

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5592108号
(P5592108)

(45) 発行日 平成26年9月17日 (2014.9.17)

(24) 登録日 平成26年8月8日 (2014.8.8)

(51) Int. Cl.

F I

G O 2 B 21/00 (2006.01)

G O 2 B 21/00

請求項の数 12 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2009-513725 (P2009-513725)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月30日 (2007.5.30)
 (65) 公表番号 特表2009-540346 (P2009-540346A)
 (43) 公表日 平成21年11月19日 (2009.11.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2007/000898
 (87) 国際公開番号 W02007/141409
 (87) 国際公開日 平成19年12月13日 (2007.12.13)
 審査請求日 平成22年5月31日 (2010.5.31)
 審判番号 不服2013-14496 (P2013-14496/J1)
 審判請求日 平成25年7月29日 (2013.7.29)
 (31) 優先権主張番号 06/05087
 (32) 優先日 平成18年6月8日 (2006.6.8)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 505045610
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシュ スィヤンティフィック (セーエヌ
 エルエス)
 CENTRE NATIONAL DE
 LA RECHERCHE SCIENT
 IFIQUE (CNRS)
 フランス国 F-75794 パリ セデ
 ックス 16 リュ ミッシェル-アンジ
 ュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 干渉共焦点顕微鏡および光源撮像方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの光源(18)を含む、サンプル(3)を撮像するための共焦点顕微鏡(16)であって、像焦点を有する少なくとも1つの対物レンズ(2)と結像レンズ(5)とを備え、該光源(18)から干渉像を生成するように構成される干渉手段(11)とを備えた共焦点顕微鏡(16)において、

該干渉手段(11)は、

該光源の第1の像を生成するように構成される第1の像生成手段と、

像焦点に関して該第1の像と対称である該光源の第2の像を生成するように構成される第2の像生成手段であって、前記光源(18)の像を反転させて前記像焦点に関して前記第1の像と対称である前記光源の前記第2の像を生成するように構成される反射光学系を含む前記第2の像生成手段と、

該第1の像および該第2の像を干渉させるように構成される像干渉手段と

を備え、

前記像干渉手段は、前記光源(18)が前記対物レンズ(2)の焦点に関して側方に位置する場合に前記第1の像を、前記像焦点に関して前記第1の像と対称である前記第2の像と相殺的に干渉させることを特徴とする、共焦点顕微鏡(16)。

【請求項 2】

前記少なくとも1つの対物レンズは、光学軸を有し、前記光源は、該光学軸に沿った軸方向構成要素と、該光学軸に直交する側方向構成要素とを有し、前記第1の像生成手段は

10

20

、該側方向構成要素の第 1 の側方像を生成するように構成され、前記第 2 の像生成手段は、該側方向構成要素の第 2 の側方像を生成するように構成され、該第 1 の側方像および該第 2 の側方像は、前記像焦点に関して対称であり、前記像干渉手段は、該第 1 の側方像および該第 2 の側方像を干渉させるように構成される、請求項 1 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 3】

前記光源は、前記少なくとも 1 つの対物レンズ (2) と前記結像レンズ (5) との間に少なくとも 1 つの光路を有する光ビーム (1 0) を生成することが可能であり、前記干渉手段は、該光路上の前記対物レンズ (2) と前記結像レンズ (5) との間に配置される、請求項 1 または 2 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 4】

前記干渉手段は、少なくとも 2 つの干渉アームを含み、前記反射光学系は、該干渉アームの一方の中に配置される、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 5】

前記干渉手段は、ビーム・スプリッタ (1 5) および基準ミラー (1 2) と共に形成される第 1 の基準アームと、該ビーム・スプリッタ (1 5) および前記反射光学系と共に形成される第 2 の物体アームとを含む、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 6】

前記反射光学系は、干渉計レンズ (1 3) と物体ミラー (1 4) とを含む、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 7】

前記反射光学系はコーナー・キューブ (2 2) を含む、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 8】

前記第 1 の像生成手段は、基準ミラー (1 2) と結像レンズ (5) とを含み、前記第 2 の像生成手段は、前記反射光学系と前記結像レンズ (5) とを含み、前記像干渉手段は、ビーム・スプリッタ (1 5) を含む、請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 9】

ポンプ・ビームを含み、前記光源は、前記対物レンズの出力で空間的に収束する励起区域中の該ポンプ・ビームにより励起される少なくとも 1 つの蛍光粒子を含み、該励起される蛍光粒子は、蛍光を生成することが可能であり、前記共焦点顕微鏡は、該ポンプ・ビームと該蛍光とを分離するように構成される分離手段 (4) を含む、請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 1 0】

単一の対物レンズ (2) を含む、請求項 1 乃至 9 いずれか 1 項に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 1 1】

