

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4677728号
(P4677728)

(45) 発行日 平成23年4月27日 (2011. 4. 27)

(24) 登録日 平成23年2月10日 (2011. 2. 10)

(51) Int. Cl.

G 0 2 B 21/00 (2006.01)

F 1

G 0 2 B 21/00

請求項の数 7 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2004-83319 (P2004-83319)
 (22) 出願日 平成16年3月22日 (2004. 3. 22)
 (65) 公開番号 特開2005-274591 (P2005-274591A)
 (43) 公開日 平成17年10月6日 (2005. 10. 6)
 審査請求日 平成19年3月9日 (2007. 3. 9)

(73) 特許権者 000004112
 株式会社ニコン
 東京都千代田区有楽町 1 丁目 1 2 番 1 号
 (74) 代理人 100072718
 弁理士 古谷 史旺
 (72) 発明者 奥川 久
 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 株
 式会社ニコン内
 (72) 発明者 相川 直志
 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 株
 式会社ニコン内
 審査官 荒巻 慎哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共焦点顕微鏡及び共焦点顕微鏡システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光源と、

前記光源からの光を試料に集光する照明光学系と、

前記試料からの光を結像する結像光学系と、

前記結像光学系に関し前記試料の集光点と略共役な位置に入射する光を、少なくとも前記試料の前記集光点の近傍領域からの光と、その周辺領域からの光とに分離し、それぞれ検出する検出手段とを備え、

前記検出手段は、

前記結像光学系の焦点深度内に光軸に対して傾斜して配置された光学部材と、前記光学部材において前記集光点と略共役な位置に設けられ、かつその位置に入射する光を前記近傍領域からの光と前記周辺領域からの光とに分離する光分離面と、前記近傍領域からの光と前記周辺領域からの光とを独立して検出する検出器とを有し、

前記光分離面は、

前記近傍領域からの光を受ける円形の第 1 面と、前記周辺領域からの光を受ける第 2 面とを有し、

前記光学部材は、

前記周辺領域からの光の光路に対し直列の関係で複数の前記光分離面を配置しており、

前記複数の光分離面の間では、

後段に配置されたもののほど前記第 1 面の径が大きく設定され、

10

20

前記複数の光分離面の間では、

前記第 1 面のタイプは透過面及び反射面の一方に統一され、かつ前記第 2 面のタイプは透過面及び反射面の他方に統一されている

ことを特徴とする共焦点顕微鏡。

【請求項 2】

前記検出手段は、

複数の前記検出器を備える

ことを特徴とする請求項 1 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 3】

前記検出手段は、

前記近傍領域からの光を検出する第 1 の前記検出器と、前記周辺領域からの光を検出する第 2 の前記検出器とを有する

ことを特徴とする請求項 2 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 4】

前記検出手段は、

前記分離された前記近傍領域からの光と前記周辺領域からの光との双方を受光する単一の検出器と、

前記近傍領域からの光の光路と、前記周辺領域からの光の光路との一方を開閉するシャッターとを有し、

前記光学部材は、前記近傍領域からの光及び前記周辺領域からの光を前記単一の検出器へ導く

ことを特徴とする請求項 1 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 5】

前記検出手段は、

前記近傍領域からの光と前記周辺領域からの光との光量と、又は、前記近傍領域からの光の光量を検出する

ことを特徴とする請求項 4 に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項 6】

請求項 2 に記載の共焦点顕微鏡と、

前記複数の検出器が生成する複数の検出信号のうち少なくとも 2 つを選択し、加算する選択加算手段と

を備えることを特徴とする共焦点顕微鏡システム。

【請求項 7】

請求項 2 に記載の共焦点顕微鏡と、

前記複数の検出器が生成する複数の検出信号を個別に記憶する記憶手段と、

前記記憶手段が記憶した複数の検出信号を用いて演算する演算処理手段と

を備えることを特徴とする共焦点顕微鏡システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、共焦点顕微鏡及び共焦点顕微鏡システムに関する。

【背景技術】

【0002】

共焦点顕微鏡（特許文献 1 など）は、生体標本などの試料上に照明光を集光すると共にその試料上の集光部から射出する光束を共焦点絞りに集光し、その共焦点絞りを通過した光束の光量を光検出器で検出するものである。また、その試料の二次元の画像を得るため、試料上を集光部（スポット）で走査しながらその検出を行う。

共焦点絞りにては、ピンホール部材が配置される。ピンホール部材はピンホール（開口）内に集光する光線のみを透過し、それ以外の光線をカットするので、試料上の特定の高さから射出した光線のみが光検出器に入射し、それ以外の高さから射出した光線は光検出

10

20

30

40

50

器に入射しない。

【0003】

このため、共焦点顕微鏡によれば、観察対象を試料上の特定の高さに位置する薄い層の像のみに限定（セクショニング）することができる。

そのセクショニング分解能（観察対象となる層の薄さ）を変更するためには、ピンホール部材の開口径を変更すればよい。開口径を大きくするとセクショニング分解能が低くなり、開口径を小さくするとセクショニング分解能が高くなる。

【0004】

この変更をユーザが試料の種類などに応じて自在にすることができるよう、従来の共焦点顕微鏡は、ピンホール部材のピンホール径（開口径）を制御する機構（特許文献1の図1など）や、ピンホール径の互いに異なる複数のピンホール部材を選択的に光路に挿脱する機構などを備えている（特許文献1の図8など）。

【特許文献1】実開平6-16927号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、ピンホール径を制御する機構（特許文献1の図1など）は、共焦点顕微鏡を複雑化（大型化・高コスト化）する問題があり、また、ピンホール部材を挿脱する機構（特許文献1の図6など）は、ピンホールと光路との位置合わせを煩雑化するなどの問題がある。よって、従来の共焦点顕微鏡は、少なくともその構成と性能との一方に問題を抱えていた。

【0006】

そこで本発明は、シンプルな構成でありながらも高精度にセクショニング分解能を変更することの可能な共焦点顕微鏡及び共焦点顕微鏡システムを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の共焦点顕微鏡は、光源と、前記光源からの光を試料に集光する照明光学系と、前記試料からの光を結像する結像光学系と、前記結像光学系に関し前記試料の集光点と略共役な位置に入射する光を、少なくとも前記試料の前記集光点の近傍領域からの光と、その周辺領域からの光とに分離し、それぞれ検出する検出手段とを備え、前記検出手段は、前記結像光学系の焦点深度内に光軸に対して傾斜して配置された光学部材と、前記光学部材において前記集光点と略共役な位置に設けられ、かつその位置に入射する光を前記近傍領域からの光と前記周辺領域からの光とに分離する光分離面と、前記近傍領域からの光と前記周辺領域からの光とを独立して検出する検出器とを有し、前記光分離面は、前記近傍領域からの光を受ける円形の第1面と、前記周辺領域からの光を受ける第2面とを有し、前記光学部材は、前記周辺領域からの光の光路に対し直列の関係で複数の前記光分離面を配置しており、前記複数の光分離面の間では、後段に配置されたものほど前記第1面の径が大きく設定され、前記複数の光分離面の間では、前記第1面のタイプは透過面及び反射面の一方に統一され、かつ前記第2面のタイプは透過面及び反射面の他方に統一されている。

