

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4605447号
(P4605447)

(45) 発行日 平成23年1月5日(2011.1.5)

(24) 登録日 平成22年10月15日(2010.10.15)

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

請求項の数 6 (全 15 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2004-271503 (P2004-271503)</p> <p>(22) 出願日 平成16年9月17日 (2004. 9. 17)</p> <p>(65) 公開番号 特開2006-84960 (P2006-84960A)</p> <p>(43) 公開日 平成18年3月30日 (2006. 3. 30)</p> <p>審査請求日 平成19年4月13日 (2007. 4. 13)</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16年度新エネルギー・産業技術総合開発機構細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発/複数種生体分子の細胞内識別技術の開発、細胞内の複数種生体分子同時解析技術の開発、総合調査研究委託研究、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</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>審査官 下村 一石</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3次元共焦点顕微鏡システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

顕微鏡を介して試料のスライス像を共焦点画像として取得する共焦点スキャナと、
前記共焦点画像の画像データを出力するビデオカメラと、
前記顕微鏡の対物レンズの焦点位置を光軸方向に移動するアクチュエータと、
このアクチュエータを介して前記対物レンズを光軸方向に走査するための走査波形信号を発生する制御部と、

前記ビデオカメラで取得した画像データに基づき前記試料の3次元画像を生成する画像処理部と、

を備えた3次元共焦点顕微鏡システムであって、

前記顕微鏡に接続され、前記試料に刺激を与えるレーザ光を出力するレーザ光出力手段を有し、

前記対物レンズを走査して前記試料に対して光軸方向に刺激を与え、

前記対物レンズの一方向の走査で刺激を与え、これに続いて他方向の走査で前記共焦点画像を取得することを特徴とする3次元共焦点顕微鏡システム。

【請求項2】

前記試料に刺激を与えるレーザ光のスポット径を調整する可変絞り手段を備えたことを特徴とする請求項1に記載の3次元共焦点顕微鏡システム。

【請求項3】

前記試料に刺激を与えるレーザ光を2次元に走査させる走査手段を有することを特徴と

する請求項 1 または請求項 2 に記載の 3 次元共焦点顕微鏡システム。

【請求項 4】

前記レーザ光出力手段は、前記試料に刺激を与えるレーザ光と、このレーザ光が前記試料へ照射される位置を示すためのレーザ光とを合波して出力することを特徴とする請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の 3 次元共焦点顕微鏡システム。

【請求項 5】

前記試料を刺激する際の走査波形と前記試料を観察する際の走査波形をそれぞれ任意に設定することを特徴とする請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の 3 次元共焦点顕微鏡システム。

【請求項 6】

前記 3 次元共焦点顕微鏡システムは、フォトアクチベーションまたは蛍光褪色に用いられることを特徴とする請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の 3 次元共焦点顕微鏡システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、3次元共焦点顕微鏡システムに関し、詳しくは、観察試料に対し光刺激を行うためのレーザ光を照射する機能を備えた3次元共焦点顕微鏡システムに関するものである。

【背景技術】

【0002】

共焦点顕微鏡は、試料を薄切片にすることなくスライス画像が得られ、そのスライス画像から試料の正確な3次元立体像を構築できるので、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の表面観察などに使用されている（例えば、特許文献1参照）。

【0003】

図7は特許文献1に記載の共焦点顕微鏡システムの構成図である。ビデオレートカメラ1、共焦点スキャナ2、顕微鏡3、アクチュエータ4および対物レンズ5は、同じ光軸上に配置されている。共焦点スキャナ2は、多数のピンホールを持つニポウディスクと、それに対応するマイクロレンズアレイを有するもので、シンプルな光学系から成るニポウディスク方式を採用したコンパクトなアドオンタイプである。

【0004】

この共焦点スキャナ2は顕微鏡3のカメラポートに取り付けられる。共焦点顕微鏡は、レーザ光を使用して、対物レンズ5、アクチュエータ4および顕微鏡3を経由して、試料の像を共焦点スキャナ2に入力する。共焦点スキャナ2は、試料の共焦点画像を得て、ビデオレートカメラ1に入力する。

