

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3917731号

(P3917731)

(45) 発行日 平成19年5月23日(2007.5.23)

(24) 登録日 平成19年2月16日(2007.2.16)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>GO 2 B 21/00</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 2 B 21/00	
<b>GO 1 N 21/64</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 21/64	E
<b>GO 2 B 21/18</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 2 B 21/18	

請求項の数 18 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願平9-294107	(73) 特許権者	000000376
(22) 出願日	平成9年10月27日(1997.10.27)		オリンパス株式会社
(65) 公開番号	特開平10-206742		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(43) 公開日	平成10年8月7日(1998.8.7)	(74) 代理人	100058479
審査請求日	平成16年10月20日(2004.10.20)		弁理士 鈴江 武彦
(31) 優先権主張番号	特願平8-310889	(74) 代理人	100084618
(32) 優先日	平成8年11月21日(1996.11.21)		弁理士 村松 貞男
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100100952
			弁理士 風間 鉄也
		(74) 代理人	100097559
			弁理士 水野 浩司
		(72) 発明者	鹿島 伸悟
			東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
			オリンパス光学工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザ走査顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

レーザ光源から出力されたコヒーレント光を標本面上に走査したときの前記標本からの透過光、反射光又は前記標本に発生する蛍光を検出するレーザ走査顕微鏡において、

前記レーザ光源から出力された第1のコヒーレント光の光路に設けられた第1走査光学系と、

前記レーザ光源から出力された第2のコヒーレント光の光路に設けられた第2走査光学系と、

を具備し、

前記第1のコヒーレント光を前記1走査光学系によって、前記第2のコヒーレント光を前記2走査光学系によって個別に走査することを特徴とするレーザ走査顕微鏡。 10

【請求項2】

前記第1のコヒーレント光は、標本観察用の光であり、前記第2のコヒーレント光は、前記標本に対して反応を起こさせる光であり、

前記第1走査光学系によって前記第1のコヒーレント光を前記標本上で走査して得られる前記標本からの反射光又は蛍光を検出して前記標本の画像を生成し、前記第2走査光学系によって前記第2のコヒーレント光を前記標本の所望の位置に照射することを特徴とする請求項1に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項3】

前記第1のコヒーレント光を前記標本に集光する対物レンズと、前記第2のコヒーレン 20

ト光を前記標本に集光する対物レンズと、が前記標本を挟んで対向して配置され、前記第1のコヒーレント光と、前記第2のコヒーレント光を前記標本に対して互いに対向する側から照射することを特徴とする請求項2に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項4】

前記第1のコヒーレント光を前記標本に集光する対物レンズと、前記第2のコヒーレント光を前記標本に集光する対物レンズと、が1つの対物レンズで共用され、

前記第1のコヒーレント光の光路と、前記第2のコヒーレント光の光路とを一致させる光路結合手段を備え、

前記第1走査光学系と前記1つの対物レンズの間、且つ前記第2走査光学系と前記1つの対物レンズの間に前記光路結合手段を配置したことを特徴とする請求項2に記載のレーザ走査顕微鏡。

10

【請求項5】

前記光路結合手段は、ダイクロイックミラーであることを特徴とする請求項4記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項6】

前記第2のコヒーレント光を、前記第2走査光学系により前記標本上にスポット的に照射することを特徴とする請求項2乃至4のいずれか1つに記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項7】

前記第2のコヒーレント光を、前記第2走査光学系により前記標本上の所望の範囲に走査して照射することを特徴とする請求項2乃至4のいずれか1つに記載のレーザ走査顕微鏡。

20

【請求項8】

前記第2のコヒーレント光の集光位置を光軸方向にシフトさせる光学調整機構を前記第2のコヒーレント光の光路に設け、前記第1走査光学系による観察断面と光軸方向に異なる断面に前記第2走査光学系による前記第2のコヒーレント光の照射を行うようにしたことを特徴とする請求項2乃至4のいずれか1つに記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項9】

前記光学調整機構は、前記第2のコヒーレント光を出力するレーザ光源と、前記第2走査光学系の間に配置されている請求項8のレーザ走査顕微鏡。

【請求項10】

前記第1走査光学系及び前記第2走査光学系を走査制御する1つの制御手段を備えたことを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1つに記載のレーザ走査顕微鏡。

30

【請求項11】

前記第1のコヒーレント光を照射したときの前記標本からの反射光又は蛍光を検出する第1の検出光学系と、

前記第2のコヒーレント光を照射したときの前記標本からの反射光又は蛍光を検出する第2の検出光学系と、

を備え、

前記第1の検出光学系及び前記第2の検出光学系で検出されたそれぞれの検出結果に基づいて生成される第1の標本画像及び第2の標本画像を同時に表示することを特徴とする請求項1に記載のレーザ走査顕微鏡。

40

【請求項12】

前記標本に照射される前記第2のコヒーレント光の集光位置に一致させて位置確認用の光を前記標本に照射する位置確認用光学系を備えることを特徴とする請求項2乃至4のいずれか1つに記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項13】

前記第1のコヒーレント光を出射するレーザ光源と、前記第2のコヒーレント光を出射するレーザ光源が互いに異なることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1つに記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項14】

50

前記第 1 のコヒーレント光を出射するレーザ光源と、前記第 2 のコヒーレント光を出射するレーザ光源と、が同一であり、前記同一のレーザ光源から出射される光を前記第 1 のコヒーレント光の光路と前記第 2 のコヒーレント光の光路とに分割する光路分割手段と、を備えることを特徴とする請求項 1、2 又は 4 のいずれか 1 つに記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項 15】

前記第 1 のコヒーレント光及び前記第 2 のコヒーレント光は、多光子吸収を起こさせる I R パルスレーザであることを特徴とする請求項 14 に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項 16】

前記第 1 のコヒーレント光は、可視連続レーザ光または I R パルスレーザ光であり、前記第 2 のコヒーレント光は、I R パルスレーザ光であることを特徴とする請求項 2 乃至 4 のいずれか 1 つに記載のレーザ走査顕微鏡。

10

【請求項 17】

前記標本は被加工物であり、前記第 1 のコヒーレント光は、前記被加工物の観察用の光であり、前記第 2 のコヒーレント光は、前記被加工物を加工するための光であり、前記第 1 走査光学系によって前記第 1 のコヒーレント光を前記被加工物上で走査して得られる前記被加工物からの反射光、又は蛍光を検出して前記被加工物の画像を生成し、前記第 2 走査光学系によって前記第 2 のコヒーレント光を前記被加工物の所望の位置に照射して加工する請求項 1 に記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項 18】

前記第 1 のコヒーレント光を前記被加工物に集光する対物レンズと前記第 2 のコヒーレント光を前記被加工物に集光する対物レンズが 1 つの対物レンズで共用され、

20

前記第 1 のコヒーレント光の光路と前記第 2 のコヒーレント光の光路とを一致させる光路結合手段を備え、

前記第 1 走査光学系と前記 1 つの対物レンズの間、且つ前記第 2 走査光学系と前記 1 つの対物レンズの間に前記光路結合手段を配置したことを特徴とする請求項 17 に記載のレーザ走査顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

30

本発明は、レーザ光源から出力されたコヒーレント光で標本面上を走査したときの標本からの透過光や反射光又は標本に発生する蛍光を検出するレーザ走査顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】

図 16 は走査型レーザ顕微鏡の構成図である。

この走査型レーザ顕微鏡は、コヒーレント光を発するレーザ光源 100 と、このレーザ光源 100 からの光束を対物レンズ 107 の像面に走査させる走査光学ユニット 102 と、前記光束を像面に集光させる対物レンズ 107 とを有している。

【0003】

すなわち、レーザ光源 100 から発せられたコヒーレント光（レーザ光）は、ダイクロイックミラー 101 を透過して走査光学ユニット 102 に入射する。

40

この走査光学ユニット 102 は、互いに直交方向に走査する各走査ミラー 102 a、102 b を有するもので、これら走査ミラー 102 a、102 b によってコヒーレント光を偏向する。

【0004】

この偏向されたコヒーレント光は、リレーレンズ 103 を透過した後、ミラー 104 によって光路の向きを変え、ダイクロイックミラー 105 を透過し、結像レンズ 106 により対物レンズ 107 の瞳径を満足するものとなる。

【0005】

すなわち、結像レンズ 106 を透過した光は、ダイクロイックミラー 108、対物レンズ

50

107に至り、さらに対物レンズ107を透過した光は、ステージ109上に載置された標本110の断面111に集光される。

【0006】

このように標本110に光が照射されると、この光により蛍光指示薬が励起され、蛍光が発せられる。例えば、蛍光指示薬にカルシウムイオン指示薬のfluo-3を使い、レーザ波長488nm(例えばアルゴンレーザなど)を用いると、fluo-3は蛍光波長530nmの光を発する。

【0007】

この標本110からの蛍光は、先の光路とは逆方向に、対物レンズ107、ダイクロイックミラー108、結像レンズ106、ダイクロイックミラー105、ミラー104、リレーレンズ103、各走査ミラー102b、102aを通してダイクロイックミラー101に到達し、このダイクロイックミラー101で反射して測光フィルタ112に入射する。

10

【0008】

この測光フィルタ112に入射した光は、標本110からの蛍光波長のみが選択され、その光がレンズ113によってピンホール114面に結像される。このピンホール114を貫けた蛍光は、光電変換素子115によって計測される。

【0009】

ここで、上記ダイクロイックミラー101の特性は、標本110を染色する蛍光色素の励起波長(レーザ波長)及び蛍光波長によって決定される。例えば、上記の通り蛍光指示薬にカルシウムイオン指示薬のfluo-3を使い、レーザ波長488nm(例えばアルゴンレーザなど)を用いると、fluo-3は蛍光波長530nmの光を発するので、ダイクロイックミラー101は例えば波長505nm以上の光を反射する特性となる。

20

【0010】

このような標本110の観察において、コヒーレント光が走査光学ユニット102の各走査ミラー102a、102bで偏向し、対物レンズ107を通過し、照明することによって標本110の断面111上の結像位置の蛍光を逐次測定でき、走査範囲内の標本像を構築できる。

【0011】

又、ステージ109又は対物レンズ107を昇降させることによって、標本110の断面111とは異なる断面像を取得できるので、標本像の3次元構築も可能である。

30

【0012】

一方、レーザ光源100をUV(紫外線)パルスレーザとし、かつ走査光学ユニット102の各走査ミラー102a、102bを任意の向きで停止させると、標本110の所望の位置にUVパルスレーザを照射することができる。

