

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4461250号
(P4461250)

(45) 発行日 平成22年5月12日(2010.5.12)

(24) 登録日 平成22年2月26日(2010.2.26)

(51) Int. Cl. F I
G O 2 B 21/06 (2006.01) G O 2 B 21/06
G O 2 B 21/00 (2006.01) G O 2 B 21/00
G O 2 B 21/36 (2006.01) G O 2 B 21/36

請求項の数 3 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2003-187142 (P2003-187142) (22) 出願日 平成15年6月30日 (2003.6.30) (65) 公開番号 特開2005-24647 (P2005-24647A) (43) 公開日 平成17年1月27日 (2005.1.27) 審査請求日 平成18年6月28日 (2006.6.28)</p>	<p>(73) 特許権者 504300181 国立大学法人浜松医科大学 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 (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45番6号 審査官 森内 正明</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の面と第2の面を備え前記第1の面に標本を支持する透明板と、
 前記第1の面側に配置される共焦点走査顕微鏡光学系と、
前記第2の面から第1の面に抜ける光の成分がミクロン以下の単位の厚さになるように前記第2の面に全反射角より大きい角度で入射させてエバネッセンス照明光を形成し前記標本を前記エバネッセンス照明光で切断するための照明光を供給するエバネッセンス照明光源と、

前記第2の面側に配置されているエバネッセンス照明像用の走査顕微鏡光学系とから構成し、

前記共焦点走査顕微鏡光学系からの照明を標本の特定の面に照明し、該照明により発生した信号光を受けて撮像される共焦点像と、前記エバネッセンス照明光により標本をミクロン以下の単位の厚さの光で切断してその部分より信号光を受けて撮像されるエバネッセンス照明像とを同時に観察するように構成し、且つ前記エバネッセンス照明光による照明点と前記共焦点走査顕微鏡光学系からの照明による照明点は標本上で重ならない様構成したことを特徴とする、

共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡。

【請求項2】

請求項1記載の走査顕微鏡において、共焦点走査顕微鏡光学系は、光源からの光をレンズつき円板、対応するピンホール円板からなるニブコウ円板組立、前記円板間に配置され

ているダイクロイックミラー、共焦点走査顕微鏡光学系対物レンズを介して標本の特定の面を照明し、照明により発生した信号光を前記ピンホール円板、前記ダイクロイックミラーで反射して撮像するように構成されている共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡。

【請求項 3】

請求項 1 記載の走査顕微鏡において、
エバネッセンス照明用の走査顕微鏡光学系は、
エバネッセンス照明により発生した信号光を対物レンズおよび収束レンズを介して信号光発生点に対応するピンホールを有するニプロウ円板を介して撮像するように構成されている共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標本を光学的に切断した像を与える共焦点光学系と、ガラス 水（または空気）界面にできるエバネッセンス光による照明を利用したエバネッセンス顕微鏡光学系を備え、同一標本について共焦点像とエバネッセンス照明像情報の両方を同時に取得できる走査顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】

共焦点顕微鏡は対象標本の z 軸上の 1 点でこれに垂直な面に沿って切断したような顕微鏡画像が得られ、医学生物学、半導体工学などの領域で使われる。

20

共焦点顕微鏡は照明用のレンズを備える板と、像からの信号を透過させるピンホール板を組にしたレンズつきニプロウ円板を用いて実現されている。

【0003】

一方本件発明者は下記の「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」の発明により、界面の全反射領域で発生するエバネッセンス光を用いて、極めて薄い光で標本を照明または励起してその結果発生する情報を得る顕微鏡用極薄照明光発生装置を提案している。エバネッセンス照明法では $1 \mu\text{m}$ より薄く切れる極薄照明光を発生できる。

【特許文献 1】

30

特願 2003 - 186769 号

この装置を用いると、標本である細胞の断層情報、2 以上の断層の情報から、細胞等の立体情報を獲得することができる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

前記共焦点走査顕微鏡と、前記エバネッセンス光を用いる顕微鏡装置を組み合わせると細胞等に関する情報を同時的に獲得できるのであるが、そのような装置は提案されていない。

本発明の目的は、共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡を提供することにある。

40

【0005】

【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 記載の共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡は、

