

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2004-69428  
(P2004-69428A)

(43) 公開日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 13/16	GO 1 N 13/16	2 GO 4 3
GO 1 N 21/64	GO 1 N 21/64	2 GO 4 5
// GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/483	C

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2002-227569 (P2002-227569)	(71) 出願人	000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(22) 出願日	平成14年8月5日(2002.8.5)	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100084618 弁理士 村松 貞男
		(74) 代理人	100068814 弁理士 坪井 淳
		(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100100952 弁理士 風間 鉄也

最終頁に続く

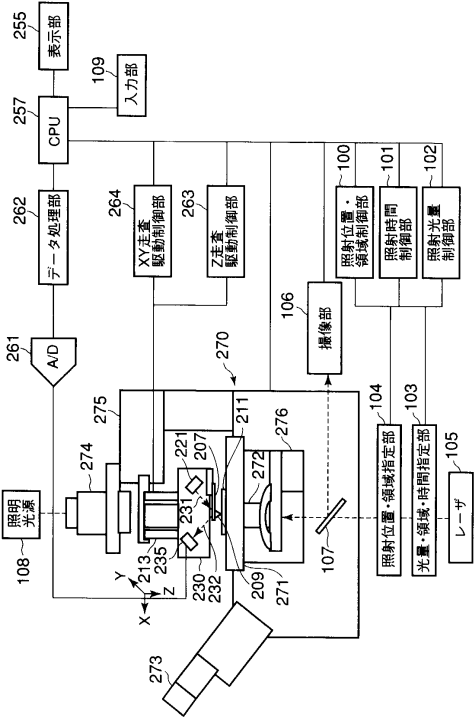
(54) 【発明の名称】 原子及び分子間力顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】 光刺激に対する生体試料の局所的な部位の反応をA F M観察できる原子及び分子間力顕微鏡を提供する。

【解決手段】 原子及び分子間力顕微鏡は、ステージ271・対物レンズ272・レボルバーZ移動機構276・接眼レンズ273・照明光源108・透過照明装置274を含む倒立型顕微鏡270と一体化されている。原子及び分子間力顕微鏡は更に、カンチレバー207と、それ用の変位検出ユニット230と、カンチレバー207を走査する走査機構213とを有しており、更に、レーザ105と、レーザ光照射の位置と領域と光量と時間を指定する光強度・時間指定部103と照射位置・領域指定部104と、レーザ光照射の位置と領域と光量と時間を制御する照射位置・領域制御部100と照射時間制御部101と照射光量制御部102と、試料全体の蛍光像を得るための撮像部106とを有している。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

光刺激に対する生体試料の局所的な部位の反応を A F M 観察する原子及び分子間力顕微鏡であり、

A F M 観察のための探針を先端に備えるカンチレバーと、

カンチレバーの変位を光学的に検出する変位検出手段と、

変位検出手段で得られた検出信号を処理する処理手段と、

試料に対してカンチレバーを X Y Z 走査する走査手段と、

試料の全体像を得るための撮像手段と、

試料の局所的な部位に光刺激を与えるための光ビームを発する光源手段と、

10

光源手段からの光ビームの照射の位置と領域と光量と時間を指定する指定手段と、

光源手段からの光ビームの照射の位置と領域と光量と時間を制御する制御手段とを備えている、原子及び分子間力顕微鏡。

## 【請求項 2】

光源手段からの光ビームの照射に反応して試料が発する蛍光を検出する共焦点光学系の検出光学系を更に備えている、請求項 1 に記載の原子及び分子間力顕微鏡。

## 【請求項 3】

光源手段から発せられ試料を透過した光ビームを検出する検出手段を更に備えている、請求項 1 または請求項 2 に記載の原子及び分子間力顕微鏡。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、試料表面の情報を高い分解能で生態メカニズムを経時的に観察測定することのできる走査型プローブ顕微鏡等に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

走査型プローブ顕微鏡のひとつに原子間力顕微鏡 (A F M) がある。これは微細加工によって作られたカンチレバーを試料に接触または近接させ、カンチレバーの先端に付けられた探針と試料間に働く原子間力によるカンチレバーのたわみを検出することにより、試料表面の形状を測定するものである。カンチレバーのたわみを測定する手段としては、光テ

30

## 【0003】

この原子間力顕微鏡は、光学顕微鏡を遙かに上回る分解能を持ちながら、電子顕微鏡のように試料を真空中に入れる必要がない、という利点を有している。従って、空気中や、水溶液をはじめ各種液体中でも観察できる。

## 【0004】

また他の利点として、有機分子、D N A、蛋白質、蛋白質集合体であるアクチン、微小管、バクテリアの繊毛、各種細胞骨格、核膜と核孔、ウイルスなどの微細構造を固定や染色をせずにとらえることができる。さらに、培養中の生きている動物細胞の微細な形態変化を時間を追って観察することができる。

40

## 【0005】

従来の A F M 装置の典型的な構成例を説明する。図 9 は、従来の典型的な A F M の全体構成を示す模式図である。この図の装置は、倒立型顕微鏡 270 と一体化されており、透過照明装置 274 を備えている。試料 211 は、ステージ 271 に載せられ支持されている。カンチレバー 207 の先端部下面には、探針 209 が下方に突出するように形成されている。カンチレバー 207 の先端の探針 209 は試料 211 の表面に当てられている。円筒形 X Y Z スキャナー 213 は、試料面上に対して水平方向 (X, Y) と垂直方向 (Z) にカンチレバー 207 を走査する。円筒形 X Y Z スキャナー 213 は、通常は、ピエゾアクチュエータで構成されており、顕微鏡 270 のアーム 275 に固定されている。カンチ

