

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4932162号
(P4932162)

(45) 発行日 平成24年5月16日 (2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日 (2012.2.24)

(51) Int.Cl.

F I

G O 2 B 21/00 (2006.01)

G O 2 B 21/00

G O 2 B 7/36 (2006.01)

G O 2 B 7/11

D

G O 2 B 7/28 (2006.01)

G O 2 B 7/11

J

請求項の数 11 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2005-12824 (P2005-12824)
 (22) 出願日 平成17年1月20日 (2005.1.20)
 (65) 公開番号 特開2006-201465 (P2006-201465A)
 (43) 公開日 平成18年8月3日 (2006.8.3)
 審査請求日 平成20年1月18日 (2008.1.18)

(73) 特許権者 000000376
 オリンパス株式会社
 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
 (74) 代理人 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74) 代理人 100088683
 弁理士 中村 誠
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100075672
 弁理士 峰 隆司
 (74) 代理人 100109830
 弁理士 福原 淑弘
 (74) 代理人 100084618
 弁理士 村松 貞男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 焦点検出装置とそれを用いた蛍光観察装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標本を観察する対物レンズと、
 前記標本の屈折率とは異なる屈折率をもち、前記標本を載置する透明部材と、
 前記対物レンズの外周部分を通して、前記標本と前記透明部材との境界面で全反射する
 ように照明光を照射する照明光源と、
 前記対物レンズと撮像素子との間に配置された焦点検出用のダイクロイックミラーと、
 前記ダイクロイックミラーのうち前記境界面からの反射光を反射させる反射面側に配置
 された半透過ミラーと、
 前記半透過ミラーのうち前記境界面からの反射光を反射させる反射面側に設けられ、焦
 点検出用の検出光を照射する焦点検出光源と、
 前記検出光をその光束の断面方向で半分に遮光する遮光板と、
 前記半透過ミラーのうち前記境界面からの反射光を透過させる透過面側に設けられる焦
 点検出用の検出器と、
 前記ダイクロイックミラーと前記検出器の間に設けられ、前記焦点検出光の波長のみを
 透過させるフィルタと、を備え、
 前記検出器が受光した前記反射光の検出結果に基づいて、前記境界面に対するオートフ
 ォーカスを行うことを特徴とする焦点検出装置。

【請求項 2】

標本を観察する対物レンズと、

10

20

前記標本の屈折率とは異なる屈折率をもち、前記標本を載置する透明部材と、
前記対物レンズの外周部分を通して、前記標本と前記透明部材との境界面で全反射する
ように照明光を照射する照明光源と、

前記対物レンズと撮像素子との間に配置された焦点検出用のダイクロイックミラーと、
前記ダイクロイックミラーのうち前記境界面からの反射光を反射させる反射面側に配置
された半透過ミラーと、

前記半透過ミラーのうち前記境界面からの反射光を透過させる透過面側に設けられ、焦
点検出用の検出光を照射する焦点検出光源と、

前記検出光をその光束の断面方向で半分に遮光する遮光板と、

前記半透過ミラーのうち前記境界面からの反射光を反射させる反射面側に設けられる焦
点検出用の検出器と、

前記ダイクロイックミラーと前記検出器の間に設けられ、前記焦点検出光の波長のみを
透過するフィルタと、を備え、

前記検出器が受光した前記反射光の検出結果に基づいて、前記境界面に対するオートフ
ォーカスを行うことを特徴とする焦点検出装置。

【請求項 3】

標本を観察するための対物レンズと、

前記標本の屈折率とは異なる屈折率をもち、前記標本を載置する透明部材と、

前記対物レンズを介して前記標本と前記透明部材との境界面で全反射するように前記対
物レンズの外周部分を通して照明光を投光する照明光学系と、

励起された前記標本が発する微弱な蛍光を観察する観察光学系と、

前記対物レンズを介して前記境界面にオートフォーカス用の焦点検出光を投光する焦点
検出光学系と、を備え、

前記焦点検出光学系は、

前記観察光学系の光路上に設けられるダイクロイックミラーと、

前記ダイクロイックミラーを通して前記境界面に焦点検出光を出射する焦点検出光源と

、
前記ダイクロイックミラーのうち前記境界面からの反射光を反射させる反射面側に配置
され、前記境界面からの反射光を透過及び反射させることで 2 つの光路に分岐させる半透
過ミラーと、

前記焦点検出光源と前記半透過ミラーとの間に配置され、前記焦点検出光をその断面方
向で半円形に遮光する遮光板と、

前記焦点検出光のうち前記境界面からの反射光を集光する結像レンズと、

前記半透過ミラーによって分岐された光路上に設けられ、前記結像レンズによって結像
される前記焦点検出光を観察可能に配置された検出器と、を有し、

前記検出器が受光した反射光の検出結果に基づいて、前記境界面に対するオートフォー
カスを行うとともに、前記境界面で全反射した照明光により生じるエバネッセント光に基
づいて前記標本の蛍光像を観察することを特徴とする蛍光観察装置。

【請求項 4】

前記焦点検出光学系は、前記ダイクロイックミラーと前記検出器との間に設けられ、前
記焦点検出光源からの反射光のみを透過する波長制限部材をさらに有することを特徴とす
る請求項 3 に記載の蛍光観察装置。

【請求項 5】

前記観察光学系は、前記照明光源で励起されたエバネッセント光によって標本が発する
微弱な蛍光像を前記対物レンズを通して撮像する撮像素子を有することを特徴とする請求
項 3 または 4 に記載の蛍光観察装置。

【請求項 6】

前記ダイクロイックミラーは、前記焦点検出光を反射するとともに前記蛍光を透過する
ことを特徴とする請求項 3 ないし 5 のいずれかひとつに記載の蛍光観察装置。

【請求項 7】

前記照明光学系は、前記照明光を出射する照明光源と、前記照明光を反射するとともに前記標本が発する蛍光を透過する照明ダイクロイックミラーと、を有することを特徴とする請求項3ないし6のいずれかひとつに記載の蛍光観察装置。

【請求項 8】

前記標本からの微弱な蛍光と、前記焦点検出光とで波長が異なり、前記観察光学系による観察と前記検出器によるオートフォーカスとを同時に行うことが可能であることを特徴とする請求項3ないし7のいずれかひとつに記載の蛍光観察装置。

