

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4512698号  
(P4512698)

(45) 発行日 平成22年7月28日(2010.7.28)

(24) 登録日 平成22年5月21日(2010.5.21)

(51) Int.Cl. F 1  
G 0 2 B 21/06 (2006.01) G 0 2 B 21/06

請求項の数 5 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2005-249191 (P2005-249191)	(73) 特許権者	503138134
(22) 出願日	平成17年8月30日(2005.8.30)		ナノフoton株式会社
(65) 公開番号	特開2007-65149 (P2007-65149A)		大阪府大阪市北区梅田1丁目1-3 26
(43) 公開日	平成19年3月15日(2007.3.15)		7号
審査請求日	平成18年3月20日(2006.3.20)	(74) 代理人	100103894
			弁理士 冢入 健
		(72) 発明者	大出 孝博
			兵庫県伊丹市安堂寺町4丁目117番地
		審査官	森内 正明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザ顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

レーザ光源と、

前記レーザ光源からのレーザ光に位相差を与える位相板と、

前記位相板を透過した光を試料に集光する対物レンズと、

前記試料から前記レーザ光の進行方向と反対方向に放射された第2高調波と前記試料で反射した基本波とを分離する分離手段と、

前記分離手段により基本波から分離された第2高調波を検出する光検出器とを備え、

前記位相板は、前記位相板の中心点から放射状に複数の領域に分割されており、

一の前記領域がレーザ光に与える位相差と、当該一の前記領域と対向する他の前記領域がレーザ光に与える位相差とは異なり、

前記試料から前記レーザ光の進行方向と同じ方向に放射された第2高調波と前記試料を透過した基本波とを分離する手段と、

前記光源から光の進行方向と同じ方向に放射された第2高調波を検出する光検出器とをさらに備え、

前記位相板が光路上に出し入れ可能に設けられているレーザ顕微鏡。

【請求項2】

レーザ光源と、

前記レーザ光源からのレーザ光を複数のビームに分割するマイクロレンズ・アレイ・ディスクと、

10

20

前記マイクロレンズ・アレイ・ディスクから出射された前記複数のビームの光路上に配置される第1のレンズと、

前記第1のレンズから出射された前記複数のビームの光路上に配置される第2のレンズと、

前記第1のレンズと前記第2のレンズとの間に出し入れ可能に配置され、前記第1のレンズから出射された前記複数のビームに位相差を与える位相板と、

前記位相板を透過した光を試料に集光する対物レンズと、

前記試料から前記レーザー光の進行方向と反対方向に放射された第2高調波と前記試料で反射した基本波とを分離する分離手段と、

前記分離手段により基本波から分離された第2高調波を検出する光検出器と、

前記試料から前記レーザー光の進行方向と同じ方向に放射された第2高調波と前記試料を透過した基本波とを分離する手段と、

前記光源から光の進行方向と同じ方向に放射された第2高調波を検出する光検出器と、を備え、

前記位相板は、前記位相板の中心点から放射状に複数の領域に分割されており、

一の前記領域がレーザー光に与える位相差と、当該一の前記領域と対向する他の前記領域がレーザー光に与える位相差とは異なるレーザー顕微鏡。

#### 【請求項3】

前記位相板は、前記光軸に対して対向する前記領域で前記レーザー光に180°の位相差を与えることを特徴とする請求項1又は2に記載のレーザー顕微鏡。

#### 【請求項4】

前記位相板は、前記光軸に対して対向する前記領域に光学軸が90°異なる1/2波長板を備えていることを特徴とする請求項1又は2に記載のレーザー顕微鏡。

#### 【請求項5】

前記位相板では、前記光軸に対して対向する前記領域において、レーザー光の電気ベクトルの振動方向が反対方向となる請求項3又は4に記載のレーザー顕微鏡。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明はレーザー顕微鏡に関し、特に詳しくは試料から発生される第2高調波を検出するレーザー顕微鏡に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

レーザー光を利用するレーザー顕微鏡は、その用途に応じて様々なタイプのものが開発されている。レーザー顕微鏡は、レーザーより出力されたレーザー光を試料上に集光し、試料による反射光、発光光などを受光することによって、試料の観察や検査などを行うことができる。

#### 【0003】

レーザー顕微鏡の一つの態様として、共焦点顕微鏡が知られている。共焦点顕微鏡は、優れた分解能や試料の3次元情報を取得することができるなどの点から、注目を集めている。このような共焦点顕微鏡の一つに、回転するピンホール基板を利用して照射光を試料上で走査する共焦点顕微鏡が知られている（例えば、特許文献1を参照）。光源からの光は回転する複数のピンホールが形成されたピンホール基板に入射する。ピンホールによって分割された光が試料上を走査する。ピンホールは、試料上での明暗むらを防止するため、基板上に螺旋配列に従って配置され、螺旋のトラックに沿って径方向及び周方向にピッチが等しくなるように配置される。

#### 【0004】

あるいは、ピンホールの配置密度が一定となるように、ピンホールが配置された、共焦点用光スキャナが知られている（例えば、特許文献2を参照）。ピンホールは、マイクロレンズを使用することができる。しかし、これらの配置に従ったピンホール基板は、明暗

