

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6143098号
(P6143098)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(51) Int. Cl.		F 1	
G 0 2 B 21/24	(2006.01)	G 0 2 B 21/24	
G 0 2 B 21/00	(2006.01)	G 0 2 B 21/00	

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2013-175477 (P2013-175477)	(73) 特許権者	503359821 国立研究開発法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22) 出願日	平成25年8月27日(2013.8.27)	(74) 代理人	100120868 弁理士 安彦 元
(65) 公開番号	特開2015-45684 (P2015-45684A)	(72) 発明者	中野 明彦 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人 理化学研究所内
(43) 公開日	平成27年3月12日(2015.3.12)	(72) 発明者	市原 昭 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人 理化学研究所内
審査請求日	平成28年5月23日(2016.5.23)	審査官	瀬戸 息吹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対物レンズの駆動制御方法及び蛍光顕微鏡システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光顕微鏡に備えられピエゾアクチュエータにより駆動される対物レンズに生じる光軸色収差の補正方法であって、

前記ピエゾアクチュエータに対し、前記対物レンズを観察対象の焦点位置に移動させる変位電圧よりも大きいパルス電圧を、前記対物レンズが前記焦点位置の手前まで移動する所定時間印加する第1工程と、

前記第1工程後に前記変位電圧を前記ピエゾアクチュエータに印加し前記対物レンズを静定させる第2工程と、

を有することを特徴とする対物レンズの駆動制御方法。

【請求項2】

前記第1工程において、前記パルス電圧として前記変位電圧の逡倍の電圧が印加されることを特徴とする請求項1記載の対物レンズの駆動制御方法。

【請求項3】

光源と、

前記光源から発せられる光線を観察対象に導く対物レンズと、

前記対物レンズを光軸方向に駆動するピエゾアクチュエータと、

前記対物レンズを前記観察対象の焦点位置に移動させる変位を生じる変位電圧よりも大きいパルス電圧を、前記対物レンズが前記焦点位置の手前まで移動する所定時間、前記ピエゾアクチュエータに印加した後、前記変位電圧を前記ピエゾアクチュエータに印加し前

10

20

記対物レンズを静定させる駆動部と、
を備えることを特徴とする蛍光顕微鏡システム。

【請求項 4】

前記駆動部は前記パルス電圧として前記変位電圧の過倍の電圧を印加することを特徴とする請求項 3 記載の蛍光顕微鏡システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光顕微鏡等に用いられる対物レンズの駆動制御方法及びそれを用いた蛍光顕微鏡システムに関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

蛍光顕微鏡は、観察対象となる試料から発せられる蛍光を観察する顕微鏡であり、生物学や医学等、様々な分野で用いられている。

【0003】

観察対象が細胞内の蛋白質である場合に蛍光顕微鏡を用いるときは、この蛋白質を蛍光顕微鏡により観察可能とするため、蛍光蛋白質（以下「マーカー」とも言う。）である GFP (Green Fluorescent Protein)、RFP (Red Fluorescent Protein)、BFP (Blue Fluorescent Protein) 等が遺伝子工学的手法や免疫学的手法を用いて観察対象の蛋白質に付加される、いわゆるマーキングが行われる（例えば、特許文献 1 参照）。

20

【0004】

そして、蛍光蛋白質の種類に応じた波長の励起光を照射し、その蛍光蛋白質から発せられる蛍光を観察、撮影することで、蛍光蛋白質を介する試料の観察が行われている。励起光の光源としては、レーザー光源（Ar、Ar-Kr、He-Ne、He-Cd、半導体等）、超高圧水銀灯、キセノンランプ、紫外線 LED 等の光源が用いられている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特開平 11 - 266883 号公報

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ところで、生きた細胞内の蛋白質間の相互作用を蛍光顕微鏡により観察する際には、複数の蛋白質がそれぞれ波長の異なる蛍光を発する蛍光蛋白質によりマーキングされる。そして、それぞれの蛍光蛋白質に応じた励起光が照射されることで観察が行われるが、このとき蛍光顕微鏡の対物レンズに生じる光軸色収差が問題となる。

【0007】

光軸色収差とは、レンズの焦点距離が光の波長により異なるため、光の色により像面にずれが生じる現象であり、波長（色）による像面位置の不一致や被写体ブレの原因となっている。特に空間 3 次元観察においては、顕微鏡の光軸倍率が 2 乗特性であり、100 倍の対物レンズでは光軸焦点が 10000 倍となってカメラに結像するため、光軸色収差は大きな問題となる。