像焦点を有する少なくとも 1 つの対物レンズ (2) と 1 つの結像レンズ (5) とから光源 (1 8) を撮像するための方法であって、該方法は、該光源から干渉像を生成することよりなる干渉生成工程を備え、

該干渉生成工程は、

該光源の第 1 の像を生成する工程と、

前記光源の像を反転させて、該像焦点に関して該第 1 の像と対称である該光源の第 2 の像を生成する工程と、

該第 1 の像と該第 2 の像とを干渉させる工程と、
を備え、

前記干渉させる工程は、前記光源 (1 8) が前記対物レンズ (2) の焦点に関して側方に位置する場合に前記第 1 の像を、前記像焦点に関して前記第 1 の像と対称である前記第 2 の像と相殺的に干渉させることを含むことを特徴とする、方法。

【請求項 1 2】

前記少なくとも1つの対物レンズは、光学軸を有し、前記光源は、該光学軸に沿った軸方向構成要素と、該光学軸に直交する側方向構成要素とを有し、前記干渉生成工程は、

該側方向構成要素の第1の側方像を生成する工程と、

該側方向構成要素の第2の側方像を生成する工程と、

を含み、該第1の側方像および該第2の側方像は、前記像焦点に関して対称であり、前記干渉生成工程はさらに、

該第1の側方像と該第2の側方像とを干渉させる工程とを含む、請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、共焦点顕微鏡の技術分野に属する。

【背景技術】

【0002】

共焦点顕微鏡は、解析すべきサンプルにより発せられるルミネッセンスを収集することで知られている。このような共焦点顕微鏡においては、解析すべきサンプルは、対物レンズの焦点面中に配置される。サンプルより発せられるルミネッセンスは、対物レンズおよび結像レンズを通り、共焦点孔へと進んでセンサのレベルで連結される。共焦点顕微鏡に関して、共焦点孔は、結像レンズの像焦点に位置決めされる。このような既知の共焦点顕微鏡においては、ルミネッセンスは、サンプルを移動させることによって、または観察区域を移動させることによってサンプル全体について検出される。例えば、サンプルのルミネッセンスは、蛍光の場合では、レーザ・ビームによる励起により発せられる。この場合、サンプルにより発せられる蛍光とレーザにより発せられる光とを分離するために、ダイクロイック・ミラーが共焦点顕微鏡中に配置される。

20

【0003】

既知の共焦点顕微鏡における主要な問題の1つは、サンプルを解析する際に得ることの可能な空間分解能の制限である。

それ自体が既知である点においては、このような共焦点顕微鏡における空間分解能は、レーザ励起によりもたらされる第1の部分と、共焦点孔のレベルでの収集によりもたらされる第2の部分とに分類することが可能である。

30

【0004】

実際には、レーザによる励起は、完全な点形状ではなくある一定の分解能を有する焦点ゾーンを画定することを第1に理解すべきである。したがって、レーザ強度が最大となる区域が、励起体積とも呼ばれる体積を画定する。

【0005】

さらに、顕微鏡を通る共焦点孔の像が、励起された蛍光分子の観察領域を制限する。この領域は、採集領域と呼ばれる。

さらに、共焦点顕微鏡の空間分解能は、観察領域の関数であり、励起体積と採集領域との積である。

【0006】

40

より詳細には軸方向における励起体積を改善するために、4 顕微鏡とも呼ばれ、例えば欧州特許第0491289号明細書において開示されている共焦点顕微鏡が知られている。このような4 顕微鏡においては、2つの対物レンズの焦点面が撮像すべき物体のレベルになるように、2つの対物レンズが構成される。このようなデバイスにおいては、対物レンズの焦点面中に正確には位置せず、物体の側に距離dだけ移動される実光源点が、対物レンズの焦点面に関して実光源点と対称である仮光源点に干渉する。このような2つの整合的な光源点は、共焦点孔のレベルで相殺的に干渉する。したがって、2つの対物レンズの焦点面のレベルに位置する光源点のみが、相殺的干渉を生じさせず、それにより顕微鏡の軸方向分解能の向上が可能となる。

【0007】

50

したがって、このような4 顕微鏡が、光源を撮像するための共焦点顕微鏡を定義し、該顕微鏡は、少なくとも1つの対物レンズと、像焦点を有する1つの結像レンズとを備え、該顕微鏡は、該光源から干渉像を生成するように構成される干渉手段を備える。