50

レバー 207 は、一般的に剛性の高いアームを介して支柱に保持されている。

【0006】

カンチレバー 207 の上面には、装置上方に設置されている変位測定用のレーザ発振器 221 から、レーザ光（入射光 231）が当てられる。この入射光 231 は、カンチレバー 207 の上面に焦点が合った状態で、その表面上で反射される。その反射光 232 は、上方に設置されている検出器 235 に当る。

【0007】

検出器 235 は、例えば上下二分割型のフォトディテクタ（PD）で構成され、図 10 に示されるように、上下に並べて配置された二つのセンサ、すなわち上側センサ A と下側センサ B を有しており、反射光 232 の入射位置を検出することができる。例えば、反射光 232 が上側に当たると、上側センサ A の光量の方が下側センサ B の光量よりも多くなる。反射光 232 が下に当たると逆となる。

10

【0008】

PD 235 の信号は、アナログ信号のため、A/D 変換器 261 で一旦デジタル信号に変換され、データ処理部 262 に送られる。データ処理部 262 は、PD 235 の各センサ A と B の信号の和信号と差信号を算出し、その結果は、システム全体を制御する CPU 257 を介して、Z 走査駆動制御部 263 と XY 走査駆動制御部 264 に制御信号として送られる。Z 走査駆動制御部 263 と XY 走査駆動制御部 264 は送られてくる制御信号に従って円筒形 XYZ スキャナ 213 を駆動する。また、CPU 257 は、取得したデータに基づいて所望のデータを表示部 255 に表示させる。

20

【0009】

次に、図 9 の AFM の調整及び動作について説明する。最初、レーザ発振器 221 からレーザ光をカンチレバー探針 209 の先端の表面上に合わせる必要がある。そのため、位置と焦点面が一致するように、レーザ発振器 221 の位置を組立調整時又は測定前に精密に調整する。次に、その反射レーザ光 232 を二分割 PD 235 の指定した中心位置に合わせる調整が必要である。二分割 PD 235 の和信号（A + B）が最大になるようにレーザ入射光 231 の位置を調節し、次に差信号（A - B）が最小になるように二分割 PD 235 の位置を調整する。

【0010】

これらの調整が終わった後にカンチレバー 207 を試料に接触させ、サンプルスキャンの場合は試料 211 をカンチレバー 207 で走査する。このとき二分割 PD 235 の差信号をモニタすることによって、試料 211 表面の形状を表示部 255 で画像表示することができる。また、二分割 PD 235 の差信号が一定になるように、すなわちカンチレバー 207 と試料 211 の間に働く力が一定になるようにフィードバックをかけながら、試料表面の形状を画像化することも可能である。また、検出器 235 は四分割 PD が用いられてもよい。

30

【0011】

上記の制御を行うことにより、たわみとねじれを一定値に保つように制御しながら走査し、各々の制御電圧の結果を画像化することにより、試料表面の形状が分かる。

【0012】

また、表面形状観察以外の測定方法には、注目する分子の力定数測定がある。これは、Z 方向の制御を行うのみで実行できる。

40

【0013】

また、光学顕微鏡を用いた光学観察は、透過照明装置 274 から照明し、対物レンズ 272 を通して接眼レンズ 273 で観察ができる。これにより、AFM 観察を行いながら、試料全体の光学像が観察でき、測定位置等が容易に確認できる。

【0014】

一方、AFM 観察が普及されるかなり前から、生態観察においては蛍光を利用した観察もバイオイメーjingとして広く利用されている。これは、蛍光試薬を蛍光標識として生態内に取り込み、光励起し発生する蛍光信号を観察する。CCD カメラで像を検出すること

50

で、又は励起光を走査することで画像が得られる。さらに、それを発展させた研究では、単なる蛍光画像化にとどまらず、光刺激などを応用した生物フィジオロジープリケーションがある。

【0015】

例えば、Cagedは、細胞内で(局所的に)活性物質の濃度を上昇させ、どのような反応が引き起こされるかを観察できるという手法である。従来、細胞外から何らかの刺激を働きかけることで活性化する物質、例えば神経伝達物質、ホルモン、細胞内情報伝達物質が注目されている。これらは、すぐに働き出してしまいう反応性分子であるが、反応前には不活性な状態で細胞に導入しておき、光照射を与えると分子が動き出し反応が開始するようにする。この光照射のタイミングが反応開始のトリガーになり、その後の変化や反応の現象を経時的に画像化して捉える。これらを観察し生態のメカニズムを解明する手がかりをつかんでいく。この場合、一般的に光源は、簡単で安価な為、Hgランプなどが使われている。

10

【0016】

また、CALI (Chromophore - Assisted Laser Inactivation) という手法は、生体内の蛋白質の機能を分子レベルで解析する手段として使われている。具体的にはレーザによるダメージを興味ある蛋白質にだけ局所的に与える方法であり、ダメージにより細胞に機能障害が発生する。その障害の様子を経時的に観察し、失活させた蛋白質の細胞内での役割を調べる。主に使われるレーザには、Nd - YAG pumped dye laser、N<sub>2</sub> dye laserがある。

20

【0017】

いずれも、レーザ光を使った生態内の蛋白質の局所的な動きなどを解明する手法であり、蛍光やレーザを使った試みが広がっている。

【0018】

前述の生物標本に対して、蛍光を使った検出手段と、原子分子間力と使った手段との両者を併用し、新たな観察手段として従来例が提案されている。

【0019】

特開平10 - 260190号公報には、倒立顕微鏡と組合せた蛍光AFMが提案されている。

【0020】

一般に、この種の走査型蛍光プローブ顕微鏡においては、探針には所定の波長成分の光に励起されて蛍光を発する蛍光物質が付されており、一方、顕微鏡ステージにセットされた試料にも、所定の波長成分の光に励起されて蛍光を発する蛍光物質が付されている。測定開始に際し、所定の波長成分の光を試料及び探針に照射すると、探針及び試料から蛍光が発せられる。実際の測定に際し、探針を試料に位置付ける場合、例えばCCDカメラによって探針の蛍光像及び試料の蛍光像の位置関係をモニタしながら顕微鏡ステージを移動させる。そして、各蛍光像が相互に重なったときに、探針が試料に位置付けられたものとみなして、その試料に対する種々の測定を行っている。

