

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5190603号
(P5190603)

(45) 発行日 平成25年4月24日(2013.4.24)

(24) 登録日 平成25年2月8日(2013.2.8)

(51) Int. Cl. F 1
GO 1 N 21/65 (2006.01) GO 1 N 21/65
GO 1 N 21/64 (2006.01) GO 1 N 21/64 E
GO 2 B 21/00 (2006.01) GO 2 B 21/00

請求項の数 10 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2008-220243 (P2008-220243)	(73) 特許権者	503138134
(22) 出願日	平成20年8月28日 (2008.8.28)		ナノフoton株式会社
(65) 公開番号	特開2010-54368 (P2010-54368A)		大阪府大阪市北区梅田1丁目1-3 267号
(43) 公開日	平成22年3月11日 (2010.3.11)	(74) 代理人	100103894
審査請求日	平成23年8月25日 (2011.8.25)		弁理士 冢入 健
		(74) 代理人	100129953
			弁理士 岩瀬 康弘
		(72) 発明者	小林 実
			大阪府吹田市山田丘2番1号 ナノフoton株式会社内
		(72) 発明者	太田 泰輔
			大阪府吹田市山田丘2番1号 ナノフoton株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学顕微鏡、及び観察方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

レーザ光源と、

前記レーザ光源からの光ビームを偏向させて第1の方向に走査する第1の走査手段と、
 前記第1の走査手段により走査された光ビームを集光して試料に入射させる対物レンズと、

前記第1の走査手段によって走査された光ビームと前記試料との相対位置を移動させて第2の方向に走査する第2の走査手段と、

前記第1の走査手段から前記試料までの光路中に配置され、前記試料に入射された光ビームのうち前記試料から前記対物レンズ側に出射する出射光と前記レーザ光源から前記試料に入射する入射光とを分離する光分岐手段と、

前記光分岐手段により分離された出射光が集光されて入射する入射側に前記第1の方向に対応する方向に沿って配置された入射スリットを有し、前記入射スリットを通過した前記出射光を波長に応じて空間的に分散させる分光器と、

前記分光器で分散された出射光を検出する2次元アレイ光検出器と、

前記試料と共役な位置に配置され、前記第1の方向に対応する方向に沿って配列された受光素子を有する光検出器と、

前記光分岐手段で分離された出射光が、前記分光器に向かうか、前記光検出器に向かうかを切替える切替手段と、を備える光学顕微鏡。

【請求項2】

前記光分岐手段が、波長に応じて光を分岐する第1のビームスプリッタと、波長に関わらず光を分岐する第2のビームスプリッタとを有し、

前記第1のビームスプリッタと第2のビームスプリッタとが排他的に使用され、

前記出射光が前記分光器に向かう場合は、前記第1のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離し、

前記出射光が前記光検出器に向かう場合において、前記光検出器で前記試料の反射像を撮像するため、前記第2のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離することを特徴とする請求項1に記載の光学顕微鏡。

【請求項3】

前記第1のビームスプリッタを光路中に挿入した状態で、前記試料で発生する蛍光を前記光検出器で検出する請求項2に記載の光学顕微鏡。

10

【請求項4】

前記第1の走査手段が、前記2次元アレイ光検出器の露光時間で前記光ビームを1回以上走査する低速スキャナーと、

前記低速スキャナーよりも高速に前記光ビームを走査する高速スキャナーと、を備え、

前記出射光が前記光検出器に向かう場合において、前記試料上の所定の位置を観察するため、前記低速スキャナーで前記入射光を位置決めする請求項1、2、又は3に記載の光学顕微鏡。

【請求項5】

前記光分岐手段が、波長に応じて光を透過又は反射するエッジフィルタを有しており、

前記光ビームの前記エッジフィルタに対する入射角度が 12° 以下である請求項1乃至4のいずれかに記載の光学顕微鏡。

20

【請求項6】

レーザ光源からの光ビームを偏向させて第1の方向に走査し、

前記第1の方向に走査された光ビームを集光して試料に入射させ、

前記第1の方向に走査された光ビームと前記試料との相対位置を移動させて第2の方向に走査し、

前記試料に入射された光ビームのうち、前記試料から前記対物レンズ側に出射する出射光が、前記第1の方向にデスキャンされる前に、前記出射光と前記レーザ光源から前記試料に入射する入射光とを分離し、

30

前記入射光から分離された出射光が第1の光路及び第2の光路の一方を伝播するように、光路を切換え、

前記出射光が第1の光路を伝播する場合は、前記第1の方向に対応する方向に沿って配置された入射スリットに入射させ、

前記入射スリットを通過した前記出射光を波長に応じて空間的に分散させ、

前記分散された出射光を、前記入射スリットの方向及び前記出射光が分散される方向に沿って受光素子が配列された2次元アレイ光検出器によって検出して、スペクトルを測定し、

前記出射光が第2の光路を伝播する場合は、前記試料と共役な位置に配置され、前記第1の方向に対応する方向に沿って設けられた受光素子を有する光検出器で検出する、観察方法。

40

【請求項7】

前記入射光と出射光とを分離する時において、波長に応じて光を分岐する第1のビームスプリッタと、波長によらず光を分岐する第2のビームスプリッタとを排他的に使用し、

前記出射光が第1の光路を伝播する場合は、前記第1のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離し、

前記出射光が第2の光路を伝播する場合において、前記光検出器で反射像を撮像するため、前記第2のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離することを特徴とする請求項6に記載の観察方法。

【請求項8】

50

前記出射光が第2の光路を伝播する場合において、前記第1のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離して、前記試料で発生する蛍光を前記光検出器で検出する請求項7に記載の観察方法。

【請求項9】

前記2次元アレイ光検出器の露光時間で前記光ビームを1回以上走査する低速スキャナーと、前記低速スキャナーよりも高速で前記光ビームを走査する高速スキャナーと、が設けられ、

前記出射光が前記光検出器に向かう場合において、前記試料上の所定の位置を観察するため、前記低速スキャナーで前記入射光を位置決めする請求項6、7、又は8に記載の観察方法。

10

【請求項10】

波長に応じて光を透過又は反射するエッジフィルタを光路中に挿入することによって、前記光ビームと前記出射光とを分離し、

前記光ビームの前記エッジフィルタに対する入射角度が 12° 以下である請求項6乃至9のいずれか1項に記載の観察方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、光学顕微鏡及び観察方法に関し、特に詳しくは、スペクトルを測定するための分光器を備える光学顕微鏡及び観察方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

ラマン分光測定は、試料が気体、液体、結晶、無定形固体であることを問わず、温度は高温でも低温でも可能であり、測定において、真空などの特殊な測定雰囲気が必要としないという利点を持つ。さらに、試料の前処理を特に必要とせず、試料をそのままの状態でも測定可能であるなどの長所があり、これらの長所を生かした測定が多くなされている。ラマン分光測定を利用することによって、分子を非染色で観測すること、及び半導体中の不純物を観測することができる。

【0003】

このようなラマン分光測定を行うため、分光器を用いたラマン顕微鏡が開示されている（特許文献1、特許文献2）。このラマン顕微鏡では、試料にレーザ光を集光して照射している。そして、試料からのラマン散乱光を分光器で分光することにより、ラマンスペクトルを測定することができる。さらに、これらのラマン顕微鏡では、試料を移動させて測定することにより、特定の波長におけるラマン散乱光強度の空間分布を測定することができる。また、測定時間を短縮するため、シリンドリカルレンズにより試料をライン状に照明して、CCDカメラにより検出するラマン顕微鏡も開示されている（非特許文献1）。このラマン顕微鏡では、ライン状に照明しているため一度に広い領域を照射することができ、測定時間を短縮することができる。しかしながら、シリンドリカルレンズを用いて光をライン状にした場合、均一に光を照射することが困難であり、周辺領域が暗くなってしまう。

