

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

## 特開2003 - 185930

( P 2 0 0 3 - 1 8 5 9 3 0 A )

(43)公開日 平成15年 7月 3日(2003.7.3)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup> (参考)
G02B 21/06		G02B 21/06	2G043
G01N 21/64		G01N 21/64	E 2H052
// G01N 13/10		13/10	F

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願2001 - 380967( P 2001 - 380967)

(22)出願日 平成13年12月14日(2001.12.14)

特許法第30条第 1 項適用申請有り 2001年 6 月18日発行  
の日刊工業新聞に掲載

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

(72)発明者 徳永 万喜洋

静岡県三島市谷田桜ヶ丘2525 - 6

(74)代理人 100107009

弁理士 山口 隆生

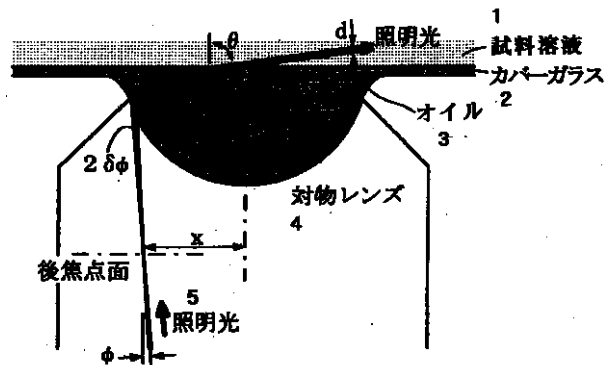
最終頁に続く

(54)【発明の名称】光学系の薄層斜光照明法

(57)【要約】

【課題】顕微鏡と同等の光学系を用いて光を使って物質や分子の高感度検出と光学顕微鏡における低背景・高感度観察が可能な薄層斜光照明法を提供する。

【解決手段】試料における照明光の厚さを  $d$ 、試料における照明光の入射角を  $\theta$ 、対物レンズ後焦点面における照明光の中心軸からの距離を  $X$ 、照明光の対物レンズへの入射角を  $\phi$ 、照明光の対物レンズ入射の開き角の半分を  $\delta\phi$  とすると、試料における照明光の厚さを  $d$  を与える式  $d = 2 r \cdot \cos \theta$  において、試料への照明光の入射角  $\theta$  は  $X$  と  $r$  によって決まり、試料観察面での照射半径  $r$  は  $\phi$  によって決まる値であることがわかる。従って、照明光の厚さ  $d$  を薄くすることは、 $\cos \theta$  および  $r$  を小さくすることにより実現できる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 対物レンズを用いたレンズ光学系の斜光照明において、試料への照明光入射角度を対物レンズ光軸に垂直に近い角度にし、照射領域を絞ることにより、薄い層状の光で試料を照明することを特徴とする光学系の薄層斜光照明法。

【請求項 2】 試料の屈折率よりも閉口数大きい対物レンズを用いて、試料への照明光入射角度をさらに光軸に垂直に近くし、より薄い光で試料を照明することを特徴とする請求項 1 記載の光学系の薄層斜光照明法。

【請求項 3】 対物レンズを用いたレンズ光学系の斜光照明において、焦点位置を変えて異なる高さの試料面を観察する場合に、照明光の対物レンズへの入射角を変えることにより、試料観察面における照明光の入射角を一定に保つことを特徴とする光学系の薄層斜光照明法。

【請求項 4】 カメラ等の受光素子の受光面、あるいは結像レンズを傾けることにより、試料観察面を傾け、斜光照明光と試料観察面を平行若しくはほぼ平行にして観察可能にすることを特徴とする光学系の薄層斜光照明法。

【請求項 5】 試料観察面を傾ける場合に、対物レンズに入射する照明光の形を細長くし、試料を照明する薄層光をさらに薄くすることを特徴とする請求項 4 記載の光学系の薄層斜光照明法。

【請求項 6】 複数の入射光の使用や、回転等による入射位置の移動によって、偏りのない薄層斜光照明を行うことを特徴とする光学系の薄層斜光照明法。

【請求項 7】 光学系が蛍光顕微鏡や暗視野顕微鏡などの光学顕微鏡、対物レンズを用いたレンズ光学系であることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 6 記載の光学系の薄層斜光照明法。

