

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5039307号
(P5039307)

(45) 発行日 平成24年10月3日(2012.10.3)

(24) 登録日 平成24年7月13日(2012.7.13)

(51) Int.Cl.

F 1

G02B 21/06 (2006.01)

G02B 21/06

G02B 21/02 (2006.01)

G02B 21/02

Z

請求項の数 10 外国語出願 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2006-43796 (P2006-43796)
 (22) 出願日 平成18年2月21日 (2006.2.21)
 (65) 公開番号 特開2006-243723 (P2006-243723A)
 (43) 公開日 平成18年9月14日 (2006.9.14)
 審査請求日 平成21年1月6日 (2009.1.6)
 (31) 優先権主張番号 102005009832.0
 (32) 優先日 平成17年3月1日 (2005.3.1)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 500178876
 ライカ マイクロシステムス ツェーエム
 エス ゲーエムペーハー
 ドイツ連邦共和国 デー・35578 ヴ
 ェツラー エルンスト・ライツ・シュトラ
 ーゼ 17-37
 (74) 代理人 100091867
 弁理士 藤田 アキラ
 (72) 発明者 アルブレヒト ヴァイス
 ドイツ連邦共和国 デー・35440 リ
 ンデン シラーシュトラーセ 18
 (72) 発明者 ミヒヤエル ガンザー
 ドイツ連邦共和国 デー・35398 ギ
 ーセン フォンターネヴェーク 12a

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】対物レンズおよび顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料のエバネッセント照射用光源と、照射光(3)並びに検出光(14)が通り抜ける対物レンズ(1)と、及び、

前記対物レンズの瞳の付近または平面に設けられた絞り(13)であって、前記絞り(13)は、前記照射光(3)に対し不透過性であり、かつ前記検出光(14)に対し透過性である中央領域(15)と、前記照射光(3)に対し透過性である縁領域(16)とを有する、絞り(13)とを有する顕微鏡において、

前記絞り(13)の中央領域(15)と縁領域(16)が薄層の形状であること、及び

、照射フィルタ(6)が前記照射光(3)の照射ビーム路内に配置され、及び/又は、検出フィルタ(21)が前記検出光(14)の検出ビーム路内に配置され、前記照射フィルタ(6)は前記絞り(13)の前記縁領域(16)と同一のコーティングを有し、且つ、前記検出フィルタ(21)は前記絞り(13)の前記中央領域(15)と同一のコーティングを有することを特徴とする、顕微鏡。

【請求項 2】

前記絞り(13)の縁領域(16)は、前記検出光(14)に対し不透過性であることを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。

【請求項 3】

前記絞り(13)の中央領域(15)は、円形領域として構成され、前記縁領域(16)

)は、前記円形領域の周囲に直に延在する環状領域として構成されることを特徴とする請求項1または2に記載の顕微鏡。

【請求項4】

前記層(19、20)が光透過性基板(17)に取り付けられ、当該層(19、20)は前記基板(17)に蒸着されることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の顕微鏡。

【請求項5】

前記層(19、20)は、干渉層であることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の顕微鏡。

【請求項6】

ガラス面が、前記層(19、20)用の前記基板(17)として機能し、ガラススライドの面が、前記層(19、20)用の前記基板(17)として機能できるか、又は、レンズの面が、前記層(19、20)用の前記基板(17)として機能できることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載の顕微鏡。

【請求項7】

前記基板(17)は、前記層(19、20)を担持する側で平板化されるように構成されることを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の顕微鏡。

【請求項8】

前記層(19、20)は、前記試料から遠い方に面する前記基板(17)の側に形成されること、及び／又は、前記層(19、20)は、前記試料に面する前記基板(17)の側に形成されることを特徴とする請求項1～7のいずれか一項に記載の顕微鏡。

【請求項9】

前記照射フィルタ(6)が照射絞り(4)とビームスプリッタ(7)との間に、平行な照射光(3)の領域において配置されることを特徴とする請求項1～8のいずれか一項に記載の顕微鏡。

【請求項10】

前記検出フィルタ(21)は、前記ビームスプリッタ(7)と検出器との間に配置されることを特徴とする請求項1～9のいずれか一項に記載の顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、試料のエバネッセント照射のための対物レンズおよび光源を有する顕微鏡に関し、それによって照射光は、照射光のほか検出光も通る対物レンズによって対物レンズ瞳の平面に焦点を有する。