【0013】

例えば、ケージド試薬を用いる場合、UVパルスレーザを照射することによってケージド基に囲われている物質が放出され、細胞のある特定部位に特異現象を引き起こさせることができる。

【0014】

標本110の全体照明は、光源116、レンズ117、励起フィルタ118及びダイクロイックミラー108を有する照明光学系によって行われ、標本110から発せられる蛍光は、ダイクロイックミラー105で反射し、測光フィルタ119で蛍光波長が選択され、蛍光像としてCCDカメラ等の撮像素子120により取得される。

40

【0015】

以上のように、標本110の所望の位置にレーザ光を瞬間的に照射して(UVパルスレーザを照射して)、この影響によって起こる標本110の動的特性を調査する場合、標本像の時系列的記録が必要になる。このような場合に一般的によく使われるのがCCDカメラを用いて画像を取得する方法である。

【0016】

しかしながら、CCDカメラによる画像取得の方法では、コンフォーカルでの画像ではな

50

いので、コンフォーカル画像と比較して焦点深度の深い画像となり、このためにケージド基を解除したことによる特異反応が標本 110 のどのくらいの深さのところできているのか分からない。

【0017】

従って、標本像もコンフォーカルレーザー顕微鏡として標本画像を観察・記録しながら、標本 110 の所望の位置にレーザー光を瞬間的に照射して、標本 110 の動的特性を調査することが望ましい。

【0018】

又、研究用途によっては、標本 110 にレーザー光を照射する部位と観察したい断面とが同一平面上にあるとは限らず、ある断層の一部にレーザー光を照射し、それとは異なる断層の画像を取得したい場合がある。例えば、動脈において、その外郭の交感神経に刺激を与えたとき、その内側の平滑筋や内皮細胞にどのような反応が生じるかを調査する場合などである。従って、このような場合、レーザー光を照射する部位と、画像を取得する断面とが標本 110 内で選択できることが望ましい。

10

【0019】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、標本画像を観察・記録しながら標本の所望の位置にレーザー光を照射し、標本の動的特性などを調査できるレーザー走査顕微鏡を提供することを目的とする。

又、本発明は、レーザー光を照射する部位と画像を取得する断面とが標本内で選択できるレーザー走査顕微鏡を提供することを目的とする。

20

【0020】

【課題を解決するための手段】

請求項 1 によれば、レーザー光源から出力されたコヒーレント光を標本面上に走査したときの標本からの透過光、反射光又は標本に発生する蛍光を検出するレーザー走査顕微鏡において、レーザー光源から出力された第 1 のコヒーレント光の光路に設けられた第 1 走査光学系と、レーザー光源から出力された第 2 のコヒーレント光の光路に設けられた第 2 走査光学系と、を具備し、第 1 のコヒーレント光を 1 走査光学系によって、第 2 のコヒーレント光を 2 走査光学系によって個別に走査することを特徴とするレーザー走査顕微鏡である。

【0025】

【発明の実施の形態】

(1) 次に本発明の第 1 の実施の形態について説明する。なお、図 16 と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

図 1 は本発明に係るレーザー走査顕微鏡の構成図である。

30

【0026】

このレーザー走査顕微鏡は、第 1 のレーザー光源 100 から出力されたコヒーレント光で標本 110 面上を走査する観察用の第 1 の走査光学系 1 と、第 2 のレーザー光源 2 から出力されたコヒーレント光を標本 110 の任意の位置に照射してケージドを解除させる（標本 110 に化学反応を起こさせる）ための第 2 の走査光学系 3 とを備えている。

【0027】

このうち観察用の第 1 の走査光学系 1 は、ダイクロイックミラー 101、走査光学ユニット 102、リレーレンズ 103、ミラー 104、結像レンズ 106、対物レンズ 107 が配置されている。

40

【0028】

第 2 の走査光学系 3 は、第 2 のレーザー光源 2 から出力されるコヒーレント光の光路上に、互いに直交方向に走査する各走査ミラー 4a、4b を備えた走査光学ユニット 4、リレーレンズ 5、ミラー 6、結像レンズ 7、対物レンズ 8 を配置した構成となっている。

【0029】

又、第 1 の走査光学系 1 におけるダイクロイックミラー 101 の分岐光路上には、検出光学系 9 が配置されている。この検出光学系 9 は、第 1 の走査光学系 1 によりコヒーレント光で標本 110 面上を走査したときの標本 110 に発生する蛍光を検出する機能と、第 2

50

の走査光学系3によりコヒーレント光で標本110面上を走査したときの標本110からの透過光を検出する機能を有している。

【0030】

この検出光学系9は、ダイクロイックミラー101の分岐光路上に、測光フィルタ112、レンズ113、ピンホール114及び光電変換素子115を配置した構成となっている。

【0031】

上記ダイクロイックミラー101の特性は、標本110を染色する蛍光色素の励起波長(レーザ波長)及び蛍光波長によって決定される。例えば、上記の通り蛍光指示薬にカルシウムイオン指示薬のfluo-3を使い、レーザ波長488nm(例えばアルゴンレーザなど)を用いると、fluo-3は蛍光波長530nmの光を発するので、ダイクロイックミラー101は、例えば波長505nm以上の光を反射する特性となる。

10

【0032】

なお、第1のレーザ光源100にIRパルスレーザを用いて2光子吸収による画像を取得することができる。このとき、2光子吸収現象は結像位置でのみ発生するので、ピンホール114は理論的には不要となる。又、ダイクロイックミラー101は、IRレーザを透過し、可視蛍光を反射して光電変換素子115に導くための短波長反射の特性を持つものとなる。

【0033】

次に上記の如く構成されたレーザ走査顕微鏡の作用について説明する。

20

この例で第2の走査光学系3は、標本110の任意の位置にコヒーレント光を照射するために用いられる。

【0034】

すなわち、第2のレーザ光源2から発せられたコヒーレント光は、走査光学ユニット4に入射する。この走査光学ユニット4は、各走査ミラー4a、4bによってコヒーレント光を任意に偏向する。

【0035】

この任意に偏向されたコヒーレント光は、リレーレンズ5を透過した後、ミラー6によって光路の向きを変え、結像レンズ7を透過し、対物レンズ8に導かれる。

【0036】

この対物レンズ8を透過した光は、ステージ109上に載置された標本110の断面111に集光される。

30

なお、用途に応じて、各走査ミラー4a、4bによってある範囲を走査してもよく、又静止させてスポット的に照射させてもよい。さらに、各走査ミラー4a、4bを瞬間的にスキップ作動させることで瞬時に複数の任意の位置にスポット的に照射させてもよい。

【0037】

一方、第1のレーザ光源100から発せられたコヒーレント光は、ダイクロイックミラー101を透過して走査光学ユニット102に入射する。

この走査光学ユニット102は、各走査ミラー102a、102bによってコヒーレント光を偏向する。

40

【0038】

この偏向されたコヒーレント光は、リレーレンズ103を透過した後、ミラー104によって光路の向きを変え、結像レンズ106により対物レンズ107の瞳径を満足するものとなる。

【0039】

そして、結像レンズ106を透過した光は、対物レンズ107に至り、さらにこの対物レンズ107を透過した光は、ステージ109上に載置された標本110の断面111に集光される。

【0040】

このように標本110に光が照射されると、この光により蛍光指示薬が励起され、蛍光が

50

発せられる。例えば、蛍光指示薬にカルシウムイオン指示薬の fluo-3 を使い、レーザー波長 488 nm (例えばアルゴンレーザーなど) を用いると、fluo-3 は蛍光波長 530 nm の光を発する。

【0041】

この標本 110 からの蛍光は、先の光路とは逆方向に、対物レンズ 107 から結像レンズ 106、ミラー 104、リレーレンズ 103、各走査ミラー 102b、102a を通ってダイクロイックミラー 101 に到達し、このダイクロイックミラー 101 で反射して測光フィルタ 112 に入射する。

【0042】

このダイクロイックミラー 101 は、上記透過率波長特性で説明したように、標本 110 を染色する蛍光色素の励起波長及び蛍光波長とレーザー波長に依存している。 10

【0043】

この測光フィルタ 112 に入射した光は、標本 110 からの蛍光波長のみが選択され、その光がレンズ 113 によってピンホール 114 面に結像される。このピンホール 114 を貫けた蛍光は、光電変換素子 115 によって計測される。

【0044】

このように上記第 1 の実施の形態においては、第 1 の走査光学系 1 とは別に、第 2 のレーザー光源 2 から出力されたコヒーレント光を第 2 の走査光学系 3 により標本 110 上の任意の位置に照射し、かつ第 1 のレーザー光源 100 から出力されたコヒーレント光で第 1 の走査光学系 1 により標本 110 上を走査し、その蛍光を光電変換素子 115 によって計測するようにしたので、例えば第 1 の走査光学系により標本画像を観察・記録している途中に、第 2 の走査光学系 3 によりコヒーレント光を標本 110 に照射すれば、第 2 の走査光学系 3 によるコヒーレント光照射によって引き起こされる標本 110 の動的特性(化学反応)などを調査できる。 20

(2) 次に本発明の第 2 の実施の形態について説明する。なお、図 1 と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0045】

図 2 は本発明に係るレーザー走査顕微鏡の構成図である。

このレーザー走査顕微鏡は、観察用の第 1 の走査光学系 1 の光路と第 2 の走査光学系 3 の光路とを途中で一致させ、これら第 1 及び第 2 の走査光学系 1、3 を 1 つの対物レンズ 107 で共用する構成となっている。 30

【0046】

第 2 の走査光学系 3 は、上記第 1 の実施の形態と同様に、第 2 のレーザー光源 2 から出力されたコヒーレント光を標本 110 の任意の位置に照射する機能を有している。

【0047】

第 1 と第 2 の走査光学系 1、3 の各光路を一致させる構成を説明すると、第 1 の走査光学系 1 におけるリレーレンズ 103 の焦点位置には、ダイクロイックミラー 10 が配置されている。又、このダイクロイックミラー 10 の配置位置は、第 2 の走査光学系 3 におけるリレーレンズ 5 の焦点位置に一致している。

【0048】

このダイクロイックミラー 10 は、第 1 及び第 2 のレーザー光源 100, 2 の出力波長により次のような特性を有している。 40

通常、ケージド試薬の解除には、UV 光が使用される。そこで以下の組み合わせを考える。

(a) 観察用としては、第 1 のレーザー光源 100 に可視連続光レーザー(波長 488 nm)、第 2 のレーザー光源 2 として UV パルスレーザー(波長 351 nm)の組み合わせが考えられる。

