

(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2014-6308

(P2014-6308A)

(43) 公開日 平成26年1月16日(2014.1.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 2 B 21/00 (2006.01)	G O 2 B 21/00	2 G O 4 3
G O 1 N 21/64 (2006.01)	G O 1 N 21/64	2 H O 5 2

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2012-140232 (P2012-140232)	(71) 出願人	000000376
(22) 出願日	平成24年6月21日 (2012. 6. 21)		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
		(74) 代理人	100074099
			弁理士 大菅 義之
		(72) 発明者	高塚 洋文
			東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ
			リンパス株式会社内
		Fターム(参考)	2G043 AA03 BA16 EA01 FA01 FA02
			GA01 GB01 HA01 HA02 HA03
			HA05 HA07 HA09 JA02 KA09
			LA02
			2H052 AA08 AA09 AB04 AB29 AC04
			AC15 AC26 AC27 AC34

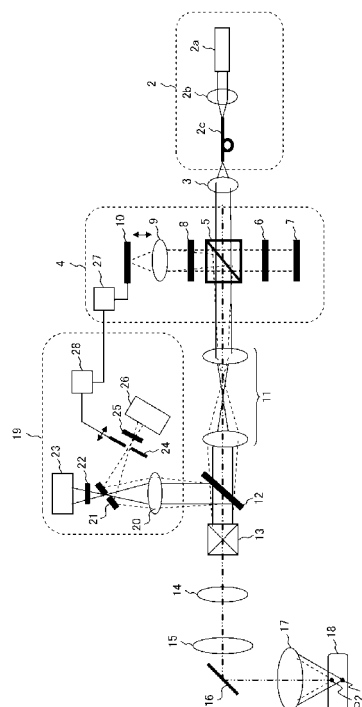
(54) 【発明の名称】 走査型共焦点レーザ顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】 1回の標本走査で複数のスライス画像を取得し得る走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供することを課題とする。

【解決手段】 走査型共焦点レーザ顕微鏡1は、単一のレーザ光源2aと、レーザ光を標本の光軸方向に異なる複数の集光位置に集光させる多焦点形成部4と、複数の集光位置からの蛍光を検出する多焦点検出部19を含む。多焦点形成部4は、少なくとも1つの集光位置を光軸方向に変更する第1の制御部27を含む。多焦点検出部19は、各々が対応する集光位置からの蛍光と他の位置からの蛍光とを分割する複数の共焦点絞り21、24と、各々が対応する集光位置から生じる蛍光に対応する共焦点絞りを介して検出する複数のPMT23、26と、第1の制御部27により変更された集光位置とその集光位置に対応する共焦点絞り24との共役関係を維持する第2の制御部28を含む。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レーザ光を出射する単一のレーザ光源と、

前記単一のレーザ光源から出射された前記レーザ光を標本の光軸方向に異なる複数の集光位置に集光させる多焦点形成部であって、前記複数の集光位置のうちの少なくとも 1 つの集光位置を光軸方向に変更する集光位置変更手段を含む多焦点形成部と、

各々が前記複数の集光位置のうちの対応する集光位置からの検出光と他の位置からの検出光とを分割する複数の共焦点手段と、各々が前記複数の集光位置のうちの対応する集光位置から生じる検出光を前記複数の共焦点手段のうちの対応する共焦点手段を介して検出する複数の検出手段と、前記集光位置変更手段により変更された集光位置と前記複数の共焦点手段のうちの前記変更された集光位置に対応する共焦点手段との共役関係を維持する検出位置変更手段と、を含む多焦点検出部と、を含むことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記多焦点形成部は、さらに、前記レーザ光を分割する光路分割手段を含み、

前記集光位置変更手段は、前記光路分割手段で分割されたレーザ光の少なくとも 1 つの光路上の光学素子を制御して、前記複数の集光位置のうちの少なくとも 1 つの集光位置を光軸方向に変更する

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

20

【請求項 3】

請求項 2 に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記多焦点形成部は、さらに、前記光路分割手段で分割されたレーザ光の少なくとも 1 つの光路上に、

集光レンズと、

前記集光レンズを介して入射するレーザ光を前記集光レンズに向けて反射させて前記光路分割手段に入射させる反射部材と、を含み、

前記集光位置変更手段は、前記集光レンズと前記反射部材との間隔を変更する

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

30

【請求項 4】

請求項 2 に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記多焦点形成部は、さらに、前記光路分割手段で分割されたレーザ光の少なくとも 1 つの光路上に、デフォーダブルミラーを含み、

前記集光位置変更手段は、前記デフォーダブルミラーの曲率を変更する

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

【請求項 5】

請求項 2 乃至請求項 4 のいずれか 1 項に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記多焦点形成部は、収斂状態が異なる複数の光束であって、前記複数の光束の光軸の方向が互いに異なる、という複数の光束を出射する

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

40

【請求項 6】

請求項 1 に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記多焦点形成部は、さらに、前記レーザ光の特定の偏光成分の位相を変調する位相変調型空間光変調器を含み、

前記集光位置変更手段は、前記位相変調型空間光変調器を制御して、前記レーザ光の一部の位相を変調し、前記複数の集光位置のうちの少なくとも 1 つの集光位置を光軸方向に変更する

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

【請求項 7】

請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

50

前記複数の共焦点手段の各々は、対応する集光位置からの検出光を反射させ、他の位置からの検出光を透過させる、または、対応する集光位置からの検出光を透過させ、他の位置からの検出光を反射させる

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記複数の共焦点手段の各々は、対応する集光位置と共役な位置に開口が形成された、反射コーティングされた部材である

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

【請求項 9】

10

請求項 7 に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記複数の共焦点手段の各々は、対応する集光位置と共役な位置に反射コーティングされた、透明部材である

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

【請求項 10】

請求項 7 乃至請求項 9 のいずれか 1 項に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記検出位置変更手段は、前記集光位置変更手段により変更される集光位置に対応する共焦点手段の前記標本側に配置された光学素子を移動させる、または、交換する

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

【請求項 11】

20

請求項 7 乃至請求項 9 のいずれか 1 項に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、

前記検出位置変更手段は、前記集光位置変更手段により変更される集光位置に対応する共焦点手段を光軸方向に移動させる

ことを特徴とする走査型共焦点レーザ顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、走査型共焦点レーザ顕微鏡に関し、特に、標本の三次元画像を生成する走査型共焦点レーザ顕微鏡に関する。

【背景技術】

30

【0002】

走査型共焦点レーザ顕微鏡により生体標本の三次元画像を生成する方法として、標本の光軸方向に異なる面のスライス画像を、対物レンズなどを光軸方向に移動させることで順次取得し、それらを合成する方法が知られている。