【背景技術】

【0002】

全内反射顕微鏡検査法の分野は、光学的に濃い媒体から光学的に薄い媒体への移行中の光の屈折挙動を利用する。したがって、たとえば、カバーガラス($n_1 = 1.518$)から水($n_2 = 1.33$)への移行は、 61° の臨界角(全反射の角度)を生じる。全反射の条件(角度 61°)下で、定常状態のエバネッセント波がより低い屈折率を有する媒体に形成される。この波の強度は、境界面からの距離と共に指數関数的に減少する。このため、境界面からさらに遠くに位置する蛍光体は、励起されない。背景の蛍光は、急激に減少する。像コントラストはこの過程で改良されると同時に、解像度は相当向上する。上述の現象を利用するための必要条件は、カバーガラスの屈折率と媒体の屈折率との間に十分に大きな差があることである。

【0003】

特許文献1は、試料のエバネッセント照射を必要とする顕微鏡を既に開示した。この顕微鏡は白色光源を備え、エバネッセント照射の目的のために、その光は、顕微鏡の対物レンズによってスリット絞りを介して試料スライドに結合される。照射光は、全内反射の結果として試料スライドにそれ自体を伝搬し、その過程では試料は試料スライドから投影す

10

20

30

40

50

るエバネッセント場の領域において照射されるだけである。この種の顕微鏡は、TIRFM（全内反射蛍光顕微鏡）という名称で周知である。

【0004】

TIRFMのz解像度は、エバネッセント場が約100nmのみで試料を投影するという事実のために良好である。

【0005】

特許文献2は、特にTIRF用途向けの大きな開口の対物レンズを開示している。この対物レンズは、正の屈折力を有する第1のレンズ、負の屈折力を有する第2のレンズからなり、それによって2つのレンズ間の焦点距離比は-0.4~-0.1の範囲内にあり、全体的な屈折力はゼロより大きい。さらに、対物レンズは2枚の正レンズを備え、その直径対焦点距離比は0.3より大きく、0.6より小さい。さらに、対物レンズは、負レンズおよび集光レンズを備え、それによって負レンズは第1のグループに面し、集光レンズの焦点距離対負レンズの焦点距離比は-0.5~-2にある。10

【0006】

特許文献3は、TIRF顕微鏡検査法に関する入射照射装置を開示している。この入射照射装置は、動作中、光軸に対してある角度で伝播する光線の偏光照射光束を放射する照射源と、光線の照射光束を偏向し、光軸に平行な対物レンズに結合する偏向素子と、を備える。この入射照射装置によって、照射源によって放射される光線の照射光束は位相差を有するs偏光方向およびp偏光方向を有し、偏向素子はx倍の光線の照射光束を反射し、 $x = (n \times 180^\circ - d) / 60^\circ$ であるように形成される。20

【0007】

特許文献4は、TIRM（全内反射顕微鏡検査法）用の顕微鏡を開示している。この顕微鏡は、筐体および対物レンズを有する。照射素子によって放射される照射光は、顕微鏡筐体の中に挿入可能なアダプタによって結ばれることができる。

【0008】

特許文献5は、エバネッセント照射と反射照射との間で簡単な切り替えが可能である光学照射系を備えた顕微鏡を開示している。照射系はレーザ光源を備え、その光は光ファイバの中に結合される。連結光学系もまた、ファイバから出射する光を顕微鏡対物レンズの後側焦点に集束するために設けられる。顕微鏡対物レンズの光軸に垂直な平面において、光ファイバを移動することができる。30

【0009】

特許文献6は、光を顕微鏡内に結合するための素子を開示している。レーザ光は、スライドとして構成される導光ファイバ結合器によって照射される場の絞りの平面にあるプレパラートに向かられる。この発明は、TIRF法に特によく適している。

【0010】

走査型顕微鏡検査法において、試料は、試料によって放射される検出光を反射光または蛍光光として観察することができるよう、光ビームを用いて照射される。光線の照射光束の焦点は、制御可能なビーム偏向器によって、一般に2枚のミラーを傾斜させることによって、試料の平面に移動され、それによって偏向軸は通常、互いに垂直に位置し、一方のミラーがx方向に偏向し、他方のミラーがy方向に偏向するようになっている。ミラーは、たとえば、ガルバノ測定作動要素を用いて傾斜される。物体から来る検出光の出力は、走査ビームの位置に応じて測定される。通常は、ミラーの実際の位置を確認するために、作動要素は、センサに装備される。特に共焦点走査型顕微鏡検査法において、物体は、光ビームの焦点を用いて3次元に走査される。40