【0011】

また、前記検出手段は、複数の前記検出器を備えてもよい。

前記検出手段は、前記近傍領域からの光を検出する第1の前記検出器と、前記周辺領域からの光を検出する第2の前記検出器とを有してもよい。

また、前記検出手段は、前記分離された前記近傍領域からの光と前記周辺領域からの光との双方を受光する単一の検出器と、前記近傍領域からの光の光路と、前記周辺領域からの光の光路との一方を開閉するシャッターとを有し、前記光学部材は、前記近傍領域からの光及び前記周辺領域からの光を前記単一の検出器へ導いてもよい。

また、前記検出手段は、前記近傍領域からの光と前記周辺領域からの光との光量と、又は、前記近傍領域からの光の光量を検出してもよい。

また、本発明の共焦点顕微鏡システムは、本発明の共焦点顕微鏡と、前記複数の検出器が生成する複数の検出信号のうち少なくとも２つを選択し、加算する選択加算手段とを備えることを特徴とする。

また、本発明の共焦点顕微鏡システムは、本発明の共焦点顕微鏡と、前記複数の検出器が生成する複数の検出信号を個別に記憶する記憶手段と、前記記憶手段が記憶した複数の検出信号を用いて演算する演算処理手段とを備えることを特徴とする。

【発明の効果】

【００１２】

以上、本発明の共焦点顕微鏡又は共焦点顕微鏡システムでは、試料上の比較的薄い層を示す光束と、その上下の層を示す光束とが分離される。よって、これらの光束を選択的に検出可能な検出手段の動作や、各検出器で検出した各光束の信号の演算により、セクショニング分解能が変化する。

10

その結果、この共焦点顕微鏡又は共焦点顕微鏡システムは、シンプルな構成でありながらも高精度にセクショニング分解能を変更することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１３】

以下、図面を参照して本発明の実施形態について説明する。

〔第１実施形態〕

図１、図２、図３、図４、図５を参照して本発明の第１実施形態について説明する。

20

本実施形態は、蛍光共焦点顕微鏡装置の実施形態である。

本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置には、図１に示すように、光源１１、照明用レンズ１２、フィルタ１３、ダイクロイックミラー１４、ガルバノミラー１５、対物レンズ１６、フィルタ１７、集光レンズ１８、光分離部材であるマスク部材１９、可動シャッタ２０、光検出器２１、コンピュータ２２、モニタ２３、入力器２４などが備えられる。この蛍光共焦点顕微鏡装置には、蛍光観察用に予め処理された試料１０が配置される。

【００１４】

なお、このうち、マスク部材１９、可動シャッタ２０、光検出器２１からなる光学系が光検出部１である。また、照明用レンズ１２と対物レンズ１６とが請求項ににおいて照明光束を集光する光学系に対応し、対物レンズ１６と集光レンズ１８とが請求項における集光光学系に対応する。

30

光源１１から射出した光は、照明用レンズ１２、フィルタ１３、ダイクロイックミラー１４、ガルバノミラー１５、及び対物レンズ１６を介して試料１０上に集光し、試料１０上にスポットを形成する。試料１０上のスポットの形成領域からは、光（蛍光）が射出する。

【００１５】

その試料１０から射出した光束は、対物レンズ１６に戻り、対物レンズ１６、ガルバノミラー１５を介してダイクロイックミラー１４に入射する。

ダイクロイックミラー１４に入射した光束は、ダイクロイックミラー１４を透過し、マスク１３及び照明用レンズ１２が配置されている方向とは異なる方向へ射出し、フィルタ１７、集光レンズ１８を介してマスク部材１９に入射する。

40

【００１６】

マスク部材１９は、図２に示すように、試料１０上のスポットの形成領域と光学的に略共役な位置にピンホール１９ａ'、１９ｂ'、１９ｃ'（請求項２における透過面に対応。）などを配置している（詳細は後述）。

マスク部材１９に入射した光束は、それらピンホール１９ａ'、１９ｂ'、１９ｃ'の近傍に集光し、それらピンホール１９ａ'、１９ｂ'、１９ｃ'からマスク部材１９の外部へ射出する。

【００１７】

ピンホール１９ａ'、１９ｂ'、１９ｃ'から射出した光束は、可動シャッタ２０を介

50

して光検出器 2 1 に入射する。

光検出器 2 1 は、入射した光束の光量に応じた信号を出力する。この信号は、コンピュータ 2 2 に取り込まれる。

ここで、ガルバノミラー 1 5 は、不図示のモータにより駆動される。この駆動により、試料 1 0 上をスポットが二次元的に走査する。コンピュータ 2 2 は、この走査中に光検出器 2 1 が出力した信号を取り込む。

【 0 0 1 8 】

この信号に基づいて、コンピュータ 2 2 は試料 1 0 の二次元の画像の画像データを構築し、その画像をモニタ 2 3 に表示する。

以上の構成の本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置においては、光検出部 1 に特徴がある。以下、この光検出部 1 の各要素を詳細に説明する。

図 2 に示すように、マスク部材 1 9 には、集光レンズ 1 8 の焦点深度内の略中央の面に対し傾斜した姿勢で光分離面である反射透過面 1 9 a が設けられている。

【 0 0 1 9 】

反射透過面 1 9 a は、集光レンズ 1 8 の光軸を中心とした微小円形の透過面（ピンホール）1 9 a ' と、そのピンホール 1 9 a ' の周辺領域をカバーする反射面 1 9 a " とからなる。ピンホール 1 9 a ' の径 r_a は、試料 1 0 上に形成されたスポット（集光部）の径に相当する。

このマスク部材 1 9 では、集光レンズ 1 8 から入射した光束のうち、ピンホール 1 9 a ' の形成位置に入射するもの（中央光束）のみがピンホール 1 9 a ' からマスク部材 1 9 の外部へ射出し、それ以外（周辺光束）は反射面 1 9 a " にて集光レンズ 1 8 の方向からずれた方向に反射する。

【 0 0 2 0 】

マスク部材 1 9 には、さらに、その反射面 1 9 a " で反射した光束を反射する反射面 1 9 A が、透過反射面 1 9 a と平行な姿勢で設けられている。

