

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4608043号
(P4608043)

(45) 発行日 平成23年1月5日(2011.1.5)

(24) 登録日 平成22年10月15日(2010.10.15)

(51) Int.Cl.

F I

GO2B 7/28 (2006.01)

GO2B 7/11 J

GO2B 21/36 (2006.01)

GO2B 21/36

請求項の数 4 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願平11-270297	(73) 特許権者	000000376
(22) 出願日	平成11年9月24日(1999.9.24)		オリンパス株式会社
(65) 公開番号	特開2001-91822(P2001-91822A)		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(43) 公開日	平成13年4月6日(2001.4.6)	(74) 代理人	100084618
審査請求日	平成18年9月14日(2006.9.14)		弁理士 村松 貞男
		(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	青野 寧
			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	登丸 久寿
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】顕微鏡用焦点検出装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対物レンズを通して特定の波長の励起光を標本に照射し、発生した励起光より長い特定の波長の蛍光を対物レンズで集めて蛍光観察像を形成する落射蛍光観察手段と、

前記対物レンズと対向する側から前記標本を照射する透過照明手段と、

前記透過照明手段が照射する照明光によって前記標本の微分干渉観察像または位相差観察像を形成する微分干渉観察手段または位相差観察手段と、

前記透過照明手段の中であって、前記蛍光より長い特定の波長の光を透過する分光透過特性を有する特定波長透過手段と、

前記蛍光もしくは前記特定波長透過手段を透過した光のうち、いずれか一方を透過し、他方を反射する分光透過特性を有する波長分離手段と、

前記波長分離手段により分離された光の短波長側に配され、前記標本の蛍光観察像を撮像する撮像手段と、

前記波長分離手段により分離された光の長波長側に配され、前記標本の微分干渉観察像または位相差観察像を受光し、一定のレンジに適合する光量の蓄積を行う受光手段と、

前記受光手段の出力信号に対する合焦度評価値に基づいて前記標本の微分干渉観察像または位相差観察像の焦点状態を検出する焦点検出手段と、

前記焦点検出手段の合焦度に応じて前記対物レンズ側もしくは前記標本側の少なくとも一方を駆動して合焦点サーチを行うサーボ手段と、

前記受光手段、前記焦点検出手段、及び前記サーボ手段を統括制御する制御手段と、

10

20

を具備したことを特徴とする顕微鏡用焦点検出装置。

【請求項 2】

前記落射蛍光観察手段の中であって、前記励起光の波長を切換える切換手段と、
観察光の波長に基づく前記撮像手段に対する前記受光手段の結像位置誤差を補正する光路長補正手段と、

前記励起光によって発生する蛍光の波長データに基づいて前記光路長補正手段を駆動する駆動手段と、

を具備したことを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡用焦点検出装置。

【請求項 3】

前記駆動手段とは別に構成され、前記蛍光の波長データとは無関係に前記撮像手段に対する結像位置を任意のオフセット量だけ移動するオフセット手段を具備したことを特徴とする請求項 2 に記載の顕微鏡用焦点検出装置。

10

【請求項 4】

前記落射蛍光観察手段の光路中で開閉可能な遮蔽手段を有し、前記制御手段は、前記焦点検出手段によって前記標本に対する焦点状態を合焦と判断した状態で前記遮蔽手段を開放し、前記励起光を前記標本に照射させることを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡用焦点検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

20

本発明は、顕微鏡に用いられる焦点検出装置に関し、特に落射蛍光顕微鏡に用いられる顕微鏡用焦点検出装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来より、対物レンズによる標本の観察像を TV 画面により観察したり、写真撮影したりする顕微鏡装置において、対物レンズの焦点を検出し、TV カメラや写真フィルム等の撮像面上に合焦させるためのオートフォーカス装置は重要なアプリケーションの一つである。

【0003】

最近では、生体組織や生物細胞を蛍光試薬で染色し、試薬を励起することで発生する蛍光を観察する落射蛍光顕微鏡が普及し、この落射蛍光顕微鏡にマッチングしたオートフォーカス装置が求められている。

30

【0004】

特開平 9 - 189849 号公報は、このような蛍光観察に対応したオートフォーカス装置を開示したものであり、写真システム等と焦点検出装置の各々の結像光学系において生じる色収差に基づく同焦差を、蛍光の波長に基づいて補正する方法が開示されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

一方で、落射蛍光観察に用いるオートフォーカス装置における問題として、観察される蛍光波長の絶対光量が小さいため、焦点検出に用いられる受光素子のレンジに適合するための入射光の蓄積時間が多く必要であり、すなわちオートフォーカスの処理時間が長いという問題がある。

40

【0006】

この問題は、観察の効率が悪いだけでなく、オートフォーカスの処理動作中は落射照明による励起光が継続的に標本に照射され、標本の不要な褪色を余儀無くされると、蛍光観察において致命的な問題を抱えている。

【0007】

本発明は、上記のような課題を解決するためなされたもので、落射蛍光観察におけるオートフォーカスの効率が向上する顕微鏡用焦点検出装置を提供することを目的とする。

【0008】

50

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するため、請求項 1 に対応する発明は、対物レンズを通して特定の波長の励起光を標本に照射し、発生した励起光より長い特定の波長の蛍光を対物レンズで集めて蛍光観察像を形成する落射蛍光観察手段と、

前記対物レンズと対向する側から前記標本を照射する透過照明手段と、

前記透過照明手段が照射する照明光によって前記標本の微分干渉観察像または位相差観察像を形成する微分干渉観察手段または位相差観察手段と、

前記透過照明手段の中であって、前記蛍光より長い特定の波長の光を透過する分光透過特性を有する特定波長透過手段と、

前記蛍光もしくは前記特定波長透過手段を透過した光のうち、いずれか一方を透過し、他方を反射する分光透過特性を有する波長分離手段と、

前記波長分離手段により分離された光の短波長側に配され、前記標本の蛍光観察像を撮像する撮像手段と、

前記波長分離手段により分離された光の長波長側に配され、前記標本の微分干渉観察像または位相差観察像を受光し、一定のレンジに適合する光量の蓄積を行う受光手段と、

前記受光手段の出力信号に対する合焦度評価値に基づいて前記標本の微分干渉観察像または位相差観察像の焦点状態を検出する焦点検出手段と、

前記焦点検出手段の合焦度に応じて前記対物レンズ側もしくは前記標本側の少なくとも一方を駆動して合焦点サーチを行うサーボ手段と、

前記受光手段、前記焦点検出手段、及び前記サーボ手段を統括制御する制御手段と、を具備した顕微鏡用焦点検出装置である。

【0009】

請求項 1 に対応する発明によれば、次のような作用効果が得られる。すなわち、焦点検出手段による焦点検出は、受光手段に投影される透過照明観察光像に基づいて行われるので、この透過照明光量を大きくすることにより、一定のレンジに適合するための前記受光手段による透過照明観察光像の蓄積時間を短くすることができる。従って、光量の小さい蛍光観察においても、制御手段による合焦に要する時間を短くすることができる。また、落射照明により発した蛍光は、波長分離手段の長波長側に分割されることなく、前記波長分離手段の短波長側に配された撮像手段に効率良く導入される。この結果、合焦に要する時間が短く、且つ蛍光観察の効率の高い顕微鏡用焦点検出装置とすることができる。

【0010】

前記目的を達成するため、請求項 2 に対応する発明は、前記落射蛍光観察手段の中であって、前記励起光の波長を切換える切換手段と、観察光の波長に基づく前記撮像手段に対する前記受光手段の結像位置誤差を補正する光路長補正手段と、前記励起光によって発生する蛍光の波長データに基づいて前記光路長補正手段を駆動する駆動手段とを具備した請求項 1 に記載の顕微鏡用焦点検出装置である。

【0011】

請求項 2 に対応する発明によれば、次のような作用効果が得られる。すなわち、請求項 1 に記載の発明による効果に加え、励起光によって発生する蛍光の波長データに基づいて光路長補正手段を駆動することにより、蛍光の波長に基づく前記撮像手段に対する前記受光手段の結像位置誤差を補正することができるので、蛍光の波長によらず前記撮像手段に対する合焦の精度を確保した顕微鏡用焦点検出装置とすることができる。