【請求項 8】 薄層光照明を用いた顕微鏡観察において、焦点位置を移動させながら連続画像を得て、デコンボリューションによってセクショニング画像及び 3 次元画像を得ることを特徴とする請求項 7 記載の光学系の薄層斜光照明法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、物質や分子を光を使って高感度検出する顕微鏡と同等の光学系の薄層斜光照明法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、物質や分子を光を使って高感度検出する光学顕微鏡の照明技術は種々のものが提案されており、その内の幾つかを以下に説明する。図 9 は、蛍光顕微鏡の照明として、現在一般的に使われている落射照明方法の概略図である。図に示すように、光源からの光を、照射光は反射し、蛍光は透過させるダイクロイックミラーで反射させて、対物レンズ中央に入射し、試料観察面を照射するものである。

【0003】また、ガラス表面近傍のみを局所的に照明する方法として、全反射照明法がある。全反射した際に生じるエバネッセント光（深さ 100200nm 程度）を使って照明するものである。プリズムを使う方法と対物レンズを使う方法があるが、図 10 に対物レンズ型全反射照明法の概略図を示す。対物レンズの閉口数を  $N$ 、 $A$ 、試料溶液の屈折率を  $n$  としたとき、閉口数 ( $NA$ ) が  $NA > n$  の式を満たす対物レンズにより全反射照明が可能となる。この方法は、従来、極く限られた利用のみであったが、蛍光色素 1 分子を蛍光顕微鏡で観察する方法として有用であることが判明し、最近 1 分子イメージング用に使用され始めている。

【0004】更に、本発明者が提案し、特許第 3093145 号として既に特許されている光照射切り替え方法の概略を図 11 に示す。1 は試料溶液、2 はカバーガラス、3 はオイル、4 は対物レンズ（レンズ群）、5 は照射光、6 は照明光、7 はダイクロイックミラーである。落射照明から全反射照明の状態への変更を、ミラー等の光学部品を図 11 (A) 11 (B) 図 11 (C) へと移動することのみで実現することができ、余分な光学系を必要とせず、簡単な原理で照射の切替を行えることができる。また、この方法では、入射光位置又は光源位置（例えば光ファイバーの出射位置）をずらすことによっても同等の状態変更を実現することができる。

【0005】また、他の方法として、通常の光学顕微鏡や落射照明法による蛍光顕微鏡において、セクショニング像や 3 次元画像を得る方法としては、焦点を連続的に変化させて得た連続画像からデコンボリューションによって計算する方法が用いられている。これは、試料上の 1 点から出た光の像が、焦点からはずれた時にどうなるかを予め知っておくことにより、計算によって元の 3 次元像を計算するものであるが、厚みのある試料や、明るい中にある暗い部分を観察する場合には、この方法では限界がある。

【0006】また、他の方法として、セクショニング像や 3 次元画像を用いる方法としては、現在、共焦点顕微鏡法が広く普及している。この方法は、高感度カメラに比べると感度が劣っており、特に蛍光試料の観察においては、レーザー光を 1 点に集光して照射するために、蛍光色素の退色が早くなったり、生物試料に損傷を与えるなどの難点がある。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】このように、従来の方法では、厚みのある試料や明るい中にある暗い部分の観察において、高感度、高  $S/N$  比を得ることができなかった。そこで本発明は、顕微鏡と同等の光学系を用いて光を使って物質や分子を高感度検出することを可能とし、光学顕微鏡における低背景・高感度観察を可能にする光学系の薄層斜光照明法を提供することを目的とする。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、この発明の請求項1に係る光学系の薄層斜光照明法は、対物レンズを用いたレンズ光学系の斜光照明において、試料への照明光入射角度を対物レンズ光軸に垂直に近い角度にし、照射領域を絞ることにより、薄い層状の光で試料を照明する構成とした。

【0009】これにより、対物レンズを用いた斜光照明において、照射領域を絞ることにより、薄い層状の光で試料を照明することができ、光学顕微鏡においては、低背景・高感度のセクショニング像や3次元画像を得ることができる。

【0010】この発明の請求項2に係る光学系の薄層斜光照明法は、対物レンズを用いたレンズ光学系の斜光照明において、試料の屈折率よりも閉口数が多い対物レンズを用い、試料への照明光入射角度をさらに対物レンズ光軸に垂直に近い角度にし、照射領域を絞ることにより、より薄い層状の光で試料を照明する構成とした。

【0011】これにより、閉口数の大きい対物レンズを用いるほど照明光を薄くでき、試料の屈折率よりも閉口数が多い対物レンズを用いて、試料への照明光入射角度を更に光軸に垂直に近くすることで、より薄い光で照明することができる。