40

【0008】

こうした光軸色収差による影響を軽減するため、従来、対物レンズとして十数枚の屈折率の異なるレンズを組み合わせたものを用いることが行われている。しかし、この手法によっても、150 ~ 200 nm の光軸色収差が残ってしまい、微細な細胞内蛋白質の観察を行う際には大きな影響を及ぼすことになる。

【0009】

そのため、蛍光顕微鏡を用いて細胞内蛋白質を観察する場合には、従来のレンズの組合せによる方法とは異なる新たな光軸色収差の補正方法が必要となる。

50

【0010】

また、被写体が生きた細胞内の物質である場合には、被写体が常に動いているため被写体ブレが生じ易い。こうした被写体ブレを防止するためには高速撮影を行う必要がある。

【0011】

さらに、蛍光顕微鏡により3次元画像の取得をする場合には多数の平面画像が必要となる。この場合、それぞれの平面画像の取得位置に応じて対物レンズを駆動し焦点位置を合わせる必要があるが、3次元画像の高速取得のためには、この焦点合わせに要する時間を短縮する必要がある。

【0012】

そこで、本発明は、上述した問題点に鑑みて案出されたものであり、光軸色収差の補正を対物レンズの駆動で行うとともに、この対物レンズの駆動と静止の迅速化を実現することで撮影を迅速化し3次元画像の高速取得も行うことのできる対物レンズの駆動制御方法及びそれを用いた蛍光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】

【0013】

本発明者は、上述した課題を解決するために、光軸色収差の補正を対物レンズの駆動で行うとともに、この対物レンズの駆動と静止の迅速化を実現することで撮影を迅速化し3次元画像の高速取得も行うことのできる対物レンズの駆動制御方法及びそれを用いた蛍光顕微鏡システムを発明した。

【0014】

第1発明に係る対物レンズの駆動制御方法は、蛍光顕微鏡に備えられピエゾアクチュエータにより駆動される対物レンズに生じる光軸色収差の補正方法であって、前記ピエゾアクチュエータに対し、前記対物レンズを観察対象の焦点位置に移動させる変位電圧よりも大きいパルス電圧を、前記対物レンズが前記焦点位置の手前まで移動する所定時間印加する第1工程と、前記第1工程後に前記変位電圧を前記ピエゾアクチュエータに印加し前記対物レンズを静定させる第2工程と、を有することを特徴とする。

【0015】

第2発明に係る対物レンズの駆動制御方法は、第1発明に係る光軸色収差の補正方法において、前記第1工程において、前記パルス電圧として前記変位電圧の逡倍の電圧が印加されることを特徴とする。

【0016】

第3発明に係る蛍光顕微鏡システムは、光源と、前記光源から発せられる光線を観察対象に導く対物レンズと、前記対物レンズを光軸方向に駆動するピエゾアクチュエータと、前記対物レンズを前記観察対象の焦点位置に移動させる変位を生じる変位電圧よりも大きいパルス電圧を、前記対物レンズが前記焦点位置の手前まで移動する所定時間、前記ピエゾアクチュエータに印加した後、前記変位電圧を前記ピエゾアクチュエータに印加し前記対物レンズを静定させる駆動部と、を備えることを特徴とする。

【0017】

第4発明に係る蛍光顕微鏡システムは、第3発明に係る蛍光顕微鏡システムにおいて、前記駆動部は前記パルス電圧として前記変位電圧の逡倍の電圧を印加することを特徴とする。

【発明の効果】

【0018】

上述した構成からなる本発明によれば、光軸色収差の補正を対物レンズの駆動で行うとともに、この対物レンズの駆動と静止の迅速化を実現することで撮影の迅速化と3次元画像の高速取得を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明の実施形態に係る蛍光顕微鏡システムを示すブロック図である。

【図2】光軸色収差の補正が行われる様子を示し、(A)は光軸色収差の補正前の対物レ

10

20

30

40

50

レンズの位置、(B)は光軸色収差の補正後の対物レンズの位置を示す図である。

【図3】光軸色収差の補正の前後における画像の状態を示し、(A)は光軸色収差の補正前に撮影される画像、(B)は光軸色収差の補正後に撮影される画像を示す図である。

【図4】対物レンズの静定時間を短縮するために印加する電圧を調整する様子を示すグラフである。

【図5】本発明の実施形態に係る光軸色収差の補正方法を示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明の実施の形態としての蛍光顕微鏡システム1と、これにより行われる光軸色収差の補正方法について詳細に説明する。

