(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2004-333579
(P2004-333579A)
(43)公開日　平成16年11月25日(2004.11.25)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G02B 21/00	G02B 21/00		2G043
G01N 21/64	G01N 21/64	E	2H052
	G01N 21/64	F	

審査請求 未請求　請求項の数 4　ＯＬ　（全 12 頁）

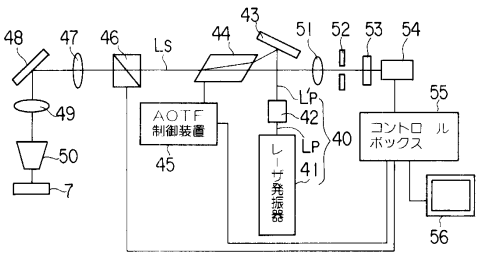
(21)出願番号　特願2003-125650(P2003-125650)
(22)出願日　平成15年4月30日(2003.4.30)

(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
(74)代理人　100058479
弁理士　鈴江　武彦
(74)代理人　100091351
弁理士　河野　哲
(74)代理人　100084618
弁理士　村松　貞男
(74)代理人　100100952
弁理士　風間　鉄也
(72)発明者　名取　靖晃
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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】レーザ走査顕微鏡

(57)【要約】
【課題】試料の吸収波長分光特性を取得すること。
【解決手段】レーザ光源４０から出力された広帯域のスペクトル拡散光Ｌｐ’をＡＯＴＦ４４により波長選択しかつ当該波長選択されたスペクトル光Ｌｓの波長を連続的に可変して各蛍光試薬Ｙ、Ｚで染色された試料７上に走査し、この試料７からの蛍光をＡＯＴＦ４４の波長選択と同期しながら光電変換素子５４により明るい蛍光光量データを検出し、この蛍光光量データに基づいて試料７を染色した各蛍光試薬Ｙ、Ｚの吸収波長分光特性を求める。
【選択図】　図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
広帯域のスペクトル拡散光を出力するレーザ出力手段と、
前記レーザ出力手段から出力された前記スペクトル拡散光から任意の波長を連続的に可変選択可能な波長選択手段と、
前記波長選択手段により波長選択された前記スペクトル光を蛍光試薬で染色された試料を走査する走査手段と、
前記スペクトル光により走査された前記試料から放出される蛍光光量を前記波長選択手段の波長選択と同期して検出する光検出器と、
前記光検出器により検出された前記蛍光光量データに基づいて前記試料を染色した前記蛍光試薬の吸収波長分光特性を求める演算手段と、
を具備したことを特徴とするレーザ走査顕微鏡。
【請求項２】
前記演算手段は、それぞれ１種類の前記蛍光試薬により染色されている前記試料上の少なくとも２つの部位の前記各蛍光光量データと、複数種類の前記蛍光試薬により染色されている前記試料上の１つの部位の前記蛍光光量データとを比較し、この比較結果に基づいて複数種類の前記蛍光試薬により染色されている前記部位における複数種類の前記蛍光試薬毎の各吸収波長分光特性を求めることを特徴とする請求項１記載のレーザ走査顕微鏡。
【請求項３】
前記演算手段は、それぞれ１つの前記蛍光試薬により染色されている前記試料上の少なくとも２つの部位の前記各蛍光光量データと、複数種類の前記蛍光試薬により染色されている前記試料上の１つの部位の前記蛍光光量データと、複数種類の前記蛍光試薬を判別するための係数とを有する関係式を演算し、前記係数の取る値に応じて複数種類の前記蛍光試薬により染色されている前記部位における複数種類の前記蛍光試薬毎の各吸収波長分光特性を求めることを特徴とする請求項１記載のレーザ走査顕微鏡。
【請求項４】
前記波長選択手段により波長選択された前記スペクトル光の一部を取り出すビームスプリッタと、
前記ビームスプリッタにより取り出された前記スペクトル光量を検出する光検出器と、
前記光検出器により検出された前記スペクトル光量に応じて前記波長選択手段により波長選択するスペクトル光の光量を制御する光量制御手段と、
を有することを特徴とする請求項１記載のレーザ走査顕微鏡。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、蛍光試薬に染色された試料上にレーザ光を走査し、試料からの蛍光を検出するレーザ走査顕微鏡に関する。
【０００２】
【従来の技術】
かかるレーザ走査顕微鏡は、例えば各特許文献１、２に記載されている。図９は特許文献１に記載されているレーザ走査顕微鏡の構成図である。このレーザ走査顕微鏡は、顕微鏡１と走査装置２とを有する。顕微鏡１は、光源３、照明レンズ系４、ビームスプリッタ５、対物レンズ６、試料ステージ７、集光レンズ８、光源９、受信機の配列１０、円筒レンズ１１、ビームスプリッタ・鏡１２、接眼レンズ１３を有する。
【０００３】
走査装置２は、レーザユニット１４、シャッタ１５、視準レンズ系１６、各ビームスプリッタ１７、１８、走査手段１９、共焦点ピンホール２０、格子２１、各結像鏡２２、２３、１次元の任意のプログラムの可能な切替え鏡アレー２４、収束レンズ系２５、検出器２６を有する。
【０００４】