【0012】この発明の請求項3に係る光学系の薄層斜光照明法は、対物レンズを用いたレンズ光学系の斜光照明において、焦点位置を変えて異なる高さの試料面を観察する場合に、照明光の対物レンズへの入射角を変えることにより、試料観察面における照明光の入射角を一定に保つように構成した。

【0013】これにより、対物レンズの焦点位置を変えて、試料観察面のカバーガラス表面からの高さを変えても、対物レンズへの照明光の入射角を変えることにより、同じ入射角で試料を照明することができる。

【0014】この発明の請求項4に係る光学系の薄層斜光照明法は、カメラ等の受光素子の受光面、あるいは結像レンズを傾けることにより、試料観察面を傾け、斜光照明光と試料観察面を平行若しくはほぼ平行にして観察可能にする構成とした。

【0015】この発明の請求項5に係る光学系の薄層斜光照明法は、カメラ等の受光素子の受光面、あるいは結像レンズを傾けることにより、試料観察面を傾け、斜光照明光と試料観察面を平行若しくはほぼ平行にして観察可能にし、試料観察面を傾げる場合に、対物レンズに入射する照明光の形を細長くし、試料を照明する薄層光をさらに薄くする構成とした。

【0016】これにより、試料観察面を傾けている場合には、観察視野の大きさは、カバーガラスに平行な面による照明光の断面形状の照明光進行方向の半径には依存せず、垂直な方向の半径によって決まるので、照明光進行方向に垂直な方向の半径は大きくし、照明光進行方向

の半径は小さくした細長い形の入射光を用いると、観察視野を狭めることなく、照明光の厚さを薄くすることができる。

【0017】この発明の請求項6に係る光学系の薄層斜光照明法は、複数の入射光の使用や、回転等による入射位置の移動によって、偏りのない薄層斜光照明を行うような構成とした。

【0018】この発明の請求項7に係る光学系の薄層斜光照明法は、上記請求項1乃至請求項6の光学系が蛍光顕微鏡や暗視野顕微鏡などの光学顕微鏡、対物レンズを用いたレンズ光学系にも適用可能な構成とした。

【0019】これにより、光学顕微鏡はもとより各種の顕微鏡及び光を用いた検出において、低背景の画像及び低バックグラウンドのシグナルを得ることができる。その結果として、高感度・高いS/N比の画像及びシグナルを得ることができる。

【0020】この発明の請求項8に係る光学系の薄層斜光照明法は、蛍光顕微鏡、原子間力顕微鏡、トンネル顕微鏡、又はフォトンネル顕微鏡の光学系において、薄層光照明を用いた顕微鏡観察を、焦点位置を移動させながら連続画像を得て、デコンボリューションによってセクショニング画像及び3次元画像を得る構成した。

【0021】これにより、薄層光照明を用いた顕微鏡観察から、焦点位置を移動させながら連続画像を得て、デコンボリューションによってセクショニング画像及び3次元画像を得ることができ、背景光が低く高画質である。また、試料の照明が薄い層状領域のみの局所的であるので、得られる蛍光像を高感度カメラであるイメージングインテンシファイアーCCDによって観察することにより、蛍光色素1分子を可視化できる。

## 【0022】

【発明の実施の形態】本発明は、対物レンズを用いたレンズ光学系の斜光照明において、試料を薄い層状の光で照明することにより、照明光のあたる領域が局所的に制限されて、背景光を低くすることができ、高感度で高いS/N比の画像およびシグナルを得ることができることに依拠するものである。光学系としては蛍光顕微鏡や暗視野顕微鏡などの光学顕微鏡はもとより、対物レンズを用いたレンズ光学系にも広く適用できるものである。次に、本発明の実施形態を図1乃至図8に基づいて以下に詳述する。

【0023】図1に照明光の厚さを求める原理を示す。図において、試料観察面での照射半径を $r$ 、試料における照明光の厚さを $d$ 、試料における照明光の入射角（又は、照明光と対物レンズ光軸とのなす角）を $\theta$ とすると、

$$\text{【数1】 } d = 2r \cdot \cos \theta$$

の関係式により、試料における照明光の厚さ $d$ を求めることができる。

【0024】図2に光学系の対物レンズに関連する部分

拡大図を示す。図において、1は試料媒体（溶液等）、2はカバーガラス、3はオイル、4は対物レンズ（レンズ群）、5は照射光である。光源からの照射光はダイクロミックミラー（図示なし）で直角に屈折されて照射光5となり、オイル3、カバーガラス2を経て試料媒体1に斜光照明される。