マスク部材 1 9 には、さらに、その反射面 1 9 A で反射した光束に対し反射透過面 1 9 a と同じ姿勢で反射透過面 1 9 b が設けられている。

反射透過面 1 9 b は、その光束の中心近傍に配置されたピンホール 1 9 b ' と、そのピンホール 1 9 b ' の周辺領域をカバーする反射面 1 9 b " とからなる。ピンホール 1 9 b ' の径 r_b は、ピンホール 1 9 a ' の径 r_a よりも大きく、例えば、 $r_b = 2 r_a$ である。

【 0 0 2 1 】

このマスク部材 1 9 では、反射面 1 9 A で反射した光束のうち、ピンホール 1 9 b ' の形成位置に入射するもの（中央光束）のみがピンホール 1 9 b ' からマスク部材 1 9 の外部へ射出し、それ以外（周辺光束）は反射面 1 9 b " にて反射面 1 9 A からずれた方向に反射する。

マスク部材 1 9 には、さらに、その反射面 1 9 b " で反射した光束を反射する反射面 1 9 B が、反射面 1 9 A と同じ姿勢で設けられている。

【 0 0 2 2 】

この反射面 1 9 B と上述した反射面 1 9 A とは、反射透過面 1 9 a , 1 9 b によって分離された中央光束と周辺光束とを後述する光検出器 2 1 の検出面に導光する役割を果たす。

マスク部材 1 9 には、さらに、その反射面 1 9 B で反射した光束に対し反射透過面 1 9 b と同じ姿勢で反射透過面 1 9 c が設けられている。

【 0 0 2 3 】

反射透過面 1 9 c は、その光束の中心近傍に配置されたピンホール 1 9 c ' と、そのピンホール 1 9 c ' の周辺領域をカバーする反射面 1 9 c " とからなる。ピンホール 1 9 c ' の径 r_c は、ピンホール 1 9 b ' の径 r_b よりも大きく、例えば、 $r_c = 2 r_b$ である。

このマスク部材 1 9 では、反射面 1 9 B で反射した光束のうち、ピンホール 1 9 c ' の

10

20

30

40

50

形成位置に入射するもの（中央光束）のみがピンホール 19 c' からマスク部材 19 の外部へ射出する。

【0024】

なお、反射透過面 19 a と反射面 19 A との間隔、及び反射面 19 A と反射透過面 19 b との間隔、及び反射透過面 19 b と反射面 19 B との間隔、及び反射面 19 B と反射透過面 19 c との間隔は、反射透過面 19 b と反射透過面 19 c とが集光レンズ 18 の焦点深度内に位置するよう、十分に短く設定される。

以上の構成のマスク部材 19 は、例えば次のようにして形成できる。

【0025】

少なくとも、試料 10 からの射出光（蛍光）に対し透明な透明基板（光学ガラス基板など）を用意し、その透明基板の一方の面にその光を反射する性質の光学膜（クロム膜など）を、反射面 19 a'', 19 b'', 19 c'' となるべき領域に成膜し、同様の性質の光学膜を、他方の面の反射面 19 A, 19 B となるべき領域に成膜する。

なお、反射面 19 a'', 19 b'', 19 c'' の一部又は全部は連続していてもよい。また、反射面 19 A, 19 B は連続していてもよい。また、この透明基板において光束が最初に入射する部分には、その入射角度を 0 に近づけて余分な反射光の発生を防ぐために、図 2 に示すような楔状の透明部材 19' を貼付するとよい。透明部材 19' の材料は、透明基板と同じ材料、又は透明基板と略同じ屈折率の材料であることが好ましい。また、透明基板の各箇所には、適宜、迷光の発生を防止するための反射防止膜などの公知の膜が成膜されることが好ましい。

【0026】

次に、光検出器 21 の検出面は、以上のマスク部材 19 のピンホール 19 a' からの射出光束の光路と、ピンホール 19 b' からの射出光束の光路と、ピンホール 19 c' からの射出光束の光路との全部をカバーできるだけのサイズを有している。

可動シャッタ 20 は、図 2 に点線で示すようにステップ状に駆動され、その駆動量に応じて少なくとも次の 3 つの状態 S a, S b, S c に設定可能である。

【0027】

第 1 の状態 S a は、ピンホール 19 a' からの射出光束の光路を開放し、かつピンホール 19 b', 19 c' からの射出光束の光路を遮断する状態である。

第 2 の状態 S b は、ピンホール 19 a', 19 b' からの射出光束の光路を開放し、かつピンホール 19 c' からの射出光束の光路を遮断する状態である。

第 3 の状態 S c は、ピンホール 19 a', 19 b', 19 c' からの射出光束の光路を全て開放する状態である。

【0028】

このような可動シャッタ 20 の遮光部には、様々なものが適用できる。可動シャッタ 20 の駆動機構に回転機構を採用した場合、例えば、図 3 (a), (b), (c) の何れかのように、径方向の長さが段階的に変化した羽状の部材を適用できる。

また、可動シャッタ 20 の駆動には、手動、電動の何れをも適用できる。因みに、電動化する場合、可動シャッタ 20 の駆動機構にモータ（ステッピングモータ）が取り付けられる。そのモータは、ユーザインタフェースに対し電氣的に接続される。因みに、そのユーザインタフェースとして図 1 の入力器 24 を利用する場合、そのモータをコンピュータ 22 に対し電氣的に接続すればよい。

【0029】

次に、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置の効果について図 4 を用いて説明する。なお、図 4 は、マスク部材 19 の各反射透過面 19 a, 19 b, 19 c と、試料 10 の各層 10 a, 10 b, 10 c との関係を示す模式図である。図 4 において、図 1, 図 2 に示すものと同じ要素については、同一符号で示した。

試料 10 において対物レンズ 16 の焦点面付近の薄い層 10 a から射出した光束のみがそのピンホール 19 a' を通過できる。

【0030】

また、薄い層 10 a を挟む上下 2 層（図 4 の厚い層 10 b から薄い層 10 a を差し引いたもの）から射出した光束のみが、反射透過面 19 b のピンホール 19 b' を通過できる。

また、厚い層 10 b を挟む上下 2 層（図 4 の極めて厚い層 10 c から厚い層 10 b を差し引いたもの）から射出した光束のみが、反射透過面 19 c のピンホール 19 c' を通過できる。

【0031】

よって、可動シャッタ 20 が図 2 の第 1 の状態 S a にあるとき（ピンホール 19 a' からの射出光束の光路のみが開放されているとき）には、薄い層 10 a が観察対象となり、その薄い層 10 a の画像がモニタ 23 上に図 4 の（a）のように表示される。