【0021】

図1は、本発明の実施形態に係る蛍光顕微鏡システム1を示すブロック図である。蛍光顕微鏡システム1は、観察対象6から発せられる蛍光の観察を行う蛍光顕微鏡2と、蛍光顕微鏡2により得られる画像を映し出すディスプレイ4と、蛍光顕微鏡2により得られる画像を保存する外部記憶装置5と、蛍光顕微鏡2、ディスプレイ4及び外部記憶装置5の制御を行う制御部3とにより主に構成されている。

【0022】

蛍光顕微鏡2は、励起光を発する光源21と、光源21から発せられた励起光を反射し光軸の方向を変える反射ミラー22と、反射ミラー22により反射された励起光を選択的に通過させるビームスプリッタ23と、ビームスプリッタ23と観察対象6との間に設けられビームスプリッタ23を通過した励起光及び観察対象6から発せられた蛍光を屈折する結像レンズ24及び対物レンズ25と、対物レンズ25の光軸方向(Z軸方向)への駆動を行うピエゾアクチュエータ26と、観察対象6が載置されるステージ7と、観察対象6から発せられた蛍光を撮影する撮影装置27とを備えて構成されている。

【0023】

光源21は、観察対象である物質をマーキングしている蛍光物質に対して励起波長を有するレーザ光である励起光を照射する光源である。こうした光源21として、超高圧水銀灯、キセノンランプ、紫外線LED等、観察対象から発せられる蛍光の種類に応じて単数又は複数の光源が用いられている。光源21は、制御部3の後述する光源選択部31によりその動作が制御されている。

【0024】

反射ミラー22は、光源21から出射された励起光を反射しその方向を変え、ビームスプリッタ23へと導くためのミラーである。

【0025】

ビームスプリッタ23は、光源21から出射された励起光と、観察対象6から発せられた蛍光とを分離するフィルタ特性を有し、励起光を100%近く透過する一方、蛍光を100%近く反射する。この特性により、励起光はほとんどパワーロスなく観察対象6に照射されるとともに、観察対象6から発せられて対物レンズ25と結像レンズ24を経た蛍光は100%近く撮影装置27へと送られるようになっている。

【0026】

結像レンズ24は、ビームスプリッタ23を通過した励起光を平行光として対物レンズ25へと導くとともに、対物レンズ25を通過した蛍光を収束光へと変換し、撮影装置27の結像面に結像させるレンズである。

【0027】

対物レンズ25は、結像レンズ24を通過した光線を収束光へと変換してその焦点を観察対象6に合わせるとともに、試料から発せられる蛍光を平行光へと変換して結像レンズ24へと導くレンズである。

【0028】

ピエゾアクチュエータ26は、電圧を印加するとピエゾ素子に変形する圧電効果を利用したアクチュエータであり、制御部3の後述する駆動部34によりその動作が制御され、

10

20

30

40

50

対物レンズ 25 の光軸方向への駆動を行う。

【0029】

具体的には、 piezoアクチュエータ 26 の内部には Z 軸方向に積層された多数の piezo素子が設けられている。そして、駆動部 34 によりこれらの piezo素子に電圧が印加されると、それぞれの piezo素子が Z 軸方向に変形する。 piezoアクチュエータ 26 はこの変形力により対物レンズ 25 の Z 軸方向への駆動を行っている。

【0030】

なお、本実施形態においては対物レンズ 25 の Z 方向の駆動のみを行う piezoアクチュエータ 26 が用いられているが、本発明においてはこれに限らず、更に X 方向及び Y 方向の駆動も行う piezoアクチュエータ 26 であっても良い。

10

【0031】

ステージ 7 は、観察対象 6 が載置されるステージであり、図示しないアクチュエータにより X - Y 方向に移動される。なお、ステージ 7 は、本発明においてはこれに限らず、Z 方向にも移動可能であっても良い。ステージ 7 の移動に用いられるアクチュエータは特に限定されず、 piezoアクチュエータの他、ステッピングモータやエアシリンダ等であっても良い。また、ステージ 7 は手動で動かされるようにしても良い。

【0032】

撮影装置 27 は、観察対象 6 から発せられ、対物レンズ 25、結像レンズ 24 及びビームスプリッタ 23 を経た蛍光を受光し撮像を行う CCD (Charge Coupled Device) 等の固体撮像素子を利用したカメラである。撮影装置 27 が CCD である場合には、結像レンズ 24 や対物レンズ 25 を介して入射される被写体像を撮像面上に結像させ、光電変換により映像信号を生成し、これを制御部 3 の後述する表示部 32 や撮影部 33 へと送信する。

20

【0033】

なお、本実施形態においてはこの撮影装置 27 は静止画を撮影するものが想定されているが、本発明においてはこれに限らず、動画を撮影するものであっても良い。撮影装置 27 は、制御部 3 の撮影部 33 によりその駆動が制御される。