第 1 の面と第 2 の面を備え前記第 1 の面に標本を支持する透明板と、

前記第 1 の面側に配置される共焦点走査顕微鏡光学系と、

前記第 2 の面から第 1 の面に抜ける光の成分がミクロン以下の単位の厚さになるように前記第 2 の面に全反射角より大きい角度で入射させてエバネッセンス照明光を形成し前記標本を前記エバネッセンス照明光で切断するための照明光を供給するエバネッセンス照明光源と、

50

前記第 2 の面側に配置されているエバネッセンズ照明像用の走査顕微鏡光学系とから構成し、

前記共焦点走査顕微鏡光学系からの照明を標本の特定の面に照明し、該照明により発生した信号光を受けて撮像される共焦点像と、前記エバネッセンズ照明光により標本をミクロン以下の単位の厚さの光で切断してその部分より信号光を受けて撮像されるエバネッセンズ照明像とを同時に観察するように構成し、且つ前記エバネッセンズ照明光による照明点と前記共焦点走査顕微鏡光学系からの照明による照明点は標本上で重ならない様構成されている。

【 0 0 0 6 】

本発明による請求項 2 記載の共焦点像とエバネッセンズ照明像情報を取得できる走査顕微鏡は、請求項 1 記載の走査顕微鏡において、共焦点走査顕微鏡光学系は、光源からの光をレンズつき円板、対応するピンホール円板からなるニブコウ円板組立、前記円板間に配置されているダイクロイックミラー、共焦点走査顕微鏡光学系対物レンズを介して標本の特定の面を照明し、照明により発生した信号光を前記ピンホール円板、前記ダイクロイックミラーで反射して撮像するように構成されている。

10

【 0 0 0 7 】

本発明による請求項 3 記載の共焦点像とエバネッセンズ照明像情報を取得できる走査顕微鏡は、請求項 1 記載の走査顕微鏡において、エバネッセンズ照明像用の走査顕微鏡光学系は、エバネッセンズ照明により発生した信号光を対物レンズおよび収束レンズを介して信号光発生点に対応するピンホールを有するニブコウ円板を介して撮像するように構成されている。

20

【 0 0 0 8 】

【 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、本発明による共焦点像とエバネッセンズ照明像情報を取得できる走査顕微鏡の第 1 の実施例を示す図、図 2 は前記顕微鏡の対物レンズと標本部分を拡大して示した図である。

【 0 0 0 9 】

この第 1 の実施例は、マイクロレンズつきレンズ円板 2 a とピンホール円板 2 b を含むニブコウ円板組立 2 と一つの対物レンズ 5 により共焦点光学系を作る。同時に前記ニブコウ円板組立 2 の他の領域を利用して、レーザ光の走査系を作りこれを標本の反対側から、もう一つの対物レンズ 1 1 の周縁を通して標本 1 0 に照射する。これによりエバネッセンズ照明光を作る。エバネッセンズ場におかれた蛍光物質の発する光を前記対物レンズ 1 1 で集める。

30

エバネッセンズ照明光の蛍光像の焦点位置を共焦点系のそれとずらすことにより、2 つの光学系を独立して（他の光学系の影響を受けないようにして）動作させることができるように構成してある。

【 0 0 1 0 】

前記原理による第 1 の実施例を図 1、2 を参照してさらに説明する。各図に示すようにカバーガラスなどにより構成される透明板 9 の第 1 の面である上側に標本 1 0 が配置される。そしてこの前記第 1 の面側に共焦点走査顕微鏡光学系が配置される。

40

【 0 0 1 1 】

共焦点走査顕微鏡光学系はニブコウ円板組立 2 を含んでいる。ニブコウ円板組立 2 はレンズ円板 2 a、各レンズに対応するピンホールを備えるピンホール円板 2 b を含み各円板間にダイクロイックミラー 6 が設けられている。

ピンホールを通過した光源 1 の窓 1 a からの光は共焦点走査顕微鏡光学系の鏡筒 4 に支持されている対物レンズ 5 を介して標本の特定の面（図 2 の平面 P_1 ）を照明する。

照明により発生した信号光（励起された蛍光、散乱光等）は前記ピンホール円板 2 b のピンホール、ダイクロイックミラー 6 で反射してレンズ 7 と撮像素子よりなるカメラで撮像