10

また、可動シャッタ 20 が図 2 の第 2 の状態 S b にあるとき（ピンホール 19 a' , 19 b' からの射出光束の光路のみが開放されているとき）には、厚い層 10 b が観察対象となり、その厚い層 10 b の画像がモニタ 23 上に図 4 の（b）のように表示される。

【0032】

また、可動シャッタ 20 が図 2 の第 3 の状態 S c にあるとき（ピンホール 19 a' , 19 b' , 19 c からの射出光束の光路が全て開放されているとき）には、極めて厚い層 10 c が観察対象となり、その極めて厚い層 10 c の画像がモニタ 23 上に図 4 の（c）のように表示される。

したがって、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置によれば、ユーザが可動シャッタ 20 を駆動するだけで、セクショニング分解能を（a）, （b）, （c）のとおり変更することができる。

20

【0033】

ここで、この蛍光共焦点顕微鏡装置では、マスク部材 19 が、薄い層 10 a を示す光束、厚い層 10 b を示す光束、極めて厚い層 10 c を示す光束の全てを生成する。

そして、セクショニング分解能を変更する際の唯一の駆動部分である可動シャッタ 20 は、光束の光路を開放 / 遮断するだけの単純な役割しか担っていない。

よって、可動シャッタ 20 の位置合わせに対する要求精度は低く、その駆動機構の構成は単純化可能である。

【0034】

そして、たとえ可動シャッタ 20 の位置合わせ精度が低くとも、マスク部材 19 の位置合わせさえ予め高精度に行われていれば、各層の画像はそれぞれ高精度に取得される。

30

したがって、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置は、シンプルな構成でありながらも高精度にセクショニング分解能を変更することができる。

（その他）

なお、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置では、光検出器に対し必要な光束を導光する手段としてマスク部材 19 の反射面 19 A , 19 B を用いたが、その反射面の数を増加させたり、反射面の代わりに光ファイバ（導光方向が自在である。）を利用したりすれば、マスク部材 19 における反射透過面 19 a , 19 b , 19 c の配置自由度を高めることができる。但し、光路中の光量ロスが許容範囲内に収まるようマスク部材 19 は設計される必要がある。

40

【0035】

また、可動シャッタ 20 の挿入角度は、図 2 に示すように各光束に対し略垂直にする必要はなく、各光束に対し非垂直に（例えば、マスク部材 19 に沿う角度に）してもよい。

また、上述した説明では、セクショニング分解能の切り換え数（マスク部材 19 に形成されるピンホールの数）が「3」となっているが、必要に応じて 3 より大きい数、又は 2 に増減してもよい。その増減数に応じて、反射透過面 19 a , 19 b , . . . の数を増減すればよい。

【0036】

また、図 1 に示す光検出部 1 に代えて、図 5 に示す光検出部を適用することもできる。この検出部のマスク部材 29 と、図 1 の光検出部 1 のマスク部材 19 との間では、反射面

50

及び透過面との利用の仕方が反転している。

以下、図5の光検出部について説明する。

この光検出部のマスク部材29には、図1に示した集光レンズ18の焦点深度内の所定面に対し傾斜した姿勢で反射透過面29aが設けられている

反射透過面29aは、集光レンズ18の光軸近傍に配置された微小円形の反射面29a'と、その反射面29a'の周辺領域をカバーする透過面29a"とからなる。反射面29a'の径 r_a は、試料10上に形成されたスポットの径に相当する。

【0037】

このマスク部材29では、集光レンズ18から入射した光束のうち、反射面29a'の形成位置に入射するもの(中央光束)のみが反射面29a'にて反射してマスク部材29の外部へ射出し、それ以外(周辺光束)は透過面29a"を透過する。

10

マスク部材29には、さらに、その透過面29a"を透過した光束に対し反射透過面29aと同じ姿勢で反射透過面29bが設けられている。

【0038】

反射透過面29bは、その光束の中心近傍に配置された円形の反射面29b'と、反射面29b'の周辺領域をカバーする透過面29b"とからなる。反射面29b'の径 r_b は反射面29a'の径 r_a よりも大きく、例えば、 $r_b = 2r_a$ である。

このマスク部材29では、透過面29a"を透過した光束のうち、反射面29b'の形成位置に入射するもの(中央光束)のみが反射面29b'にて反射してマスク部材29の外部へ射出し、それ以外(周辺光束)は透過面29b"を透過する。

20

【0039】

マスク部材29には、さらに、その透過面29b"を透過した光束に対し反射透過面29bと同じ姿勢で反射透過面29cが設けられている。

反射透過面29cは、その光束の中心近傍に配置された円形の反射面29c'と、反射面29c'の周辺領域をカバーする透過面29c"とからなる。反射面29c'の径 r_c は反射面29b'の径 r_b よりも大きく、例えば、 $r_c = 2r_b$ である。

【0040】

このマスク部材29では、透過面29b"を透過した光束のうち、反射面29c'の形成位置に入射するもの(中央光束)のみが反射面29c'にて反射してマスク部材29の外部へ射出する。

30

このマスク部材29によれば、反射透過面29a, 29bによって分離された中央光束と周辺光束とが同一方向に導光される。

【0041】

因みに、このマスク部材29については、透明基板の必要な箇所に光を反射する性質の光学膜を成膜することによって形成できる。図5のように透明基板の内部に光学膜を成膜するためには、例えば、透明基板を2つの部材にカットし、カットしてできた2つの部材の一方の断面に光学膜を形成し、再びそれらの部材を貼り合わせればよい。

なお、反射透過面29aと反射透過面29bとの間隔、及び反射透過面29bと反射透過面29cとの間隔は、反射透過面29bと反射透過面29cとが集光レンズ18の焦点深度内に位置するよう、十分に短く設定される。

40

【0042】

光検出器21の検出面は、以上のマスク部材29の反射面29a'からの射出光束の光路と、反射面29b'からの射出光束の光路と、反射面29c'からの射出光束の光路との全部をカバーできるだけのサイズを有している。

可動シャッタ20は、ステップ状に駆動され、その駆動量に応じて少なくとも次の3つの状態 S_a , S_b , S_c に設定可能である。

【0043】

第1の状態 S_a は、反射面29a'からの射出光束の光路を開放し、かつ反射面29b', 29c'からの射出光束の光路を遮断する状態である。

第2の状態 S_b は、反射面29a', 29b'からの射出光束の光路を開放し、かつ反

50

射面 29c' からの射出光束の光路を遮断する状態である。

第3の状態Scは、反射面29a', 29b', 29c'からの射出光束の光路を全て開放する状態である(以上、図5に示した光検出部の説明)。

【0044】

[第2実施形態]