10

20

30

40

50

むらを抑制し同時に試料上の照明の明るさを大きくする点において、十分な結果を得られない場合があった。また、このようなアレイ基板を効果的に設計する方法について、これまで十分な検討がなされていなかった。

【0005】

他のレーザ顕微鏡として、試料にレーザ光を照射することにより発生した第二高調波を利用して、試料の各種物理特性を計測する第二高調波顕微鏡が実用化されるようになってきている（非特許文献1）。この第二高調波顕微鏡を用いた計測は、レーザ光源から出力されたレーザ光を試料に焦点させるとともに、試料上を走査させ、試料内部から発せられた第二高調波を検出することによって実施する。第二高調波顕微鏡は、特に、医療やバイオテクノロジーの分野などにおける、細胞やたんぱく質レベルの構造もしくは機能の検出などに有効な手段として注目を集めている。

10

【0006】

第二高調波顕微鏡では、図9に示すような放射パターンにより試料から放出される第二高調波を検出している。第二高調波は入射光の進行方向と同じ方向に放出されている。なお、図9では矢印の方向が入射光の進行方向である。そして、試料の背面側に光検出器を配置して、試料を透過した第二高調波を検出している。

【0007】

しかしながら、従来の第二高調波顕微鏡では試料を透過した透過光を検出しているため、不透明な試料について観察することができない場合があった。さらに、生体などの厚みのある試料に対しての観察を行うことができない場合があった。

20

【特許文献1】特開2001-148625号公報

【特許文献2】特開平05-119262号公報

【非特許文献1】ナノフoton株式会社 SHG-11カタログ

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述のように従来の第二高調波顕微鏡では、第二高調波が入射光の進行方向と同じ方向に放射されるため、試料を透過した第二高調波しか検出することができなかった。

本発明はこのような問題点を鑑みてなされたものであり、入射光の進行方向と反対方向に放射される第二高調波を検出することができるレーザ顕微鏡を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の第一の態様にかかるレーザ顕微鏡は、レーザ光源（例えば、本発明の実施の形態におけるレーザ光源10）と、前記レーザ光源からのレーザ光に入射位置に応じた位相差を与える位相板（例えば、本発明の実施の形態における位相板12）と、前記位相板を透過した光を試料に集光する対物レンズ（例えば、本発明の実施の形態における対物レンズ16）と、前記試料から前記レーザ光の進行方向と反対方向に放射された第二高調波と前記試料で反射した基本波とを分離する手段（例えば、本発明の実施の形態における基本波カットフィルタ22）と、前記分離手段によって基本波から分離された第二高調波を検出する光検出器（例えば、本発明の実施の形態における光検出器19）とを備えるものである。これにより、レーザ光の進行方向と反対方向に放射される第二高調波を検出することができる。

40

【0010】

本発明の第二の態様にかかるレーザ顕微鏡は、上述のレーザ顕微鏡において、前記位相板が光軸に対して対向する領域で前記レーザ光に180°の位相差を与えることを特徴とするものである。これにより、後方に放射される第二高調波の光量を高くすることができる。

【0011】

本発明の第三の態様にかかるレーザ顕微鏡は、上述のレーザ顕微鏡において、前記位相

50

板が、光軸に対して対向する領域に光学軸が  $90^\circ$  異なる  $1/2$  波長板を備えていることを特徴とするものである。これにより、後方に放射される第2高調波の光量を高くすることができる。

【0012】

本発明の第四の態様にかかるレーザ顕微鏡は、上述のレーザ顕微鏡において、前記位相板では、前記光軸に対して対向する領域において、レーザ光の電気ベクトルの振動方向が反対方向となるものである。これにより、後方に放射される第2高調波の光量を高くすることができる。

【0013】

本発明の第五の態様にかかるレーザ顕微鏡は、上述のレーザ顕微鏡において、前記試料から前記レーザ光の進行方向と同じ方向に放射された第2高調波と前記試料を透過した基本波とを分離する手段（例えば、本発明の実施の形態における基本波カットフィルタ21）と、前記光源から光の進行方向と同じ方向に放射された第2高調波を検出する光検出器（例えば、本発明の実施の形態における光検出器18）とをさらに備え、前記位相板が光路上に出し入れ可能に設けられているものである。これにより前方及び後方に放射される第2高調波のそれぞれを検出することができる。

【発明の効果】

【0014】

入射光の進行方向と反対方向に放射される第2高調波を検出することができるレーザ顕微鏡を提供すること。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下に、本発明を適用可能な実施の形態が説明される。以下の説明は、本発明の実施形態を説明するものであり、本発明が以下の実施形態に限定されるものではない。説明の明確化のため、以下の記載は、適宜、省略及び簡略化がなされている。又、当業者であれば、以下の実施形態の各要素を、本発明の範囲において容易に変更、追加、変換することが可能であろう。尚、各図において同一の符号を付されたものは同様の要素を示しており、適宜、説明が省略される。

発明の実施の形態1 .