【請求項 9】

前記焦点検出光源が発する前記焦点検出光の波長は、前記標本が発する微弱な蛍光の波長よりも長いことを特徴とする請求項3ないし8のいずれかひとつに記載の蛍光観察装置

10

【請求項 10】

照明光学系が投光する照明光の前記境界面に対する入射角を可変であることを特徴とする請求項3ないし9のいずれかひとつに記載の蛍光観察装置。

【請求項 11】

前記検出器が検出する前記標本に対する合焦位置をオフセット可能であることを特徴とする請求項3ないし10のいずれかひとつに記載の蛍光観察装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、焦点検出装置とそれを用いた蛍光観察装置に関し、特に、生細胞を高コントラストで蛍光観察する顕微鏡や光学装置において、観察対象となる観察標本の搭載されたガラス面と観察標本の界面位置を高い精度で検出することができる装置に関する。

20

【背景技術】

【0002】

生物研究分野では、蛍光観察法を利用して細胞内部の機能、構造解析が行われている。しかしながら、通常の蛍光観察では照明光が観察対象物全体に照射されるため、観察したい位置以外（ピントの合っていない位置）の蛍光情報も同時に取得される。そのため、コントラストが低下してしまい、例えば1分子といった微小単位の観察を行うことができなかった。

【0003】

30

近年、光の全反射時に発生するエバネッセント光を照明光として利用し、数十から数百nmといった微小領域のみを照明する技術が確立したことで、通常の蛍光観察の問題点である上記コントラストの低下を防止し、1分子レベルの微小単位の蛍光観察が可能となってきた。

【0004】

エバネッセント光は、屈折率の異なる境界面に、ある一定値以下の角度で照明光を入射させたときに、その照明光を全反射させることによって発生する光である。また、エバネッセント光は、上記境界面に対して照明光とは反対側に、波長より小さい寸法の領域に局在する、自由空間を伝播しない特性をもつ。

【0005】

40

生物研究では、生細胞内での経時変化を見るためにしばしばタイムラプスと言われる手法がとられている。この手法は、例えば1日、2日といった期間内で連続または一定間隔で観察像を取得することで細胞内部の機能を解析することを目的としている。

【0006】

この手法においては、長期間におよぶ観察が必要となるが、観察装置である顕微鏡は金属とガラスの集合体であり、例えば実験を行う部屋の内部温度が僅かに変化しただけでも顕微鏡が変形し、ピント位置がずれるという問題が発生する。特に、数十から数百nmといった微小領域を観察するエバネッセント光を利用した蛍光観察では、大きな問題となっている。

【0007】

50

特許文献1では、焦点検出専用のエバネッセント光を利用することで、そのエバネッセント場に存在する細胞の一部を高精度で位置検出する手段が開示されている。

【0008】

図11に示すように、焦点検出用のレーザ光90をカバーガラス91と試料溶液96中の観察試料92との界面91aで全反射するように入射し、カバーガラス表面にエバネッセント光を浸み出させる。このエバネッセント光の存在する領域つまりエバネッセント場に位置する観察標本92は前記エバネッセント光により散乱光93を生じる。その散乱光93を対物レンズ94で集光し、受光素子95で検出してその受光強度の最も大きな位置を合焦位置とする。この位置情報から対物レンズ94の焦点位置を制御している。試料を蛍光観察するための光源はさらに別にあり、焦点検出用のレーザ光90は赤外光を用いる事で細胞に与えるダメージを少なくする事ができる。

10

【特許文献1】特開2003-270524号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

ところが特許文献1に記載の発明では、細胞による散乱光強度を検出しているため、合焦精度、位置が細胞の数や状態によって振られることや、フォーカス調整時の散乱光強度変化が微小であり検出精度が劣化することが予想される。

【0010】

また焦点を合わせるために用いている基準点が散乱光を発生する試料の一部であるため、生細胞などを観察標本としている場合、基準点とした散乱光を発生する観察標本の一部が動くことが予想され、焦点調整が定まらないことになる。例えば、焦点調整に用いていた細胞の一部が上方向に移動し、実際に観察していた部位が動かなかった時、観察している部位はピンボケになってしまう。

20

【0011】

本発明は、エバネッセント光を利用した高コントラストの蛍光観察において、試料である細胞の状態等に影響なく高合焦精度を実現することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明に係る発明は、標本を観察する対物レンズと、前記標本の屈折率とは異なる屈折率をもち、前記標本を載置する透明部材と、前記対物レンズの外周部分を通して、前記標本と前記透明部材との境界面で全反射するように照明光を照射する照明光源と、前記対物レンズと撮像素子との間に配置された焦点検出用のダイクロイックミラーと、前記ダイクロイックミラーのうち前記境界面からの反射光を反射させる反射面側に配置された半透過ミラーと、前記半透過ミラーのうち前記境界面からの反射光を反射させる反射面側に設けられ、焦点検出用の検出光を照射する焦点検出光源と、前記検出光をその光束の断面方向で半分に遮光する遮光板と、前記半透過ミラーのうち前記境界面からの反射光を透過させる透過面側に設けられる焦点検出用の検出器と、前記ダイクロイックミラーと前記検出器の間に設けられ、前記焦点検出光の波長のみを透過させるフィルタと、を備え、前記検出器が受光した前記反射光の検出結果に基づいて、前記境界面に対するオートフォーカスを行う焦点検出装置である。

30

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、エバネッセント光を利用した高コントラストの蛍光観察において、試料である細胞の状態等に影響なく高合焦精度を実現することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

【0015】

(第1の実施の形態)

40

50

図 1 は、本発明の第 1 の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図である。なお、第 1 の実施の形態及び以降の実施の形態では、蛍光観察装置として倒立型の落射蛍光顕微鏡を用いて、本発明の実施の形態を説明する。

図 1 において、1 は顕微鏡本体であり、この顕微鏡本体 1 は、一般的な倒立型の落射蛍光顕微鏡と同様に、照明部 2、ダイクロイックミラー 3、対物レンズ 4、ハーフミラー 5、光学フィルタ 6 および光ディテクタとしての撮像素子 (CCD カメラなど) 7 を有しており、それらが、それぞれの光軸を一致させて配置されている。