図6を参照して本発明の第2実施形態について説明する。ここでは、第1実施形態との相違点についてのみ説明する。

本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置においては、図6に示すように、可動シャッタ20が省略され、マスク部材19のピンホール19a', 19b', 19c'と同数(ここでは3つ)の光検出器21a, 21b, 21cが備えられ、かつそれら光検出器21a, 21b, 21cと同数(ここでは3つ)のスイッチ31a, 31b, 31cが、光検出器21a, 21b, 21cとコンピュータ22との間に備えられる。このうち、マスク部材19、光検出器21a, 21b, 21cからなる光学系が光検出部2である。

【0045】

なお、光検出器21aとスイッチ31aとの間には電流/電圧変換器(I/V)21a'が挿入され、光検出器21bとスイッチ31bとの間には電流/電圧変換器21b'が挿入され、光検出器21cとスイッチ31cとの間には電流/電圧変換器21c'が挿入される。また、スイッチ31a, 31b, 31cとコンピュータ22との間には、A/D変換器(A/D)21"が挿入される。また、A/D変換器21"の出力は、コンピュータ22内の画像ボード223に接続される。因みに、これら電流/電圧変換器、A/D変換器、画像ボードは、図1に示す蛍光共焦点顕微鏡装置にも同様に備えられるが、その蛍光共焦点顕微鏡装置では電流/電圧変換器の数は1である(図1では不図示)。

【0046】

光検出器21aの検出面は、ピンホール19a'からの射出光束の光路をカバーし、光検出器21bの検出面は、ピンホール19b'からの射出光束の光路をカバーし、光検出器21cの検出面は、ピンホール19c'からの射出光束の光路をカバーしている。

よって、光検出器21a 電流/電圧変換器21a' スwitch31a A/D変換器21"の経路は、ピンホール19a'からの射出光束の光量を示す信号saの経路となる。

【0047】

また、光検出器21b 電流/電圧変換器21b' スwitch31b A/D変換器21"の経路は、ピンホール19b'からの射出光束の光量を示す信号sbの経路となる。

また、光検出器21c 電流/電圧変換器21c' スwitch31c A/D変換器21"の経路は、ピンホール19c'からの射出光束の光量を示す信号scの経路となる。

それら別々の経路を経てA/D変換器21"に入力された信号sa, sb, scは、足し合わされた上で、コンピュータ22の画像ボード223に入力される。

【0048】

画像ボード223に入力された信号は、画像ボード223上のフレームメモリMに順次書き込まれ、そのフレームメモリM上に1枚の画像を示す画像データを構築する。コンピュータ22のCPU221は、その画像データに基づいてモニタ23に画像を表示する。

ここで、コンピュータ22内のCPU221は、画像ボード223を介してスイッチ31a, 31b, 31cに接続されており、それらスイッチ31a, 31b, 31cを個別に開状態/閉状態にセットすることができる。

【0049】

また、コンピュータ22に対しユーザは予め、セクショニング分解能を複数段階(ここでは、高, 中, 低の3段階)の何れかに指定することができる。CPU221は、インタフェース回路(I/F)224を介して入力器24からの信号を受信し、ユーザの指定した段階を認識する。

このような蛍光共焦点顕微鏡装置は、コンピュータ22内のCPU221の指示の下で次のとおり動作する。

【 0 0 5 0 】

ユーザの予め指定した段階が「高」であったとき、CPU 221は、スイッチ31aを閉状態にセットし、スイッチ31b, 31cを開状態にセットする。

この状態では、信号saの経路のみが開通するので、A/D変換器21"には信号saのみが入力される。よって、フレームメモリM上には、信号saによる画像データDaが構築される。したがって、モニタ23には図4(a)に示したような薄い層10aの画像が表示される。

【 0 0 5 1 】

ユーザの予め指定した段階が「中」であったとき、CPU 221は、スイッチ31a, 31bを閉状態にセットし、スイッチ31cを開状態にセットする。

この状態では、信号saの経路と信号sbの経路とが開通するので、A/D変換器21"には信号saと信号sbとのみが入力される。よって、フレームメモリM上には、信号sa, sbによる画像データDabが構築される。したがって、モニタ23には図4(b)に示したような厚い層10bの画像が表示される。

【 0 0 5 2 】

ユーザの予め指定した段階が「低」であったとき、CPU 221は、スイッチ31a, 31b, 31cを閉状態にセットする。

この状態では、信号saの経路と信号sbの経路と信号scの経路が全て開通するので、A/D変換器21"には信号saと信号sbと信号scとが入力される。よって、フレームメモリM上には、信号sa, sb, scによる画像データDabcが構築される。したがって、モニタ23には図4(c)に示したような極めて厚い層10cの画像が表示される。

【 0 0 5 3 】

したがって、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置によれば、ユーザは、入力器24を操作するだけで、セクショニング分解能を図4の(a), (b), (c)のとおり変更することができる。

ここで、この蛍光共焦点顕微鏡装置では、マスク部材19が、薄い層10aを示す光束、厚い層10bを示す光束、極めて厚い層10cを示す光束の全てを生成する。

【 0 0 5 4 】

そして、セクショニング分解能を変更する際に駆動されるのは、コンピュータ22とスイッチ31a, 31b, 31cのみである。

よって、マスク部材19の位置合わせさえ予め高精度に行われていれば、各層の画像はそれぞれ高精度に取得される。

したがって、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置は、シンプルな構成でありながらも高精度にセクショニング分解能を変更することができる。

【 0 0 5 5 】

(その他)

なお、光検出器21a, 21b, 21cの配置角度は、図6に示すように各光束に対し略垂直にする必要はなく、各光束に対し非垂直に(例えば、マスク部材19に沿う角度に)してもよい。

また、上記実施形態では、電氣的に開閉されるスイッチ31a, 31b, 31c(コンピュータ22からの電氣的な指示に従って開閉されるスイッチ)を説明したが、手動で開閉するスイッチ31a, 31b, 31cを用いることもできる。このときユーザは、入力器24を操作する代わりにそれらスイッチ31a, 31b, 31cを、上述したCPU 221が開閉したのと同様に開閉すればよい。

【 0 0 5 6 】

[第3実施形態]

図7を参照して本発明の第3実施形態について説明する。

本実施形態は、蛍光共焦点顕微鏡装置の実施形態である。ここでは、第2実施形態との相違点についてのみ説明する。

本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置においては、図 7 に示すように、スイッチ 3 1 a , 3 1 b , 3 1 c が省略され、その代わりにコンピュータ 2 2 の内部が一部変更される。

