

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4270610号
(P4270610)

(45) 発行日 平成21年6月3日(2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int. Cl.		F 1
GO 2 B 21/06	(2006.01)	GO 2 B 21/06
GO 2 B 21/16	(2006.01)	GO 2 B 21/16
GO 2 B 21/18	(2006.01)	GO 2 B 21/18

請求項の数 2 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平10-269561	(73) 特許権者	000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(22) 出願日	平成10年9月24日(1998.9.24)	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(65) 公開番号	特開2000-98245(P2000-98245A)	(74) 代理人	100084618 弁理士 村松 貞男
(43) 公開日	平成12年4月7日(2000.4.7)	(74) 代理人	100100952 弁理士 風間 鉄也
審査請求日	平成17年9月13日(2005.9.13)	(74) 代理人	100097559 弁理士 水野 浩司
		(72) 発明者	島田 佳弘 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリンパス光学工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 走査型光学顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

レーザー光源からのレーザー光で標本を走査する走査型光学顕微鏡において、
前記標本からの蛍光を分光するスペクトル分解手段と、
前記スペクトル分解手段で分光された蛍光を複数の波長域に分割する波長域分割手段と

、
前記複数の波長域に分割された各光路にそれぞれ設けられ、前記標本からの蛍光を結像する複数の結像光学系と、

前記各光路にそれぞれ設けられ、前記結像光学系の焦点位置に配置された複数の共焦点絞りと、

前記各光路にそれぞれ設けられ、前記共焦点絞りを通過した前記標本からの蛍光を検出する複数の光検出器と、

を具備し、

前記スペクトル分解手段は、スペクトル分解された光束を平行に出射する光学手段を有することを特徴とする走査型光学顕微鏡。

【請求項2】

前記スペクトル分解手段はプリズムであり、

前記標本からの蛍光を分離するためのビームスプリッタと前記スペクトル分解手段との間に、光束を縮小する縮小光学系を設けたことを特徴とする請求項1に記載の走査型光学顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標本からの蛍光を複数の波長域に分光し、各波長域の蛍光を検出する走査型光学顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】

特開平8-43739号公報には、レーザー光を対物レンズにより集光して標本上にスポット光を結ばせ、光走査手段によりそのスポット光を標本上で2次元に走査し、標本からの蛍光をグレーティングにより分光し、分光された光の幅を可変可能なスリットを通して検出する共焦点走査型レーザー顕微鏡が開示されている。

10

【0003】

図6は、上記共焦点走査型レーザー顕微鏡の構成を示す図である。図6に示すように、レーザー光源101から出射されたレーザー光は、ビームエキスパンダ102、ダイクロイックミラー104、X-Y走査光学系105、瞳投影レンズ106、顕微鏡107を順次介して標本109に導かれる。また測光分離手段は、標本109からの蛍光を分離するダイクロイックミラー104、共焦点光学系108、グレーティング119、光の幅を変更可能なスリット110, 111, 112、集光レンズ116, 117, 118、光検出器113, 114, 115からなる。

【0004】

このような構成において、標本109からの蛍光は、顕微鏡107、瞳投影レンズ106、X-Y走査光学系105、ダイクロイックミラー104、共焦点光学系108を順次通過した後、グレーティング119に至り、その波長に合わせ分光される。分光された各蛍光には、それぞれスリット110, 111, 112、及び光検出器113, 114, 115が対応しており、各スリット110, 111, 112の幅を変化させることで、検出する各蛍光波長範囲を選択することができる。

20

【0005】

また特開平9-502269号公報には、蛍光光束をプリズム等のスペクトル分解手段により分光し、一方では第一スペクトル範囲を絞り込み、他方では絞りを通過しないスペクトル範囲の少なくとも一部分を反射して第二スペクトル範囲をなす二つの光路を構成し、それぞれの光路に対して光検出器を設けた共焦点走査型レーザー顕微鏡が開示されている。

30

【0006】

図7は、上記共焦点走査型レーザー顕微鏡の構成を示す図である。図7に示すように、レーザー光源202から出射されたレーザー光束203は、方向変更ミラー204、レーザーラインフィルタ205、レンズ206、絞り207を介してダイクロイックミラー208で反射され、レンズ209、X-Y走査光学系210、瞳投影レンズ211、対物レンズ212を経て標本213に達する。標本213からの反射光及び蛍光からなる光束214は、対物レンズ212、瞳投影レンズ211、X-Y走査光学系210、レンズ209を経てダイクロイックミラー208に戻る。そして、光束214はダイクロイックミラー208を透過し、共焦点絞り215を介して分光器216に入る。