【0012】

前記目的を達成するため、請求項 3 に対応する発明は、前記駆動手段とは別に構成され、前記蛍光の波長データとは無関係に前記撮像手段に対する結像位置を任意のオフセット量だけ移動するオフセット手段を具備したことを特徴とする請求項 2 に記載の顕微鏡用焦点検出装置である。

【0013】

請求項 3 に対応する発明によれば、次のような作用効果が得られる。すなわち、請求項 2 に記載の発明による効果に加え、前記撮像手段に対する観察像の合焦位置を、前記制御

手段による合焦結果に対して定常的に略一定量オフセットすることができるので、例えば標本の厚みが大きい場合において、前記受光手段に検出される部分に対して撮像したい部分の厚み方向の位置の差が大きい場合でも、撮像したい部分が撮像光路において結像する位置を前記撮像手段上にマニュアル動作で合わせ込むことで、前記制御手段による合焦により定常的に撮像したい部分を合焦とすることが可能となる等、観察者の要求に柔軟に対応した顕微鏡用焦点検出装置とすることができる。

前記目的を達成するため、請求項 4 に対応する発明は、前記落射蛍光観察手段の光路中で開閉可能な遮蔽手段を有し、前記制御手段は、前記焦点検出手段によって前記標本に対する焦点状態を合焦と判断した状態で前記遮蔽手段を開放し、前記励起光を前記標本に照射させることを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡用焦点検出装置である。

10

請求項 4 に対応する発明によれば、蛍光観察には不要なオートフォーカス動作時の励起光を遮断し、標本の不要な褪色を防止することができる。

【 0 0 1 4 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態につき図面を参照して説明する。

【 0 0 1 5 】

< 第 1 の実施の形態 >

図 1 は、本発明の第 1 の実施の形態を示した構成図であり、本実施形態は、概略以下のように構成されている。すなわち、対物レンズ 11 を通して特定の波長の励起光を標本 3 に照射し、発生した励起光より長い特定の波長の蛍光を対物レンズで集める例えば光源 14、コレクタレンズ 15、励起フィルタ 17、ダイクロイックミラー 18、吸収フィルタ 19、対物レンズ 11 からなる落射蛍光観察手段と、対物レンズ 11 と対向する側から標本 3 を照射する例えば光源 4、コレクタレンズ 5、コンデンサレンズ 10 からなる透過照明手段と、該透過照明手段の中であって、該蛍光より長い特定の波長の光を透過する分光透過特性を有する例えばバンドパスフィルタ 7 からなる特定波長透過手段と、該蛍光もしくは該特定波長透過手段を透過した光のうち、いずれか一方を透過し、もう一方を反射するような分光透過特性を有する例えばダイクロイックミラー 23 からなる波長分離手段と、該波長分離手段により分離された短波長側に配され、標本 3 の観察光像を撮像する例えばテレビカメラ（撮像面 24）からなる撮像手段と、該波長分離手段により分離された長波長側に配され、標本 3 の観察光像を受光し、一定のレンジに適合するまで観察光像の蓄積を行う例えばイメージセンサ 26 からなる受光手段と、該受光手段の出力信号に対する合焦度評価値に基づいて標本 3 の観察光像の焦点状態を検出する例えばアナログ信号処理回路 27、評価関数演算器 28、CPU 29 からなる焦点検出手段と、該焦点検出手段の合焦度に応じて標本 3 を駆動して合焦点サーチを行う CPU 29 とステージ駆動装置 30 からなるサーボ手段と、該受光手段、該焦点検出手段、及び該サーボ手段を統括制御する例えば CPU 29 からなる制御手段とを具備したものである。

20

30

【 0 0 1 6 】

以下これについて詳細に説明する。図において、1 は顕微鏡本体で、この顕微鏡本体 1 には、ステージ 2 を設けている。このステージ 2 は、標本 3 を載置すると共に、光軸に対して平行方向に移動可能にしている。

40

【 0 0 1 7 】

ステージ 2 の下方には、透過微分干渉観察のための照明光学系が構成されている。具体的には、光源 4 から出射された光は、コレクタレンズ 5 により進められ、全反射ミラー 6 で標本 3 の方向に反射し、バンドパスフィルタ 7 で特定の波長のみ透過し、ポラライザ 8 に入射する。尚、バンドパスフィルタ 7 の分光透過率特性については後述する。

【 0 0 1 8 】

そしてポラライザ 8 から出射した直線偏光は、ウォラストンプリズム（複屈折素子）9 を通過して互いに直交する方向に振動する二つの直線偏光に分かれ、これらはコンデンサレンズ 10 で集光され、ウォラストンプリズム 9 に固有の横ずれ量（シア量）を持って標本 3 を透過する。

50

【 0 0 1 9 】

そして、これら二つの直線偏光は、対物レンズ 1 1 を透過し、第 2 のウォラストンプリズム 1 2 と後述するアナライザ 2 5 によって干渉し、それら二つの波面による干渉像は、標本 3 の位相変化を微分したものが、明暗のコントラストの差として、結像レンズ 1 3 を介して観察され得る。

【 0 0 2 0 】

一方、ステージ 2 の上方には、落射蛍光観察のための照明光学系が構成されている。具体的には、光源 1 4 から出射された光は、コレクタレンズ 1 5 により進められ、シャッタ 1 6 の開放時のみ通過し、励起フィルタ 1 7 によって標本 3 を励起するのに必要な波長のみが透過し、ダイクロイックミラー 1 8 によって反射し、ウォラストンプリズム 1 2 を通り対物レンズ 1 1 によって標本 3 に照射される。

10

【 0 0 2 1 】

これにより標本 3 の蛍光色素に染色されている部分が励起され、励起光より長い波長の蛍光を発する。発した蛍光は対物レンズ 1 1 で集められ、ウォラストンプリズム 1 2 を通りダイクロイックミラー 1 8 を透過する。ダイクロイックミラー 1 8 を透過した蛍光像は、特定される波長領域より長い波長の蛍光のみを透過する吸収フィルタ 1 9 を透過した後、結像レンズ 1 3 を介して観察される。ここで、前記の励起フィルタ 1 7、ダイクロイックミラー 1 8、吸収フィルタ 1 9 の分光透過率特性は、後述するように、従来の落射蛍光顕微鏡と同様一般的なものである。

【 0 0 2 2 】

また、前記落射蛍光観察のための照明光学系の上方には、標本 3 の像を目視観察するための観察光学系、及び TV カメラや写真フィルム等で撮像するための撮像光学系、及び標本 3 に対する対物レンズ 1 1 の焦点を検出するための焦点検出光学系が構成されている。

20

【 0 0 2 3 】

具体的には、結像レンズ 1 3 を通過した後、光路分割プリズム 2 0 によって反射した光は、後述するような分光透過率特性を持つローパスフィルタ 2 1 及び接眼レンズ 2 2 を介して観察される。

【 0 0 2 4 】

一方、結像レンズ 1 3 を通過した後、光路分割プリズム 2 0 を透過した光は、後述するような分光透過率特性を持つ第 2 のダイクロイックミラー 2 3 によって、特定される波長領域より短い波長の光が反射し、前記波長領域より長い波長の光が透過する。この第 2 のダイクロイックミラー 2 3 を反射した光は、後述するような前記ローパスフィルタ 2 1 と略同一な分光透過率特性を持つローパスフィルタ 2 1 ' を介して、結像レンズ 1 3 の焦点位置に配置された TV カメラや写真フィルム等の撮像面 2 4 上に結像される。

30

【 0 0 2 5 】

他方、前記第 2 のダイクロイックミラー 2 3 を透過した光は、アナライザ 2 5 及びバンドパスフィルタ 7 と略同一な分光透過率特性を持つバンドパスフィルタ 7 ' を介して、撮像面 2 4 と光学的に共役な位置に配置されたイメージセンサ 2 6 上に結像される。