試料７から放出された光は、対物レンズ６、ビームスプリッタ５、円筒レンズ１１を通ってビームスプリッタ・鏡１２で反射し、走査手段１９、ビームスプリッタ１８を通って共役な対象物平面内に位置する共焦点ピンホール２０上に焦点を結ぶ。この共焦点ピンホール２０は、格子２１及び各結像鏡２２、２３からなるモノクロメータの入射開口部をなし、このモノクロメータの分散作用によって試料７からの光がスペクトル成分に分割する。

【０００５】

格子２１の焦点面には、少なくとも１次元の任意のプログラムの可能な切替え鏡アレー２４が設けられているので、この切替え鏡アレー２４上に試料７からのスペクトル光が光学的に結像し、収束レンズ系２５により収束されて検出器２６により光検出される。このように切替え鏡アレー２４を使用して、プログラムすることにより試料７の蛍光波長分光特性を取得することが可能である。

【０００６】

図１０は特許文献２に記載されている走査顕微鏡の構成図である。この走査顕微鏡は、レーザ光源３０と走査装置（スキャンミラー３５）との間に、レーザ光によって生じた光をスペクトル拡散させる光学要素３１を設けている。レーザ光源３０から出力されるパルス化されたレーザ光L_1は、光学要素３１によって案内される。この光学要素３１は、フォトニックバンドギャップ材から成り、広帯域のスペクトル光照明光L_2を出力する。このスペクトル光照明光L_2は、ＡＯＴＦ（ａｃｏｕｓｔｏ ｏｐｔｉｃａｌ ｔｕｎａｂｌｅ ｆｉｌｔｅｒ）３２に導入されて波長選択される。なお、ＡＯＴＦ３２は、ＡＯＴＦ制御器３３から加わる高周波信号（ＲＦ信号）により波長選択を行う。波長選択されたスペクトル光L_3は、ビームスプリッタ３４で反射し、スキャンミラー３５で走査されて顕微鏡に導入され、対物レンズ３６を通って試料７に照射される。

【０００７】

試料７から反射又は放出した光は、試料７への照射とは逆光路を戻り、ビームスプリッタ３４を透過して検出器３７で検出される。

【０００８】

なお、光学要素３１は、広帯域のスペクトル光照明光L_2を出力するので、波長を選択して光パワーを安定させる必要がある。このためには、音響光学的又は電子光学的に調整可能なフィルタ（ＡＯＴＦ）を、音響光学的又は電子光学的検出器（ＡＯＤ）及び特許文献３に記載されている音響光学的又は電子光学的ビームスプリッタ（ＡＯＢＳ）と組み合わせるのがよい。音響光学的又は電子光学的検出器（ＡＯＤ）及び音響光学的又は電子光学的ビームスプリッタ（ＡＯＢＳ）は、波長選択及び検出光を絞るために使用可能である。

【０００９】

【特許文献１】

特開２０００－５６２４４号公報

【００１０】

【特許文献２】

特開２００２－５５２８４号公報

【００１１】

【特許文献３】

特開２００１－１２４９９７号公報

【００１２】

【発明が解決しようとする課題】

蛍光試薬を染色した試料の観察では、試料７の吸収波長分光特性を取得することも要求される。試料７の吸収波長分光特性を取得するには、吸収波長を連続的に変化させることが必要である。

【００１３】

しかしながら、特許文献１では、レーザユニット１４から出力されるレーザ光の波長を連続的に変化させてそのスペクトル光を発振することができないので、試料７の吸収波長分光特性を取得することはできない。又、特許文献１の走査顕微鏡の構成で吸収波長を連続

的に変化させて試料７の吸収波長分光特性を取得しようとすれば、蛍光波長分光特性の分解能を向上させるために、分散素子により得られる蛍光スペクトルの検出範囲を絞らなければならない。このため、検出される蛍光光量が微弱となり、暗い蛍光画像になってしまう。

【００１４】

特許文献２でも特許文献１と同様に、レーザ光源３０から出力されるレーザ光の波長を連続的に変化させることができないために、試料７の吸収波長分光特性を取得することができない。

