

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4867354号  
(P4867354)

(45) 発行日 平成24年2月1日(2012.2.1)

(24) 登録日 平成23年11月25日(2011.11.25)

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

請求項の数 3 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2006-6931 (P2006-6931)                  (22) 出願日 平成18年1月16日 (2006.1.16)                  (65) 公開番号 特開2007-187945 (P2007-187945A)                  (43) 公開日 平成19年7月26日 (2007.7.26)                  審査請求日 平成20年5月26日 (2008.5.26)</p> <p>(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願 (平成14年度新エネルギー・産業技術総合開発機構再委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)</p>	<p>(73) 特許権者 000006507                  横河電機株式会社                  東京都武蔵野市中町2丁目9番32号                  (72) 発明者 御厨 健太                  東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会社内                  (72) 発明者 景 虹之                  東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会社内                  審査官 殿岡 雅仁</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共焦点顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

顕微鏡ユニットとニポウディスク方式の共焦点スキャナユニットから構成され、試料に照射される画像計測用光ビームの戻り蛍光を結像させた共焦点画像により前記試料の観察を行なう共焦点顕微鏡において、

前記試料に刺激を与える刺激用光ビームのスポットを前記試料上に結像させる刺激用光ビーム出力手段と、

前記刺激用光ビームの途中に設けられ、前記スポットの光軸方向焦点位置を調節する焦点調節手段と、

を備え、

前記刺激用光ビーム出力手段及び焦点調節手段は、前記共焦点スキャナユニットに一体に形成されると共に、その光源を前記刺激用光ビーム出力手段内に備えていることを特徴とする共焦点顕微鏡。

【請求項2】

前記刺激用光ビーム出力手段は、前記スポットを前記試料上で走査して任意の形状で刺激を与える走査手段を備えることを特徴とする請求項1に記載の共焦点顕微鏡。

【請求項3】

前記走査手段は、ガルバノミラースキャン機構であることを特徴とする請求項2に記載の共焦点顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は共焦点顕微鏡に関し、詳しくは、観察試料に対して光刺激を行なう機能を備えた共焦点顕微鏡に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

共焦点顕微鏡は、レーザ光（以下、画像計測用光ビーム）による試料上の集光点を走査し、試料からの戻り蛍光を結像させて画像を得ることにより試料を観察するもので、生物やバイオテクノロジーなどの分野における生きた細胞の生理反応観察や形態観察、あるいは半導体市場におけるLSIの表面観察等に使用されている。

10

## 【0003】

図4は、従来の共焦点顕微鏡の一例を示した構成図である。図4において、共焦点スキャナユニット110は、顕微鏡ユニット120のポート122に接続されており、画像計測用光ビーム111は、マイクロレンズディスク112のマイクロレンズ117により個別の光束に集光され、ダイクロイックミラー113を透過後、ピンホールディスク（以下、ニポウディスク）114の個々のピンホール116を通過し、顕微鏡ユニット120の対物レンズ121により、ステージ123上の試料140に集光される。

## 【0004】

この画像計測用光ビーム111の照射により、試料140が蛍光する。試料140から出た戻り蛍光は、再び対物レンズ121を通り、ニポウディスク114の個々のピンホール上に集光される。個々のピンホールを通過した戻り蛍光は、ダイクロイックミラー113で反射され、リレーレンズ115を介してイメージセンサ131に結像される。

20

## 【0005】

このような装置では、図示しないモータでマイクロレンズディスク112及びニポウディスク114を同軸で一定速度回転させており、この回転によるピンホール116の移動により試料140上への集光点を走査している。

## 【0006】

ニポウディスク114のピンホールが並んでいる表面と、試料140の被観察面と、イメージセンサ131の受光面とは互いに光学的に共役関係に配置されているので、イメージセンサ131には、試料140の光学的断面像、即ち共焦点画像が結像される。ニポウディスク方式の共焦点顕微鏡の詳細に関しては、特許文献1に開示されている。

30

## 【0007】

このような共焦点顕微鏡を用いた画像計測では、細胞等の試料などに対して光刺激を行ない、時間経過に対する状態変化（フォトアクチベーションやFRAP（fluorescence recovery after photobleaching）等）を観察したい要求がある。