30

【0021】

この蛍光の光強度は、相互の蛍光分子間の距離に依存し、励起された蛍光色素の近接する位置にそのエネルギーを吸収する蛍光色素がある場合に本来蛍光として光となるべきエネルギーが第二の蛍光色素の励起光として利用されるエネルギー・トランスファー (FRET) という現象を利用している。

40

【0022】

これにより探針の測定位置を所定の蛍光の発光によって確認でき、蛍光観察も行えるシステムである。この際、蛍光観察の為に励起光源として励起水銀ランプやキセノンランプ等を適用可能な光源としている。

【0023】

特開平8 - 304420号公報には、倒立型顕微鏡を用いた原子間力顕微鏡装置に、レーザ共焦点顕微鏡の光学系を導入した装置が開示されており、この装置では、レーザ励起に

50

よる試料の蛍光観察画像とカンチレバー蛍光画像とが鮮明に観察でき、かつ同時にA F M観察できる。尚、この実施形態に適用されるカンチレバーにも蛍光処理が施されている。

【0024】

この従来例の光学顕微鏡の構成を図11に示す。この光学顕微鏡は、試料25に対してレーザ光を走査して、その際に発生する試料25及びカンチレバー19からの蛍光像を目視観察することによって、試料25に対するカンチレバー19の位置合わせを行うように構成されている。

【0025】

この動作において、レーザ発振器65から発振された所定波長のレーザ光は、ガルバノメータ67で反射された後、ダイクロイックミラー69及び対物レンズ43を介してステージ23上の試料25に照射されると共に、この試料25を透過してカンチレバー19に到達する。このとき、ガルバノメータ67を図中矢印方向に所定角度だけ回転させることにより、レーザ光は、試料25及びカンチレバー19上に走査される。

【0026】

レーザ光が走査された試料25及びカンチレバー19から発生した蛍光像は、対物レンズ43によって取り込まれた後、ダイクロイックミラー69に導光される。このとき、ダイクロイックミラー69で反射された蛍光像は、後述するフィルタ71を透過した後、共焦点用ピンホール73を通過して光センサ75に導光され、所定の信号に変換される。光センサ75から出力された信号は、コントローラ77によって画像処理された後、モニタ79上に蛍光像として写し出される。この結果、モニタ79内には、カンチレバー19と試料25の蛍光像が呈示され、試料25に対する蛍光観察を行いながら同時にカンチレバー19を用いたS P M測定を行うことが可能となる。尚、接眼レンズ51の観察視野にも同様の蛍光像が呈示される。

【0027】

上述した動作において、レーザ発振器65からのレーザ光は、その一部が試料25を透過した透過光又は試料25からの散乱光となって、S P M装置27内の変位検出光学系55に伝波されてしまう。このような透過光又は散乱光等の外乱光が変位検出光学系55に伝波した場合には、試料25に対するカンチレバー19の変位を高精度に検出することができなくなってしまう。

【0028】

そのような不具合を避けるため、S P M装置27には、外乱光のみを除去する外乱光除去フィルタ81が内蔵されている。この結果、変位検出光学系55には、外乱光が除去されたカンチレバー19からの反射光のみが伝波される。

【0029】

また、S P M装置27の変位検出光学系55からカンチレバー19に変位検出用レーザが照射された際、カンチレバー19からは散乱光が発生する。この散乱光は、試料25を透過した後、対物レンズ43からダイクロイックミラー69及び共焦点用ピンホール73を介して光センサ75に導光され、この光センサ75から出力される信号にノイズとなって表れる。

【0030】

そのような不具合を避けるため、カンチレバー19からの散乱光を除去するように、ダイクロイックミラー69と共焦点用ピンホール73との間の光路中にはフィルタ71が配置されている。これにより、モニタ79内には、カンチレバー19と試料25の蛍光像のみが鮮明に呈示される。その結果、試料25に対する蛍光観察を行いながら同時にカンチレバー19を用いたS P M測定を行うことが可能となり、カンチレバー19を試料25に対して高精度に位置決めすることができ、従って、試料25に対する蛍光観察と同時に所定のS P M測定を行うことが可能な光学顕微鏡を実現することが可能となる。

【0031】

この従来例は、カンチレバーの位置合わせ精度を向上させる為、またL S M蛍光観察を行いながら、同時にカンチレバーを用いたS P M測定を行うことが可能となる例である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 2 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

近年、医学生物分野の研究が進むにつれて、生体観察試料を光刺激によって、局所的な生態反応を観察・測定したいという要望が高まっている。これらの現象を、蛍光信号を使って画像化する手法はいくつかがあるが、さらに原子分子レベルでの観察となると、A F M を使ったナノレベルの観察が必須となってくる。

## 【 0 0 3 3 】

特開平 1 0 - 2 6 0 1 9 0 号公報においては、励起光源として水銀ランプやキセノンランプ等を用いている。これは、探針に付着している蛍光物質を励起するための光源として用いられており、あくまでも探針の位置を可視化することを目的としている。従って、ケー 10  
ラー照明に代表される照明光学系で、探針への光照射を行うか又は試料全体に当てることを主目的としているので、試料の局所的な光刺激反応をみる顕微鏡として利用できない。また、試料の全体照射で観測を試みても、注目部位に対してはエネルギー密度の高いレーザでない為、各種反応に関して適用範囲が狭い。