【0016】

照明部 2 は、後述する標本 (生細胞) 12 を励起する所定波長のレーザ光を発する照射光源 8 と、集光レンズ 9 を、それぞれの光軸が一致するように配置している。また、照射光源 8 からのレーザ光が集光レンズ 9、ダイクロイックミラー 3 を介して対物レンズ 4 の後ろ側焦点位置に集光されるように調整されている。

【0017】

ダイクロイックミラー 3 は、照射光源 8 からの所定波長の照明光 111 の波長の光を反射するとともに、後述する照明光 111 よりも波長の長い蛍光 112 の波長を透過するように設定されている。対物レンズ 4 は、 NA (対物レンズの開口数) $> n$ (観察標本の屈折率) の条件を満たした高い開口数を有する油浸対物レンズからなる。

【0018】

対物レンズ 4 の上方に標本 12 が配置されている。標本 12 は、顕微鏡本体 1 の図示しないステージに載置されたカバーガラス 13 上に密着される。このカバーガラス 13 は生細胞である標本 12 の生体活動に必要な水溶液で満たされている。この標本 12 は、カバーガラス 13 の屈折率とほぼ同じ屈折率をもつオイル 15 を介して対物レンズ 4 の焦点位置に位置されている。

【0019】

ダイクロイックミラー 3 で反射された照射光源 8 のレーザ光は、照明光 (励起光) 111 として、対物レンズ 4 の外周部分を通る小さい光束径で対物レンズ 4 に入射し、カバーガラス 13 で全反射する入射角度に調整されており、カバーガラス 13 で全反射したときに標本 12 側にエバネッセント光 17 を生成する。エバネッセント光 17 は、その照明光の波長より短い距離でカバーガラス 13 の標本 12 側に局在する。照明光 111 はカバーガラス 13 で全反射した後、対物レンズ 4 の中心軸に対して照明光 111 と軸対称な対物レンズ 4 の後ろ側焦点位置で集光し、戻り光 113 としてダイクロイックミラー 3 で反射して顕微鏡本体 1 の内面で遮光される。

【0020】

一方、エバネッセント光 17 により励起される標本 12 から発する微弱な蛍光 112 (破線で表記) は、ダイクロイックミラー 3 を透過し、光学フィルタ 6 を介してハーフミラー 5 に入射する。ハーフミラー 5 は、観察光軸に対して挿脱可能になっている。ハーフミラー 5 が光軸に挿入された時には、蛍光 112 が分割され、一方の分割蛍光は接眼レンズ 16 を介して観察可能になり、他方の分割蛍光は撮像素子 7 に入射する。一方、ハーフミラー 5 が光軸から抜かれた時には、蛍光 112 がすべて撮像素子 7 に導かれる。

【0021】

光学フィルタ 6 は、ダイクロイックミラー 3 などとともに観察光学系を構成するもので、特定の波長の光を選択的に通すことができるようになっている。ここでは、照明光 111 の波長の光を遮断し、照明光 111 よりも波長が長い蛍光 112 の光を通過させるものが用いられる。

【0022】

標本 12 からの蛍光 112 は、光学フィルタ 6 を通過し、接眼レンズ 16 による蛍光像として観察されるとともに、撮像レンズ 18 を介して撮像素子 7 により撮像される。

【0023】

制御部 10 は、位置制御部 14 を使って対物レンズ 4 を光軸方向に動かすことにより対物レンズ 4 の焦点位置を光軸方向に動かす。これにより、蛍光 112 の複数の蛍光像を撮

10

20

30

40

50

像素子 7 で取得し、そのコントラストの差を求める。

【 0 0 2 4 】

このコントラストの差から、観察標本 1 2 と対物レンズ 4 の焦点位置が重なるように位置制御部 1 4 を制御して対物レンズ 4 を上下に動かす。

なお、蛍光像によるピント検出は、コントラスト差に限らず、像の強度分布などからも求めることができる。

【 0 0 2 5 】

以上の構成により、数十ナノメートル～数百ナノメートルという非常に薄いエバネッセント光 1 7 の領域に存在する標本 1 2 の一部分から発する蛍光 1 1 2 の像を使った、焦点検出と焦点合わせが可能となる。

エバネッセントと組み合わせた高精度の焦点検出の効果が得られる。すなわち、蛍光 1 1 2 は上記の数十ナノメートル～数百ナノメートルのエバネッセント光 1 7 の領域でしか発光しないため、数十ナノメートル～数百ナノメートルという精度で焦点検出ができる。

【 0 0 2 6 】

また生物研究における生細胞内での経時変化を見るためのタイムラプスでは、長期間におよぶ観察が必要となるが、観察装置である顕微鏡は金属とガラスの集合体であり、例えば実験を行う部屋の内部温度が僅かに変化しただけでも顕微鏡が熱変形し、ピント位置がずれるという問題が発生しており、特に、数十から数百 nm といった微小領域を観察するエバネッセント光を利用した蛍光観察では、大きな問題となっている。しかし本実施の形態によれば、観察している蛍光 1 1 2 の像を使って焦点検出を行うため、顕微鏡などが熱変形をおこしても、長時間にわたり焦点を合わせたまま観察を続けることができる。また、観察に使用するレーザの波長より多い波長のレーザを別途用意して使用すれば、蛍光の退色も防止できる。

【 0 0 2 7 】

なお、第 1 の実施の形態及び以降の実施の形態においては、蛍光観察装置として、倒立型の落射蛍光顕微鏡を用いて説明しているが、これに限らず、蛍光を用いて合焦を実現できる構成であれば、どのような装置にも適用可能である。

【 0 0 2 8 】

(第 2 の実施の形態)

図 2 は、本発明の第 2 の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図である。図 2 において、図 1 と同じ部分には同じ符号を付している。

第 2 の実施の形態では、第 1 の実施の形態における装置に、新たに焦点検出装置系である集光レンズ 3 0 と検出器 3 1 を観察光学系の光軸に対して追加している。

図 2 において、第 1 の実施の形態では戻り光 1 1 3 を遮光していたが、本実施の形態では、戻り光 1 1 3 を遮光せずに、集光レンズ 3 0 にて検出器 3 1 の検出ポイント 3 7 の後方に集光している。