## 【0008】

フォトアクチベーションとは、例えば細胞の所定の部分に画像計測用光ビーム以外の刺激用光ビームのスポット光を照射し、その部分の蛍光色を変化させてマーキングする。このマーキングが時間経過により、細胞に広がっていく様子を観察するものである。

## 【0009】

FRAP（蛍光褪色法）とは、蛍光タンパクを発現した細胞の蛍光を、刺激用光ビームの照射により部分的に褪色させ、細胞における蛍光褪色後のタンパク質の局在変化を観察するものである。

40

## 【0010】

特許文献1には、結像特性を向上し、ピンホール面からの迷光を低減できるようにした共焦点用光スキャナが記載されている。

## 【0011】

【特許文献1】特開平5-60980号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

## 【0012】

しかしながら、上述の従来のニポウディスク方式の共焦点顕微鏡には、試料に光刺激を与えてその変化を観察する機能を備えたものがない。

## 【0013】

本発明は、このような従来の共焦点顕微鏡が有していた問題を解決しようとするものであり、ニポウディスク方式の共焦点顕微鏡に光刺激を行なう機能を付加することにより、光刺激や蛍光褪色の反応をリアルタイムで観察可能とすると共に、試料上に集光させる刺激用光ビームのスポットの光軸方向焦点位置を調節することができる共焦点顕微鏡を実現することを目的とするものである。

## 【課題を解決するための手段】

10

## 【0014】

このような課題を達成するために、本発明の構成は次の通りである。

(1) 顕微鏡ユニットとニポウディスク方式の共焦点スキャナユニットから構成され、試料に照射される画像計測用光ビームの戻り蛍光を結像させた共焦点画像により前記試料の観察を行なう共焦点顕微鏡において、

前記試料に刺激を与える刺激用光ビームのスポットを前記試料上に結像させる刺激用光ビーム出力手段と、

前記刺激用光ビームの途中に設けられ、前記スポットの光軸方向焦点位置を調節する焦点調節手段と、

を備え、

20

前記刺激用光ビーム出力手段及び焦点調節手段は、前記共焦点スキャナユニットに一体に形成されると共に、その光源を前記刺激用光ビーム出力手段内に備えていることを特徴とする共焦点顕微鏡。

## 【0019】

(2) 前記刺激用光ビーム出力手段は、前記スポットを前記試料上で走査して任意の形状で刺激を与える走査手段を備えることを特徴とする(1)に記載の共焦点顕微鏡。

## 【0020】

(3) 前記走査手段は、ガルバノミラースキャン機構であることを特徴とすることを特徴とする(2)に記載の共焦点顕微鏡。

## 【発明の効果】

30

## 【0023】

以上説明したことから明らかなように、本発明によれば次のような効果がある。

(1) 光刺激用の刺激用光ビームを照射する機能を備えることによって、フォトアクチベーションやFRAPが可能となる。この場合、蛍光観察、即ち画像計測は、ニポウディスク式焦点スキャナで行なうことで、高速性(例えば1000フレーム/秒のスキャンスピード)が実現できるため、光刺激や蛍光褪色に係わる高速反応をリアルタイムで観察することができる。

## 【0024】

(2) 刺激用光ビームの途中に設けた焦点調節手段により、試料上に集光されるスポットの光軸方向の焦点位置ずれを調節することで、光刺激の効率を常に最大に保持した試料観察が可能となる。

40

## 【0025】

(3) 画像処理手段を用いることにより、共焦点画像データから刺激用光ビームによるスポット形状情報を抽出することで、スポットの光軸方向位置が最適となるように焦点調節手段を操作する自動調整が可能となる。

## 【0026】

(4) 刺激用光ビーム出力手段を、共焦点スキャナユニットと一体に形成することによって、画像計測用光ビームと、刺激用光ビームの2つのスキャン機構を一体化でき、一体化により、2つのビームの焦点合わせを簡単にできる。

## 【0027】

50

(5) 光刺激用の刺激用光ビームの2次元走査により、試料の形状に合わせた光刺激を可能とし、走査手段としてガルバノミラースキャン機構を用いることで、刺激用光ビームのスポットを高精度で位置決め制御することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