【００１５】

そこで本発明は、試料の吸収波長分光特性を取得できるレーザ走査顕微鏡を提供することを目的とする。

【００１６】

【課題を解決するための手段】

本発明は、広帯域のスペクトル拡散光を出力するレーザ出力手段と、レーザ出力手段から出力されたスペクトル拡散光から任意の波長を連続的に可変選択可能な波長選択手段と、波長選択手段により波長選択されたスペクトル光を蛍光試薬で染色された試料を走査する走査手段と、スペクトル光により走査された試料から放出される蛍光光量を波長選択手段の波長選択と同期して検出する光検出器と、光検出器により検出された蛍光光量データに基づいて試料を染色した蛍光試薬の吸収波長分光特性を求める演算手段とを具備したレーザ走査顕微鏡である。

【００１７】

本発明のレーザ走査顕微鏡における演算手段は、それぞれ１種類の蛍光試薬により染色されている試料上の少なくとも２つの部位の各蛍光光量データと、複数種類の蛍光試薬により染色されている試料上の１つの部位の蛍光光量データとを比較し、この比較結果に基づいて複数種類の蛍光試薬により染色されている部位における複数種類の蛍光試薬毎の各吸収波長分光特性を求めることが好ましい。

【００１８】

本発明のレーザ走査顕微鏡における演算手段は、それぞれ１つの蛍光試薬により染色されている試料上の少なくとも２つの部位の各蛍光光量データと、複数種類の蛍光試薬により染色されている試料上の１つの部位の蛍光光量データと、複数種類の蛍光試薬を判別するための係数とを有する関係式を演算し、係数の取る値に応じて複数種類の蛍光試薬により染色されている部位における複数種類の蛍光試薬毎の各吸収波長分光特性を求めることが好ましい。

【００１９】

本発明のレーザ走査顕微鏡において、波長選択手段により波長選択されたスペクトル光の一部を取り出すビームスプリッタと、ビームスプリッタにより取り出されたスペクトル光量を検出する光検出器と、光検出器により検出されたスペクトル光量に応じて波長選択手段により波長選択するスペクトル光の光量を制御する光量制御手段とを有することが好ましい。

【００２０】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の第１の実施の形態について図面を参照して説明する。

【００２１】

図１はレーザ走査顕微鏡の構成図である。レーザ光源４０は、フェムト秒のパルスレーザ光Ｌｐを発振するレーザ発振器４１と、このレーザ発振器４１から発振されるパルスレーザ光Ｌｐの光路上に設けられた光学要素４２とを有する。この光学要素４２は、フォトニックバンドギャップ材により成るもので、レーザ発振器４１から発振されたパルスレーザ光Ｌｐを広帯域のスペクトル拡散光Ｌｐ’に変換して出力する。

【００２２】

光学要素４１から出力されるスペクトル拡散光Ｌｐ’の光路上には、ミラー４３を介して

フィルタ（ＡＯＴＦ）４４が設けられている。このＡＯＴＦ４４は、ＡＯＴＦ制御装置４５からのＲＦ信号を選択的に受けることによって、入射するスペクトル拡散光Ｌｐ’から任意の波長を選択して、その選択された波長のスペクトル光Ｌｓを出力する。なお、ＡＯＴＦ４４は、光パワーを安定化させるために音響光学素子又は電子光学的光偏向器（ＡＯＤ）と音響光学素子又は電子光学的ビームスプリッタ（ＡＯＢＳ）と組み合わせてもよい。

【００２３】

このＡＯＴＦ４４から選択出力されるスペクトル光Ｌｓの光路上には、ＸＹスキャナ４６、瞳投影レンズ４７、ミラー４８、結像レンズ４９、対物レンズ５０が設けられている。

【００２４】

一方、スペクトル光Ｌｓを試料７に照射する光路方向とは逆方向の光路において、ＡＯＴＦ４４の透過光路上には、共焦点レンズ５１、共焦点絞り５２、吸収フィルタ５３を介して光電変換素子５４が設けられている。このうち共焦点絞り５２は、試料７の表面上と光学的に共役な関係の位置に設けられている。吸収フィルタ５３は、特定の波長域の光のみを透過する。光電変換素子５４は、受光した蛍光光量に応じた信号を出力する。

【００２５】

コントロールボックス５５は、ＸＹスキャナ４６の動作制御、光電変換素子５４の出力信号を蛍光光量データとして内部メモリにデータ保存し、かつ蛍光光量データを演算処理して試料７の吸収波長分光特性を取得する。又、コントロールボックス５５は、必要に応じて試料７の吸収波長分光特性などをＣＲＴディスプレイ５６に表示する。

【００２６】

又、コントロールボックス５５は、ＡＯＴＦ４４の波長選択と同期しながら光電変換素子５４の出力信号を入力し、試料７上の指定したピクセルでの吸収波長分光特性のデータを取得し、このデータを内部メモリに各ピクセル毎にデータ保存する。