【 0 0 2 9 】

上記構成ではカバーガラス 1 3 と標本 1 2 の密着面が対物レンズ 4 の焦点位置に一致した状態の構成を示しており、カバーガラス 1 3 の位置 3 3 (点線) は、対物レンズ 4 の焦点位置よりも下方向にカバーガラスが動いた状態を示している。カバーガラス 1 3 が位置 3 3 に動いたときに、照明光 1 1 1 の戻り光 1 1 3 は戻り光 1 2 3 の位置に動く。具体的には、図 2 に示すように、照明光 1 1 1 の反射面が下方向に動いたので、戻り光 1 2 3 の光路は、戻り光 1 1 3 より光軸側の光路に移動し、集光レンズ 3 0 による集光位置が検出ポイント 3 7 から検出ポイント 3 8 に移動する。

カバーガラス面 1 3 が対物レンズ 4 の焦点位置よりも上方向に動いた場合を考慮すると、照明光 1 1 1 の戻り光は検出ポイント 3 7 に対して検出ポイント 3 8 とは反対側の図示しない光路を通ることになる。

従って、まず、ピントがあった状態における集光レンズ 3 0 による集光位置である検出器 3 1 の検出ポイント 3 7 の位置を記憶しておく。そして、集光位置が、検出ポイント 3 7 からずれたときに、ピントがずれているということなので、対物レンズ 4 を動かして、

10

20

30

40

50

集光位置をピントが合った状態である検出ポイント３７の位置に戻す。

【００３０】

上記のように、検出器３１に対する戻り光の集光位置を検出して、集光位置を合焦時の検出ポイントに一致させることで、対物レンズ４の合焦位置を求めることが可能となる。これにより第１の実施形態と同様に、顕微鏡などが熱変形をおこしても、長時間にわたり焦点を合わせたまま観察を続けることができる。

【００３１】

また検出器３１に集光される戻り光の検出ポイントの位置により、カバーガラス１３と標本１２の密着面が、焦点位置に対して光軸方向の上方向か下方向かどちらにあるのかが分かるため、焦点調整時の調整方向を短時間で判断できる。

10

【００３２】

本実施の形態において、カバーガラス１３と標本１２の密着面と異なる位置（ここではカバーガラス面３３と標本の密着面）に対物レンズ４の焦点を合わせたいとき、戻り光の検出ポイント３８を焦点一致ポイントとしてオフセットしても良い。なお照明光１１１を対物レンズ４の瞳位置で集光させていれば、エバネッセント光３６は変わらない。

これにより、上記の効果に加え、カバーガラス１３と標本１２の密着面と異なる位置に対物レンズ４の焦点をオフセットして合わせたままで、焦点位置を検出する事ができる。

【００３３】

更に、照明光１１１はカバーガラス面１３への入射角度によって、エバネッセント光１７の浸み出し深さを变化させる事ができるが、エバネッセント光１７の浸み出し深さを变化させた後の検出ポイントを焦点一致ポイントとしてオフセットしても良い。

20

これにより、上記の効果に加え、エバネッセント光１７の浸み出し深さを变化させても焦点位置を検出する事ができる。

【００３４】

また、カバーガラス面１３が移動しない短時間の間に、照明光１１１のカバーガラス面１３への入射角度を变化させ、その戻り光の検出ポイントの变化量を読み取るようにしても良い。

これにより、エバネッセント光１７の浸み出し深さの变化量を求める事ができる。

【００３５】

図３に示すように、図２に示す検出器３１である面センサ、ラインセンサなどの代わりに、ピンホール３９と光検出器４０を組み合わせた集光ポイント検出器４１に置き換えても良い。この場合には、集光位置を検出するために集光ポイント検出器４１を移動して光検出器４０で集光ポイントを検出する。

30

これにより、上記の効果に加え、高価な検出器３１をより安価な検出器に置き換えることができる。

【００３６】

また、焦点検出に用いていた照明光１１１を焦点検出用の専用光とし、照明用の光源を別に配置しても良い。

これにより、上記の効果に加え、焦点検出用の光源の波長を、生体である標本１２にダメージを与えにくい赤外光などに変更することができる。

40

【００３７】

（第３の実施の形態）

図４は、本発明の第３の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図である。

図４において、図１と同じ部分には同じ符号を付している。

図４に示すように、本実施の形態では、新たに焦点検出光源系である焦点検出用レンズ５０と、焦点検出装置系である焦点検出用レンズ５３と、２分割検出器５４とを観察光学系の光軸に対して追加している。

【００３８】

本実施の形態では、戻り光１１３は、挿脱可能な遮光板５２で、遮光と透過を選択できるように構成される。

50

焦点検出用レンズ50が照明光路内に挿入されると、遮光板52は焦点検出戻り光132の光路から抜かれて、焦点検出戻り光132は2分割検出器54に到達する。一方、焦点検出用レンズ50が照明光路内から抜かれると、遮光板52は戻り光113の光路に挿入されて、戻り光113は遮光される。

【0039】

焦点検出用レンズ50は、集光レンズ9の焦点と共益な位置に挿脱可能な状態で配置される。焦点検出用レンズ50が照明光路内に挿入されると、照明光111は焦点検出光131となる。焦点検出光131として対物レンズ4に入射されるレーザ光は、カバーガラス13と標本12の密着面で焦点を結ぶと同時に反射され、対物レンズ4の中心軸に対して焦点検出光131と軸対称な焦点検出戻り光132となる。焦点検出戻り光132はダイクロイックミラー3で反射される。

10

【0040】

ダイクロイックミラー3で反射された焦点検出戻り光132は、焦点検出光軸と光軸を一致した焦点検出用レンズ53にて集光され、焦点検出光軸と軸を一致した2分割検出器54の中心の分割部で焦点を結ぶ。このときの2分割検出器54の集光面55では、2分割検出器54の両検出素子にまたがった小さな集光光が観察される。

【0041】

2分割検出器54の分割面は、光軸と平行であり、かつ焦点検出光131と焦点検出戻り光132の軸を含む面に対して垂直な状態で構成される。ここで、図5に示すようにカバーガラス13と標本12の密着面が下方方向に動いたとき、焦点検出光131として対物レンズ4に入射されるレーザ光は、カバーガラス13と標本12の境界面で焦点を結ばずに反射して焦点検出戻り光133となる。焦点検出戻り光133は2分割検出器54の中心より偏った位置に集光しない状態のまま到達する。したがって2分割検出器54の集光面55では、2分割検出器54の片側素子に偏った大きなボケ光56が観察される。逆に、図6のようにカバーガラス13と標本の密着面が上方方向に動いたときは、2分割検出器54の上記とは反対の素子に偏った大きなボケ光57が観察される。