(b) 観察用としては、第 1 のレーザー光源 100 に可視連続レーザー光(波長 488 nm)、第 2 のレーザー光源 2 として IR パルスレーザー(波長 710 nm)の組み合わせが考えられる。 50

(c) 観察用としては、第1のレーザ光源100にIRパルスレーザ(波長850nm)、第2のレーザ光源2としてIRパルスレーザ(波長710nm)の組み合わせが考えられる。

【0049】

なお、IRパルスレーザは、2光子励起現象を引き起こすことのできるレーザとする。図3はかかる条件に適用する各ダイクロイックミラー10の透過率波長特性を示す。

【0050】

同図(a)は上記組み合わせ(a)の場合のダイクロイックミラー10の特性を示し、このダイクロイックミラー10は、可視連続光レーザ(波長488nm)及びその蛍光(波長530nm)を透過し、UVパルスレーザ(波長351nm)を反射する特性を有している。 10

【0051】

同図(b)は上記組み合わせ(b)の場合のダイクロイックミラー10の特性を示し、上記同様に、ダイクロイックミラー10は、可視連続光レーザ(波長488nm)及びその蛍光(波長530nm)を透過し、IRパルスレーザ(波長710nm)を反射する特性を有している。

【0052】

同図(c)は上記組み合わせ(c)の場合のダイクロイックミラー10の特性を示し、このダイクロイックミラー10は、IRパルスレーザ(波長850nm)及び波長530nmの蛍光を透過し、IRパルスレーザ(波長710nm)を反射する特性を有している。 20

【0053】

次に上記の如く構成されたレーザ走査顕微鏡の作用について説明する。第2の走査光学系3は、標本110の任意の位置にコヒーレント光を照射するために用いる。

【0054】

すなわち、第2のレーザ光源2から発せられたコヒーレント光は、走査光学ユニット4の各走査ミラー4a、4bによって任意に偏向され、リレーレンズ5を透過してダイクロイックミラー10に入射し、ここで光路が変更され、結像レンズ106により対物レンズ107の瞳径を満足するものとなる。

【0055】

この結像レンズ106を透過した光は、対物レンズ107に至り、この対物レンズ107を透過し、ステージ109上に載置された標本110の断面111に集光される。 30

【0056】

なお、上記同様に用途に応じて、各走査ミラー4a、4bによってある範囲を走査してもよく、又静止させてスポット的に照射させてもよい。さらに、各走査ミラー4a、4bを瞬間的にスキップ作動させることで瞬時に複数の任意の位置にスポット的に照射させてもよい。

【0057】

一方、レーザ光源100から発せられたコヒーレント光は、ダイクロイックミラー101を透過し、走査光学ユニット102の各走査ミラー102a、102bによって偏向される。 40

【0058】

この偏向されたコヒーレント光は、リレーレンズ103を透過した後、ミラー104によって光路の向きを変え、ダイクロイックミラー10を透過し、結像レンズ106により対物レンズ107の瞳径を満足するものとなる。

【0059】

この結像レンズ106を透過した光は、対物レンズ107に至り、この対物レンズ107を透過し、ステージ109上に載置された標本110の断面111に集光される。

【0060】

このように標本110に光が照射されると、この光により蛍光指示薬が励起され、蛍光が 50



発せられる。

この標本 110 からの蛍光は、先の光路とは逆方向に、対物レンズ 107 から結像レンズ 106、ダイクロイックミラー 10、ミラー 104、リレーレンズ 103、各走査ミラー 102b、102a を通ってダイクロイックミラー 101 に到達し、このダイクロイックミラー 101 で反射して測光フィルタ 112 に入射する。

【0061】

この測光フィルタ 112 に入射した光は、標本 110 からの蛍光波長のみが選択され、その光がレンズ 113 によってピンホール 114 面に結像される。このピンホール 114 を貫けた蛍光は、光電変換素子 115 によって計測される。

【0062】

なお、第 1 のレーザ光源 100 に IR パルスレーザを用いると、2 光子吸収により蛍光画像を取得することができ、このとき 2 光子吸収現象は結像位置でのみ発生するので、ピンホール 114 は理論的には不要となる。又、ダイクロイックミラー 101 は、IR レーザを透過し、可視蛍光を反射して光電変換素子 115 に導くための短波長反射の特性を持つものとなる。

【0063】

このように上記第 2 の実施の形態においては、第 1 の走査光学系 1 に対して第 2 の走査光学系 3 をダイクロイックミラー 10 によって結合し、これら第 1 及び第 2 の走査光学系 1、3 を一つの対物レンズ 107 により共用する構成としても、上記第 1 の実施の形態と同様の効果を奏することは言うまでもない。

(3) 次に本発明の第 3 の実施の形態について説明する。なお、図 2 と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0064】

図 4 は本発明に係るレーザ走査顕微鏡の構成図である。

このレーザ走査顕微鏡は、第 2 の走査光学系 3 にも観察用の検出光学系 11 を設け、かつ第 1 及び第 2 の走査光学系 1、3 を一つのコントロールユニット 12 により走査制御する構成となっている。

【0065】

このうち観察用の検出光学系 11 は、第 2 のレーザ光源 2 から出力されたコヒーレント光で標本 110 面上を走査したときの標本 110 に発生する蛍光、又は標本 110 からの反射光を検出する機能を有している。

【0066】

この検出光学系 11 は、第 2 のレーザ光源 2 と走査光学ユニット 4 との間の光路上に、ダイクロイックミラー 13 を配置し、このダイクロイックミラー 13 の反射光路上に、標本 110 からの蛍光波長のみを選択する測光フィルタ 14、レンズ 15、ピンホール 16 及び光電変換素子 17 を配置した構成となっている。

【0067】

一方、コントロールユニット 12 は、第 1 及び第 2 の走査光学系 1、3 の各走査光学ユニット 102、4 の走査動作を制御するとともに各光電変換素子 115、17 の動作を制御し、これら光電変換素子 115、17 からそれぞれ出力される各電気信号を取り込み、コンピュータ 18 に対して例えば画像の重ね合わせ処理や画像を並べたりする処理等の画像処理の指令を発する機能を有している。

【0068】

コンピュータ 18 は、画像処理した結果をモニタテレビジョン 19 に映し出す機能を有している。

次に上記の如く構成されたレーザ走査顕微鏡の作用について説明する。

【0069】

第 1 のレーザ光源 100 から発せられたコヒーレント光は、ダイクロイックミラー 101 を透過し、走査光学ユニット 102 の各走査ミラー 102a、102b によって偏向され、リレーレンズ 103 を通過した後、ミラー 104 によって光路の向きを変え、ダイクロ

10

20

30

40

50

イックミラー 10、結像レンズ 106、対物レンズ 107 を透過し、標本 110 の断面 111 に集光される。

【0070】

この標本 110 からの蛍光は、先の光路とは逆方向に、対物レンズ 107 から結像レンズ 106、ダイクロイックミラー 10、ミラー 104、リレーレンズ 103、走査光学ユニット 102 を通ってダイクロイックミラー 101 に到達し、ここで反射して測光フィルタ 112 に入射する。

【0071】

この測光フィルタ 112 に入射した光は、標本 110 からの蛍光波長のみが選択され、ピンホール 114 を貫けて光電変換素子 115 によって計測される。

10

一方、第 2 のレーザ光源 2 から発せられたコヒーレント光は、走査光学ユニット 4 の各走査ミラー 4a、4b によって任意に偏向され、リレーレンズ 5 を透過してダイクロイックミラー 10 で反射され、結像レンズ 106、対物レンズ 107 を透過し、標本 110 の断面 111 に集光される。

【0072】

この標本 110 の反射光又は蛍光は、対物レンズ 107 から結像レンズ 106、ダイクロイックミラー 10、リレーレンズ 5、走査光学ユニット 4 を通ってダイクロイックミラー 13 に到達する。なお、ダイクロイックミラー 13 は、標本 110 からの反射光を検出するときハーフミラーに代える。

【0073】

20

そして、測光フィルタ 14 を取り外すことにより標本 110 からの反射光、又は測光フィルタ 14 を透過させて蛍光波長のみを選択した蛍光は、その光をレンズ 15 によってピンホール 16 面に結像する。光電変換素子 17 は、このピンホール 16 を貫けた蛍光を計測する。

【0074】

一方、コントロールユニット 12 は、各光電変換素子 115、17 からそれぞれ出力される各電気信号を取り込み、コンピュータ 18 に対して例えば画像の重ね合わせ処理や画像を並べたりする処理等の画像処理の指令を発する。

【0075】

このコンピュータ 18 は、各光電変換素子 115、17 からそれぞれ出力される各電気信号に基づいてそれぞれ画像を求め、これら画像の重ね合わせ処理や画像を並べたりする処理等の画像処理を実行し、その画像処理結果をモニタテレビジョン 19 に映し出す。

30

【0076】

このように上記第 3 の実施の形態においては、上記第 2 の実施の形態と同様な効果を奏することができるとともに、1つのコントロールユニット 12 によって第 1 及び第 2 の走査光学ユニット 102、4 を走査制御するので、第 1 の走査光学ユニット 102 の光電変換素子 115 及び第 2 の走査光学ユニット 4 の光電変換素子 17 からそれぞれ得られる各画像を重ね合わせたり、並べたりしてモニタテレビジョン 19 上に表示できる。

【0077】

又、第 1 及び第 2 の走査光学ユニット 102、4 により走査したときの 2 つの画像を同時にモニタテレビジョン 19 上に表示でき、例えば第 1 の走査光学ユニット 102 の走査により得られる画像内で、第 2 の走査光学ユニット 4 の走査による画像を得ることもできる。

40

【0078】

なお、第 1 のレーザ光源 100 と第 2 のレーザ光源 2 との各出力波長が同一であれば、ダイクロイックミラー 10 は、ハーフミラーに代えてもよい。

(4) 次に本発明の第 4 の実施の形態について説明する。なお、図 2 と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0079】

図 5 は本発明に係るレーザ走査顕微鏡の構成図である。

50

第2のレーザ光源2と走査光学ユニット4との間の光路上には、標本110に照射されるコヒーレント光の集光位置を、このコヒーレント光の光軸方向にシフトさせる光学調整機構20が配置されている。

【0080】

具体的に光学調整機構20は、第1のレーザ光源2から出力されたコヒーレント光の光束を任意の出射角度を持つように変換出力するもので、固定レンズ21と光軸方向に移動自在な可動レンズ22とから構成されている。