【0034】

ディスプレイ 4 は、蛍光顕微鏡 2 の撮影装置 27 により得られる観察対象 6 の画像を映し出す画面であり、制御部 3 の表示部 32 により制御されている。このディスプレイ 4 は単なる画像表示手段であっても良いが、これをタッチパネルとすることで使用者が制御部 3 を介して蛍光顕微鏡システム 1 全体の設定操作を行えるようにしても良い。

30

【0035】

外部記憶装置 5 は、蛍光顕微鏡 2 により得られる観察対象 6 の画像を含む各種データを保存する。

【0036】

制御部 3 は、蛍光顕微鏡システム 1 全体の制御を行い、パーソナルコンピュータ等により構成されている。制御部 3 は、制御部 3 全体を制御する CPU (Central Processing Unit) と、CPU 上で動作する制御プログラム等を格納した ROM (Read Only Memory) と、各種データを一時的に格納するための RAM (Random Access Memory) と、を備えて構成されている。なお、CPU、ROM 及び RAM についての図示は省略されている。

40

【0037】

制御部 3 は、CPU が ROM に格納されている制御プログラムを RAM に展開して実行することにより、光源選択部 31、表示部 32、撮影部 33、駆動部 34 として機能する。

【0038】

光源選択部 31 は、観察対象 6 が発する蛍光の種類に応じて用いる光源 21 を観察対象に応じて選択することで、光源 21 から発せられる光線の波長を変化させる。

【0039】

表示部 32 は、撮影装置 27 により撮影された画像を、制御部 3 に接続された外部のデ

50

ディスプレイ 4 に表示する。

【 0 0 4 0 】

撮影部 3 3 は、撮影装置 2 7 のシャッターや撮影タイミング等の駆動制御を行うとともに、撮影装置 2 7 により撮像された画像のデータを、制御部 3 に接続された外部記憶装置 5 に記憶させる。

【 0 0 4 1 】

駆動部 3 4 は、 piezoアクチュエータ 2 6 に印加される電圧の大きさとタイミングを制御することで、 piezoアクチュエータ 2 6 の駆動制御を行う。こうした駆動部 3 4 による piezoアクチュエータ 2 6 の制御は、マーカーの種類ごとに予め求められている各蛍光色に応じた焦点距離に基づき行われる。マーカーの種類、焦点距離及び必要な印加電圧に関する情報は RAM や外部記憶装置 5 に記憶されていて、 piezoアクチュエータ 2 6 の駆動時に駆動部 3 4 がこの情報を読み出すことで、 piezoアクチュエータ 2 6 に印加される電圧が決定される。

10

【 0 0 4 2 】

次に、上述した蛍光顕微鏡システム 1 が励起光及び蛍光を導く動作について説明する。

【 0 0 4 3 】

まず、観察対象 6 に応じた波長の励起光を出射する光源 2 1 が光源選択部 3 1 により選択され、選択された光源 2 1 から励起光が反射ミラー 2 2 に向けて照射される。なお、選択された光源 2 1 の情報は、光源選択部 3 1 から駆動部 3 4 へと送られ、駆動部 3 4 による piezoアクチュエータ 2 6 への印加電圧の選択に用いられる。

20

【 0 0 4 4 】

次に、反射ミラー 2 2 に到達した励起光は、反射ミラー 2 2 により反射されて進行方向が変化し、ビームスプリッタ 2 3 へと導かれる。ビームスプリッタ 2 3 は、上述したように励起光をほぼ 1 0 0 % 透過する。そのため、ビームスプリッタ 2 3 へと導かれた励起光はほぼ 1 0 0 % ビームスプリッタ 2 3 を透過し、結像レンズ 2 4 へと導かれる。

【 0 0 4 5 】

結像レンズ 2 4 に導かれた励起光は、結像レンズ 2 4 を平行光として通過し、対物レンズ 2 5 へと導かれる。ここで、光源 2 1 から出射される励起光が平行光である場合には、励起光はそのまま平行光として結像レンズ 2 4 を通過する。一方、励起光が拡散光である場合には、結像レンズ 2 4 により平行光へと変換される。

30

【 0 0 4 6 】

次に、結像レンズ 2 4 から対物レンズ 2 5 へと導かれた励起光は、対物レンズ 2 5 により収束光に変換されるとともに、観察対象 6 に焦点が合わされて照射される。