【００２７】

次に、上記の如く構成された装置の動作について説明する。

【００２８】

試料７には、例えば図２に示す吸収波長分光特性を持つ蛍光試薬（ＦＩＴＣ）により染色されている。この蛍光試薬により染色された試料７の吸収波長分光特性を取得する方法としては、（ａ）一定の領域での吸収波長分光特性の取得方法と、（ｂ）図３に示すように１ピクセル毎の吸収波長分光特性の取得方法とがある。

【００２９】

（ａ）一定の領域での吸収波長分光特性の取得方法では、吸収波長分光特性を取得する波長範囲（例えば４００ｎｍ～５５０ｎｍ）と、波長分解能（１ｎｍ）と、試料７の表面上における領域の座標とをコントロールボックス５６に記憶する。

【００３０】

レーザ発振器４１から発振されたパルスレーザ光Ｌｐは、光学要素４２により広帯域のスペクトル拡散光Ｌｐ’に変換出力される。このスペクトル拡散光Ｌｐ’は、ミラー４３で反射してＡＯＴＦ４４に入射する。

【００３１】

このＡＯＴＦ４４は、ＡＯＴＦ制御装置４５からの吸収波長分光特性を取得する波長範囲（例えば４００ｎｍ～５５０ｎｍ）に対応したＲＦ信号を選択的に受けることによって、入射するスペクトル拡散光Ｌｐ’から任意の波長を選択して、その選択された波長のスペクトル光Ｌｓを出力する。

【００３２】

このスペクトル光Ｌｓは、ＸＹスキャナ４６に入射する。このＸＹスキャナ４６は、試料７の表面上における領域の座標に従ってスペクトル光Ｌｓを走査する。この走査されたスペクトル光Ｌｓは、瞳投影レンズ４７、ミラー４８、結像レンズ４９、対物レンズ５０を通して試料７の表面上の指定された領域に照射される。

【００３３】

試料７に染色された蛍光試薬が励起され、この励起により発生した蛍光は、スペクトル光Ｌｓを試料７に照射する光路方向とは逆方向の光路、すなわち対物レンズ５０、結像レンズ４９、ミラー４８、瞳投影レンズ４７、ＸＹスキャナ４６を通ってＡＯＴＦ４４を透過し、さらに共焦点レンズ５１、共焦点絞り５２、吸収フィルタ５３を通って光電変換素子５４で受光される。この光電変換素子５４は、受光した蛍光光量に応じた信号を出力する。

【００３４】

コントロールボックス５５は、光電変換素子５４の出力信号を蛍光光量データとして内部メモリにデータ保存する。

【００３５】

以下、コントロールボックス５５は、ＡＯＴＦ４４による波長選択の制御と、ＸＹスキャナ４６による指定した領域へのスペクトル光Ｌｓの走査と、蛍光光量データのデータ保存とを繰り返し行い、吸収波長分光特性を取得する波長範囲（例えば４００ｎｍ～５５０ｎｍ）の蛍光光量データを取得する。

【００３６】

この蛍光光量データの取得が終了すると、コントロールボックス５５は、蛍光光量データを演算処理して試料７の吸収波長分光特性を取得し、かつ必要に応じて試料７の吸収波長分光特性などをＣＲＴディスプレイ５６に表示する。

【００３７】

（ｂ）１ピクセル毎の吸収波長分光特性の取得方法では、上記取得方法と同様に、吸収波長分光特性を取得する波長範囲（例えば４００ｎｍ～５５０ｎｍ）と、波長分解能（１ｎｍ）と、試料７の表面上における領域の座標とをコントロールボックス５６に記憶する。

【００３８】

ＡＯＴＦ４４は、ＡＯＴＦ制御装置４５によりスペクトル拡散光Ｌｐ’の吸収波長分光特性を取得する波長範囲（例えば４００ｎｍ～５５０ｎｍ）に対応するＲＦ信号が選択的かつ連続的に掛けられる。これにより、ＡＯＴＦ４４は、入射するスペクトル拡散光Ｌｐ’からスペクトル光Ｌｓを選択し、かつスペクトル光Ｌｓの波長を連続的に変化させる。

【００３９】

ＸＹスキャナ４６によってスペクトル光Ｌｓを走査する試料７の表面上のピクセル位置が決定されると、このＸＹスキャナ４６は、かかるピクセル位置にＡＯＴＦ４４により波長選択されかつ連続的に波長変化されたスペクトル光Ｌｓを走査する。

【００４０】

次に、ＸＹスキャナ４６によってスペクトル光Ｌｓを走査する次のピクセル位置が決定されると、このＸＹスキャナ４６は、同ピクセル位置にＡＯＴＦ４４により波長選択されかつ連続的に波長変化されたスペクトル光Ｌｓを走査する。