【0025】図2において、試料における照明光の厚さを $d$ 、試料における照明光の入射角を $\theta$ 、対物レンズ後焦点面における照明光の中心軸からの距離を $X$ 、照明光の対物レンズへの入射角を $\alpha$ 、照明光の対物レンズ入射の開き角の半分を $\beta$ とすると、試料における照明光の厚さ $d$ を与える式  $d = 2r \cdot \cos \theta$  において、試料への照明光の入射角 $\theta$ は $X$ と $r$ によって決まり、試料観察面での照射半径 $r$ は $X$ によって決まる値であることがわかる。従って、照明光の厚さ $d$ を薄くすることは、 $\cos \theta$  および $r$ を小さくすることにより実現できる。

【0026】 $\cos \theta$ を小さくするには、 $\theta$ を90度に近づければ良いが、そのために $X$ を大きくする。即ち、対物レンズの縁に光を入射し、試料において対物レンズ光軸と垂直に近い角度で斜光照明をおこなう。更に、対物

【0027】照射半径 $r$ を小さくするためには、 $X$ を小さくすれば良い。その際、 $r$ を小さくすると観察視野が狭められるので、観察視野の許す範囲において、 $r$ を小さくする必要がある。

【0028】こうして、対物レンズを用いた斜光照明において、試料への照明光入射角度を対物レンズ光軸に垂直に近い角度にし、照射領域を絞ることにより、薄い層状の光で試料を照明することができる。そして、光学顕微鏡においては、低背景・高感度のセクショニング像や3次元画像を得ることができる。

【0029】また、開口数の大きい対物レンズを用いるほど照明光を薄くできるが、試料の屈折率よりも開口数が大きい対物レンズを用いて、試料への照明光入射角度を更に光軸に垂直に近くすることで、より薄い光で照明することができる。対物レンズの開口数（ $NA$ ）が大きいほど、図2において $X$ を大きくすることができ、照明光の入射角 $\theta$ が大きくなるので、その結果として、照明光の厚さ $d$ を薄くすることができる。

【0030】次に、図3を参照して、対物レンズの開口数 $NA$ で決まる $X$ の最大値を $X_{NA}$ 、試料の屈折率 $n$ で決まる全反射が起こる $X$ の境界値を $X_n$ とすると、開口数 $NA$ が試料の屈折率 $n$ よりも大きいレンズでは、図3（A）に示すように、 $X$ を大きくすると全反射が起こり試料を照明できなくなる。

【0031】しかし、図3（B）に示すように、対物レンズへの入射角 $\alpha$ を調節することにより、全反射を起こすことなく試料を斜光照明することができる。この方法を用いると、照明光の入射角 $\theta$ を90度により近い値に

することが可能となり、照明光の厚さ $d$ を更に薄くすることができる。

【0032】次に、対物レンズの焦点位置を変えて、試料観察面のカバーガラス表面からの高さ $Z$ を変える場合について図4を参照して説明する。図4（A）は対物レンズへの照明光の入射角 $\alpha$ では、試料観察面のカバーガラス表面からの高さは $Z$ であることを示す。

【0033】図4（B）は対物レンズへの照明光の入射角が $(\alpha + \beta)$ では、試料観察面のカバーガラス表面からの高さは $(Z + Z')$ となることを示す。それ故、対物レンズの焦点位置を変えても対物レンズへの照明光の入射角 $\alpha$ を変えることにより、同じ入射角 $\alpha$ で試料を照明することができる。

【0034】次に、カメラ等の受光素子の受光面を傾ける場合、あるいは結像レンズを傾ける場合について図5を参照して説明する。図5において、1は試料媒体（溶液等）、2はカバーガラス、3はオイル、4は対物レンズ（レンズ群）、5は照射光、8は試料観察面、9は結像レンズ、10はカメラ等の受光素子である。図では、レンズ系を単純化して描いているが、実際には中間にレンズ群が入って構成されている。

【0035】図5（A）はカメラ等の受光素子10の受光面を傾けることにより、試料観察面8を傾け、斜光照明光5と試料観察面8を平行、若しくはほぼ平行にして観察することができることを示している。

【0036】また、図5（B）は結像レンズ9を傾けることにより、試料観察面8を傾け、斜光照明光5と試料観察面8を平行もしくはほぼ平行にして観察することができることを示している。結像レンズ9を傾ける方法では、中間の光学系の変更によっても同等のを行うことができる。