【0008】

4 顕微鏡の場合、両干渉計のアームが、両対物レンズ自体により発せられる両ビームによって形成される。

しかし、このような2共焦点顕微鏡は、いくつかの欠点を有する。

【0009】

第1に、この顕微鏡は、側方分解能を、すなわち光学軸に関して直交方向に、より詳細には単純な共焦点顕微鏡に対して向上させることができない。実際に4 顕微鏡内では、対物レンズのそれぞれと結像レンズとの間に形成される2つのアームが、干渉計システムの2つのアームを形成する。光源が両対物レンズの焦点に関して側方に、すなわち両対物レンズの共焦点面中において移動される場合には、干渉計の両アームは、同一の距離にこの光源を認め、この光源より発せられる2つの同一の像を生成する。したがって、このような像は構造的見地から干渉する。このとき、4 顕微鏡の側方分解能は満足のゆくものではない。

【0010】

さらに、焦点面が一致するように配置される2つの対物レンズを使用することにより、このデバイスは、満足のゆくような整列条件下で整列し状態を保つことが困難となる。このようなデバイスは、特に温度に関して非常にセンシティブである。

【0011】

さらに、両対物レンズにより発せられるビームによって形成された干渉計のアームを正確に位置決めすることにより、観察領域を移動させることによってサンプル全体を探索することが不可能となる。さらに、サンプルのドット解析は、観察領域の移動よりもさらに低速で行われるサンプル自体の移動によってしか実行することができない。

【0012】

さらに、対物レンズはかなり短い作動距離を有するため、4 顕微鏡の2つの対物レンズの間には薄いサンプルのみを配置することが可能である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

したがって、本発明の1つの目的は、共焦点顕微鏡における側方分解能を向上させることである。

本発明の別の目的は、共焦点顕微鏡における検出体積を低減することにより側方分解能を向上させることである。

【0014】

本発明の別の目的は、良好な側方および軸方向分解能を有し、安定的である共焦点顕微鏡を提供することである。

本発明の別の目的は、良好な側方および軸方向分解能を有し、使用が容易な共焦点顕微鏡を提供することである。

【0015】

本発明の別の目的は、良好な側方および軸方向分解能を有し、比較的厚い物体について蛍光を測定することが可能な共焦点顕微鏡を提供することである。

本発明の別の目的は、良好な側方および軸方向分解能を有し、良好な感度で生物発光サンプルを観察することを可能に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】

【0016】

本発明により、これらの目標の中の少なくとも1つが達成されるが、本発明の目的は、少なくとも1つの光源を含むサンプルを撮像するための共焦点顕微鏡であって、少なくとも1つの対物レンズおよび、像焦点を有する結像レンズと、該光源から干渉像を生成する

10

20

30

40

50

ように構成される干渉手段とを備え、

該干渉手段は、該光源の第 1 の像を生成するように構成される第 1 の像生成手段と、像焦点に関して第 1 の像と対称である該光源の第 2 の像を生成するように構成される第 2 の像生成手段と、該第 1 の像および該第 2 の像を干渉させるように構成される像干渉手段とを備える、共焦点顕微鏡である。

【 0 0 1 7 】

したがって、本発明による共焦点顕微鏡中に配置される干渉手段は、第 1 の像を生成するための第 1 の生成手段と、第 2 の像を生成するための第 2 の生成手段とを含み、光源のこの 2 つの像は、結像レンズの像焦点に関して互に対称である。したがって、実光源が延在する、より詳細にはレーザによる非点形状の励起によって延在する場合には、実光源は、対物レンズの物体焦点に対して対物レンズの光学軸に直交する方向に移動される側方部分を含む。本発明によれば、このような側方部分は、対物レンズの焦点に関して実光源と対称である仮光源の側方部分と相殺的に干渉する。したがって、この干渉システムにより本発明による顕微鏡の側方分解能を向上させることが可能となる。

10

【 0 0 1 8 】

4 顕微鏡においては、干渉は、対物レンズの軸に沿って 1 方向にのみ生じること留意すべきである。したがって、延在される光源の側方部分、すなわち対物レンズの光学軸から外方に延在される光源の側方部分は、干渉を生成しないが、これは、この側方部分が両対物レンズにより同一に認められるためである。一般的には、延在される光源について、より詳細にはレーザによる非点形状の励起によって延在される光源について、4 顕微鏡では、結像レンズの像焦点に関して対称である光源の 2 つの像を生成することができない。

20

【 0 0 1 9 】

より詳細には、上述の共焦点顕微鏡においては、前記少なくとも 1 つの対物レンズは、光学軸を有し、前記光源は、該光学軸に沿った軸方向構成要素と、該光学軸に直交する側方向構成要素とを有し、前記第 1 の像生成手段は、該側方向構成要素の第 1 の側方像を生成するように構成され、前記第 2 の像生成手段は、該側方向構成要素の第 2 の側方像を生成するように構成され、該第 1 の側方像および該第 2 の側方像は、前記像焦点に関して対称であり、前記像干渉手段は、該第 1 の側方像および該第 2 の側方像を干渉させるように構成される。

