 の先端における励起光の強度を測定した。光源は、白色光源 (SPECTRA7 Light Engine ; Lumencor, Inc.) を使用した。光源 110 からの波長 475 / 28 nm (透過中心波長 / 半値幅) の励起光をマルチモード光ファイバ 120 に導入した。マルチモード光ファイバ 120 を伝播した励起光を、倍率 4 ~ 20 倍 (焦点距離 10 ~ 50 mm) のコリメータレンズ 131、または共焦点スキャナユニットのレーザ用ファイバーポート (図 7 において「B」で示す) に導入した。励起光の強度は、光パワーメータ (3664 ; 日置電機株式会社) を用いて測定した。

[0054] 図 8 は、励起光の強度の測定結果を示すグラフである。図 8 に示されるように、レーザ用ファイバーポート (コリメータレンズの焦点距離 100 mm 以上) に励起光を導入した場合に比べて、倍率 10 倍 (焦点距離 20 mm) または倍率 20 倍 (焦点距離 10 mm) のコリメータレンズを使用した場合、それぞれ励起光の強度が 3.7 倍、3.6 倍と顕著に向上した。一方、倍率 4 倍 (焦点距離 50 mm) のコリメータレンズを使用した場合は励起光の強度はほとんど向上しなかった (1.3 倍)。この結果から、 $\theta_1 \geq \theta_2$ を満たすコリメータレンズを使用することで、励起光の強度が顕著に高くなることがわかる。

[0055] 3. 空間分解能の評価

本発明の共焦点顕微鏡について空間分解能を評価するために、蛍光ビーズからの蛍光強度を測定した。試料は、直径 0.2 μ m の蛍光ビーズ (Tetraspeck ; Invitrogen Corporation) を使用した。励起光は、白色光源 (SPECTRA7 Light Engine ; Lumencor, Inc.) からの波長 475 / 28 nm の光、100 W 水銀アークランプ (OSRAM GmbH) からの波長 470 / 40 nm の光、またはアルゴンイオンレーザ (Sapphire 488 LP ; Coherent, Inc) からの波長 488 nm の光を使用した。白色光源からの波長 475 / 28 nm の光は、倍率 10 倍のコリメータレンズ (焦点距離 20 mm) に導入した。一方、水銀

アークランプからの波長470/40nmの光、またはアルゴンイオンレーザからの波長488nmは、共焦点スキャナユニットのレーザ用ファイバーポート（コリメータレンズの焦点距離100mm以上）に導入した。

[0056] 各条件で励起光を照射した蛍光ビーズからの蛍光強度の分布（x軸、y軸およびz軸方向）を測定し、10個のビーズの平均値を求めた。

[0057] 図9は、各条件における蛍光強度の分布を示すグラフである。白色光源からの光を照射した場合、x軸方向の半値全幅は0.31μm、y軸方向の半値全幅は0.31μm、z軸方向の半値全幅は0.63μmであった。また、水銀アークランプからの光を照射した場合、x軸方向の半値全幅は0.32μm、y軸方向の半値全幅は0.33μm、z軸方向の半値全幅は0.84μmであった。また、アルゴンイオンレーザからの光を照射した場合、x軸方向の半値全幅は0.28μm、y軸方向の半値全幅は0.29μm、z軸方向の半値全幅は0.61μmであった。

[0058] これらの結果から、本発明の共焦点顕微鏡は、従来の共焦点顕微鏡の空間分解能と同程度の空間分解能を有していることがわかる。

[0059] 4. 共焦点蛍光画像の撮影

本発明の共焦点顕微鏡（図7参照）および従来の共焦点顕微鏡（図2参照）を用いて、イエローカメレオン（CFPおよびYFPを有するCa²⁺プローブ）を発現させたHeLa細胞の共焦点蛍光画像をリアルタイムで撮影した。

[0060] 本発明の共焦点顕微鏡では、白色光源（SPECTRA7 Light Engine）からの波長440nmの光をマルチモード光ファイバに導入し、倍率10倍のコリメータレンズ（焦点距離20mm）によりコリメートした（図7参照）。一方、従来の共焦点顕微鏡では、100W水銀アークランプからの波長440nmの光をマルチモード光ファイバを通して、共焦点スキャナユニットのレーザ用ファイバーポート（コリメータレンズの焦点距離100mm以上）に導入した（図2参照）。