30

40

【0004】

さらに、レーザ光を偏向させて、走査する光学顕微鏡が開示されている（特許文献3）。この文献では、X方向の走査装置、及びY方向の走査装置を設けている。そして、分光器に設けられたカメラの露光時間よりもY走査装置の走査周期を短くしている（段落0042）。これにより、カメラの1フレームでライン状の領域におけるラマンスペクトルを測定することができる。

【特許文献1】特開2002-14043号公報

【特許文献2】特開2003-344776号公報

【特許文献3】特開2007-179002号公報

【非特許文献1】CHARLENE A. DRUMM、他1名「Microscopic

50

Raman Line - Imaging With Principal Component Analysis」 APPLIED SPECTROSCOPY、1995年、49巻、第9号、p. 1331 - 1337

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記のように、特許文献3や非特許文献1では、ラマンスペクトルを測定するために、分光器を用いている。ところで、上記のようなラマン顕微鏡において、ラマンスペクトルの情報とともに、分光しない試料の情報を取得したいという要求がある。例えば、試料で反射した反射光によって試料を観察したいという要求がある。あるいは、試料で発生した蛍光を用いて観察を行いたいという要求がある。このような観察を行う場合、高速かつ高分解能で試料を撮像することが好ましい。

10

【0006】

しかしながら、上記のラマン顕微鏡では、分光器を通して反射光を分光器用カメラで撮像することになるため、以下に示す問題点がある。分光器用のカメラは、低雑音であることが要求されるため、読み出し速度が遅くなってしまう。すなわち、分光器用カメラでは、高速で撮像することが困難になってしまう。また、分光器を通すことで、収差が発生してしまう。特に、ツェルニターナ型の分光器では、凹面鏡を用いているため、収差が大きい。収差がある場合、反射光による画像がぼけてしまう。このような場合、高分解能での撮像することが困難になってしまう。上記のように、スペクトルを測定するための分光器を用いた光学顕微鏡では、試料を、高速かつ高分解能で撮像することができないという問題点がある。

20

【0007】

このように従来の光学顕微鏡では、スペクトルを測定するための分光器を用いた構成では、試料を高速かつ高分解能で撮像することが困難である問題点があった。

本発明は上述の問題点に鑑みてなされたものであり、スペクトルを測定するための分光器を用いた構成であっても、試料を高速かつ高分解能で撮像することができる光学顕微鏡、及び観察方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の第1の態様にかかる光学顕微鏡は、レーザ光源と、前記レーザ光源からの光ビームを偏向させて第1の方向に走査する第1の走査手段と、前記第1の走査手段により走査された光ビームを集光して試料に入射させる対物レンズと、前記第1の走査手段によって走査された光ビームと前記試料との相対位置を移動させて第2の方向に走査する第2の走査手段と、前記第1の走査手段から前記試料までの光路中に配置され、前記試料に入射された光ビームのうち前記試料から前記対物レンズ側に出射する出射光と前記レーザ光源から前記試料に入射する入射光とを分離する光分岐手段と、前記光分岐手段により分離された出射光が集光されて入射する入射側に前記第1の方向に対応する方向に沿って配置された入射スリットを有し、前記入射スリットを通過した前記出射光を波長に応じて空間的に分散させる分光器と、前記分光器で分散された出射光を検出する2次元アレイ光検出器と、前記試料と共役な位置に配置され、前記第1の方向に対応する方向に沿って配列された受光素子を有する光検出器と、前記光分岐手段で分離された出射光が、前記分光器に向かうか、前記光検出器に向かうかを切替える切替手段と、を備えるものである。これにより、分光器によってスペクトルを測定可能な構成であっても、コンフォーカル光学系を介しての試料を撮像することができる。また、分光器用の2次元アレイ光検出器と異なる光検出器によって試料を撮像している。よって、試料を高速かつ高分解能で撮像することができる。

30

40

【0009】

本発明の第2の態様にかかる光学顕微鏡は、上記の光学顕微鏡であって、前記光分岐手段が、波長に応じて光を分岐する第1のビームスプリッタと、波長に関わらず光を分岐す

50

る第2のビームスプリッタとを有し、前記第1のビームスプリッタと第2のビームスプリッタとが排他的に使用され、前記出射光が前記分光器に向かう場合は、前記第1のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離し、前記出射光が前記光検出器に向かう場合において、前記光検出器で前記試料の反射像を撮像するため、前記第2のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離することを特徴とするものである。これにより、簡便な構成で、出射光を光検出器又は2次元アレイ光検出器まで効率よく伝播させることができる。

【0010】

本発明の第3の態様にかかる光学顕微鏡は、上記の光学顕微鏡であって、前記第1のビームスプリッタを光路中に挿入した状態で、前記試料で発生する蛍光を前記光検出器で検出するものである。これにより、試料で発生した蛍光による蛍光像を撮像することができる。

10

【0011】

本発明の第4の態様にかかる光学顕微鏡は、上記の光学顕微鏡であって、前記第1の走査手段が、前記2次元アレイ光検出器の露光時間で前記光ビームを1回以上走査する低速スキャナーと、前記低速スキャナーよりも高速に前記光ビームを走査する高速スキャナーと、を備え、前記出射光が前記光検出器に向かう場合において、前記試料上の所定の位置を観察するため、前記低速スキャナーで前記入射光を位置決めするものである。これにより、正確に位置決めすることができ、所定の位置における試料の時間変化を観察することができる。

20

本発明の第5の態様にかかる光学顕微鏡は、上記の光学顕微鏡であって、前記光分岐手段が、波長に応じて光を透過又は反射するエッジフィルタを有しており、前記光ビームの前記エッジフィルタに対する入射角度が 12° 以下であるものである。これにより、出射光と入射光とを確実に分離することができる。

【0012】

本発明の第6の態様にかかる観察方法は、レーザ光源からの光ビームを偏向させて第1の方向に走査し、前記第1の方向に走査された光ビームを集光して試料に入射させ、前記第1の方向に走査された光ビームと前記試料との相対位置を移動させて第2の方向に走査し、前記試料に入射された光ビームのうち、前記試料から前記対物レンズ側に出射する出射光が、前記第1の方向にデスキャンされる前に、前記出射光と前記レーザ光源から前記試料に入射する入射光とを分離し、前記入射光から分離された出射光が第1の光路及び第2の光路の一方を伝播するように、光路を切換え、前記出射光が第1の光路を伝播する場合は、前記第1の方向に対応する方向に沿って配置された入射スリットに入射させ、前記入射スリットを通過した前記出射光を波長に応じて空間的に分散させ、前記分散された出射光を、前記入射スリットの方向及び前記出射光が分散される方向に沿って受光素子が配列された2次元アレイ光検出器によって検出して、スペクトルを測定し、前記出射光が第2の光路を伝播する場合は、前記試料と共役な位置に配置され、前記第1の方向に対応する方向に沿って設けられた受光素子を有する光検出器で検出する、ものである。これにより、分光器によってスペクトルを測定可能な構成であっても、コンフォーカル光学系を介しての試料を撮像することができる。また、分光器用の2次元アレイ光検出器と異なる光検出器によって試料を撮像している。よって、試料を高速かつ高分解能で撮像することができる。

30

40

【0013】

本発明の第7の態様にかかる観察方法は、上記の観察方法であって、前記入射光と出射光とを分離する時において、波長に応じて光を分岐する第1のビームスプリッタと、波長によらず光を分岐する第2のビームスプリッタとを排他的に使用し、前記出射光が第1の光路を伝播する場合は、前記第1のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離し、前記出射光が第2の光路を伝播する場合において、前記光検出器で反射像を撮像するため、前記第2のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離することを特徴とするものである。これにより、簡便な構成で、出射光を光検出器又は2次元アレイ光検出