【0011】

共焦点走査型顕微鏡は一般に、光源と、光源からの光をピンホール絞り、いわゆる励起絞りに集束する集束光学系と、ビームスプリッタと、ビームを制御するためのビーム偏向器と、顕微鏡光学系と、検出絞りと、検出光または蛍光光を検出するための検出器と、を備える。照射光は、ビームスプリッタによって結合される。ビーム偏向器によって物体から来る蛍光光または反射光がビームスプリッタに反射され、ビームスプリッタを通過して50

、続いて、検出器が後置される検出絞りへ集束される。この検出器装置は、デスキャン装置と呼ばれる。焦点領域に直接起因しない検出光は、異なる光路をとり、検出絞りを通過しない。その結果、光線の照射光束の焦点を用いた物体の連続走査の結果として、3次元像が生じるように、点情報が取得される。大半の場合には、3次元像は、層ごとの像データ取得によって得られる。

【0012】

最新技術から周知の系には欠点があり、TIRF照射光に結合するために、顕微鏡のビーム路にきわめて複雑で広い空間を占める光学系を必要とすることがある。このことは特に検出ビーム路に悪影響を及ぼし、検出光の出力の損失を生じることが多い。

【0013】

上述したように、これらは、試料がきわめて水平な角度で照射される場合、すなわち試料の面で全反射を生じるようにする場合の顕微鏡によるTIRF検査である。この目的のために、最新技術では、大きな照射開口を得るために、きわめて大きな開口の対物レンズを用いる。蛍光励起はレーザ光源を用いて行われ、それによってレーザは対物レンズの瞳の縁の点に規則的に結像される。同様に、蛍光励起用の気体放電灯を用いることも最新技術から周知である。この場合には、環状の絞りが照射ビーム路の開口平面に配置され、対物レンズの瞳の縁のみが照射されるようになっている。

【0014】

現在までTIRF顕微鏡検査法に関して実現された技術は欠点を伴っており、偏向ミラー、絞りなどのきわめて正確な調整が必要である。対物レンズ瞳に開口絞りに色収差なく結像するためには、きわめて十分に補正された照射光学系が必要とされる。したがって、外部蛍光照射およびレーザ装置を備えた極めて特殊な顕微鏡が、従来用いられている。

【0015】

【特許文献1】U.S. 2002/0097489 A1

【特許文献2】DE 10108796 A1

【特許文献3】DE 10217098 A1

【特許文献4】DE 10143481 A1

【特許文献5】U.S. 2004/0001253 A1

【特許文献6】DE 10229935 A1

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、照射光および検出光の従来のビーム路に用いることができる全反射顕微鏡検査法用の簡素な構成の対物レンズを有する顕微鏡を提案するという課題に基づいている。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明による顕微鏡は、請求項1の特徴によって、上記で概要を述べた課題を克服する。請求項1によれば、一般的な顕微鏡における対物レンズは、絞りが対物レンズ瞳の付近または平面に設けられることと、絞りは、照射光に対して不透過性であり、かつ検出光に対して透過性である中央領域と、照射光に対して透過性である縁領域とを有することとを特徴とする。本発明の顕微鏡によれば、対物レンズによる試料のエバネッセント照射は、特殊な構成、すなわち特殊な絞りが対物レンズ瞳の付近または平面に設けられるという設計という形で、容易に実現することができる事が認識されている。この絞りは、照射光に対して不透過性であり、かつ検出光に対して透過性である中央領域と、照射光に対して透過性である縁領域と、を有するように構築または構成される。言い換えれば、励起光は中央領域で遮断され、瞳の縁を通過できさえすれば、水平な角度で試料を透通する。中央領域は検出光に対して透過性であるために、試料から来る検出光、たとえば蛍光光は、全体的な対物レンズ開口によって検出されることができる。最も簡素な事例では、すなわち観察開口に何ら制限を加えることなく、縁領域は同様に、検出光に対して透過性であってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

観察開口の縮小が所望である場合には、縁領域が検出光、すなわち試料から来る蛍光光に対して不透過性であることが好都合である。この対策の結果として、対物レンズ開口または観察開口が縮小される。試料によって放射される蛍光光は、縁領域を通過することができず、したがって、縁領域で遮断される。