30

【 0 0 2 0 】

本発明による顕微鏡の使用を容易にするために、より詳細には上述の共焦点顕微鏡における側方分解能を向上させる機能を任意のものにするために、前記光源は、前記少なくとも 1 つの対物レンズと前記結像レンズとの間に少なくとも 1 つの光路を有する光ビームを生成することが可能であり、前記干渉手段は、該光路上の前記対物レンズと前記結像レンズとの間に配置することが可能である。

【 0 0 2 1 】

したがって、例えば、先に定義されるようなこの干渉手段は、その側方分解能を向上させるために、4 顕微鏡のアームの一方の中に配置することが可能である。

上述の共焦点顕微鏡において結像レンズの焦点に関して光源と対称である像を生成するために、前記干渉手段は、ビーム・スプリッタおよび基準ミラーにより形成される第 1 の基準アームと、該ビーム・スプリッタおよび反射光学系により形成される第 2 の物体アームとを含むことが可能である。

40

【 0 0 2 2 】

本発明の第 1 の実施形態によれば、前記反射光学系は、干渉計レンズおよび物体ミラーを含むが可能である。

本発明の第 2 の実施形態によれば、前記反射光学系はコーナー・キューブを含む。

【 0 0 2 3 】

上述の顕微鏡において、前記第 1 の像生成手段は、前記基準ミラーを備えることが可能であり、前記第 2 の像生成手段は、前記反射光学系を備えることが可能であり、前記像干

50

渉手段は、前記ビーム・スプリッタを備えることが可能である。

【0024】

このような干渉手段により、基準アームは、受光した光ビームを変更せず、物体アームは、干渉計レンズの焦点に関して入射ビームと対称である出力ビームを生成する。したがって、結像レンズの焦点のレベルで、基準アームは、光源の第1の無変更像を生成し、物体アームは、結像レンズの焦点に関して第1の像と対称である第2の像を生成する。

【0025】

干渉計レンズおよび物体ミラーの連携により、またはコーナー・キューブの使用により、焦点に関して対照的に入射ビームを反射することが可能となる。

上述の共焦点顕微鏡は、ポンプ・ビームを含んでよく、前記光源は、前記対物レンズの出力で空間的に収束する励起区域中の該ポンプ・ビームにより励起される少なくとも1つの蛍光粒子からなり、該励起される蛍光粒子は、蛍光を生成することが可能であり、この共焦点顕微鏡は、該ポンプ・ビームと該蛍光とを分離するように構成される分離手段を備える。

【0026】

上述の共焦点顕微鏡の1実施形態においては、この共焦点顕微鏡は、単一の対物レンズを備えることが可能である。この実施形態により、顕微鏡の出力のセンサのレベルで得られる像の良好な側方および軸方向分解能を実現すると同時に、2つの対物レンズを含む4顕微鏡の使用に関わる欠点を回避することが可能となる。

【0027】

また、本発明の目的は、少なくとも1つの対物レンズと、像焦点を有する1つの結像レンズとから、少なくとも1つの光源を含むサンプルを撮像するための方法であって、該光源から干渉像を生成することよりなる干渉生成工程からなり、該干渉生成工程は、

該光源の第1の像を生成する下位工程と、

該光源の第2の像を生成する下位工程と、

からなり、該第1の像および該第2の像は、該像焦点に関して対称であり、該干渉生成工程はさらに、

該第1の像と該第2の像とを干渉させる下位工程と、

からなる方法を提供することである。

【0028】

本発明の1つの特定の実施形態によれば、前記少なくとも1つの対物レンズは、光学軸を有し、前記光源は、該光学軸に沿った軸方向構成要素と、該光学軸に直交する側方向構成要素とを有し、前記干渉生成工程は、

該側方構成要素の第1の側方像を生成する下位工程と、

該側方向構成要素の第2の側方像を生成する下位工程と、

からなり、該第1の側方像および該第2の側方像は、前記像焦点に関して対称であり、前記干渉生成工程はさらに、

該第1の側方像と該第2の側方像とを干渉させる下位工程と、

を備える。

【0029】

以下、本発明の1実施形態を、添付の図面を参照しながら説明する。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】本発明による共焦点顕微鏡の図。