50

器まで効率よく伝播させることができる。

【0014】

本発明の第8の態様にかかる観察方法は、上記の観察方法であって、前記出射光が第2の光路を伝播する場合において、前記第1のビームスプリッタで前記入射光と前記出射光とを分離して、前記試料で発生する蛍光を前記光検出器で検出するものである。これにより、試料で発生した蛍光による蛍光像を撮像することができる。

【0015】

本発明の第9の態様にかかる観察方法は、上記の観察方法であって、前記2次元アレイ光検出器の露光時間で前記光ビームを1回以上走査する低速スキャナーと、前記低速スキャナーよりも高速で前記光ビームを走査する高速スキャナーと、が設けられ、前記出射光が前記光検出器に向かう場合において、前記試料上の所定の位置を観察するため、前記低速スキャナーで前記入射光を位置決めするものである。これにより、正確に位置決めすることができる、所定の位置における試料の時間変化を観察することができる。

波長に応じて光を透過又は反射するエッジフィルタを光路中に挿入することによって、前記光ビームと前記出射光とを分離し、本発明の第10の態様にかかる観察方法は、上記の観察方法であって、前記光ビームの前記エッジフィルタに対する入射角度が 12° 以下であるものである。これにより、出射光と入射光とを確実に分離することができる。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、スペクトルを測定するための分光器を用いた構成であっても、試料を高速かつ高分解能で撮像することができる光学顕微鏡、及び観察方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下に、本発明を適用可能な実施の形態が説明される。以下の説明は、本発明の実施形態を説明するものであり、本発明が以下の実施形態に限定されるものではない。説明の明確化のため、以下の記載は、適宜、省略及び簡略化がなされている。又、当業者であれば、以下の実施形態の各要素を、本発明の範囲において容易に変更、追加、変換することが可能であろう。尚、各図において同一の符号を付されたものは同様の要素を示しており、適宜、説明が省略される。

【0018】

発明の実施の形態1 .

本発明の実施の形態にかかる光学顕微鏡について図1を用いて説明する。図1は本実施の形態にかかる光学顕微鏡100の光学系の構成を模式的に示す図である。光学顕微鏡100は、試料24を観察するための構成として、レーザ光源10と、ビームエキスパンダ11とレーザラインフィルタ12、Y走査装置40、リレーレンズ14、リレーレンズ15、リレーレンズ17、リレーレンズ18、エッジフィルタ19、X走査装置20、リレーレンズ21、チューブレンズ22、対物レンズ23、ハーフミラー25、結像レンズ26、切換えミラー27、分光器31、ラインCCDカメラ50、ステージ60と、を有している。

【0019】

光学顕微鏡100はラマン顕微鏡であり、レーザ光源10からの光ビームを試料24に入射させ、試料24からのラマン散乱光を分光器31で検出する。ラマン散乱光を分光器31で分光するため、ラマンスペクトルを測定することができる。さらに、光学顕微鏡100では、XY方向(水平方向)及びZ方向(鉛直方向)に走査することができるため、3次元のラマンスペクトルイメージを測定することができる。さらに、光学顕微鏡100は、コンフォーカル光学系を介して反射像を撮像するために、ラインCCDカメラ50が設けられている。すなわち、試料24を反射した反射光は、ラインコンフォーカル光学系を介して検出される。ラマン散乱光のスペクトル測定を行うための光学系と、反射像を撮像するための光学系とを切換えることができる。ラマン散乱光のスペクトル測定を行うた

めの光学系と、反射像を撮像するための光学系とは、一部の光路が共通しており、切換えミラー27によって、切換が行われる。

【0020】

光学顕微鏡100の全体構成について説明する。まず、ラマンスペクトルを測定するときの照明光学系について説明する。照明光学系では、レーザ光源10は、励起光となるレーザ光を出射する。レーザ光源10は、所定のレーザ波長の光を出射する。レーザ光源10は、例えば、赤色や緑色の単色光を出射する。レーザ光源10には、例えば、スペクトラフィジックス社製Millenniaを用いることができる。このレーザ光源10はレーザ波長532nm、線幅0.24nm、最大出力が10WのNd/YVO4レーザである。レーザ光源10はこのレーザ波長を有するレーザ光を出射する。

10

【0021】

レーザ光は、ビームエキスパンダ11で拡大される。すなわち、ビームエキスパンダ11は、レーザ光のスポットが所定の大きさとなるように、ビーム径を拡大する。この後、レーザ光は、レーザラインフィルタ12に入射する。レーザラインフィルタ12は、レーザ波長以外の光を遮光する。これにより、ノイズとなる迷光を低減することができる。そして、レーザ光は、レーザラインフィルタ12を通過して、高速スキャナ13に入射する。

【0022】

高速スキャナ13は、低速スキャナ16とともに、Y走査装置40を構成する。すなわち、Y走査装置40は、高速スキャナ13と低速スキャナ16とを含んでいる。Y走査装置40は、レーザ光をY方向に偏向して、走査する。Y走査装置40は、入射した光ビームの出射角を変化させて、光ビームを偏向させる。これにより、試料24上で光ビームの入射位置がY方向に沿って変化する。例えば、高速スキャナ13は、共振型ガルバノミラーであり、約8kHzでレーザ光を走査する。具体的には、ガルバノミラーの反射面の角度が変化することで、レーザ光の方向が変わる。低速スキャナ16は、サーボガルバノミラーであり、高速スキャナ13よりも低速で動作する。これにより、レーザ光が走査される。なお、高速スキャナ13、及び低速スキャナ16はレーザ光をY方向に走査する。なお、Y走査装置40の動作については後述する。

20

【0023】

高速スキャナ13と低速スキャナ16の間には、リレーレンズ14、15が設けられている。リレーレンズ14、15は、レーザ光を屈折して、像をリレーする。なお、リレーレンズ14とリレーレンズ15の間には、絞りが設けられていてもよい。低速スキャナ16で反射されたレーザ光は、リレーレンズ17、18に入射する。リレーレンズ17、18は、レーザ光を屈折して、像をリレーする。そして、リレーレンズ18からのレーザ光は、エッジフィルタ19に入射する。

30

【0024】

エッジフィルタ19は、波長に応じて光を反射又は透過する。すなわち、エッジフィルタ19は、波長に応じた透過率、及び反射率を有している。具体的には、エッジフィルタ19は、レーザ波長の光を反射して、レーザ波長よりも波長の長い光を透過する。これにより、効率よく、ラマン散乱光を測定することができる。すなわち、励起光となるレーザ光のほとんどは、エッジフィルタ19で反射して、試料24の方向に向かう。一方、レーザ光よりも長い波長を有するラマン散乱光のほとんどは、エッジフィルタ19を透過して、分光器31の方向に向かう。ここでは、Semrock社製のエッジフィルタ19を用いている。

40

【0025】

エッジフィルタ19で反射されたレーザ光は、X走査装置20に入射する。X走査装置20は、例えばサーボガルバノミラーであり、反射面の角度が変化することによって、光ビームを偏向させる。すなわち、光軸に対するX走査装置20の反射面の傾斜角度が変化するため、光ビームの出射角を変化させることができる。これにより、試料24上で光ビームの入射位置がX方向に沿って変化する。試料24上で、光ビームをX方向に走査する

50

ことができる。なお、X走査装置20での偏向角は、電気信号によって制御される。また、X方向とY方向とは互いに直交する方向であるため、X走査装置20及びY走査装置40によってXY方向に走査することにより、試料24上において2次元領域を走査することができる。

【0026】

そして、X走査装置20で反射されたレーザー光は、リレーレンズ21、チューブレンズ22で屈折され、対物レンズ23に入射する。対物レンズ23は、光ビームを集光して、試料24上を入射させる。すなわち、対物レンズ23は、試料24上に光ビームを集光して、試料24を照明する。これにより、試料24のスポット状の領域が照明される。対物レンズ23には、例えば、ニコン製アポクロマト NA 1.2 x 60を用いることができる。