【 0 0 5 7 】

コンピュータ 2 2 内の画像ボード 2 2 3 には、光検出器 2 1 a , 2 1 b , 2 1 c から並行して出力される信号 s a , s b , s c を並行して格納する複数のフレームメモリ M a , M b , M c が設けられる。また、それら信号 s a , s b , s c の経路には、複数の A / D 変換器 2 1 a ″ , 2 1 b ″ , 2 1 c ″ が並列に挿入される。

また、コンピュータ 2 2 に対しユーザは予め、又は画像取得後でも、セクショニング分解能を複数段階（ここでは、高、中、低の 3 段階）の何れかに指定又は変更することができる。CPU 2 2 1 は、インタフェース回路（I / F）2 2 4 を介して入力器 2 4 からの信号を受信し、ユーザの指定した段階を認識する。

10

【 0 0 5 8 】

このような蛍光共焦点顕微鏡装置は、コンピュータ 2 2 内の CPU 2 2 1 の指示の下で次のとおり動作する。

各光検出器 2 1 a , 2 1 b , 2 1 c から並行して出力される信号 s a , s b , s c は、電流 / 電圧変換器 2 1 a ′ , 2 1 b ′ , 2 1 c ′ , A / D 変換器 2 1 a ″ , 2 1 b ″ , 2 1 c ″ を介してフレームメモリ M a , M b , M c に対し並行して書き込まれる。

【 0 0 5 9 】

よって、フレームメモリ M a 上には信号 s a による画像データ D a が構築され、フレームメモリ M b 上には信号 s b による画像データ D b が構築され、フレームメモリ M c 上には信号 s c による画像データ D c が構築される。これら画像データ D a , D b , D c は、コンピュータ 2 2 内の RAM 2 2 2 などの記憶部に格納される。

20

ここで、ユーザの指定した段階が「高」であったとき、CPU 2 2 1 は、画像データ D a を RAM 2 2 2 から読み出し、その画像データ D a に基づく画像をモニタ 2 3 に表示する。この画像は、図 4 (a) に示したような薄い層 1 0 a の画像となる。

【 0 0 6 0 】

ユーザの指定した段階が「中」であったとき、CPU 2 2 1 は、画像データ D a , D b を RAM 2 2 2 から読み出し、それら画像データ D a , D b の和をとり（画像データ D a , D b を重畳させ）、その和の画像データ D a b に基づく画像をモニタ 2 3 に表示する。この画像は、図 4 (b) に示したような厚い層 1 0 b の画像となる。

30

ユーザの指定した段階が「低」であったとき、CPU 2 2 1 は、画像データ D a , D b , D c を RAM 2 2 2 から読み出し、それら画像データ D a , D b , D c の和をとり（画像データ D a , D b , D c を重畳させ）、その和の画像データ D a b c に基づく画像をモニタ 2 3 に表示する。この画像は、図 4 (c) に示したような極めて厚い層 1 0 c の画像である。

【 0 0 6 1 】

したがって、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置によれば、ユーザは、入力器 2 4 を操作するだけで、セクショニング分解能を図 4 の (a) , (b) , (c) のとおり変更することができる。

ここで、この蛍光共焦点顕微鏡では、マスク部材 1 9 が、薄い層 1 0 a を示す光束、厚い層 1 0 b を示す光束、極めて厚い層 1 0 c を示す光束の全てを生成する。そして、セクショニング分解能を変更する際に駆動されるのは、コンピュータ 2 2 のみである。

40

【 0 0 6 2 】

よって、マスク部材 1 9 の位置合わせさえ予め高精度に行われていれば、各層の画像はそれぞれ高精度に取得される。

したがって、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置は、シンプルな構成でありながらも高精度にセクショニング分解能を変更することができる。

さらに、本実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置は、複数の光検出器 2 1 a , 2 1 b , 2 1 c を用いて、取得した画像データを演算することで画像取得後におけるセクショニング分解能の変更や、異なる層の画像情報の取得が可能になるので、画像取得前にセクショニ

50

グ分解能を指定する必要がない。そのため、画像取得のセット時間が短くなる。また、試料への光照射時間も減り、試料のダメージを軽減できる。

【 0 0 6 3 】

また、各画像データが並行して取得されるので、同じ時点の試料 1 0 を様々なセクショニング分解能で観察することが可能になる。

これは、時間経過に伴って状態が変化するような試料（生体試料など）を、同じ状態の下で様々なセクショニング分解能で観察したい場合などに極めて有効である。

また、各画像データは個別に記憶されるので、ユーザは所望するタイミングで所望する回数だけ、セクショニング分解能を変更することができる。

【 0 0 6 4 】

（その他）

なお、本実施形態では、モニタ 2 3 上に同時に表示される画像が、試料 1 0 の何れかの層の画像 1 つのみであるかのごとく説明したが、2 以上にしてもよいことは言うまでもない。

〔その他〕

また、第 2 実施形態又は第 3 実施形態では、セクショニング分解能の切り換え数が「 3 」となっているが、必要に応じて 3 より大きい数、又は 2 に増減してもよい。その増減数に応じて、反射透過面 1 9 a , 1 9 b , . . . の数を増減すればよい。

【 0 0 6 5 】

また、第 2 実施形態又は第 3 実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置は、図 6 , 図 7 に示す光検出部 2 以外に、例えば図 8 , 図 9 , 図 1 0 , 図 1 1 , 図 1 2 の何れかに示すような光検出部を適用することができる。なお、適用された光検出部内の光検出器の数に応じて、上述した電流電圧変換器、スイッチ、A / D 変換器、フレームメモリなどはそれぞれ最適な数だけ配置される。

【 0 0 6 6 】

以下、図 8、図 9、図 1 0、図 1 1、図 1 2 に示す各光検出部について説明する。なお、これらの各図では図 2、図 5 と同様、各反射透過面の符号には集光レンズ 1 8 に近い側から順に、添え字「 a 」, 「 b 」, 「 c 」, . . . を付した。また、各反射透過面において中央光束に作用する面の符号は、その反射透過面と同じ符号に「 ' 」を付したものであり、周辺光束に作用する面の符号は、その反射透過面と同じ符号に「 '' 」を付したものである。また、各光検出器の符号には、それに対応する反射透過面と同じ添え字「 a 」, 「 b 」, 「 c 」, . . . を付した。

【 0 0 6 7 】

また、各図に示す何れのマスク部材においても、集光レンズ 1 8 から離れた反射透過面ほど、中央光束に作用する面（ピンホール又は反射面）の径が大きい。また、各反射透過面は何れも集光レンズ 1 8 の焦点深度内に配置されている。