【0003】

しかしながら、ガルバノミラーなどにより光軸と直交する方向に標本を走査することで取得されるスライス画像はその取得に相応の時間を要するため、各面のスライス画像を順次取得する上述した方法を用いた場合には、三次元画像を高速に生成することが難しい。

【0004】

このため、近年では、より高速に 3 次元画像を生成し得る走査型共焦点レーザ顕微鏡が

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特開 2009 - 198980 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

特許文献 1 に開示される顕微鏡は、複数のスライス画像を同時に取得することができる。しかしながら、特許文献 1 に開示される顕微鏡には、種々の技術的な課題が存在する。

50

【 0 0 0 7 】

例えば、特許文献 1 に開示される顕微鏡は、同時に取得するスライス画像の枚数と同じ数だけ照明手段と検出手段を有しているため、装置が大型化しやすい。また、特許文献 1 に開示される顕微鏡は、照明と検出の両方に用いられる光学素子を集光位置に配置しているため、その光学素子に埃などが付着した場合に、大きく性能が劣化してしまう。特に、可干渉性の強いレーザ光が作用する照明においては、その影響は顕著である。

このため、特許文献 1 に開示される顕微鏡とは異なる構成を有する、高速に 3 次元画像を生成し得る走査型共焦点レーザ顕微鏡が求められている。

以上のような実情を踏まえ、本発明は、1 回の標本走査で複数のスライス画像を取得し得る走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供することを課題とする。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本願の第 1 の態様は、レーザ光を出射する単一のレーザ光源と、前記単一のレーザ光源から出射された前記レーザ光を標本の光軸方向に異なる複数の集光位置に集光させる多焦点形成部であって、前記複数の集光位置のうちの少なくとも 1 つの集光位置を光軸方向に変更する集光位置変更手段を含む多焦点形成部と、各々が前記複数の集光位置のうちの対応する集光位置からの検出光と他の位置からの検出光とを分割する複数の共焦点手段と、各々が前記複数の集光位置のうちの対応する集光位置から生じる検出光を前記複数の共焦点手段のうちの対応する共焦点手段を介して検出する複数の検出手段と、前記集光位置変更手段により変更された集光位置と前記複数の共焦点手段のうちの前記変更された集光位置に対応する共焦点手段との共役関係を維持する検出位置変更手段と、を含む多焦点検出部と、を含む走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

20

【 0 0 0 9 】

本願の第 2 の態様は、第 1 の態様に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記多焦点形成部は、さらに、前記レーザ光を分割する光路分割手段を含み、前記集光位置変更手段は、前記光路分割手段で分割されたレーザ光の少なくとも 1 つの光路上の光学素子を制御して、前記複数の集光位置のうちの少なくとも 1 つの集光位置を光軸方向に変更する走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

【 0 0 1 0 】

本願の第 3 の態様は、第 2 の態様に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記多焦点形成部は、さらに、前記光路分割手段で分割されたレーザ光の少なくとも 1 つの光路上に、集光レンズと、前記集光レンズを介して入射するレーザ光を前記集光レンズに向けて反射させて前記光路分割手段に入射させる反射部材と、を含み、前記集光位置変更手段は、前記集光レンズと前記反射部材との間隔を変更する走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

30

【 0 0 1 1 】

本願の第 4 の態様は、第 2 の態様に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記多焦点形成部は、さらに、前記光路分割手段で分割されたレーザ光の少なくとも 1 つの光路上に、デフォーダブルミラーを含み、前記集光位置変更手段は、前記デフォーダブルミラーの曲率を変更する走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

40

【 0 0 1 2 】

本願の第 5 の態様は、第 2 の態様乃至第 4 の態様のいずれか 1 つに記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記多焦点形成部は、収斂状態が異なる複数の光束であって、前記複数の光束の光軸の方向が互いに異なる、という複数の光束を出射する走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

【 0 0 1 3 】

本願の第 6 の態様は、第 1 の態様に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記多焦点形成部は、さらに、前記レーザ光の特定の偏光成分の位相を変調する位相変調型空間光変調器を含み、前記集光位置変更手段は、前記位相変調型空間光変調器を制御して、前記レーザ光の一部の位相を変調し、前記複数の集光位置のうちの少なくとも 1 つの集光位

50

置を光軸方向に変更する走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

【0014】

本願の第7の態様は、第1の態様乃至第6の態様のいずれか1つに記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記複数の共焦点手段の各々は、対応する集光位置からの検出光を反射させ、他の位置からの検出光を透過させる、または、対応する集光位置からの検出光を透過させ、他の位置からの検出光を反射させる走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

【0015】

本願の第8の態様は、第7の態様に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記複数の共焦点手段の各々は、対応する集光位置と共役な位置に開口が形成された、反射コーティングされた部材である走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

10

【0016】

本願の第9の態様は、第7の態様に記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記複数の共焦点手段の各々は、対応する集光位置と共役な位置に反射コーティングされた、透明部材である走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

【0017】

本願の第10の態様は、第7の態様乃至第9の態様のいずれか1つに記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記検出位置変更手段は、前記集光位置変更手段により変更される集光位置に対応する共焦点手段の前記標本側に配置された光学素子を移動させる、または、交換する走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

20

【0018】

本願の第11の態様は、第7の態様乃至第9の態様のいずれか1つに記載の走査型共焦点レーザ顕微鏡において、前記検出位置変更手段は、前記集光位置変更手段により変更される集光位置に対応する共焦点手段を光軸方向に移動させる走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供する。

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、1回の標本走査で複数のスライス画像を取得し得る走査型共焦点レーザ顕微鏡を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

30

【0020】

【図1】本発明の実施例1に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成を例示した図である。

【図2】本発明の実施例2に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成の一部を例示した図である。

【図3】本発明の実施例3に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成の一部を例示した図である。

【図4】本発明の実施例4に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成の一部を例示した図である。

【図5】本発明の実施例5に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成の一部を例示した図である。

40

【図6】本発明の実施例6に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の多焦点形成部の構成を例示した図である。

【図7】本発明の実施例6に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の多焦点検出部の構成を例示した図である。

【図8】本発明の実施例7に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成を例示した図である。

【図9】本発明の実施例7に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の走査対象範囲を説明するための図である。

【発明を実施するための形態】

【実施例1】

【0021】

50

図 1 は、本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成を例示した図である。図 1 に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 は、対物レンズ 17 の光軸方向に異なる標本 18 の複数の面のスライス画像を同時に取得して、標本 18 の 3 次元画像を生成する走査型共焦点レーザ顕微鏡である。