40

【0007】

図8は、分光器216の構成を示す図である。選択装置225は、光束214を分解するスペクトル分解手段227と、一方では第一スペクトル範囲229を絞り込み他方では絞りを通過しないスペクトル範囲の少なくとも一部分230を反射する手段228とを有している。光検出装置226は、絞り込まれた第一スペクトル範囲229の光路に配置された第一光検出器231と、反射されたスペクトル範囲の光路に設置された第二光検出器232とを有している。さらに選択装置225は、反射されたスペクトル範囲230の光路に設置され、第二スペクトル範囲234を絞り込む手段233を有する。第二光検出器232は、絞り込まれた第二スペクトル範囲234の光路に設置されている。

50

【 0 0 0 8 】

一方、近年蛍光観察においては、単染色のみならず、多重染色が多用されている。もとより、蛍光染色は細胞、組織内の特定対象を視認可能にするために行なわれる。このため多重染色観察では、各染色部位が明確な色の差、即ち蛍光波長の違いとして検出されなければならない。しかも、蛍光波長の部分的な重なり（クロスオーバー部分）を効率良く除去して検出する必要がある。さらに蛍光観察においては、高いコントラストと高い光学分解能が要求される。走査型共焦点レーザー顕微鏡はこれらの要求を満たすものであり、近年、生物分野の研究目的で広く利用されるようになってきている。

【 0 0 0 9 】

上記特開平 8 - 4 3 7 3 9 号公報及び特開平 9 - 5 0 2 2 6 9 号公報では、いずれも走査型共焦点レーザー顕微鏡をベースに、多重染色の蛍光分離手段として、プリズムや回折格子のようなスペクトル分解手段と、蛍光波長域を制限するためのスリットで構成することにより、共焦点顕微鏡のもつ高コントラストと高分解能を実現しつつ、多重染色標本からの蛍光をクロスオーバーさせることなく、高い効率で検出することを可能にしている。

【 0 0 1 0 】

【 発明が解決しようとする課題 】

一般的に標本からの蛍光は、光検出器にフォトマルチプライヤーを必要とするほど微弱である。また、蛍光標本は励起光（レーザー光）を強く当てるほど退色が激しくなるので、通常観察者は、標本の退色と得られる画像ノイズのバランスを見て、許容できる範囲内で可能な限り励起光量を下げようとする。したがってこの種の装置では、蛍光の損失を極力抑えることが極めて重要なポイントになる。

【 0 0 1 1 】

ここで例として、二つの蛍光色素（D A P I , C Y 5）で標識された標本をとりあげる。D A P I は U V 域（3 4 0 ~ 3 6 5 n m）に吸収波長域を有し、放出される蛍光波長は、そのピークがほぼ 4 5 0 n m に現れる。一方、C Y 5 は赤色域（6 3 0 ~ 6 5 0 n m）に吸収波長域を有し、蛍光波長は、そのピークがほぼ 6 7 0 n m に現れる。

【 0 0 1 2 】

以下、これらの蛍光が結像位置で形成されるスポットについて、図 7 を基に述べる。対物レンズ 2 1 2 で標本 2 1 3 上にレーザースポットを形成し、標本から放射される蛍光は、対物レンズ 2 1 2、瞳投影レンズ 2 1 1、X - Y 走査光学系 2 1 0 を経て、レンズ 2 0 9 に入射する。さらに光束 2 1 4 はダイクロイックミラー 2 0 8 を透過し、共焦点絞り 2 1 5 が配置されている位置、すなわちレンズ 2 0 9 による結像位置にそのスポットを結ぶ。なお、そのスポット径（回折径）は次式で表わされる。

【 0 0 1 3 】

$$= 1.22 \times \lambda / \text{NA}$$

ここで NA はレンズ 2 0 9 を出射する出射 NA であり、 λ は波長である。この式から、D A P I（蛍光波長 4 5 0 n m）と C Y 5（蛍光波長 6 7 0 n m）のスポット径を比べると、C Y 5 の方が約 1.5 倍ほど大きい。

【 0 0 1 4 】

したがって上述した従来の技術では、共焦点効果を確保するために D A P I のスポット径に合わせて共焦点絞り 2 1 5 の径を設定することになる。これは D A P I に対しては最適に設定されていることになるが、C Y 5 に対しては、不必要に共焦点絞り 2 1 5 により絞られてしまい、貴重な蛍光を失ってしまう。逆に、共焦点絞り 2 1 5 の径を C Y 5 に合わせると、D A P I は十分な共焦点効果が得られないという欠点がある。

