

(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2005-24597  
(P2005-24597A)

(43) 公開日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 2 B 21/06	GO 2 B 21/06	2 G O 5 9
GO 1 N 21/01	GO 1 N 21/01	2 H O 5 2
GO 1 N 21/17	GO 1 N 21/17 6 2 0	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-186769 (P2003-186769)	(71) 出願人	503236175 寺川 進 静岡県浜松市半田山三丁目4 5 番 6 号
(22) 出願日	平成15年6月30日 (2003. 6. 30)	(74) 代理人	100075144 弁理士 井ノ口 壽
		(72) 発明者	寺川 進 静岡県浜松市半田山三丁目4 5 番 6 号
		Fターム(参考)	2G059 AA05 BB12 BB14 CC16 EE04 FF01 FF08 GG01 GG10 JJ07 JJ11 JJ13 KK07 MM10 2H052 AA07 AA09 AA13 AB02 AC05 AC09 AC15 AC16 AC18 AC34 AF14 AF25

(54) 【発明の名称】 顕微鏡用極薄照明光発生装置および前記装置を用いた観察方法

(57) 【要約】

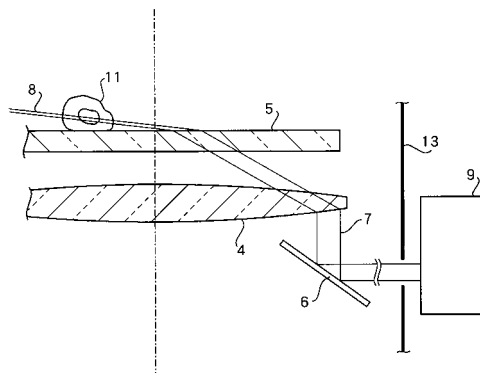
【課題】 顕微鏡用極薄照明光発生装置および前記顕微鏡用極薄照明光発生装置を用いて、細胞等の立体情報を獲得することができる観察方法を提供する。

【解決手段】 本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置は、光源と、光源からの光をスリット光に変換するスリット光形成手段9と、試料11が載せられる透明板5と、前記板と試料側の媒質の界面に前記スリット光を全反射角よりやや小さい角度で入射させ、屈折光が前記スリット光より薄く、かつ前記界面と僅かな角度を保って発生し極薄照明光8となるように入射させる入射手段とを含んでいる。

スリット光光路変更手段は、前記極薄照明光8が前記界面に対して異なる高さになるように前記スリット光の光路を変更する。

前記装置を利用する本発明方法によれば、細胞等の立体情報が獲得できる。

【選択図】 図3



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

光源と、  
光源からの光をスリット光に変換するスリット光形成手段と、  
試料が載せられる透明板と、  
前記板と試料側の媒質の界面に前記スリット光を全反射角よりやや小さい角度で入射させ、屈折光が前記スリット光より薄く、かつ前記界面と僅かな角度を保って発生し極薄照明光となるように入射させる入射手段と、および  
前記極薄照明光が前記界面に対して異なる高さになるように前記スリット光の光路を変更するスリット光光路変更手段と、  
から構成した顕微鏡用極薄照明光発生装置。

10

**【請求項 2】**

前記極薄照明光が前記界面に対して異なる高さになるように前記スリット光の光路手段をさらに備える請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置。

**【請求項 3】**

前記光源はレーザ光源であり、前記透明板はカバーガラスであり、前記入射手段は、前記光源を使用する顕微鏡の対物レンズの周縁部を含むものである請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置。

**【請求項 4】**

前記スリット光形成手段は、光源からの光を最小のスリット光に変換する第 1 スリット板と、前記スリット板で形成された側帯回折光を除去する第 2 スリット板から構成されている請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置。

20

**【請求項 5】**

請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置を用いる顕微鏡観察方法において、  
顕微鏡の前記透明板に標本を配置するステップと、  
前記スリット光の光路を選択して前記極薄照明光の通過した 1 以上の切断面から前記極薄照明光に励起されて発生した信号光の情報を取得するステップと、  
前記切断面の情報に基づいて切断面の情報または複数の切断面の情報よりなる立体情報を再生するステップから構成した顕微鏡観察方法。