以下、本発明を図面により詳細に説明する。図1は本発明を適用した共焦点顕微鏡の一実施形態を示す構成図である。図4で説明した従来の共焦点顕微鏡と同一要素には同一符号を付して説明を省略する。以下、本発明の特徴部につき説明する。

【0029】

図1において、共焦点スキャナユニット110は、顕微鏡ユニット120のポート122に接続されており、画像計測用光ビーム111を試料140上に照射する共焦点顕微鏡の構成は、図4に示した従来の共焦点顕微鏡と同一である。

【0030】

共焦点スキャナユニット110に入射した波長1の画像計測用光ビーム111は、マイクロレンズディスク112のマイクロレンズ117により個別の光束に集光され、ダイクロイックミラー113を透過後、ニポウディスク114の個々のピンホール116を通過し、ポート122を通過して顕微鏡ユニット120に入り、対物レンズ121により、ステージ123上の試料140に集光される。

【0031】

この画像計測用光ビーム111の照射により、試料140が蛍光する。試料140からの戻り蛍光は、再び対物レンズ121を通り、ニポウディスク114の個々のピンホール上に集光される。個々のピンホールを通過した戻り蛍光は、ダイクロイックミラー113で反射され、リレーレンズ115を介してイメージセンサ131に共焦点画像として結像される。

【0032】

共焦点スキャナユニット110において、鎖線で示すブロック200は刺激用光ビーム出力手段であり、試料140に刺激を与える刺激用光ビームのスポットを試料140上に集光させるために、波長2の刺激用光ビームを出力する。

【0033】

この刺激用光ビーム出力手段200は、共焦点スキャナユニット110と一体に形成されている。画像計測用光ビームの波長1と刺激用光ビームの波長2との関係は、 $1 > 2$ に選定されている。

【0034】

201は、波長2の刺激用光ビームを発生する光源である。この光源201としては、一般的には外部のレーザ光源より共焦点スキャナユニット110に導く構成をとるが、試料に刺激を与える刺激用光ビームは蛍光発生を目的とする画像計測用光ビームのような電力を必要とないので、波長の条件( $1 > 2$ )を満足すれば発光ダイオード(青色発光ダイオード)等の発光素子のビームを利用することが可能である。

【0035】

光源201からの刺激用光ビーム202は、コリメータレンズ203で平行ビームに変換され、焦点調節用レンズ204を介して走査手段を形成するガルバノミラースキャン機構208に導かれる。

【0036】

209はダイクロイックミラーであり、画像計測用光ビーム111の途中に設けられてこの画像計測用光ビームを透過させると共に、ガルバノミラースキャン機構208からの刺激用光ビームを反射させ、2つのビームを合成して試料140に照射する。SPは、試料140上に集光された刺激用光ビーム202によるスポットである。

【0037】

ガルバノミラースキャン機構208は、DCモータにより縦・横方向に回転できる機構になっていて、制御ユニット(図示せず)からの信号によりDCモータを制御してガルバ

10

20

30

40

50

ノミラーを回転させて試料140上のスポットSPを任意の位置に位置決め制御できる。このスポットの複数プロットにより、任意形状の刺激範囲を設定することが可能である。

【0038】

205は焦点調節手段であり、刺激用光ビームの途中に挿入された焦点調節用レンズ204を光軸方向に移動させて、刺激用光ビーム202により試料140上に集光されるスポットSPの光軸方向の焦点位置を調節する。

【0039】

画像計測用光ビーム111の光軸方向の焦点位置と、刺激用光ビーム202によるスポットSPの光軸方向の焦点位置とを一致させることにより、次のような効果がある。

- (1) 光刺激を受けた正しい共焦点画像が得られる。
- (2) 共焦点スライス面から見た刺激用光ビームによるスポットSPの径を小さくし、光刺激箇所をシャープに狙うことができる。
- (3) 刺激用光ビーム202の光パワーを効率よく利用でき、不必要なブリーチングを小さくできる。

【0040】

オペレータは、イメージセンサ131の共焦点画像を観察しながら、手動により焦点調節手段205を操作してスポットSPの光軸方向の焦点位置を最適位置に調節することができるが、画像処理手段を用いることでこの操作を自動化することが可能である。