【 0 0 4 7 】

この焦点合わせは、駆動部 3 4 が piezoアクチュエータ 2 6 に印加する電圧を光源選択部 3 1 から送られた光源 2 1 の情報に基づき決定することで行われる。 piezoアクチュエータ 2 6 に印加される電圧が変化すると piezoアクチュエータ 2 6 の動作量が変化し、 piezoアクチュエータ 2 6 に駆動される対物レンズ 2 5 の静定位置も変化する。こうして対物レンズ 2 5 の静定位置を変化させることにより励起光の焦点位置を調整することができる。

40

【 0 0 4 8 】

次に、対物レンズ 2 5 を通過した励起光は、ステージ 7 上にある観察対象 6 に照射される。励起光の照射により観察対象 6 のマーカーの種類に応じた波長の蛍光が散乱光として発せられる。

【 0 0 4 9 】

マーカーから発せられた散乱光である蛍光は、対物レンズ 2 5 により平行光へと変換され、結像レンズ 2 4 へと導かれる。なお、対物レンズ 2 5 は蛍光を収束光に変換するものであっても良い。

【 0 0 5 0 】

対物レンズ 2 5 を通過した蛍光は、次に結像レンズ 2 4 に導かれる。蛍光は結像レンズ

50

24により撮影装置27の像面において結像する収束光に変換され、ビームスプリッタ23へと導かれる。

【0051】

ビームスプリッタ23は、上述したように蛍光をほぼ100%反射し、撮影装置27へと導く。そして、撮影装置27の撮像面において蛍光画像が結像し撮影が行われる。

【0052】

ところで、蛍光顕微鏡により生きた細胞内の蛋白質を観察する場合、細胞内蛋白質は細胞内を高速で移動しているため、撮影時に被写体ブレが発生し易い。そのため、上述した方法により対物レンズ25を piezoelectric actuator 26により超高速で移動させ被写体に焦点を合わせるとともに、細胞内蛋白質の移動速度よりも速い速度でシャッターを切ることで、撮影時の被写体ブレを防止している。

10

【0053】

こうした対物レンズ25の移動による被写体ブレの防止について詳細に説明する。図2は、光軸色収差の補正が行われる様子を示し、(A)は光軸色収差の補正前の対物レンズ25の位置、(B)は光軸色収差の補正後の対物レンズ25の位置を示す。図3は、光軸色収差の補正の前後における画像の状態を示し、(A)は光軸色収差の補正前に撮影される画像、(B)は光軸色収差の補正後に撮影される画像を示す図である。

【0054】

上述したように、蛍光顕微鏡ではレンズの焦点距離が蛍光の波長により異なる光軸色収差が問題となる。

20

【0055】

例えば、図2(A)では、蛍光Aと蛍光Bの焦点距離が異なる様子が示されている。蛍光Aの場合、結像レンズ24が位置I、対物レンズ25が位置Hにあるときに観察対象6に焦点の合った状態となる。しかし、蛍光Bについては、蛍光Aの場合と同様に結像レンズ24が位置I、対物レンズ25が位置Hにあるときでも、観察対象6に焦点の合った状態とはならない。

【0056】

この図2(A)の状態では撮影を行うと、撮影される画像は図3(A)のようになる。蛍光Aについては焦点が合っているため観察対象となる試料が鮮明に写っている。一方、蛍光Bについては焦点が合っておらず、観察対象となる試料がぼやけて写っている。こうした蛍光毎に焦点のズレが生じる現象が光軸色収差である。

30

【0057】

そこで、本実施形態に係る蛍光顕微鏡システム1では、観察対象となる試料が発する蛍光の波長毎に piezoelectric actuator 26により対物レンズ25を光軸方向であるZ方向に移動することで、光軸色収差の補正を行っている。

【0058】

図2(B)は、図2(A)において光軸色収差による焦点のズレが生じていた蛍光Bについて、対物レンズ25をHの位置からH'の位置まで移動させることで、光軸色収差の補正を行った状態を示している。こうして光軸色収差の補正が行われた後の状態で観察対象の撮影を行うと、得られる画像は図3(B)のようになる。図3(B)では、蛍光Bについても焦点が合うことで、観察対象となる試料が鮮明に写るようになっている。

40

【0059】

ところで、対物レンズ25を超高速で移動させて撮影を行う場合には、対物レンズ25を所望の位置で素早く静止させる必要がある。しかし、実際にはアクチュエータの停止後も対物レンズ25はしばらく細かく振動してしまい(以下「過度応答」という。)、すぐに静止することができない。こうした対物レンズ25の過度応答時にシャッターを切ると、カメラブレが生じてしまう。