【0016】

本実施の形態にかかる第二高調波（SHG：Second Harmonic Generation）顕微鏡について図1を用いて説明する。図1は、本実施形態におけるSHG顕微鏡の概略を示す構成図である。SHG顕微鏡は、試料に所定波長の光を入射し、第二高調波発生（SHG）を用いた光学顕微鏡である。SHG顕微鏡は触媒反応表面、金属や半導体の微細構造など、様々な試料の観察に利用することができるが、特に、医療やバイオテクノロジーの分野などにおける、細胞やたんぱく質レベルの構造もしくは機能の検出などに有効な手段である。SHG光強度の像は分子の配向分布などを表し、非平衡な現象による分子濃度などのかたより、配向の分布のパターンなどが観察できる。生物体試料は非対称な生体分子から構成されており、そのSHG像は生物体内の特別な構造の分布を抽出観察するために有効である。多くの場合、第二高調波発光と共に、多光子励起蛍光が試料から生成される。本形態のSHG顕微鏡1は、試料が生成した第二高調波と共に、多光子励起蛍光を同時に観察することができる。多光子励起蛍光は、2光子以上の光子を同時に吸収することによる励起蛍光である。

【0017】

図1において、10はレーザ光源、11はビームエキスパンダ、12は位相板、13はビームスプリッタ、14はガルバノミラー、15はガルバノミラー、16は入射側に配置された対物レンズ、17は透過側に配置された対物レンズ、18は入射光と同じ方向に伝播する第2高調波を検出するための光検出器、19は入射光と反対方向に伝播する光検出器、20はレンズ、21は透過側の基本波カットフィルタ、22は反射側の基本波カットフィルタ、30は試料である。

## 【 0 0 1 8 】

図 1 に示す構成の S H G 顕微鏡では試料 3 0 で発生して前方に伝播する第 2 高調波が光検出器 1 8 で検出され、試料 3 0 で発生して後方に伝播する第 2 高調波が光検出器 1 9 で検出される。ここで前方とは入射光の伝播方向と同じ方向であり、後方とは入射光の伝播方向と反対方向である。

## 【 0 0 1 9 】

本形態のレーザ光源 1 0 としては、第 2 次高調波と多光子蛍光の発生が可能なレーザ装置が使用される。例えば、生物細胞の観察などにおいて、モード・ロック・チタン・サファイア・レーザを使用した赤外光パルスなどを使用することができる。レーザ光波長、レーザ光強度、発振態様、繰り返し周波数、パルス幅などのレーザ光の特性は、試料や観察方法によって適切なものが選択される。

10

## 【 0 0 2 0 】

ビームエキスパンダ 1 1 はレーザ光源 1 0 からの光のビーム径を拡大して出射する。ビームエキスパンダ 1 1 により拡大された光ビームは位相板 1 2 に入射する。試料 3 0 で発生し後方に伝播する第 2 高調波を検出するときは位相板 1 2 を光路上に配置する。試料 3 0 で発生し前方に伝播する第 2 高調波を検出するときは位相板 1 2 を光路上から取り除く。この位相板 1 2 については後述する。位相板 1 2 から出射した光はレンズ 2 0 a、2 0 b により屈折して、ビームスプリッタ 1 3 に入射する。ビームスプリッタ 1 3 に入射した光の一部はビームスプリッタ 1 3 をそのまま透過してガルバノミラー 1 4 に入射する。

## 【 0 0 2 1 】

ガルバノミラー 1 4 により反射された光はレンズ 2 0 c、2 0 d により屈折されてガルバノミラー 1 5 に入射する。ガルバノミラー 1 4 及びガルバノミラー 1 5 はビームを走査して、試料の全面の観察、撮像を可能にする。ガルバノミラー 1 5 により反射された光はレンズ 2 0 e、2 0 f により屈折され、入射側の対物レンズ 1 6 に入射する。対物レンズ 1 6 は入射したレーザ光を集光して、試料 3 0 に入射させる。

20

## 【 0 0 2 2 】

試料 3 0 は、入射光によって、入射光の 2 倍の周波数を有する第二高調波と、多光子励起蛍光とを発光する。典型的な多光子励起蛍光は 2 光子励起蛍光である。試料 3 0 から発光して前方に伝播する第 2 高調波及び多光子励起蛍光の内、試料 3 0 を透過した透過光は、透過側の対物レンズ 1 7 によって集められる。また、試料 3 0 をそのまま透過した基本波も透過側の対物レンズ 1 7 によって集光される。透過側の対物レンズ 1 7 は、試料 3 0 に関して、入射側の対物レンズ 1 6 と反対側に配置されている。試料 3 0 は、入射側の対物レンズ 1 6 と透過側の対物レンズ 1 7 の間に配置され、2 つの対物レンズの焦点は、試料上で実質的に一致することが好ましい。

30

## 【 0 0 2 3 】

対物レンズ 1 7 からの光は、レンズ 2 0 g、2 0 h により屈折され、基本波カットフィルタ 2 1 に入射する。基本波カットフィルタ 2 1 は基本波及び多光子励起蛍光から第 2 高調波を分離する。すなわち、対物レンズ 1 7 から基本波カットフィルタ 2 1 に入射した光のうち、第 2 高調波のみが基本波カットフィルタ 2 1 を透過する。基本波カットフィルタ 2 1 は例えば、レーザ光源 1 0 の出力光の波長域及び多光子励起蛍光の波長域を遮断するバンド・パス・フィルタもしくはローパス・フィルタなどによって構成することができる。あるいは光軸と傾斜して配置されたダイクロイックミラーであってもよい。この基本波カットフィルタ 2 1 を第 2 高調波の波長域及び基本波の波長域を遮断するバンド・パス・フィルタ等に変えることにより多光子励起蛍光を検出することができる。