【0041】

206は画像処理手段であり、イメージセンサ131の共焦点画像データから刺激用光ビーム202によるスポットSPの形状情報を抽出する。207は、画像処理手段206からの形状情報を入力する操作手段であり、形状情報に基づいてスポットの焦点位置が最適となるように焦点調節手段205に操作信号Mを出力する。

【0042】

図1の実施形態では、試料に刺激を与える刺激用光ビームのスポットSPを試料140上に集光させるための刺激用光ビーム出力手段200を、共焦点スキャナユニット110と一体に形成することによって、画像計測用光ビーム111と、光刺激用ビーム202の2つのスキャン機構を一体化でき、2つのビームの焦点合わせが容易にできる。

【0043】

一体化構造のため、画像計測用光ビーム111の途中に、画像計測用光ビームを透過させるダイクロイックミラー205を共焦点スキャナユニット内に設けることができる。このダイクロイックミラーで刺激用光ビーム202を反射させることにより、共焦点スキャナユニット内でシンプルな光学系により画像計測用光ビーム111と刺激用光ビーム202を合成することができる。

【0044】

図2は、本発明を適用した共焦点顕微鏡の他の実施形態を示す構成図である。図1の構成との相違点は、刺激用光ビームの光源201として発光ダイオード等の発光素子を用い、この光源を共焦点スキャナユニット110の筐体内に内蔵した点にある。

【0045】

このような光源内蔵構造をとることにより、刺激用光ビーム出力手段200全体を共焦点スキャナユニット110の筐体内に収容することが可能となり、共焦点顕微鏡の小型・省スペース・コストダウンに貢献することができる。

【0046】

図3は、本発明を適用した共焦点顕微鏡の更に他の実施形態を示す構成図である。図1及び図2の構成との相違点は、試料に刺激を与える刺激用光ビームのスポットSPを試料140上に集光させるための刺激用光ビーム出力手段200のユニットを、顕微鏡120が備える第2のポート124に結合させた点にある。

【0047】

顕微鏡120が第2のポート124を備える場合には、このポートを利用した接続形態で本発明を実施することができる。この実施形態では、ガルバノミラー・スキャン機構を持

10

20

30

40

50

たず、スポットSPの位置は試料140上の固定位置となる。更にこの実施形態では、刺激用光ビームを反射させるダイクロイックミラー125は、顕微鏡120の筐体内に形成されている。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】 発明を適用した共焦点顕微鏡の一実施形態を示す構成図である。