【図2】本発明による共焦点顕微鏡における、同一の光源からの、結像レンズの像焦点に関して対称である2つの像の生成を示す図。

【図3】本発明による共焦点顕微鏡における、同一の光源からの、結像レンズの像焦点に関して対称である2つの像の生成を示す図。

【図4】本発明による共焦点顕微鏡における、同一の光源からの、結像レンズの像焦点に

10

20

30

40

50

関して対称である２つの像の生成を示す図。

【図５Ａ】干渉計を有さない共焦点顕微鏡の空間分解能を示す図。

【図５Ｂ】４ 顕微鏡の空間分解能を示す図。

【図５Ｃ】本発明による共焦点顕微鏡の空間分解能を示す図。

【図６】本発明の別の実施形態を示す図。

【発明を実施するための形態】

【００３１】

図面において、同一の参照符号は、構造的に類似する要素を指す。

図１は、本発明による共焦点顕微鏡１６を示す。

本発明による共焦点顕微鏡１６は、図１において低密度のドットにより示されるレーザ・ビーム８を発することが可能な励起レーザ１を備える。このレーザ・ビーム８は、この光ビームを反射することおよびビームの波長に応じてビームを分離することが可能なダイクロイック・ミラー４に配向される。ダイクロイック・ミラー４は、対物レンズ２の方にレーザ・ビーム８を反射する。対物レンズ２は、蛍光粒子１８を含むサンプル３の方にこの反射されたレーザ・ビームを収束する。次いで、レーザ励起の下で、蛍光粒子１８は、対物レンズの方に再び発せられる光ビームを生成する。光ビームは、対物レンズ２によってダイクロイック・ミラー４の方に伝達される。したがって、ダイクロイック・ミラー４とサンプル３との間の区域は、他方では第１の波長でレーザ１により発せられる光ビーム８と、第２の波長でサンプルにより生成される光ビームとによって構成される光ビーム区域である。結果的に得られるビーム９が、高密度のドットにより示される。ダイクロイック・ミラーは、サンプル３により発せられる光ビームを伝達するように構成され、したがってサンプル３により発せられる波長およびレーザ波長のみを含むビーム１０を伝達する。このビーム１０は、サンプル蛍光３の特性を決定するために顕微鏡で解析しなければならない。

【００３２】

本発明によれば、サンプル３の光源により生成されるこの光ビーム１０は、干渉計１１の方に伝達される。この干渉計１１は、ビーム１０を２つのビーム１０Ａおよび１０Ｂに分離することが可能なビーム・スプリッタ１５を備える。ビーム１０Ａは、ビーム・スプリッタ１５および基準ミラー１２により形成される干渉計１１の基準アームの方に伝達される。基準ミラー１２は、ビーム１０Ａを反射し、これをビーム・スプリッタ１５の方に送り返す。ビーム１０Ｂは、ビーム・スプリッタ１５、レンズ１３およびミラー１４により形成される干渉計１１の物体アームの方に伝達される。レンズ１３は、ミラー１４上にビーム１０Ｂを収束し、ミラー１４は、レンズ１３の方にビーム１０Ｂを送り返す。図１においては、ビーム１０Ｂの要素の反転を図示するために、ビーム１０Ｂ上に矢印が示される。実際のところ、レンズは、ビーム要素Ｆ１をミラーの方にビーム要素Ｆ２の形態で配向する。次いで、このビーム要素Ｆ２は、よく知られている反射の法則に従ってビーム要素Ｆ３において反射される。このビーム要素Ｆ３は、レンズ１３の効果の下にビーム要素Ｆ４に変換される。したがって、ビーム１０Ｂにより示される強度を有する像は、それがレンズ１３およびミラー１４からなる光学系を通過した後に反転されることを理解すべきである。この効果が、以下でより詳細に説明される。

【００３３】

干渉計１１の基準アームおよび物体アームにより発せられる光ビームは、ビーム・スプリッタ１５の出力にてビーム１７の形態で干渉する。この干渉ビーム１７は、フォトダイオード７の前に位置する共焦点孔６の方にビーム１７を向けるように構成される結像レンズ５の方に向けられる。フォトダイオード７は、ビーム１７の強度測定が可能である。

【００３４】

図２から図４は、本発明による干渉計１１の効果の下での像の反転を示す。

図２に図示されるように、蛍光粒子１８が対物レンズ２の焦点１９に正確に位置する場合には、干渉計１１の２つのアームにより生成される像は、同一であり、同一のビーム１０Ａおよび１０Ｂに対応する。この場合、干渉計１１の物体は、基準アームにより生成さ

10

20

30

40

50

れる像 20 に重畳されることが可能な光源 18 の像 21 を生成する。

【0035】

図 3 に図示されるように、蛍光粒子 18 が、対物レンズ 2 の焦点 19 に関して側方に、すなわち対物レンズ 2 の焦点面中で移動される場合には、干渉計 11 は、2 つの異なるビーム 10 A および 10 B を生成する。基準ミラー 12 およびビーム・スプリッタ 15 からなる基準アームは、レンズ 13、ミラー 14 およびビーム・スプリッタ 15 からなる物体アームにより生成されるビーム 10 B とは異なる配向を有するビーム 10 A を生成する。光学的法則に従い、干渉計 11 の物体アームは、結像レンズ 5 の焦点に関して像 20 と対称である像 21 を生成する。