【 0 0 2 6 】

図 2 は、この第 1 の実施の形態の構成における、バンドパスフィルタ 7、励起フィルタ 1 7、ダイクロイックミラー 1 8、吸収フィルタ 1 9、ローパスフィルタ 2 1、第 2 のダイクロイックミラー 2 3、ローパスフィルタ 2 1 ' 及びバンドパスフィルタ 7 ' の分光透過率特性を示す図である。

40

【 0 0 2 7 】

なお、前述したように、励起フィルタ 1 7、ダイクロイックミラー 1 8、吸収フィルタ 1 9 の分光透過率特性は、従来の落射蛍光顕微鏡と同様一般的なものであり、またバンドパスフィルタ 7 ' はバンドパスフィルタ 7 と略同一な分光透過率特性を持っており、ローパスフィルタ 2 1 ' はローパスフィルタ 2 1 と略同一な分光透過率特性を持っている。

【 0 0 2 8 】

ここで、図 2 に示すように、第 2 のダイクロイックミラー 2 3 の分光透過率が立ち上がる

50

波長領域Uは、励起フィルタ17を透過した励起光によって励起された蛍光波長の波長領域Fと重なり合わない長波長側にあり、且つバンドパスフィルタ7及び7'の分光透過率特性のピークより短波長側にある。

【0029】

また、ローパスフィルタ21及び21'の分光透過率が立ち下がる波長領域Dは、励起フィルタ17を透過した励起光によって励起された蛍光波長の強度分布のピークより長波長側にあり、且つバンドパスフィルタ7及び7'の透過波長領域Bと重なり合わない短波長側にある。即ち、透過微分干渉の光線は、バンドパスフィルタ7の透過波長領域Bの照明光のみが標本3を透過して対物レンズ11を透過し、ダイクロイックミラー18、吸収フィルタ19、第2のダイクロイックミラー23、及びバンドパスフィルタ7'を透過して

10

【0030】

こ時、第2のダイクロイックミラー23により僅かに反射した光は、ローパスフィルタ21'によってカットされるので、撮像面24に入射することはない。一方、落射照明により励起された蛍光は、ダイクロイックミラー18、吸収フィルタ19を透過した後、第2のダイクロイックミラー23で反射し、ローパスフィルタ21'を透過して撮像面24に入射する。従って、微分干渉像はイメージセンサ26の焦点検出光学系側へ、蛍光像は撮像面24の撮像光学系側へ、完全に分離される。

【0031】

また、光路分割プリズム20で反射して観察光学系に導入された観察光は、ローパスフィルタ21により透過微分干渉光が遮断され、蛍光のみが接眼レンズ22へ導かれる。

20

【0032】

次に、第1の実施の形態における電気信号の接続及び処理の形態について、図1に基づいて説明する。イメージセンサ26は、投影された光像の入射光量と蓄積時間に応じた電圧に相当するアナログ信号を出力するようにしている。

【0033】

また、イメージセンサ26には、アナログ信号処理回路27を接続し、このアナログ信号処理回路27に評価関数演算器28を接続すると共に、CPU29を接続している。アナログ信号処理回路27は、イメージセンサ26からのアナログ信号を増幅すると共に、フィルタ処理等のアナログ処理を実行する。

30

【0034】

さらに、評価関数演算器28は、アナログ信号処理回路27で処理されたアナログ信号を取り込み、所定の評価関数に基づいて、標本3の合焦度を示すデフォーカス量を検出し、そのデフォーカス信号をCPU29へ送信する。

【0035】

CPU29は、イメージセンサ26の出力するアナログ信号をアナログ信号処理回路27のレンジに適合させるための制御を行うと共に、評価関数演算器28からのデフォーカス信号に基づいて標本3を合焦とするようなステージ2の移動量及び移動方向の信号をステージ駆動装置30に送信する。

【0036】

ステージ駆動装置30は、CPU29からの移動量及び移動方向の信号に基づいてステージ2を上下方向に移動させ、合焦調整を行う。また、CPU29は、シャッタ16の開閉信号をシャッタ駆動装置31に送信し、シャッタ駆動装置31は、CPU29からのシャッタ開閉信号に基づいてシャッタ16を開閉する。これらの制御操作は、CPU29と接続した外部コントローラ32の制御開始スイッチにより行うようにしている。

40

【0037】

次に、以上のように構成した第1の実施の形態の動作を、図3に示すフローチャートに基づいて説明する。まずステップ101で、外部コントローラ32からの信号によりオートフォーカス動作を開始すると、ステップ102で、シャッタ16の開閉状態を確認する。ここでシャッタ16が開放されている場合は、ステップ103で、シャッタ駆動装置31

50

へ信号を送ってシャッタ 16 を閉鎖する。一方、シャッタ 16 が閉鎖されている場合は、ステップ 104 で、イメージセンサ 26 により検出した微分干渉像に基づくアナログ画像信号を読み込み、ステップ 105 で、イメージセンサ 26 のアナログ信号がアナログ信号処理回路 27 のレンジに適合しているかチェックする。

【0038】

ここで、レンジが適合していない場合には、レンジが適合するまでイメージセンサ 26 の蓄積時間を制御する。一方、レンジが適合している場合には、ステップ 106 で、イメージセンサ 26 の信号より所定の評価関数に基づき合焦度を示すデフォーカス量を演算する。そして、ステップ 107 で、算出されたデフォーカス量から合焦判定を行い、合焦していないと判断した場合は、ステップ 108 で、デフォーカス量に応じたステージ 2 の移動量及び移動方向の信号をステージ駆動装置 30 に送信してステージ 2 の駆動を行うと共に、ステップ 104 に戻り、ステップ 104 ~ ステップ 108 の一連の動作を合焦と判断されるまで繰返し、ステップ 107 で合焦と判断された後、ステップ 109 で、シャッタ駆動装置 31 へ信号を送ってシャッタ 16 を開放し、ステップ 110 に進んで制御を終了する。

10

【0039】

以上述べた第 1 の実施の形態によれば、以下に記すような効果を得ることができる。まず、撮像面 24 に配置した TV カメラや写真フィルム等を用いた蛍光撮影におけるオートフォーカス動作は、イメージセンサ 26 に投影される透過微分干渉観察による標本像に基づいて行われる。イメージセンサ 26 への入射光量は、光源 4 から出射する光量を大きくすることにより、相対的に大きくすることができ、その結果、アナログ信号処理回路 27 のレンジに適合するためのイメージセンサ 26 の蓄積時間を短くすることができる。従って、光量の小さい蛍光観察においても、オートフォーカス動作に要する総時間を短くすることができる。

20

【0040】

また、標本 3 から発し対物レンズ 11 で集められた蛍光は、イメージセンサ 26 の焦点検出光学系側へ分割されることなく、撮像面 24 の撮像光学系側へ効率良く導入される。

【0041】

さらに、透過微分干渉観察のアナライザ 25 は、第 2 のダイクロイックミラー 23 よりもイメージセンサ 26 側に配置されており、蛍光観察の光路上には存在しないので、アナライザ 25 を通過することによる光量ロスが蛍光観察においては起こらない。

30

【0042】

また、第 2 のダイクロイックミラー 23 で反射した僅かな透過微分干渉観察光は、ローパスフィルタ 21' によって撮像面 24 への進入を遮断される。従って、撮像面 24 において、蛍光の光量ロスが少なく且つバックグラウンドの抜けが良い高効率な蛍光像の撮像が可能となる。同様に、接眼レンズ 22 側の観察光学系においても、ローパスフィルタ 21 によって透過微分干渉観察光が遮断されるので、蛍光の光量ロスが少なく且つバックグラウンドの抜けが良い高効率な蛍光観察が可能となるばかりでなく、バンドパスフィルタ 7 の透過波長領域 B が近赤外域に設定されるような場合でも、有害な近赤外光が目に入らない安全な構成となる。

40

【0043】

さらに、オートフォーカス動作時は、シャッタ 16 が閉鎖されており、標本 3 上に励起光が照射されない。従って、蛍光観察には不要なオートフォーカス動作時の励起光を遮断し、標本 3 の不要な褪色を防止することができる。