50

される。

【 0 0 1 2 】

エバネッセンス照明光源は、前記透明板 9 の第 2 の面側から前記標本をエバネッセンス照明光で切断するための照明光を供給する。エバネッセンス照明像用の走査顕微鏡光学系は前記第 2 の面側に配置されている。図 2 で L_1 の示す光束はエバネッセンス照明光 L_2 を形成するための光であってエバネッセンス照明像用の走査顕微鏡光学系の対物レンズ 1 1 を介して供給される。

【 0 0 1 3 】

前記エバネッセンス照明用光束は、前述の光源の窓 1 b からの光により形成される。光源の窓 1 b からの光で前記ニブコウ円板組立 2 のレンズ円板 2 a のマイクロレンズを透過した光はピンホール円板 2 b の対応するピンホールを通過し、レンズ 3 でコリメートされる。コリメートされた光はプリズム 1 3 で曲げられ、エバネッセンス照明像用の走査顕微鏡光学系の光軸中に配置されているダイクロイックミラー 1 4 により反射され鏡筒 1 2 に支持されている対物レンズ 1 1 により透明板 9 に入射される。

10

【 0 0 1 4 】

本件出願人の前記特許文献 1 に詳細に記載されているが、図 2 に示すように水相とカバーガラスのような透明板 9 との界面を想定し、その中に細胞等の標本 1 0 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 L_1 の入射角を臨界角より僅かに大きく取ると、全反射が生じ、光は水側へ抜ける光の成分が発生する。この抜けた光 L_2 は界面に平行に近く、 $1 \mu\text{m}$ 程度の厚さの光となる。この光により細胞等の標本が切断されることにより、標本の当該部分から信号光（散乱光、蛍光など）が発生させられる。

20

【 0 0 1 5 】

前記信号光は、対物レンズ 1 1 をダイクロイックミラー 1 4、レンズ 1 5 を介して、信号光発生点と共焦点面にあるニブコウ円板組立 1 6 のピンホール位置に結像され、ピンホールを通過した光はミラー 1 9 で反射され、レンズ 1 7 と撮像装置 1 8 からなる撮像手段で撮像される。

【 0 0 1 6 】

前述の第 1 の実施例は、共焦点走査顕微鏡と全反射エバネッセンス光学系の照明を一つのニブコウ円板組立 1 6 を用いて実現している。前記全反射エバネッセンス光学系の照明力を向上させるために前記ニブコウ円板組立 2 に同期して回転するさらに他のニブコウ円板組立を全反射エバネッセンス光学系の照明に利用することができる。

30

図 3 に示す第 2 の実施例は、第 1 のニブコウ円板組立 2 に連動する第 2 のニブコウ円板組立 1 6 の斜め下方向からエバネッセンス励起用の光ビームを導入するものである。

図 4 に示す第 3 の実施例は、第 1 のニブコウ円板組立 2 に連動する第 2 のニブコウ円板組立 1 6 の撮像用（蛍光観察用）に利用される部分の反対側のピンホール等を利用するものである。

図 5 に示す第 4 の実施例は、第 1 のニブコウ円板組立 2 に連動する第 2 のニブコウ円板組立 1 6 の撮像用（蛍光観察用）に利用されるピンホールの近傍のピンホールを利用するものである。以下各実施例を簡単に説明する。

【 0 0 1 7 】

図 3 は、本発明による共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡の第 2 の実施例を示す図である。前記実施例と共通の機能をもつものについては同一の数字を付してある。この実施例の、第 1 の面側に配置される共焦点走査顕微鏡光学系の構成は前述の実施例装置と同じである。そして、エバネッセンス顕微鏡用光源 2 0 を下側に配置してニブコウ円板組立 1 6 にマイクロレンズを支持するレンズ円板 1 6 a とピンホール円板 1 6 b を介して照明光を供給するように構成したものである。光源 2 0 からの光はニブコウ円板組立 1 6 のマイクロレンズを支持するレンズ円板 1 6 a のレンズを透過し、レンズ円板 1 6 a は 1 6 b 間に配置されているダイクロイックミラー 2 4 を透過し、ピンホール円板 1 6 b の対応するピンホールを通過する。ピンホールを通過した光はレンズ 1 5、1 1 を通り、標本 1 0 と透明板 9 の界面に全反射角よりも僅かに小さい角度で入射させられ