20

そこで、2分割検出器54の集光面55にて両検出素子にまたがった小さな集光光が観察できるように対物レンズを光軸方向に調整することで焦点調整を行うことができる。

【0042】

上記のように、本実施の形態により、照明光111を定期的に焦点検出光131に切り替えながら対物レンズ4の焦点位置を検出することができる。これにより、第1の実施の形態と同様に、顕微鏡などが熱変形をおこしても、長時間にわたり焦点を合わせたまま観察を続けることができる。また照明光を焦点検出光に流用するため、全体的な構成が単純となり安価に構成できる。また焦点検出光を必要な時だけ照明光に切り替えられるため、生細胞などの標本に与えるダメージが少なくなる。また焦点検出においても、2分割検出器54の集光面のどちらに焦点検出戻り光132が到達しているかで、カバーガラス13が焦点面の上方向にあるのか下方向にあるのか判断できるため、カバーガラス13の移動方向をこれだけで判断する事ができる。

30

【0043】

(第4の実施の形態)

40

図7は、本発明の第4の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図である。図7において、図1と同じ部分には同じ符号を付している。

図7に示すように、本実施の形態では、新たに焦点検出光源系である焦点検出光源60と、コリメートレンズ61と、遮光板62と、半透過ミラー63と、焦点検出用ダイクロイックミラー69と、焦点検出装置系である焦点検出用レンズ64と、波長カット板70と、2分割検出器65とを観察光学系の光軸に対して追加している。

【0044】

図7において、照明系と観察系は、第1の実施の形態に係る構成と同じである。ダイクロイックミラー3は、照射光源8からの所定波長の照明光111の波長の光を反射するとともに、照明光111の励起により標本12から発せられる波長の長い微弱な蛍光の波長

50

を透過し、蛍光の波長よりさらに波長の長い焦点検出で用いる焦点検出光 1 4 1 も透過するように設定されている。

【 0 0 4 5 】

照明系には、カバーガラス 1 3 で全反射した戻り光 1 1 3 が、観察光学系に漏れ出さないようになり、遮光板 7 1 が、ダイクロイックミラー 3 より標本側に配置される。

【 0 0 4 6 】

焦点検出系では、生細胞にダメージを与えにくい赤外域の所定波長のレーザ光を発する焦点検出光源 6 0、及びコリメートレンズ 6 1 を、それぞれの光軸を一致するように配置している。焦点検出光源 6 0 からのレーザ光を、コリメートレンズ 6 1、半透過ミラー 6 3、焦点検出光ダイクロイックミラー 6 9、ダイクロイックミラー 3 を介して対物レンズ 4 の焦点位置で集光させるように各々が調整されている。

10

【 0 0 4 7 】

半透過ミラー 6 3 は、焦点検出光源 6 0 からの所定波長のレーザ光を半透過するとともに、残りの半分の光量を反射するように設定されている。

焦点検出光ダイクロイックミラー 6 9 は、蛍光の波長を透過すると共に、蛍光より波長の長い焦点検出光 1 4 1 を反射するように設定されている。

【 0 0 4 8 】

焦点検出光源 6 0 からのレーザ光は、コリメートレンズ 6 1 の瞳位置に配置された遮光板 6 2 でその半分を遮光された焦点検出光 1 4 1 として対物レンズ 4 に入射され、カバーガラス 1 3 と標本 1 2 の密着面で焦点を結ぶと共に反射されて対物レンズ 4 の中心軸に対して焦点検出光 1 4 1 と軸対称な焦点検出戻り光 1 4 2 となる。

20

遮光板 6 2 は、焦点検出光の断面から見て半円形に遮光するように、円板状のガラス板の半円部分を遮光し、残りを透過させている。

【 0 0 4 9 】

カバーガラス 1 3 と標本 1 2 の密着面で反射した焦点検出戻り光 1 4 2 は、ダイクロイックミラー 3 を透過し、焦点検出用ダイクロイックミラー 6 9 で反射し、半透過ミラー 6 3 でその半分の光量が反射して遮光板 6 2 で遮光され、残り半分の光量が透過する。半透過ミラー 6 3 を透過した焦点検出戻り光 1 4 2 は、焦点検出光軸と光軸を一致した焦点検出用レンズ 6 4 にて集光され、波長カット板 7 0 にて焦点検出光源 6 0 の波長のみを透過し、焦点検出光軸と軸を一致した 2 分割検出器 6 5 の中心の分割部で焦点を結ぶ。このときの 2 分割検出器 6 5 の集光面 6 6 では、2 分割検出器 6 5 の両検出素子にまたがった小さな集光光が観察される。

30

2 分割検出器 6 5 の分割面は、光軸と平行でかつ焦点検出光 1 4 1 と焦点検出戻り光 1 4 2 の分割ラインを含む面と同じ面で構成される。

【 0 0 5 0 】

これにより、カバーガラス 1 3 と標本 1 2 の密着面に対物レンズ 4 の焦点が合った状態を検出できる。

【 0 0 5 1 】

図 8 はカバーガラス 1 3 が下方向に動いたとき、焦点検出光 1 4 1 として対物レンズ 4 に入射されるレーザ光は、カバーガラス 1 3 と標本 1 2 の密着面で焦点を結ばずに反射して対物レンズ 4 を透過してもコリメータ光ではない焦点検出戻り光 1 4 3 となる。焦点検出戻り光 1 4 3 は 2 分割検出器 6 5 まで導かれ、2 分割検出器 6 5 の中心より偏った位置に集光しない状態のまま到達する。したがって 2 分割検出器 6 5 の集光面 6 6 では、2 分割検出器 6 5 の片側素子に偏った大きなボケ光 6 7 が観察される。逆に図 9 のようにカバーガラス 1 3 が上方向に動いたときは、カバーガラス 1 3 が下方向に動いたときの 2 分割検出器 6 5 の検出素子とは反対の素子に偏った大きなボケ光 6 8 が観察される。