【図2】 本発明を適用した共焦点顕微鏡の他の実施形態を示す構成図である。

【図3】 本発明を適用した共焦点顕微鏡の更に他の実施形態を示す構成図である。

【図4】 従来の共焦点顕微鏡の一例を示した構成図である。

【符号の説明】

10

【0049】

110 共焦点スキャナユニット

111 画像計測用光ビーム

112 マイクロレンズディスク

113 ダイクロイックミラー

114 ニポウディスク

115 リレーレンズ

116 ピンホール

117 マイクロレンズ

120 顕微鏡ユニット

20

121 対物レンズ

122 ポート

123 ステージ

131 イメージセンサ

140 試料

200 刺激用光ビーム出力手段

201 光源

202 刺激用光ビーム

203 コリメータレンズ

204 焦点調節用レンズ

30

205 焦点調節手段

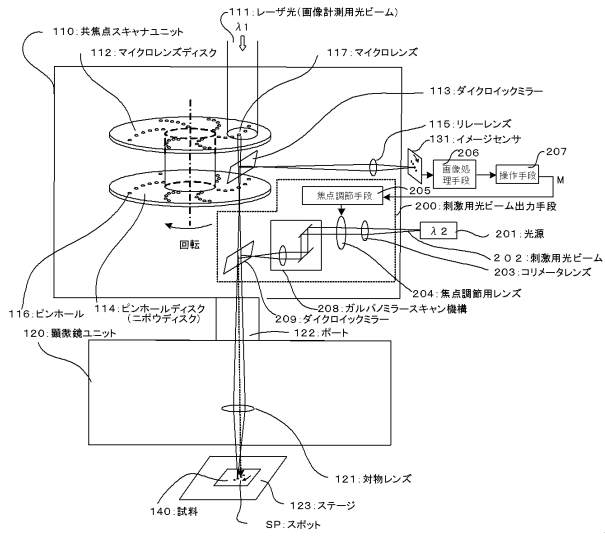
206 画像処理手段

207 操作手段

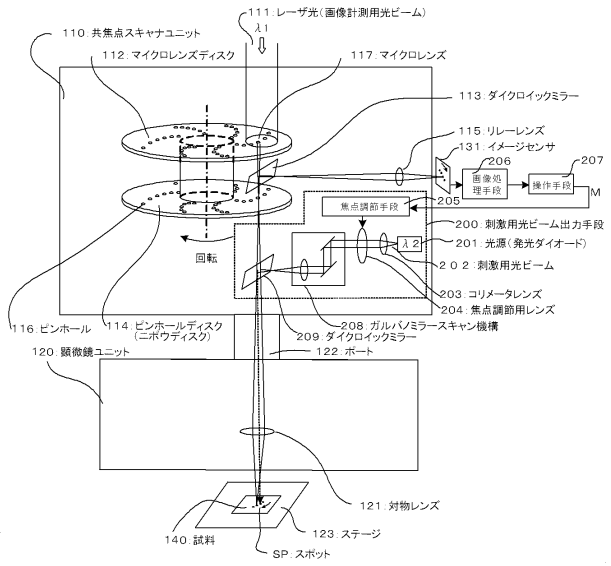
208 ガルバノミラースキャン機構

209 ダイクロイックミラー

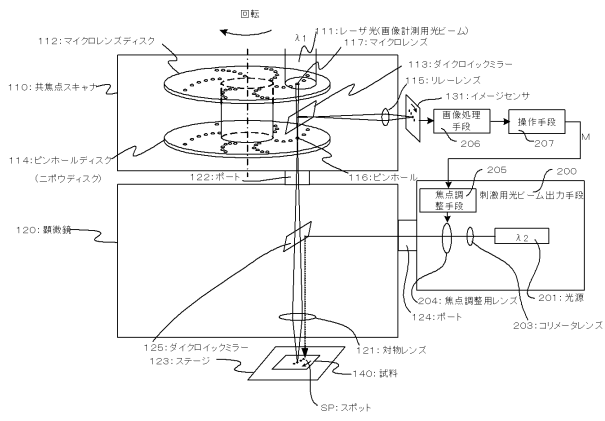
【図1】



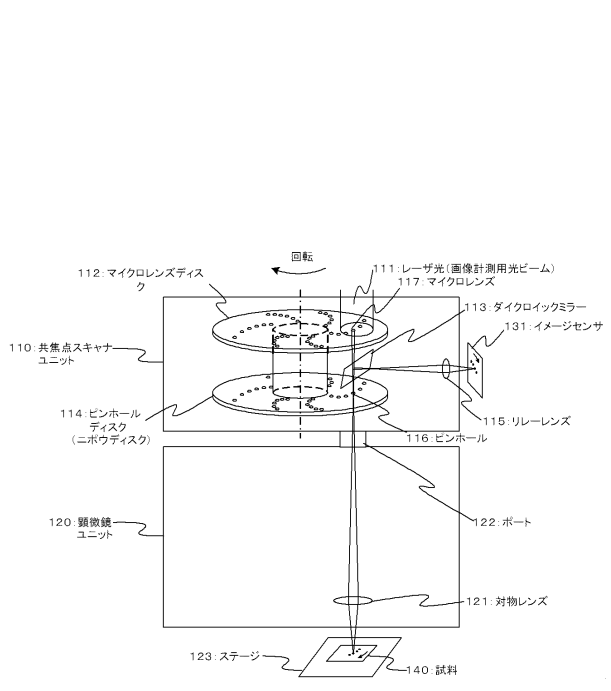
【図2】



【図3】



【図4】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2004-004678(JP,A)  
特開2005-165212(JP,A)  
特開2006-003747(JP,A)  
特開2001-281147(JP,A)  
特開2005-037690(JP,A)  
特開平06-160724(JP,A)  
特開平10-206742(JP,A)  
特開2004-109565(JP,A)  
特開2003-215461(JP,A)  
特開平04-336445(JP,A)  
特開平09-329750(JP,A)  
特開2004-110017(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/00  
G02B 21/06 - 21/36