【 0 0 1 5 】

また、図 8 に示した特開平 9 - 5 0 2 2 6 9 号公報の構成では、光束 2 1 4 がスペクトル分解手段 2 2 7 でスペクトル分解され、一方では第一スペクトル範囲 2 2 9 を絞り込み、他方では絞りを通過しないスペクトル範囲の少なくとも一部分 2 3 0 を反射する手段 2 2 8（可変スリット）で、各蛍光の波長域に分割している。しかし、スペクトル分解手段として図 8 に示すようなプリズムを用いている場合は、光束 2 1 4 の光束径が大きいと、十

10

20

30

40

50

分な精度で各検出光路に分割されないという欠点がある。

【0016】

本発明の第一の目的は、多重染色時の各蛍光波長に対して、共焦点効果を落とすことなく、かつ蛍光を損失することなく光検出器に導くことができる走査型光学顕微鏡を提供することにある。

本発明の第二の目的は、多重染色時の各蛍光波長に対して、精度良く各検出光路に分割することができる走査型光学顕微鏡を提供することにある。

【0017】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決し目的を達成するために、本発明の走査型光学顕微鏡は以下の如く構成されている。

(1) 本発明の走査型光学顕微鏡は、レーザー光源からのレーザー光で標本を走査する走査型光学顕微鏡において、前記標本からの蛍光を分光するスペクトル分解手段と、前記スペクトル分解手段で分光された蛍光を複数の波長域に分割する波長域分割手段と、前記複数の波長域に分割された各光路にそれぞれ設けられ、前記標本からの蛍光を結像する複数の結像光学系と、前記各光路にそれぞれ設けられ、前記結像光学系の焦点位置に配置された複数の共焦点絞りと、前記各光路にそれぞれ設けられ、前記共焦点絞りを通過した前記標本からの蛍光を検出する複数の光検出器と、を具備し、前記スペクトル分解手段は、スペクトル分解された光束を平行に出射する光学手段を有する。

【0018】

(2) 本発明の走査型光学顕微鏡は、上記(1)に記載の顕微鏡であり、かつ前記スペクトル分解手段はプリズムであり、前記標本からの蛍光を分離するためのビームスプリッタと前記スペクトル分解手段との間に、光束を縮小する縮小光学系を設けられている。

【0020】

上記手段を講じた結果、それぞれ以下のような作用を奏する。

(1) 本発明の走査型光学顕微鏡によれば、多重染色された標本からの各蛍光は、各蛍光が有する波長域に光路を分割されるが、各光路にはそれぞれ前記標本からの蛍光を結像する結像光学系と共焦点絞りが設けられているので、各共焦点絞りを各波長域に最適な絞り径に設定することができる。これにより、蛍光を損失することなく完全な共焦点効果が得られる。また、本発明の走査型光学顕微鏡によれば、スペクトル分解され、各検出光路に波長分解された光束が平行に出射するので、これらの光束は全て共焦点位置に集光する。したがって、この位置に共焦点絞りを配置するだけで上記(1)の走査型光学顕微鏡を構成できる。また各検出光路において、光束を分離した後の光路に共焦点絞り及び光検出器を配置するだけで、独立した共焦点光学系を設けることができるので、装置を簡易かつ安価に構成できる。

【0021】

(2) 本発明の走査型光学顕微鏡によれば、前記スペクトル分解手段はプリズムであり、標本からの各蛍光の光束が前記プリズムに入射する前に縮小されるので、蛍光を精度良く各検出光路に分割することができる。

【0023】

【発明の実施の形態】

(第1の実施の形態)

図1及び図2は、本発明の第1の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の構成を示す図である。図1に示すように、レーザー光源1は、アルゴン、クリプトン混合ガスレーザーの光源である。このレーザー光源1から出射されたレーザー光は、ビームエキスパンダ2、波長選択フィルタ3、ビームスプリッタ4、X-Y走査光学系5、瞳投影レンズ6、結像レンズ7、対物レンズ8を順次介して、標本9に導かれる。

【0024】

レーザー光源1により、主に351nm, 488nmのアルゴン線、及び568nm, 647nmのクリプトン線が放射される。ビームエキスパンダ2はレーザー光の光径が対物

10

20

30

40

50

レンズ 8 の瞳径をほぼ満たすように設定されている。またビームスプリッタ 4 は、到達した光の 20 % 程度を反射し、80 % 程度を透過する。

【0025】

波長選択フィルタ 3 は、351 nm, 488 nm, 568 nm, 647 nm の波長を選択的に透過する。標本 9 は、色素 DAPI, FITC, Texas Red, CY5 で四重染色されており、DAPI はアルゴン線 351 nm で、FITC はアルゴン線 488 nm で、Texas Red はクリプトン線 568 nm で、CY5 はクリプトン線 647 nm で、それぞれ励起される。