【0044】

以上のように、オートフォーカスの所要時間が短く、且つ蛍光観察の効率を最大限に確保した顕微鏡用焦点検出装置を提供することができる。

【0045】

< 第 1 の実施の形態の変形例 >

なお、上述の第 1 の実施の形態では、ステージ 2 を上下に移動して標本の合焦を行う形式

50

の顕微鏡について説明したが、対物レンズ 11 を上下に移動して標本の合焦を行う形式の顕微鏡においては、ステージ 2 の代りに対物レンズ 11 を駆動することにより、同様の効果を得ることができる。また、前述の第 1 の実施の形態において、ローパスフィルタ 21' の代りに、図 4 に示すように蛍光波長の強度分布と略同一な分光透過特性を有するローパスフィルタ 21'' を用いても、同様の効果を得ることができる。

【0046】

さらに、前述の第 1 の実施の形態において、ローパスフィルタ 21 の代わりに、観察光学系の中の接眼レンズ等の光学部材に近赤外反射コートを施すことによっても、同様の効果を得ることができる。

【0047】

また、前述の第 1 の実施の形態では、第 2 のダイクロイックミラー 23 の透過側に焦点検出光学系を、反射側に撮像光学系を配置したが、図 5 に示すように反転することも可能である。

【0048】

なお、図 5 における構成要素の番号は、図 1 における同一の構成要素に対応している。この場合、第 2 のダイクロイックミラー 23 の分光透過率特性は、図 6 に示すように、特定される波長領域より短い波長の光が透過し、前記波長領域より長い波長の光が反射するように設定することで、前述の第 1 の実施の形態と同様の効果を得ることができる。

【0049】

尚、バンドパスフィルタ 7、励起フィルタ 17、ダイクロイックミラー 18、吸収フィルタ 19 及びバンドパスフィルタ 7' の分光透過特性については図 1 と同様である。また、この場合、第 2 のダイクロイックミラー 23 により、微分干渉観察光の撮像面 24 側への進入は完全に遮断できるので、ローパスフィルタ 21' は不要となる。

【0050】

< 第 2 の実施の形態 >

図 7 は、本発明の第 2 の実施の形態を示した構成図である。尚、図 7 において図 1 と同一な部分に関しては、同一番号を付し説明を省略する。図において、41 は前記励起フィルタ 17、前記ダイクロイックミラー 18、及び前記吸収フィルタ 19 を一体的に保持したキューブカセットであり、このキューブカセット 41 は、後述するように、落射蛍光の波長を切換えるために、前記励起フィルタ 17、前記ダイクロイックミラー 18、及び前記吸収フィルタ 19 の分光透過特性の異なる複数のキューブカセット 41 を選択的に光路中に挿入できるようにしている。

【0051】

また、前記第 2 のダイクロイックミラー 23 よりイメージセンサ 26 側の焦点検出光学系の中には、光路長補正ユニット 42 が組み込まれている。この光路長補正ユニット 42 は、例えば図に示すように、材質が異なるクサビ型のプリズム 43a 及び 43b を上下に重ね一体化することで平行平板プリズム 43 を形成し、この平行平板プリズム 43 を図示矢印方向に平行移動可能にするものであり、前記の材質が異なる 2 枚のクサビ型プリズム 43a、43b の厚さの割合から平行平板プリズム 43 を通過する光路長の割合を変化させるものである。尚、この技術は特開平 9 - 189849 号公報において開示されているものである。

【0052】

図 8 は、この第 2 の実施の形態における、前記キューブカセット 41 の切換部を示した拡大図である。図において、41a ~ 41c はキューブカセットであり、このキューブカセット 41a ~ 41c は、図示矢印方向に平行移動可能に設置されたホルダ 44 上に装着される。すなわち、この図においてはキューブカセット 41b が光路中に挿入されているが、ホルダ 44 を図示矢印方向に平行移動することで、キューブカセット 41a または 41c を光路中に挿入することが可能である。

【0053】

また、キューブカセット 41a ~ 41c には、蛍光の波長に基づいて各々のキューブを識

10

20

30

40

50

別するためのフラグ 45 a ~ 45 c が設けられている。そして、光路中に挿入されているキューブカセットのフラグ（図においては 45 b）の対向する近接位置には、前記フラグ 45 のあ無を識別する識別センサ 46 が、顕微鏡本体 1 に固定された状態で設けられている。このフラグ 45 と識別センサ 46 は、例えば永久磁石と磁気センサの如き組合せで構成することができる。

【0054】

なお、図 9 は、この識別センサ 46 に対する前記フラグ 45 a ~ 45 c の位置関係を示した概念図である。この例においては前記識別センサ 46 は 2 つの番地を有し、キューブカセットが光路中に挿入された時に右番地もしくは左番地のいずれかにフラグ 45 が対向するようになっている。

10

【0055】

次に、第 2 の実施の形態における電気信号の接続及び処理の形態について説明する。前記識別センサ 46 は、識別回路 47 を接続し、この識別回路 47 は、CPU 29 に接続され、前記フラグ 45 が対向する前記識別センサ 46 の番地に基づくキューブカセット識別信号を CPU 29 に送信する。

【0056】

CPU 29 は、識別回路 47 の送信するキューブカセット識別信号に基づいて、前記撮像面 24 に対する前記イメージセンサ 26 の同焦差を補正するような前記平行平板プリズム 43 の移動量及び移動方向の信号を、光路長補正ユニット駆動装置 48 に送信する。

【0057】

20

光路長補正ユニット駆動装置 48 は、CPU 29 からの移動量及び移動方向の信号に基づいて、前記平行平板プリズム 43 を図示矢印方向に平行移動させ、前記撮像面 24 に対する前記イメージセンサ 26 の同焦補正を行う。

【0058】

図 10 及び図 11 は、前記の同焦補正の補正量を設定するためのモデルであり、縦軸は合焦位置、横軸は光線の波長を示している。また、図中の実線は撮像面 24 への入射波長に対する合焦位置を、破線はイメージセンサ 26 への入射波長に対する合焦位置を示している。

【0059】

ここで、イメージセンサ 26 への入射波長は、バンドパスフィルタ 7' の分光透過率特性によって決まるので、このバンドパスフィルタ 7' の分光透過率特性のピークを f とすると、イメージセンサ 26 の合焦位置は図中の p の位置となる。そして、観察像の焦点深度に基づいて、前記撮像面 24 に対する前記イメージセンサ 26 の同焦差の許容値を a とすると、図 10 においては、合焦精度の保証範囲は図中の c 及び c'' の波長範囲となる。

30

【0060】

一方、図 11 は、光路長補正ユニット 42 を駆動して焦点検出光路の光路長をかえることにより、図 10 の破線を縦軸方向に移動させたものである。ここにおいて、合焦精度の保証範囲は図中の c' の波長範囲となる。従って、このモデルの場合、光路長補正ユニット 42 の位置を図 10 もしくは図 11 の位置の 2 段切換とすることで、 $c \sim c''$ の波長範囲での合焦精度が保証される。

40

【0061】

すなわち、この例においては図 9 に示すように、各々のキューブカセットにおいて 2 か所のフラグを使い分けることにより、蛍光の波長に対応した光路長補正が可能となる。

【0062】

次に、以上のように構成した第 2 の実施の形態の動作を、図 12 に示すフローチャートに基づいて説明する。まずステップ 101 で、外部コントローラ 32 からの信号によりオートフォーカス動作を開始すると、ステップ 102 で、シャッタ 16 の開閉状態を確認する。ここでシャッタ 16 が開放されている場合は、ステップ 103 で、シャッタ駆動装置 31 へ信号を送ってシャッタ 16 を閉鎖する。

【0063】

50

一方、シャッタ１６が閉鎖されている場合は、ステップ２０１で、識別回路４７により識別センサ４６からのフラグ４５の番地に基づくキューブカセット識別信号をＣＰＵ２９に読み込み、ステップ２０２で、キューブカセット識別信号に基づく平行平板プリズム４３の移動方向の信号を光路長補正ユニット駆動装置４８に送信して平行平板プリズム４３の駆動を行った後、ステップ１０４に移行する。以下のステップに関しては図３と同一であるので、同一番号を付し説明を省略する。

