

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4567324号
(P4567324)

(45) 発行日 平成22年10月20日(2010.10.20)

(24) 登録日 平成22年8月13日(2010.8.13)

(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

請求項の数 4 (全 8 頁)

| | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2003-420570 (P2003-420570) | (73) 特許権者 | 000000376 |
| (22) 出願日 | 平成15年12月18日(2003.12.18) | | オリンパス株式会社 |
| (65) 公開番号 | 特開2005-181581 (P2005-181581A) | | 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 |
| (43) 公開日 | 平成17年7月7日(2005.7.7) | (74) 代理人 | 100091351 |
| 審査請求日 | 平成18年12月13日(2006.12.13) | | 弁理士 河野 哲 |
| | | (74) 代理人 | 100084618 |
| | | | 弁理士 村松 貞男 |
| | | (74) 代理人 | 100100952 |
| | | | 弁理士 風間 鉄也 |
| | | (72) 発明者 | 中田 竜男 |
| | | | 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 |
| | | | オリンパス株式会社内 |
| | | 審査官 | 下村 一石 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザー走査型共焦点顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

レーザー光源と、
 レーザー光源から射出される光ビームを標本に対して走査するための走査手段と、
 光ビームを標本内に収束させるための対物レンズと、
 光ビームの収束点に対して共役な位置に配置された共焦点ピンホールと、
 標本から発生し共焦点ピンホールを通過した蛍光のうち中心バンドの波長成分を検出する第一検出手段と、

標本から発生し共焦点ピンホールを通過した蛍光のうちサイドバンドの波長成分を検出する第二検出手段と、

レーザー光源から射出される光ビームの強度を変えるとともに、第一検出手段と第二検出手段で検出される蛍光の強度に応じた電気信号を取得するための制御部とを備えており、

第一検出手段と第二検出手段は、それぞれ、標本から発生し共焦点ピンホールを通過した蛍光を波長に従って分光する分光機構と、分光された特定の波長成分の蛍光を検出する検出器と、検出器で検出される蛍光の波長成分を変更する波長変更手段とを備えている、
 レーザー走査型共焦点顕微鏡。

【請求項2】

請求項1において、制御部は、第一検出手段と第二検出手段で得られる情報に基づいて、レーザー光源から射出される光ビームの強度を変える、レーザー走査型共焦点顕微鏡。

【請求項 3】

請求項 1 において、第一検出手段と第二検出手段は、標本から発生し共焦点ピンホールを通過した蛍光のビームを、中心バンドの波長成分の蛍光ビームとサイドバンドの波長成分の蛍光ビームとに分割するビームスプリッターを含み、第一検出手段は、中心バンドの波長成分の蛍光を検出する検出器を備え、第二検出手段は、サイドバンドの波長成分の蛍光を検出する検出器を備えている、レーザー走査型共焦点顕微鏡。

【請求項 4】

請求項 1 において、制御部は、フォトブリーチ中には第二検出手段からの出力信号を検出する、レーザー走査型共焦点顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、レーザー走査型共焦点顕微鏡に関する。

【背景技術】

【0002】

標本中の蛍光を退色させ、退色した蛍光が復帰していく時間経過を検出して、蛍光タンパクの移送を解析する F R A P (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 実験が知られている。

【0003】

特開 2003 - 5084 号公報は、フォトブリーチ実行中の画像観察を可能にするために、レーザー光量に応じて光検出器の感度を変えて検出する手法を提案している。

20

【特許文献 1】特開 2003 - 5084 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、この手法では、検出感度を時分割で変更しているが、感度調整に使われるフォトマルチプライヤーを駆動する高圧電源は一般的に電圧変更には 1 m s 以上の時間を必要とするため、高速な F R A P 実験をすることができない。

【0005】

また、感度調整ができるダイナミックレンジも限られているため、フォトブリーチ中と画像検出中のレーザー光量の強度比を大きく変えられない。従って、フォトブリーチ中のレーザー強度を強くできず、フォトブリーチ時間が長くなる。フォトブリーチ時間が長くなると、フォトブリーチ中にも蛍光移送が起きているため、フォトブリーチ時間がもっと長くなる。最悪の場合、フォトブリーチを完了できない。すなわち、F R A P 実験のデータを取得できない。

30

【0006】

本発明は、このような実状を考慮して成されたものであり、その目的は、高速な F R A P 実験を可能にするレーザー走査型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】