【0022】

走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 は、照明光路上に、ファイバ光源ユニット 2 と、コリメートレンズ 3 と、多焦点形成部 4 と、リレー光学系 11 と、レーザ光を透過させ標本 18 からの蛍光を反射させるダイクロイックミラー 12 と、標本 18 を対物レンズ 17 の光軸と直交する方向に走査するガルバノミラー 13 と、瞳レンズ 14 と、結像レンズ 15 と、ミラー 16 と、対物レンズ 17 と、備えている。

10

【0023】

ファイバ光源ユニット 2 は、標本 18 を励起するレーザ光を出射する単一のレーザ光源 2a と、光ファイバ 2c と、レーザ光を光ファイバ 2c の入射端に集光させるカップリングレンズ 2b と、を備えている。光ファイバ 2c の射出端から発散光束として出射されたレーザ光は、コリメートレンズ 3 によりコリメートされて、コリメートレンズ 3 から平行光束として出射される。

【0024】

多焦点形成部 4 は、レーザ光を分割するための偏光ビームスプリッタ（以降、PBS と記す）5 と、PBS 5 により分割されたレーザ光の一方の光路上に配置された、 $\lambda/4$ 板 6 と、ミラー 7 と、 $\lambda/4$ 板 8 と、集光レンズ 9 と、集光レンズ 9 の光軸方向に移動自在に配置されたミラー 10 と、を備えている。多焦点形成部 4 は、さらに、集光レンズに近接して配置されているミラー 10 を光軸方向に移動させる第 1 の制御部 27 を備えている。

20

【0025】

PBS 5 は、平行光束として PBS 5 の斜面に入射したレーザ光のうちの P 偏光成分を透過させ、レーザ光の S 偏光成分を反射させる特性を有している。このため、ファイバ光源ユニット 2 から出射される直線偏光であるレーザ光が PBS 5 の斜面に対して S 偏光成分と P 偏光成分を有するようにレーザ光源 2a が配置されることで、PBS 5 はレーザ光を分割する光路分割手段として機能する。

【0026】

多焦点形成部 4 に入射したレーザ光のうち PBS 5 の斜面を透過した P 偏光であるレーザ光は、P 偏光のまま多焦点形成部 4 から出射される。一方、PBS 5 の斜面を反射した S 偏光であるレーザ光は、ミラー 7 で反射して再び PBS 5 に入射する。レーザ光は PBS 5 の斜面を反射してから PBS 5 に再入射するまでの間に 2 度 $\lambda/4$ 板 6 を通過して P 偏光となっているため、再入射した PBS 5 の斜面を透過する。さらに、PBS 5 の斜面を透過した P 偏光であるレーザ光は、集光レンズ 9 を介して入射するミラー 10 で反射して再び PBS 5 に入射する。レーザ光は PBS 5 の斜面を透過してから PBS 5 に再入射するまでの間に 2 度 $\lambda/4$ 板 8 を通過して S 偏光となっているため、再入射した PBS 5 の斜面を反射して、多焦点形成部 4 から出射される。つまり、PBS 5 で P 偏光成分と S 偏光成分に分割されたレーザ光は、それぞれの偏光方向が直交した状態で多焦点形成部 4 から出射される。

30

40

【0027】

また、多焦点形成部 4 のミラー 10 は、集光レンズ 9 を介して入射するレーザ光を集光レンズ 9 に向けて反射させて PBS 5 に再入射させる反射部材であり、上述したように、第 1 の制御部 27 により集光レンズ 9 の光軸方向に移動自在である。このため、ミラー 10 で反射したレーザ光は、ミラー 10 の位置に応じて異なる状態で多焦点形成部 4 から出射される。具体的には、ミラー 10 が集光レンズ 9 の焦点面に配置されている場合であれば平行光束として、ミラー 10 が焦点面より集光レンズ 9 から離れた面に配置されている場合であれば収斂光束として、ミラー 10 が焦点面より集光レンズ 9 に近い面に配置されている場合であれば発散光束として、多焦点形成部 4 から出射される。

50

【 0 0 2 8 】

従って、多焦点形成部 4 は、平行光束として入射するレーザ光源 2 からのレーザ光を収斂状態の異なる複数のレーザ光束（実線で示す平行光束と、破線で示す収斂光束）に変換して出射する。ここで、収斂状態とは、光束が収斂光束である状態だけでなく、平行光束である状態や発散光束である状態も含むものである。収斂状態の異なる光束は、リレー光学系 1 1 を介して入射するダイクロイックミラー 1 2 を透過し、複数の光学素子（ガルバノミラー 1 3、瞳レンズ 1 4、結像レンズ 1 5、ミラー 1 6、対物レンズ 1 7）を介して標本 1 8 の光軸方向に異なる集光位置（集光位置 P 1、集光位置 P 2）に集光する。即ち、多焦点形成部 4 は、レーザ光を標本 1 8 の光軸方向に異なる複数の集光位置に集光させるための手段として機能する。

10

【 0 0 2 9 】

また、多焦点形成部 4 では、第 1 の制御部 2 7 がミラー 1 0 を光軸方向に移動させることで、ミラー 1 0 で反射したレーザ光の標本 1 8 上の集光位置 P 2 が光軸方向に変化する。即ち、第 1 の制御部 2 7 は、多焦点形成部 4 により形成される複数の集光位置のうちの少なくとも 1 つの集光位置を光軸方向に変更する集光位置変更手段であり、多焦点形成部 4 は、集光位置変更手段として第 1 の制御部 2 7 を備えている。

【 0 0 3 0 】

なお、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 では、集光レンズ 9 の瞳位置は、リレー光学系 1 1 によりガルバノミラー 1 3 に投影されていることが望ましい。このとき、集光レンズ 9 の瞳位置とガルバノミラー 1 3 は光学的に共役な関係となっている。このため、ミラー 1 0 の位置を変えてもケラレによる光量ロスがなく、NA が一定となるため解像力の低下が起

20

【 0 0 3 1 】

走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 は、さらに、ダイクロイックミラー 1 2 により照明光路から分岐した検出光路上に、複数の集光位置からの蛍光の各々を検出光として同時に且つ別個に検出する多焦点検出部 1 9 を備えている。

【 0 0 3 2 】

多焦点検出部 1 9 は、集光レンズ 2 0 と、複数の共焦点絞り（共焦点絞り 2 1、共焦点絞り 2 4）と、複数のバリアフィルタ（バリアフィルタ 2 2、バリアフィルタ 2 5）と、複数の光電子増倍管（以降、PMT と記す。PMT 2 3、PMT 2 6）と、を備えている。