【００６４】

以上に示したような第２の実施の形態によれば、第１の実施の形態において記した効果に加え、以下に記すような効果を得ることができる。すなわち、選択的に光路中に挿入されるキューブカセット４１の種類を識別し、その結果に基づいて光路長補正ユニット４２を駆動することにより、蛍光の波長に基づく撮像面２４に対するイメージセンサ２６の同焦誤差を補正することができるので、観察像の波長によらず撮像面２４に対するオートフォーカスの合焦精度を確保することができる。

【００６５】

<第２の実施の形態の変形例>

なお、上述の第２の実施の形態では、光路長補正ユニット４２の位置を２段切換としたが、これを更に細分化すれば、撮像面２４に対するオートフォーカスの合焦精度をより正確にできることは自明である。例えば上述の第２の実施の形態においては、識別センサ４６は２つの番地を有し、キューブカセット４１が光路中に挿入された時に右番地もしくは左番地のいずれかにフラグ４５が対向するようになっているが、左右両方にフラグ４５を設けたキューブカセット４１も識別可能であるから、同じ構成で光路長補正ユニット４２の位置を３段階に設定することが可能である。識別センサ４６の番地の数を３つにすれば、キューブカセット４１の識別は最大７種類まで可能となる。

【００６６】

また、前述の第２の実施の形態では、材質が異なるクサビ型のプリズム４３ａ及び４３ｂを上下に重ね一体化した平行平板プリズム４３を移動させることによって光路長を補正していたが、これをイメージセンサ２６自体を動かしたり、波長別の色収差補正レンズを用いても同様の効果を得ることができる。

【００６７】

さらに、前述の第２の実施の形態では、材質が異なるクサビ型のプリズム４３ａ及び４３ｂを上下に重ね一体化した平行平板プリズム４３を移動させることによって光路長を補正していたが、この場合にはイメージセンサ２６に集像される像が横ずれが生じる可能性があるので、図１３のように構成するようにしてもよい。すなわち、図１３（ａ）は同じ屈折率の２個のクサビ型のプリズム４３ｃ、４３ｄを図のように傾斜面同士を組合せ、このうち下側のプリズム４３ｃを固定状態とし、上側のプリズム４３ｄを矢印のごとく平行移動させるように構成したものである。図１３（ｂ）は１個の階段状のプリズム４３ｅを矢印のごとく平行移動させるように構成したものである。

【００６８】

<第３の実施の形態>

図１４は、本発明の第３の実施の形態を示した構成図である。尚、図１３において図１及び図７と同一な部分に関しては、同一番号を付し説明を省略する。図において、前記第２のダイクロイックミラー２３より撮像面２４側の撮像光学系の中には、前記光路長補正ユニット４２と略同様の構成による第２の光路長補正ユニット５１が組み込まれている。この第２の光路長補正ユニット５１は、他の信号から独立的に設けられ、単独でのみ駆動されるように構成されている。

【００６９】

図１５は、前術の図１０及び図１１に示したモデルに、前記第２の光路長補正ユニット５１による前記撮像面２４の合焦位置の移動結果を加えたモデルである。図中の実線は前記第２の光路長補正ユニット５１を駆動する前の撮像面２４への入射波長に対する合焦位置を、一点鎖線は前記第２の光路長補正ユニット５１による前記撮像面２４の合焦位置の移

10

20

30

40

50

動結果を示す。また破線は、前術の図 10 及び図 11 に示したバンドパスフィルタ 7' の分光透過特性のピーク f におけるイメージセンサ 26 の合焦位置 p を、前記光路長補正ユニット 42 により 2 段階で補正した結果を示している。

【0070】

すなわち、オートフォーカスにより検出された合焦位置に対する前記第 2 の光路長補正ユニット 51 を駆動した結果の撮像面 24 の合焦位置のズレ量は、図の破線に対する一点鎖線のズレ量として示されている。このモデルが示すように、撮像面 24 に対する観察像の合焦位置は、オートフォーカスの合焦結果に対して定常的に略一定量のオフセットを持つことになる。

【0071】

以上に示したような第 3 の実施の形態によれば、第 1 の実施の形態及び第 2 の実施の形態において記した効果に加え、以下に記すような効果を得ることができる。すなわち、撮像面 24 に対する観察像の合焦位置を、オートフォーカスの合焦結果に対して定常的に略一定量オフセットすることができるので、例えば図 15 に示すように光軸方向に厚みの大きい標本において、イメージセンサ 26 に検出される部分 52 と撮像したい部分 53 との厚み方向の位置の差が大きい場合でも、撮像したい部分 53 の撮像光路における結像位を撮像面 24 上にマニュアル動作で合わせ込むことで、オートフォーカスにより定常的に 53 の部分を撮像することが可能となる等、観察者の要求に柔軟に対応したオートフォーカス装置とすることができる。

【0072】

< 第 3 の実施の形態の変形例 >

なお、上述の第 3 の実施の形態では、第 2 の光路長補正ユニット 51 の構成を材質が異なる 2 種類のクサビ型プリズムを上下に重ね一体化した平行平板プリズムを移動させるようにしていたが、これを撮像面 24 自体を動かしたり、波長別の色収差補正レンズを用いても同様の効果を得ることができる。

【0073】

また、前述の第 3 の実施の形態では、焦点検出光路側の光路長補正ユニット 42 に CPU 29 と接続した光路長補正ユニット駆動装置 48 を接続し、撮像光路側の第 2 の光路長補正ユニット 51 は、他の信号系から独立的に設けられ、単独でのみ駆動されるようにしていたが、これとは反対に、図 17 に示すように、撮像光路側の第 2 の光路長補正ユニット 51 に CPU 29 と接続した光路長補正ユニット駆動装置 48 を接続し、焦点検出光路側の光路長補正ユニット 42 は、他の信号系から独立的に設けられ、単独でのみ駆動されるようにしても、同様の効果を得ることができる。

【0074】

なお、図 17 における構成要素の番号は、図 14 における同一の構成要素に対応している。図 18 は、この場合の光路長補正ユニット 42 のマニュアル動作によるイメージセンサ 26 の合焦位置の移動結果を示したモデルである。図中の破線は前術の図 10 に示したバンドパスフィルタ 7' の分光透過特性のピーク f におけるイメージセンサ 26 の合焦位置 p を、二点鎖線は前記光路長補正ユニット 42 のマニュアル動作による合焦位置 p の移動結果を示し、実線は撮像面 24 への入射波長に対する合焦位置を光路長補正ユニット駆動装置 48 により 2 段階で補正した結果を示している。これより、このモデルにおいても、撮像面 24 に対する観察像の合焦位置は、オートフォーカスの合焦結果に対してして定常的に略一定量のオフセットを持つことが分かる。

【0075】

< 第 4 の実施の形態 >

図 19 は、本発明の第 4 の実施の形態を示した構成図である。尚、図 19 において図 1、図 7 及び図 14 と同一な部分に関しては、同一番号を付し説明を省略する。図において、61 は光路分割プリズム 20 よりも接眼レンズ 22 側の観察光路中に設けられたアナライザであり、62 は第 2 のダイクロイックミラー 23 よりも撮像面 24 側の撮像光路中に設けられたアナライザである。

【 0 0 7 6 】

なお、アナライザ 6 1 は観察光路から挿脱可能であり、アナライザ 6 2 は撮像光路から挿脱可能であるように設けてある。また、透過照明光路中のバンドパスフィルタ 7 は、透過照明光路から挿脱可能であるように設けてある。

【 0 0 7 7 】

この構成において、前記バンドパスフィルタ 7 を透過照明光路から取り除くと、透過照明による観察光は、ローパスフィルタ 2 1 及び 2 1 ' を透過した短波長側の観察光がアナライザ 6 1 及び 6 2 を介して接眼レンズ 2 2 及び撮像面 2 4 に進入し、透過微分干渉と蛍光の同時観察像として観察及び撮像される。蛍光単独での観察及び撮像は、前記バンドパスフィルタ 7 を光路に挿入し、アナライザ 6 1 及び 6 2 を光路から取り除くことにより行う。一方で、イメージセンサ 2 6 側の焦点検出光路にはバンドパスフィルタ 7 ' が入っているため、イメージセンサ 2 6 の入射波長や入射光量等の条件、すなわちオートフォーカスのセンシング条件は変しない。