【００４１】

以下、これを繰り返して各ピクセル位置に波長選択されかつ連続的に波長変化されたスペクトル光Ｌｓを走査する。

【００４２】

これにより、各ピクセル位置に波長選択されかつ連続的に波長を変化させたスペクトル光Ｌｓが試料７の表面上に照射される。

【００４３】

試料７からの蛍光は、上記同様にスペクトル光Ｌｓを試料７に照射する光路方向とは逆方向に進行して光電変換素子５４で受光される。この光電変換素子５４は、受光した蛍光光量に応じた信号を出力する。

【００４４】

コントロールボックス５５は、ＡＯＴＦ４４の波長選択と同期しながら光電変換素子５４の出力信号を入力し、試料７上の指定したピクセルでの吸収波長分光特性の蛍光光量データとして取得し、このデータを内部メモリに各ピクセル毎にデータ保存する。

【００４５】

この蛍光光量データの取得が終了すると、コントロールボックス５５は、各ピクセル毎に取得した吸収波長分光特性データから各波長ごとの各蛍光画像の作成処理を実行し、かつ必要に応じて試料７の吸収波長分光特性などをＣＲＴディスプレイ５６に表示する。

【００４６】

次に、複数の蛍光試薬、例えば２種類の蛍光試薬ＹとＺにより試料７を染色した場合の吸収波長分光特性の取得方法について説明する。

【００４７】

図４は２種類の蛍光試薬Ｙ、Ｚにより染色された試料７の蛍光画像データを示す。この蛍光画像データにおいて各位置（ピクセル）Ｃ、Ｄは、それぞれ各蛍光試薬Ｙ、Ｚにより染色されているのが明らかな部位であって、位置Ｃは蛍光試薬Ｙにより染色され、位置Ｄは蛍光試薬Ｚにより染色されている。又、位置（ピクセル）Ｅは、どの蛍光試薬により染色されているかを測定する部位である。

【００４８】

各位置Ｃ、Ｄの各吸収波長分光特性A_C（λ）、A_D（λ）は、位置Ｅについてどの蛍光試薬により染色されているかを測定するときの基準データとして用いる。これら吸収波長分光特性A_C（λ）、A_D（λ）は、実測して取得してもよいし、又は各蛍光試薬Ｙ、Ｚが既知であれば当該蛍光試薬Ｙ、Ｚの公表データを用いてもよい。

【００４９】

これら吸収波長分光特性A_C（λ）、A_D（λ）を実測する場合は、ＣＲＴディスプレイ５６に表示される蛍光画像データの像において、観察者が各蛍光試薬Ｙ、Ｚによりそれぞれ単独で蛍光を発している部位を判断して指定することで取得できる。これら吸収波長分光特性A_C（λ）、A_D（λ）の取得については、上記（ａ）一定の領域での吸収波長分光特性の取得方法と、上記（ｂ）１ピクセル毎の吸収波長分光特性の取得方法とが利用できる。

【００５０】

この取得方法により光電変換素子５４で蛍光光量を検出する場合、吸収フィルタ５３として蛍光試薬Ｚの蛍光波長に対応するものが予め選択される。これは、蛍光試薬Ｚの励起波長を光電変換素子５４により検出することを防止するためである。

【００５１】

又、測定位置Ｅの吸収波長分光特性A_E（λ）についても上記吸収波長分光特性の取得方法（ａ）又は（ｂ）により取得する。

【００５２】

図５は位置Ｃにおける蛍光試薬Ｙの吸収波長分光特性A_C（λ）を示し、図６は位置Ｄにおける蛍光試薬Ｚの吸収波長分光特性A_D（λ）を示し、図７は位置Ｅにおける２種類の蛍光試薬Ｙ、Ｚの混ざり合った吸収波長分光特性A_E（λ）を示す。

【００５３】

次に、コントロールボックス５５は、各蛍光試薬Ｙ、Ｚの混ざり合った吸収波長分光特性A_E（λ）を、基準データとしての各吸収波長分光特性A_C（λ）、A_D（λ）によりそれぞれ下記式（１）～（３）に示すように除算する。これら吸収波長分光特性A_C（λ）、A_D（λ）、A_E（λ）は、それぞれ励起波長λの関数であり、同じλに対する値同士を除算することにより得られる除算の結果のλの関数になる。

【００５４】

$$k_C(\lambda) = A_E(\lambda) / A_C(\lambda) \quad \cdots (1)$$

$$k_D(\lambda) = A_E(\lambda) / A_D(\lambda) \quad \cdots (2)$$

$$k_{C+D}(\lambda) = A_E(\lambda) / \{A_C(\lambda) + A_D(\lambda)\} \quad \cdots (3)$$

この除算の結果、上記各式（１）又は（２）のうちいずれか一方が励起波長λによらず一定値を示せば、コントロールボックス５５は、一定値を示す式（１）又は（２）の蛍光試薬Ｙ又はＺの吸収波長分光特性と同一である判断する。従って、コントロールボックス５５は、式（１）が一定値を示せば、位置Ｅが蛍光試薬Ｙのみで染色されていると判断し、又式（２）が一定値を示せば、位置Ｅが蛍光試薬Ｚのみで染色されていると判断する。