10

【0027】

対物レンズ23は、レーザー光を集光して、試料24に入射させる。このとき、X走査装置20、及びY走査装置40によって、レーザー光がXY方向に走査されている。すなわち、試料24上におけるレーザー光の入射位置が、X走査装置20、及びY走査装置40の動作に応じて変化している。これにより、試料24上において2次元領域を走査することができる。

【0028】

対物レンズ23から試料24に入射した入射光は、試料24で反射される。また、試料24に入射した入射光の一部はラマン散乱される。試料24に入射した入射光のうち、対物レンズ23側に出射した光を出射光とする。すなわち、試料24から対物レンズ23側に向かう光を出射光と称する。この出射光には、レーザー波長と同じ波長のレイリー散乱光、及びレーザー波長と異なる波長のラマン散乱光が含まれている。さらに、試料24が蛍光物質を含む場合、出射光に蛍光が含まれている。

20

【0029】

ラマン散乱された出射光は、入射光と異なる波長となっている。すなわち、ラマンシフトによって出射光は入射光の振動数からずれて散乱される。この出射光のスペクトルがラマンスペクトルとなる。したがって、出射光のスペクトルを測定することにより、試料24中に含まれる物質の化学構造及び物理的状態を特定することができる。すなわち、ラマンスペクトルには、試料24を構成する物質の振動数の情報が含まれるため、出射光を分光器31で分光して検出することにより、試料24中の物質を特定することができる。そして、入射光の焦点位置をXYZ方向にスキャンして試料24の全面又は一部の領域からの出射光のスペクトルを測定することにより、ラマンスペクトルの3次元測定を行うことができる。測定したラマンスペクトルのうち、特定の波長に注目することにより、特定物質の3次元空間分布の測定も可能となる。具体的には、試料24を生体細胞とした場合、核酸や脂質の空間分布あるいはスクロースやポリスチレン球の空間分布を測定することができる。

30

【0030】

なお、試料24はステージ60の上に載置されている。ステージ60は、例えば、XYZステージである。このステージ60は可動ステージであり、試料24の任意の位置を照明することができる。また、ステージ60をZ方向に駆動することによって、対物レンズ23と試料24との距離を変化させることができる。従って、対物レンズ23の焦点位置を光軸方向に沿って変化させることができる。光学顕微鏡100は、後述するようにレーザーコンフォーカル顕微鏡を構成しているため、焦点位置を変化させることによって、Z方向の走査が可能となる。すなわち、Z方向にステージを移動させることによって、試料24の断層画像を撮像することができる。試料24の任意の高さからのラマン散乱光の検出ことができ、3次元のラマンスペクトルイメージの測定が可能になる。

40

【0031】

次に、試料24からの出射光を検出するための光学系について説明する。ステージ60上に載置された試料24からの出射光は、入射光と同じ光路上を伝播していく。すなわち

50

、対物レンズ23により屈折され、チューブレンズ22及びリレーレンズ21で屈折されて、X走査装置20に入射する。X走査装置20は、入射した出射光をエッジフィルタ19の方向に反射する。このとき、出射光は、X走査装置20によってデスキャンされる。すなわち、X走査装置20で反射されることによって、出射光は、レーザ光源10からX走査装置20に入射した入射光の進行方向と反対方向に伝播する。また、試料24からのレーリー散乱光もラマン散乱光と同じ光路で伝播していく。

【0032】

X走査装置20によって、反射された出射光は、エッジフィルタ19に入射する。エッジフィルタ19は、試料24からの出射光と、レーザ光源10から試料24に入射する入射光とを波長に基づいて分岐する。すなわち、エッジフィルタ19は、その反射面が入射光の光軸に対して傾いて設けられている。試料24からの出射光がエッジフィルタ19を透過することによって、試料24からの出射光の光軸が、レーザ光源10から試料24に入射する入射光の光軸と異なるものとなる。よって、試料24からの出射光を、レーザ光源10から試料24に入射する入射光から分離することができる。このように、エッジフィルタ19は、入射光と出射光とを分岐する光分岐手段を構成する。

【0033】

光分岐手段として用いるエッジフィルタ19は、波長に応じて光を透過又は反射する。エッジフィルタ19に対する光ビームの入射角度を小さくすることが好ましい。ここで、光ビームの入射角度は、光ビームの主光線とエッジフィルタ19の反射面の垂線との間の角度である。エッジフィルタ19の反射面に対するリレーレンズ18からの光ビームの入射角度を、例えば12°以下とすることが好ましく、さらに、入射角度を10°とすることがより好ましい。このように、エッジフィルタ19に対して垂直方向に近い方向から光ビームを入射させる。また、リレーレンズ18と光路が重ならないように入射角度を8°以上とすることが好ましいが、設計によっては、8°以下とすることも可能である。これにより、エッジフィルタ19の特性を向上させることができ、レーリー散乱光とラマン散乱光と確実に分離することができる。すなわち、エッジフィルタ19のレーリー散乱光に対する反射率及び、エッジフィルタ19のラマン散乱光に対する透過率を向上することができる。したがって、レーリー散乱光とラマン散乱光との波長の差に基づいて、レーリー散乱光とラマン散乱光とを確実に分離することができる。もちろん、本発明にかかる光学顕微鏡において、光ビームのエッジフィルタ19に対する入射角度は、上記の値に限定されるものではない。

【0034】

さらに、エッジフィルタ19は、レーザ波長の光を反射して、ラマン散乱光を透過するような、特性を有している。従って、試料24からのレーリー散乱光は、エッジフィルタ19で反射され、ラマン散乱光は、エッジフィルタ19を透過する。すなわち、エッジフィルタ19を用いることによって、レーリー散乱光とラマン散乱光との波長に差に基づいてレーリー散乱光を除去することができる。さらに、レーザ光源10からのレーザ光のほとんどはエッジフィルタ19で反射され、試料24に向かう。これにより、レーザ光のロスを低減することができ、効率よくラマン散乱光のみを検出することができる。なお、エッジフィルタ19の反射特性は、測定するスペクトルの範囲に応じて決定すればよい。ここで、エッジフィルタ19は、Y走査装置40から試料24までの間に配置されている。従って、エッジフィルタ19は、Y走査装置40によってデスキャンされる前の出射光と、レーザ光源10からの光ビームとを分離する。

【0035】

エッジフィルタ19を透過した出射光は、結像レンズ26に入射する。結像レンズ26は、試料24の像を入射スリット30またはラインCCDカメラ50上に結像する。さらに、結像レンズ26で屈折された出射光は、切換えミラー27で反射して、分光器31の入射側に設けられた入射スリット30に入射する。このとき、結像レンズ26は入射スリット30上に入射光を集光している。すなわち、結像レンズ26は、入射スリット30上に試料24照明された領域の拡大像を結像している。入射スリット30には、ライン状の

10

20

30

40

50

開口部が設けられている。この開口部は、Y方向に対応する方向に沿って設けられている。すなわち、入射スリット30の開口部は試料24上におけるY走査装置40の走査方向(Y方向)に対応する方向に沿って設けられている。

【0036】

結像レンズ26は出射光を屈折させて、入射スリット30上に結像する。ここで、試料24面上において入射光はスポット状に結像されているため、入射スリット30上において出射光はスポット状に集光される。入射スリット30の開口部の方向とY走査装置20の走査方向とを一致させる。出射光は、Y走査装置20によってデスクャンされずに、エッジフィルタ19に入射している。このため、Y走査装置20で走査すると、入射スリット30上で光ビームのスポット位置が入射スリット30のライン状の開口部の方向に移動する。試料24上でY方向に走査された光が入射スリット30の開口部に結像するように配置する。換言すると入射スリット30と試料24とは互いに共役な関係となるよう配置される。