図 8 に示す光検出部のマスク部材 2 9 は、図 5 に示したのと同じマスク部材である。つまり、反射透過面 2 9 a , 2 9 b , 2 9 c の中央が反射面 2 9 a ' , 2 9 b ' , 2 9 c ' 、その周辺が透過面 2 9 a '' , 2 9 b '' , 2 9 c '' となっている。光検出器 2 1 a , 2 1 b , 2 1 c は、それら反射面 2 9 a ' , 2 9 b ' , 2 9 c ' からの射出光束の光路を個別にカバーする。

【 0 0 6 8 】

図 9 に示す光検出部のマスク部材 3 9 は、図 2 に示したマスク部材 2 9 において、反射面 1 9 A の位置に反射透過面 1 9 b、反射透過面 1 9 b の位置に反射透過面 1 9 c を設けたものである。

図 1 0 に示す光検出部のマスク部材 2 9 は、図 8 に示したのと同じマスク部材である。但し、この光検出部には光検出器 2 1 d が追加されている。光検出器 2 1 d は、反射透過面 2 9 c の透過面 2 9 c '' を透過した光束の光路をカバーする。

【 0 0 6 9 】

図 1 1 に示す光検出部のマスク部材 5 9 は、マスク部材 2 9 において、集光レンズ 1 8

10

20

30

40

50

に近い方から数えて２番目の反射透過面２９ｂの傾斜方向が、他の反射透過面２９ａ，２９ｃの傾斜方向と反対になったものである。光検出器２１ｂは、そのような反射透過面２９ｂの反射面２９ｂ'からの射出光束の光路をカバーする。

図１２に示す光検出部のマスク部材６９には、透明基板を用いた他のマスク部材とは異なり、プリズム（ここでは５角プリズム）が用いられている。

【００７０】

マスク部材６９は、５角プリズムの第２面、第３面に、ピンホール６９ａ'と反射面６９ａ''とからなる反射透過面６９ａ、ピンホール６９ｂ'と反射面６９ｂ''とからなる反射透過面６９ｂをそれぞれ設けてなる。

光検出器２１ａは、ピンホール６９ａ'からの射出光束の光路をカバーし、光検出器２１ｂは、ピンホール６９ｂ'からの射出光束の光路をカバーし、光検出器２１ｃは、マスク部材６９において何ら反射透過面を設けていない最終面（第５面）からの射出光束の光路をカバーする。

【００７１】

因みに、その光検出器２１ｃの前側には、マスク部材６９の各ピンホール６９ａ'，６９ｂ'よりも大きい開口６９ｃ'を有した絞り６９ｃが配置されている。

他の光検出部内の同様の光検出器（図９の光検出器２１ｄ，図１０の光検出器２１ｄ、図１１の光検出器２１ｄ）の全段にも、同様の絞りを配置してもよい。

また、上記各実施形態は、蛍光共焦点顕微鏡装置（蛍光観察用の共焦点顕微鏡装置）の実施形態であるが、本発明は、蛍光観察用以外の共焦点顕微鏡装置にも同様に適用可能である。

【図面の簡単な説明】

【００７２】

【図１】第１実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置の構成図である。

【図２】第１実施形態の光検出部を説明する図である。

【図３】可動シャッタ２０の遮光部の例を示す図である。

【図４】マスク部材１９の各反射透過面１９ａ，１９ｂ，１９ｃと、試料１０の各層１０ａ，１０ｂ，１０ｃとの関係を示す模式図である。

【図５】マスク部材２９を説明する図である。

【図６】第２実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置の構成図である。

【図７】第３実施形態の蛍光共焦点顕微鏡装置の構成図である。

【図８】第２実施形態又は第３実施形態に適用し得る光検出部の別の例を示す図である。

【図９】第２実施形態又は第３実施形態に適用し得る光検出部の別の例を示す図である。

【図１０】第２実施形態又は第３実施形態に適用し得る光検出部の別の例を示す図である。

【図１１】第２実施形態又は第３実施形態に適用し得る光検出部の別の例を示す図である。

【図１２】第２実施形態又は第３実施形態に適用し得る光検出部の別の例を示す図である。

【符号の説明】

【００７３】

１１ 光源

１２ 照明用レンズ

１３，１７ フィルタ

１４ ダイクロイックミラー

１５ ガルバノミラー

１６ 対物レンズ

１８ 集光レンズ

１９，２９，３９，５９，６９ マスク部材

１９ａ，１９ｂ，・・・，２９ａ，２９ｂ，・・・，６９ａ，６９ｂ，・・・ 反射透過

10

20

30

40

50

面

19 a", 19 b", . . . , 29 a', 29 b', . . . , 69 a", 69 b", . . .

・ 反射面

19 a', 19 b', . . . , 69 a', 69 b', . . . ピンホール

29 a", 29 b", . . . 透過面

69 c 絞り

69 c' 開口

20 可動シャッタ

21 光検出器

22 コンピュータ

23 モニタ

24 入力器

21' 電流 / 電圧変換器 (I / V)

31 スイッチ

21" A / D 変換器 (A / D)

M フレームメモリ

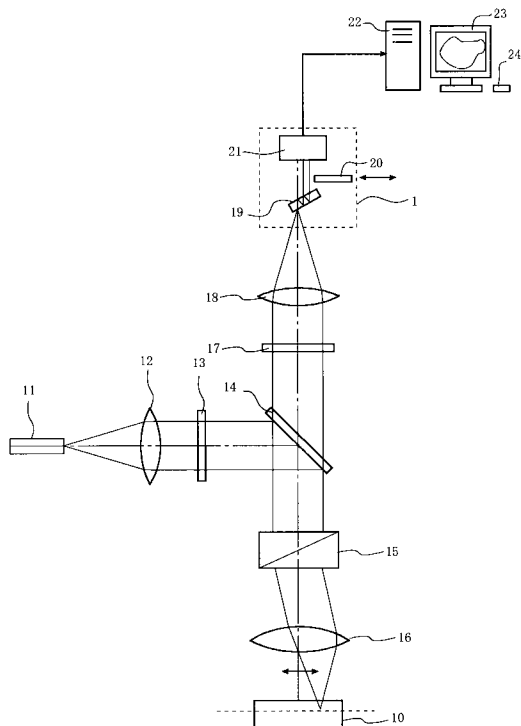
221 CPU

222 RAM

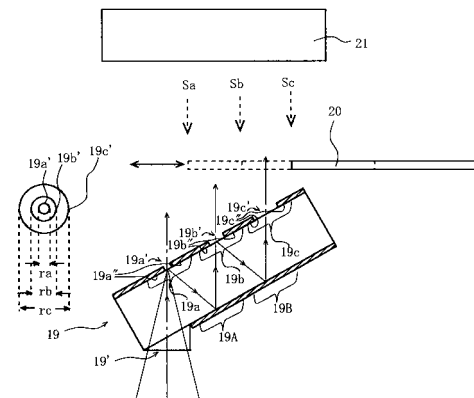
224 インタフェース回路 (I / F)