【0005】

図8は、図7の共焦点顕微鏡システムが取り扱う各種信号のタイムチャートである。ビデオレートカメラ1は、共焦点画像をビデオ信号101に変換し、共焦点スキャナ2、同期インターフェイスボックス9の信号入力端子および画像処理装置6の画像入力端子にビデオ信号101を入力する。共焦点スキャナ2は、ビデオ信号101に同期して、ニポウディスクの回転同期制御を行う。

【0006】

画像処理装置6にビデオテープデッキを採用する場合、ビデオテープデッキは、画像入力端子から入力されるビデオ信号101と、音声入力端子から入力される開始信号103を長時間用のビデオテープに同時に記録する。ビデオテープには、リアルタイムに変化する共焦点画像と対物レンズ5の焦点位置の走査開始のタイミングが同時に記録される。

【0007】

同期インターフェイスボックス9は、ビデオ信号101の偶数側パルス列または奇数側パルス列の何れか一方を抽出し、内部A信号を作成する。任意波形発生器7は、Hレベル

10

20

30

40

50

のパルス信号であるトリガ信号 102 を発生し、同期インターフェイスボックス 9 のトリガ入力端子に入力して、焦点面の走査の開始タイミングに利用する。

【0008】

同期インターフェイスボックス 9 は、トリガ信号 102 の立下りに同期して、内部 B 信号を作成する。内部 B 信号は、H レベルのパルス幅時間が 35 msec 程度であり、ビデオレートカメラ 1 のビデオレートの時間に比して若干長いパルス信号である。同期インターフェイスボックス 9 は、内部 A 信号の反転信号と内部 B 信号とを論理積演算することにより、開始信号 103 を発生し、画像処理装置 6 および任意波形発生器 7 の同期入力端子に入力する。

【0009】

画像処理装置 6 は、同期入力端子からの開始信号 103 の立上りに同期して、ビデオ信号 101 を画像データに変換し記録するキャプチャを開始する。同期インターフェイスボックス 9 は、信号入力端子からのビデオ信号 101 に基づいて、共焦点スキャナ 2 によるニポウディスクの回転同期制御、画像処理装置 6 によるビデオ信号の取得の開始タイミング、および光学制御系による対物レンズの焦点位置の走査開始のタイミングを全て同期させる。

【0010】

任意波形発生器 7 は、開始信号 103 の立上りに同期して、光学制御系による対物レンズ 5 の焦点位置の走査を開始する。任意波形発生器 7 は、走査信号 104 を発生し、コントローラ 8 に入力する。走査信号 104 は、L レベルから H レベルまで一定時間で直線的に増加するノコギリ波状の信号である。コントローラ 8 は、走査信号 104 をアクチュエータ 4 に入力する。アクチュエータ信号 105 は実際のアクチュエータの位置信号であり、伸びきってから一気に原点に戻ったあとにオーバーシュートがあり、この間は不感帯となる。

【0011】

アクチュエータ 4 は、顕微鏡 3 の対物レンズレボルバーと対物レンズ 5 との間に取り付けられ、ピエゾ駆動により走査信号 104 のレベルに比例して画像の焦点方向の長さが変化し、対物レンズ 5 の焦点位置を制御する。共焦点顕微鏡は、走査信号 104 に基づいて、焦点面を走査することにより、試料のスライス画像を取得する。

【0012】

このような構成によれば、ニポウディスクの回転同期制御、画像処理装置によるビデオ信号の取得の開始タイミングおよび光学制御系によるレンズの焦点位置の走査開始のタイミングが、すべてビデオ信号に同期することにより、共焦点画像の位置精度が向上し、複数のスライス画像を取得する際に個々の取得時間のバラツキがなくなるので、信頼性の高いスライス画像が得られる。