【0026】

上記励起によって、DAPI はほぼ 450 nm にピークをもつ蛍光を放出する。同様に FITC は 530 nm に、Texas Red は 610 nm に、CY5 は 670 nm にピークをもつ蛍光を放出する。これらの蛍光は対物レンズ 8、結像レンズ 7、瞳投影レンズ 6、X-Y 走査光学系 5 を経て、ビームスプリッタ 4 を通過する。

10

【0027】

ビームスプリッタ 4 を通過した光束 20 は、光束を縮小する縮小光学系 10 を通過して縮小され、光束 21 が形成される。光束 21 はプリズム 11 a を通過してそのスペクトルが分解され、プリズム 11 a と光学的に同一のプリズム 11 b によりスペクトルが分解された光束が平行光束 22 として形成され、三角ミラー 12 a に入射する。三角ミラー 12 a は入射軸に対して垂直な方向に移動可能に構成されており、ここでは約 570 nm を境に左右の光路に蛍光光束が分離されるように設定されている。この結果、DAPI と FITC の蛍光は光束 23 a として、また Texas Red と CY5 の蛍光は光束 23 b として分離される。

20

【0028】

光束 23 a は、さらに三角ミラー 12 b に入射する。三角ミラー 12 b も入射軸に対して垂直な方向に移動可能に構成されており、ここでは約 490 nm を境に左右の光路に蛍光光束が分離されるように設定されている。この結果、DAPI の蛍光は光束 24 b として、また FITC の蛍光は光束 24 a として分離される。

【0029】

もう一方の光束 23 b は、同様に三角ミラー 12 c に入射する。三角ミラー 12 c も入射軸に対して垂直な方向に移動可能に構成されており、ここでは約 650 nm を境に左右の光路に光束が分離されるように設定されている。この結果、Texas Red の蛍光は光束 24 c として、また CY5 の蛍光は光束 24 d として分離される。

30

【0030】

各光束 24 a, 24 b, 24 c, 24 d は、それぞれ幅が可変であり光軸に垂直な方向に移動可能なスリット 13 a, 13 b, 13 c, 13 d により、標本からの励起光の戻り光と、蛍光波長の部分的な重なり部分（蛍光のクロスオーバー部分）が制限される。スリット 13 a, 13 b, 13 c, 13 d を通過した各蛍光光束はそれぞれ共焦点レンズ 14 a, 14 b, 14 c, 14 d に入射する。各光束 24 a, 24 b, 24 c, 24 d は平行光束で出射しているため、その焦点位置に配置された共焦点絞り 15 a, 15 b, 15 c, 15 d の位置に集光し、これら共焦点絞りを通過して、フォトマルチプライヤー 16 a, 16 b, 16 c, 16 d で検出される。

40

【0031】

ここで、共焦点絞りはそれぞれ下式で計算された絞り径に設定されている。

$$= 1.22 \lambda / NA$$

ここで、NA は共焦点レンズ 14 a, 14 b, 14 c, 14 d を出射する出射 NA であり、 λ は蛍光波長である。

【0032】

したがって、DAPI, FITC, Texas Red, CY5 の各蛍光に対して、蛍光を損失することなく、最高の共焦点効果を得ることができる。

また、フォトマルチプライヤー 16 a, 16 b, 16 c, 16 d は、サイドオン型であっ

50

て、その軸心はプリズム 1 1 a によりスペクトル分解される面内に略一致するように構成されている。サイドオン型のフォトマルチプライヤーは、一般的に高感度でありながらヘッドオン型のフォトマルチプライヤーより安価であり、走査型の共焦点レーザー顕微鏡によく用いられる。しかしながら、サイドオン型のフォトマルチプライヤーは軸方向の感度分布に大きな差は見られないが、軸方向と垂直な方向には感度に大きな差があり、この点がヘッドオン型のフォトマルチプライヤーより劣る点である。なお参考として、図 3 にサイドオン型のフォトマルチプライヤーの感度分布のデータを示す。

【 0 0 3 3 】

本実施の形態では、サイドオン型フォトマルチプライヤーの軸心を、プリズム 1 1 a によりスペクトル分解される面内に略一致するように構成しているため、サイドオン型のフォトマルチプライヤーの感度分布がほとんど問題にならない。