## 【 0 0 3 4 】

特開平 8 - 3 0 4 4 2 0 号公報においては、L S M 光学系を組み合わせ、励起光源としてレーザを使っている。しかし、これも観察用のレーザとしての用途を目的としており、観察視野全体に対しレーザ走査はラスタスキャンを通常行っている為、局所的な照射を行 20  
わない。仮に、局所的な照射制御を行おうとした場合、カルバノミラー単独の照射制御の為、微細領域に対する高精度な位置や領域制御、正確な時間制御、照射光量の瞬時の切り替えを実現できず、また照射不要部位にも光があたることもあり、正確な観測ができない。

## 【 0 0 3 5 】

本発明の目的は、分子の局在の現象解析要望に答える為、光刺激に対する生体試料の局所的な部位の反応を A F M 観察できる原子及び分子間力顕微鏡を提供することである。

## 【 0 0 3 6 】

## 【 課題を解決するための手段 】

本発明の原子及び分子間力顕微鏡は、先端に探針を備えるカンチレバーと、カンチレバーの変位を光学的に検出する変位検出手段と、変位検出手段で得られた検出信号を処理する 30  
処理手段と、試料に対してカンチレバーを X Y Z 走査する走査手段と、試料の全体像を得るための撮像手段と、試料に光刺激を与えるための光ビームを発する光源手段と、光源手段からの光ビームの照射の位置と領域と光量と時間を指定する指定手段と、光源手段からの光ビームの照射の位置と領域と光量と時間を制御する制御手段とを備えている。

## 【 0 0 3 7 】

## 【 発明の実施の形態 】

以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

## 【 0 0 3 8 】

## 第一実施形態

本実施形態による原子及び分子間力顕微鏡について図 1 ~ 図 6 を参照して説明する。

## 【 0 0 3 9 】

本実施形態の原子及び分子間力顕微鏡は、図 1 に示されるように、倒立型顕微鏡 2 7 0 と 40  
一体化されており、倒立型顕微鏡 2 7 0 は、試料 2 1 1 が載せられるステージ 2 7 1 と、ステージ 2 7 1 の下方に配置された対物レンズ 2 7 2 と、対物レンズ 2 7 2 を上下に移動させるレボルバー 2 7 6 と、対物レンズ 2 7 2 と共働して試料 2 1 1 の光学像を得る接眼レンズ 2 7 3 と、照明光を発する照明光源 1 0 8 と、試料 2 1 1 を上方から照明する透過照明装置 2 7 4 と、透過照明装置 2 7 4 を支持するアーム 2 7 5 を備えている。

## 【 0 0 4 0 】

原子及び分子間力顕微鏡は更に、下方に突出する探針 2 0 9 を先端部下面に備えるカンチ 50  
レバー 2 0 7 と、カンチレバー 2 0 7 を支持すると共にカンチレバー 2 0 7 の変位を検出

する変位検出ユニット 230 と、カンチレバー 207 を試料面上に対して水平方向（X 方向と Y 方向）と垂直方向（Z 方向）にカンチレバー 207 を走査する走査機構である円筒形 XYZ スキャナー 213 とを有している。

【0041】

円筒形 XYZ スキャナー 213 は、通常、 piezo アクチュエータで構成され、顕微鏡 270 のアーム 275 に固定されている。カンチレバー 207 は、測定時、に、試料 211 に近づけられ、その先端の探針 209 が試料 211 の表面に当てられる。

【0042】

変位検出ユニット 230 は、カンチレバーの背面に光ビーム 231 を照射する変位測定用光源であるレーザ発振器 221 と、カンチレバーの背面からの反射光ビーム 232 の位置を検出する検出器 235 とを備えている。レーザ発振器 221 からの光ビーム 231 は、カンチレバー 207 の背面に焦点が合った状態で照射される。

10

【0043】

検出器 235 は、例えば上下二分割型のフォトディテクタ（PD）で構成され、受けた光量に対応する信号を出力する上側センサと下側センサとを有する。反射光ビーム 232 の入射位置は、二分割 PD 235 の上側センサと下側センサの受ける光量の差、すなわちそれらの出力信号の差に基づいて求めることができる。

【0044】

原子及び分子間力顕微鏡は更に、検出器 235 から出力されるアナログ信号をデジタル信号に変換する A/D 変換器 261 と、A/D 変換器 261 からのデジタル信号を処理するデータ処理部 262 と、円筒形 XYZ スキャナー 213 を駆動する Z 走査駆動制御部 263 と XY 走査駆動制御部 264 と、システム全体を制御する CPU 257 と、CPU 257 に外部から情報を与えるための入力部 109 と、データを表示する表示部 255 とを有している。

20

【0045】

データ処理部 262 は、二分割 PD 235 の上側センサと下側センサの出力の差信号と和信号を算出し、制御情報としてこれを CPU 257 に送る。CPU 257 は、データ処理部 262 からの情報に従って Z 走査駆動制御部 263 と XY 走査駆動制御部 264 を制御すると共に、Z 走査駆動制御部 263 と XY 走査駆動制御部 264 から探針 209 の位置情報を取得して試料 211 のデータを取得し、得られたデータに基づいて所望のデータを表示部 255 に表示させる。