10

【0037】

したがって、ラマン顕微鏡はコンフォーカル光学系として構成される。例えば、絞り(不図示)と試料24面上とが互いに共役な関係となるように配置され、試料24面上と入射スリット30とが互いに共役な関係となるように配置されている。絞りが設けられたXY平面及び試料24面上において、入射光がスポット状に集光される。そして、試料24から散乱して出射した出射光は入射スリット30上でスポット状に集光される。入射スリット30はY方向に沿った開口部を有しており、この開口部に入射した出射光のみを分光器31の二次元検出器に透過させる。レーザ光源10から試料24までの照明光学系及び試料24からアレイ光検出器36まで観察光学系をこのような結像光学系とすることにより、共焦点ラマン顕微鏡とすることができる。これにより、Z方向の分解能の高い測定を行うことができる。そして、ステージ60をZ方向に移動することにより、試料24の任意の高さからのラマン散乱光を他の高さからのラマン散乱光から分離して検出することができる。

20

【0038】

この入射スリット30を通過した出射光は、分光器31の本体に入射する。この分光器31について、図2を用いて説明する。図2は、分光器31の構成に示す図である。ここでは、ツェルニターナ型の分光器31を示している。分光器31には、入射スリット30、ミラー32、凹面鏡33、グレーティング34、凹面鏡35、及びアレイ光検出器36が設けられている。

30

【0039】

入射スリット30は、分光器31の入射側に配置されている。また、入射スリットは、Y方向に沿って配置されている。入射スリット30を通過して出射光は、ミラー32、凹面鏡33で反射され、グレーティング34に入射する。グレーティング34は、入射スリット30から入射した光をその波長に応じて空間的に分散させる。ここでは、グレーティング34として、反射型回折格子を用いている。そして、グレーティング34は、入射スリット30の方向と垂直な方向に、出射光を分散させる。そして、グレーティング34で分散した光は、凹面鏡35で反射されて、アレイ光検出器36に入射する。

40

【0040】

もちろん、上記以外の構成を有する分光器31を用いてもよい。出射光は分光器31によって入射スリット30の方向と垂直な方向に分散される。すなわち、分光器31は、入射スリット30のライン状の開口部と垂直な方向に出射光を波長分散する。分光器31により分光された出射光はアレイ光検出器36に入射する。アレイ光検出器36は受光素子がマトリクス状に配列されたエリアセンサである。具体的には、アレイ光検出器36は画素がアレイ状に配置されたCCDカメラなどの二次元アレイ光検出器である。

【0041】

アレイ光検出器36には、例えば、冷却CCDを用いることができる。具体的には、アレイ光検出器36として、プリンストン・インスツルメンツ社製1024×256画素の

50

電子冷却CCD(25)を用いることができる。また、アレイ光検出器36にイメージインテンシファイアを取り付けることも可能である。アレイ光検出器36の画素は、入射スリット30に対応する方向に沿って配置されている。したがって、アレイ光検出器36の画素の一方の配列方向は入射スリット30の方向と一致し、他方の配列方向は、分光器31の分散方向と一致する。アレイ光検出器36の入射スリット30の方向に対応する方向がY方向となり、入射スリット30と垂直な方向、すなわち、分光器31によって出射光が分散される方向がX方向となる。

【0042】

アレイ光検出器36は各画素で受光した出射光の光強度に応じた検出信号を処理装置71に出力する。処理装置71は、例えば、パーソナルコンピュータ(PC)などの情報処理装置であり、アレイ光検出器36からの検出信号をメモリなどに記憶していく。そして、検出結果に所定の処理を行い、モニターに表示する。さらに、処理装置71は、Y走査装置40及びX走査装置20の走査や、ステージ60の駆動を制御している。ここで、アレイ光検出器36のX方向は出射光の波長(振動数)に対応している。すなわち、X方向に配列されている画素列において、一端の画素は長波長(低振動数)の出射光を検出し、他端の画素は短波長(高振動数)の出射光を検出する。このように、アレイ光検出器36のX方向における光強度の分布はラマンスペクトルの分布を示すことになる。

【0043】

Y走査装置40による走査と、アレイ光検出器36の受光画素との関係について図3を用いて詳細に説明する。図3(a)は、入射スリット30の入射面における光ビームのスポット形状を模式的に示す図である。図3(b)は、アレイ光検出器36における受光面を模式的に示す図である。図3(a)に示すように、入射スリット30には、Y方向に沿って開口部30aが設けられている。開口部30aは、Y方向におけるアレイ光検出器36の受光面に対応した長さを有している。

【0044】

出射光は結像レンズ26によって入射スリット30に結像されているため、開口部30aには光ビームのスポット38が形成されている。ここで、Y走査装置40を駆動して、光ビームを走査すると、入射スリット30の入射面において、光ビームのスポット38が入射スリット30の開口部30aに沿って移動する。すなわち、入射スリット30に入射面における光ビームの入射位置がスポット38a、スポット38b、・・・、スポット38nと順次移動していく。

【0045】

図3(b)には、アレイ光検出器36の受光面に設けられた受光画素37が示されている。この受光画素37には、それぞれフォトダイオードなどの受光素子が形成されている。さらに、アレイ光検出器36がCCDカメラの場合、各画素には、電荷結合素子(CCD)が形成されている。受光画素37は、マトリクス状、すなわち、縦方向及び横方向に配列されている。例えば、横方向に1024画素、縦方向に256画素が設けられている。図3(b)に示すように、マトリクス状に配列された画素のうち最上列の受光画素37を受光画素37aとする。さらに、受光画素37aの隣、すなわち、上から2列目の受光画素37を受光画素37bとし、最下列の受光画素37を受光画素37nとする。

【0046】

ここで、図3(b)における縦方向(Y方向)が、入射スリット30の開口部30aに対応する方向となる。従って、光ビームがスポット38aに入射しているとき、出射光は、最上列の受光画素37aに入射する。このとき、出射光は、分光器31で分光されているので、最上列の受光画素37aの横方向は、出射光の波長()に対応する。すなわち、分光器31は、入射スリット30を通過した出射光を、入射スリット30の開口部30aと垂直な方向に分散させている。従って、最上列の受光画素37aの一端には、長波長の出射光が入射し、他端には、短波長の出射光が入射する。すなわち、最上列の各受光画素37aには、異なる波長の出射光が入射する。このように、2次元アレイ状に画素が配列されたアレイ光検出器36のY方向と直交する方向に、ラマン散乱光の分光情報を展開

10

20

30

40

50

することができる。

【0047】

Y走査装置40によって、入射光をY方向に走査し、入射スリット30の開口部30aを通過した光がアレイ光検出器36の上から2列目の受光画素37bに入射するようにする。このとき、入射スリット30における光ビームの入射位置は35bとなる。また、試料上における照明位置がY方向に走査される。さらに、入射スリット30を透過した出射光は、分光器31によって分光されているため、2列目の受光画素37bの横方向は、出射光の波長()に対応する。このように、アレイ状に配列された受光画素の縦方向は、Y走査装置40の走査方向に対応し、横方向はラマン散乱光の波長に対応している。

【0048】

ここで、アレイ光検出器36が1フレーム撮像する間に、光ビームをY方向に1回以上走査する。すなわち、Y走査装置40の走査周期を露光時間よりも短くして、アレイ光検出器36の1フレームの露光時間内で、Y方向に1回以上走査する。これにより、アレイ光検出器36の1フレームで、走査範囲に応じたライン状の領域のラマンスペクトルを測定することができる。すなわち、露光時間内に、Y走査装置40の走査領域の全体を走査させる。これにより、露光時間内に入射スリット30上で、光ビームの入射位置がスポット38aからスポット38nまで移動する。従って、試料24上において、開口部30aに対応する領域全体に対してラマン散乱光のスペクトル測定を行うことができる。すなわち、1フレームで、入射スリット30の開口部30aに対応する長さのライン状の領域を撮像することができる。試料24上の複数の点からのラマンスペクトルを1回の露光で測定することができる。従って、アレイ光検出器36のCCDにおける電荷の転送回数及びCCDからのデータの転送回数を減少し、測定時間を短縮することができる。よって、1フレームのデータ転送で複数の点のラマンスペクトルを測定することができる。各点毎にデータ転送等を行なう必要がなくなり、測定時間を短縮することができる。この場合、アレイ光検出器36の受光画素37がa~n列までであるため、試料24のn個の点でのラマンスペクトルを1回の露光で測定することができる。よって、測定時間を短縮することができる。よって、例えば、3次元の広い領域に対してラマンスペクトルを測定する場合でも、測定時間が長時間となるのを防ぐことができ、実用性を向上することができる。