10

【 0 0 3 4 】

以上、標本 9 が四重染色標本である場合に各蛍光を各検出光路に導く方法について示したが、標本 9 が単染色であっても何ら問題なく対応できる。また、標本 9 が FITC で単染色されている場合、他の蛍光とのクロスオーバーは考慮しなくてもよいので、得られる蛍光を全て一つの光検出器で導けばよい。

【 0 0 3 5 】

この場合、図 2 に示すように三角ミラー 1 2 a , 1 2 b の位置を調整して FITC を完全に取り込めるように設定する。なお、図 2 において図 1 と同一な部分には同一符号を付してある。また、図 2 において、縮小光学系 1 0 以下の構成は図 1 と同様であるので図示を省略する。

20

【 0 0 3 6 】

例えば、600 nm 以下の光を完全に取り込めるようにすれば、完全に FITC の蛍光を取り込めるので、三角ミラー 1 2 a , 1 2 b の位置を 600 nm 以下の光を取り込めるように設定する。また、スリット 1 3 b は 488 nm の励起光をカットし、600 nm 以下の光を取り込めるように設定すればよい。また、二重染色、三重染色の場合も同様に簡単に対応できる。

【 0 0 3 7 】

なお第 1 の実施の形態では、スペクトル分解手段として光学的に同一な一対のプリズム 1 1 a , 1 1 b を使用しているが、光学的に同一な一対の回折格子、あるいはホログラムを使用してもよい。また、スペクトル分解された光束が平行光束として出射すればよいので、プリズムと回折格子のように異なる光学素子を組合せてもよい。

30

【 0 0 3 8 】

上述した第 1 の実施の形態によれば、三角ミラーにより蛍光を複数の波長域に分割できるので、蛍光検出光路数を自由に設定できる。この例では 4 チャンネル構成として示したが、目的に応じて、2 チャンネル構成、3 チャンネル構成、あるいは 5 チャンネル以上の構成に簡単に実施できる。また、サイドオン型フォトマルチプライヤーの軸心を、プリズム 1 1 a によりスペクトル分解される面内に略一致するように構成しているため、感度分布がほとんど問題にならない。このように安価なサイドオン型フォトマルチプライヤーを使用できるので、装置を安価に構成することができる。

40

【 0 0 3 9 】

(第 2 の実施の形態)

図 4 及び図 5 は、本発明の第 2 の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の構成を示す図である。図 4 , 図 5 において同一な部分には同一符号を付してある。また、図 4 , 図 5 において、縮小光学系 1 0 以下の構成は図 1 と同様であるので図示を省略する。

【 0 0 4 0 】

図 1 に示したレーザー光源 1 は、アルゴン、クリプトン混合ガスレーザーの光源である。このレーザー光源 1 から出射されたレーザー光は、第 1 の実施の形態と同様に、ビームエキスパンダ 2、波長選択フィルタ 3、ビームスプリッタ 4、X - Y 走査光学系 5、瞳投影レンズ 6、結像レンズ 7、対物レンズ 8 を順次介して、標本 9 に導かれる。

50

【0041】

レーザー光源1により、主に488nmのアルゴン線、及び568nm、647nmのクリプトン線が放射される。ビームエキスパンダ2はレーザー光の光径が対物レンズ8の瞳径をほぼ満たすように設定されている。またビームスプリッタ4は、到達した光の20%程度を反射し、80%程度を透過する。

【0042】

波長選択フィルタ3は、488nm、568nm、647nmの波長を選択的に透過する。標本9は、色素FITC、Texas Red、CY5で三重染色されており、FITCはアルゴン線488nmで、Texas Redはクリプトン線568nmで、CY5はクリプトン線647nmで、それぞれ励起される。

10

【0043】

上記励起によって、FITCはほぼ530nmにピークをもつ蛍光を放出する。同様にTexas Redは610nmに、CY5は670nmにピークをもつ蛍光を放出する。これらの蛍光は対物レンズ8、結像レンズ7、瞳投影レンズ6、X-Y走査光学系5を経て、ビームスプリッタ4を透過する。

【0044】

ビームスプリッタ4を透過した光束20は、光束を縮小する縮小光学系10を透過して縮小され、光束21が形成される。光束21はプリズム11を透過してそのスペクトルが分解され、レンズ30に入射する。レンズ30はその焦点位置がプリズム11への光束の入射点11xに一致するように配置されている。したがって、レンズ30から射出するスペクトル分解された光束はスペクトル分解された面内においては平行光束となって射出される。このスペクトル分解された光束はミラー31a、31b、31cにより各検出光路に分離される。なおミラー31bと31cは入射光軸に対し45°方向に移動可能である。