【0007】

40

本発明は、F R A P 実験に好適なレーザー走査型共焦点顕微鏡であり、レーザー光源と、レーザー光源から射出される光ビームを標本に対して走査するための走査手段と、光ビームを標本内に収束させるための対物レンズと、光ビームの収束点に対して共役な位置に配置された共焦点ピンホールと、標本から発生し共焦点ピンホールを通過した蛍光のうち中心バンドの波長成分を検出する第一検出手段と、標本から発生し共焦点ピンホールを通過した蛍光のうちサイドバンドの波長成分を検出する第二検出手段と、レーザー光源から射出される光ビームの強度を変えるとともに、第一検出手段と第二検出手段で検出される蛍光の強度に応じた電気信号を取得するための制御部とを備えている。第一検出手段と第二検出手段は、それぞれ、標本から発生し共焦点ピンホールを通過した蛍光を波長に従って分光する分光機構と、分光された特定の波長成分の蛍光を検出する検出器と、検出器で

50

検出される蛍光の波長成分を変更する波長変更手段とを備えている。

【発明の効果】

【0008】

本発明のレーザー走査型共焦点顕微鏡によれば、高速なFRAP実験が可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、図面を参照しながら本発明の実施形態について説明する。

【0010】

図1は、本発明の一実施形態のレーザー走査型共焦点顕微鏡の構成を示している。図1に示されるように、本実施形態のレーザー走査型共焦点顕微鏡100は、顕微鏡部110と、レーザー光源ユニット120と、走査ユニット140と、制御部180とを備えている。

10

【0011】

顕微鏡部110は、対物レンズ112と、結像レンズ114とを備えている。

【0012】

レーザー光源ユニット120と走査ユニット140は光ファイバー130によって光学的に結合されている。

【0013】

レーザー光源ユニット120は、レーザー光源121、ダイクロイックミラー122と、レーザー光源123と、ダイクロイックミラー124と、レーザー光源125と、ダイクロイックミラー126と、AOTF127とを備えている。

20

【0014】

ダイクロイックミラー122は、レーザー光源121から射出された光ビームを反射する。ダイクロイックミラー124は、レーザー光源121から射出された光ビームを透過し、レーザー光源123から射出された光ビームを反射する。ダイクロイックミラー126は、レーザー光源121から射出された光ビームとレーザー光源123から射出された光ビームとを反射し、レーザー光源125から射出された光ビームを透過する。

【0015】

その結果、レーザー光源121からの光ビームとレーザー光源123からの光ビームとレーザー光源125からの光ビームは、ダイクロイックミラー122とダイクロイックミラー124とダイクロイックミラー126とによって、合成されてAOTF127に導かれる。

30

【0016】

AOTF127は、光ビームの通過・遮断を高速に制御したり、光ビームを偏向したり、輝度調光したりする。これにより、AOTF127は、光ファイバー130に結合する光のオンオフや波長の切り換えや強度の変更を行なう。

【0017】

従って、レーザー光源ユニット120は、少なくとも一つ、最大で三つの波長のレーザー光を含む光ビームを射出することができる。もちろん、レーザー光源を追加すれば三つ以上の波長のレーザー光を含む光ビームを射出することも可能である。

40

【0018】

走査ユニット140は、光ファイバー130から射出された光ビームをほぼ平行光ビームに変えるコリメートレンズ142と、コリメートレンズ142からの光ビームを偏向するダイクロイックミラー143と、光ビームを走査するための走査光学ユニット144と、走査光学ユニット144からの光ビームを対物レンズ112の瞳にリレーするリレーレンズ145とを備えている。

【0019】

ダイクロイックミラー143は、レーザー光源ユニット120から導入されるレーザー光は反射するが、そのレーザー光の照射によって標本Sから発生した蛍光は透過する。

【0020】

50

走査ユニット140は、さらに、標本Sから発生した蛍光ビームを収束させる共焦点レンズ146と、対物レンズ112にレーザー光ビームの収束点に対して共役な位置に配置された共焦点ピンホール147と、共焦点ピンホール147を通過した蛍光ビームを平行化するコリメートレンズ148と、コリメートレンズ148からの蛍光ビームを分割するダイクロイックミラー150と、ダイクロイックミラー150を透過した蛍光ビームを偏向するミラー151と、ダイクロイックミラー150で反射された蛍光を検出するための分光ユニット160と、ダイクロイックミラー150を透過した蛍光を検出するための分光ユニット170とを備えている。

【0021】

分光ユニット160は、入射する光ビームを波長に従って分光するグレーティング161と、グレーティング161の向きを調整するためのガルバノメーター162と、グレーティング161からの光ビームを収束させる収束レンズ163と、検出する光の波長範囲を決めるためのスリット164と、スリット164を通過した光を検出するための検出器165とを備えている。スリット164は、開口幅が変更可能であり、開口幅を変えることによって検出器165に入射する光の波長範囲を調整することができる。検出器165は、入射する光を光電変換して、入射光ビームの強度を反映した電気信号を出力する。