【0013】

図 9 は、従来の共焦点顕微鏡の一例を示した構成図である。

図 9 において、共焦点スキャナ 110 は、顕微鏡 120 のポート 122 に接続してあり、レーザ光 111 は、マイクロレンズアレイディスク 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、ピンホールアレイディスク (以下、ニポウディスクという。) 114 の個々のピンホール 116 を通過し、顕微鏡 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。

【0014】

試料 140 から出た蛍光信号は、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蛍光信号は、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 に結像されるように共焦点スキャナ 110 より出射される。このような装置では、図示しないモータでニポウディスク 114 を一定速度で回転させており、この回転によるピンホール 116 の移動により試料 140 への集光点を走査している。

【0015】

10

20

30

40

50

ニポウディスク 114 のピンボールが並んでいる平面と、試料 140 の被観察平面と、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してあるので、イメージセンサ 131 上には試料 140 の光学的断面像、即ち共焦点画像が結像される（例えば、特許文献 2 参照。）。

また、上述のニポウディスク方式の共焦点顕微鏡の他にガルバノミラーを用いて試料への集光点を走査し、共焦点画像を取得するものもある（例えば、特許文献 3 参照。）。

【0016】

【特許文献 1】特開 2002 - 72102 号公報

【特許文献 2】特開平 5 - 60980 号公報

【特許文献 3】特開平 5 - 210051 号公報

10

【0017】

このような共焦点顕微鏡を用いた画像計測では、細胞などの試料に対して光刺激を行い、時間経過に対する状態変化（フォトアクチベーションや F R A P (fluorescence recovery after photobleaching) など) を観察したいという要求がある。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測定用レーザー光以外の第 2 のレーザーのスポット光を照射して、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。

また、F R A P (蛍光褪色法) とは、蛍光タンパクを発現した細胞の蛍光を、第 2 のレーザー光の照射により部分的に褪色させて、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。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

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はない。

また、ガルバノミラー方式の共焦点顕微鏡では 2 次元走査のためのガルバノミラーの制御に時間がかかり、光刺激や蛍光褪色などの高速な反応についてはリアルタイムでの画像計測が困難である。

さらに、3 次元構造を持つ試料に対しては、光刺激が届かない、あるいは不十分であることが考えられる。それにより、光刺激後の試料観察の結果に正確さを欠くことになるという問題があった。

30

【0019】

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のための第 2 のレーザー光を照射する機能を付加した共焦点顕微鏡を用いて、3 次元の画像計測を行うことにより、光刺激後の試料の観察を 3 次元的に正確に行える 3 次元共焦点顕微鏡システム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】

【0020】

本発明は次の通りの構成になった共焦点顕微鏡である。

40

【0021】

(1) 顕微鏡を介して試料のスライス像を共焦点画像として取得する共焦点スキャナと、前記共焦点画像の画像データを出力するビデオカメラと、前記顕微鏡の対物レンズの焦点位置を光軸方向に移動するアクチュエータと、このアクチュエータを介して前記対物レンズを光軸方向に走査するための走査波形信号を発生する制御部と、

前記ビデオカメラで取得した画像データに基づき前記試料の 3 次元画像を生成する画像処理部と、

を備えた 3 次元共焦点顕微鏡システムであって、

前記顕微鏡に接続され、前記試料に刺激を与えるレーザー光を出力するレーザー光出力手段

50

を有し、

前記対物レンズを走査して前記試料に対して光軸方向に刺激を与え、

前記対物レンズの一方向の走査で刺激を与え、これに続いて他方向の走査で前記共焦点画像を取得することを特徴とする3次元共焦点顕微鏡システム。

【0022】

(2) 前記試料に刺激を与えるレーザ光のスポット径を調整する可変絞り手段を備えたことを特徴とする(1)に記載の3次元共焦点顕微鏡システム。

【0023】

(3) 前記試料に刺激を与えるレーザ光を2次元に走査させる走査手段を有することを特徴とする(1)または(2)に記載の3次元共焦点顕微鏡システム。

10

【0024】

(4) 前記レーザ光出力手段は、前記試料に刺激を与えるレーザ光と、このレーザ光が前記試料へ照射される位置を示すためのレーザ光とを合波して出力することを特徴とする(1)から(3)のいずれかに記載の3次元共焦点顕微鏡システム。