10

【 0 0 7 8 】

以上に示したような第 4 の実施の形態によれば、以下に記すような効果を得ることができる。すなわち、バンドパスフィルタ 7、アナライザ 6 1 及び 6 2 を、各々光路から挿脱することにより、オートフォーカスのセンシング条件を変えることなく、蛍光観察と透過微分干渉同時観察の切換を行うことができる。

【 0 0 7 9 】

< 第 4 の実施の形態の変形例 >

20

なお、前述の第 4 の実施の形態では、アナライザ 6 1 及び 6 2 を観察光路及び撮像光路に挿脱可能に設けているが、アナライザを第 2 のウォラストンプリズム 1 2 と光路分割プリズム 2 0 の間の光路に挿脱可能に設け、且つイメージセンサ 2 6 側の焦点検出光路中のアナライザ 2 5 を挿脱能とすることによっても、同様の効果を得ることができる。

【 0 0 8 0 】

また、前述の第 4 の実施の形態に示した蛍光観察と蛍光微分干渉同時観察の切換に必要な光学素子の挿脱動作は、電気信号により一括制御することで対応してもよい。

【 0 0 8 1 】

以上、請求項 1 , 2 , 3 に対応する発明の実施の形態について説明したが、本発明には以下の発明も含まれる。

30

【 0 0 8 2 】

(1) 請求項 1 において、例えば図 1 に示す光源 4 とコレクタレンズ 5 とコンデンサレンズ 1 0 からなる透過照明手段は、ポラライザ 8 とウォラストンプリズム 9 , 1 2 を具備し、例えばダイクロイックミラー 2 3 からなる波長分離手段により分離された長波長側にアナライザ 2 5 を具備した構成でもよい。

【 0 0 8 3 】

(2) 請求項 1 において、例えば図 1 の光源 1 4 とコレクタレンズ 1 5 と励起フィルタ 1 7 とダイクロイックミラー 1 8 と吸収フィルタ 1 9 と対物レンズ 1 1 からなる落射蛍光観察手段の中に励起光を遮光するためのシャッタ 1 6 を具備し、CPU 2 9 からなる制御手段によって合焦が完了した時に前記シャッタ 1 6 を開放するように制御されたシャッタ開閉手段を具備した構成でもよい。

40

【 0 0 8 4 】

(3) 請求項 1 において、例えば図 1 のバンドパスフィルタ 7 からなる特定波長透過手段は、前述の (1) の透過照明手段に挿脱可能に設けた構成でもよい。

【 0 0 8 5 】

なお、各実施の形態において、透過照明光学系による検鏡法として微分干渉検鏡法を用いているが、位相差検鏡法を用いてもよい。いずれの検鏡法も、生物標本等の透明物体 (位相物体) の像にコントラストをつけて、焦点検出を可能にする。

【 0 0 8 6 】

【 発明の効果 】

50

以上詳述したように本発明によれば、落射蛍光観察におけるオートフォーカスの効率が向上する顕微鏡用焦点検出装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の顕微鏡用焦点検出装置の第 1 の実施形態を説明するためのブロック図。

【図 2】図 1 の作用効果を説明するための分光透過率特性図。

【図 3】図 1 の動作を説明するためのフローチャート。

【図 4】本発明の顕微鏡用焦点検出装置の第 1 の実施形態の変形例を説明するための分光透過率特性図。

【図 5】本発明の顕微鏡用焦点検出装置の第 1 の実施形態の変形例を説明するためのブロック図。

10

【図 6】図 5 の作用効果を説明するための分光透過率特性図。

【図 7】本発明の顕微鏡用焦点検出装置の第 2 の実施形態を説明するためのブロック図。

【図 8】図 7 のキューブカセット 4 1 を説明するための斜視図。

【図 9】図 7 の識別センサ 4 6 に対するフラグ 4 5 の位置関係を示す概念図。

【図 10】図 7 の作用効果を説明するための同焦補正の補正量の設定モデル（光路長補正ユニット切換前）の図。

【図 11】図 7 の作用効果を説明するための同焦補正の補正量の設定モデル（光路長補正ユニット切換後）の図。

【図 12】図 7 の動作を説明するためのフローチャート。

【図 13】本発明の顕微鏡用焦点検出装置の第 2 の実施形態の変形例を説明するための図。

20

【図 14】本発明の顕微鏡用焦点検出装置の第 3 の実施形態を説明するためのブロック図。

【図 15】図 13 の作用効果を説明するための同焦補正の補正量の設定モデルの図。

【図 16】図 13 の作用効果を説明するための厚い標本の合焦モデルの図。

【図 17】本発明の顕微鏡用焦点検出装置の第 3 の実施形態の変形例を説明するためのブロック図。

【図 18】図 17 の作用効果を説明するための同焦補正の補正量の設定モデルの図。

【図 19】本発明の顕微鏡用焦点検出装置の第 4 の実施形態を説明するためのブロック図。

30

【符号の説明】

1 ... 顕微鏡本体

2 ... ステージ

3 ... 標本

4 ... 光源

5 ... コレクタレンズ

6 ... 全反射ミラー

7 ... バンドパスフィルタ

8 ... ポラライザ

9 ... ウォラストンプリズム

40

10 ... コンデンサレンズ

11 ... 対物レンズ

12 ... ウォラストンプリズム

13 ... 結像レンズ

14 ... 光源

15 ... コレクタレンズ

16 ... シャッタ

17 ... 励起フィルタ

18 ... ダイクロイックミラー

19 ... 吸収フィルタ

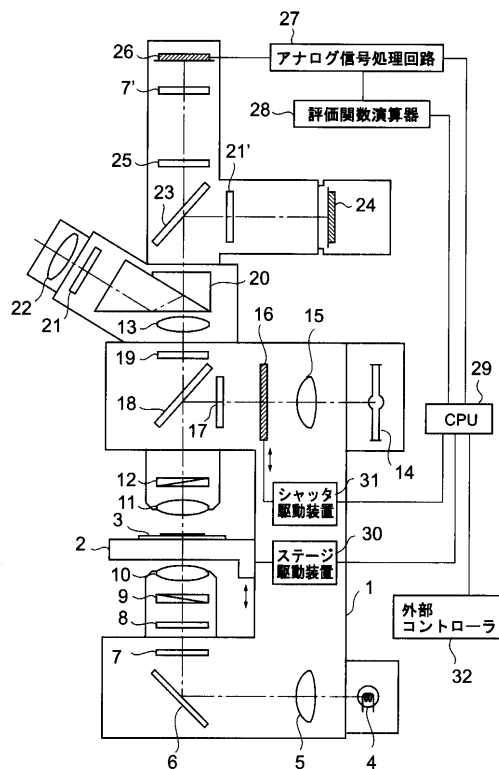
50

- 2 0 ... 光路分割プリズム
- 2 1 ... ローパスフィルタ
- 2 2 ... 接眼レンズ
- 2 3 ... ダイクロイックミラー
- 2 4 ... 撮像面
- 2 5 ... アナライザ
- 2 6 ... イメージセンサ
- 2 7 ... アナログ信号処理回路
- 2 8 ... 評価関数演算器
- 2 9 ... C P U
- 3 0 ... ステージ駆動装置
- 3 1 ... シャッタ駆動装置
- 3 2 ... 外部コントローラ
- 4 1 ... キューブカセット
- 4 2 ... 光路長補正ユニット
- 4 3 ... 平行平板プリズム
- 4 4 ... ホルダ
- 4 5 ... フラグ
- 4 6 ... 識別センサ
- 4 7 ... 識別回路
- 4 8 ... 光路長補正ユニット駆動装置
- 5 1 ... 光路長補正ユニット
- 6 1 ... アナライザ
- 6 2 ... アナライザ