30

【0046】

また、原子及び分子間力顕微鏡は、蛍光観察用の励起光ビームを発する光源であるレーザ 105 と、励起光ビーム照射の位置と領域と光量と時間を指定する手段である光強度・時間指定部 103 と照射位置・領域指定部 104 と、励起光ビーム照射の位置と領域と光量と時間を制御する手段である照射位置・領域制御部 100 と照射時間制御部 101 と照射光量制御部 102 と、試料 211 の全体の蛍光像を得るための撮像部 106 と、試料 211 からの蛍光を撮像部 106 に方向付けるミラー例えばダイクロイックミラー 107 とを有している。

【0047】

次に、本実施形態の原子及び分子間力顕微鏡の動作について述べる。

40

【0048】

生態試料の全体のアウトラインを把握し照射位置等の設定をする為、撮像部 106 により蛍光像観察を行う。照明光源 108 からの光が、透過照明装置 274 によって、円筒形 XYZ スキャナー 213 の中を通して試料に照射される。この照明光により試料の蛍光色素が励起され蛍光を発する。この蛍光像を撮像部 106 において撮像し試料全体の観察像を得る。

【0049】

照明光源 108 には、一般的に蛍光色素の励起波長域を多く持つ水銀ランプやキセノンランプが用いられる。また、安価なハロゲンランプが用いられてもよいが、その場合には、

50

蛍光色素の励起光源として十分使えない為、アナライザーとポラライザーを試料の前後の光路上に配置して微分干渉像による観察を行う。もちろん、この場合においても、試料の全体像を見ることができる。

#### 【 0 0 5 0 】

画像の焦点合わせはレボルバーZ移動機構276により行われる。焦点面の画像は、撮像部106で撮像され、CPU257を介してキャプチャーされ、表示部255において観察される。

#### 【 0 0 5 1 】

図2(a)に示されるように、所望の画像が得られたら、その試料中のどの位置に光を照射するのかを指定する。指定方法は、例えば取得画像を表示部255で見ながら、入力部109から位置や領域を設定する。入力部109は、例えば、画面上で位置を指定できるI/Fであるマウス等で構成され、図2(b)に示されるように、照射位置を示す指標を画像上にオーバーレイすることで、領域の指定を行う。

10

#### 【 0 0 5 2 】

また、複数の波長の光を用いる場合には、その波長あるいはレーザ105を選択する。例えば、細胞のあるZ位置におけるエリアを円で指定し、そのときの照射レーザの設定、例えば波長488nmのArレーザといったレーザの種類と波長の選択を行なう。

#### 【 0 0 5 3 】

加えて、照射強度の選択設定を行う。つまり、照射強度として、0から100%中の任意の値、例えば50%を選択するといった設定を行う。さらには何秒間照射するかといった照射時間の設定T1を行う。

20

#### 【 0 0 5 4 】

これらは、画像や選択メニュー等の画面を見ながらマウスで設定する。その設定用のソフトウェアはCPU257でコントロールされる。

#### 【 0 0 5 5 】

このような操作により、照射の位置と領域と時間と光量のパラメーター情報が設定される。CPU257は、照射位置・領域制御部100と照射時間制御部101と照射光量制御部102に情報を送り、光強度・時間指定部103と照射位置・領域指定部104の光学的位置を初期化する。

#### 【 0 0 5 6 】

入力部109から照射の開始が入力されると、各部にレーザ照射のトリガーとして伝えられ、レーザ光が、光強度・時間指定部103、照射位置・領域指定部104を経由した後、図2(c)に示されるように、試料に照射される。照射位置や領域を光学的に制御する照射位置・領域指定部104は、例えばガルバノミラーやAOM素子で構成される。ガルバノミラーは100からの信号に応答し、それに対応したガルバノの位置に移動する。これを用いれば、図3に示されるように、レーザ光を観察範囲全体にラスタ走査することができる。さらに領域を指定することにより、走査範囲が限定される。

30

#### 【 0 0 5 7 】

これは、一回の走査の説明であるが、高速現象が見たい場合や、繰り返し何回も照射を行う場合、走査速度が速いことが重要である。このような場合、AOM(Acoustic-Optic Modulator)がよく利用される。AOMは音響光学変調素子であり、同様に照射位置・領域指定部104からの信号に対して、レーザ光の照射位置を高速で走査できる。

40

#### 【 0 0 5 8 】

また、時間と光量の制御は、光強度・時間指定部103によって行われ、指定された強度と時間だけ、レーザ光が透過される。光強度・時間指定部103は、例えばAOTF素子(Acoustic-Optic Tunable Filter)つまり音響光学チューナブルフィルターで構成される。AOTF素子は、高速シャッター機能により光の透過/遮断を高速で切り換えることができ、これにより高精度な領域指定と時間指定が実現される。つまり、レーザ照射する微小な領域に対するレーザON/OFF制御が達成される。

50



## 【 0 0 5 9 】

その様子は図 4 を用いて説明される。レーザ光が入力される A O T F 素子 1 0 3 には、照射位置・領域制御部 1 0 0 と照射時間制御部 1 0 1 と照射光量制御部 1 0 2 からの制御信号が入力される。入力される制御信号に従って、指定された領域に対してのみレーザ光を通過させる信号が求められる。これは、レーザ光の照射時間に換算され、A O T F 素子 1 0 3 がレーザ光を通過させる時間、すなわち A O T F 素子 1 0 3 の照射 O N 時間となる。

## 【 0 0 6 0 】

A O T F 素子 1 0 3 を通過したレーザ光は、ガルバノミラー 1 0 4 により指定領域に割り振られ試料に照射される。A O T F 素子 1 0 3 の照射 O N 時間と、ガルバノミラー 1 0 4 の走査範囲はリンクしており、指定した試料領域への照射に関連付けられている。また、レーザ光照射の O N と O F F の境界は、A O T F 素子 1 0 3 のスイッチング機能により決まるので、試料上の領域を高精度に区分けできる。