[0061] 図10Aは、本発明の共焦点顕微鏡を用いて撮影されたレシオ画像（YF

P / C F P ; ヒスタミン刺激後 1 ～ 3 秒) である。図 1 0 D は、従来の共焦点顕微鏡を用いて撮影されたレシオ画像 (Y F P / C F P ; ヒスタミン刺激後 1 ～ 3 秒) である。図 1 0 A および図 1 0 D は、同一の細胞について撮影した画像である。レシオ画像は、取得した Y F P 画像 (5 3 5 n m) および C F P 画像 (4 8 0 n m) を用いて、各ピクセルについて Y F P の蛍光強度を C F P の蛍光強度で割ることにより作成した。

[0062] 図 1 0 B は、図 1 0 A に示される興味領域 (四角で囲まれた領域) における平均レシオ値の経時変化を示すグラフである。図 1 0 E は、図 1 0 D に示される興味領域における平均レシオ値の経時変化を示すグラフである。また、図 1 0 C は、図 1 0 A に示される興味領域における Y F P および C F P の平均蛍光強度の経時変化を示すグラフである。図 1 0 F は、図 1 0 D に示される興味領域における Y F P および C F P の平均蛍光強度の経時変化を示すグラフである。図 1 0 F の内挿図は、図 1 0 F のグラフの縦軸を拡大したグラフである。

[0063] 従来の共焦点顕微鏡を用いた場合、図 1 0 D ～ F に示されるように、励起光の強度が不十分なため、鮮明な画像を取得することができなかった。その結果、 Ca^{2+} の濃度変化を詳細に観察することはできなかった。一方、本発明の共焦点顕微鏡を用いた場合、図 1 0 A ～ C に示されるように、十分な強度の励起光を照射することができたため、鮮明な画像を取得することができた。その結果、 Ca^{2+} の濃度変化を詳細に観察することができた。

[0064] 本出願は、2011 年 6 月 1 日出願の特願 2011-123041 に基づく優先権を主張する。当該出願明細書および図面に記載された内容は、すべて本願明細書に援用される。

産業上の利用可能性

[0065] 本発明の共焦点スキャナユニットは、例えば、共焦点顕微鏡、共焦点内視鏡、光干渉断層撮影装置などに適用することができる。

符号の説明

[0066] 1 0, 1 0' 共焦点顕微鏡

- 2 0 レーザ光源
- 2 0' 白色光源
- 3 0 シングルモード光ファイバ
- 3 0' マルチモード光ファイバ
- 4 0 共焦点スキャナユニット
- 4 1 コリメータレンズ
- 4 2 ミラー
- 4 3 マイクロレンズアレイディスク
- 4 4 ダイクロイックミラー
- 4 5 ニポウディスク
- 4 6 第2の結像レンズ
- 5 0 第1の結像レンズ
- 6 0 対物レンズ
- 7 0 CCDカメラ
- 8 0 試料
- 9 0 フィルタホイール
- 1 0 0 共焦点顕微鏡
- 1 1 0 光源
- 1 2 0 マルチモード光ファイバ
- 1 3 0 共焦点スキャナユニット
- 1 3 1 コリメータレンズ
- 1 3 2 マイクロレンズアレイディスク
- 1 3 3 ダイクロイックミラー
- 1 3 4 ニポウディスク
- 1 3 5 第2の結像レンズ
- 1 4 0 第1の結像レンズ
- 1 5 0 対物レンズ
- 1 6 0 フィルタホイール

1 7 0 C C D カ メ ラ

1 8 0 試 料

請求の範囲

[請求項1] マルチモード光ファイバから出射された光をコリメートするコリメータレンズと、

前記コリメータレンズによりコリメートされた光を集光する複数のマイクロレンズを有するマイクロレンズアレイディスクと、

前記マイクロレンズアレイディスクに対して平行に配置され、かつ前記複数のマイクロレンズの集光点に対応する位置に複数のピンホールを有するニポウディスクと、を有し、

前記コリメータレンズは、前記マルチモード光ファイバの出射端の中心部と前記コリメータレンズの中心部との距離が前記コリメータレンズの焦点距離 f となるように配置されており、

前記コリメータレンズの焦点距離を f (mm) とし、前記マルチモード光ファイバのコアの半径を y_1 (mm) とし、前記マイクロレンズアレイディスクと前記ニポウディスクとの中心間距離を $D1$ (mm) とし、前記ニポウディスクにおける前記ピンホール間の中心間距離を $D2$ (mm) としたときに、以下の式 (1) が満たされる、