【００５５】
又、上記除算の結果、上記式（３）が励起波長λによらず一定値を示せば、コントロールボックス５５は、位置Ｅが２種類の蛍光試薬Ｙ又はＺにより染色されていると判断する。
【００５６】
さらに、一定値を示したときのk_C（λ）、k_D（λ）又はk_{C+D}（λ）は、基準としてデータに対する測定位置の輝度の比率を示しているので、コントロールボックス５５は、下記式（４）に示すように一定値を示すk_C（λ）、k_D（λ）又はk_{C+D}（λ）に対して位置Ｃでの吸収波長分光特性A_C（λ）を乗算することで位置Ｅでの蛍光試薬Ｙの吸収波長分光特性を求める。
【００５７】
又、コントロールボックス５５は、下記式（５）に示すように一定値を示すk_C（λ）、k_D（λ）又はk_{C+D}（λ）に対して位置Ｄでの吸収波長分光特性A_D（λ）を乗算することで位置Ｅでの蛍光試薬Ｚの吸収波長分光特性を求める。
【００５８】
位置Ｅでの蛍光試薬Ｙの分光特性＝A_C（λ）・k_X（λ）　…（４）
位置Ｅでの蛍光試薬Ｚの分光特性＝A_D（λ）・k_X（λ）　…（５）
なお、k_Xは、k_C（λ）、k_D（λ）又はk_{C+D}（λ）である。
【００５９】
このように上記第１の実施の形態においては、レーザ光源４０から出力された広帯域のスペクトル拡散光Ｌｐ’をＡＯＴＦ４４により波長選択しかつ当該波長選択されたスペクトル光Ｌｓの波長を連続的に可変して各蛍光試薬Ｙ、Ｚで染色された試料７上に走査するので、試料７からの蛍光をＡＯＴＦ４４の波長選択と同期しながら光電変換素子５４により明るい蛍光光量データを検出でき、この蛍光光量データに基づいて試料７を染色した各蛍光試薬Ｙ、Ｚの吸収波長分光特性を高い分解能で求めることができる。
【００６０】
又、複数種類の蛍光試薬、例えば蛍光試薬Ｙ、Ｚにより染色された場合であっても、試料７における各蛍光試薬Ｙ、Ｚにより染色されている各位置Ｃ、Ｄの各蛍光光量データと、２種類の蛍光試薬Ｙ、Ｚにより染色されている位置Ｅの蛍光光量データとを比較することにより、どの蛍光試薬により染色されているかを測定する位置（ピクセル）Ｅにおける各蛍光試薬Ｙ、Ｚの各吸収波長分光特性を求めることができる。
【００６１】
なお、位置Ｅにおける吸収波長分光特性は、次の取得方法により求めてもよい。この吸収波長分光特性の取得方法では、下記関係式（６）を与える。
【００６２】
k（λ）＝A_E（λ）／［Ｒ・A_C（λ）＋（１－Ｒ）・A_D（λ）］
但し、０≦Ｒ≦１である。　…（６）
上記式（６）においてk（λ）がほぼ一定になるＲを求める。
【００６３】
k（λ）がほぼ一定になるＲをR_0とすると、R_0＝０であれば、上記式（２）と等価になる。従って、位置Ｅは、位置Ｄと同じ蛍光試薬Ｚのみで染色されていることになる。
【００６４】
又、R_0＝１であれば、位置Ｅは、位置Ｃと同じ蛍光試薬Ｙのみで染色されていることになる。
【００６５】
さらに、R_0が０と１との間であれば、位置Ｅは、２種類の蛍光試薬Ｙ、Ｚで染色されていることになる。このときのR_0は、２種類の蛍光試薬Ｙ、Ｚによる蛍光の発生する割合を示す。すなわち、R_0が小さい程蛍光試薬Ｙによる蛍光量が大きくなり、R_0が大きくなるに従って蛍光試薬Ｚによる蛍光量が大きくなる。
【００６６】

一定値となったときのｋ（λ）は、基準データに対する測定位置の輝度の比率を示すので、ｋ（λ）とＲとを用いて下記各式（７）及び（８）を演算して位置Ｅの各蛍光試薬Ｙ、Ｚの吸収波長分光特性を求める。

【００６７】

位置Ｅの蛍光試薬Ｙの吸収波長分光特性＝A_C（λ）・Ｒ・ｋ（λ）…（７）

位置Ｅの蛍光試薬Ｚの吸収波長分光特性＝A_D（λ）・（１－Ｒ）・ｋ（λ）…（８）

次に、本発明の第２の実施の形態について図面を参照して説明する。なお、図１と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【００６８】