30

【 0 0 3 3 】

複数の共焦点絞りの各々は、多焦点形成部 4 により形成される複数の集光位置のうちの対応する集光位置と共役な位置に開口が形成された、反射コーティングされた部材である。具体的には、共焦点絞り 2 1 は多焦点形成部 4 から平行光束として射出されるレーザ光（図 1 の実線）の集光位置 P 1 に対応する共焦点絞りであり、共焦点絞り 2 4 は多焦点形成部 4 から収斂光束として射出されるレーザ光（図 1 の破線）の集光位置 P 2 に対応する共焦点絞りである。

【 0 0 3 4 】

複数のバリアフィルタの各々は、対応する共焦点手段を介して入射する光に含まれるレーザ光を遮断するバリアフィルタである。具体的には、バリアフィルタ 2 2 は集光位置 P 1 及び共焦点絞り 2 1 に対応するバリアフィルタであり、バリアフィルタ 2 5 は集光位置 P 2 及び共焦点絞り 2 4 に対応するバリアフィルタである。

40

【 0 0 3 5 】

複数の PMT の各々は、対応する集光位置から生じる、対応する共焦点手段を介して入射する蛍光を検出する検出手段である。具体的には、PMT 2 3 は集光位置 P 1 及び共焦点絞り 2 1 に対応する検出手段であり、PMT 2 6 は集光位置 P 2 及び共焦点絞り 2 4 に対応する検出手段である。

【 0 0 3 6 】

50

第2の制御部28は、第1の制御部27がミラー10を光軸方向に移動させることにより変更される集光位置P2に対応する共焦点絞り24を、光軸方向に移動させる手段であり、第1の制御部27と電氣的に接続されている。

【0037】

複数の集光位置の各々から生じた蛍光は、対物レンズ17、ミラー16、結像レンズ15、瞳レンズ14、ガルバノミラー13を介して入射するダイクロイックミラー12で反射し、多焦点検出部19に入射する。

【0038】

集光位置P1、集光位置P2から生じた蛍光は、集光位置の違いにより集光レンズ20に異なる収斂状態で入射し、異なる位置に集光する。集光位置P1から生じた蛍光は、集光位置P1と光学的に共役な位置に形成された共焦点絞り21の開口に集光して共焦点絞り21を通過し、パリアフィルタ22を介してPMT23で検出される。一方、集光位置P1を除く他の位置から生じた光は、反射コーティングされた共焦点絞り21を反射する。共焦点絞り21を反射した光のうち集光位置P2から生じた蛍光は、集光位置P2と光学的に共役な位置に形成された共焦点絞り24の開口に集光して共焦点絞り24を通過し、パリアフィルタ25を介してPMT26で検出される。また、集光位置P1及び集光位置P2を除く他の位置から生じた光は、反射コーティングされた共焦点絞り24を反射する。つまり、共焦点絞り21及び共焦点絞り24は、対応する集光位置からの蛍光を反射させて他の位置からの光を透過させることで、それらを分割する共焦点手段である。

【0039】

第1の制御部27がミラー10を制御して集光位置P2を変化させると、第2の制御部28は、共焦点絞り24の開口が集光位置P2と光学的に共役な位置に位置するように、共焦点絞り24を光軸方向に移動させる。つまり、第2の制御部28は、第1の制御部27と連動して動作し、第1の制御部27により変更された集光位置P2とその集光位置P2に対応する共焦点手段である共焦点絞り24との共役関係を維持する検出位置変更手段であり、多焦点検出部19は、検出位置変更手段として第2の制御部28を備えている。

【0040】

以上のように構成された走査型共焦点レーザ顕微鏡1によれば、1回の標本走査で光軸方向に異なる複数の標本面を同時に走査して複数のスライス画像を取得することができるため、高速に3次元画像を生成することができる。

【0041】

また、走査型共焦点レーザ顕微鏡1は、単一のレーザ光源から出射されたレーザ光を複数の集光位置に集光させる構成を採用しているため、集光位置毎にレーザ光源を設ける必要がなく、走査型共焦点レーザ顕微鏡1の構成の大型化を最小限に抑えることができる。

【0042】

さらに、走査型共焦点レーザ顕微鏡1では、ミラー10を移動させるだけで集光位置を変化させることが可能であり、また、共焦点絞り24を移動させるだけで変化した集光位置からの蛍光を検出することができる。このため、照明系と検出系のそれぞれの最小限の光学素子の制御によって、生成する3次元画像の解像度などに応じて、同時に取得するスライド画像間の間隔を調整することができる。従って、照明系や検出系の全体を標本に対して相対的に移動させるような大掛かりな制御機構を必要としないため、小型の制御機構を採用して装置全体をコンパクトに構成することが可能となる。

【0043】

また、走査型共焦点レーザ顕微鏡1では、照明光路上の集光位置に光学素子を配置しない構成を採用しているため、集光位置に配置された光学素子に付着した埃などによって高い干渉性を有するレーザ光が散乱し大幅に光量を損失するといった自体を避けることができる。なお、走査型共焦点レーザ顕微鏡1では、ミラー10が集光レンズ9の焦点位置に配置された状態では、ミラー10は集光位置に位置することになるが、標本18の複数の面を同時に走査するためにはミラー10は集光レンズ9の焦点位置からずれた位置に配置されるのが通常である。従って、走査型共焦点レーザ顕微鏡1によれば、単一の光源から

のレーザ光を効率良く標本に照射することが可能である。

【0044】

本実施例では、第1の制御部27がミラー10を光軸方向に移動させることによって、集光位置を変化させる構成が例示されているが、第1の制御部27は、集光レンズ9とミラー10との間隔を変更するように構成されていれば良く、例えば、ミラー10の代わりに集光レンズ9を移動させてもよい。また、集光レンズ9を複数のレンズで構成し、第1の制御部27が集光レンズ9を構成するレンズ間の距離を変化させることで集光位置を変化させてもよい。また、第1の制御部27が厚さの異なる複数の透明部材から選択した部材を集光レンズ9とミラー10の間に挿入することで集光位置を変化させてもよい。

【0045】

また、本実施例では、光路分割手段としてPBS5を例示したが、光路分割手段は、レーザ光を分割する機能を有していれば良く、例えば、PBS5の代わりにハーフミラーを用いてもよい。この場合、 $\lambda/4$ 板6及び $\lambda/4$ 板8を省略することができる。