【0037】図5（A）の試料観察面8を傾ける場合に、対物レンズ4に入射する照明光の形を細長くし、試料を照明する薄層光をさらに薄くすることができる。このことを図6を参照して説明する。符号は上述の例と同一である。

【0038】図6（B）は試料領域の照射光を上側からみた拡大図である。照明光の厚さ $d$ を与える式  $d = 2r \cdot \cos \theta$  における、 $r$ はカバーガラスに平行な面による照明光の断面形状の、照明光進行方向の半径である。試料観察面を傾けている場合には、観察視野の大きさは $r$ には依存せず、 $r$ に垂直な方向の半径 $r'$ によって決まる。従って、 $r'$ は大きくし、 $r$ は小さくした細長い形の入射光を用いると、観察視野を狭めることなく、照明光の厚さ $d$ を薄くすることができる。

【0039】こうして、薄層光照明を用いた顕微鏡観察から、焦点位置を移動させながら連続画像を得て、デコンボリューションによってセクショニング画像及び3次元画像を得ることができる。そして、本発明によると従来法とは違って、背景光が低く高画質であることに加

え、試料の照明が薄い層状領域のみの局所的である。

【0040】それ故に、試料観察面近傍の領域のみをデコンボリューションの計算対象とすれば良いという計算上・画質上ともに大きな利点がある。従って、厚みのある試料の観察、明るい中にある暗い部分の観察、1分子観察のような高感度観察の、セクショニング画像及び3次元画像を行うことを可能にする。

【0041】更に、図7のように、複数の入射光または回転対称な入射光の使用や、回転等による入射位置の移動によって、偏りのない薄層光照明を行うことができる。

【0042】次に、本発明を適用して蛍光顕微鏡に薄層斜光照明法を用いた例を図8に示す。図において、符号は上述の例と同一物のものには同一符号を付しており、11は光学フィルタ、12はミラー、13は集光用レンズ、Rは照明レーザー光可変絞りの内径である。レーザー光を照明光として用い、集光用レンズ13によって対物レンズ4の後焦点面にレーザー光を集光し、試料における照明光を平行光にする。

【0043】可変絞りの径Rを変えて入射開き角  $\theta$  を変化させ、照射半径rを調節する。ミラー12と集光用レンズ13を一体としてtx方向に移動させることにより、入射位置Xを調節する。次に、ミラー12へのレーザー光の入射位置をt方向に移動すると、集光用レンズ13を通過後の光路の傾きが変化するので、tによって対物レンズ4への入射角  $\theta$  を調節する。以上の調節によって、試料における照明光の層の厚さ  $d = 2r \cdot \cos \theta$  を数ミクロンに設定することができる。

【0044】実施例を挙げると、油浸100倍 NA 1.4の対物レンズを用い、試料観察面における照射領域の直径  $2r = 30 \mu\text{m}$  の時、試料における入射角  $\theta = 80^\circ$  で  $d = 5 \mu\text{m}$ 、入射角  $\theta = 84^\circ$  で  $d = 3 \mu\text{m}$  となる。油浸60倍 NA 1.4の対物レンズを用い、試料観察面における照射領域の直径  $2r = 45 \mu\text{m}$  の時、試料における入射角  $\theta = 86^\circ$  で  $d = 3 \mu\text{m}$  となる。

【0045】こうして、薄層斜光照明によって得られる蛍光像を、高感度カメラであるイメージングインテンシファイアーCCDによって観察することにより、蛍光色素1分子を可視化できる。

【0046】また、他の適用例として、蛍光顕微鏡において、試料観察面を傾け、照明光を細長くし、高NA対物レンズを用いて、薄層照明光を薄くする例を説明する。図8の蛍光顕微鏡において、図5の結像レンズを傾ける方法により試料観察面を傾け、図6の細長い照明光を使う方法を用いる。

【0047】カバーガラスでの照明光の断面形状は、短径  $2r = 30 \mu\text{m}$ 、長径  $2r' = 100 \mu\text{m}$  にする。このようにすれば、1辺  $100 \mu\text{m}$  の観察視野を得ることができ、観察視野を狭めることなく、照明光の厚みを薄くできる。