40

## 【 0 0 2 4 】

基本波カットフィルタ 2 1 を透過した第 2 高調波は光検出器 1 8 に入射する。光検出器 1 8 に入射する光はレンズ 2 0 h 等によって集光されて、光検出器 1 8 の受光面に入射する。光検出器 1 8 は例えば、CCDカメラなどの二次元光センサである。光検出器 1 8 は微弱光である第 2 高調波を効果的に検出するため、イメージ・インテシファイアを備えることが望ましい。光検出器 1 8 は入射光を検出し、ビデオ信号に変換する。このビデオ信

50

号は画像処理を行う画像処理装置（図示せず）に入力され、ディスプレイ上に撮像された画像を表示する。

【0025】

一方、試料30から発生した第2高調波のうち、入射光の伝播方向と反対方向に放射された第2高調波は入射光と逆方向に伝播していく。すなわち、後方に放射された第2高調波は再度、対物レンズ16に入射して、レーザ光源10の方向に進行していく。この第2高調波は対物レンズ16、レンズ20f及びレンズ20eによって屈折され、ガルバノミラー15に入射する。ガルバノミラー15で反射された第2高調波はレンズ20d及びレンズ20cで屈折され、ガルバノミラー14に入射する。ガルバノミラー14で反射された第2高調波はビームスプリッタ13に入射される。ビームスプリッタ13は入射した光のうちの一部分を光検出器19の方向に反射させる。ビームスプリッタ13で反射した光はレンズ20i、20jにより屈折され基本波カットフィルタ22に入射する。基本波カットフィルタ22は第2高調波と同じ方向に伝播してきた基本波及び多光子励起蛍光から第2高調波のみを分離する。すなわち、対物レンズ16から基本波カットフィルタ22に入射した光のうち、第2高調波のみが基本波カットフィルタ22を透過する。基本波カットフィルタ22は透過側の基本波カットフィルタ21と同様のものを用いることができる。

10

【0026】

そして、基本波カットフィルタ21を透過した第2高調波は光検出器19に入射する。光検出器19に入射する光はレンズ20j等によって集光されて、光検出器19の受光面に入射する。光検出器19は例えば、CCDカメラなどの2次元光センサである。光検出器19は微弱光である第2高調波を効果的に検出するため、イメージ・インテシファイアを備えることが望ましい。光検出器19は入射光を検出し、ビデオ信号に変換する。このビデオ信号は画像処理を行う画像処理装置（図示せず）に入力され、ディスプレイ上に撮像された画像を表示する。

20

【0027】

次に位相板12について図2を用いて説明する。図2(a)は位相板12の構成を模式的に示す平面図であり、図2(b)は位相板12の構成を模式的に示す断面図である。位相板12は図2に示すよう円板状の構成をしている。そして、中心線よりも上の領域12aと下の領域12bで厚みが異なる。すなわち、位相板12は中心線を挟んで厚さの異なる円板である。この位相板12は光軸と垂直に配置されるため上の領域12aと下の領域12bのそれぞれは光軸に対して垂直に配置される。位相板12の中心は光軸と一致して配置される。この位相板12は例えば、レーザ光を透過する透明なガラス板によって構成される。

30

【0028】

位相板12では厚さの違いに基づいて入射光の位相がずれて出射される。ここでは上の領域12aと下の領域12bとでレーザ光の位相が180°ずれるようになっている。すなわち、位相板12の厚さの違いはレーザ光の半波長分の光学的な距離となるように構成されている。従って、位相板12を透過した光は空間的に位相のずれが生じ、上半分と下半分で位相が180°異なっている。すなわち、位相板12によってレーザ光には入射位置に応じた位相差が与えられる。なお、上述の説明では位相板12は厚みの異なる構成としたが、平らな透明板の一部に透明膜を設けて構成してもよい。

40

【0029】

このような位相板12を光路上に配置することにより、試料30で発生される第2高調波が後方に放射される。第2高調波が後方に放射されるメカニズムについて以下に説明する。まず、上述の位相板12を光路上に配置した場合の効果について図3を用いて説明する。図3は第2高調波が後方に放射される原理を説明するため、上記の位相板12から試料30に照射されるまでの光の伝播の様子を模式的に示す図である。なお、図3では位相板12と対物レンズ16との間の構成については省略して図示している。

【0030】

図2に示すような位相板12を光路上に配置すると、上の領域12aを透過した光と下

50

の領域 1 2 b を透過した光とで位相にずれが生じる。すなわち、上半分の領域と下半分の領域とで光の位相が  $180^\circ$  ずれる。レーザー光から直線偏光が出力されているとすると、電気ベクトルの直交する成分の位相は一致している。位相板 1 2 によって、上の領域 1 2 a と下の領域 1 2 b とでは、電気ベクトルの位相が  $180^\circ$  ずれることになる。すなわち上の領域 1 2 a と下の領域 1 2 b とで電気ベクトルの振動方向が反対方向になる。上の領域 1 2 a と下の領域 1 2 b とでは、偏光方向が反対方向となる。すなわち、上の領域 1 2 a を透過した光と下の領域 1 2 b を透過した光とは同じ直線上の直線偏光であるが、その振動の向きが反対となる。