[数1]

$$\frac{y_1}{f} \geq \frac{D2}{D1} \quad \dots (1)$$

共焦点スキャナユニット。

[請求項2] 請求項1に記載の共焦点スキャナユニットと、

励起光を出射する光源と、

前記励起光を前記共焦点スキャナユニットに伝播するマルチモード光ファイバと、

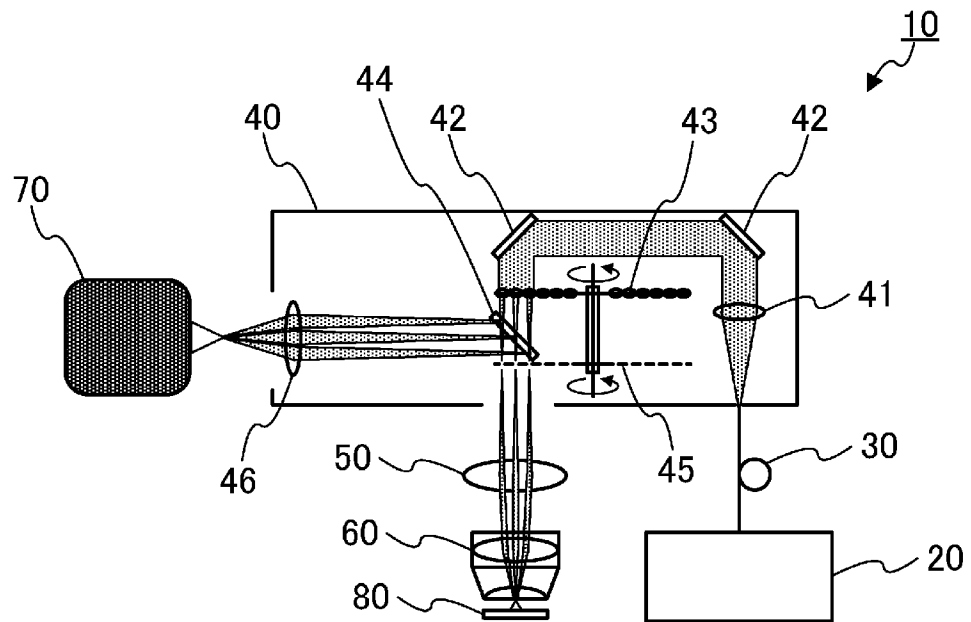
を有する、共焦点顕微鏡。