**【発明の詳細な説明】**

30

**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、試料を光学的に断面する顕微鏡用極薄照明光発生装置および前記装置を用いた観察方法に関する。

**【0002】****【従来技術】**

細胞や組織の切断・断層像を得る従来の方法は微分干渉法や共焦点走査顕微鏡法である。これらは約 1 マイクロメートルの厚みの断層像を形成する。これらの光学的切断法は、ピンホールまたはプリズムによる焦点面画像の選択的取得に基づいており、焦点面前後の面から到来する光がこれらの光学素子によって排除されることで、断層像ができる。ピンホールの大きさで切断の厚みが決まるが、ピンホールを小さくしすぎると暗い像となる。プリズムの場合は、もっぱら対物レンズの開口数の作用によって切断能が決まる。光自体は薄いものとはなっておらず、標本上での照明領域は大きい。

40

**【0003】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は従来方法では、達成できなかった極めて薄い極薄照明光を発生する顕微鏡用極薄照明光発生装置を提供することにある。  
本発明のさらに他の目的は前記顕微鏡用極薄照明光発生装置を用いて、細胞等の立体情報を獲得することができる観察方法を提供することにある。

50

## 【 0 0 0 4 】

## 【 課題を解決するための手段 】

前記目的を達成するために本発明による請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置は、光源と、光源からの光をスリット光に変換するスリット光形成手段と、試料が載せられる透明板と、前記板と試料側の媒質の界面に前記スリット光を全反射角よりやや小さい角度で入射させ、屈折光が前記スリット光より薄く、かつ前記界面と僅かな角度を保って発生し極薄照明光となるように入射させる入射手段と、および前記極薄照明光が前記界面に対して異なる高さになるように前記スリット光の光路を変更するスリット光光路変更手段と、から構成されている。 10

## 【 0 0 0 5 】

本発明による請求項 2 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置は、請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置において、前記極薄照明光が前記界面に対して異なる高さになるように前記スリット光の光路手段をさらに備えるものである。  
 本発明による請求項 3 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置は、請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置において、前記光源はレーザ光源であり、前記透明板はカバーガラスであり、前記入射手段は、前記光源を使用する顕微鏡の対物レンズの周縁部を含むものである。  
 本発明による請求項 4 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置は、請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置において、前記スリット光形成手段は、光源からの光を最小のスリット光に変換する第 1 スリット板と、前記スリット板で形成された側帯回折光を除去する第 2 スリット板から構成されている。  
 なお、第 1 スリット板と第 2 スリット板は連動しまたは独立して移動させることができる。 20

## 【 0 0 0 6 】

本発明による請求項 5 記載の方法は、請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置を用いる顕微鏡観察方法であって、顕微鏡の前記透明板に標本を配置するステップと、前記スリット光の光路を選択して前記極薄照明光の通過した 1 以上の切断面から前記極薄照明光に励起されて発生した信号光の情報を取得するステップと、前記切断面の情報に基づいて切断面の情報または複数の切断面の情報よりなる立体情報を再生するステップから構成されている。 30

## 【 0 0 0 7 】

## 【 発明の実施の形態 】

以下図面等を参照して本発明による装置の実施の形態を説明する。図 1 は、本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置の原理を説明するための略図である。  
 図 1 に示すように水相とカバーガラスのような透明板 5 との界面を想定し、その中に細胞等の標本 10 が存在している場合について検討する。その界面の入射光 7 の入射角  $\theta$  を臨界角より僅かに小さく取ると、全反射を生ずることなく、光は水側へ抜ける光の成分が発生する。この抜けた光（屈折光）8 は界面に平行に近い。この条件において、入射光 7 がこの紙面に直角方向に幅を持ち光の厚さを  $d_1$  とすると屈折光 8 は同様な幅を持ち厚み  $d_2$  は  $d_1$  よりは遙に薄くなる。本件発明者は前記原理を利用して水相中の標本 10 を光学的に切断して、その切断面 10' の情報を得ようとするものである。  
 以下本願明細書において入射光 7 に相当するスリット状の光をスリット光 7 といいこの光が界面で屈折して発生する光 8 を極薄照明光 8 と言うことにする。 40

## 【 0 0 0 8 】

図 2 は本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置のスリット光形成手段出力までの光路の実施例を示す略図である。 50