【0060】

そのため、撮影可能な範囲まで過度応答が収束しカメラブレが抑制された状態、具体的には対物レンズ25の駆動開始位置から焦点位置までの距離を100%とした場合に過度

50

応答が焦点位置を中心として10%の距離内に納まる状態(以下こうした状態を「静定」という。)においてシャッターを切る必要がある。対物レンズ25が静定した状態では、カメラブレが生じたとしても画像に及ぼす影響は極めて少ないため、対物レンズ25が静止した状態とみなすことができる。

【0061】

しかし、従来から一般的に行われているピエゾアクチュエータ26の駆動制御方法、すなわち、所望の変位を生じさせる一定の電圧を対物レンズ25の駆動開始から静定までピエゾアクチュエータ26に印加し続ける方法では、対物レンズ25の駆動開始から静定に至るまでの時間(以下「静定時間」という。)を短縮することはできない。

【0062】

そこで、本発明が適用される蛍光顕微鏡システム1では、対物レンズ25を超高速で移動させて光軸色収差を補正する蛍光顕微鏡2において、ピエゾアクチュエータ26の変位の途中でピエゾアクチュエータ26に印加する電圧を変化させることで、静定時間の短縮を可能としている。以下、こうした静定時間の短縮方法について具体的に説明する。

【0063】

図4は、対物レンズ25の静定時間を短縮するために印加する電圧を調整する様子を示すグラフである。図4において、点線Rは従来のピエゾアクチュエータ26の駆動方式における電圧印加の方式を、実線Qは本実施形態におけるピエゾアクチュエータ26の駆動方式における電圧印加の方式を、実線Pは本実施形態においてピエゾアクチュエータ26に印加される電圧を示している。図4の横軸は時間を、左側の縦軸は電圧を、右側の縦軸はピエゾアクチュエータの変位量(nm)を示している。

【0064】

従来のピエゾアクチュエータ26の駆動方式では、対物レンズ25の駆動開始から静定まで、一定の変位電圧eが印加されていた。この変位電圧eは、対物レンズ25を観察対象の焦点位置に移動させる変位をピエゾアクチュエータ26に生じさせる電圧である。

【0065】

一方、本実施形態においては、実線Pに示すように、まずピエゾアクチュエータ26に、変位電圧eのn倍、すなわち $e \times n$ (nは2以上の整数)の大きな矩形波であるパルス電圧が、時間 t_1 まで印加される。このときのパルス電圧の印加時間 t_1 は、従来の駆動方式において対物レンズ25が駆動開始から静定位置Sに至るまでの時間 t_2 よりも短い時間であり、こうしたパルス電圧の印加により対物レンズ25は焦点位置の手前まで移動する。

【0066】

そして、時間 t_2 以降は、ピエゾアクチュエータ26に変位電圧eが印加されることで、対物レンズ25は所望の焦点位置まで移動する。

【0067】

このように、本実施形態においては、まずピエゾアクチュエータ26に大きな電圧であるパルス電圧を印加して高速で変位させることで対物レンズ25を高速で焦点位置の手前まで移動させている。そして、途中から小さな電圧である変位電圧に切り替えてピエゾアクチュエータ26を低速で変位させることで対物レンズ25を低速で焦点位置まで移動させ静定させている。

【0068】

これにより、従来の駆動方式における静定時間 t_2 よりも短い静定時間 t_1 によりピエゾアクチュエータ26を静定させることができる。また、変位電圧eのn倍の電圧をパルス電圧とすることで、ピエゾアクチュエータ26の制御を容易なものとするすることができる。

【0069】

次に、上述した蛍光顕微鏡システム1による光軸色収差の補正方法の各工程についてフローチャートを用いて具体的に説明する。図5は、本発明の実施形態に係る光軸色収差の補正方法を示すフローチャートである。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

本実施形態に係る光軸色収差の補正方法は、まず、制御部 3 の光源選択部 3 1 が、観察対象となる試料に応じた波長の光線を発する光源を選択する（ステップ S 1）。

【 0 0 7 1 】

次に、駆動部 3 4 が、 piezoアクチュエータにパルス電圧 e_x を時間印加する（ステップ S 2）。上述したように n は 2 以上の整数であり、パラメータ e と n の具体的な値は、それぞれの光源に応じて適宜選択される。ステップ S 2 の大きな電圧であるパルス電圧の印加により、piezoアクチュエータ 2 6 は高速で変位し、対物レンズ 2 5 は高速で移動する。