【0026】

(5) 前記試料を刺激する際の走査波形と前記試料を観察する際の走査波形をそれぞれ任意に設定することを特徴とする(1)から(4)のいずれかに記載の3次元共焦点顕微鏡システム。

20

【0027】

(6) 前記3次元共焦点顕微鏡システムは、フォトアクチベーションまたは蛍光褪色に用いられることを特徴とする(1)から(5)のいずれかに記載の3次元共焦点顕微鏡システム。

【発明の効果】

【0028】

本発明によれば、以下のような効果がある。

【0029】

請求項1および請求項6に記載の発明によれば、ニポウディスク方式の共焦点顕微鏡に光刺激用のレーザ光を照射する機能を備えたことによって、フォトアクチベーションやFRAPなどが可能となる。

30

また、蛍光観察、すなわち画像計測はニポウディスク式共焦点スキャナで行うことで高速性(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る高速反応をリアルタイムで観察することができる。

さらに、このような共焦点顕微鏡を用いて、3次元の画像計測を行うことにより、光刺激後の試料の観察を3次元的に正確に行える共焦点顕微鏡を実現することができる。

【0030】

請求項2に記載の発明によれば、可変絞り手段を設けて、光刺激用レーザ光の照射NA(開口数)を変えることにより、光刺激のスポット径を可変にし、光刺激する範囲の大きさを換えられるようになる。

40

【0031】

請求項3に記載の発明によれば、光刺激用のレーザ光の2次元スキャンにより、試料の形状に合わせた光刺激を可能にする。

【0032】

請求項4に記載の発明によれば、光刺激用のレーザ光と刺激を与えている位置を示すためのレーザ光とを合波して試料に照射することにより、光刺激用のレーザ光が紫外光であっても位置表示用のレーザ光により励起された蛍光波長が可視光であるため、光刺激を行うポイントが目視可能となる。

50

【 0 0 3 3 】

請求項1に記載の発明によれば、例えば、対物レンズ駆動の上り（焦点位置を試料の下から上に移動させる）で光刺激を行い、対物レンズ駆動の下り（焦点位置を試料の上から下に移動させる）で画像計測を行うことにより、光刺激から画像計測までの時間を短縮できる。

【 0 0 3 4 】

請求項5に記載の発明によれば、例えば、対物レンズ駆動の上りを直線的に走査して光刺激を行い、対物レンズ駆動の下りは、ステップ波形で走査するような、異なる波形を組み合わせるにより、光刺激や画像計測に適した走査波形により試料の観測を行うことができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 5 】

以下図面を用いて本発明を詳細に説明する。図1は本発明に係る3次元共焦点顕微鏡システムの一実施例を示す構成図である。前出の図と同様の構成要素には同様の符号を付けてその部分の説明は省略する。

【 0 0 3 6 】

図1において、共焦点スキャナ2aは、従来技術で説明したものと同様のニポウディスク方式であり、多数のピンホールを持つニポウディスクと、それに対応するマイクロレンズアレイを有する。

20

【 0 0 3 7 】

この共焦点スキャナ2aは顕微鏡（蛍光顕微鏡）3aの第1のポート24（カメラポート）に光路22を介して取り付けられ共焦点顕微鏡が構成される。共焦点顕微鏡は、レーザー光を使用して、対物レンズ5a、アクチュエータ4aおよび蛍光顕微鏡3aを経由して、試料20の蛍光像を共焦点スキャナ2aに入力する。共焦点スキャナ2aは、試料20の共焦点画像を得て、光路23を介してその共焦点画像をカメラ1aに入力する。カメラ1aは、共焦点画像を撮像し画像データを取得する。カメラ1a、共焦点スキャナ2aおよび蛍光顕微鏡3aは支持台21に設置されている。