[請求項3] 前記光源は、白色光源である、請求項2に記載の共焦点顕微鏡。

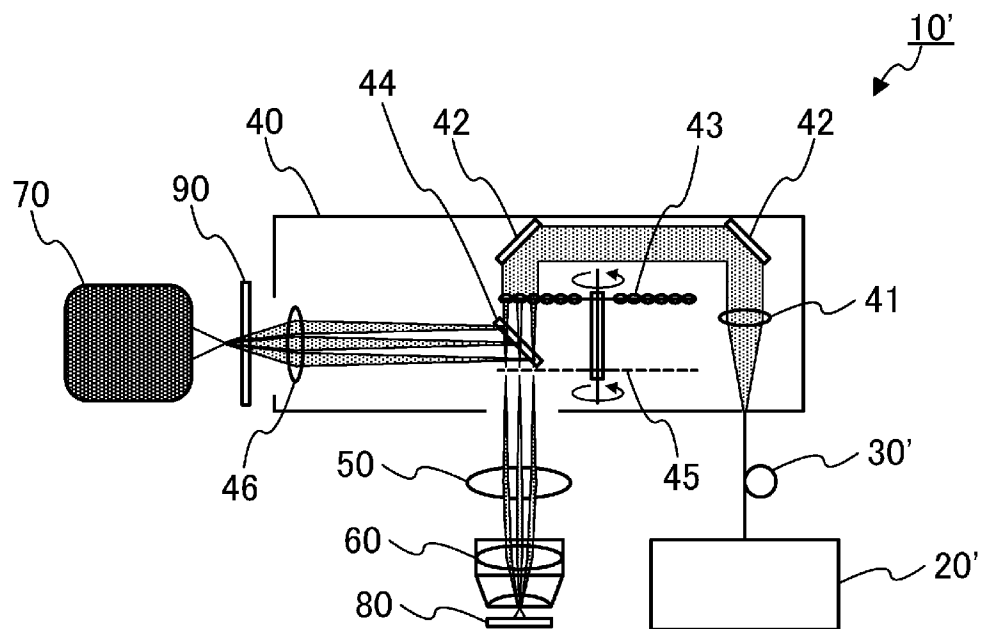
[請求項4] 前記光源は、LED光源、水銀アークランプ、キセノンアークラン

プまたはハロゲンランプである、請求項 3 に記載の共焦点顕微鏡。

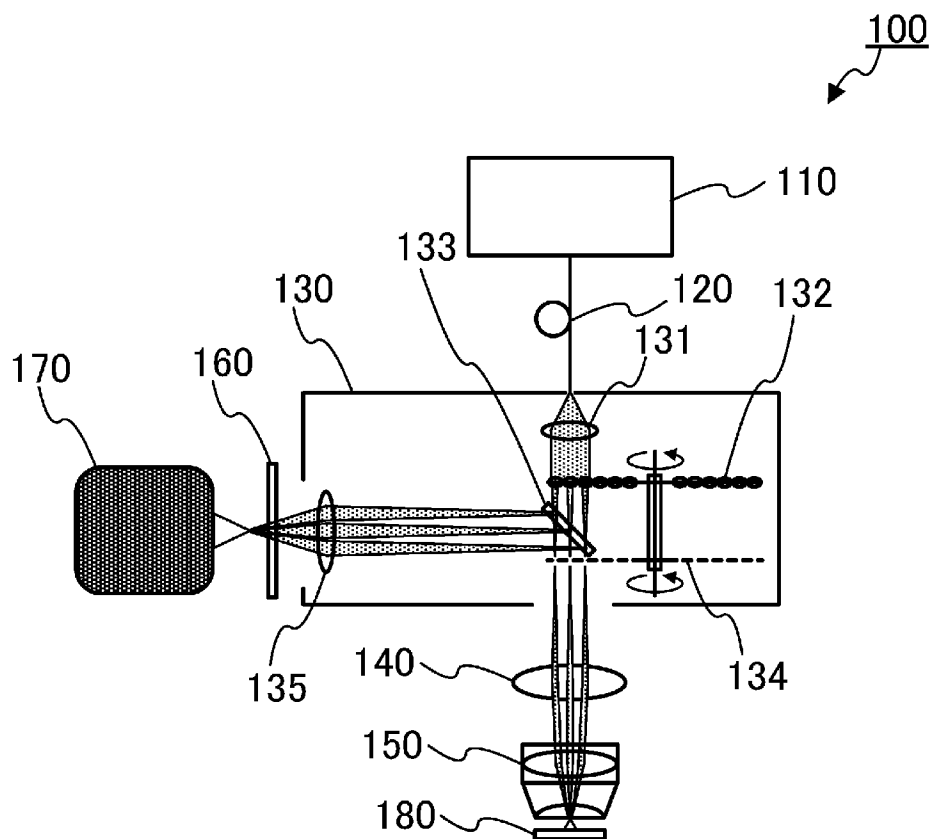
[図1]



[図2]



[図3]



[図4]