【0036】

したがって、実光源 18 の 2 つの像は、構造的見地より、フォトダイオード 7 により検出される前の共焦点孔 6 のレベルでは干渉しない。したがって、対物レンズの焦点 19 に関して側方に移動される光源 18 の効果は、対物レンズ 2 の焦点 19 に位置する光源に対して実質的に低減される。これにより、本発明による共焦点顕微鏡 16 の良好な側方分解能が実現される。

【0037】

同様に、図 4 に図示されるように、蛍光粒子 18 が対物レンズ 2 の焦点 19 から軸方向に移動される、すなわち対物レンズ 2 の光学軸に沿って移動される場合には、干渉計 11 は 2 つの異なるビーム 10 A および 10 B を生成する。干渉計 11 の物体アームは、結像レンズ 5 の焦点に関して像 20 と対称である像 21 を生成する。

【0038】

実光源 18 の 2 つの像は、構造的見地より、フォトダイオード 7 により検出される前の共焦点孔 6 のレベルでは干渉しない。したがって、焦点 19 から軸方向に移動される光源 18 の効果は、対物レンズ 2 の焦点 19 に位置する光源に対して実質的に低減される。また、これにより、本発明による共焦点顕微鏡 16 の良好な軸方向分解能が実現される。

【0039】

図 5 A から図 5 C は、種々のタイプの共焦点顕微鏡より得られる観察領域の断面図を示し、特に図 5 C に図示される本発明による共焦点顕微鏡より得られる観察領域の断面図を示す。

【0040】

図 5 A は、干渉計を含まない既知のタイプの顕微鏡についての、側方向 x、y および軸方向 z に求められる分解能を示し、488 ナノメートルのレーザ励起波長に対して蛍光波長は 525 ナノメートルであり、対物レンズ 2 のデジタル開口数は 1.3 であり、倍率は 40 であり、共焦点孔の径は 20 マイクロメートルである。

【0041】

図 5 B は、4 顕微鏡についての、側方向 x、y および軸方向 z に求められる分解能を示し、488 ナノメートルのレーザ励起波長に対して蛍光波長は 525 ナノメートルであり、対物レンズ 2 のデジタル開口数は 1.3 であり、倍率は 40 であり、共焦点孔の径は 20 マイクロメートルである。軸方向分解能が図 5 A のものよりも優れていることに留意すべきである。

【0042】

図 5 C は、本発明による共焦点顕微鏡についての、側方向 x、y および軸方向 z に求められる分解能を示し、488 ナノメートルのレーザ励起波長に対して蛍光波長は 525 ナノメートルであり、対物レンズ 2 のデジタル開口数は 1.3 であり、倍率は 40 であり、共焦点孔の径は 20 マイクロメートルである。軸方向分解能が図 5 A のものよりも優れており、側方分解能が図 5 B に図示される 4 顕微鏡のものよりも優れていることに留意すべきである。フォトダイオード 7 により得られる像の処理によってもやはり分解能を向上させることが可能であるが、より詳細にはこれは、図 5 C において分かるように強度区域が得られ、はっきりと目視可能であるためであることに留意すべきである。

【0043】

したがって、普通はM D E Fと呼ばれ、観察領域に対応する分子の効率的な検出の機能が、本発明による共焦点顕微鏡により改善される。

さらに、このような顕微鏡の側方分解能を向上させるために、4 顕微鏡のアームの一方の中を含む任意のタイプの共焦点顕微鏡に干渉計 1 1 を配置することが可能である。

【 0 0 4 4 】

さらに、本発明により、良好な軸方向分解能を得ると同時に、上記の欠点を有する、より詳細には散乱および厚い物体の使用が不可能である 4 顕微鏡の使用を回避することが可能となる。この場合、本発明による顕微鏡では、図 1 において分かるように、単一の対物レンズ 2 が干渉計 1 1 に関連付けられる。