【 0 0 7 2 】

次に、駆動部 3 4 が、piezoアクチュエータ 2 6 に変位電圧 e を印加する（ステップ S 3）。このときに印加される電圧 e は、ステップ S 2 で印加される電圧 e_x の $1/n$ の大きさである。この変位電圧 e の印加により piezoアクチュエータ 2 6 が低速で変位することで、対物レンズ 2 5 が低速で移動し静定する。

【 0 0 7 3 】

このように、ステップ S 2 で印加されたパルス電圧よりも大幅に小さい変位電圧がステップ S 3 で印加されることで、駆動する piezoアクチュエータ 2 6 に言わば急ブレーキをかけることになる。

【 0 0 7 4 】

ステップ S 2 の高電圧による piezoアクチュエータ 2 6 の高速駆動により対物レンズ 2 5 を素早く焦点位置の手前まで移動させた後、ステップ S 3 の低電圧による piezoアクチュエータ 2 6 の低速駆動により対物レンズ 2 5 を静定させる。

【 0 0 7 5 】

こうした piezoアクチュエータ 2 6 の駆動制御により、対物レンズ 2 5 を短時間で静定させることができる。

【 0 0 7 6 】

対物レンズ 2 5 の静定後、更に他の試料から発せられる他色の蛍光の観察も行う場合（ステップ S 4 : Yes）、ステップ S 1 に戻り、光源選択部 3 1 が再び観察対象となる試料に応じた波長の光線を発する光源を選択し、以後の一連の処理が再度繰り返される。

【 0 0 7 7 】

一方、他色の蛍光の観察を行わない場合、すなわち、全ての試料の観察が完了した場合には（ステップ S 4 : No）、一連の動作は全て終了する。

【 0 0 7 8 】

上述した本実施形態に係る光軸色収差の補正方法によると、対物レンズ 2 5 の光軸色収差の補正を対物レンズ 2 5 の光軸方向への駆動により行うとともに、この駆動時の静定時間を短時間にすることができるため、被写体ブレとカメラブレを効果的に防止しつつ、観察対象の撮影を短時間で素早く行うことができる。こうした光軸色収差の補正方法は、観察対象の 3 次元画像を得る際に特に有用である。

【 0 0 7 9 】

3 次元画像の取得は、少なくとも蛍光顕微鏡システム 1 の Voxel サイズ程度の大きさの蛍光被写体試料について、対物レンズ 2 5 を移動しつつ撮影することで Z 軸上の位置の異なる複数の X - Y 平面画像を求め、この平面画像群について畳み込み積分処理を施し、更に畳み込み積分の逆演算を施すことで行われる。

【 0 0 8 0 】

こうした 3 次元画像の取得に際し、被写体が生きた細胞内の物質である場合には、被写体が常に動いているため被写体ブレが生じ易い。こうした被写体ブレを防止するためには、対物レンズ 2 5 の駆動と静定を短時間で素早く行い撮影を行う必要がある。

【 0 0 8 1 】

また、3 次元画像の取得には多数の平面画像が必要であり、蛍光毎に各平面画像の取得位置に応じて対物レンズ 2 5 を駆動し静定する必要がある。そのため、3 次元画像の取得

10

20

30

40

50

の迅速化のためには、対物レンズ 2 5 の静定時間の短縮が必須となる。

【 0 0 8 2 】

そこで、上述した本発明に係る光軸色収差の補正方法を用いることで、こうした 3 次元画像の取得においても被写体ブレとカメラブレを効果的に防止しつつ、3 次元画像を迅速に得ることができる。

【 0 0 8 3 】

なお、上述した実施形態においてはパルス電圧として変位電圧の逡倍の電圧が印加されていたが、発明においてはこれに限らず、パルス電圧が変位電圧よりも大きな電圧であれば同様の作用効果を奏することができる。