【 0 0 3 1 】

図 3 の矢印はその位置における電気ベクトルの振動方向を二次元で模式的に示したものである。上述のように位相板 1 2 を透過する前のレーザー光は直線偏光であるので全て同じ方向に電気ベクトルが振動している。そして、位相板 1 2 を透過することによって、その位置に応じて電気ベクトルの振動方向が変化する。上の領域 1 2 a を透過した光の電気ベクトルは上方向に振動している。一方、下の領域 1 2 b を透過した光の電気ベクトルは下方向に振動している。なお、図 3 において、中心を透過する光の振動方向は説明のため上方向として図示している。

【 0 0 3 2 】

このような振動方向の光が対物レンズ 1 6 により集光された場合について説明する。上の領域 1 2 a を透過した光は対物レンズ 1 6 により下方向に傾くよう屈折される。従って、光の電気ベクトルの振動方向は図 3 に示すように右斜め上となる。中心を透過した光は対物レンズ 1 6 により屈折されないの、振動方向はそのまま上方向のままである。下の領域 1 2 b を透過した光は対物レンズ 1 6 により上方向に傾くよう屈折される。従って、光の電気ベクトルの振動方向は右斜め下となる。このように位置に応じて異なる振動方向を持つ光が試料上に集光される。

【 0 0 3 3 】

次に位相板 1 2 を透過した光が対物レンズ 1 6 により試料上に集光された状態について説明する。ここでは光の電気ベクトルの振動方向を光の進行方向に対して垂直な方向の成分と垂直な方向の成分に分けて考える。なお、図 3 において、光の進行方向に対して平行な方向を上下方向とし、光の進行方向に対して平行な方向を左右方向として説明する。

【 0 0 3 4 】

対物レンズ 1 6 を透過した後において、電気ベクトルの振動方向は上の領域 1 2 a では右斜め上で、下の領域 1 2 b では右斜め下であるため、上下方向の成分がそれぞれ反対である。これにより、試料上に集光された状態において、電気ベクトルの振動方向における上下方向の成分は、打ち消し合う。従って、光の進行方向と垂直方向の電気ベクトルの成分は略 0 となる。すなわち、試料上において、光の電気ベクトルは進行方向と垂直な方向に振動しなくなる。

【 0 0 3 5 】

一方、電気ベクトルの振動方向は上の領域 1 2 a では右斜め上で、下の領域 1 2 b では右斜め下であるため、左右方向の成分が同じ右方向である。これにより、電気ベクトルの左右方向の成分については、上の領域 1 2 a と下の領域 1 2 b とで強め合う。従って、光の進行方向と平行方向の電気ベクトルの成分は右方向に強調される。すなわち、光の電気ベクトルは進行方向と平行な方向に振動していることになる。このように位相板 1 2 によって位相がずれたレーザー光を対物レンズ 1 6 で集光することによって、電気ベクトルが進行方向と平行な方向に振動した状態で、光を試料 3 0 に照射することができる。

【 0 0 3 6 】

次に、電気ベクトルが進行方向と平行な方向に振動した状態で、光を試料 3 0 に照射することによって、後方に第 2 高調波が発生する原理について図 4 及び図 9 を用いて説明する。図 4 は電気ベクトルが進行方向と平行な方向に振動した状態で、光を試料 3 0 に照射したときの、第 2 高調波の放射パターンを模式的に示す図である。図 9 は電気ベクトルが進行方向と垂直な方向に振動した状態で、光を試料 3 0 に照射したときの、第 2 高調波の

10

20

30

40

50

放射パターンを模式的に示す図である。すなわち、図4は位相板12が配置された本実施の形態にかかるSHG顕微鏡における第2高調波の放射パターンを示しており、図9は位相板12が配置されていない従来のSHG顕微鏡における第2高調波の放射パターンを示している。

#### 【0037】

まず、位相板12が配置されていないSHG顕微鏡における第2高調波の放射パターンについて図9を用いて説明する。位相板12が配置されていない状態では、試料30に照射される光の電気ベクトルは進行方向と垂直な方向に振動している。すなわち、位相板12が配置されていない場合、光が対物レンズ16で集光されても、進行方向と平行な方向な成分は打ち消し合い略0となる。進行方向と垂直な方向に振動している光が照射されると分極した分子が上下方向に振動する。これにより、図9に示すような放射パターン40となり、前方に第2高調波が発生する。前方に発生された第2高調波は光軸に対して広がった放射パターン40となる。すなわち、広がりを持った第2高調波が入射方向と同じ方向に発生する。

10

#### 【0038】

一方、位相板12が配置された本実施の形態にかかるSHG顕微鏡における第2高調波の放射パターンについて説明する。本実施の形態では、位相板12が配置されているため、試料30に照射される光の電気ベクトルは進行方向と平行な方向に振動している。進行方向と平行な方向に振動している光が照射されると分極した分子が左右方向に振動する。すなわち、電気ベクトルの振動方向に応じて、分極された分子の振動方向が異なるものとなり、図9に示す放射パターン40が90°傾いた放射パターンになる。進行方向と垂直な方向に広がった放射パターン40となり、図4に示すように後方に第2高調波が発生する。すなわち、広がりを持った第2高調波が入射方向と同じ方向に発生する。