【0049】

このように、2次元アレイ状に受光画素が配列されたアレイ光検出器36のY方向と直交する方向に、ラマン散乱光の分光情報を展開する。そして、試料24における直線状の領域の分光情報を1度取得する。従って、高速にラマンスペクトルを測定することができる。また、スポット光で照明しているため、均一に照明することができ、正確に測定を行うことができる。すなわち、スポット光で試料24を照明しているため、スペックルノイズを防ぐことができる。さらに、スポット光を走査しているため、試料24上の位置に応じた照明光輝度の変動を低減することができる。よって、正確な測定を短時間で行うことができる。

【0050】

このようにして、ライン状の領域のラマンスペクトルの測定を行うことができる。そして、上記の1フレームの撮像が終了したら、X走査装置20によってX方向に1照明領域分照明位置をずらす。そして、同様1フレームの撮像を行い、ライン状の領域のラマンスペクトルを測定する。これを繰り返し行なうことによって、試料24上の2次元の領域のラマンスペクトルを測定することができる。このとき、対物レンズの照明領域毎にラマンスペクトルを測定することができるため、2次元ラマンスペクトルイメージを測定することができる。すなわち、X走査装置20によってX方向に走査しているため、試料の各点におけるラマン分光測定が可能になる。すなわち、試料24上の2次元領域におけるラマンスペクトルを測定することができる。さらに、ステージ60をXY方向に移動することにより、より広い領域のラマンスペクトルを測定することができる。また、ステージ60をZ方向に駆動して、焦点位置を光軸に沿って移動させることによって、3次元測定が可能になる。すなわち、2次元領域のスペクトル測定が終了したら、焦点位置をZ方向にず

10

20

30

40

50

らして、同様に2次元領域のラマンスペクトル測定を行う。これにより、ラマンスペクトルの3次元測定が可能になる。このように、Y方向に走査することで、アレイ光検出器36の露光時間内では、光がライン状となる。すなわち、アレイ光検出器36の露光時間を考慮すると、試料24がライン状に照明されていることになる。そして、ラインコンフォーカル(スリットコンフォーカル)光学系を介して、ラマン散乱光を検出する。

【0051】

なお、露光時間における走査は整数回行うことが好ましい。すなわち、走査周期を露光時間の整数倍とすることが好ましい。ここで、1回の走査は、走査範囲の一端から他端までとする。例えば、露光時間内に、Y方向の走査をn回(nは自然数)往復させ、露光の開始時と終了時において、試料24上で照明光が入射する位置を同じにする。あるいは、アレイ光検出器36の露光とY走査装置40の走査とを同期させ、露光の開始と同時に走査範囲の一端から走査を開始して、走査範囲の他端又は一端となったら露光を終了するようにする。これにより、露光時間内において、ライン状の領域に照射される照明光の光量が均一になる。従って、アレイ光検出器36の縦方向の画素列のそれぞれに対応する照明領域における照明量が均一になり、より正確にラマンスペクトルを測定することができる。具体的には、1回の露光時間で100回以上走査を行う。さらに、1回の露光時間での走査回数を多くすることによって、光源の光強度の揺らぎによる影響を低減し、より均一に照明することができる。

【0052】

次に、反射光による反射像を撮像するための光学系について、図1を用いて説明する。反射像を撮像する場合、エッジフィルタ19を光路上から取り除く。そして、エッジフィルタ19が挿入されていた位置に、ハーフミラー25を挿入する。すなわち、エッジフィルタ19、及びハーフミラー25を挿脱可能に設けて、いずれか一方のみを光路中に挿入するようにする。エッジフィルタ19、及びハーフミラー25は排他的に使用される。レーザ波長と同じ波長の反射光を検出する場合、ハーフミラー25が使用され、ラマン散乱光を検出する場合、エッジフィルタ19が使用される。さらに、レーザ波長と同じ波長の反射光を検出する場合、切換えミラー27が光路上から取り除かれる。なお、これら以外の構成については、ラマン散乱光を検出する場合と同じであるため、説明を省略する。

【0053】

リレーレンズ18からのレーザ光は、ハーフミラー25に入射する。ハーフミラー25は、入射した光の一部を反射し、一部を透過する。ここでは、ハーフミラー25に入射したレーザ光の半分がX走査装置20の方向に反射される。そして、ラマン散乱光を検出する場合と同様に、レーザ光が試料24に入射する。そして、試料24からの出射光が同様に、X走査装置20でデスクャンされて、ハーフミラー25に入射する。ハーフミラー25は、出射光の半分を結像レンズ26の方向に透過する。なお、ハーフミラー25は、波長によらず、透過率及び反射率が一定である。このため、ラマン散乱光の一部もハーフミラー25を透過するが、ラマン散乱光は、反射光(レイリー散乱光)に比べて十分に弱いため、反射像の撮像には、問題ない。

【0054】

そして、ハーフミラー25を透過した出射光は、結像レンズ26で屈折される。ラインCCDカメラ50の方向に向かう。このとき、切換えミラー27が光路上から離脱している。このため、出射光が、分光器31の方向に反射されずに、ラインCCDカメラ50の方向に向かう。結像レンズ26が出射光をラインCCDカメラ50の受光面に結像している。ラインCCDカメラ50は、Y方向に対応する方向に沿って配列された受光画素を有している。

【0055】

さらに、Y走査装置40は、1フレーム撮像する間に、光ビームをY方向に1回以上走査する。すなわち、Y走査装置40の走査周期を露光時間よりも短くして、ラインCCDカメラ50の1フレームの露光時間内で、Y方向に1回以上走査する。これにより、ラインCCDカメラ50の1フレームで、走査範囲に応じたライン状の領域のラマンスペクト

10

20

30

40

50

ルを測定することができる。すなわち、露光時間内に、Y走査装置40の走査領域の全体を走査する。したがって、反射光はラインコンフォーカル(スリットコンフォーカル)光学系を介して検出される。上記の1フレームの撮像が終了したら、X走査装置20によってX方向に1照明領域分、照明位置をずらす。そして、同様に1フレームの撮像を行い、ライン状の領域の反射光を検出する。これを繰り返し行なうことによって、試料24上の2次元領域の反射像を撮像することができる。なお、ラインCCDカメラ50での検出信号は、処理装置71に出力される。そして、処理装置71で処理が行われて、反射像となる。

【0056】

ラインCCDカメラ50は、アレイ光検出器36よりも露光時間が短くなっている。よって、高速に反射像を撮像することができる。すなわち、撮像時間を短縮することができる。さらに、分光器31を介さずに、出射光がラインCCDカメラ50に入射する。よって、画像がぼけることがなくなり、高分解能での撮像が可能になる。よって、ラマンスペクトルを測定可能な光学顕微鏡100でも、高速、かつ高分解能で、反射像を撮像することができる。また、Y方向に高速に走査することで、ラインCCDカメラ50の露光時間内では、光がライン状となる。すなわち、ラインCCDカメラ50の露光時間を考慮すると、試料24がライン状に照明されていることになる。