【 0 0 3 8 】

画像計測レーザー光源30は、ファイバ31を介して共焦点スキャナ2aに試料20の共焦点画像を得るための蛍光励起を行う波長1のレーザー光を供給する。光刺激レーザー光源32は、蛍光顕微鏡3aの第2のポート25にファイバ33を介して取り付けられ、光刺激を行う波長2のレーザー光を供給する。試料20は観察対象の細胞などであり、ステージ26に固定される。ステージ26はステージ支持部27に取り付けられている。

30

【 0 0 3 9 】

同期信号制御器10は、波形発生器7aの2CHから出力される垂直同期信号を受けて、これを基に各種のトリガ信号を生成する。

波形発生器7aは、同期信号制御器10からの走査波形発生トリガ信号を受信すると、あらかじめパーソナルコンピュータ28（以下PC28という。）の波形計算部11から送られ記憶した走査波形を1CHから発生して、アクチュエータドライバ12へ送る。

40

【 0 0 4 0 】

波形計算部11は、試料20を観察する際の対物レンズ5aの走査周期と光軸方向の走査距離から、走査波形を計算によって求め、それを走査波形データとして波形発生器7aに出力する。

アクチュエータドライバ12は、波形発生器7aから出力される走査波形信号に基づいて、アクチュエータ4aを駆動するための駆動信号を発生する。

このアクチュエータ4aを介して対物レンズ5aを光軸方向に走査するための走査波形信号を発生する部分が制御部である。

【 0 0 4 1 】

50

アクチュエータ 4 a は、蛍光顕微鏡 3 a の対物レンズレボルバーと対物レンズ 5 a との間に取り付けられ、ピエゾ駆動により走査信号のレベルに比例して画像の焦点方向の長さが変化し、対物レンズ 5 a の焦点位置を制御する。つまり、波形発生器 7 a の出力波形に従って対物レンズ 5 a が光軸方向に走査される。

これにより、試料に対して 3 次元の光刺激が行えると共に画像計測時は試料 2 0 の光軸方向のスライス画像がカメラ 1 a により取得される。

【 0 0 4 2 】

また、アクチュエータ 4 a には、自身の位置をセンシングする位置センサ（図示せず）が設けられている。この位置センサが位置信号を出力してアクチュエータドライバ 1 2 a にフィードバックすることにより、アクチュエータ 4 a の位置制御が行われる。

10

【 0 0 4 3 】

PC 2 8 の画像処理部 6 a は、対物レンズ 5 a の走査開始に同期してカメラ 1 a からの画像データが入力され、試料 2 0 の断面スライス像を連続的に取得する。これらのスライス画像を合成することにより、試料の 3 次元画像を生成する。

【 0 0 4 4 】

このような構成の動作を、図 2 に示す各信号のタイムチャートを参照して説明する。図 2 は、図 1 に記載の 3 次元共焦点顕微鏡システムで取り扱われる各信号のタイムチャートである。横軸が時間を示し、縦軸が信号レベルを示している。

【 0 0 4 5 】

波形発生器 7 a は、ユーザが設定する画像取込のフレームレートに合わせて、周期的なパルス信号（垂直同期信号（ a ））を出力する。同期信号制御器 1 0 では、この周期的なパルス信号を元に、各種トリガ信号を生成する。

20

【 0 0 4 6 】

波形発生器 7 a から同期信号制御器 1 0 に予め設定された周期の垂直同期信号（ a ）が送られると、同期信号制御器 1 0 では、この垂直同期信号（ a ）を基に共焦点スキャナ 2 a へニポウディスクの回転同期制御を行う同期信号を送ると共に、各種トリガ信号すなわち光刺激のための走査波形発生トリガ信号（ b ）、画像計測のための走査波形発生トリガ信号（ d ）を生成する。