20

#### 【0039】

ここで後方に放射される第2高調波の光量を高くするため、開口数の高い対物レンズ16を用いることが好ましい。これにより、対物レンズ16によって屈折される角度が大きくなり、進行方向と平行方向に振動する成分を大きくすることができる。例えば、図3に示すように対物レンズ16で集光される光の角度を  $\theta$  とした場合、 $\sin \theta = 0.9 \sim 0.95$  となる対物レンズ16を用いている。これにより、後方に放射される第2高調波の光量を十分なものとしてすることができる。また、第2高調波の光量を光検出器19により検出可能にするには、 $\sin \theta = 0.5$  とすることが好ましい。すなわち、 $\theta = 30^\circ$  とすることにより、第2高調波の光量を光検出器19により検出可能にすることができる。なお、上述の  $\theta$  の値は、例示的な値であり、レーザ光源の光量、光学系や光検出器等の性能に応じて変化するものである。

30

#### 【0040】

このように入射光の進行方向と反対方向に放出された第2高調波は、対物レンズ16等を介して光検出器19に入射される。そして、後方に放射された第2高調波の画像が光検出器19により撮像される。これにより、半導体等の不透明な試料や生体等の厚みのある試料に対してSHG光像を容易に撮像することができ、SHG顕微鏡の利用分野を拡大することができるようになる。

40

#### 【0041】

なお、位相板12は図2に示す構成で上の領域12aと下の領域12bとでレーザ光に位相差を与えたが、これ以外の構成でも上の領域12aと下の領域12bとでレーザ光に位相差を与えることができる。これについて図5を用いて説明する。図5は図2に示す位相板12とは別の構成で位相差を与える位相板12の構成を示す平面図である。図5に示す位相板12は円板状に設けられている。2分割された上の領域12aには図中の矢印方向の光学軸を持つ1/2波長板が設けられている。下の領域12bには図中の矢印方向の光学軸を持つ1/2波長板が設けられている。すなわち、上の領域12aと下の領域12bとでは1/2波長板の光学軸が90°異なる。図5に示す構成では、上の領域12aと下の領域12bとで光学軸が直交するよう、半円状の2枚の1/2波長板が接合されてい

50

る。

【0042】

図5に示す構成の位相板12も同様に光軸に対して垂直に配置される。また、光軸と位相板12の中心点が一致するように配置される。1/2波長板は入射光の偏向面に対して1/2波長板の光学軸が角度 $\theta$ であるとき、出射光の偏光面を $180^\circ - 2\theta$ だけ回転させる。1/2波長板を角度 $\theta$ だけ回転させると、出射光の偏向面は $2\theta$ だけ回転する。従って、光学軸が $90^\circ$ 異なる上の領域12aと下の領域12bでは出射光の偏光面が $180^\circ$ ずれる。すなわち、上の領域12aと下の領域12bでは電気ベクトルの振動方向が反対になる。これにより、図2に示す位相板12と同様の効果を得ることができる。すなわち、上の領域12aと下の領域12bとで電気ベクトルの振動方向を逆方向にすることができる。よって、レーザー光に入射位置に応じた位相差を与えることができる。そして、この位相板12を透過した光が対物レンズ16で集光されることによって、電気ベクトルが進行方向と平行な方向に振動する。

10

【0043】

このように図5に示す構成の位相板12を用いることによって、入射光の進行方向と反対方向に第2高調波が放射される。そして、後方に放射された第2高調波の画像が光検出器19により撮像される。これにより、半導体等の不透明な試料や生体等の厚みのある試料に対してSHG光像を容易に撮像することができ、SHG顕微鏡の利用分野を拡大することができるようになる。

【0044】

図2及び図5に示された位相板12では2分割された領域で位相差を与えていたが、これ以外の構成の位相板12を用いることが可能である。例えば、図6に示す4分割された領域で位相差を与える位相板12を用いることも可能である。図6に示す円板状の位相板12では、4分割された領域のそれぞれに異なる光学軸を持つ1/2波長板が配置される。すなわち、 $90^\circ$ の扇状の1/2波長板が4枚接合され位相板12が構成される。4分割された上の領域12aと下の領域12bではそれぞれ光学軸が $90^\circ$ ずれている。また、4分割された左の領域12cと右の領域12dではそれぞれ光学軸が $90^\circ$ ずれている。すなわち、中心点を挟んで対向する位置の1/2波長板の光学軸は $90^\circ$ ずれている。

20

【0045】

このような構成の位相板12を用いることによって、対向する領域では電気ベクトルの振動方向が $180^\circ$ ずれる。すなわち、上の領域12aを通過した光と下の領域12bを通過した光で電気ベクトルの振動方向が反対になる。さらに、左の領域12cを通過した光と右の領域12dを通過し光で電気ベクトルの振動方向が反対になる。この位相板12を透過した光が対物レンズで集光されることによって、試料上で入射光の電気ベクトルが進行方向と平行な方向に振動する。これにより、入射光の進行方向と反対方向に第2高調波が放射される。そして、後方に放射された第2高調波の画像が光検出器19により撮像される。これにより、半導体等の不透明な試料や生体等の厚みのある試料に対してSHG光像を撮像することができ、SHG顕微鏡の利用分野を拡大することができるようになる。上述のように4分割の位相板12を用いることによって図5で示した2分割の位相板12よりも電気ベクトルの進行方向と平行方向に振動する成分を大きくすることができる。