【 符号の説明 】

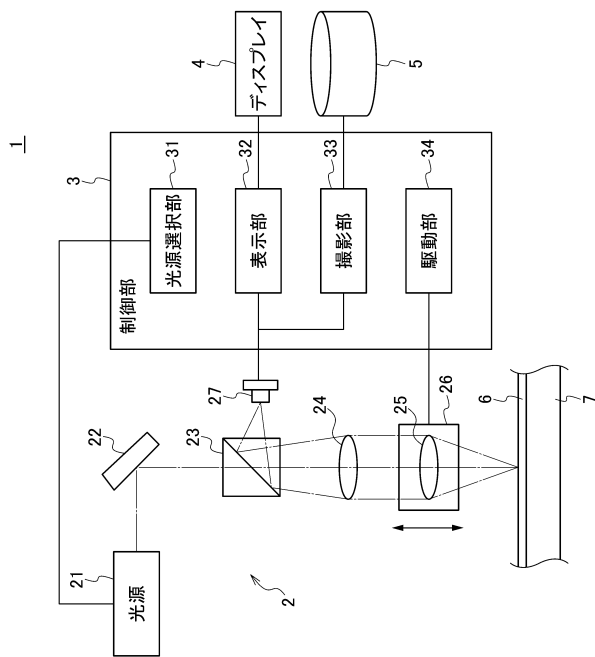
10

【 0 0 8 4 】

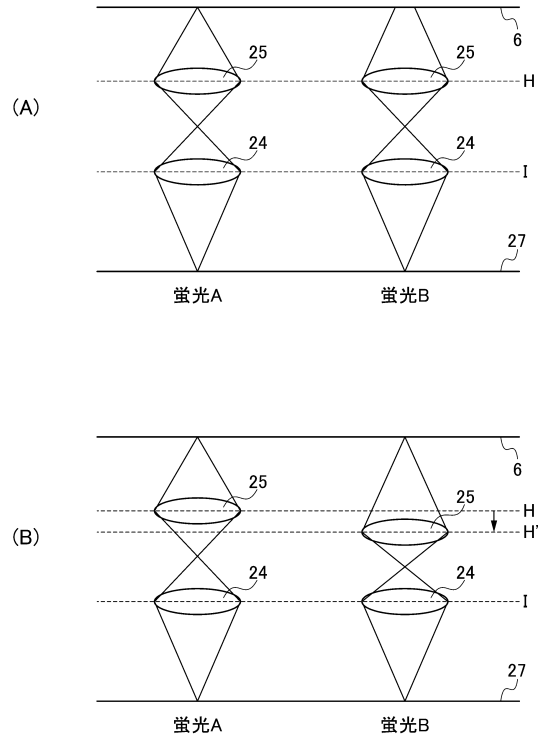
- 1 蛍光顕微鏡システム
- 2 蛍光顕微鏡
- 3 制御部
- 4 ディスプレイ
- 5 外部記憶装置
- 6 観察対象
- 7 ステージ
- 2 1 光源
- 2 2 反射ミラー
- 2 3 ビームスプリッタ
- 2 4 結像レンズ
- 2 5 対物レンズ
- 2 6 ピエゾアクチュエータ
- 2 7 撮影装置
- 3 1 光源選択部
- 3 2 表示部
- 3 3 撮影部
- 3 4 駆動部

20

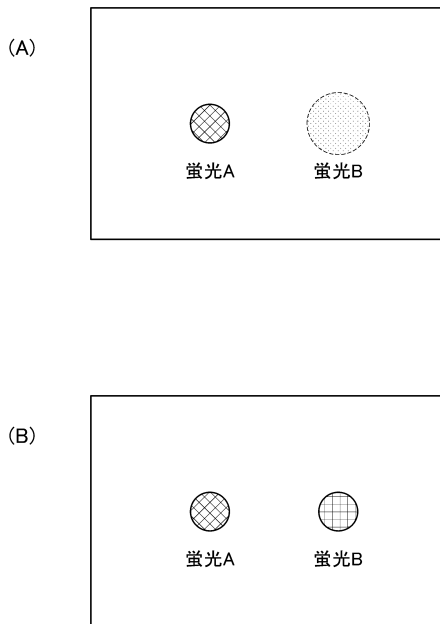
【図1】



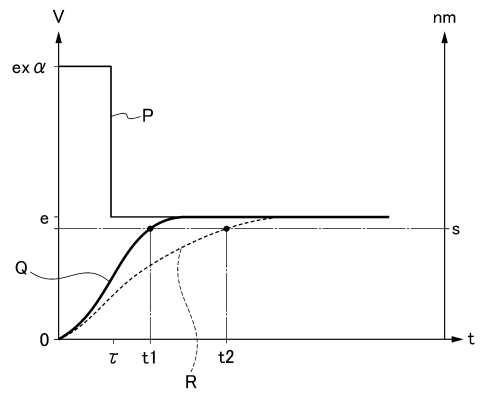
【図2】



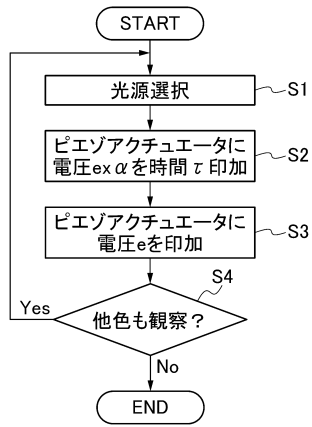
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平08-068756(JP,A)
特開平04-069069(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G02B 19/00 - 21/36