【 0 0 4 7 】

また、同期信号制御器 1 0 は、垂直同期信号（ a ）をそのままカメラ 1 a に出し、カメラ 1 a は、この垂直同期信号（ a ）に同期して画像を取り込み、内部メモリに保存していく。保存された画像データは、メモリが一杯になると最古のデータが最新のデータに上書きされる。

30

【 0 0 4 8 】

同期信号制御器 1 0 では、PC 2 8 から画像取込開始信号を受信すると、画像取込開始信号が LOW になった後の最初の垂直同期信号に同期した光刺激のための走査波形発生トリガ信号（ b ）を波形発生器 7 a へ送る。

【 0 0 4 9 】

同時に、光刺激レーザ光源 3 2 に、この走査波形発生トリガ信号（ b ）に同期した照射 ON / OFF 信号（ c ）を送信し、内蔵されたシャッタ（図示せず）を開けて光刺激用のレーザ照射を ON 状態にする。

40

光刺激用レーザ光の照射 ON 時間は、光刺激を行うための焦点位置の走査開始から終了までの時間であって、PC から同期信号制御器 1 0 に設定される。

なお、画像取込開始信号は、操作者により PC 2 8 から任意のタイミングで同期信号制御器 1 0 に入力する信号であり、そのパルス幅は垂直同期信号の周期の 2 倍以上である。

【 0 0 5 0 】

波形発生器 7 a は、走査波形発生トリガ信号（ b ）を受信すると、予め PC 2 8 にある波形計算部 1 1 から送られてきた走査波形データに基づき走査波形信号（ f 1 ）を発生して、アクチュエータドライバ 1 2 に送信し、アクチュエータ 4 a を駆動する。焦点位置は走査波形の信号レベルに応じて変化するので走査波形信号（ f 1 ）の変化を焦点位置の変化

50

として示している。

このように、アクチュエータ 4 a の駆動によって対物レンズ 5 a の焦点面を連続的に変えて、試料 2 0 に対して光刺激を 3 次元的に行う。

【 0 0 5 1 】

光刺激動作が終了すると、同期信号制御器 1 0 では、画像計測のための走査波形発生トリガ信号 (d) を波形発生器 7 a へ送信すると共に P C 2 8 へ垂直同期信号 (a) に同期した画像取込信号 (g) を送る。

同時に、画像計測用レーザの照射 O N / O F F 信号 (e) を共焦点スキャナ 2 a に送信し、内蔵されているシャッタ (図示せず) を開き画像計測用のレーザ照射を O N 状態にする。

10

【 0 0 5 2 】

波形発生器 7 a では、走査波形発生トリガ信号 (d) を受信すると、予め P C にある波形計算部 1 1 から送られてきた走査波形データに基づき走査波形信号 (f 1) を発生して、アクチュエータドライバ 1 2 に送信し、アクチュエータ 4 a を駆動する。

P C 2 8 は、画像取込信号 (g) を受けて、この画像取込信号 (g) に同期したカメラ制御信号によりカメラ 1 a から画像データを出力させる。

【 0 0 5 3 】

このように、アクチュエータ 4 a の駆動によってレンズの焦点面を連続的に変え、アクチュエータ 4 a の走査に同期して、カメラ 1 a で試料の断面スライス像を連続的に生成した画像データを P C 2 8 の画像処理部 6 a で 3 次元画像に合成する。

20

【 0 0 5 4 】

走査波形信号 (f 1) は、ステップ波形 (段階的に増加して元のレベルにもどる波形) であり、試料の深さ (光軸) 方向の各ステップ (平らな部分) で蛍光画像計測を行うため鮮明な画像を取得できる。

【 0 0 5 5 】

また、アクチュエータ 4 a を走査する走査波形には図 3 に示すような波形を用いてもよい。

図 3 は、図 1 に記載の 3 次元共焦点顕微鏡システムで取り扱われる各信号の他のタイムチャートである。前出の図 2 と同様の信号には同様の名称と符号を付してその説明は省略する。