30

40

【0046】

なお、図2、図5及び図6では2分割又は4分割の位相板12を用いたが、位相板12の構成はこれに限るものではない。例えば、8分割や16分割等の複수에分割された位相板12を用いることも可能である。例えば、複数の扇状の1/2波長板を円形になるよう配置することにより、対向する領域に対して位相差を与えることができる。この場合、分割数が多いほど、進行方向に平行な振動成分が大きくなる。さらに、中心に対して対向する領域で1/2波長板の光学軸を $90^\circ$ ずらすことにより、電気ベクトルの振動方向を反対にすることができる。これにより、入射光の進行方向と平行方向に振動する成分を大きくすることができ、後方に放射される第2高調波の光量を高くすることができる。なお、試料30に照射される光は十分に入射方向と平行に振動する成分があれば、入射方向と垂

50

直に振動する成分を持っていてもよい。

【0047】

もちろん、位相板12は上記の構成にかぎらず、レーザ光に入射位置に応じた位相差を与え、電気ベクトルの位相をずらすことのできるものであればよい。例えば、液晶光学素子を用いることにより、入射位置に応じて電気ベクトルの位相をずらすことができる。そして、電気ベクトルの位相がずらされた光を対物レンズで集光することにより、入射光の電気ベクトルが進行方向と平行方向に振動する成分を持つようになる。これにより、入射光の進行方向と反対方向に第2高調波を放射させることができる。

【0048】

前方に放射された第2高調波を検出する時は、位相板12を光路上から除去すればよい。すなわち、位相板12を光路上に出し入れすることにより前方又は後方に放射された第2高調波をそれぞれ検出することが可能になる。

発明の実施の形態2 .

【0049】

本実施の形態にかかるSHG顕微鏡について図7を用いて説明する。本実施の形態では走査方法が実施の形態1と異なるものである。実施の形態1で示したSHG顕微鏡ではガルバノミラーによりレーザ光を走査していたが本実施の形態ではXYステージによりレーザ光を走査している。実施の形態1と同様の構成については説明を省略する。

【0050】

本実施の形態ではXYステージ(図示せず)の上に試料を載置している。そして、XYステージを走査して、試料の全面の観察、撮像を可能にする。このようなSHG顕微鏡でも実施の形態1で示した位相板を用いることにより、実施の形態1と同様に後方に放射する第2高調波を検出することができる。これにより実施の形態1と同様の効果を得ることができる。また、本実施の形態ではXYステージにより試料を走査しているため、光学系を簡略化できる。

発明の実施の形態3 .

【0051】

本実施の形態にかかるSHG顕微鏡について図8を用いて説明する。本実施の形態では走査方法が実施の形態1と異なるものである。実施の形態1で示したSHG顕微鏡ではガルバノミラーによりレーザ光を走査していたが本実施の形態ではマイクロレンズ・アレイ・ディスク25によりレーザ光を走査している。実施の形態1と同様の構成については説明を省略する。

【0052】

本実施の形態ではビームエキスパンダ11とレンズ20aとの間にマイクロレンズ・アレイ・ディスクを配置している。そして、レンズ20aとレンズ20bとの間に位相板12を配置している。マイクロレンズ・アレイ・ディスク25に入射したレーザ光は複数のビームに分割されてレンズ20aに入射する。対物レンズ16は入射したマルチビームを試料状に集光する。マイクロレンズ・アレイ・ディスク25によって分割されたマルチビームは、対物レンズ16の結像作用によって、試料30上に多焦点を形成する。このマイクロレンズ・アレイ・ディスク25の回転により、試料上を走査する。このようなSHG顕微鏡でも実施の形態1で示した位相板を用いることにより、実施の形態1と同様に後方に放射する第2高調波を検出することができる。これにより実施の形態1と同様の効果を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】本発明の実施の形態1にかかるSHG顕微鏡の構成を示す図である。