【0048】式  $d = 2r \cdot \cos \theta$  から、試料における照明光の層の厚さdは、油浸60倍 NA 1.4の対物レンズを用いると、 $2r = 30 \mu\text{m}$ 、試料における照明光の入射角  $\theta = 86^\circ$  で  $d = 2 \mu\text{m}$  となる。但し、厚さdが光の波長(可視光で  $0.4 \sim 0.7 \mu\text{m}$ )に近くなるため、回折現象により光の層の上下に光の広がりが見られ始める。

【0049】更に、NAの大きい油浸60倍 NA 1.45の対物レンズを用いると、試料における入射角  $\theta = 87^\circ$ 、即ち、カバーガラスとのなす角が  $3^\circ$  となり、照明光とカバーガラスとがほとんど平行になる。このように平行に近づけることにより、結像レンズを傾けることによる画質への影響が無視できるようになる。光の厚さdに関しては、理論的には  $2 \mu\text{m}$  より薄くなるが、回折光による厚みの広がりも強くなる。

【0050】本発明の光学系の薄層斜光照明と従来の斜光照明法による照明光の厚みを実測比較すると、図12に示すように、例えば開口数NA = 1.4の対物レンズを用いた場合、従来の斜光照明法による照明光の厚みの約半分の厚みが得られた。

【0051】本発明の薄層斜光照明法を用いた蛍光顕微鏡観察によって、細胞内においても明瞭な1分子イメージングが実現した。その結果、分子1個の動きや変化を直接観察できるようになった。それと共に、分子1個の蛍光強度を得ることによって、蛍光強度から細胞内における分子数を定量することも実現できた。更に、分子数の定量から細胞内における分子間相互作用の結合分子数と結合の強さを求めることを実現できた。

【0052】現在、ナノテクノロジーのバイオへの応用が強い興味を集めているが、1分子レベルの高感度検出を可能にする本発明の薄層斜光照明法は、この分野における重要な要素技術になるものと考えられる。また、顕微鏡技術としても、新しい顕微鏡法として発展することが期待される。

【0053】

【発明の効果】以上のように、本発明の光学系の薄層斜光照明法は、対物レンズを用いた斜光照明において、薄い層状の光で試料を照明することにより、光学顕微鏡はもとより各種の顕微鏡及び光を用いた検出において、低背景の画像及び低バックグラウンドのシグナルを得ることができる。その結果として、高感度・高いS/N比の画像及びシグナルを得ることができる。

【0054】また、薄層光照明を用いた顕微鏡観察から、焦点位置を移動させながら連続画像を得て、デコンボリューションによってセクショニング画像及び3次元画像を得ることができ、背景光が低く高画質である。また、試料の照明が薄い層状領域のみの局所的であるので、得られる蛍光像を高感度カメラで観察することにより、蛍光色素1分子を可視化できると共に、分子1個の蛍光強度を得ることによって、蛍光強度から細胞内にお

ける分子数を定量することも実現できる。更に、分子数の定量から細胞内における分子間相互作用の結合分子数と結合の強さを求めることを実現できる。

【図面の簡単な説明】

- 【図 1】本発明の照明光の厚さを求める原理図。
- 【図 2】光学系の対物レンズに関連する部分拡大図。
- 【図 3】対物レンズへの入射角を調節方法の概略図。
- 【図 4】対物レンズの焦点位置を変える方法の概略図。
- 【図 5】受光素子の受光面あるいは結像レンズを傾ける方法の概略図。
- 【図 6】対物レンズに入射する照明光の形を細長くする方法の概略図。
- 【図 7】複数の入射光または回転対称な入射光を使用する方法の概略図。
- 【図 8】蛍光顕微鏡の薄層斜光照明法の概略図。
- 【図 9】蛍光顕微鏡の落射照明法の概略図。
- 【図 10】対物レンズ型全反射照明法の概略図。