10

【0022】

分光ユニット170は、分光ユニット160と同様の構成であり、グレーティング171と、ガルバノメーター172と、収束レンズ173と、スリット174と、検出器175とを備えている。

20

【0023】

制御部180は、AOTF127と、走査光学ユニット144と、分光ユニット160内のガルバノメーター162と、分光ユニット170内のガルバノメーター172とを制御する。また、制御部180には、検出器175の出力信号と、検出器165の出力信号とが入力される。

【0024】

制御部180は、検出器175の出力信号と検出器165の出力信号と走査光学ユニット144の制御信号とから蛍光画像を形成してパソコンに転送する制御を行なう。また、制御部180は、フォトブリーチを行なうために、パソコンであらかじめ設定された値に従って、レーザー光源ユニット120で発せられるレーザー光の強度を時間経過とともに強めたり弱めたりする制御を行なう。

30

【0025】

このようなレーザー走査型共焦点顕微鏡100において、レーザー光源ユニット120内で、AOTF127を通過した光ビームは光ファイバー130に入射する。光ファイバー130に入射したレーザー光は、光ファイバー130によって走査ユニット140に導かれ、コリメートレンズ142に向けて射出される。

【0026】

光ファイバー130から射出された光ビームは、コリメートレンズ142によってほぼ平行光ビームに変えられ、ダイクロイックミラー143で反射されて走査光学ユニット144に方向付けられ、走査光学ユニット144とリレーレンズ145と結像レンズ114とを通過し、対物レンズ112によって標本S内でほぼ一点に収束される。その収束点は、走査光学ユニット144によって、一定平面上を走査される。

40

【0027】

標本Sは、レーザー光源ユニット120から発せられるレーザー光に対応した蛍光色素が導入されている。レーザー光が照射された標本Sの部分は、蛍光色素が励起されて、蛍光を発する。対物レンズ112に入射した蛍光は、結像レンズ114に向かうビームとなり、結像レンズ114とリレーレンズ145と走査光学ユニット144とダイクロイックミラー143を通過し、共焦点レンズ146によって収束される。

【0028】

共焦点レンズ146によって収束された蛍光ビームのうち、対物レンズ112によるレ

50

レーザー光ビームの収束点とその近傍から発生した蛍光は共焦点ピンホール147を通過できるが、それ以外の部分から発生した蛍光は共焦点ピンホール147を通過できない。

【0029】

共焦点ピンホール147を通過した蛍光ビームは、コリメートレンズ148を通過したあと、ダイクロイックミラー150によって二本の蛍光ビームに分割される。ダイクロイックミラー150で反射された蛍光ビームは分光ユニット160に入射し、ダイクロイックミラー150を透過した蛍光ビームはミラー151で反射されて分光ユニット160に入射する。

【0030】

分光ユニット160に入射した蛍光ビームは、グレーティング161で回折され、波長に従って分光され、波長ごとに異なる方向に偏向される。グレーティング161からの蛍光のうち、収束レンズ163に入射した蛍光は、収束性ビームとなり、スリット164を通り検出器165に入射する。検出器165は入射した蛍光の強度に応じた電気信号を制御部180に出力する。

10

【0031】

収束レンズ163に入射する蛍光の波長は、ガルバノメーター162でグレーティング161の向きを変えることによって変更することができる。スリット164の開口幅を変えることによって、検出器165で検出される蛍光の波長範囲を変更することができる。つまり、グレーティング161の向きによって検出器165で検出される蛍光の中心波長が決められ、スリット164の開口幅によって検出器165で検出される蛍光の波長範囲が決められる。例えば、スリット164の開口幅を広めれば、広い波長範囲の蛍光が検出され、スリット164の開口幅を狭めれば、狭い波長範囲の蛍光が検出される。

20

【0032】

分光ユニット170に入射した蛍光ビームも、分光ユニット160に入射した蛍光ビームと同様にして検出される。

【0033】

図2は、蛍光ビームを分割するダイクロイックミラー150の透過率特性を示している。図2に示されるように、ダイクロイックミラー150は、標本Sから発生する蛍光のうちサイドバンドの波長範囲の成分は透過し、標本Sから発生する蛍光のうち中心バンドの波長範囲の成分は透過せずに反射する。もちろん、標本S内の蛍光色素を励起するレーザー光は透過しない。

30

【0034】

このため、分光ユニット160には、標本Sから発生する蛍光のうち中心バンドの波長範囲の成分の蛍光が入射し、分光ユニット170には、標本Sから発生する蛍光のうちサイドバンドの波長範囲の成分の蛍光が入射する。従って、分光ユニット160では、中心バンドの蛍光が検出され、分光ユニット170では、サイドバンドの蛍光が入射する。