【図2】本実施の形態1にかかるSHG顕微鏡において、位相板の構成を示す図である。

【図3】位相板によって変化する電気ベクトルの振動方向の様子を模式的に示す図である。

【図4】本実施の形態にかかるSHG顕微鏡における第2高調波の放射パターンを示す図

10

20

30

40

50

である。

【図5】本実施の形態1にかかるSHG顕微鏡において、位相板の別の構成を示す図である。

【図6】本実施の形態1にかかるSHG顕微鏡において、位相板の別の構成を示す図である。

【図7】本発明の実施の形態2にかかるSHG顕微鏡の構成を示す図である。

【図8】本発明の実施の形態3にかかるSHG顕微鏡の構成を示す図である。

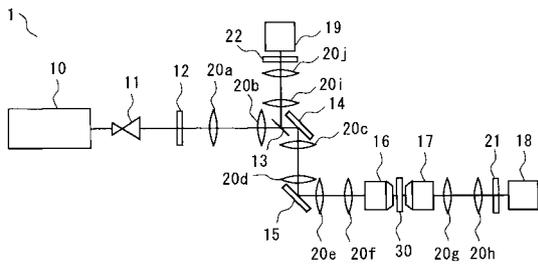
【図9】従来のSHG顕微鏡における第2高調波の放射パターンを示す図である。

【符号の説明】

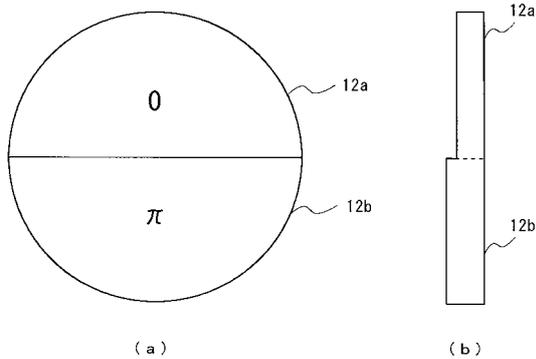
【0054】

- 1 SHG顕微鏡、10 レーザ光源、11 ビームエキスパンダ、12 位相板、
- 13 ビームスプリッタ、14 ガルバノミラー、15 ガルバノミラー
- 16 対物レンズ、17 対物レンズ、18 光検出器、19 光検出器、
- 20 レンズ、21 基本波カットフィルタ、22 基本波カットフィルタ、
- 25 マイクロレンズアレイ、30 試料、40 放射パターン

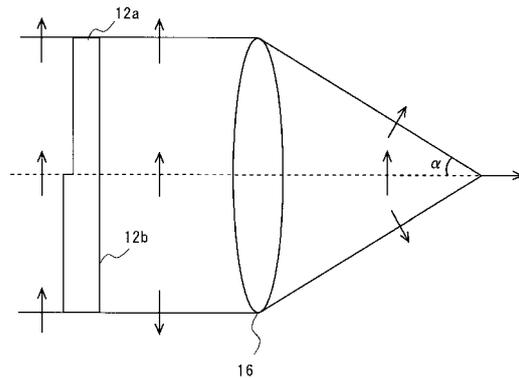
【図1】



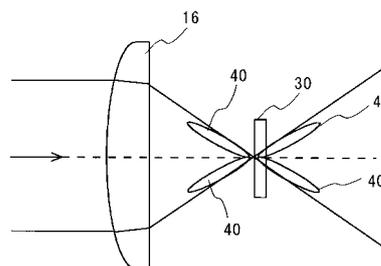
【図2】



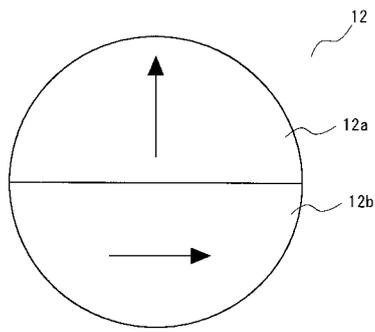
【図3】



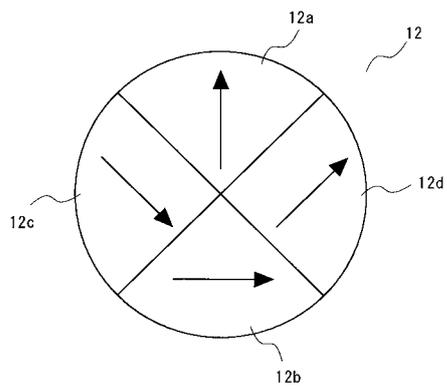
【図4】



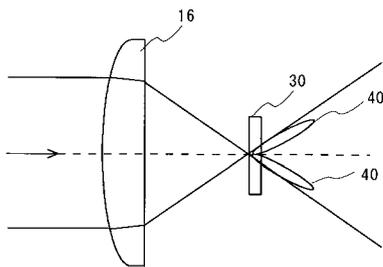
【図5】



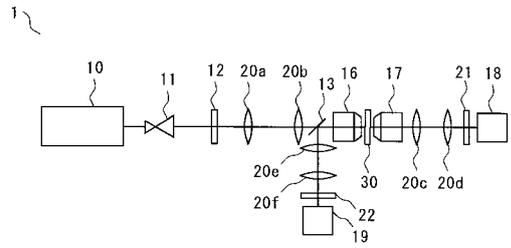
【図6】



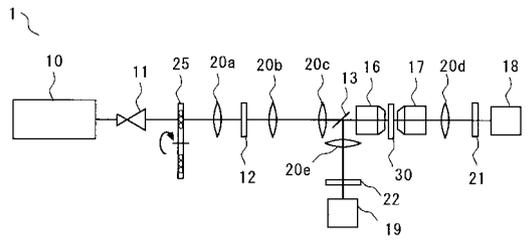
【図9】



【図7】



【図8】



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2006-313273(JP,A)  
特開平07-320295(JP,A)  
特開2001-272343(JP,A)  
特開2004-191891(JP,A)  
特開2003-057554(JP,A)  
特開2000-310799(JP,A)  
米国特許出願公開第2005/0195480(US,A1)  
米国特許出願公開第2005/0140982(US,A1)  
米国特許出願公開第2006/0238865(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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