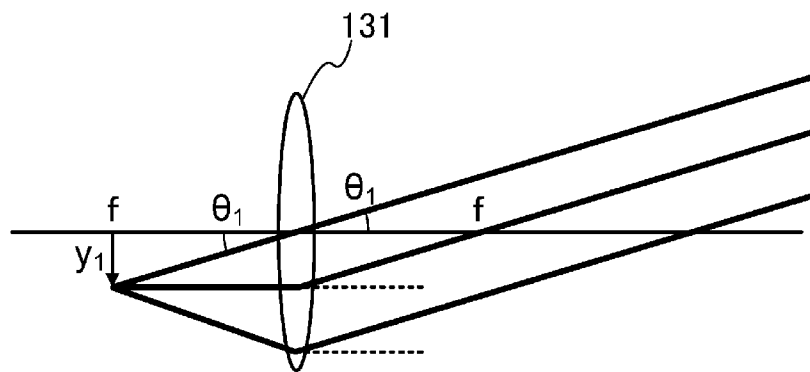


図4A

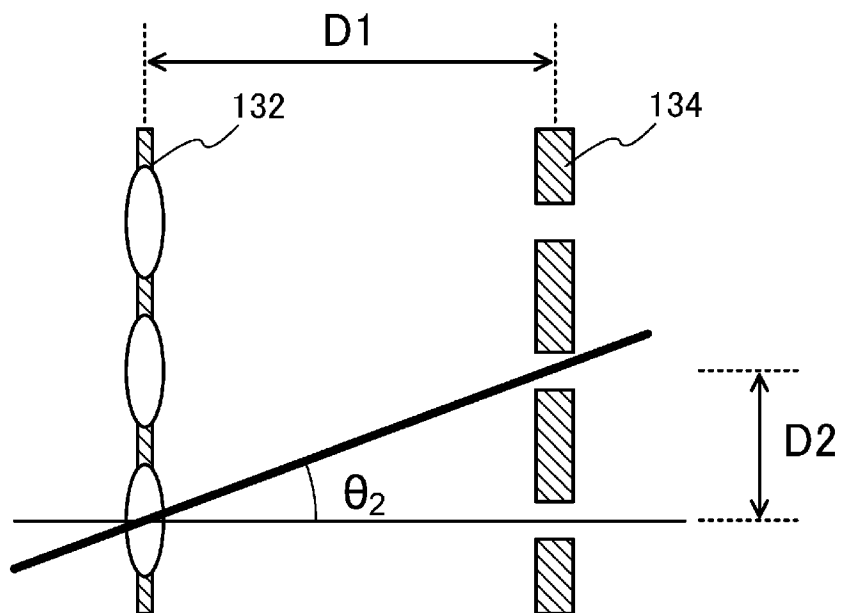
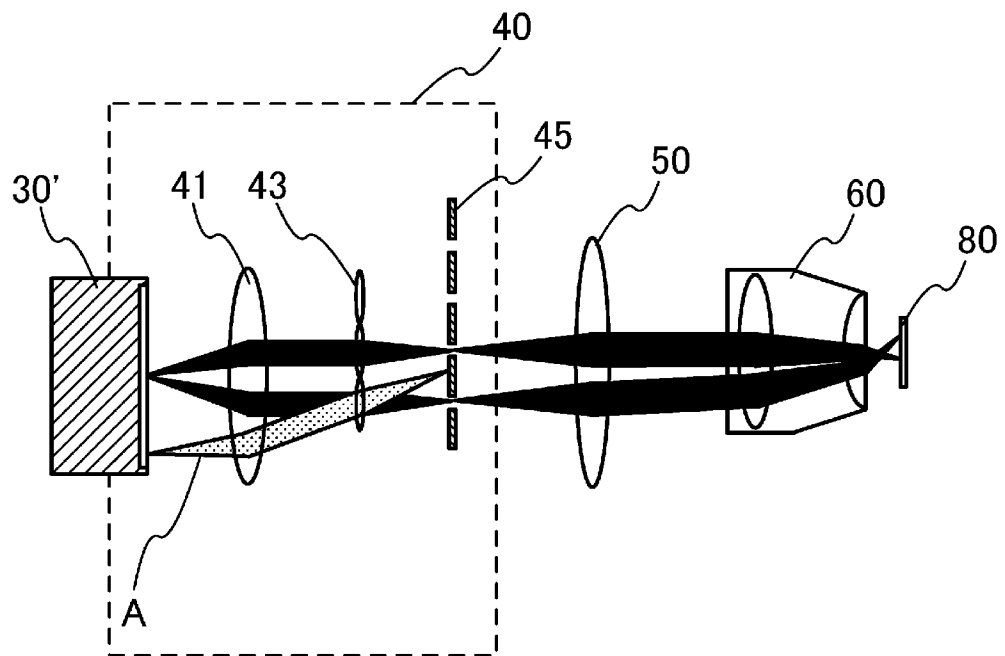
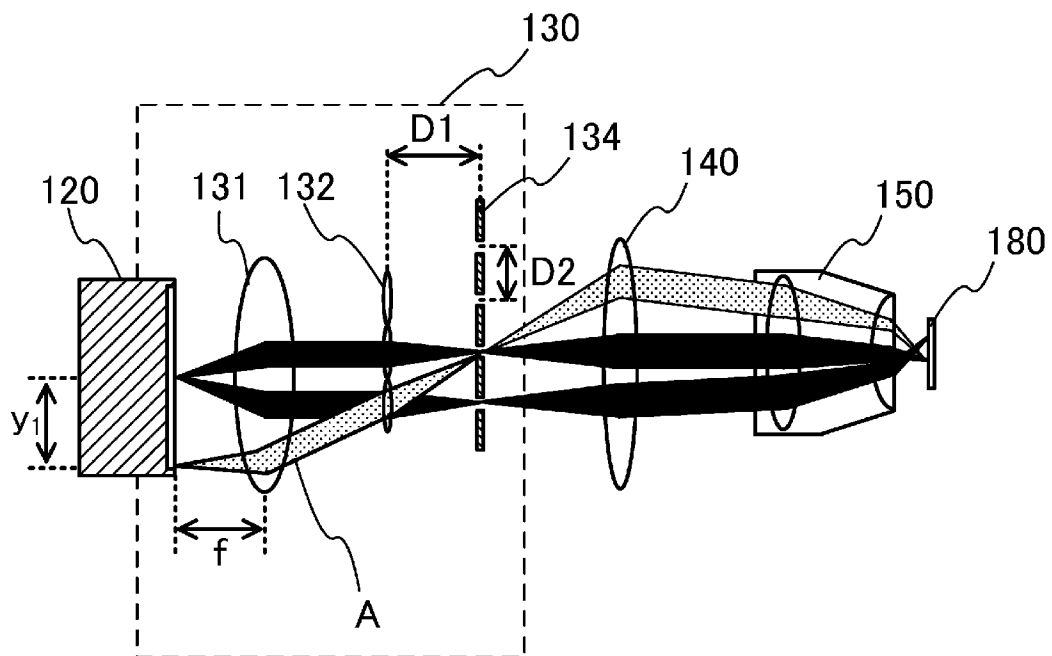