10

## 【 0 0 6 1 】

さらには、Z 方向に移動する機構を利用して、例えば対物レンズ 2 7 2 により、図 5 に示されるように、空間照射を行うことができる。

## 【 0 0 6 2 】

A F M 観察は従来技術で述べた通りに行う。特に、本システムは光反応前後の生態の挙動を観測測定するので、試料の測定部分にカンチレバーを設定し、レーザ照射前後の反応を見る。例えば、フォースカーブから力測定を行う場合、レーザ照射前つまり反応前から測定を始め、図 6 に示されるように、さらに照射後の生態の反応を観測できる。また、レーザ照射中に照射タイミング信号を発生しているので、照射中や照射後のタイミング時間が分かるとともに、その反応の進展も経時的に照らし合わせながら観測できる。図 6 には、時刻 T 1 でレーザ照射を開始し、時刻 T 2 で照射を終了し、時刻 T 2 以降何らかの反応が生じて分子間力の値が変わっていく例が示されている。

20

## 【 0 0 6 3 】

また、表面形状の観測であれば、円筒形 X Y Z スキャナー 2 1 3 を用いて X Y Z スキャンを行い画像化する。これにより A F M の機能により三次元情報が得られる。この場合もレーザ照射前後の反応を 3 D 画像化して見ることで、経時変化を伴った 4 D 画像を得ることができる。この A F M の X Y Z スキャンの速度が速ければ速いほど、より時間分解能を上げたリアルタイム画像が得られる。これにより、分子形状の変化、1 分子の動き、距離、結合角度の算出に役立つデータをとることができる。

30

## 【 0 0 6 4 】

また、A F M 観測中にも平行して撮像部 1 0 6 で試料の蛍光画像や透過微分干渉画像を同時に観察でき、C P U 2 5 7 上でオーバーレイして表示ができる。さらに、高速でかつ Z 方向に分解能を高めるための観察組合せ例として、撮像部 1 0 6 の直前の光路上に、試料と共役な位置に、ノイズ光やフレア光を除去するコンフォーカルディスクを配置することにより、リアルタイムの蛍光画像観察が可能となる。コンフォーカルディスクは、ディスク上に光を透過させる為の複数の小さいピンホールを持ち、試料面の合焦位置に関する蛍光のみを通過させ、その他の面からの蛍光はカットする。従って、フレア光のない鮮明な蛍光画像が得られるだけでなく、撮像部のフレームレートに依存したリアルタイム画像観察も得られる。

40

## 【 0 0 6 5 】

また、比較的長い波長の光を発するレーザを選択してもよく、この場合、レーザ光は、散乱せずに、厚みのある試料の中まで集光され得る。これにより、試料深部や、試料を透過してカンチレバーの探針付近に光刺激を与えて、反応を見ることができる。

## 【 0 0 6 6 】

## 第二実施形態

本実施形態による原子及び分子間力顕微鏡について図 7 を参照して説明する。図 7 において、図 1 に示された部材と同じ参照符号で示された部材は同等の部材であり、その詳しい説明は省略する。

50

## 【 0 0 6 7 】

本実施形態の原子及び分子間力顕微鏡は、第一実施形態の原子及び分子間力顕微鏡に、蛍光を検出する検出光学系を追加した構成を有している。検出光学系は共焦点光学系になっており、試料のZ方向にシャープな観察画像を得ることができる。このようにレーザを用いて蛍光画像を共焦点光学顕微鏡で観察する装置はLSM ( Laser Scanning Microscope ) と言われる。またレーザ照射制御及び検出部分を含めた部分をスキャンユニット300と言う。

## 【 0 0 6 8 】

通常のLSM画像観測を述べる。試料上の着目するZ位置にZ移動機構276により位置を合わせる。レーザ光は、ミラー305で反射された後、ダイクロイックミラー304を透過する。ダイクロイックミラー304は、レーザ105からのレーザ光は透過し、それより長い波長の光は反射する特性を有している。所望の励起用のレーザによりレーザ光を試料に照射し、一般には図3に示されるように観察のXY平面をラスタ走査する。

10

## 【 0 0 6 9 】

試料から発した蛍光は、ダイクロイックミラー304に戻り、そこで反射される。その後、蛍光は、ピンホール303によって焦点面以外からの光が除外され、さらにバリアーフィルター302によって不必要な波長成分が除去された後、検出器301によって検出される。これにより、指定したZ位置でXY画像が得られる。

## 【 0 0 7 0 】

本実施形態の原子及び分子間力顕微鏡は、第一実施形態と同様に、局部的にレーザ照射できる光学系も兼ね備えている。従って、前述した通り、所望の部位にレーザ照射を行った後に、画像観察用のレーザに切り替え、AFM観察と同時に蛍光画像観察のLSM像を取得できる。

20

## 【 0 0 7 1 】

この応用として、Z移動機構276により所望のステップでZ位置を移動させながら各Z位置での複数のXY画像を取得することにより、XYZ画像の3D像を構築することもできる。

## 【 0 0 7 2 】

また、ダイクロイックミラー304やバリアーフィルター302の光学フィルターは、蛍光試薬の励起、蛍光波長により最適な選択が必要であり、所望の特性のものに交換可能である。

30

## 【 0 0 7 3 】

また、検出器301は、一般にPMT ( フォトマルチプライヤー ) で構成されるが、検出対象によってはPDやCCDで構成されてもよい。

## 【 0 0 7 4 】

## 第三実施形態

本実施形態による原子及び分子間力顕微鏡について図8を参照して説明する。図8において、図7に示された部材と同じ参照符号で示された部材は同等の部材であり、その詳しい説明は省略する。