【実施例2】

【0046】

図2は、本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成の一部を例示した図である。図2に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡30は、多焦点形成部4の代わりに多焦点形成部31を含んでいる点が、図1に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡1と異なっている。走査型共焦点レーザ顕微鏡30のその他の構成は、走査型共焦点レーザ顕微鏡1と同様であるため、詳細な説明は省略する。

【0047】

多焦点形成部31は、図2に示されるように、集光レンズ9及びミラー10の代わりにデフォーダブルミラー32を含み、第1の制御部27がデフォーダブルミラー32の曲率を変更する点が、図1に例示される多焦点形成部4と異なっている。

【0048】

多焦点形成部31は、第1の制御部27がデフォーダブルミラー32の曲率を変更することで、デフォーダブルミラー32で反射したレーザ光の収斂状態を変更することができる。

従って、走査型共焦点レーザ顕微鏡30によっても、走査型共焦点レーザ顕微鏡1と同様の効果を得ることができる。

【実施例3】

【0049】

図3は、本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成の一部を例示した図である。図3に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡40は、多焦点形成部4の代わりに多焦点形成部41を含んでいる点が、図1に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡1と異なっている。走査型共焦点レーザ顕微鏡40のその他の構成は、走査型共焦点レーザ顕微鏡1と同様であるため、詳細な説明は省略する。

【0050】

多焦点形成部41は、図3に示されるように、レーザ光の特定の偏光成分の位相を変調する位相変調型空間光変調器（以降、LCOSと記す）43と、コリメートレンズ3からのレーザ光をLCOS43に向けて反射し、LCOS43からのレーザ光をリレー光学系11（図1を参照）に向けて反射するプリズム42とを備えている。さらに、多焦点形成部41は、LCOS43を制御する第1の制御部27を備えている。

【0051】

LCOS43は、対物レンズ17の瞳（及びガルバノミラー13）と光学的に共役な位置に配置されていて、LCOS43に入射するレーザ光のうちの、LCOS43の液晶分子の配向方向に平行な偏光方向を有する成分の位相を変調して、その波面を制御する。

なお、LCOS43は、対物レンズ17の瞳位置からずれて配置されていても目的の効果を得ることができる。

【0052】

10

20

30

40

50

多焦点形成部 4 1 は、第 1 の制御部 2 7 が L C O S 4 3 を制御して入射するレーザ光の一部の位相を変調することで、収斂状態の異なる複数のレーザ光束を出射することができる。

従って、走査型共焦点レーザ顕微鏡 4 0 によっても、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と同様の効果を得ることができる。

【実施例 4】

【0053】

図 4 は、本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成の一部を例示した図である。図 4 に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡 5 0 は、多焦点検出部 1 9 の代わりに多焦点検出部 5 1 を含んでいる点が、図 1 に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と異なっている。走査型共焦点レーザ顕微鏡 5 0 のその他の構成は、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と同様であるため、詳細な説明は省略する。

10

【0054】

多焦点検出部 5 1 は、図 4 に示されるように、レンズ 5 2 を含み、第 2 の制御部 2 8 がレンズ 5 2 を光軸方向に移動させる点が、図 1 に例示される多焦点検出部 1 9 と異なっている。なお、レンズ 5 2 は、共焦点絞り 2 1 と共焦点絞り 2 4 の間、即ち、集光位置 P 2 に対応する共焦点絞り 2 4 の標本側に配置されている。

【0055】

多焦点検出部 5 1 は、第 2 の制御部 2 8 が集光位置 P 2 と共焦点絞り 2 4 との共役関係を維持するようにレンズ 5 2 を光軸方向に移動させることで、ミラー 1 0 (図 1 を参照) の位置によらず集光位置 P 2 からの蛍光を検出することができる。

20

従って、走査型共焦点レーザ顕微鏡 5 0 によっても、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と同様の効果を得ることができる。

【0056】

本実施例では、第 2 の制御部 2 8 がレンズ 5 2 を光軸方向に移動させることによって、集光位置 P 2 と共焦点絞り 2 4 との共役関係を維持する構成が例示されているが、第 2 の制御部 2 8 は、集光位置 P 2 と共焦点絞り 2 4 との共役関係を維持するように光学素子を制御すればよい。従って、例えば、レンズ 5 2 を複数のレンズで構成し、第 1 の制御部 2 8 がレンズ 5 2 を構成するレンズ間の距離を変化させることで集光位置 P 2 と共焦点絞り 2 4 との共役関係を維持してもよい。また、第 2 の制御部 2 8 が厚さの異なる複数の透明部材または焦点距離の異なる複数のレンズから選択した光学素子を共焦点絞り 2 4 の標本側に挿入することで集光位置 P 2 と共焦点絞り 2 4 との共役関係を維持してもよい。

30

【実施例 5】

【0057】

図 5 は、本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成の一部を例示した図である。図 5 に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡 6 0 は、多焦点検出部 1 9 の代わりに多焦点検出部 6 1 を含んでいる点が、図 1 に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と異なっている。走査型共焦点レーザ顕微鏡 6 0 のその他の構成は、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と同様であるため、詳細な説明は省略する。

【0058】

40

多焦点検出部 6 1 は、図 5 に示されるように、共焦点絞り 2 1 の代わりに集光位置 P 1 と共役な位置に微小ミラー 6 3 を備えた透明部材 6 2 を、共焦点絞り 2 4 の代わりに共焦点絞り 6 4 を含む点、及び、第 2 の制御部 2 8 が共焦点絞り 6 4 を集光レンズ 2 0 の光軸方向に移動させる点が、図 1 に例示される多焦点検出部 1 9 と異なっている。なお、透明部材 6 2 の微小ミラー 6 3 は、透明部材 6 2 の領域のうちの集光位置 P 1 と共役な位置を含む微小な領域に反射コーティングすることで形成される。

【0059】

集光位置 P 1 から生じた蛍光は、集光位置 P 1 と共役な位置に形成された微小ミラー 6 3 を反射し、バリアフィルタ 2 2 を介して P M T 2 3 で検出される。一方、集光位置 P 1 を除く他の位置から生じた蛍光は、透明部材 6 2 及びバリアフィルタ 2 5 を透過する。透

50

明部材 6 2 及びバリアフィルタ 2 5 を透過した蛍光のうち集光位置 P 2 から生じた蛍光は、集光位置 P 2 と光学的に共役な位置に形成された共焦点絞り 6 4 の開口に集光して共焦点絞り 6 4 を通過し、PMT 2 6 で検出される。

【0060】

多焦点検出部 6 1 は、第 2 の制御部 2 8 が集光位置 P 2 と共焦点絞り 6 4 との共役関係を維持するように共焦点絞り 6 4 を光軸方向に移動させることで、ミラー 1 0 (図 1 を参照) の位置によらず集光位置 P 2 からの蛍光を検出することができる。