【 0 0 4 5 】

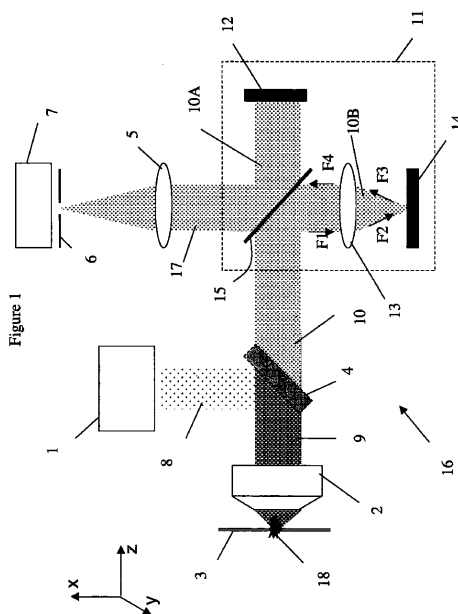
本発明の代替的な解決案は、以下において理解することが可能である。

結像レンズ 5 の像焦点に関して対称である光源の 2 つの像が干渉計 1 1 によって生成されるために、レンズ 1 3 およびミラー 1 4 を含む物体アームが説明された。図 6 に図示される本発明の代替の解決案によれば、これらの要素は、コーナー・キューブ 2 2 に代えられる。また、それ自体が既知である点においては、このコーナー・キューブ 2 2 は、像を有する仮光源を生成し、光源の 2 つの像が、結像レンズ 5 の像焦点に関して対称となる。これは、例えばレンズ 1 3 およびミラー 1 4 を含むシステムのように、コーナー・キューブ上での入射像の反転を示す矢印 F 1 および F 4 により示される。このように、コーナー・キューブの効果は、レンズ 1 3 およびミラー 1 4 の連携の効果と同等であり、より詳細には、図 3 および図 4 に図示される機構を、このようなコーナー・キューブ 2 2 を備える干渉計 1 1 に適用することが可能である。

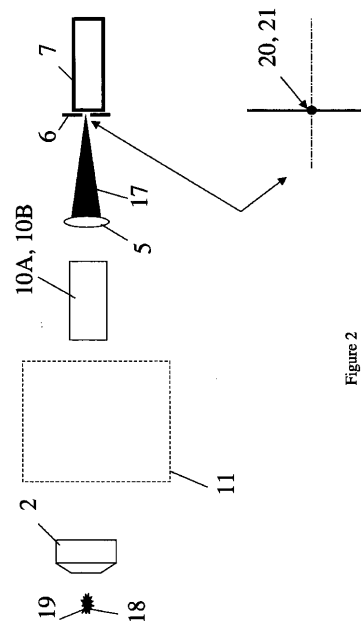
【 0 0 4 6 】

さらに、本発明の別の代替の解決案によれば、共焦点孔 6 を省くことが可能である。実際のところ、共焦点効果は、本発明の範囲内で生成される干渉によって保証される。この場合、図 1 のフォトダイオード 7 が、干渉ビームを直接受光する。