## 【 0 0 7 5 】

本実施形態の原子及び分子間力顕微鏡は、図8に示されるように、第二実施形態の原子及び分子間力顕微鏡に、試料211を透過したレーザ光を検出する検出器401を追加した構成を有している。

40

## 【 0 0 7 6 】

つまり、本実施形態の原子及び分子間力顕微鏡は、レーザ105から発せられ試料211を透過したレーザ光を検出する検出器401を備えている。検出器401はファイバーを介して透過照明装置274と光学的に接続されている。透過照明装置274はファイバーを介して照明光源108とも光学的に接続されている。つまり、照明光源108から照明光を導くファイバーと、透過照明装置274からレーザ光を導くファイバーとは二分岐になっており、透過照明装置274は照明と検出を兼ねた構成となっている。

50

## 【 0 0 7 7 】

レーザ 1 0 5 から発せられ試料 2 1 1 を透過し透過照明装置 2 7 4 を透過したレーザ光を検出器 4 0 1 で検出することによって、L S M 蛍光画像と同様に、レーザ光による試料 2 1 1 の透過画像を得ることができる。このように、L S M の蛍光観察像のみならず、検出器 4 0 1 によりレーザ透過画像を得ることができ、多方面の観察が可能となる。

## 【 0 0 7 8 】

光強度・時間指定部 1 0 3 は、A O T F 素子の波長選択機能を用いて、複数の任意領域に、異なる波長の複数のレーザ光を、異なる強度で照射することも可能である。

## 【 0 0 7 9 】

照射領域は、X Y 平面や X Y Z 空間のみならず、X Z 平面や Y Z 平面、あるいは任意の平面上の直線や曲線であってもよい。 10

## 【 0 0 8 0 】

また、これらの処理は、ハードウェアとソフトウェアのどちらによっても実現可能である。

## 【 0 0 8 1 】

これまで、図面を参照しながら本発明の実施の形態を述べたが、本発明は、これらの実施の形態に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において様々な変形や変更が施されてもよい。

## 【 0 0 8 2 】

例えば、上述した実施形態では、入力部 1 0 9 としてマウスを例示したが、入力部 1 0 9 はキーボードやジョイスティックなどで構成されてもよい。 20

## 【 0 0 8 3 】

また、走査機構は、円筒形 X Y Z スキャナ 2 1 3 に限らず、照明光やレーザ光を遮らない構造であれば、任意のものが適用され得る。また、変位検出ユニット 2 3 0 の支持形態も上方から保持することに限定されない。例えば、円筒形 X Y Z ステージスキャナをステージ 2 7 1 上に配置し、これにより変位検出ユニット 2 3 0 を下方から支持してもよい。

## 【 0 0 8 4 】

## 【 発明の効果 】

本発明の原子及び分子間力顕微鏡によれば、試料の所望の位置と領域に光ビームを所望の時間と光強度で照射することにより、光刺激に反応して起こる試料の局所的な部位の各種反応を A F M 観察することができる。 30