図８はレーザ走査顕微鏡の構成図である。ＡＯＴＦ４４から選択出力されるスペクトル光Ｌｓの光路上には、ビームスプリッタ６０が設けられている。このビームスプリッタ６０は、スペクトル光Ｌｓを例えば透過率９８％で透過し、かつ反射率２％で反射する。

【００６９】

このビームスプリッタ６０の反射光路上は、光検出器６１が設けられている。この光検出器６１は、ビームスプリッタ６０で反射したスペクトル光Ｌｓを受光し、この受光量に応じた信号を出力する。

【００７０】

光量制御装置６２は、光検出器６１から出力された信号を入力してスペクトル光Ｌｓの光量を監視し、スペクトル光Ｌｓの光量に変化があったことを判断すると、スペクトル光Ｌｓの光量を一定に制御するための光量制御信号をＡＯＴＦ制御装置４５に送出する。

【００７１】

このＡＯＴＦ制御装置４５は、光量制御装置６２から送出された光量制御信号を入力し、ＡＯＴＦ４４により選択されるスペクトル光Ｌｓの各波長の光量、すなわち励起光の光量を一定に制御する。

【００７２】

このように上記第２の実施の形態においては、ＡＯＴＦ４４から選択出力されたスペクトル光Ｌｓの一部を光検出器６１により受光してその光量を監視し、スペクトル光Ｌｓの光量に変化があったことを判断すると、スペクトル光Ｌｓの光量を一定に制御するようにフィードバック制御するので、安定した光量のスペクトル光Ｌｓを試料７に照射することができ、精度高く試料７を染色した各蛍光試薬（Ｙ、Ｚ）の吸収波長分光特性を取得できる。

【００７３】

又、複数種類の蛍光試薬、例えば蛍光試薬Ｙ、Ｚにより染色された場合であっても、安定した光量のスペクトル光Ｌｓを試料７に照射することで、どの蛍光試薬により染色されているかを測定する位置（ピクセル）Ｅにおける各蛍光試薬Ｙ、Ｚの各吸収波長分光特性を精度高く求めることができる。

【００７４】

なお、本発明は、上記第１及び第２の実施の形態に限定されるものでなく、実施段階ではその要旨を逸脱しない範囲で種々に変形することが可能である。

【００７５】

さらに、上記実施形態には、種々の段階の発明が含まれており、開示されている複数の構成要件における適宜な組み合わせにより種々の発明が抽出できる。例えば、実施形態に示されている全構成要件から幾つかの構成要件が削除されても、発明が解決しようとする課題の欄で述べた課題が解決でき、発明の効果の欄で述べられている効果が得られる場合には、この構成要件が削除された構成が発明として抽出できる。

【００７６】

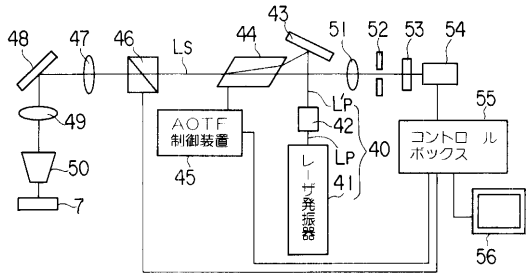
【発明の効果】

以上詳記したように本発明によれば、試料の吸収波長分光特性を取得できるレーザ走査顕微鏡を提供できる。

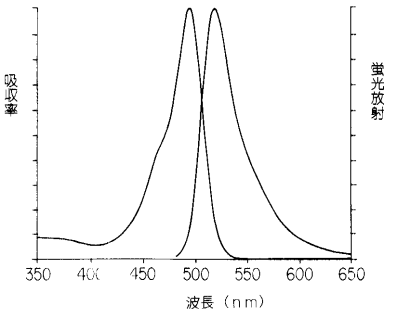
【図面の簡単な説明】

【図１】本発明に係わるレーザ走査顕微鏡の第１の実施の形態を示す構成図。
【図２】試料に染色する蛍光試薬の持つ吸収波長分光特性を示す図。
【図３】１ピクセル毎の吸収波長分光特性の取得する領域を示す模式図。
【図４】２種類の蛍光試薬により染色された試料の蛍光画像データを示す図。
【図５】蛍光試薬Ｙの吸収波長分光特性を示す図。
【図６】蛍光試薬Ｚの吸収波長分光特性を示す図。
【図７】２種類の蛍光試薬Ｙ、Ｚの混ざり合った吸収波長分光特性を示す図。
【図８】本発明に係わるレーザ走査顕微鏡の第２の実施の形態を示す構成図。
【図９】従来のレーザ走査顕微鏡の構成図。
【図１０】従来の走査顕微鏡の構成図。
【符号の説明】
４０：レーザ光源、４１：レーザ発振器、４２：光学要素、４３：ミラー、４４：フィルタ（ＡＯＴＦ）、４５：ＡＯＴＦ制御装置、４６：ＸＹスキャナ、４７：瞳投影レンズ、４８：ミラー、４９：結像レンズ、５０：対物レンズ、５１：共焦点レンズ、５２：共焦点絞り、５３：吸収フィルタ、５４：光電変換素子、５５：コントロールボックス、５６：ＣＲＴディスプレイ、６０：ビームスプリッタ、６１：光検出器、６２：光量制御装置。