【 0 0 1 9 】

別の好都合な態様において、特に、対称な照射状態を実現するために、照射光を遮断する絞りの中央領域は、円形領域として構成される。同様に好都合な態様において、縁領域は、円形領域に直に隣接し、その周囲に環状領域として延在する。上述の詳細によれば、この環状領域は、検出光に対して透過性（全体的な対物レンズ開口）であってもよく、または不透過性（縮小した対物レンズ開口）であってもよい。10

【 0 0 2 0 】

特に簡素な構成の範囲内で、異なる透過性の絞り領域、すなわち中央領域および縁領域は、光透過性の基板に施される薄層として構成される。これらの層は、基板上に蒸着することができる。層は、リソグラフィック工程の広いアレイによって形成されることができる。

【 0 0 2 1 】

別の好都合な態様において、層は干渉層であり、その結果、波長に応じて光を作らせることができる。したがって、たとえば、層は、複数の蛍光励起が同時に行うことができるような多帯域干渉層であってもよい。そのような構成は、対物レンズを広く用いることができるることを意味する。20

【 0 0 2 2 】

具体的には、層用の基板として一般に機能するものとしてはガラス面が考えられる。本願明細書ではガラス面は、対物レンズに組み込まれたガラススライドの面であってもよい。同様に、レンズの面が層用の基板として機能するものとして考えられ、それによって層を有する側でレンズを平板化することができる。同様に、層を凸面に施すことが考えられ、その結果、匹敵する効果を得ることができる。

【 0 0 2 3 】

さらに、試料から遠い方に面する基板の側に、あるいは試料に面する基板の側に層を形成することが可能であり、それによって、層が対物レンズ瞳の平面の近くに配置されることを保証する必要がある。30

【 0 0 2 4 】

本発明による顕微鏡に関して、上述の課題は、請求項1の特徴によって克服される。請求項1によれば、特に試料のエバネッセント照射のために対物レンズおよび光源を備え、それによって照射光が対物レンズ瞳の平面に焦点を有する、一般的な顕微鏡は、絞りが対物レンズ瞳の付近または平面に設けられることと、絞りは、照射光に対して不透過性であり、かつ検出光に対して透過性である中央領域と、照射光に対して透過性である縁領域とを有することとを特徴とする。

【 0 0 2 5 】

このとき、本発明による顕微鏡はきわめて特殊な対物レンズ、すなわち請求項1に見られる特徴の組み合わせに対応する対物レンズを用いることを指摘すべきである。繰り返しを避けるために、対物レンズに関連する特徴に関して、本願明細書では個別に言及しない。本発明による顕微鏡の範囲内で、対物レンズの具体的な利用に関して、さらなる実施形態が好都合である。顕微鏡が照射ビーム路に照射フィルタまたは励起フィルタを有する限りにおいて、この照射フィルタは、絞りの縁領域または基板の縁領域と同一のコーティングを備えうる。このような態様で、照射フィルタの構成に応じて照射フィルタを通過する励起用の照射光のみが、試料のエバネッセント照射を達成する目的のために、対物レンズにおいて縁領域を通過することができる光である。したがって、照射フィルタおよび絞りの縁領域は、簡素な態様で互いに協働する。照射フィルタは、照射絞り（照射される場の絞り）および任意に光学系とビームスプリッタとの間に配置されることが有利であり、平4050

行に向けられる照射光の領域に配置されれば好ましい。

【0026】

同様に、検出フィルタは、検出器から上流の検出ビーム路に配置されることが好都合である。試料から反射され、対物レンズの絞りの中央領域を通過することができた放射光は、ビームスプリッタによってこのフィルタに達する。好都合な態様において、検出フィルタは、絞りの中央領域と、または基板の中央領域と同一のコーティングを有することから、このことは本願明細書では同様にうまく調整される。検出フィルタは、中でも望ましくないフレア光が検出器に達しないようにする。観察開口は、中央面領域のサイズのほか、検出光が通過することができない縁領域のサイズによって画定される。

【0027】

さらに、ビームスプリッタと検出器との間の任意の所望の場所で検出ビーム路に検出フィルタを配置することができることを指摘すべきである。

【0028】

本発明の教示を有利に構成し、改善するための種々の可能性がある。この目的のために、一方では請求項1に従属する請求項を、他方では図面を参照して本発明による教示の好ましい実施形態に関する以下の説明を、本願明細書では参照する。一般に好ましい実施形態および教示の改善例はまた、図面を参照して本発明による教示の好ましい実施形態に関する説明と関連して説明されてもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