20

【0045】

ミラー31cの端面31cxは、ほぼ647nmの励起光が当たる位置に設定され、ミラー31bの端面31bxは、ほぼ568nmの励起光が当たる位置に設定される。このような構成により、FITCの蛍光は光束33aとして、Texas Redの蛍光は光束33bとして、CY5の蛍光は光束33cとして分離される。なおミラー31a、31b、31cの位置はレンズ30の焦点位置から少しずれているが、縮小光学系10により光束系が縮小されているので、各検出光路への分離を十分に精度良く行なうことができる。

30

【0046】

各光束33a、33b、33cは、それぞれ幅が可変であり光軸に垂直な方向に移動可能なスリット13a、13b、13cにより、標本からの励起光の戻り光と、蛍光波長の部分的な重なり部分(蛍光のクロスオーバー部分)が制限される。スリット13a、13b、13cは、レンズ30の焦点位置に置かれている。したがって、スペクトル分解された各光束はスリット位置でスポットを結ぶので、スリットにより極めて高精度に波長域を制限することができる。なおスリット13a、13b、13cとミラー31a、31b、31cの位置は、それらの中間的な位置にレンズ30の焦点位置がくるように設定してもよい。

40

【0047】

スリットを通過した各蛍光光束はそれぞれレンズ34a、34b、34c及びプリズム35a、35b、35cを透過する。レンズ34a、34b、34c及びプリズム35a、35b、35cは、それぞれレンズ30、プリズム11と同一のものである。これにより、スペクトル分解された光束は各光路で合成され、それぞれ光束40a、40b、40cとなって共焦点レンズ14a、14b、14cに入射し、その焦点位置に配置された共焦点絞り15a、15b、15cを通過し、紙面に対して垂直に軸がなすように配置されたフォトマルチプライヤー16a、16b、16cで検出される。

【0048】

光束40a、40b、40cはスペクトルが完全に合成されているので、第1の実施の形態とは異なり、共焦点絞り15a、15b、15cを通過した後にスペクトル分解された

50

方向へ広がることはない。したがって、フォトマルチプライヤー 16 a , 16 b , 16 c を紙面に対して垂直に軸がなすように配置しても何ら問題はない。

【0049】

ここで、共焦点絞りはそれぞれ下式で計算された絞り径に設定されている。

$$= 1.22 \lambda / NA$$

ここで、NAは共焦点レンズ 14 a , 14 b , 14 c を出射する出射 NA であり、 λ は蛍光波長である。

【0050】

したがって、FITC, Texas Red, CY5 の各蛍光に対して、蛍光を損失することなく、最高の共焦点効果を得ることができる。なお、この例では3チャンネル構成で示したが、3チャンネルに限らず目的に応じてチャンネル数を設定できる。

10

【0051】

以上、標本9が三重染色標本である場合に各蛍光を各検出光路に導く方法について示したが、標本9が単染色であっても何ら問題なく対応できる。標本9がFITCで単染色されている場合、他の蛍光とのクロスオーバーは考慮しなくてもよいので、得られる蛍光を全て一つの光検出器に導けばよい。

【0052】

この場合、図5に示すようにミラー 31 c の位置を調整してFITCを完全に取り込めるように設定する。例えば600 nm以下の光を完全に取り込めるようにすれば、完全にFITCの蛍光を取り込めるので、ミラー 31 c の位置を600 nm以下の光を取り込めるように設定する。また、スリット 13 c は488 nmの励起光をカットし、600 nm以下の光を取り込めるように設定すればよい。また、二重染色、三重染色の場合も同様に簡単に対応できる。

20

【0053】

なお第2の実施の形態では、スペクトル分解手段としてプリズムを使用しているが、回折格子、あるいはホログラムを使用してもよい。

上述した第2の実施の形態によれば、スペクトル分解された光束を結像レンズ30によりスポットとして形成しているため、この位置に置かれたスリットにより、極めて精度良く蛍光の波長域を制限することができる。また、光束21のプリズム11への入射位置11xにレンズ30の焦点が一致するように構成しているため、レンズ30を出射するスペクトル分解された光束はスペクトル分離された面内においては平行になる。したがって、レンズ30、プリズム11と同一のものをレンズ34 a , 34 b , 34 c、プリズム35 a , 35 b , 35 c として使用できるので、装置を簡易にかつ安価に構成できる。

30

本発明は上記各実施の形態のみに限定されず、要旨を変更しない範囲で適時変形して実施できる。

【0054】

【発明の効果】

本発明によれば、多重染色時の各蛍光波長に対して、共焦点効果を落とすことなく、かつ蛍光を損失することなく光検出器に導くことができる走査型光学顕微鏡を提供できる。

また本発明によれば、多重染色時の各蛍光波長に対して、精度良く各検出光路に分割することができる走査型光学顕微鏡を提供できる。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の構成を示す図。