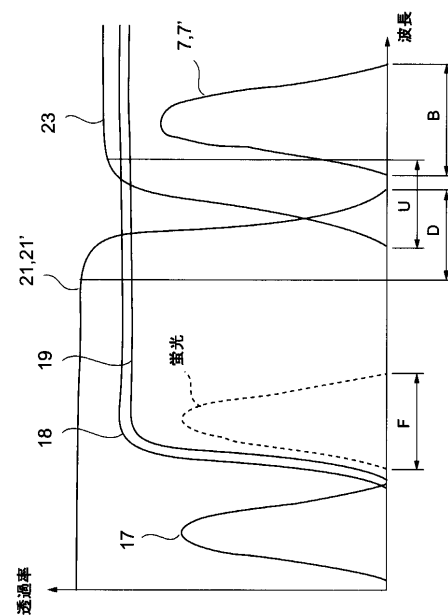
10

20

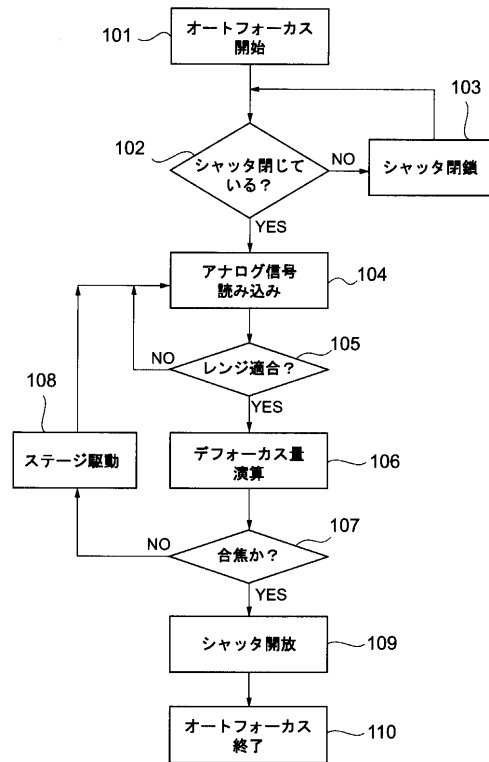
【図 1】



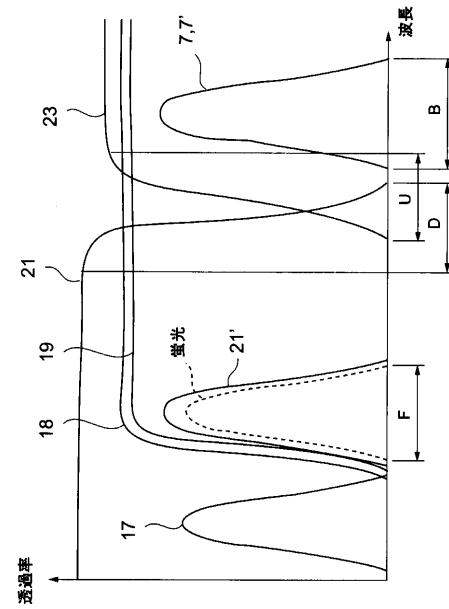
【図 2】



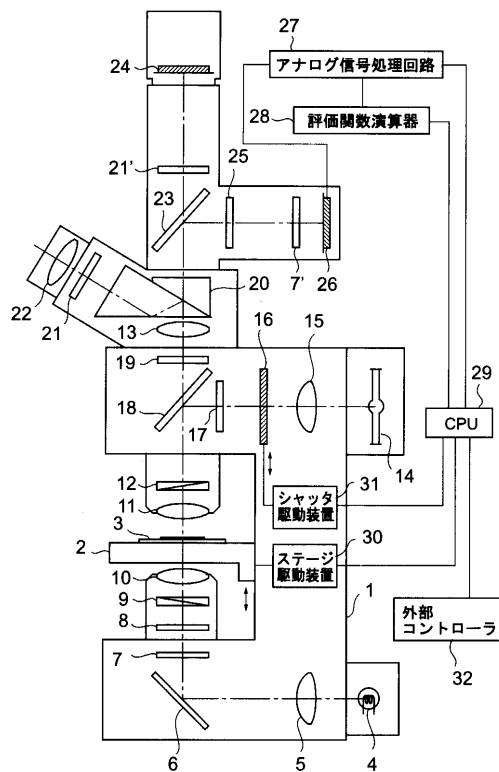
【図 3】



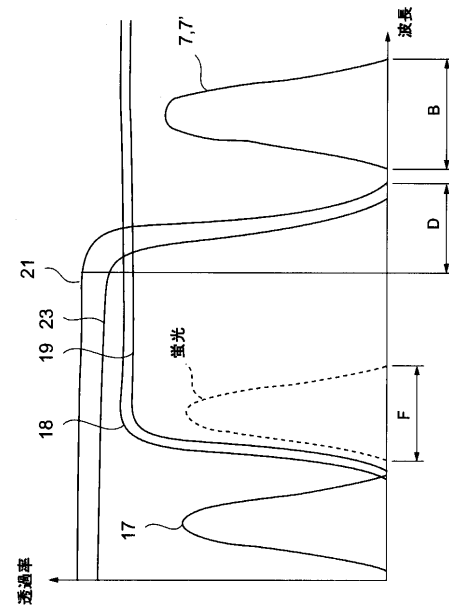
【図 4】



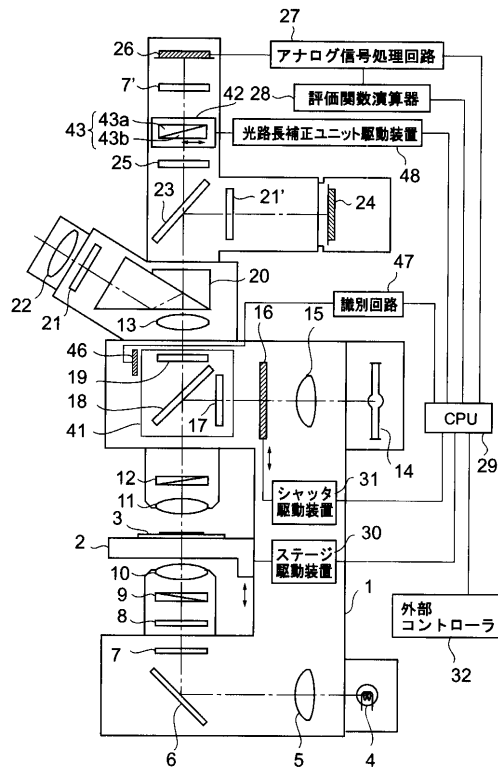
【図 5】



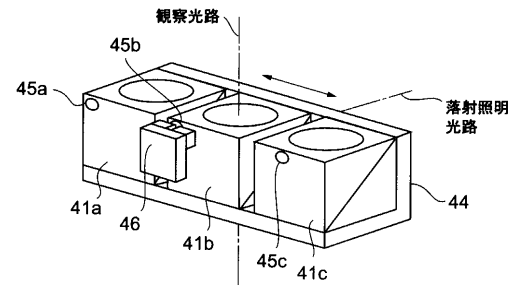
【図 6】



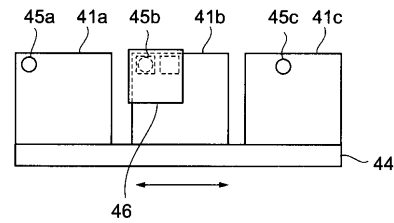
【図 7】



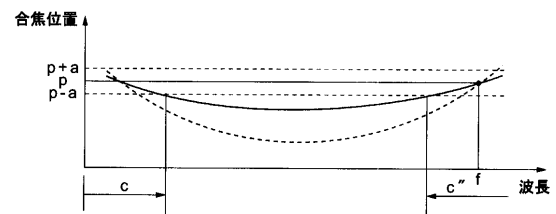
【図 8】



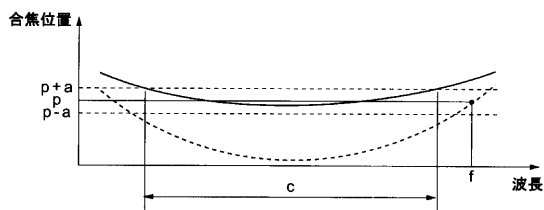
【図 9】



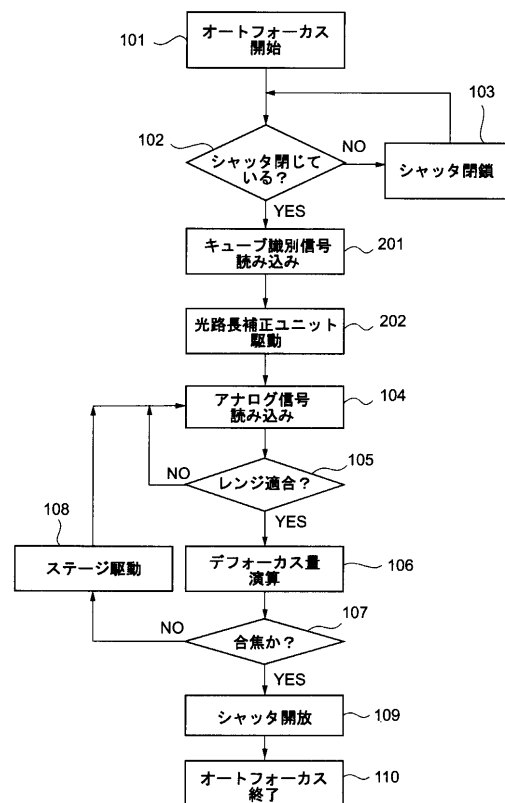
【図 10】



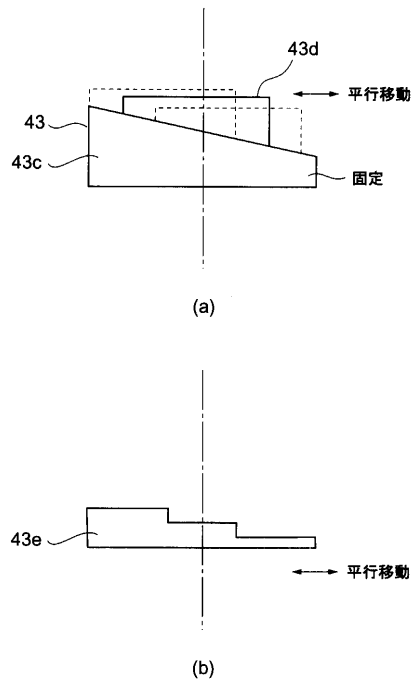
