

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4465460号
(P4465460)

(45) 発行日 平成22年5月19日(2010.5.19)

(24) 登録日 平成22年3月5日(2010.3.5)

(51) Int. Cl. F I
GO 2 B 21/06 (2006.01) GO 2 B 21/06
GO 1 N 21/01 (2006.01) GO 1 N 21/01 D
GO 1 N 21/17 (2006.01) GO 1 N 21/17 6 2 0

請求項の数 4 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-186769 (P2003-186769)	(73) 特許権者	504300181
(22) 出願日	平成15年6月30日 (2003. 6. 30)		国立大学法人浜松医科大学
(65) 公開番号	特開2005-24597 (P2005-24597A)		静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号
(43) 公開日	平成17年1月27日 (2005. 1. 27)	(74) 代理人	100075144
審査請求日	平成18年6月28日 (2006. 6. 28)		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45番6号
		審査官	森内 正明

最終頁に続く

(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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一点に集光する光を発生する光源と、
 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、

前記光源の集光する点は顕微鏡の対物レンズの瞳面内の一点に形成し、前記スリット光形成手段からのスリット光を前記透明板と試料側の媒質の界面に全反射角より小さい角度で入射させ、その屈折光を、その厚みが前記スリット光の厚みより薄く、かつ前記界面に対し極薄照明光が発生する角度で試料側の媒質に射出させる顕微鏡の対物レンズと、

前記極薄照明光が前記界面に対して一定の角度を保ちながらレンズ中心光軸上にて異なる高さになるように前記スリット光形成手段のスリットを移動させ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。

【請求項 2】

前記光源はレーザー光源であり、前記透明板はカバーガラスであり、前記対物レンズの、前記スリット光形成手段からのスリット光を入射させる位置は、対物レンズの周縁部であることを特徴とする請求項 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

10

20

いる請求項 1 記載の顕微鏡用極薄照明光発生装置。

【請求項 4】

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前記スリット光光路変更手段により移動させることにより前記極薄照明光を界面に対し一定の角度を保ちながらレンズ中心光軸上にて標本内の異なる高さ位置に形成し、この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。

10

【発明の詳細な説明】

【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】

【従来の技術】

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。

20

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。

【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。

30

【0004】

【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、一点に集光する光を発生する光源と、

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、

前記光源の集光する点は顕微鏡の対物レンズの瞳面内の一点に形成し、前記スリット光形成手段からのスリット光を前記透明板と試料側の媒質の界面に全反射角より小さい角度で入射させ、その屈折光を、その厚みが前記スリット光の厚みより薄く、かつ前記界面に対し極薄照明光が発生する角度で試料側の媒質に射出させる顕微鏡の対物レンズと、

40

前記極薄照明光が前記界面に対して一定の角度を保ちながらレンズ中心光軸上にて異なる高さになるように前記スリット光形成手段のスリットを移動させ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。

【0005】

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、前記対物レンズの、前記スリット光形成手段からのスリット光を入射させる位置は、対物レンズの周縁部であることを特徴とする。

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

50

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。

【0006】

本発明による請求項4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前記スリット光光路変更手段により移動させることにより前記極薄照明光を界面に対し一定の角度を保ちながらレンズ中心光軸上にて標本内の異なる高さ位置に形成し、この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。

【0007】

【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。

【0008】

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。

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

10

20

30

40

50

を確認できる。

【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。

10

【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。

20

【0013】

【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。

30

【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。

【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。

【符号の説明】

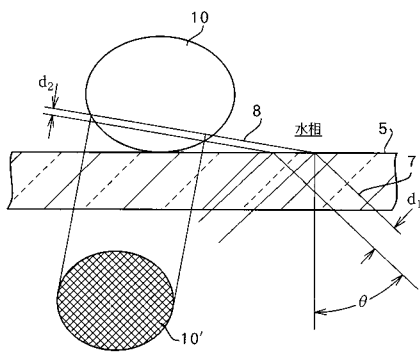
- 1 レーザ光
- 2 第1のスリット
- 3 第2のスリット
- 4 対物レンズ
- 5 透明板(カバーガラス)
- 6 反射鏡
- 7 スリット光
- 8 極薄照明光
- 9, 9A スリット光形成手段
- 10, 11 標本
- 12A, 12B 標本
- 13 顕微鏡鏡筒
- 20 レーザ発振器
- 21, 22 反射鏡
- 23 凹レンズ
- 24 凸レンズ

40

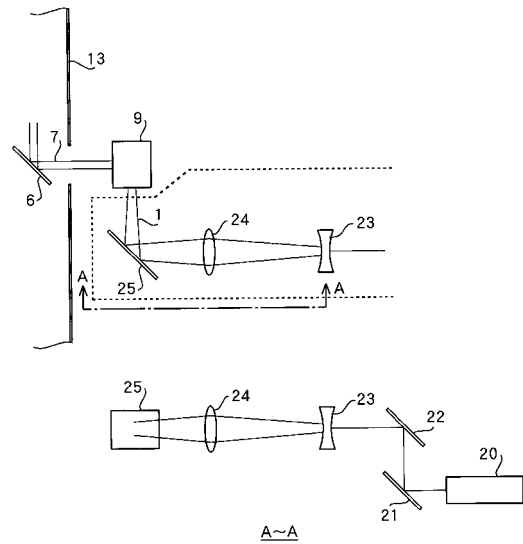
50

2 5 反射鏡

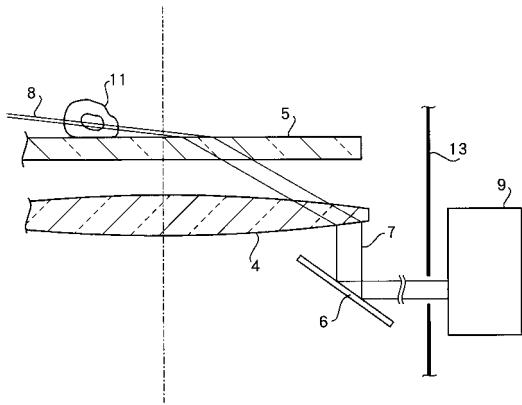
【図 1】



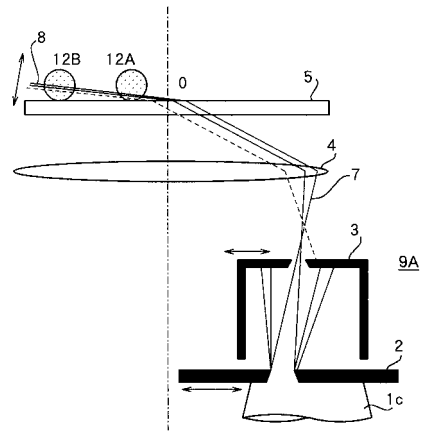
【図 2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平9 - 159922 (JP, A)
特開平8 - 122344 (JP, A)
特開2002 - 236258 (JP, A)
実開平6 - 8917 (JP, U)
特開平9 - 73057 (JP, A)
特開平10 - 213778 (JP, A)
特開2001 - 27728 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/00 - 21/36
G01N 21/00 - 21/01
G01N 21/17 - 21/61