【図2】本発明の第1の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の構成を示す図。

【図3】本発明の第1の実施の形態に係るサイドオン型のフォトマルチプライヤーの感度分布のデータを示す図。

【図4】本発明の第2の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の構成を示す図。

【図5】本発明の第2の実施の形態に係る走査型光学顕微鏡の構成を示す図。

【図6】従来例に係る共焦点走査型レーザー顕微鏡の構成を示す図。

【図7】従来例に係る共焦点走査型レーザー顕微鏡の構成を示す図。

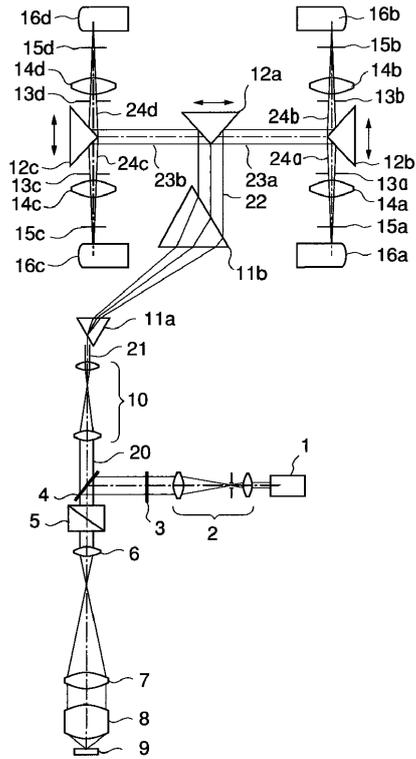
50

【図8】従来例に係る分光器の構成を示す図。

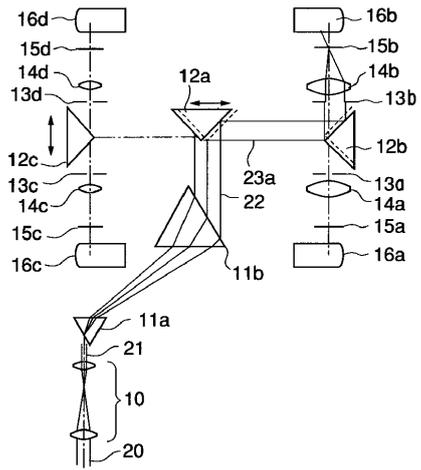
【符号の説明】

- 1 ... レーザー光源
- 2 ... ビームエキスパンダ
- 3 ... 波長選択フィルタ
- 4 ... ビームスプリッタ
- 5 ... X - Y 走査光学系
- 6 ... 瞳投影レンズ
- 7 ... 結像レンズ
- 8 ... 対物レンズ 10
- 9 ... 標本
- 10 ... 縮小光学系
- 11, 11a, 11b ... プリズム
- 12a, 12b, 12c ... 三角ミラー
- 13a, 13b, 13c, 13d ... スリット
- 14a, 14b, 14c, 14d ... 共焦点レンズ
- 15a, 15b, 15c, 15d ... 共焦点絞リ
- 16a, 16b, 16c, 16d ... 光検出器
- 20 ... レーザー光源
- 21 ... 光束 20
- 30 ... レンズ
- 31a, 31b, 31c ... ミラー
- 33a, 33b, 33c ... 光束
- 34a, 34b, 34c ... レンズ
- 35a, 35b, 35c ... プリズム
- 40a, 40b, 40c ... 光束