【0081】

すなわち、固定レンズ21により集光された光を、例えば位置23bに配置された可動レンズ22に入射することによって、この可動レンズ22から出射される光に任意の出射角度が持たれるようになる。例えば、可動レンズ22が位置23bに配置された場合、可動レンズ22から出射される光が平行光になるように設定されている。

10

【0082】

このように光学調整機構20から出射されるコヒーレント光の光束が任意の出射角度を持つように変換すると、標本110におけるコヒーレント光の集光位置がその光軸方向にシフトするものとなっている。

【0083】

例えば、図6に示すように可動レンズ22を位置23a側に移動すると、コヒーレント光の集光位置は図7に示すように標本断面24a側にシフトし、反対に可動レンズ22を位置23c側に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面24c側にシフトする。そして、可動レンズ22を位置23b付近に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面24b近傍にシフトするものとなっている。

20

【0084】

なお、光学調整機構20における可動レンズ22が位置23bに配置されたとき、2つのレーザ光源2、100の各集光位置が例えば同一断面24bになるように、光学素子すなわちリレーレンズ5とリレーレンズ103とは同一のものを使用し、結像レンズ106とリレーレンズ5及びリレーレンズ103との距離を等しくする。

【0085】

次に上記の如く構成されたレーザ走査顕微鏡の作用について説明する。

レーザ光源100から発せられたコヒーレント光は、ダイクロイックミラー101を透過し、走査光学ユニット102の各走査ミラー102a、102bによって偏向され、リレーレンズ103を透過した後、ミラー104によって光路の向きを変え、ダイクロイックミラー10、結像レンズ106、対物レンズ107を透過し、標本110の断面24に集光される。

30

【0086】

この標本110からの蛍光は、先の光路とは逆方向に、対物レンズ107から結像レンズ106、ダイクロイックミラー10、ミラー104、リレーレンズ103、走査光学ユニット102を通過してダイクロイックミラー101に到達し、ここで反射して測光フィルタ112に入射する。

【0087】

この測光フィルタ112に入射した光は、標本110からの蛍光波長のみが選択され、ピンホール114を貫けて光電変換素子115によって計測される。

40

一方、第2のレーザ光源2から発せられたコヒーレント光は、光学調整機構20に入射する。

【0088】

この光学調整機構20は、第2のレーザ光源2から出力されたコヒーレント光の光束を、固定レンズ21及び可動レンズ22の配置位置23a~23cに応じて任意の出射角度を持つように変換出力する。

【0089】

この光学調整機構20から任意の出射角度で変換出力されたコヒーレント光は、走査光学

50

ユニット4の各走査ミラー4a、4bによって任意に偏向され、リレーレンズ5を透過してダイクロイックミラー10で反射され、結像レンズ106、対物レンズ107を透過し、標本110の断面111に集光される。

【0090】

なお、用途に応じて、各走査ミラー4a、4bによって標本110上のある範囲を走査してもよいし、静止させてスポット的に照射させてもよい。さらに、各走査ミラー4a、4bを瞬間的にスキップ作動させることで瞬時に複数の任意の位置にスポット的に照射させることもできる。

【0091】

ここで、上記光学調整機構20における可動レンズ22が各位置23a~23cの範囲で可動することで、標本110におけるコヒーレント光の集光位置は、その光軸方向にシフトする。

10

【0092】

例えば、図6に示すように可動レンズ22を位置23a側に移動すると、コヒーレント光の集光位置は図7に示すように標本断面24a側にシフトし、反対に可動レンズ22を位置23c側に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面24c側にシフトする。そして、可動レンズ22を位置23b付近に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面24b近傍にシフトする。

【0093】

このように上記第4の実施の形態においては、第2のレーザ光源2から出力されたコヒーレント光の光束を任意の出射角度を持つように変換出力し、標本110におけるコヒーレント光の集光位置をその光軸方向にシフトさせる光学調整機構20を設けたので、標本110にレーザ光を照射する部位と観察したい断面とが同一平面上にあるとは限らない場合、すなわち断層の一部にレーザ光を照射し、それとは異なる断層の画像を取得したい場合、例えば動脈において、その外郭の交感神経に刺激を与えたとき、その内側の平滑筋や内皮細胞にどのような反応が生じるかを調査する場合などがあるが、このような場合でも光学調整機構20の可動レンズ22を移動させることにより、観察したい断面とレーザ光を照射する断層とが同一平面上になくても対応でき、上記第1の実施の形態の効果の如く、第1の走査光学系により標本画像を観察・記録している途中に、第2の走査光学系によりコヒーレント光を標本110に照射すれば、第2の走査光学系によるコヒーレント光照射によって引き起こされる標本110の動的特性(化学反応)等を調査できる。

20

30

【0094】

なお、可動レンズ22の移動量に対して集光位置24a~24cの位置関係を予め調査しておけば、ステージ109の移動量に対して可動レンズ22の移動量を相関付けることができ、ステージ109が昇降しても、可動レンズ22を調整することで標本110の任意の位置にコヒーレント光を照射できる。すなわち、第1の走査光学系1によって標本110の任意の平面の断層像の取得を行いながら、第2の走査光学系3によって任意の部位にコヒーレント光を照射できる。

(5) 次に本発明の第5の実施の形態について説明する。なお、図2と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

40

【0095】

図8は本発明に係るレーザ走査顕微鏡の構成図である。

標本110の任意の位置にコヒーレント光を照射する第2の走査光学系3の光路上には、ダイクロイックミラー25を介して位置確認用のポインタレーザ光源26が設けられている。

【0096】

このポインタレーザ光源26は、標本110に照射したときに標本110に変化を与えない波長、例えば波長650nmのポインタ用のレーザ光を出力する機能を有している。

【0097】

このポインタレーザ光源26を用いたときに、標本110からの反射光により位置確認す

50

る場合の各ダイクロイックミラー 27、28の各特性は次の通りとなる。

【0098】

上記第2の実施の形態で説明したように、ケージド試薬の解除には、通常、UV光が使用される。そこで以下の組み合わせを考える。(a) 観察用としては、第1のレーザ光源100に可視連続光レーザ(波長488nm)、第2のレーザ光源2としてUVパルスレーザ(波長351nm)の組み合わせが考えられる。(b) 観察用としては、第1のレーザ光源100に可視連続レーザ光(波長488nm)、第2のレーザ光源2としてIRパルスレーザ(波長710nm)の組み合わせが考えられる。(c) 観察用としては、第1のレーザ光源100にIRパルスレーザ(波長850nm)、第2のレーザ光源2としてIRパルスレーザ(波長710nm)の組み合わせが考えられる。

10

【0099】

なお、IRパルスレーザは、2光子励起現象を引き起こすことのできるレーザとする。図9はかかる条件に適用する各ダイクロイックミラー27、28の透過率波長特性を示す。

【0100】

同図(a)は上記組み合わせ(a)の場合のダイクロイックミラー28の特性を示し、このダイクロイックミラー28は、可視連続光レーザ(波長488nm)及びその蛍光(波長530nm)を透過し、UVパルスレーザ(波長351nm)を反射する特性を有している。そして、ダイクロイックミラー28は、波長650nmに対して透過率50%程度に設定されている。

20

【0101】

同図(b)は上記組み合わせ(b)の場合のダイクロイックミラー28の特性を示し、上記同様に、ダイクロイックミラー28は、可視連続光レーザ(波長488nm)及びその蛍光(波長530nm)を透過し、IRパルスレーザ(波長710nm)を反射する特性を有している。

【0102】

同図(c)は上記組み合わせ(c)の場合のダイクロイックミラー28の特性を示し、このダイクロイックミラー28は、IRパルスレーザ(波長850nm)及び波長530nmの蛍光を透過し、IRパルスレーザ(波長710nm)を反射する特性を有している。そして、ダイクロイックミラー27は、波長650nmに対して透過率が極力小さく設定されている。

30

【0103】

なお、レーザ光源2が本来の目的以外の波長、例えばポインタレーザ光源26と同じ波長のレーザ光を出力できるような多波長出射のものであれば、レーザ光源2の出射端に励起フィルタを設けることによって、ポインタレーザ光源26及びダイクロイックミラー25は不要となり、それでも同一の効果は得られる。

【0104】

次に上記の如く構成されたレーザ走査顕微鏡の作用について説明する。

まず、第1の走査光学系1により標本110の画像が取られる。

すなわち、第1のレーザ光源100から発せられたコヒーレント光は、ダイクロイックミラー27を透過し、走査光学ユニット102の各走査ミラー102a、102bによって偏向される。

40

【0105】

この偏向されたコヒーレント光は、リレーレンズ103を透過した後、ミラー104によって光路の向きを変え、ダイクロイックミラー28を透過し、結像レンズ106により対物レンズ107の瞳径を満足するものとなる。

【0106】

この結像レンズ106を透過した光は、対物レンズ107に至り、この対物レンズ107を透過し、ステージ109上に載置された標本110の断面111に集光される。

【0107】

50

このように標本 1 1 0 に光が照射されると、この光により蛍光指示薬が励起され、蛍光が発せられる。

この標本 1 1 0 からの蛍光は、先の光路とは逆方向に、対物レンズ 1 0 7 から結像レンズ 1 0 6、ダイクロイックミラー 2 8、ミラー 1 0 4、リレーレンズ 1 0 3、各走査ミラー 1 0 2 b、1 0 2 a を通ってダイクロイックミラー 2 7 に到達し、このダイクロイックミラー 2 7 で反射して測光フィルタ 1 1 2 に入射する。

【 0 1 0 8 】

この測光フィルタ 1 1 2 に入射した光は、標本 1 1 0 からの蛍光波長のみが選択され、その光がレンズ 1 1 3 によってピンホール 1 1 4 面に結像される。このピンホール 1 1 4 を貫けた蛍光は、光電変換素子 1 1 5 によって計測される。

10

【 0 1 0 9 】

この光電変換素子 1 1 5 から出力される電気信号は、例えば画像処理装置に送られ、ここで画像処理されて標本 1 1 0 の画像としてモニタテレビジョンに映し出される。

【 0 1 1 0 】

次に第 2 のレーザ光源 2 をオフした状態で、ポインタレーザ光源 2 6 からコヒーレント光を出力させる。

このポインタレーザ光源 2 6 から発せられたコヒーレント光は、ダイクロイックミラー 2 5 により第 2 の走査光学系 3 の光軸と同軸に入り、走査光学ユニット 4 の各走査ミラー 4 a、4 b によって任意に偏向され、リレーレンズ 5 を透過してダイクロイックミラー 2 8 に入射して光路の向きを変え、結像レンズ 1 0 6、対物レンズ 1 0 7 を透過し、標本 1 1 0 の断面 1 1 1 に集光される。