40

【 0 0 5 2 】

以上より焦点検出器の集光面にて両検出素子にまたがった小さな集光光が観察できるように対物レンズを光軸方向に調整する事で焦点調整を行う。

【 0 0 5 3 】

50

本実施の形態によれば、蛍光像を観察しながら常に対物レンズの焦点位置を検出することができる。また照明光 1 1 1 と焦点検出光 1 4 1 の光源が異なるため、焦点検出光 1 4 1 に赤外光などを用い、生細胞などの標本に与えるダメージを少なくする事ができる。また焦点検出においても、2分割検出器 6 5 の集光面のどちらに焦点検出戻り光 1 4 2 が到達しているかで、カバーガラス 1 3 が焦点面の上方方向にあるのか下方方向にあるのか判断できるため、焦点調整時にカバーガラス 1 3 の移動方向をこれだけで判断する事ができる。さらに、照明光 1 1 1 のカバーガラス 1 3 への入射角を変えてエバネッセント光 1 7 の浸み出し深さを変えても、焦点検出はまったく別の光源でおこなっているため焦点検出に影響が出ない。また第 1 の実施の形態と同様に、顕微鏡などが熱変形をおこしても、長時間にわたり焦点を合わせたまま観察を続けることができる。さらに 2 分割検出器 6 5 における焦点一致の位置をオフセットすることで、対物レンズ 4 の焦点位置がカバーガラス 1 3 と標本 1 2 の密着面から離れていても像を観察しながら焦点検出が行える。

10

【 0 0 5 4 】

(第 5 の実施の形態)

図 1 0 は、本発明の第 5 の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図である。図 1 0 において、図 1 と同じ部分には同じ符号を付している。

【 0 0 5 5 】

図 1 0 において、1 は顕微鏡本体で、この顕微鏡本体 1 は、一般的な倒立型の落射蛍光顕微鏡と同様に、照明光源 8 4、対物レンズ 4、ダイクロイックミラー 3、光学フィルタ 6、ハーフミラー 5、および光ディテクタとしての撮像素子 7、焦点検出光源 8 7、焦点検出装置 8 9 を有しており、それぞれの光軸を一致させて配置されている。照明光源 8 4 による照明光は、標本 1 2 を励起する所定波長の光のみを透過する励起フィルタ 8 5 を通って標本 1 2 を照射する。対物レンズ 4 は、 NA (対物レンズの開口数) $> n$ (観察標本の屈折率) の条件を満たした高い開口数を有する油浸対物レンズからなる。

20

【 0 0 5 6 】

対物レンズ 4 の上方に標本 1 2 が配置されている。標本 1 2 は、顕微鏡本体 1 の図示しないステージに載置されたカバーガラス 1 3 上に密着される。このカバーガラス 1 3 は生細胞である標本 1 2 の生体活動に必要な水溶液で満たされている。この標本 1 2 は、カバーガラス 1 3 の屈折率とほぼ同じ屈折率をもつオイル 1 5 を介して対物レンズ 4 の焦点位置に位置されている。

30

【 0 0 5 7 】

照明光 8 8 の励起により、標本 1 2 から発せられる微弱な蛍光 1 1 2 は、対物レンズ 4 及びダイクロイックミラー 3 を透過し、光学フィルタ 6 を介してハーフミラー 5 に入射される。ハーフミラー 5 は、観察光軸に対して挿脱ができるようになっており、光軸に挿入された時には、蛍光 1 1 2 を分割し、一方の分割蛍光が接眼レンズ 1 6 を介して観察可能であり、他方の分割蛍光が撮像素子 7 に入射する。一方、ハーフミラー 5 が光軸から抜かれた時には、蛍光 1 1 2 がすべて撮像素子 7 に導かれる。光学フィルタ 6 は、ダイクロイックミラー 3 などとともに観察光学系を構成するものであって、特定の波長の光を選択的に通すことができる。ここでは、光学フィルタ 6 として、照明光 8 8 の波長の光と焦点検出光 1 5 1 の波長の光を遮断し、照明光 8 8 よりも波長が長い蛍光 1 1 2 の光を通過させるものが用いられる。標本 1 2 からの蛍光 1 1 2 は、光学フィルタ 6 を通過し、蛍光像として観察されるとともに、撮像素子 7 により撮像される。

40

【 0 0 5 8 】

焦点検出系は、生細胞である標本にダメージを与えにくい赤外域の所定波長のレーザ光を発する焦点検出光源 8 7、集光レンズ 8 6 を、それぞれの光軸が一致するように配置しており、焦点検出光源 8 7 からのレーザ光を集光レンズ 8 6 及びダイクロイックミラー 3 を介して対物レンズ 4 の後側焦点位置に集光させるように調整されている。

【 0 0 5 9 】

ダイクロイックミラー 3 は、励起光 8 8 よりも波長の長い蛍光の波長を透過し、焦点検出光源 8 7 からの赤外域の所定波長の焦点検出光 1 5 1 を反射するとともに、励起光 8 8

50

を通さないように設定されている。

ダイクロイックミラー 3 で反射された焦点検出光源 8 7 のレーザ光は、焦点検出光 1 5 1 として対物レンズ 4 を介して標本 1 2 に照射される。

【 0 0 6 0 】

焦点検出光 1 5 1 は、対物レンズ 4 の外周部分を通る小さい光束径で、カバーガラス 1 3 と標本 1 2 の密着面で全反射する入射角度に調整されており、カバーガラス 1 3 と標本 1 2 の密着面で全反射したときに標本 1 2 側にエバネッセント光 1 7 を生成する。エバネッセント光 1 7 は、その焦点検出光 1 5 1 の波長より短い距離でカバーガラス 1 3 の標本 1 2 側に局在する。焦点検出光 1 5 1 はカバーガラス 1 3 で全反射した後、対物レンズ 4 の中心軸に対して焦点検出光 1 5 1 と軸対称な対物レンズ 4 の後ろ側焦点位置で集光され、焦点検出戻り光 1 5 2 としてダイクロイックミラー 3 で反射して顕微鏡本体 1 の内面で遮光される。

10

【 0 0 6 1 】

エバネッセント光 1 7 が標本 1 2 に当たるとその散乱光 1 6 1 が発生する。散乱光 1 6 1 はダイクロイックミラー 3 で反射し、焦点検出装置 8 9 にはいる。