40

50

、エバネッセンス光を発生する。前記エバネッセンス光で、切断された標本の面の発生する信号光は対物レンズ 11、レンズ 15 を介して、信号光発生点と共役な位置にあるピンホールを透過する。前記ピンホールを透過した信号光はダイクロイックミラー 24 により反射され、レンズ 17 撮像装置 18 よりなる撮像手段で撮像される。

【0018】

図 4 は、本発明による共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡の第 3 の実施例を示す図である。前記他の実施例と共通の機能をもつものについては同一の数字を付してある。この実施例の、第 1 の面側に配置される共焦点走査顕微鏡光学系の構成は前述の実施例装置と同じである。そして、エバネッセンス顕微鏡用光源 21 を下側に配置してニブコウ円板組立 16 にマイクロレンズを支持するレンズ円板 16b とピンホール円板 16a を介して照明光を供給するように構成されている。ピンホール円板 16a のピンホールを透過した光はレンズ 22 でコリメートされ、プリズム 13 で反射され、ダイクロイックミラー 14 で反射されて、対物レンズ 11 の周縁に入射させられる。この光により、前述した照明用のエバネッセンス光が形成され、エバネッセンス光により信号光が発生させられる。この信号光は対物レンズ 11、ダイクロイックミラー 14、レンズ 15 を介して信号光発生点と共役な位置にあるピンホールを透過する。

前記ピンホールを透過した信号光はミラー 19 により反射され、レンズ 17 撮像装置 18 よりなる撮像手段で撮像される。

【0019】

図 5 は、本発明による共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡の第 4 の実施例を示す図である。

前記他の実施例と共通の機能をもつものについては同一の数字を付してある。

この実施例の、第 1 の面側に配置される共焦点走査顕微鏡光学系の構成は前述の実施例装置と同じである。

そして、エバネッセンス顕微鏡用光源 21 を下側に配置してニブコウ円板組立 16 にマイクロレンズを支持するレンズ円板 16a とピンホール円板 16b を介して照明光を供給するように構成されている。

ピンホール円板 16b のピンホールを透過した光はレンズ 23 でコリメートされ対物レンズ 11 の周縁部分に供給され、前述と同様照明用のエバネッセンス光が発生させられる。

【0020】

【発明の効果】

以上、説明したように本発明は、標本を光学的に切断した像を与える共焦点光学系と、ガラス 水（または空気）界面にできるエバネッセンス光による照明を利用したエバネッセンス顕微鏡光学系を備え、同一標本について共焦点像とエバネッセンス照明像情報の両方を同時に取得できる。

2 次元的な面の像を得るには、それぞれの点を走査する必要があるが、走査手段を連動させることにより、両照明モードの光の点は重ならないようにすることで、2 つの異なる方式によって得られる 2 つの 2 次元画像は互いに影響を及ぼすことなく、即ち 2 つの画像が重畳されることなく、それぞれの方式による 2 つの 2 次元画像をそれぞれ別個に得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明による共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡の第 1 の実施例を示す図である。

【図 2】前記実施例の標本部分と対物レンズ部分を拡大して示した図である。

【図 3】本発明による共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡の第 2 の実施例を示す図である。

【図 4】本発明による共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡の第 3 の実施例を示す図である。

【図 5】本発明による共焦点像とエバネッセンス照明像情報を取得できる走査顕微鏡の第 4 の実施例を示す図である。

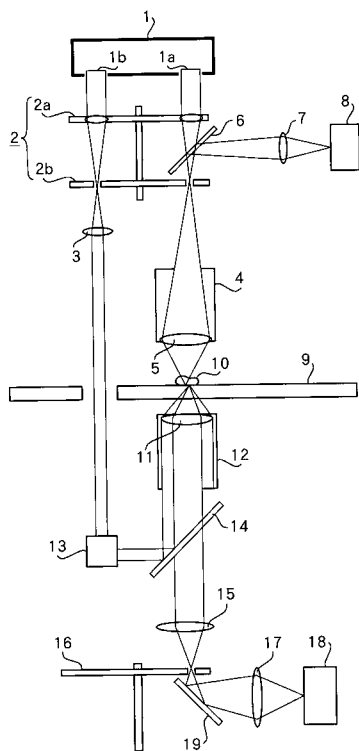
【符号の説明】

- 1 光源
- 2 ニブコウ円板組立
- 3 レンズ
- 4 共焦点走査顕微鏡用鏡筒
- 5 共焦点走査顕微鏡用対物レンズ
- 6 ダイクロイックミラー
- 7 撮像レンズ
- 8 撮像装置
- 9 透明板
- 10 標本
- 11 エバネッセンス顕微鏡用対物レンズ
- 12 エバネッセンス顕微鏡用鏡筒
- 13 プリズム
- 14 ダイクロイックミラー
- 15 レンズ
- 16 ニブコウ円板組立
- 17 撮像レンズ
- 18 撮像装置
- 19 ミラー
- 20, 21 エバネッセンス顕微鏡用光源
- 23 コリメータレンズ
- 24 ダイクロイックミラー