30

【 0 0 5 6 】

図 3 において、走査波形 (f 2) , (f 3) , (f 4) は、波形発生器 7 a が、波形発生トリガ信号 (d) を受信することにより出力する走査波形を例示したものであって、予め P C 2 8 にある波形計算部 1 1 から送られてきた走査波形データをアナログ波形に変換したものである。これらの走査波形のいずれかを用いてアクチュエータを駆動する。

【 0 0 5 7 】

走査波形 (f 2) によれば、ステップ波形のステップごとに対物レンズ駆動の上り (焦点位置を試料の下から上に移動させる) で光刺激を行い、対物レンズ駆動の下り (焦点位置を試料の上から下に移動させる) で画像計測を行う。これにより、光刺激から画像計測までの時間を短縮できる。

40

【 0 0 5 8 】

走査波形 (f 3) によれば、二等辺三角形形状の走査波形を用いて走査波形 (f 2) と同様に対物レンズ駆動の上りで光刺激を行い、対物レンズ駆動の下りで画像計測を行う。これにより、試料に対して深さ方向の光刺激をもれなく行うことができる。また、画像計測においても、1 フレームを撮像する間に試料の深さ方向に焦点位置が移動することによりその間の共焦点画像を平均した画像 (光の強度を平均したもの) を取り込むことができ、試料の深さ方向の画像情報がもれなく取得される。

【 0 0 5 9 】

また、走査波形 (f 4) のように、対物レンズ駆動の上りを直線的に走査して光刺激を行い、対物レンズ駆動の下りは、ステップ波形で走査するようしてもよい。このような、異

50

なる波形を組み合わせるにより、光刺激や画像計測に適した走査波形により試料の観測を行うことができる。

【 0 0 6 0 】

ここで、このような3次元共焦点顕微鏡システムに適用される共焦点顕微鏡の構成を図を用いて説明する。以下の実施例では顕微鏡に共焦点スキャナを搭載した構成の共焦点顕微鏡を示しているが共焦点顕微鏡としては図1に示したものと同等である。

図4は、本発明に適用される共焦点顕微鏡の一実施例を示した構成図である。前出の図と同様の構成要素には同様の符号を付けてその部分の説明は省略する。

図4において、顕微鏡40の第1のポート41には共焦点スキャナ110が取り付けられ、波長1のレーザ光111(第1のレーザ光)を試料140に照射する共焦点顕微鏡を構成する。顕微鏡40内に入ったレーザ光111は、ダイクロイックミラー43を透過して対物レンズ44により、ステージ46上の細胞などの試料140に集光される。このレーザ光111の照射により試料140が蛍光する。試料140から出た蛍光信号は、再び対物レンズ44を通り、ダイクロイックミラー43を透過し共焦点スキャナ110を介して従来例と同様にイメージセンサ131に結像される。

10

【 0 0 6 1 】

顕微鏡40の第2のポート42にはレーザ光出力手段50が取り付けられる。このレーザ光出力手段50は、レーザ光源51とコリメータレンズ52を備えている。レーザ光源51は2の波長の第2のレーザ光53を発光し、コリメータレンズ52は、この第2のレーザ光53を平行光にして第2のポート42から顕微鏡40内に入れる。顕微鏡40内に入った第2のレーザ光53は、ダイクロイックミラー43で反射して、対物レンズ44により、試料140上に波長2の光刺激用レーザ光の光ビームスポットを結像させる。

20

なお、この場合の1と2との関係は、 $2 < 1$ である。

【 0 0 6 2 】

ニポウディスク方式の共焦点顕微鏡に光刺激用の第2のレーザ光を照射する機能を備えたことによって、フォトアクチベーションのアプリケーションやFRAPなどが可能となる。また、蛍光観察、すなわち画像計測はニポウディスク式共焦点スキャナで行うことで高速性(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る高速反応をリアルタイムで観察することができる。