20

【 0 1 1 1 】

この標本 1 1 0 の反射光又は蛍光は、対物レンズ 1 0 7 から結像レンズ 1 0 6、ダイクロイックミラー 2 8、ミラー 1 0 4、リレーレンズ 1 0 3、走査ユニット 1 0 2 を通ってダイクロイックミラー 2 7 に到達する。

【 0 1 1 2 】

そして、測光フィルタ 1 1 2 を取り外すことにより標本 1 1 0 からの反射光、又は測光フィルタ 1 1 2 を透過させて蛍光波長のみを選択した蛍光は、レンズ 1 1 3 によってピンホール 1 1 4 面に結像される。このピンホール 1 1 4 を貫けた蛍光は、光電変換素子 1 1 5 によって取得される。

30

【 0 1 1 3 】

この光電変換素子 1 1 5 から出力される電気信号は、上記同様に画像処理装置に送られ、ここで画像処理されて標本 1 1 0 の画像としてモニタテレビジョンに映し出される。

【 0 1 1 4 】

従って、位置確認用のコヒーレント光の集光された画像は、モニタテレビジョンの画面上に第 1 の走査光学系 1 によって得られた標本 1 1 0 の画像の上に重ねて映し出される。

【 0 1 1 5 】

ここで、レーザ光源 1 0 0 とポインタレーザ光源 2 6 とが同一波長であれば、パルス光照射位置のみ輝度が高くなって画像として現れる。又、これらレーザ光源 1 0 0、2 6 が異なる波長であれば、レーザ光源 1 0 0 から出力されるコヒーレント光によって得られる蛍光標本全体画像と異なる波長で検出できるようにダイクロイックミラー 2 7 と測光フィルタ 1 1 2 との間にさらにダイクロイックミラー、測光フィルタ、レンズ、ピンホール、光電変換素子を設け、ポインタレーザ光源 2 6 から出力されるコヒーレント光によって得られる像だけを検出できるようにポインタレーザ光源 2 6、ダイクロイックミラー、測光フィルタの波長を選択すればよい。

40

【 0 1 1 6 】

この位置確認用のコヒーレント光の集光位置は、第 2 のレーザ光源 2 を動作させたときの集光位置と同一になっている。

従って、モニタテレビジョンに映し出される画面を観察しながら第 2 の走査光学系 3 を移動させ、位置確認用のコヒーレント光の集光位置が標本 1 1 0 に例えば化学反応を起こさ

50

せたい部位に一致するように移動させる。

【0117】

そうして、位置確認用のコヒーレント光の集光位置が標本110に化学反応を起こさせたい部位に一致した後、第2のレーザ光源2からコヒーレント光が出力される。

【0118】

この第2のレーザ光源2から発せられたコヒーレント光は、走査光学ユニット4の各走査ミラー4a、4bによって任意に偏向され、リレーレンズ5を透過してダイクロイックミラー28で反射され、結像レンズ106により対物レンズ107の瞳径を満足するものとなる。

【0119】

この結像レンズ106を透過した光は、対物レンズ107に至り、この対物レンズ107を透過し、ステージ109上に載置された標本110の断面111に集光される。

【0120】

このとき、第1の走査光学系1は、上記同様に標本110の断面111の画像を検出し、モニタテレビジョンに映し出すので、第2の走査光学系3により標本110にコヒーレント光を照射したときの動的特性が観察できる。

【0121】

このように上記第5の実施の形態においては、標本110の任意の位置にコヒーレント光を照射する第2の走査光学系3の光路上に、ダイクロイックミラー25を介してポインタレーザ光源26を設けたので、標本110にコヒーレント光を照射して例えば化学反応を起こさせる前に、コヒーレント光を照射する部位を標本110の全体像の中から位置合わせの確認ができる。

【0122】

なお、ポインタレーザ光源26は、上記第5の実施の形態に限らず、上記第1～4の実施の形態における第2の走査光学系3に設け、標本110にコヒーレント光を照射して例えば化学反応を起こさせる部位の確認ができる。

【0123】

又、図10は工業用のレーザ加工に適用した場合のレーザ走査顕微鏡の構成図である。第2のレーザ光源2aは、例えばCO<sub>2</sub>などのガスレーザ発振装置が用いられ、標本に代わって被加工物11aがステージ109上に載置されている。

【0124】

この場合、ダイクロイックミラー25や走査光学ユニット4、リレーレンズ5、ダイクロイックミラー28、結像レンズ106、対物レンズ107は、レーザ光源2aのレーザ出力に耐えられるものが用いられる。

【0125】

このような構成であれば、被加工物にコヒーレント光を照射してレーザ加工する前に、このレーザ加工する部分を被加工物の全体像の中から位置合わせ確認できる。

(6) 次に本発明の第6の実施の形態について説明する。なお、図1と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0126】

図11は本発明に係るレーザ走査顕微鏡の構成図である。

第2のレーザ光源2と第2の走査光学ユニット4との間の光路上には、標本110に照射されるコヒーレント光の集光位置をこのコヒーレント光の光軸方向にシフトさせる光学調整機構20が配置されている。

【0127】

この光学調整機構20は、第2のレーザ光源2から出力されたコヒーレント光の光束を任意の出射角度を持つように変換出力するもので、例えば、可動レンズ22を位置23a側に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面29a側にシフトし、反対に可動レンズ22を位置23c側に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面29c側にシフトする。そして、可動レンズ22を位置23b付近に移動すると、コヒーレント光の

10

20

30

40

50

集光位置は標本断面 2 9 b 近傍にシフトするものとなっている。

【 0 1 2 8 】

次に上記の如く構成されたレーザ走査顕微鏡の作用について説明する。なお、第 1 の走査光学系 1 の作用は上記第 1 の実施の形態と同様なのでその説明は省略し、光学調整機構 2 0 の作用について説明する。

【 0 1 2 9 】

第 2 のレーザ光源 2 から発せられたコヒーレント光は、光学調整機構 2 0 に入射する。この光学調整機構 2 0 は、第 2 のレーザ光源 2 から出力されたコヒーレント光の光束を、固定レンズ 2 1 及び可動レンズ 2 2 の配置位置 2 3 a ~ 2 3 c に応じて任意の出射角度を持つように変換出力する。

10

【 0 1 3 0 】

この光学調整機構 2 0 から任意の出射角度で変換出力されたコヒーレント光は、走査光学ユニット 4 の各走査ミラー 4 a、4 b によって任意に偏向され、リレーレンズ 5 からミラー 6 で光路の向きを変え、結像レンズ 7、対物レンズ 8 を透過し、標本 1 1 0 の断面 2 9 a ~ 2 9 c に集光される。

【 0 1 3 1 】

なお、用途に応じて、各走査ミラー 4 a、4 b によって標本 1 1 0 上のある範囲を走査してもよいし、静止させてスポット的に照射させてもよい。さらに、各走査ミラー 4 a、4 b を瞬間的にスキップ作動させることで瞬時に複数の任意の位置にスポット的に照射させることもできる。

20

【 0 1 3 2 】

ここで、上記光学調整機構 2 0 における可動レンズ 2 2 が各位置 2 3 a ~ 2 3 c の範囲で可動することで、標本 1 1 0 におけるコヒーレント光の集光位置は、その光軸方向にシフトする。

【 0 1 3 3 】

例えば、可動レンズ 2 2 を位置 2 3 a 側に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面 2 9 a 側にシフトし、反対に可動レンズ 2 2 を位置 2 3 c 側に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面 2 9 c 側にシフトする。そして、可動レンズ 2 2 を位置 2 3 b 付近に移動すると、コヒーレント光の集光位置は標本断面 2 9 b 近傍にシフトする。

【 0 1 3 4 】

このように上記第 6 の実施の形態においては、レーザ光源 2 から出力されたコヒーレント光の光束を任意の出射角度を持つように変換出力し、標本 1 1 0 におけるコヒーレント光の集光位置をその光軸方向にシフトさせる光学調整機構 2 0 を設けたので、上記第 4 の実施の形態と同様に、標本 1 1 0 にレーザ光を照射する部位と観察したい断面とが同一平面上にあるとは限らない場合、すなわち、ある断層の一部にレーザ光を照射し、それとは異なる断層の画像を取得したい場合、例えば動脈において、その外郭の交感神経に刺激を与えたとき、その内側の平滑筋や内皮細胞にどのような反応が生じるかを調査する場合などがあるが、このような場合でも光学調整機構 2 0 の可動レンズ 2 2 を移動させることにより、観察したい断面とレーザ光を照射する断層とが同一平面上になくても対応でき、上記第 1 の実施の形態の効果の如く、第 1 の走査光学系により標本画像を観察・記録している途中に、第 2 の走査光学系によりコヒーレント光を標本 1 1 0 に照射すれば、第 2 の走査光学系によるコヒーレント光照射によって引き起こされる標本 1 1 0 の動的特性（化学反応）等を調査できる。

30

40

【 0 1 3 5 】

なお、上記第 1 乃至第 6 の実施の形態は、次の通り変形してもよい。

例えば、上記図 5 に示す第 4 の実施の形態に対し、上記第 5 の実施の形態のポインタレーザ光源 2 6 を付加してもよい。

【 0 1 3 6 】

この場合のレーザ照射位置確認方法は、可動レンズ 2 2 を位置 2 3 b に配置し、レーザ光を照射したい断層像と観察したい断層像とを記録する。ここで、2 つの断層の距離を計測

50



する。

【0137】

可動レンズ22の移動量と対物レンズ107出射後の結像位置が予め相関づけられていると、可動レンズ22の移動量が決まる。

例えば、図7に示す断層24cにレーザ光を照射し、断層24bの画像を取得しようとする場合、可動レンズ22は位置23cにあればよい。このとき断層24cにレーザ光が結像するかどうか確認するためには、ステージ109を断層24bと24cの差分だけ上方向に移動させれば、ポインタレーザ光源26から出力されたコヒーレント光による標本110の蛍光又は反射光が光電変換素子115により確認できる。この確認後は、ステージ109を元の位置に戻して測定を開始すればよい。

10

【0138】

又、レーザ光源及びその走査光学系は、2系統に限らず、複数系統備えるようにしてもよい。これにより、例えば標本110の任意の位置の観察・記録と、標本110の任意の位置における動的特性などを調査とが複数箇所で行うことができる。