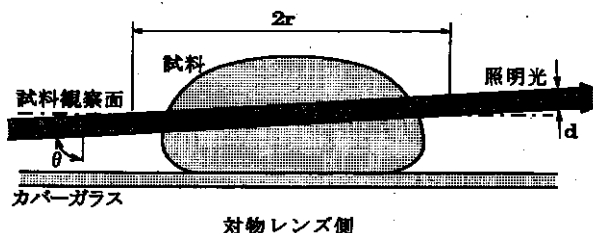
【図 11】光照射切り替え方法の概略図。

【図 12】本発明方法と従来方法の照明光の厚めの比較表。

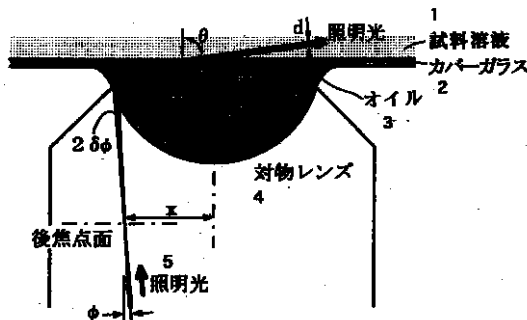
【符号の説明】

- 1 試料媒体（溶液等）
- 2 カバーガラス
- 3 オイル
- 4 対物レンズ（レンズ群）
- 5, 6 照射光
- 7 ダイクロイックミラー
- 8 試料観察面
- 9 結像レンズ
- 10 受光素子
- 11 光学フィルタ
- 12 ミラー
- 13 集光用レンズ