10

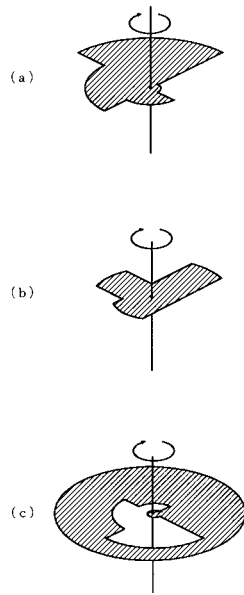
【図 1】



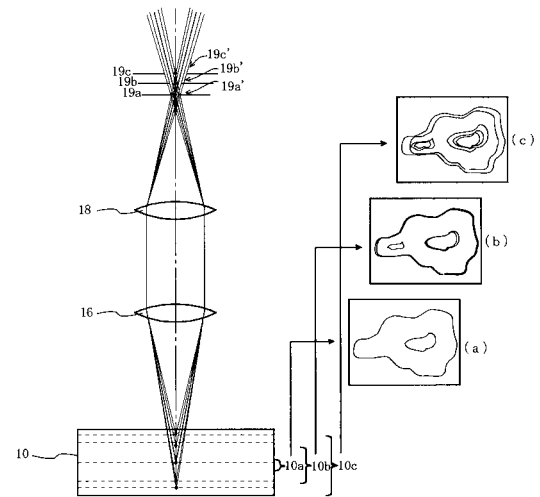
【図 2】



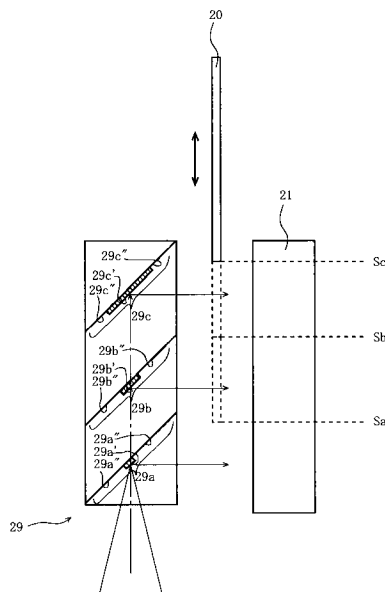
【図 3】



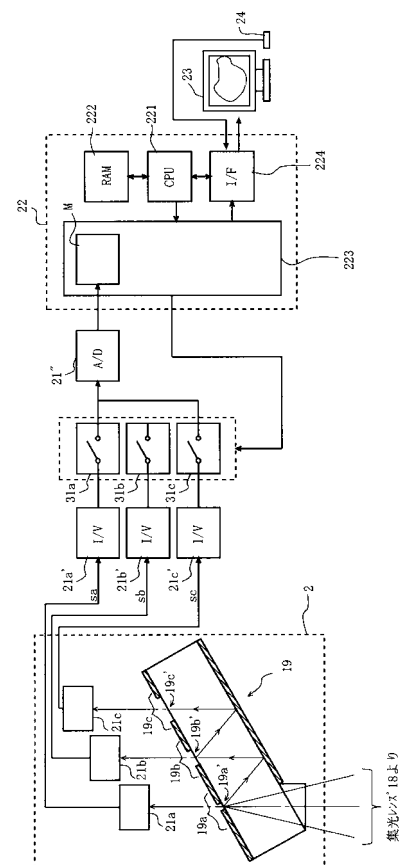
【図 4】



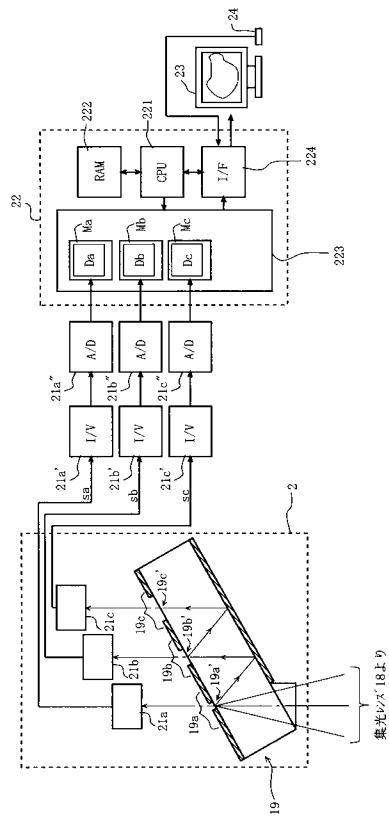
【図 5】



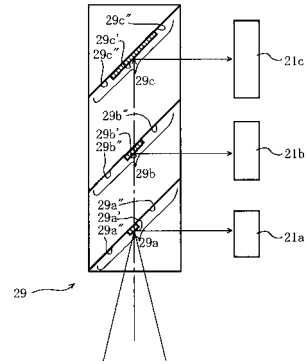
【図 6】



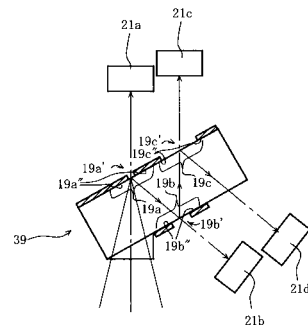
【図 7】



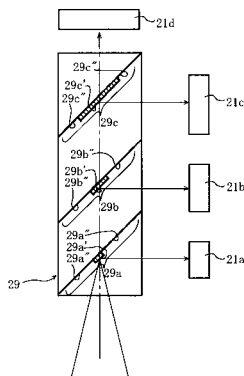
【図 8】



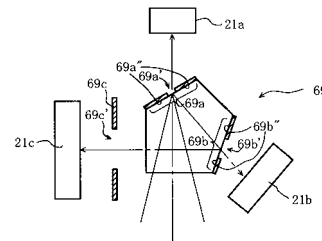
【図 9】



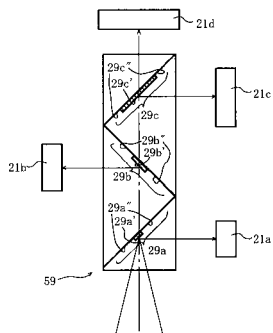
【図 10】



【図 12】



【図 11】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平 0 2 - 2 2 1 9 0 9 (J P , A)
特表 2 0 0 1 - 5 1 1 9 0 2 (J P , A)
特開平 0 8 - 1 3 6 8 1 5 (J P , A)
特開平 1 1 - 2 3 7 5 5 7 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 2 B 2 1 / 0 0 - 2 1 / 3 6