## 【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 本発明の第一実施形態による原子及び分子間力顕微鏡の構成を示している。

【 図 2 】 図 1 の撮像部で得られる画像と、それに対して設定される照射エリアと、実際に照射されるレーザ光とを示している。

【 図 3 】 レーザ光が試料面に対してラスタ走査される様子を示している。

【 図 4 】 微小な領域に対するレーザ O N / O F F 制御の様子を示している。

【 図 5 】 レーザ光が空間照射される様子を示している。

【 図 6 】 レーザ O N / O F F の時間制御とそれに対する試料の分子間力値の時間的变化を示している。 40

【 図 7 】 本発明の第二実施形態による原子及び分子間力顕微鏡の構成を示している。

【 図 8 】 本発明の第三実施形態による原子及び分子間力顕微鏡の構成を示している。

【 図 9 】 従来の典型的な A F M の全体構成を示している。

【 図 1 0 】 図 9 の上下二分割型 P D の上側センサ A と下側センサ B と、それに入射するカンチレバーからの反射光とを示している。

【 図 1 1 】 特開平 8 - 3 0 4 4 2 0 号公報に開示された、倒立型顕微鏡を用いた原子間力顕微鏡装置の構成を示している。

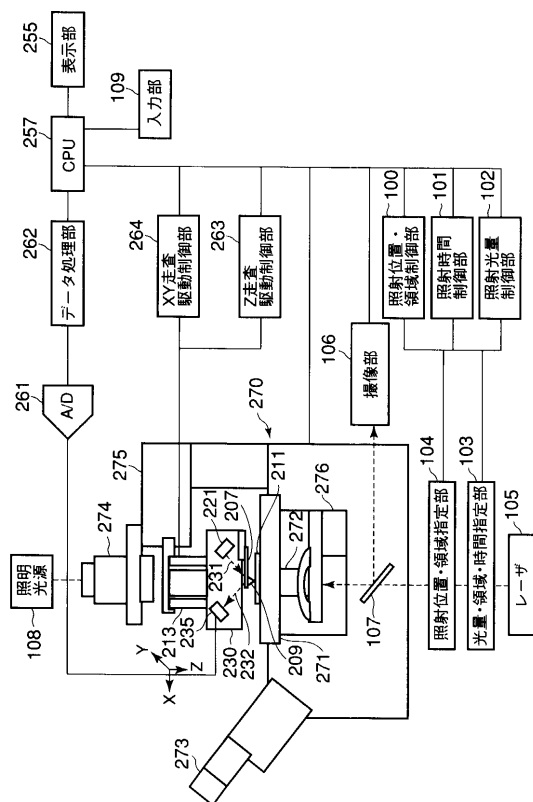
## 【 符号の説明 】

1 0 0 照射位置・領域制御部

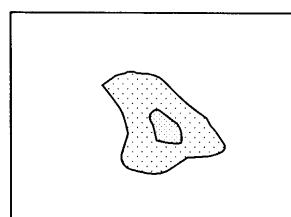
- |       |             |
|-------|-------------|
| 1 0 1 | 照射時間制御部     |
| 1 0 2 | 照射光量制御部     |
| 1 0 3 | 光強度・時間指定部   |
| 1 0 4 | 照射位置・領域指定部  |
| 1 0 5 | レーザ         |
| 1 0 6 | 撮像部         |
| 2 0 7 | カンチレバー      |
| 2 0 9 | 探針          |
| 2 1 3 | X Y Z スキャナー |
| 2 2 1 | レーザ発振器      |
| 2 3 0 | 変位検出ユニット    |
| 2 3 5 | 検出器         |
| 2 5 5 | 表示部         |
| 2 5 7 | C P U       |
| 2 6 2 | データ処理部      |
| 2 6 3 | Z 走査駆動制御部   |
| 2 6 4 | X Y 走査駆動制御部 |
| 2 7 0 | 倒立型顕微鏡      |

10

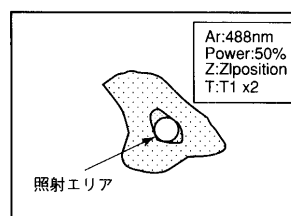
【图 1】



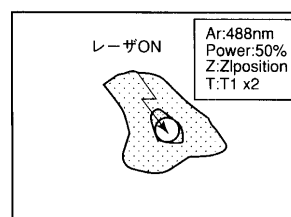
【圖 2】



(a) カメラ観察による細胞像

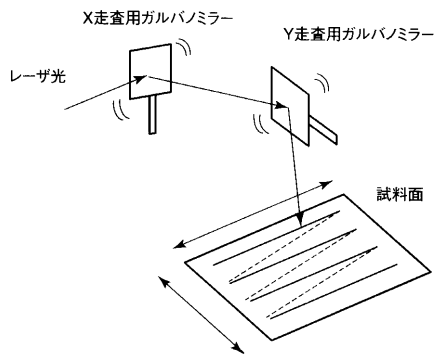


(b) 照射位置指定

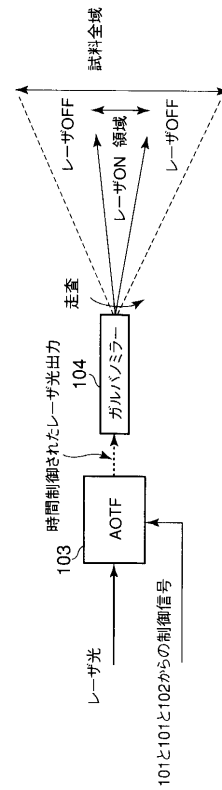


(c) レーザ光照射

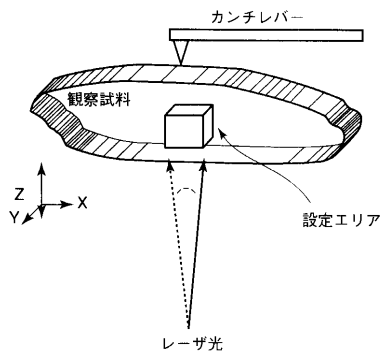
【図 3】



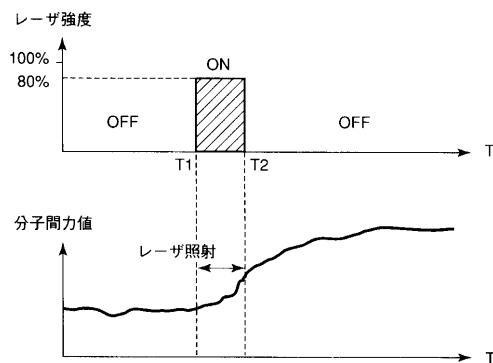
【図 4】



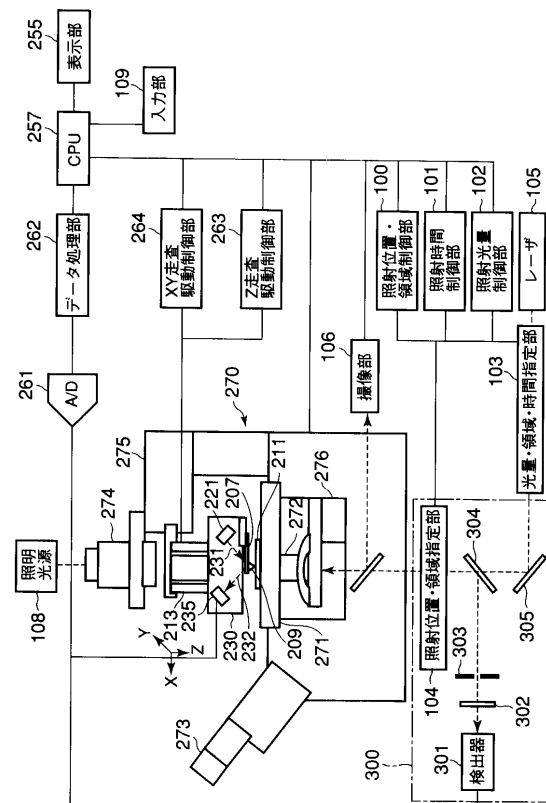
【図 5】



【図 6】



【図 7】





---

フロントページの続き

(72)発明者 小林 茂

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学工業株式会社内

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA02 EA01 FA01 FA02 FA03 HA01 HA02 HA07  
HA15 JA02 KA02 KA05 KA09 LA02 LA03  
2G045 CB01 DA13 DA36 FA11 FA12 FA16 FB12