図4B

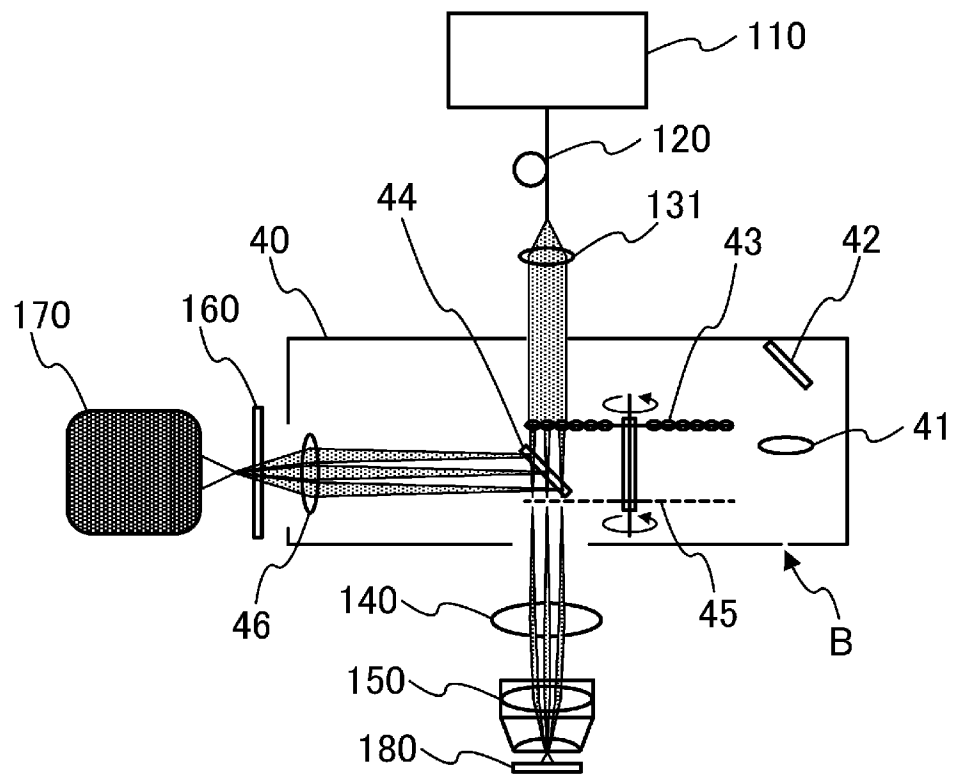
[図5]



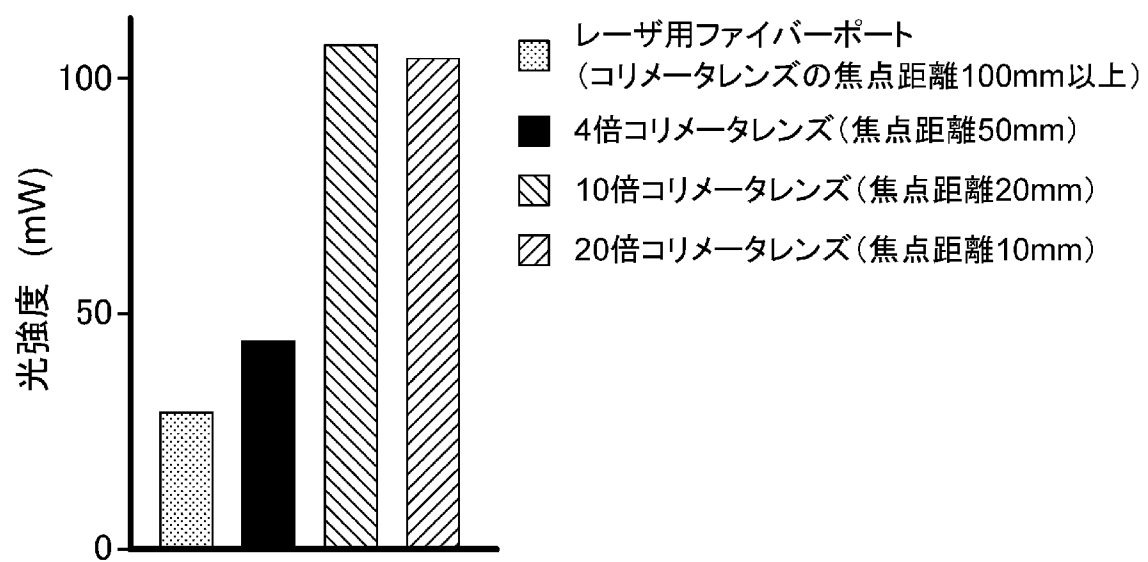
[図6]