レーザ発振器 20 からのレーザ光は反射鏡 21, 22 により光路が変更され、凹レンズ 23 によって発散させられ凸レンズ 24 により、コリメートまたは収束されて反射鏡 25 で反射されたレーザ光 1 が、前述したスリット光 7 を形成するスリット光形成手段 9 に入射される。スリット光形成手段 9 の出力は顕微鏡の鏡筒内に入射させられ、反射鏡 6 により前述したスリット光 7 として利用される。

#### 【0009】

次に図 4 を参照して、本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置で使用するスリット光形成手段の第 1 の実施例を説明する。なお通常スリット光形成手段と後述する対物レンズ間には、適宜な反射鏡やダイクロイックミラーなどの光学素子が用いられるが、説明を容易にするために省略してある。スリット光形成手段 9A に入射されるレーザ光 1c は集光されており、第 1 のスリット 2 に入射させられる。これによって光が狭められるとともに回折が起こり、サイドバンドが生ずる。この第 1 のスリット 2 を横に移動することで走査の機能を果たすことができる。第 2 のスリット 3 で、サイドバンドを遮断する。第 1 のスリット 2 を横方向の移動に連動して第 2 のスリット 3 を適当量横に移動して、主光を通して、スリット光 7 を形成する。スリット光 7 は顕微鏡の対物レンズ 4 の周縁部に入射される。対物レンズ 4 とカバーガラス 5 の間には結合油が封入されている。12A, 12B は標本（蛍光ビーズ）であり、それを切断するように極薄照明光 8 が通る。対物レンズを上下してフォーカスを合わせる。切断面の蛍光発光を確認することにより極薄照明光 8 の効果を  
10  
20  
確認できる。

#### 【0010】

図 5 はスリット光形成手段の第 2 の実施例を説明した略図である。前述同様スリット光形成手段と対物レンズ間の光学素子は省略してある。スリット光形成手段 9B に入射されるレーザ光 1p は平行光として第 1 のスリット 2 に入射させられる。これによって光が狭められるとともに回折が起こり、サイドバンドが生ずる。この第 1 のスリット 2 を横に移動することで走査の機能を果たすことができる。第 2 のスリット 3 で、サイドバンドを遮断する。第 1 のスリット 2 を横方向の移動に連動して第 2 のスリット 3 を適当量横に移動して、主光を通して、スリット光 7 を形成する。スリット光 7 は顕微鏡の対物レンズ 4 の周縁部に入射される。対物レンズ 4 とカバーガラス 5 の間には結合油が封入されている。12A, 12B は標本（蛍光ビーズ）であり、それを切断するように極薄照明光 8 が通る。レーザ光 1p を平行光平面波とすると、第 1 および第 2 のスリット 2, 3 の移動による  
30  
走査で、極薄照明光 8 が光軸上の点 O を中心に回転するように移動する。

#### 【0011】

図 3 は、標本である細胞 11 を観察する例を示す図である。スリット光 7 を前述のようなスリット光形成手段 9 で形成し、反射鏡 6 により対物レンズ 4 に入射する。このスリット光を上記原理によってさらに細くして回折限界に達する薄い極薄照明光 8 を形成する。

これを細胞からなる標本 11 に照射し、照明された部分をそれに垂直な方向から観察して細胞等の断層像を得る。細胞の内部にある蛍光性の物質の像（蛍光像）が得られる。スリット光の位置をずらすことにより、細胞等の光切断位置を走査することにより、各面の 2 次元画像を記録し、それをコンピュータ上で再構成することで細胞の 3 次元像が得られる。特に、超高開口数対物レンズ（NA = 1.65）を利用して、このような配置を取ること  
40  
は容易であり、実用的な装置として構築できた。また前記極薄照明光 8 は 1 ミクロン以下の厚さにすることができる。

#### 【0012】

本発明による顕微鏡観察方法は、前記装置を使用するものである。顕微鏡の前記透明板カバーガラスに標本を配置するステップにより、細胞等の標本を水相に配置する。前記スリット光の光路を選択して前記極薄照明光の通過した 1 以上の切断面の前記極薄照明光に励起された信号光の情報を取得する。そして前記前記切断面の情報に基づいて断面のまたは立体情報を再生する。これにより、細胞等の立体像を再構成することができる。  
50