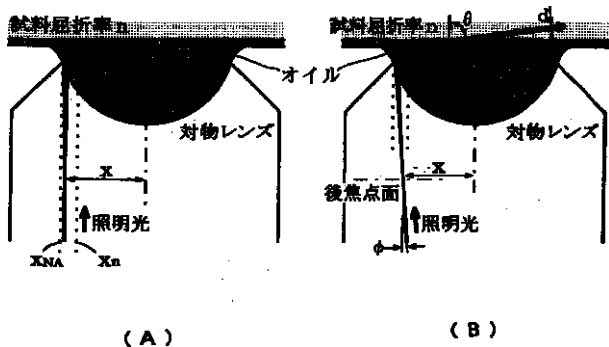
【図 1】



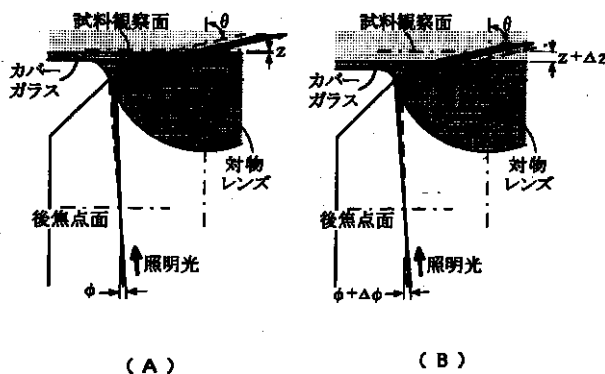
【図 2】



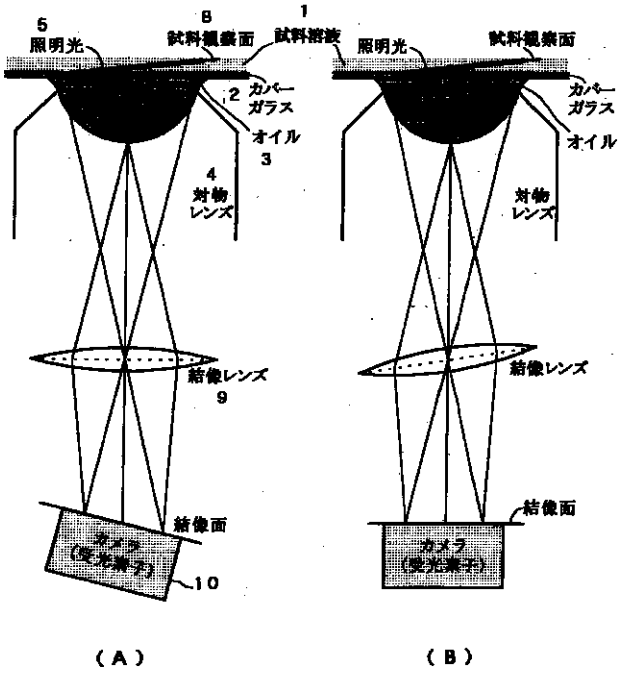
【図 3】



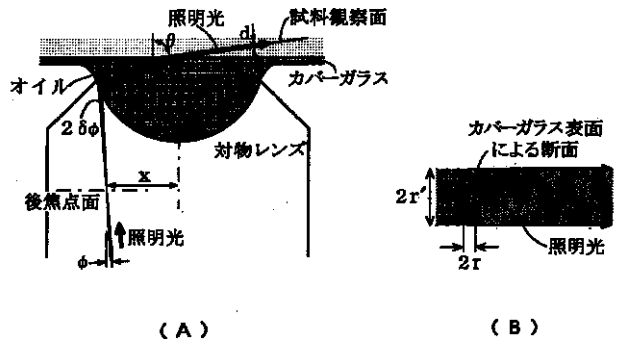
【図 4】



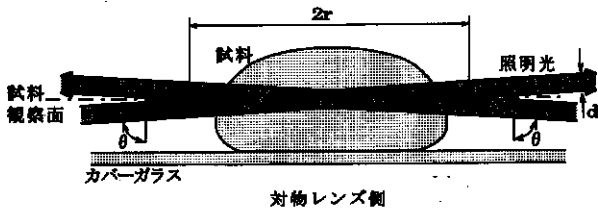
【図5】



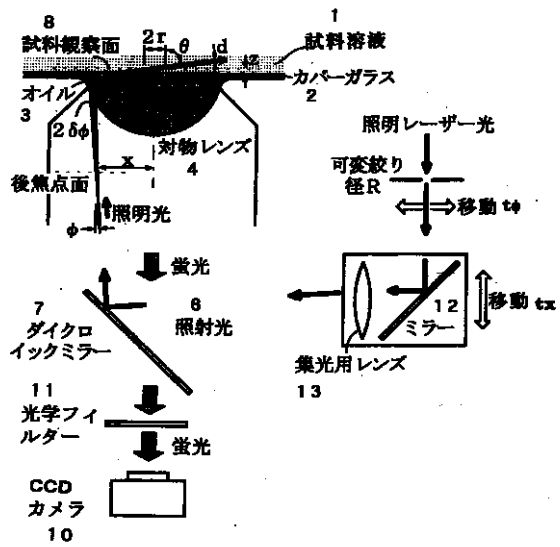
【図6】



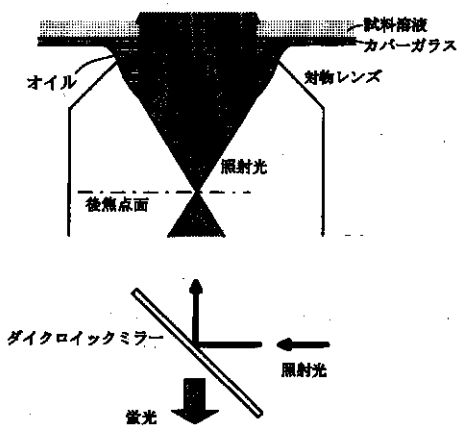
【図7】



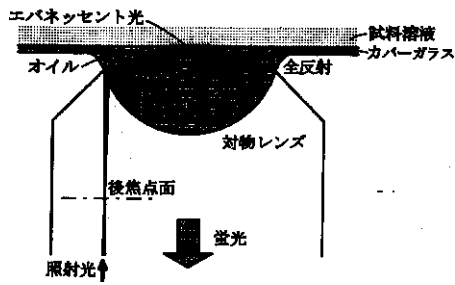
【図8】



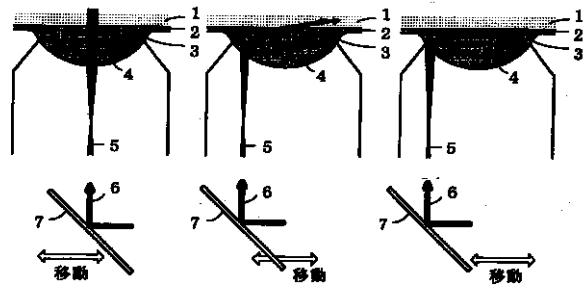
【図9】



【図10】



【図11】



( A )

( B )

( C )

【図12】

照明光の厚み

	対物レンズ		照明光の 入射角 $\theta$ (度)	照射領 域直径 $2r$ ( $\mu\text{m}$ )	照明光 の厚み $d$ ( $\mu\text{m}$ )
	開口数 (NA)	油浸 倍率			
通常の斜 光照明	0.8	-	53	100	60
	1.4	油浸	65	50	21
薄層斜光 照明	1.4	油浸	75	40	10
	1.4	油浸	80	50	9
	1.4	油浸	100	84	3
	1.4	油浸	60	86	3
	1.45	油浸	60	87	3

$$d = 2r \cdot \cos \theta$$

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA09 EA01 FA02  
 GA02 GA03 GB02 GB03 HA01  
 HA02 JA02 KA09 LA02 LA03  
 MA01  
 2H052 AA09 AA13 AB02 AB15 AC04  
 AC09 AC27 AC34 AD31 AD34  
 AF14