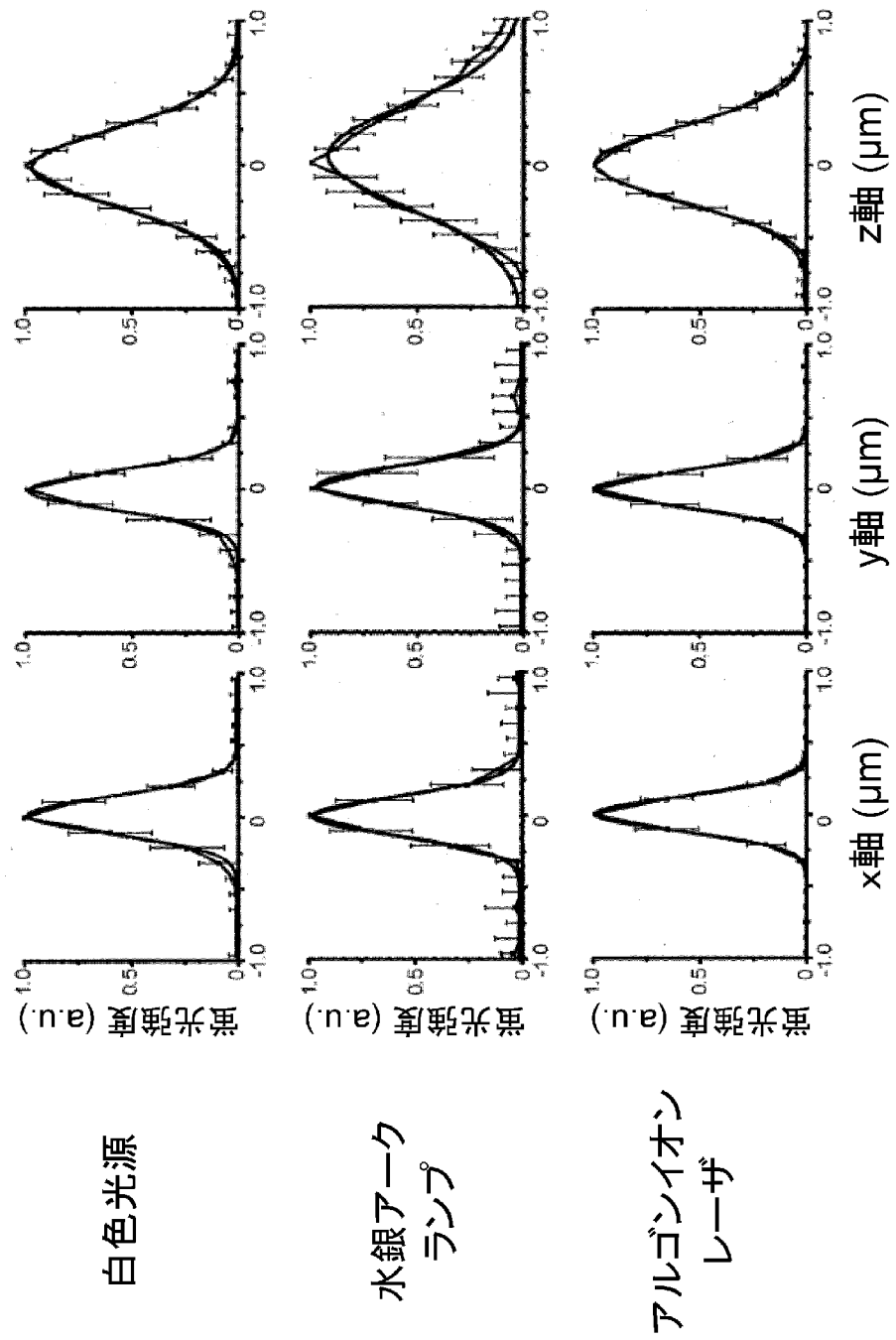
[図7]