【図 11】



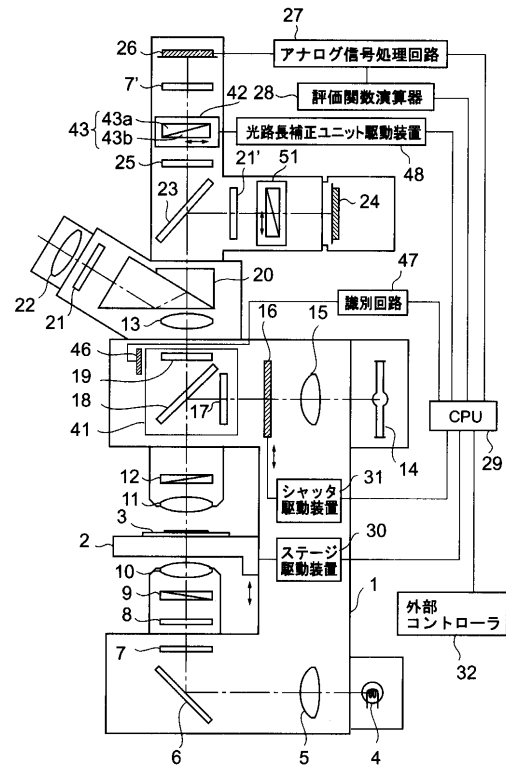
【図 12】



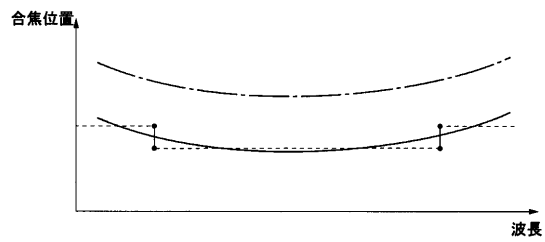
【図 13】



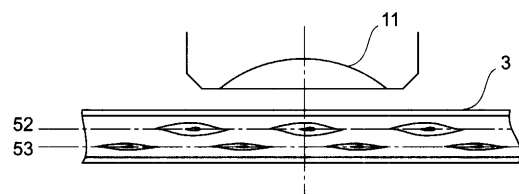
【図 14】



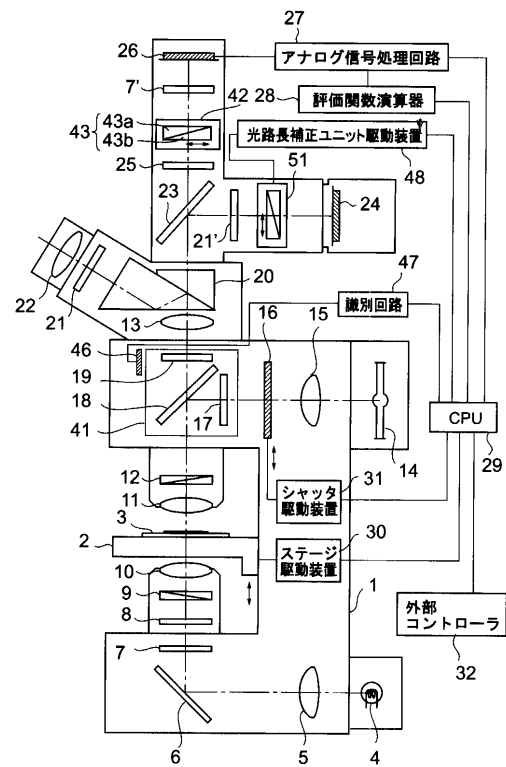
【図 15】



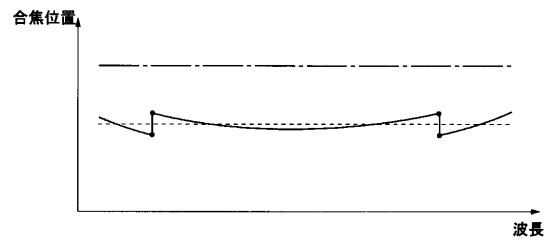
【図 16】



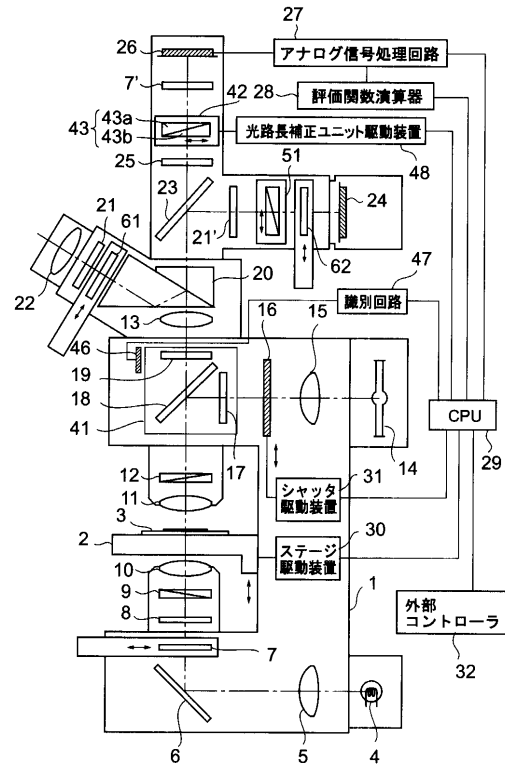
【図 17】



【図 18】



【図 19】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平 0 9 - 1 8 9 8 4 9 (J P , A)
特開平 0 9 - 2 4 3 9 2 1 (J P , A)
特開平 1 1 - 2 2 3 7 7 3 (J P , A)
特開平 0 8 - 2 1 1 2 9 5 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G02B 7/28
G02B 21/36