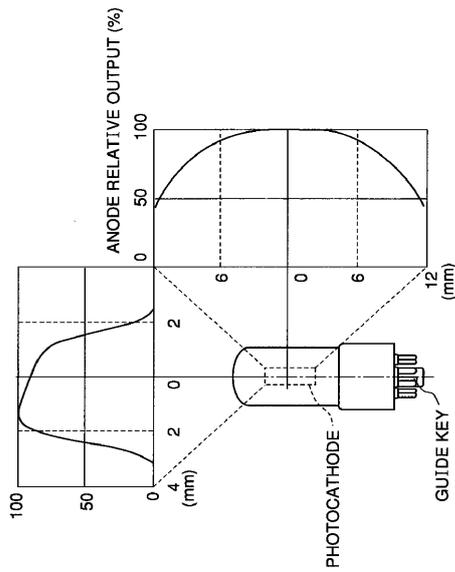
【 図 1 】



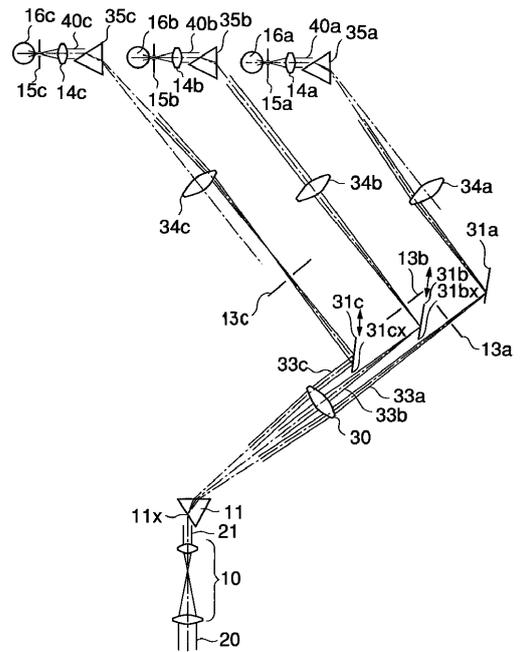
【 図 2 】



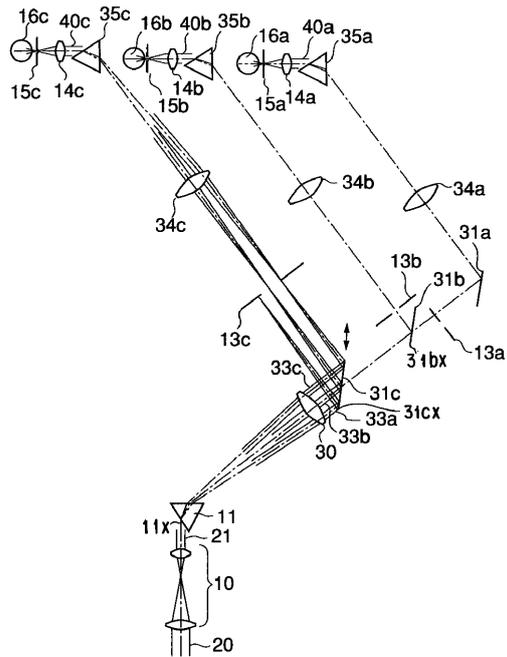
【 図 3 】



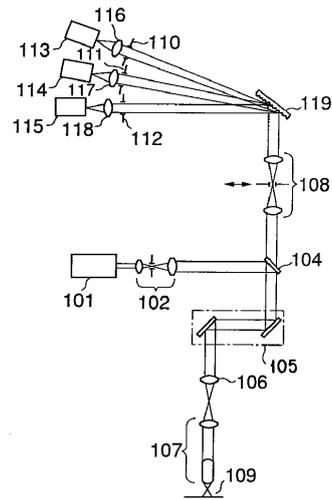
【 図 4 】



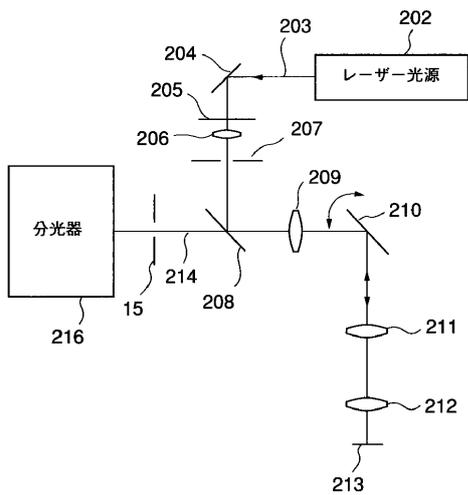
【図5】



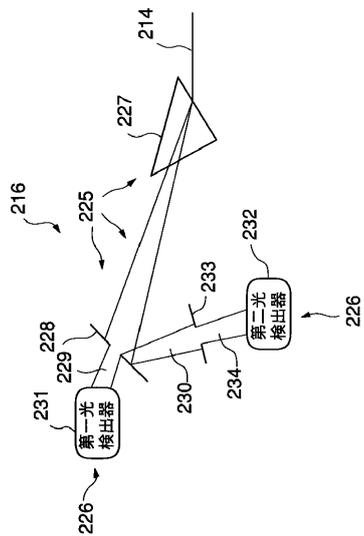
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

審査官 井上 信

- (56)参考文献 特開平 8 - 4 3 7 3 9 (J P , A)
特開平 6 - 2 1 4 1 6 2 (J P , A)
特開平 7 - 1 9 9 0 7 5 (J P , A)
特開平 1 0 - 2 0 6 7 4 5 (J P , A)

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