[図8]



[図9]



[図10]

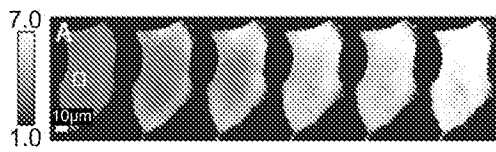


図10A

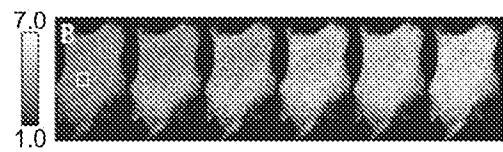


図10D

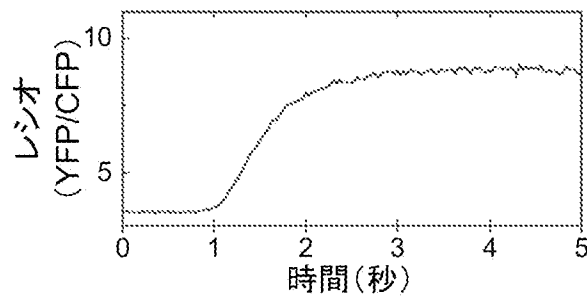


図10B

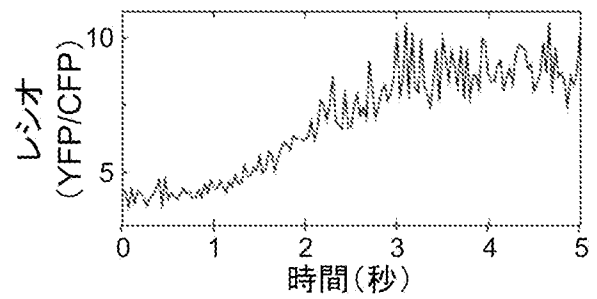


図10E

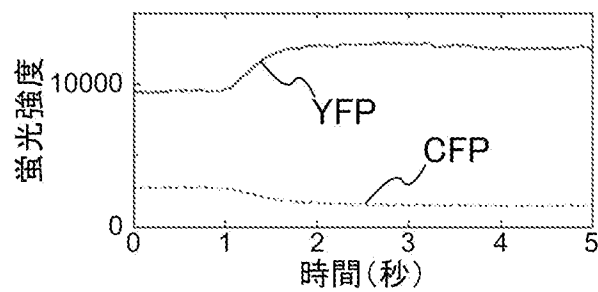


図10C

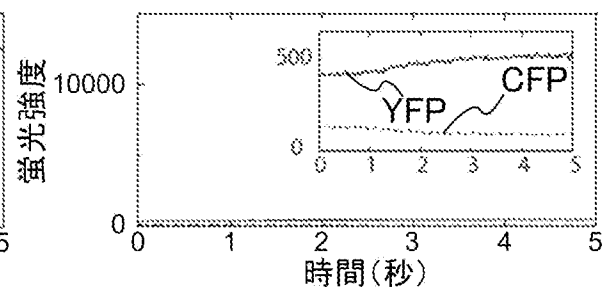


図10F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/002598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B21/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G02B21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-121590 A (Yokogawa Electric Corp.), 17 May 2007 (17.05.2007), entire text; all drawings & US 2007/0096014 A1	1-4
A	JP 2000-126116 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 09 May 2000 (09.05.2000), paragraphs [0088] to [0112]; fig. 8 (Family: none)	1-4
A	JP 2005-283659 A (Olympus Corp.), 13 October 2005 (13.10.2005), paragraphs [0072] to [0075]; fig. 1 (Family: none)	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 July, 2012 (04.07.12)

Date of mailing of the international search report
17 July, 2012 (17.07.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G02B21/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G02B21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2007-121590 A（横河電機株式会社）2007.05.17, 全文、全図 & US 2007/0096014 A1	1-4
A	JP 2000-126116 A（オリンパス光学工業株式会社）2000.05.09, 【0088】－【0112】、図8（ファミリーなし）	1-4
A	JP 2005-283659 A（オリンパス株式会社）2005.10.13, 【0072】－【0075】、図1（ファミリーなし）	1-4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.07.2012

国際調査報告の発送日

17.07.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

菊岡 智代

2V

2915

電話番号 03-3581-1101 内線 3271