焦点検出装置 8 9 は、集光レンズ 8 0、ピンホール 8 1、フィルタ 8 2、検出器 8 3 で構成され、各々が顕微鏡本体 1 の光軸と一致している。散乱光 1 6 1 は集光レンズ 8 0 で検出器 8 3 に集光される。集光レンズ 8 0 の瞳位置にはピンホール 8 1 が配置され、焦点を合わせたい視野中心の散乱光 1 1 4 以外の不要な光線を大幅にカットする。ピンホール 8 1 と検出器 8 3 の間には、赤外域の所定波長である散乱光 1 6 1 の波長のみを透過しそれ以外の照明光 8 8 などの波長を除去するフィルタ 8 2 が構成される。

20

【 0 0 6 2 】

制御部 1 0 では、位置調整部 1 4 を使って対物レンズ 4 を光軸方向に動かし、これにより対物レンズ 4 の焦点位置を光軸方向に動かすことで、散乱光 1 6 1 の複数の像を検出器 8 3 で取得し、その信号の強度差などを求める。この信号の強度差から、信号強度が最大になる状態が標本 1 2 と対物レンズ 4 の焦点位置が重なる状態であるとして位置制御部 1 4 を制御して対物レンズ 4 を信号強度が最大になる位置まで光軸方向に動かす。

【 0 0 6 3 】

本実施の形態によれば、数十ナノメートル～数百ナノメートルという非常に薄いエバネッセント光 1 7 の領域に存在する標本 1 2 の一部分から発する散乱光 1 6 1 の像を使った、焦点検出と焦点合わせが可能となる。

30

散乱光 1 6 1 は、上記のように、数十ナノメートル～数百ナノメートルのエバネッセント光 1 7 の領域でしか発光しないため、数十ナノメートル～数百ナノメートルという精度の焦点検出が効果として得られる。

【 0 0 6 4 】

また生物研究における生細胞内での経時変化を見るためのタイムラプスでは、長期間におよぶ観察が必要となるが、観察装置である顕微鏡は金属とガラスの集合体であり、例えば実験を行う部屋の内部温度が僅かに変化しただけでも顕微鏡が熱変形し、ピント位置がずれるという問題が発生しており、特に、数十から数百 nm といった微小領域を観察するエバネッセント光を利用した蛍光観察では、大きな問題となっている。しかしこの実施の形態では、観察している標本の散乱光を使って焦点検出を行うため、顕微鏡などが熱変形をおこしても、長時間にわたり焦点を合わせたまま観察を続けることができる。また焦点を合わせたい部分の像のみをピンホール 8 1 で選択するため、焦点とは関係ない像を除去し、焦点検出の精度を上げることができる。

40

【 0 0 6 5 】

本発明は、上記各実施の形態に限ることなく、その他、実施段階ではその要旨を逸脱しない範囲で種々の変形を実施し得ることが可能である。例えば、上記の各実施の形態では、焦点検出方法を個別に述べたが、適宜組み合わせることができることはもちろんである。さらに、上記各実施形態には、種々の段階の発明が含まれており、開示される複数の構成要件における適宜な組合せにより種々の発明が抽出され得る。

50

【 0 0 6 6 】

また、例えば各実施形態に示される全構成要件から幾つかの構成要件が削除されても、発明が解決しようとする課題の欄で述べた課題が解決でき、発明の効果で述べられている効果が得られる場合には、この構成要件が削除された構成が発明として抽出され得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 7 】

【図 1】本発明の第 1 の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図。

【図 2】本発明の第 2 の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図。

【図 3】本発明の第 2 の実施の形態の変形例にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図。

【図 4】本発明の第 3 の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図。

10

【図 5】本発明の第 3 の実施の形態において、カバーガラスと標本の密着面が下方方向に動いたときの焦点検出戻り光の検出位置を示す図。

【図 6】本発明の第 3 の実施の形態において、カバーガラスと標本の密着面が上方方向に動いたときの焦点検出戻り光の検出位置を示す図。

【図 7】本発明の第 4 の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図。

【図 8】本発明の第 4 の実施の形態において、カバーガラスと標本の密着面が下方方向に動いたときの焦点検出戻り光の検出位置を示す図。

【図 9】本発明の第 4 の実施の形態において、カバーガラスと標本の密着面が上方方向に動いたときの焦点検出戻り光の検出位置を示す図。

【図 10】本発明の第 5 の実施の形態にかかる蛍光観察装置の概略構成を示す図。

20

【図 11】従来技術の概略構成を示す図。

【符号の説明】

【 0 0 6 8 】

1 ...顕微鏡本体

2 ...照明部

3 ...ダイクロイックミラー

4 ...対物レンズ

5 ...ハーフミラー

6 ...光学フィルタ

7 ...撮像素子

30

8 ...照射光源

9 ...集光レンズ

10 ...制御部

12 ...標本

13 ...カバーガラス

14 ...位置制御部

15 ...オイル

16 ...接眼レンズ

17 ...エバネッセント光

18 ...撮像レンズ

40

30 ...集光レンズ

31 ...検出器

32 ...カバーガラス面

36 ...エバネッセント光

39 ...ピンホール

40 ...光検出器

41 ...集光ポイント検出器

50 ...焦点検出用レンズ

52 ...遮光板

53 ...焦点検出用レンズ

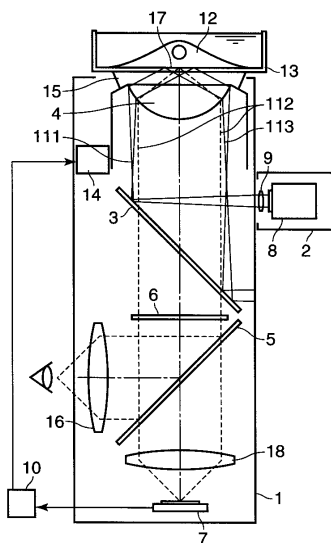
50

- 5 4 ... 2 分割検出器
- 5 5 ... 集光面
- 6 0 ... 焦点検出光源
- 6 1 ... コリメートレンズ
- 6 2 ... 遮光板
- 6 3 ... 半透過ミラー
- 6 4 ... 焦点検出用レンズ
- 6 5 ... 分割検出器
- 6 6 ... 集光面
- 6 7 ... ボケ光
- 6 9 ... 焦点検出用ダイクロイックミラー
- 8 0 ... 集光レンズ
- 8 1 ... ピンホール
- 8 2 ... フィルタ
- 8 3 ... 検出器
- 8 4 ... 照明光源
- 8 5 ... 励起フィルタ
- 8 6 ... 集光レンズ
- 8 7 ... 焦点検出光源
- 8 9 ... 焦点検出装置