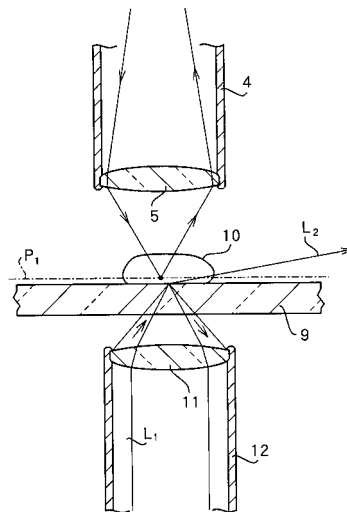
10

20

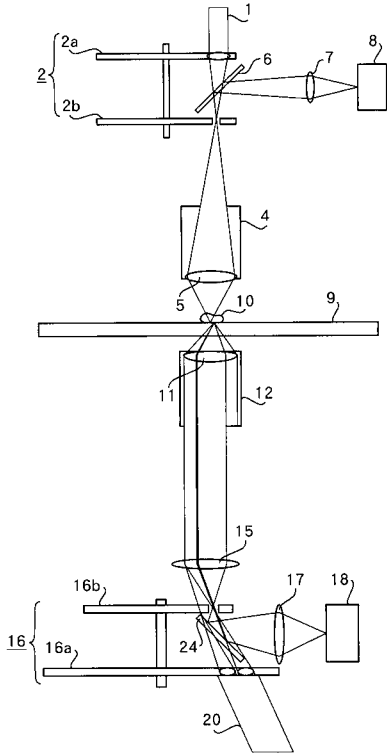
【図1】



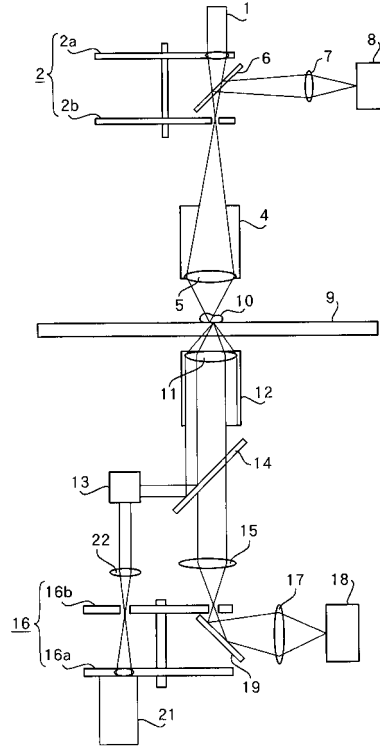
【図2】



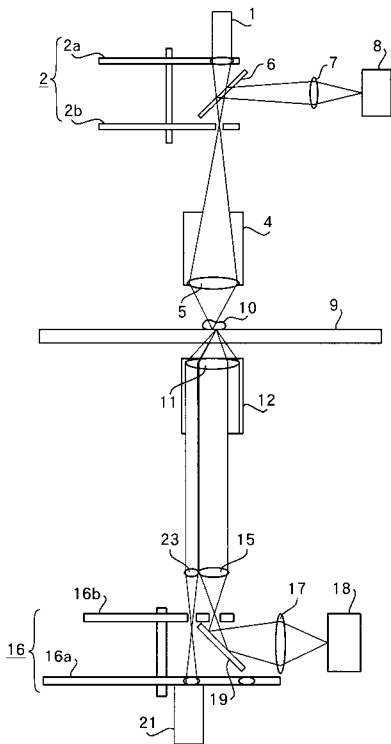
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2000-89124(JP,A)
特開2002-55282(JP,A)
特開2003-29153(JP,A)
特開2000-206412(JP,A)
特開2001-272606(JP,A)

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