【0035】

フォトブリーチを行なうため、レーザー光源ユニット120で発せられるレーザー光は、パソコンであらかじめ設定された値に従って、時間経過とともにその強度が強められたり弱められたりする。レーザー光の強度変化に応じて、標本Sから発生する蛍光の強度も変化する。また、標本Sで反射されたレーザー光は、わずかであるが、その一部は分光ユニット160と分光ユニット170に達している。分光ユニット160と分光ユニット170に達するレーザー光の強度も、レーザー光の強度変化に応じて変化する。

40

【0036】

このため、レーザー光の強度が強められるフォトブリーチの最中では、分光ユニット160に入射する光(蛍光とレーザー光)の強度が、検出器165の測定可能範囲を超えることがある。この状態では、分光ユニット160はもはや入射光の強度を検出することはできない。

【0037】

しかし、分光ユニット170は、サイドバンドの蛍光を検出しており、サイドバンドの

50

蛍光は中心バンドの蛍光に比べて輝度値が大幅に低いいため、フォトブリーチの最中であっても、分光ユニット170に入射する光(蛍光とレーザー光)の強度が、検出器175の測定可能範囲を超えることはない。

【0038】

つまり、本実施形態のレーザー走査型共焦点顕微鏡100では、フォトブリーチの最中でも、蛍光を良好に検出することができる。

【0039】

これにより、レーザー走査型共焦点顕微鏡100は、蛍光画像による退色前と退色後の蛍光の復帰具合を検出できる。また、フォトブリーチ中の退色過程を検出できる。その結果、蛍光タンパクの移送を解析するFRAP実験において重要な退色過程のデータを取得することが可能となる。

10

【0040】

これまで、図面を参照しながら本発明の実施形態を述べたが、本発明は、これらの実施形態に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において様々な変形や変更が施されてもよい。

【0041】

例えば、実施形態では、分光ユニット160と分光ユニット170は、グレーティングを利用して分光する構成であるが、光学フィルターを利用した構成であってもよく、または、ほかの分光方式による構成であっても構わない。

【0042】

また、実施形態では、フォトブリーチを完了するタイミングはパソコンであらかじめ設定された値で決まるが、サイドバンドの蛍光輝度値とパソコンであらかじめ設定された輝度値とからフォトブリーチを完了するタイミングを自動的に決めてもよい。つまり、制御部180は、サイドバンドの蛍光輝度値があらかじめ設定された輝度値よりも小さくなった時点でフォトブリーチが完了したと判断してレーザー光の強度をフォトブリーチ前の状態に戻す制御を行なってもよい。その結果、フォトブリーチ後の画像取得を無駄なく実行できるようになる。

20

【0043】

FRAP実験では、細胞中の指定部位だけに対してフォトブリーチが行なわれる。分光ユニット160と分光ユニット170のいずれか一方だけを使用し、指定部位に対しては、検出する蛍光の波長を変化させて、フォトブリーチの前後では蛍光中の中心バンドの成分を検出し、フォトブリーチの最中はサイドバンドの成分を検出するようにしてもよい。この手法に従えば、レーザー走査型共焦点顕微鏡は、分光ユニット160と分光ユニット170のいずれか一方が省かれた構成であってもよい。

30

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】本発明の一実施形態のレーザー走査型共焦点顕微鏡の構成を示している。

【図2】蛍光ビームを分割するダイクロイックミラーの透過率特性を示している。

【符号の説明】

【0045】

100 ... レーザー走査型共焦点顕微鏡、110 ... 顕微鏡部、112 ... 対物レンズ、114 ... 結像レンズ、120 ... レーザー光源ユニット、121 ... レーザー光源、122 ... ダイクロイックミラー、123 ... レーザー光源、124 ... ダイクロイックミラー、125 ... レーザー光源、126 ... ダイクロイックミラー、130 ... 光ファイバー、140 ... 走査ユニット、142 ... コリメートレンズ、143 ... ダイクロイックミラー、144 ... 走査光学ユニット、145 ... リレーレンズ、146 ... 共焦点レンズ、147 ... 共焦点ピンホール、148 ... コリメートレンズ、150 ... ダイクロイックミラー、151 ... ミラー、160 ... 分光ユニット、161 ... グレーティング、162 ... ガルバノメーター、163 ... 収束レンズ、164 ... スリット、165 ... 検出器、170 ... 分光ユニット、171 ... グレーティング、172 ... ガルバノメーター、173 ... 収束レンズ、174 ... スリット、175 ... 検出器、

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平04 - 315119 (JP, A)
特開2000 - 035400 (JP, A)
特表平09 - 502269 (JP, A)
特開2003 - 057556 (JP, A)
特開2000 - 098245 (JP, A)
特開2003 - 028795 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G02B21/00 - 21/36