【0061】

従って、走査型共焦点レーザ顕微鏡 6 0 によっても、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と同様の効果を得ることができる。なお、走査型共焦点レーザ顕微鏡 6 0 では、蛍光の集光位置に光学素子 (微小ミラー 6 3) が位置する構成を採用するが、蛍光はレーザ光に比べて可干渉性が低いため、大幅に検出光量を損失するといった自体は起こり得ない。

【0062】

本実施例では、集光位置 P 2 に対応する共焦点手段として共焦点絞り 6 4 を例示したが、共焦点絞り 6 4 の代わりに微小ミラーを備えた透明部材を用いてもよい。この場合、PMT 2 6 は微小ミラーの反射光路上に配置され、第 2 の制御部 2 8 は微小ミラーと集光位置 P 2 との光学的に共役な関係が維持されるように透明部材を移動させればよい。

【実施例 6】

【0063】

図 6 及び図 7 は、本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の多焦点形成部及び多焦点検出部の構成を例示した図である。本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡 7 0 は、標本の光軸方向に異なる 4 面を同時に走査するために、多焦点形成部 4 の代わりに多焦点形成部 7 1 を、多焦点検出部 1 9 の代わりに多焦点検出部 8 1 を含む点が、図 1 に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と異なっている。走査型共焦点レーザ顕微鏡 7 0 のその他の構成は、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と同様であるため、詳細な説明は省略する。

【0064】

図 6 に例示される多焦点形成部 7 1 は、図 1 に例示される多焦点形成部 4 に相当する構成 (第 1 の多焦点形成部 7 1 a、第 2 の多焦点形成部 7 1 b) を直列に 2 つ並べて、且つ、その間に瞳リレー光学系 7 2 と $\lambda/4$ 板 7 3 を配置した構成を有している。つまり、多焦点形成部 7 1 は、瞳リレー光学系 7 2 と、 $\lambda/4$ 板 7 3 と、第 2 の多焦点形成部 7 1 b (PBS 7 4、 $\lambda/4$ 板 7 5、ミラー 7 6、 $\lambda/4$ 板 7 7、集光レンズ 7 8、ミラー 7 9、第 3 の制御部 8 0) をさらに含む点、及び、第 1 の制御部 2 7 及び第 3 の制御部 8 0 が後述する多焦点検出部 8 1 に含まれる第 2 の制御部 2 8、第 4 の制御部 8 8 及び第 5 の制御部 8 9 と連動する点、が多焦点形成部 4 と異なっている。

【0065】

多焦点形成部 7 1 では、第 1 の多焦点形成部 7 1 a から出射される異なる収斂状態の 2 光束 (直線偏光) は、瞳リレー光学系 7 2 を介して入射する $\lambda/4$ 板 7 3 で円偏光に変換されて、第 2 の多焦点形成部 7 1 b に入射する。そして、第 2 の多焦点形成部 7 1 b に入射した 2 光束は、それぞれ、第 2 の多焦点形成部 7 1 b で異なる収斂状態の 2 光束に変換されて出射される。即ち、多焦点形成部 7 1 は、平行光束として入射するレーザ光源 2 からのレーザ光を、収斂状態の異なる 4 つのレーザ光束 (実線で示す平行光束と、破線、一点鎖線、点線で示す 3 つの収斂光束) に変換して出射し、標本の光軸方向に異なる 4 つの集光位置に集光させるように機能する。

【0066】

なお、多焦点形成部 7 1 では、第 1 の制御部 2 7 及び第 3 の制御部 8 0 がミラー 1 0 及びミラー 7 9 を光軸方向に移動させることで、出射される 4 つのレーザ光束のうちの 3 つのレーザ光束が形成する 3 つの集光位置が光軸方向に変化する。

【0067】

図 7 に例示される多焦点検出部 8 1 は、多焦点形成部 7 1 により形成される 4 つの集光位置に対応する、4 つの共焦点絞り (共焦点絞り 2 1、共焦点絞り 2 4、共焦点絞り 8 2

10

20

30

40

50

、共焦点絞り 8 5) と、4 つのバリアフィルタ (バリアフィルタ 2 2、バリアフィルタ 2 5、バリアフィルタ 8 3、バリアフィルタ 8 6) と、4 つの P M T (P M T 2 3、P M T 2 6、P M T 8 4、P M T 8 7) と、を含んでいる。また、共焦点絞り 2 4 を移動させる第 2 の制御部 2 8 と、共焦点絞り 8 2 を移動させる第 4 の制御部 8 8 と、共焦点絞り 8 5 を移動させる第 5 の制御部 8 9 と、を含んでいる。

【 0 0 6 8 】

4 つの共焦点絞りの各々は、多焦点形成部 7 1 により形成される 4 つの集光位置のうちの対応する集光位置と共役な位置に開口が形成された、反射コーティングされた部材であり、対応する集光位置以外からの光を反射するように構成されている。また、4 つのバリアフィルタの各々は、対応する共焦点手段を介して入射する光に含まれるレーザ光を遮断するバリアフィルタであり、4 つの P M T の各々は、対応する集光位置から生じる、対応する共焦点手段を介して入射する蛍光を検出する検出手段である。

【 0 0 6 9 】

多焦点検出部 8 1 は、第 2 の制御部 2 8 が共焦点絞り 2 4 を対応する集光位置との共役な関係が維持されるように移動させて、第 4 の制御部 8 8 が共焦点絞り 8 2 を対応する集光位置との共役な関係が維持されるように移動させて、第 5 の制御部 8 9 が共焦点絞り 8 5 を対応する集光位置との共役な関係が維持されるように移動させることで、つまり、第 2 の制御部 2 8、第 4 の制御部 8 8、及び、第 5 の制御部 8 9 がそれぞれ第 1 の制御部 2 7 及び第 3 の制御部 8 0 と連動することで、多焦点形成部 7 1 のミラー 1 0 及びミラー 7 9 の位置によらず、多焦点形成部 7 1 が形成する 4 つの集光位置からの蛍光を同時且つ別個に検出することができる。

【 0 0 7 0 】

従って、走査型共焦点レーザ顕微鏡 7 0 によれば、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 に比べて、1 回の標本走査でより多くのスライス画像を取得することができるため、より高速に 3 次元画像を生成することができる。