(7) 次に本発明の第7の実施の形態について説明する。

【0139】

図12は本発明に係るレーザ走査顕微鏡の構成図である。

同図において、30は近赤外域の波長のサブピコ秒の単色コヒーレント光パルスを発するレーザ光源、31は光束をコリメートする光束変換光学系、32は対物レンズ系、33は標本面である。

20

【0140】

又、34は近赤外の波長域でも比較的短波長(例えば700nm辺り)を反射し、比較的長波長(例えば850nm辺り)を透過するダイクロイックミラー、35は直進する光束、36は直角に曲げられた光束、37は近赤外を透過し可視光を反射するダイクロイックミラー、38及び39は一对のガルバノミラー、40は瞳投影レンズ、41は対物レンズ系32の像位置、42は結像レンズ、43は対物レンズ、44は検出光学系、45は検出光学系44の検出器、46は近赤外の波長域でも比較的長波長(例えば850nm辺り)と可視光を反射し、近赤外の波長域中比較的短波長(例えば700nm辺り)を透過するダイクロイックミラー、47は検出光学系44のピンホール、48はコンデンサーレンズ、49は近赤外カットフィルタである。

30

【0141】

図13(a)(b)は、それぞれ図12の領域A、B及びCにおける置き換え可能な他の光学系を示す部分構成図である。

同図(a)において55は瞳リレー光学系であり、同図(b)において36は第2の近赤外レーザ光をコリメートした光束である。

【0142】

又、50、51は光束を偏向するための近接配置された2枚のガルバノミラー、52は瞳投影レンズ、53は対物レンズ系32の像位置、54は検出器である。

【0143】

次に上記の如く構成されたレーザ走査顕微鏡の作用について説明する。

40

近赤外域の波長のサブピコ秒の単色コヒーレント光パルスを発するレーザ光源30からの光束は、光束変換光学系31に導入され、所望の大きさのコリメート光に変換される。

【0144】

そのコリメート光は、近赤外の波長域でも比較的短波長(例えば700nm辺り)を反射し比較的長波長(例えば850nm辺り)を透過するダイクロイックミラー34により直進する光束35と直角に曲げられた光束36の2光束に分けられる。

【0145】

直進する光束35は近赤外光を透過し可視光を反射するダイクロイックミラー37を透過し、近接して配置された2枚のガルバノミラー38、39により偏向させられた光束は瞳投影レンズ40によって、結像レンズ42と対物レンズ43よりなる対物レンズ系32の

50

像位置 4 1 に集光される。

【 0 1 4 6 】

この時、瞳投影レンズ 4 0 により、近接して配置された 2 枚のガルバノミラー 3 8、3 9 の中間点に対物レンズ系 3 2 の瞳位置近傍に投影されていることは云うまでもない。

【 0 1 4 7 】

対物レンズ系 3 2 の像位置 4 1 に集光され、ラスタースキャンされたスポットは対物レンズ系 3 2 により標本面 3 3 に投影され、標本面上を微小スポットとなりラスタースキャンする。

【 0 1 4 8 】

標本面 3 3 で 2 光子 ( 或いはそれ以上の多光子 ) 吸収により励起され発生した蛍光が、光路を逆進し、ダイクロイックミラー 3 7 で反射され検出光学系 4 4 に導入される。 10

【 0 1 4 9 】

この時、検出光学系 4 4 の集光位置にピンホール 4 7 を配し、所謂共焦点系とすることにより、更に光軸方向の分解能を向上させることができ、また光学系等からフレアなどの余分な光を除去できるため、コントラストも向上する。ピンホール 4 7 は常に光路中にあっても構わないし、光路中に出し入れ自由でも構わない。また、その径は、対物レンズや使用波長に応じて可変にすることが望ましい。

【 0 1 5 0 】

また、標本面 3 3 から発した蛍光は、標本面を挟んで対物レンズと逆側に配置されたコンデンサレンズ 4 8 と近赤外カットフィルタ 4 9 を介し、検出器 5 4 で検出しても良い。検出された蛍光信号は検出器 5 4 により電気信号に変換され、図示しない信号処理系を経てモニタ上に画像として表示される。 20

【 0 1 5 1 】

一方、ダイクロイックミラー 3 4 により直角に曲げられた光束 3 6 は近接して配置された 2 枚のガルバノミラー 5 0、5 1 により互いに直交する方向に偏向される。これらのガルバノミラー 5 0、5 1 により偏向させられた光束は瞳投影レンズ 5 2 によって、結像レンズ 4 2 と対物レンズ 4 3 よりなる対物レンズ系 3 2 の像位置 5 3 に集光される。

【 0 1 5 2 】

この時、瞳投影レンズ 5 2 により、近接して配置された 2 枚のガルバノミラー 5 0、5 1 の中間点に対物レンズ系 3 2 の瞳位置近傍に投影されていることは云うまでもない。 30

【 0 1 5 3 】

2 枚のガルバノミラー 5 0、5 1 により対物レンズ系 3 2 の像位置 5 3 の任意の位置に集光されたスポットは像位置 5 3 と結像レンズ 4 2 の間に配された近赤外の波長域でも比較的長波長 ( 例えば 8 5 0 n m 辺り ) と可視光を反射し、近赤外の波長域中比較的短波長 ( 例えば 7 0 0 n m 辺り ) を透過するダイクロイックミラー 4 6 で対物レンズ系 3 2 に導入され、標本面 3 3 上の任意の位置に微小スポットとして投影され、2 光子 ( 或いはそれ以上の多光子 ) 吸収による化学反応を起こす。

【 0 1 5 4 】

上記構成のように、近接して配置された 2 枚のガルバノミラー ( スキャナ ) 5 0、5 1 で走査する場合は、瞳位置はそれらの中央付近が望ましいが、どちらかのスキャナ上にあっても良い。又、領域 A を図 1 3 ( a ) に示すようなスキャナー間にリレー光学系 5 5 を配置したものに置き換えた走査光学系であっても良い。 40

【 0 1 5 5 】

又、領域 B を図 1 3 ( b ) に示すように先にダイクロイックミラー 3 4 で分割し、それらを別々の光束変換光学系 3 1 で所望の大きさのコリメート光 3 5、3 6 にするような構成に置き換えても構わない。

【 0 1 5 6 】

なお、図 1 4 ( a ) ( b ) 及び ( c ) は、図 1 2 に示されているダイクロイックミラー 3 4、3 7 及び 4 6 の分光特性の一例を示す波長と透過率の関係図である。

具体的には、近赤外レーザー光の波長を 7 0 0 n m に設定し、標本面上の任意の位置で 2 光 50

子吸収によるケージド試薬の解除を行わせ、次に近赤外レーザの波長を850nmに設定し2光子吸収による蛍光イメージングを行う。

(8) 次に本発明の第8の実施の形態について説明する。

【0157】

図15は本発明に係るレーザ走査顕微鏡の部分構成図である。なお、全体的な構成は上記第7の実施の形態等と同じであり、走査光学系のみが異なるため、その部分のみ図示する。

【0158】

56は瞳リレー光学系であり、57は共振ガルバノミラーである。

以下、作用について説明する。

ダイクロミックミラー37を透過した近赤外光束は、共振ガルバノミラー57によりX方向(モニタ上で横方向)に高速に偏向される。

【0159】

偏向された光束は、瞳リレー光学系56によりリレーされ、近接して配置された2枚のガルバノミラー38、39によりX、Y両方に偏向される。X、Y両方に偏向された光束は、瞳投影レンズ40によって、結像レンズ42と対物レンズ43よりなる対物レンズ系32の像位置41に集光される。

【0160】

この時、共振ガルバノミラー57の位置は瞳リレー光学系56により近接して配置された2枚のガルバノミラー38、39の中間点に投影され、更にこの位置が瞳投影レンズ40により、対物レンズ系32の瞳位置近傍に投影されていることは言うまでもない。

【0161】

ここで、2光子(或いはそれ以上の多光子)吸収により励起され発生した蛍光を画像として高速に捉える時は、共振ガルバノミラー57とY方向のガルバノミラー39を用いて走査し、X方向のガルバノミラー38は固定しておく。これにより、遅くともビデオレート以上の速さで画像を得ることができる。

【0162】

他方、画像が暗く低速で走査したい場合、或いは標本面上の任意の位置で2光子(或いはそれ以上の多光子)吸収による化学反応を起こさせたい場合は、共振ガルバノミラー57は固定し、X、Y両方向のガルバノミラー38、39で走査する。

【0163】

本実施の形態では高速スキャナとして共振ガルバノミラーを挙げているが、音響光学素子(AOD)やポリゴンミラーを用いても良い。但し、これらの高速スキャナのうち、音響光学素子は波長依存性があるため試料に照射された光の波長と、蛍光のように試料から発する光の波長とが異なるような場合には波長依存性に起因する問題を考慮しなければならない。また、ポリゴンミラーは走査方向において、走査幅や走査中心を制御できないためランダム走査の用途には使用できない。何れの場合もこれらの高速スキャナは任意の偏向方向にスキャナを制御することが不可能であるため、ランダムスキャンの用途には使えない。

【0164】

本実施の形態の構成を採れば、用いるスキャナを切り換えるだけで、高速のイメージングと低速のイメージング或いはランダムアクセスを行うことができる。尚、3次元像の構築や3次元内でのランダムアクセスにはステージ上下或いは対物レンズ上下による光軸方向の走査(Z走査)を併用することは言うまでもない。また、低速イメージングやランダムアクセスには、既知の手法であるが、光束スキャンによる走査ではなく、ステージ或いは対物レンズのスキャンによる走査という手法もあることを付記しておく。

【0165】

上記何れの実施の形態も、これらの構成に限定されるものではなく、複数のレーザと走査光学系等の様々な組み合わせで構成できることは言うまでもない。また、一般のレーザ走査顕微鏡と同様、複数の検出器で検出された信号を画像処理し、特殊な効果を得ることが

10

20

30

40

50

できることも云うまでもない。

【 0 1 6 6 】

【 発明の効果 】

本発明の請求項 1 ~ 5 によれば、標本画像を観察・記録しながら標本の所望の位置にレーザー光を照射し、標本の動的特性などを調査できるレーザー走査顕微鏡を提供できる。

【 0 1 6 7 】

又、本発明の請求項 4、5 によれば、レーザー光を照射する部位と画像を取得する断面とが標本内で選択できるレーザー走査顕微鏡を提供できる。

又、本発明の請求項 6 によれば、複数のレーザーや走査光学系等を組み合わせることにより、実用上有効なシステムを構築することが可能で、又高速イメージングと 3 次元ランダムアクセスも簡単な切り換えで可能となり、かつ検出器のレイアウトの自由度の大きな多光子吸収レーザー走査顕微鏡を提供できる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 本発明に係るレーザー走査顕微鏡の第 1 の実施の形態を示す構成図。