【0057】

本実施の形態では、出射光の光路を切換える切換え手段として、切換えミラー27が設けられている。切換えミラー27は、出射光の光路中に挿脱可能に設けられている。切換えミラー27が光路中に挿入されることで、出射光が反射されて、分光器31の方向に向かう。一方、切換えミラー27が光路中から取り除かれると、出射光が切換えミラー27の挿入位置を直進して、ラインCCDカメラ50の方向に向かう。このように、切換えミラー27を挿脱することで、ラマンスペクトル測定か、反射像の撮像かを切換えることができる。もちろん、切換えミラー27を挿入時に、反射像を撮像してもよい。この場合、スペクトル測定時には、切換えミラー27が光路から取り除かれる。切換えミラー27を動作させることで、分光器31による測定か、ラインCCDカメラ50による測定かを選択することができる。入射光から分離された出射光が分光器31に向かう光路51又はラインCCDカメラ50に向かう光路52を伝播するように、切換えミラー27が光路を切換える。なお、光路を切換える切換え手段は、切換えミラー27に限られるものではない。

【0058】

次に、Y走査装置40について説明する。本実施の形態では、Y方向に走査するY走査装置40として、高速スキャナ13、及び低速スキャナ16の2つが設けられている。そして、用途に応じて、一方のスキャナを駆動する。例えば、分光器31でスペクトル測定を行う場合、高速スキャナ13を用いる。高速スキャナ13は、例えば、共振型ガルバノミラーであり、例えば、8kHzの周波数で動作する。

【0059】

低速スキャナ16は、サーボ型ガルバノミラーであり、高速スキャナ13よりも低い周波数で動作する。高速スキャナ13は低速スキャナ16よりも高速にレーザ光を走査する。なお、いずれか一方のスキャナで十分な場合は、一方のスキャナのみでY走査装置40を構成してもよい。

【0060】

例えば、ラマン散乱光を検出するラマンモードの場合、高速スキャナ13を固定して、低速スキャナ16を動作させる。すなわち、アレイ光検出器36の露光時間がラインCCDカメラ50の露光時間よりも長いために、低速スキャナ16による低速スキャンで十分となる。このとき、アレイ光検出器36と低速スキャナ16を同期させる。ラマンモードの場合、X走査装置20も動作させる。このとき、光路上からは、ハーフミラー25が取り除かれ、光路中にはエッジフィルタ19が挿入されている。また、切換えミラー27も光路中に挿入されている。これにより、分光器31で分光測定が可能になる。なお、ラマン

10

20

30

40

50

モードでは、高速スキャナ 13 を動作させて、低速スキャナ 16 を固定してもよい。

【0061】

一方、ライン CCD カメラ 50 の露光時間は、アレイ光検出器 36 の露光時間よりも短い。よって、レーザ光と同じ波長の反射光を検出する反射モードでは、高速スキャナ 13 を動作させて、低速スキャナ 16 を固定する。これにより、ライン CCD カメラ 50 の露光時間で、Y 方向に、レーザ光が 1 回以上走査される。反射モードの場合、X 走査装置 20 も動作させる。このとき、光路上からは、エッジフィルタ 19 が取り除かれ、光路中にはハーフミラー 25 が挿入されている。また、切換えミラー 27 が光路上から取り除かれている。これにより、ライン CCD カメラ 50 で反射光検出が可能になる。ライン CCD カメラ 50 は、アレイ光検出器 36 よりも露光時間が短いため、高速スキャナ 13 で走査

10

【0062】

また、試料 24 の特定位置を観察する場合、低速スキャナ 16 でレーザ光をその特定位置に照射する。そして、レーザ光の走査を停止して、照射位置をその位置で固定する。このとき、高速スキャナ 13 の動作は停止している。これにより、特定の位置での像の変化を観察することができる。このように、位置決め精度が必要な場合、低速スキャナ 16 のみを用いてレーザ光の照射位置を移動させる。すなわち、特定の位置を照明するため、低速スキャナ 16 で位置決めする。これにより、レーザ光の照射位置が特定の位置で固定される。一方、高速スキャナ 13 は、反射光の検出時に用いる。もちろん、1 つのスキャナで十分な場合は、1 つのスキャナのみで Y 方向に走査してもよい。このように、Y 方向に走査する走査手段として、低速スキャナ 16 と高速スキャナ 13 を設ける。そして、2 つのスキャナを用途に応じて使い分ける。

20

【0063】

さらに、この構成では、蛍光を検出することができる。蛍光を検出する蛍光モードの場合、高速スキャナ 13 を動作させて、低速スキャナ 16 を固定する。蛍光モードの場合、X 走査装置 20 も動作させる。このとき、光路上からは、ハーフミラー 25 が取り除かれ、光路中にはエッジフィルタ 19 が挿入されている。これにより、蛍光から励起光を分岐することができる。すなわち、レーザ波長と異なる波長の蛍光がエッジフィルタ 19 を通過し、レーザ光がエッジフィルタ 19 で反射される。また、切換えミラー 27 が光路上から取り除かれている。これにより、ライン CCD カメラ 50 で蛍光像を取得することが

30

【0064】

本実施の形態では、入射光を高速に走査して、試料 24 の XY 平面における任意のポイントのラマンスペクトルを測定している。このため、スペクトルの測定時間を短縮化することができる。すなわち、試料 24 の広い領域におけるラマンスペクトルの測定を短時間で行うことができる。よって、試料 24 の観察領域を広くした場合でも、長い測定時間が必要とならない。これにより、ラマンスペクトルの波長分解能を向上した場合や、より広い範囲のスペクトルを測定した場合でも、測定時間が長時間とならず、実用的な観察を行なうことができる。例えば、任意の波長（振動数）のラマン散乱光に着目した 2 次元像の観察や試料 24 の特定の点におけるラマンスペクトルの測定を高い分解能で行なうことができる。

40

【0065】

さらに、本実施の形態では、ラマン散乱光を集光するスリットコンフォーカル光学系として構成している。これにより、Z 方向の分解能を向上することができるため、ラマンスペクトルの 3 次元測定が可能になる。すなわち、対物レンズ 23 と試料 24 との距離を変化させ、試料 24 上の焦点位置を Z 方向に走査することができる。これにより、XYZ 方向の走査が可能となり、ラマンスペクトルを 3 次元空間分布の測定をすることができる。

50

換言すると、立体的な試料 24 の任意にポイントにおいて、ラマンスペクトルを測定することができる。このような、ラマンスペクトルの 3 次元空間分布を測定した場合でも、ライン状の領域を一度に測定することにより、測定時間を短縮することができる。よって、実用的な時間で測定を行うことができる。このように、上記の構成では、X Y Z - の 4 次元の測定を行うことができる。4 次元測定を行うことにより、様々なスペクトル解析を行なうことができる。そして、解析結果を処理装置のディスプレイに表示させることにより、より高度な分析が可能になる。

【0066】

さらに、反射光や蛍光を検出するための光学系をスリットコンフォーカル光学系としている。よって、ステージ 60 を Z 方向に移動させることで、任意の高さにおける反射像や蛍光像を取得することができる。これにより、断層画像を高速かつ高分解能で取得することができる。よって、3 次元観察を容易に行うことができる。

10

【0067】

なお、上記の説明では、アレイ光検出器 36、及びライン CCD カメラ 50 を CCD カメラとして説明したが、これらは CCD カメラに限られるものではない。すなわち、受光画素がマトリクス状に配列されている 2 次元光検出器を分光測定用に用いることができる。また、受光画素が 1 列に配列された 1 次元光検出器を反射光検出用に用いることができる。さらに、一定の露光時間だけ検出信号を積分して、出力する積分型の光検出器とする。

【0068】

20

さらに、ラマン散乱光とレーザ光を分岐するビームスプリッタは、エッジフィルタ 19 に限られるものではない。例えば、波長に応じて光を分岐するダイクロイックミラーをビームスプリッタとして用いてもよい。また、X 走査装置 20 はビームを偏向させるものに限られるものではなく、ステージ 60 を駆動するものでもよい。なお、Y 走査装置 40 の代わりにシリンダカルレンズなどを用いてスリットコンフォーカル光学系を構成してもよい。すなわち、光をライン状にする光変換手段を Y 走査装置 40 の代わりに用いる。そして、ライン状の光のスポットを試料 24 上に形成すれば、スリットコンフォーカル光学系を構成することができる。さらに、光分岐手段として、ハーフミラー 25 とエッジフィルタ 19 を排他的に用いることが好ましい。

【0069】

30

発明の実施の形態 2 .