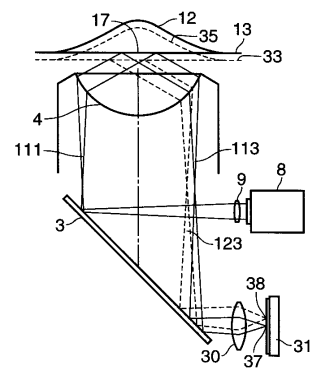
10

20

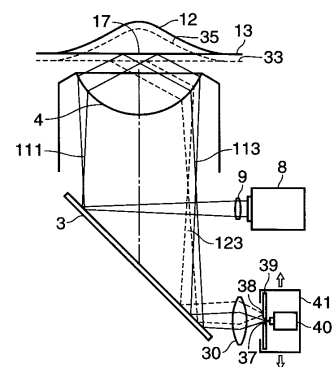
【図 1】



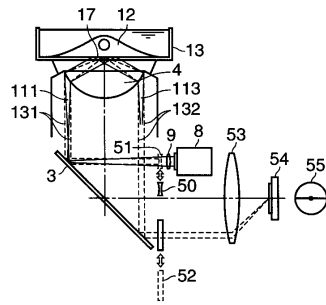
【図 2】



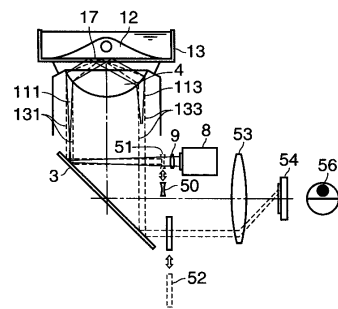
【図 3】



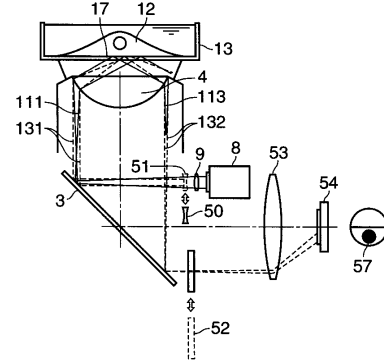
【図 4】



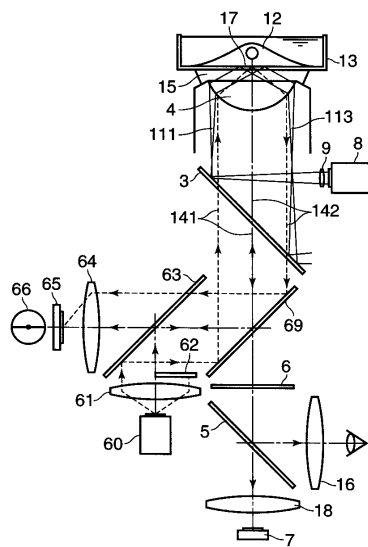
【図 5】



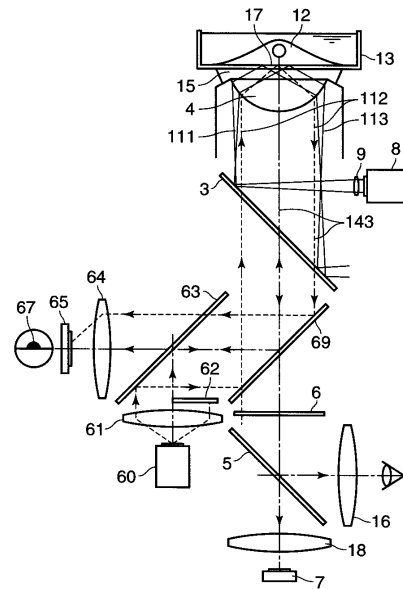
【図 6】



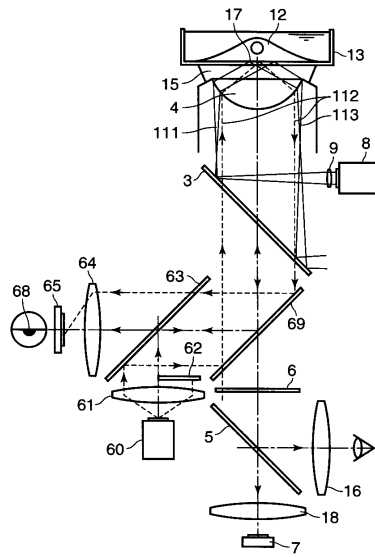
【図 7】



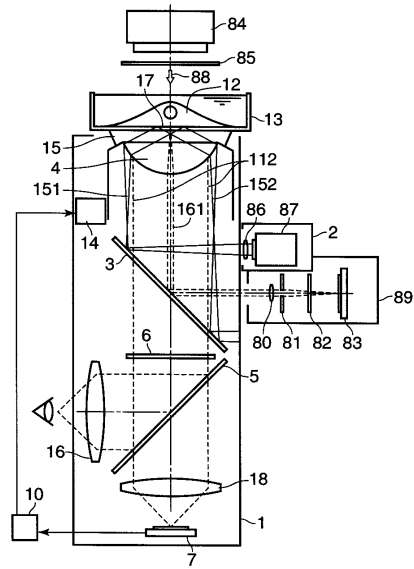
【図 8】



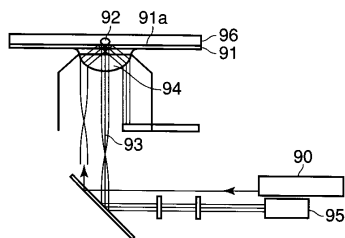
【図 9】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

- (74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎
- (72)発明者 唐澤 雅善
東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内
- (72)発明者 土屋 敦宏
東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内
- (72)発明者 米山 貴
東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内
- (72)発明者 小山 健一
東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス株式会社内

審査官 高橋 雅明

- (56)参考文献 特開平 10 - 024019 (JP, A)
特開 2002 - 156578 (JP, A)
特開 2002 - 341234 (JP, A)
特開 2003 - 177325 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G02B 19/00 - 21/00、21/06 - 21/36