【 図 2 】 本発明に係るレーザー走査顕微鏡の第 2 の実施の形態を示す構成図。

【 図 3 】 同顕微鏡に用いられるダイクロイックミラーの透過率波長特性を示す図。

【 図 4 】 本発明に係るレーザー走査顕微鏡の第 3 の実施の形態を示す構成図。

【 図 5 】 本発明に係るレーザー走査顕微鏡の第 4 の実施の形態を示す構成図。

【 図 6 】 同顕微鏡に用いられる光学調整機構の具体的な構成図。

【 図 7 】 同光学調整機構による結像面のシフトを示す模式図。

【 図 8 】 本発明に係るレーザー走査顕微鏡の第 5 の実施の形態を示す構成図。

【 図 9 】 同顕微鏡に用いられるダイクロイックミラーの透過率波長特性を示す図。

【 図 1 0 】 同顕微鏡をレーザー加工に適用した場合の構成図。

【 図 1 1 】 本発明に係るレーザー走査顕微鏡の第 6 の実施の形態を示す構成図。

【 図 1 2 】 本発明に係るレーザー走査顕微鏡の第 7 の実施の形態を示す構成図。

【 図 1 3 】 同顕微鏡における各領域に置き換え可能な光学系を示す図。

【 図 1 4 】 同顕微鏡に用いられるダイクロイックミラーの透過率波長特性を示す図。

【 図 1 5 】 本発明に係るレーザー走査顕微鏡の第 8 の実施の形態を示す構成図。

【 図 1 6 】 従来 of レーザー走査顕微鏡の構成図。

【 符号の説明 】

1 ... 第 1 の走査光学系、

2 , 2 a ... 第 2 のレーザー光源、

3 ... 第 2 の走査光学系、

4 ... 走査光学ユニット、

5 ... リレーレンズ、

6 ... ミラー、

7 ... 結像レンズ、

8 ... 対物レンズ、

9 ... 検出光学系、

1 0 ... ダイクロイックミラー、

1 1 ... 検出光学系、

1 2 ... コントロールユニット、

1 3 ... ダイクロイックミラー、

1 4 ... 測光フィルタ、

1 5 ... レンズ、

1 6 ... ピンホール、

1 7 ... 光電変換素子、

1 8 ... コンピュータ、

1 9 ... モニタテレビジョン、

2 0 ... 光学調整機構、

10

20

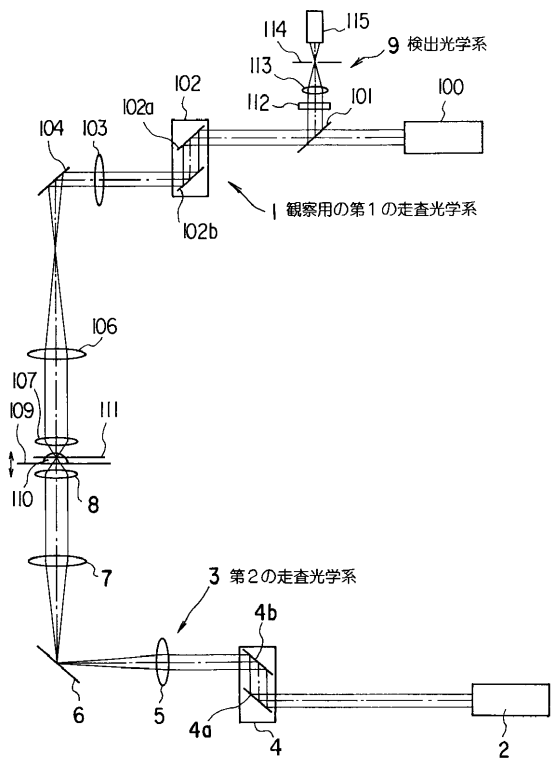
30

40

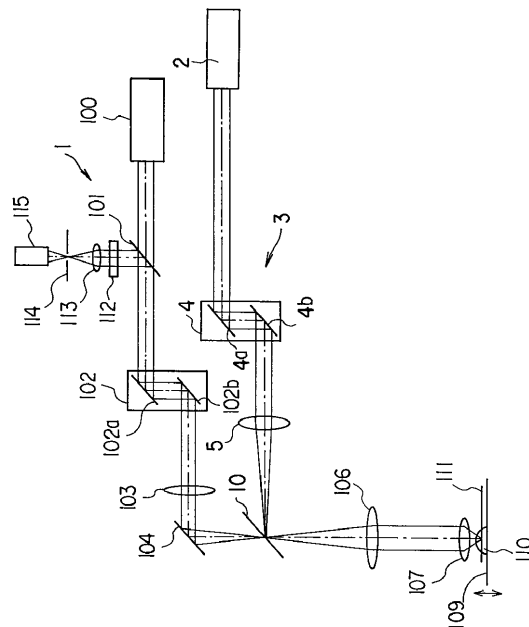
50

2 1 ... 固定レンズ、	
2 2 ... 可動レンズ、	
2 5 ... ダイクロイックミラー、	
2 6 ... ポインタレーザ光源、	
2 7 , 2 8 ... ダイクロイックミラー、	
3 0 ... レーザ光源、	
3 1 ... 光束変換光学系、	
3 2 ... 対物レンズ系、	
3 3 ... 標本面、	
3 4 , 3 7 ... ダイクロイックミラー、	10
3 8 , 3 9 ... ガルバノミラー、	
4 0 ... 瞳投影レンズ、	
4 2 ... 結像レンズ、	
4 3 ... 対物レンズ、	
4 4 ... 検出光学系、	
4 5 ... 検出器、	
4 6 ... ダイクロイックミラー、	
4 7 ... ピンホール、	
4 8 ... コンデンサレンズ、	
4 9 ... 赤外カットフィルタ、	20
5 0 , 5 1 ... ガルバノミラー、	
5 2 ... 瞳投影レンズ、	
5 4 ... 検出器、	
5 5 ... リレー光学系、	
5 6 ... 瞳リレー光学系、	
5 7 ... 共振ガルバノミラー、	
1 0 0 ... 第 1 のレーザ光源、	
1 1 0 ... 標本、	
1 0 1 ... ダイクロイックミラー、	
1 0 2 ... 走査光学ユニット、	30
1 0 2 a , 1 0 2 b ... 走査ミラー、	
1 0 3 ... リレーレンズ、	
1 0 4 ... ミラー、	
1 0 5 ... ダイクロイックミラー、	
1 0 6 ... 結像レンズ、	
1 0 7 ... 対物レンズ、	
1 0 8 ... ダイクロイックミラー、	
1 0 9 ... ステージ、	
1 1 0 ... 標本、	
1 1 3 ... レンズ、	40
1 1 4 ... ピンホール、	
1 1 2 ... 測光フィルタ、	
1 1 5 ... 光電変換素子。	