本実施の形態にかかる光学顕微鏡 100 について、図 4 を用いて説明する。図 4 は、本実施形態にかかる光学顕微鏡の光学系を示す図である。本実施の形態では、高速スキャナ 13 と低速スキャナ 16 との間に、リレーレンズ 14、15 が設けられていない。これ以外の構成については、実施の形態 1 と同様であるため、重複する部分については説明を省略する。このような構成によって、実施の形態 1 と同様の効果を得ることができる。

【0070】

発明の実施の形態 3 .

本実施の形態にかかる光学顕微鏡 100 について、図 5 を用いて説明する。図 5 は、本実施形態にかかる光学顕微鏡の光学系を示す図である。本実施の形態では、低速スキャナ 16 がエッジフィルタ 19 と X 走査装置 20 との間に設けられている。すなわち、ハーフミラー 25 又はエッジフィルタ 19 からの入射光が低速スキャナ 16 に入射する。これ以外の構成については、実施の形態 4 と同様であるため説明を省略する。このような構成であっても実施の形態 1、2 と同様の効果を得ることができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図 1】本発明の実施の形態 1 にかかる光学顕微鏡の構成を示す図である。

【図 2】光学顕微鏡に用いられる分光器の構成を模式的に示す斜視図である。

【図 3】入射スリットの入射面における光ビームのスポット形状、並びに、アレイ光検出器の受光面を模式的に示す図である。

50

【図4】実施の形態2にかかる光学顕微鏡の構成を示す図である。

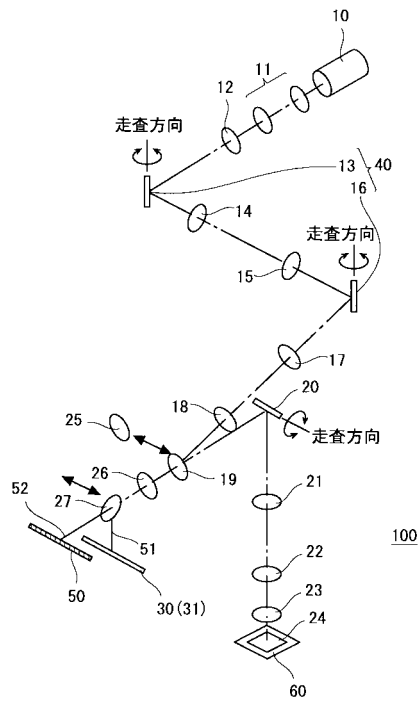
【図5】実施の形態3にかかる光学顕微鏡の構成を示す図である。

【符号の説明】

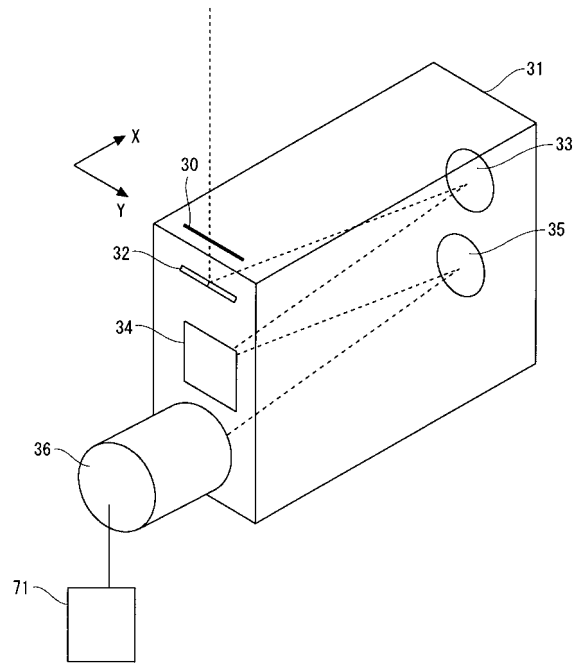
【0072】

10	レーザー光源	
11	ビームエキスパンダ	
12	レーザーラインフィルタ	
13	高速スキャナ	
14	リレーレンズ	
15	リレーレンズ	10
16	低速スキャナ	
17	リレーレンズ	
18	リレーレンズ	
19	エッジフィルタ	
20	X走査装置	
21	リレーレンズ	
22	チューブレンズ	
23	対物レンズ	
24	試料	
25	ハーフミラー	20
26	結像レンズ	
27	切換えミラー	
30	入射スリット	
31	分光器	
32	ミラー	
33	凹面鏡	
34	グレーティング	
35	凹面鏡	
36	2次元CCDカメラ	
37	受光画素	30
40	Y走査装置	
50	ラインCCDカメラ	
60	ステージ	
71	処理装置	

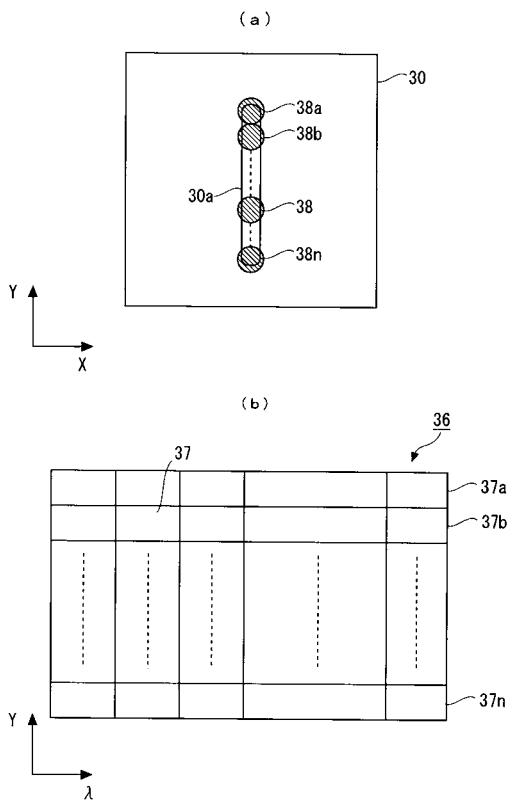
【 図 1 】



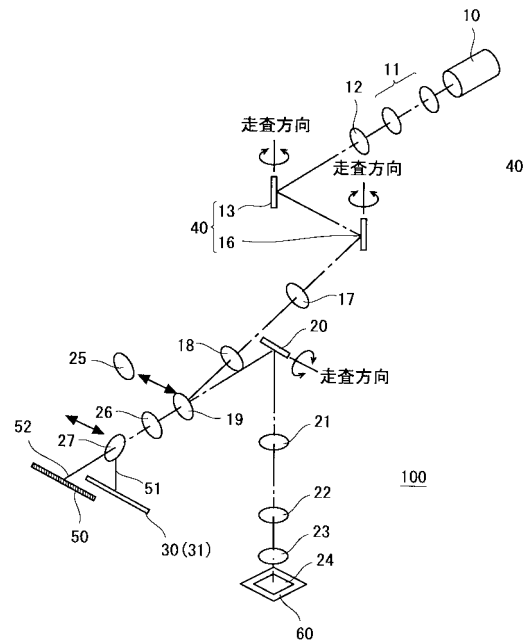
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 大出 孝博
大阪府吹田市山田丘2番1号 ナノフォトン株式会社内

審査官 横井 亜矢子

(56)参考文献 特開2006-003154(JP,A)
特開2007-179002(JP,A)
特開平04-138341(JP,A)
特開平06-265790(JP,A)
特開2006-064384(JP,A)
国際公開第2007/077710(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 21/00 - 21/01
G01N 21/17 - 21/74
G02B 21/00
G02B 21/06 - 21/36
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)