本実施例では、標本の 4 つの面を同時に走査する構成を例示したが、同時に走査する面は 4 面に限られず、それ以上の面を同時に走査してもよい。

【 0 0 7 1 】

また、本実施例では、第 1 の多焦点形成部 7 1 a と第 2 の多焦点形成部 7 1 b の間に $\lambda / 4$ 板 7 3 を配置する構成が例示されているが、P B S 7 4 に入射するレーザ光に P B S 7 4 の斜面に対して S 偏光成分と P 偏光成分が含まれていればよいので、 $\lambda / 4$ 板 7 3 の代わりにデポライザまたは $\lambda / 2$ 板を配置しても同様の効果を得ることが出来る。

【 0 0 7 2 】

また、本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡 7 0 は、2 面を同時に走査する実施例 1 に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 を 4 面同時に走査できるように変形したものであるが、他の実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡を、4 面同時に走査できるように変形してもよい。

【 実施例 7 】

【 0 0 7 3 】

図 8 は、本実施例に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡の構成を例示した図である。図 8 に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡 9 0 は、ミラー 7 の代わりにミラー 9 2 を含んでいる点が、図 1 に例示される走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と異なっている。走査型共焦点レーザ顕微鏡 9 0 のその他の構成は、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と同様であるため、詳細な説明は省略する。

【 0 0 7 4 】

ミラー 9 2 は、P B S 5 の斜面を反射したレーザ光の進行方向に対してミラー 9 2 の法線が傾くように配置されている点が、実施例 1 に係る走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 のミラー 7 とは相違している。

【 0 0 7 5 】

ミラー 9 2 が傾いているため、P B S 5 で反射しミラー 9 2 及びミラー 1 0 を経由して

出射されるレーザ光は、P B S 5 を透過して出射されるレーザ光とは収斂状態が異なるだけでなく、光束の光軸の方向も異なっている。より具体的には、P B S 5 を透過して出射される平行光束（図 8 の実線）の光軸はリレー光学系 1 1 の光軸と一致するのに対して、P B S 5 で反射しミラー 9 2 を経由して出射される収斂光束の光軸はリレー光学系 1 1 の光軸とは一致せずリレー光学系 1 1 の光軸に対して傾いている。このため、多焦点形成部 9 1 は、図 8 に示されるように、標本 1 8 の光軸方向に異なり、且つ、光軸と直交する方向にも異なる複数の集光位置（集光位置 P 1、集光位置 P 2）を形成することができる。

なお、ミラー 9 2 を傾ける代わりにミラー 9 2 と P B S 5 の間に楔状のガラス板などの光路を曲げる光学素子を配置することによっても実現可能である。

【 0 0 7 6 】

なお、ミラー 9 2 は、集光レンズ 9 の瞳位置（または瞳共役位置）に配置されることが望ましい。集光レンズ 9 の瞳位置に配置することで、ミラー 9 2 の傾きに起因するガルバノミラー 1 3 に入射する位置の変動を防止することができる。

【 0 0 7 7 】

従って、走査型共焦点レーザ顕微鏡 9 0 によっても、走査型共焦点レーザ顕微鏡 1 と同様の効果を得ることができる。さらに、走査型共焦点レーザ顕微鏡 9 0 によれば、複数の集光位置が互いに光軸と直交する方向にもずれているため、集光位置間の光軸方向の距離が近い場合であっても、それぞれの集光位置からの蛍光を確実に別個に検出することができる。

【 0 0 7 8 】

図 9 は、走査型共焦点レーザ顕微鏡 9 0 の走査対象範囲を説明するための図であり、図 8 に示す矢印 A の方向から標本 1 8 を見た図である。走査型共焦点レーザ顕微鏡 9 0 では、集光位置 P 1 と集光位置 P 2 は光軸と直交する方向に異なっているため、図 9 に示されるように、1 回の走査で取得される複数のスライス画像では、走査対象範囲にもずれが生じる。このため、走査型共焦点レーザ顕微鏡 9 0 は、複数のスライス画像間で生じる画素ずれを補正してから、複数のスライス画像を合成して 3 次元画像を生成する。