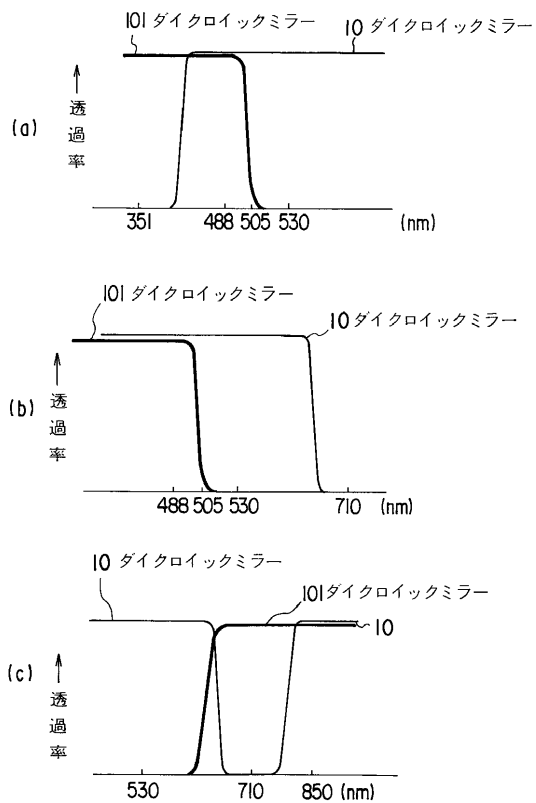
【 図 1 】



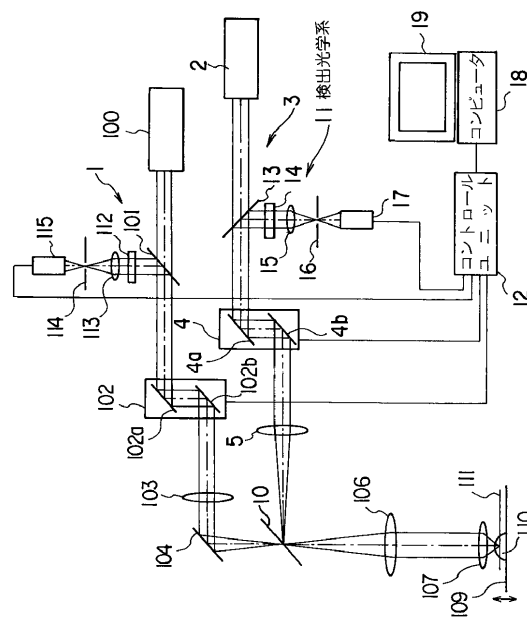
【 図 2 】



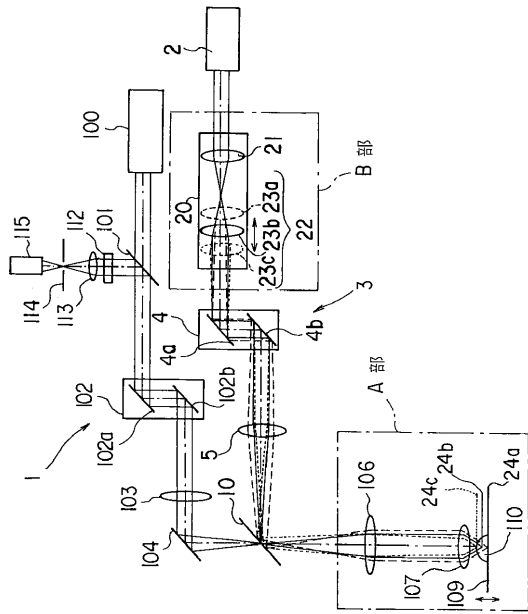
【 図 3 】



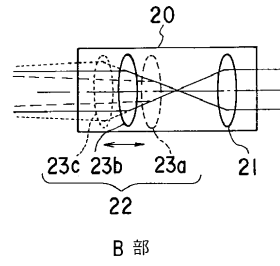
【 図 4 】



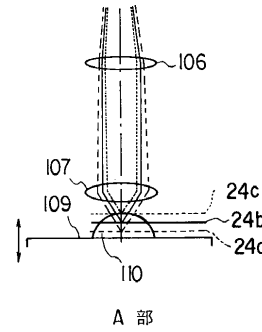
【 図 5 】



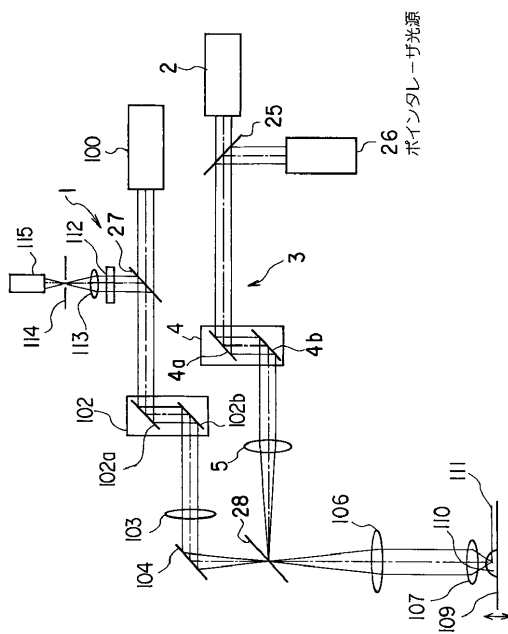
【 図 6 】



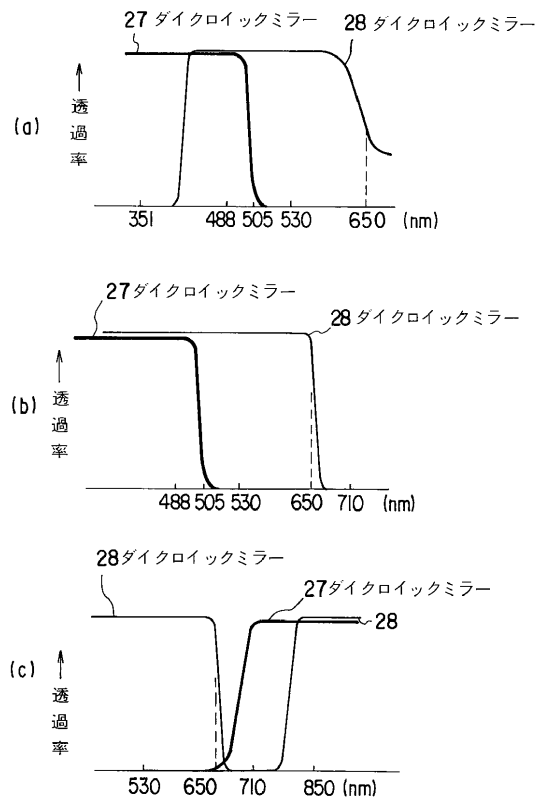
【 図 7 】



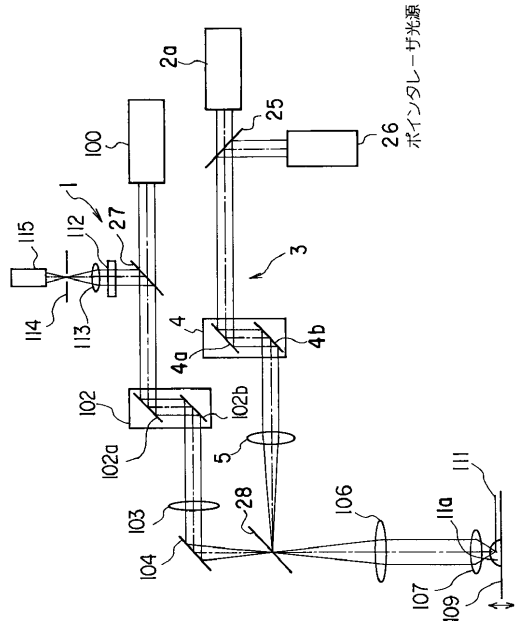
【 図 8 】



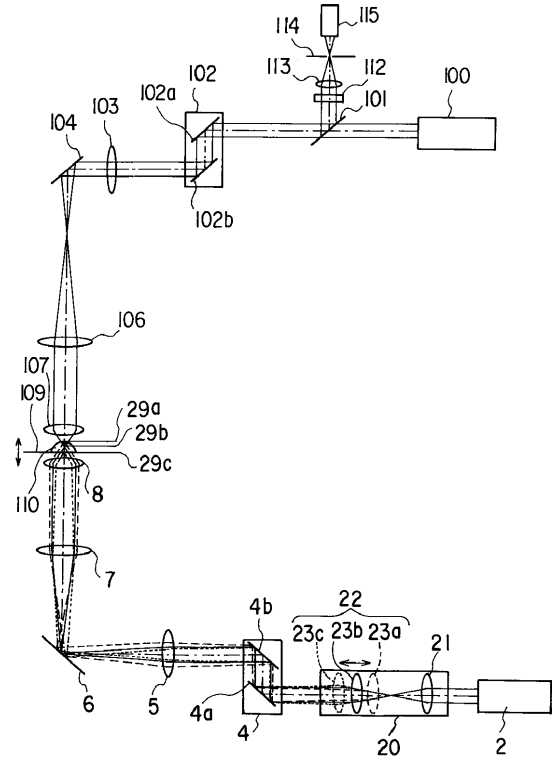
【 図 9 】



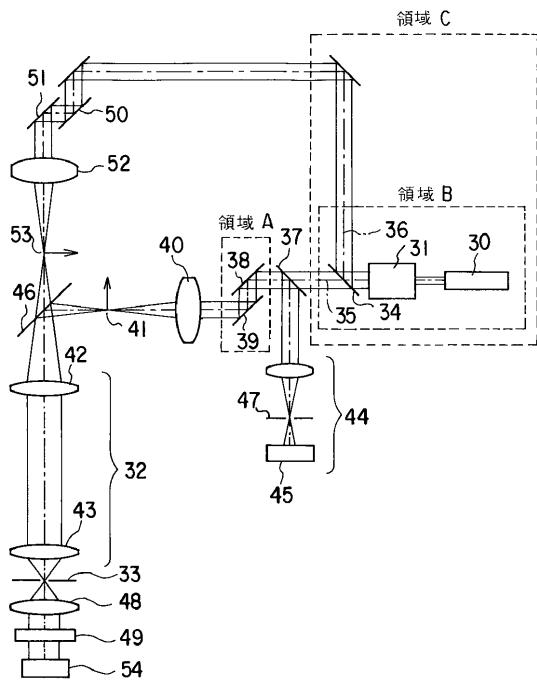
【 図 1 0 】



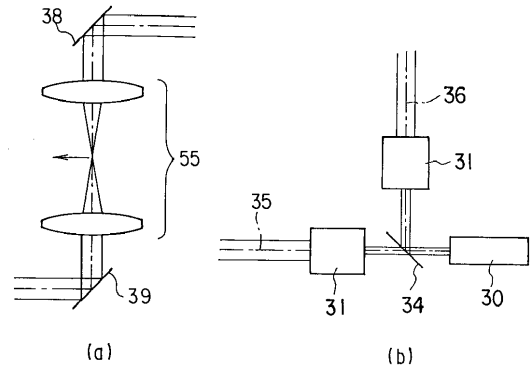
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

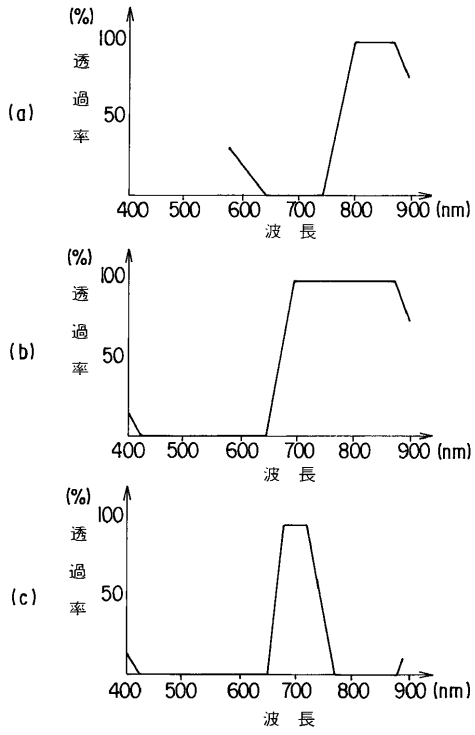


【 図 1 3 】

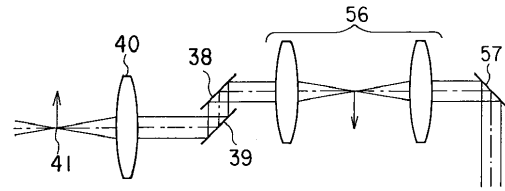




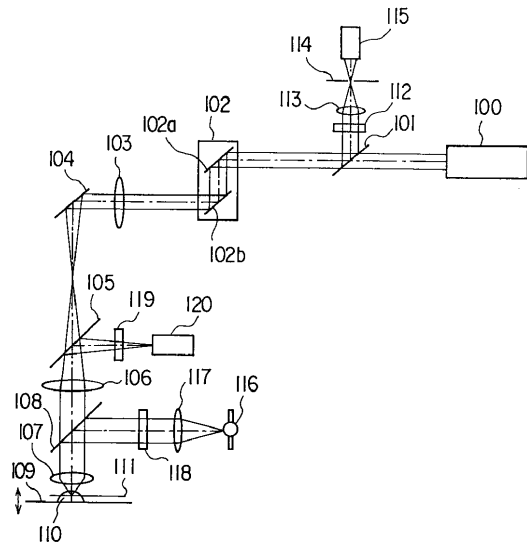
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 岸 陽介

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学工業株式会社内

審査官 谷山 稔男

- (56)参考文献 特開平07-333515(JP,A)  
特開平06-160724(JP,A)  
特開平08-141769(JP,A)  
特開平07-333511(JP,A)  
特開平05-134186(JP,A)  
特開平07-199079(JP,A)  
特表平05-503149(JP,A)  
特開平05-027178(JP,A)  
特開平06-167654(JP,A)  
特開平07-013083(JP,A)  
特開昭57-175093(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/00

G02B 21/18