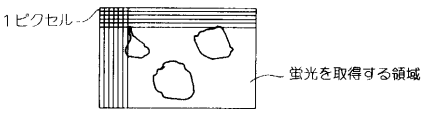
【図１】



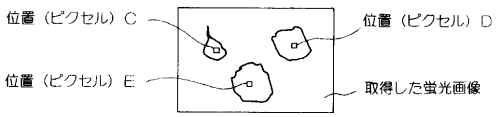
【図２】



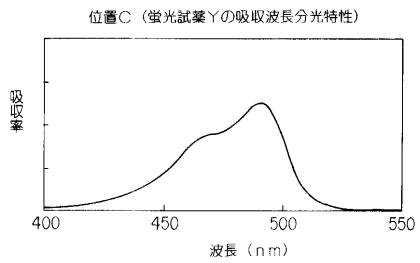
【図３】



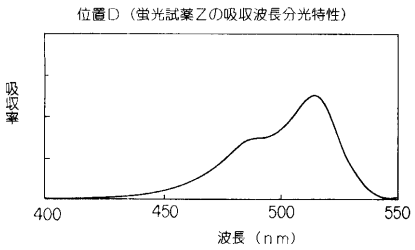
【図４】



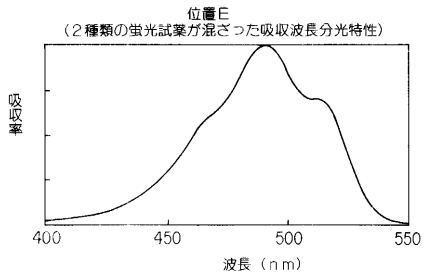
【図５】



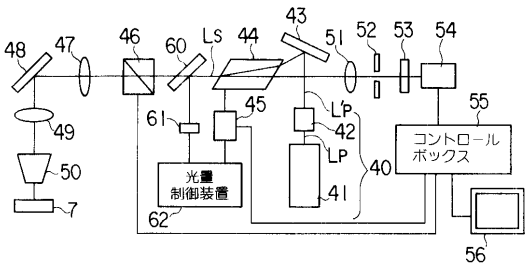
【図６】



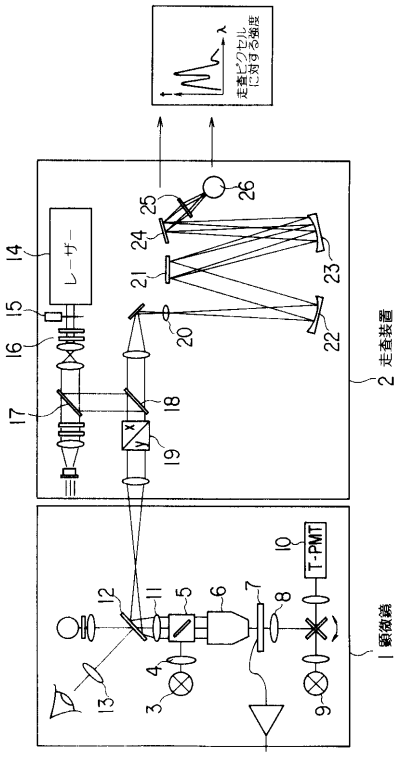
【図７】



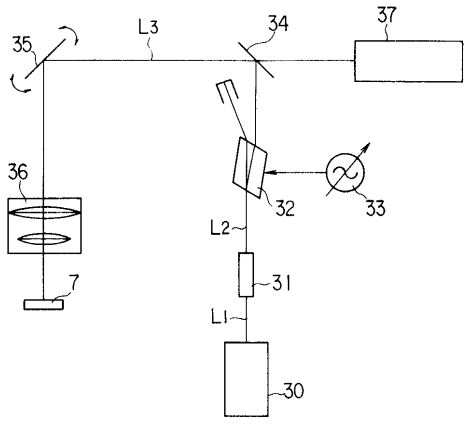
【図８】



【図９】



【図１０】



フロントページの続き

Ｆターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA01 EA01 FA01 FA02 FA06 GA02 GA04 GB01
GB18 HA01 HA02 HA09 HA15 JA02 KA02 KA08 KA09 NA01
NA06
2H052 AA08 AA09 AB14 AC00 AC04 AC15 AC28 AC34 AF07