【 符号の説明 】

【 0 0 7 9 】

1、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、9 0・・・走査型共焦点レーザ顕微鏡

2・・・ファイバ光源ユニット

2 a・・・レーザ光源

2 b・・・カップリングレンズ

2 c・・・光ファイバ

3・・・コリメートレンズ

4、3 1、4 1、7 1、9 1・・・多焦点形成部

5、7 4・・・P B S

6、8、7 3、7 5、7 7・・・ $\lambda / 4$ 板

7、1 0、1 6、7 6、7 9、9 2・・・ミラー

9、2 0、7 8・・・集光レンズ

1 1・・・リレー光学系

1 2・・・ダイクロイックミラー

1 3・・・ガルバノミラー

1 4・・・瞳レンズ

1 5・・・結像レンズ

1 7・・・対物レンズ

1 8・・・標本

1 9、5 1、6 1、8 1・・・多焦点検出部

2 1、2 4、6 4、8 2、8 5・・・共焦点絞り

2 2、2 5、8 3、8 6・・・バリアフィルタ

10

20

30

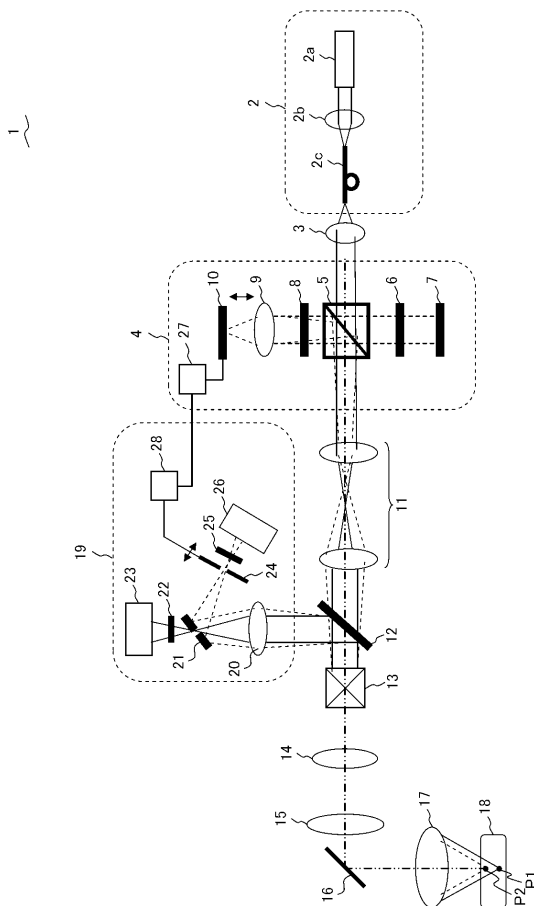
40

50

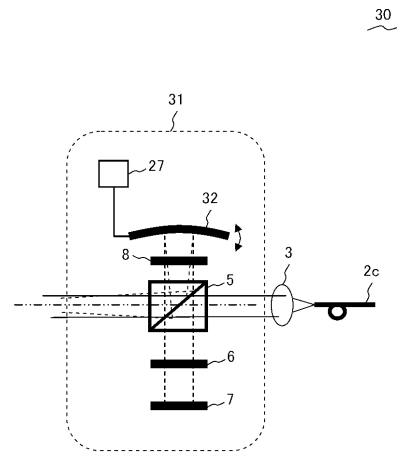
23、26、84、87・・・PMT
 27・・・第1の制御部
 28・・・第2の制御部
 32・・・デフォーダブルミラー
 42・・・プリズム
 43・・・LCOS
 52・・・レンズ
 62・・・透明部材
 63・・・微小ミラー
 71a・・・第1の多焦点形成部
 71b・・・第2の多焦点形成部
 72・・・瞳リレー光学系
 80・・・第3の制御部
 88・・・第4の制御部
 89・・・第5の制御部
 P1、P2・・・集光位置

10

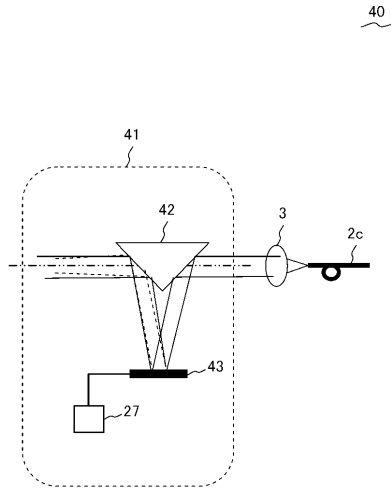
【図1】



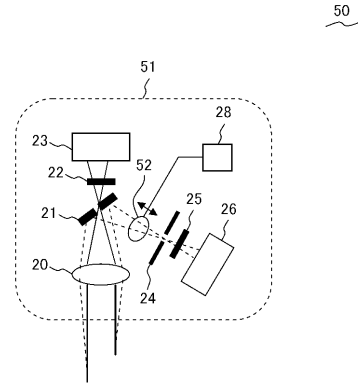
【図2】



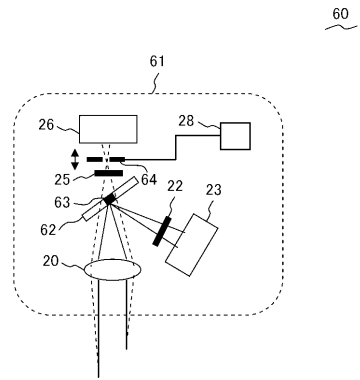
【図 3】



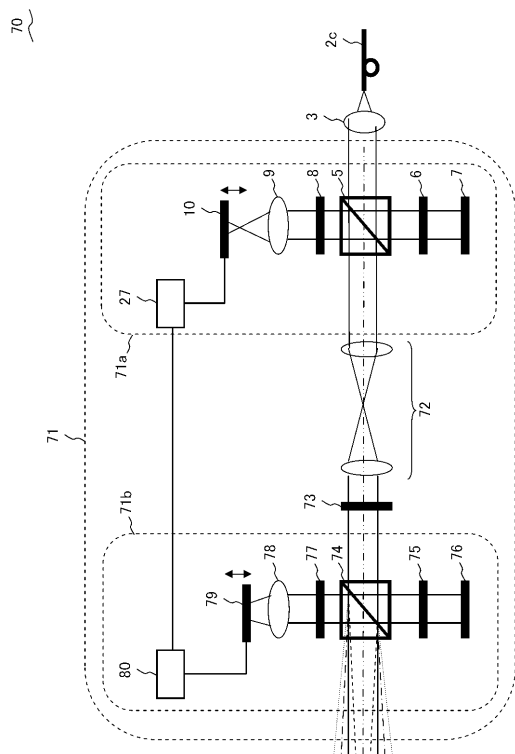
【図 4】



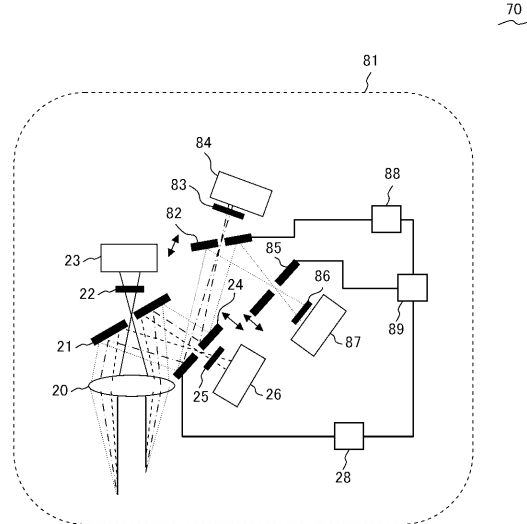
【図 5】



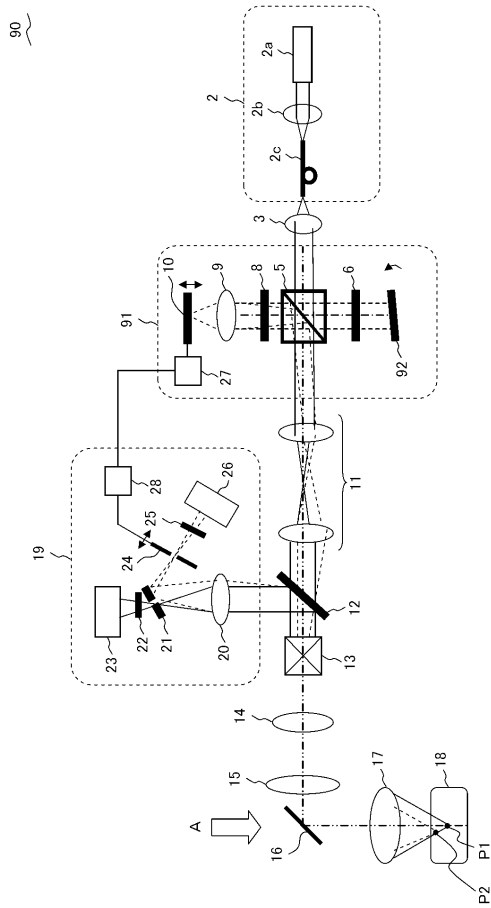
【図 6】



【図 7】



【 図 8 】



【 図 9 】