【 図 1 】



【 図 2 】



【図 3】

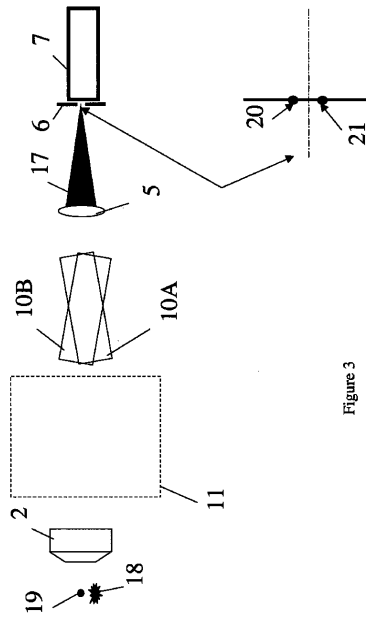


Figure 3

【図 4】

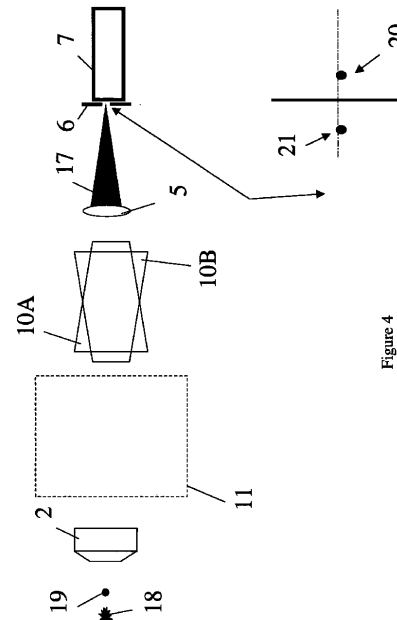


Figure 4

【図 5 A】

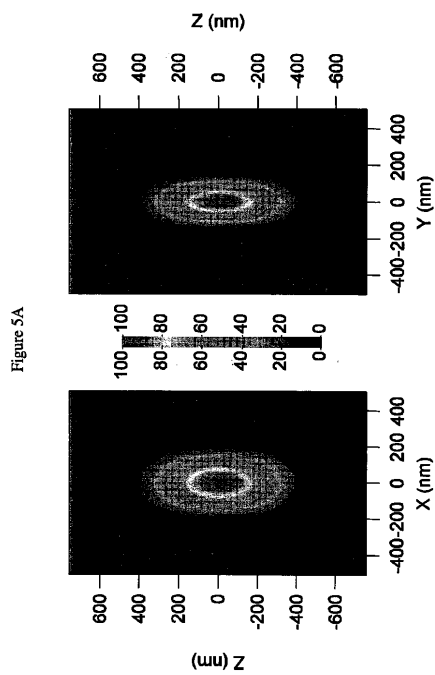


Figure 5A

【図 5 B】

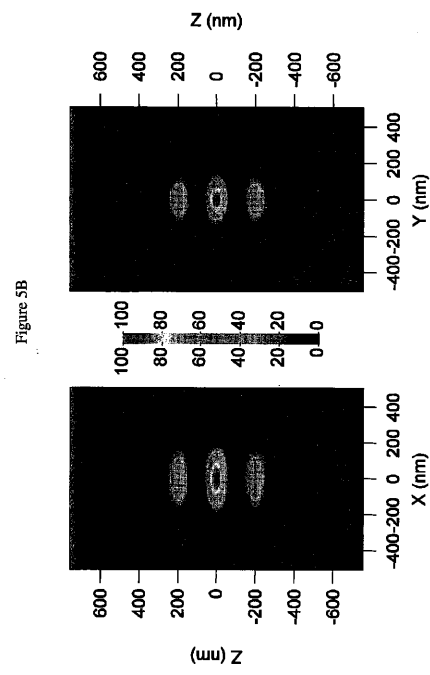
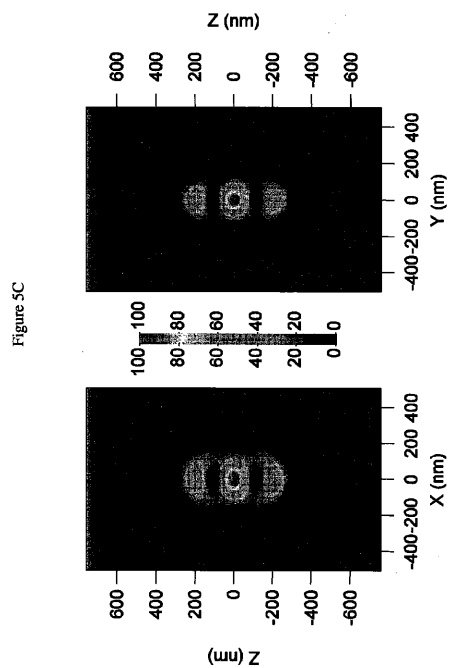
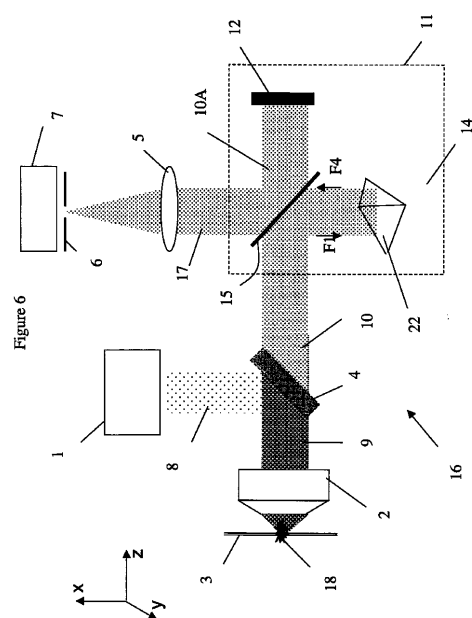


Figure 5B

【 図 5 C 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(73)特許権者 511025226

ユニヴェルシテ デクス - マルセイユ

UNIVERSITE D' AIX - MARSEILLE

フランス、エフ - 13284 マルセイユ セデックス 07、ブールバール シャルル リヴォン、ジャルダン ドュ ファロ、58

Jardin du Pharo, 58, Bld Charles Livon, F - 13284 Marseille cedex 07, France

(74)代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(72)発明者 リグノー、エルベ

フランス国 F - 13600 ラ シオタ ブールバール デゾーベピーヌ 10

(72)発明者 サンドー、ニコラ

フランス国 F - 13380 ブランド クーク アヴニユ フレデリック シュヴィヨン 82

(72)発明者 ジョバンニーニ、ユーグ

フランス国 F - 13190 アローシュ プラス デ ミシェル 8

合議体

審判長 藤原 敬士

審判官 西村 仁志

審判官 清水 康司

(56)参考文献 欧州特許出願公開1524491第(EP, A1)

特開2004-102225(JP, A)

特開平4-269644(JP, A)

特開2001-100102(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B21/00