## 【 0 0 1 3 】

## 【 発明の効果 】

以上、説明したように本発明は1ミクロン以下の厚さの極薄照明光をカバーガラスに略平行に作りだすことができ、これにより獲得できる断面の情報に基づいて、細胞等の3次元情報を再構成することができる。

## 【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置の原理を説明するための略図である。

【 図 2 】 本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置のスリット光形成手段出力までの光路を示す略図である。

【 図 3 】 本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置の実施例を示す略図である。

10

【 図 4 】 本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置で使用するスリット光形成手段の第1の実施例を示す略図である。

【 図 5 】 本発明による顕微鏡用極薄照明光発生装置で使用するスリット光形成手段の第2の実施例を示す略図である。

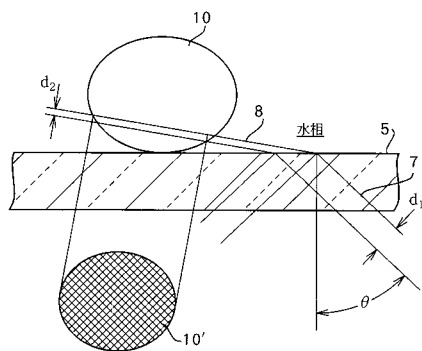
## 【 符号の説明 】

- 1 レーザ光
- 2 第1のスリット
- 3 第2のスリット
- 4 対物レンズ
- 5 透明板（カバーガラス）
- 6 反射鏡
- 7 スリット光
- 8 極薄照明光
- 9, 9A, 9B スリット光形成手段
- 10, 11 標本
- 12A, 12B 標体
- 13 顕微鏡鏡筒
- 20 レーザ発振器
- 21, 22 反射鏡
- 23 凹レンズ
- 24 凸レンズ
- 25 反射鏡

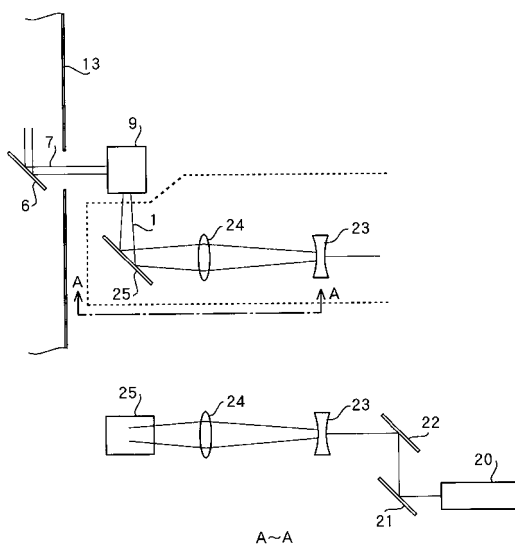
20

30

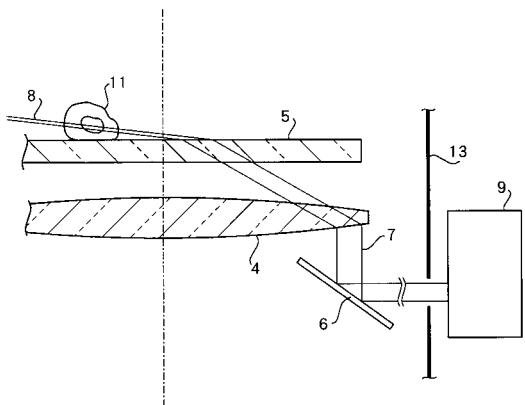
【図 1】



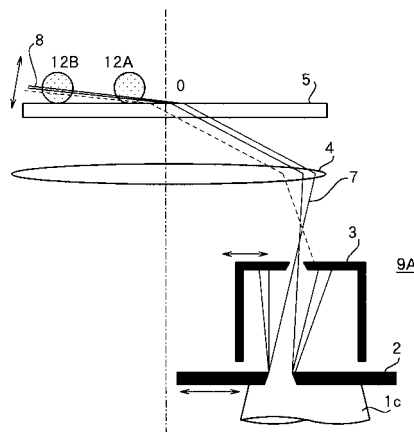
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【 図 5 】