図1が、同様に本発明による顕微鏡のビーム路2における本発明による対物レンズ1の実施形態を示しており、それによって本願明細書では、顕微鏡の個別の構成要素のみが示されている。

【0030】

照射光3は、レーザ光源(図示せず)から来て、照射絞り4を介して光を平行光線化する光学系5および照射フィルタ6を通過して、ビームスプリッタ7に達する。

【0031】

照射光3は、ビームスプリッタ7を介して、対物レンズ1通り光軸8に沿って誘導される。

【0032】

対物レンズ1は簡略した形で示され、対物レンズ筐体9に加えて、図示されているだけのフロントレンズ10のほか、別のレンズ11を備える。

【0033】

対物レンズ瞳の平面は、参考符号12によって表される矢印によって示される。ここで選択された実施形態において、絞り13が対物レンズ瞳の平面に設けられ、上記の絞り13は、照射光3に対して不透過性であり、かつ検出光14に対して透過性である中央領域15と、照射光3に対して透過性である縁領域16とを有する。

【0034】

試料(図示せず)によって放射される蛍光光は、フロントレンズ10および他のレンズ11によって光軸8に沿って通過され、その平面18が蒸着層19、20用の基板として機能するガラス本体17を通過する。これらの層19、20は、最終的には絞り13を形成し、それによって放射された光、すなわち検出光14が、中央領域15およびそこに蒸着された層19を通過し、対物レンズ1から射出し、ビームスプリッタ7へ進み、ビームスプリッタ7を通過して、検出フィルタ21を通過することができる。検出フィルタ21から、検出光14は検出器(図示せず)に達する。

【0035】

さらに、照射フィルタ6および検出フィルタ21が対物レンズ1におけるガラス本体17に蒸着された層と同一の層でコーティングされることが図1から分かる。したがって、照射フィルタ6は、ガラス本体17の縁領域16に蒸着された層と同一の蒸着層20を有する。

10

20

30

40

50

【0036】

検出フィルタ21は、ガラス本体17の中央領域15に蒸着された層と同一の蒸着層19を有する。繰り返しを避けるために、図1から学ぶことができない他の特徴および利点に関しては、本願明細書では説明の一般的な部分を参照されたい。

【0037】

最後に上記で説明した実施形態は、請求された教示をあくまでも記載するために機能するものであり、請求された教示はこの実施形態に制限されるものとして解釈すべきではないことを明確に言及するものとする。

【図面の簡単な説明】**【0038】**

10

【図1】本発明によれば、同様に顕微鏡のビーム路における本発明による対物レンズの実施形態の概略図である。

【符号の説明】**【0039】**

1 対物レンズ

2 ビーム路

3 照射光

4 照射絞り

5 光学系

6 照射フィルタ

20

7 ビームスプリッタ

8 光軸

9 対物レンズ筐体

10 フロントレンズ

11 別のレンズ

12 対物レンズ瞳の平面

13 絞り

14 検出光

15 中央領域

16 縁領域

30

17 ガラス本体

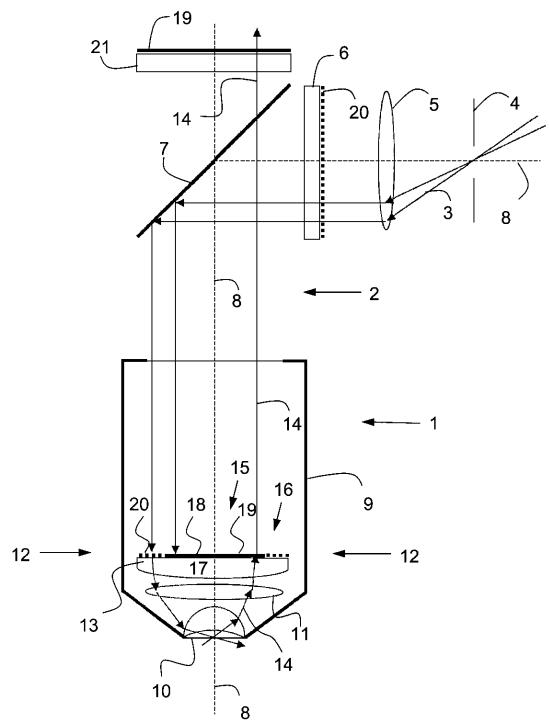
18 平面

19 蒸着層

20 蒸着層

21 検出フィルタ

【図1】



フロントページの続き

審査官 森内 正明

(56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0174523(US,A1)
特開2002-236258(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 02 B 21/00 - 21/36