30

【 0 0 6 3 】

ここで、図4に示した構成において、第2のレーザ光53が例えば紫外光のような可視光でない場合、第2のレーザの照射ポイントが目視できないことになる。この問題を解決するため、図5に示すように、第2のレーザ光のビームスポットに可視光のレーザスポットを重ねるようにする。

【 0 0 6 4 】

図5は、本発明に適用される共焦点顕微鏡の第2の実施例を示した構成図である。前出の図4と同様の構成要素には同様の符号を付けてその部分の説明は省略する。

図5において、顕微鏡40の第1のポート41には共焦点スキャナ110が取り付けられ、波長1のレーザ光111を照射する共焦点顕微鏡を構成する。顕微鏡40内に入ったレーザ光111は、ダイクロイックミラー43を透過して対物レンズ44により、ステージ46上の試料140に集光される。このレーザ光111の照射により試料140が蛍光する。試料140から出た蛍光信号は、再び対物レンズ44を通り、ダイクロイックミラー43を透過し共焦点スキャナ110を介して従来例と同様にイメージセンサ131に結像される。

40

【 0 0 6 5 】

顕微鏡40の第2のポート42にはレーザ光出力手段60が取り付けられる。このレーザ光出力手段60は、レーザ光源61, 65、コリメータレンズ62, 66、ダイクロイックミラー64、全反射ミラー67、可変絞り手段68を備えている。

【 0 0 6 6 】

レーザ光源61は実線で示した波長2の第2のレーザ光63を発光する。コリメータレ

50

ズ62は、この第2のレーザ光63を平行光にする。ダイクロイックミラー64は、その分光特性により、平行光となった第2のレーザ光63を透過する。可変絞り手段68は、ダイクロイックミラー64を透過した第2のレーザ光63のビーム径を可変させる。可変絞り手段68を通った第2のレーザ光63は、顕微鏡40の第2のポート42から顕微鏡40内に入る。顕微鏡40に入った第2のレーザ光63は、ダイクロイックミラー43で反射して、対物レンズ44により、試料140上に波長 2の光刺激用レーザ光の光ビームスポットを結像させる。

【0067】

また、レーザ光源65は破線で示した波長 3の第3のレーザ光69を発光する。コリメータレンズ66は、この第3のレーザ光69を平行光にする。全反射ミラー67は、平行光になった第3のレーザ光69を反射してダイクロイックミラー64に当てる。ダイクロイックミラー64は、その分光特性により、第3のレーザ光69を反射し、可変絞り手段68を介して第2のポート42から顕微鏡40内に入れる。顕微鏡40に入った第3のレーザ光69は、ダイクロイックミラー43で反射して、対物レンズ44により、試料140上に波長 3の光ビームスポットを結像させる。

【0068】

これにより第2の蛍光信号45が発生する。この第2の蛍光信号45は、再び対物レンズ44を通り、ダイクロイックミラー43を透過し共焦点スキャナ110を介し、レーザ光111による蛍光信号と同様にイメージセンサ131に結像される。なお、1, 2, 3の関係は $2 < 1 < 3$ となっている。また、第2の蛍光信号45は、可視光であって 3よりも長波長である。

【0069】

2と3の光を合波して試料140に照射することにより、第2のレーザ光(2)が紫外光であっても第3のレーザ光(3)により励起された蛍光波長が可視光であれば、光刺激を行うポイントが目視可能となる。

また、可変絞り手段68を設けて、第2, 第3のレーザ光の照射NA(開口数)を変えることにより、光刺激のスポット径を可変にし、光刺激する範囲の大きさを変えられるようにしている。

【0070】

図6は本発明に適用される共焦点顕微鏡の第3の実施例を示した構成図である。前出の図と同様の構成要素には同様の符号を付けてその部分の説明は省略する。

図6において、共焦点スキャナ110および顕微鏡1の構成は、前出の図5で示したものと同様である。

顕微鏡40の第2のポート42にはレーザ光出力手段70が取り付けられる。このレーザ光出力手段70は、レーザ光源61, 65、コリメータレンズ62, 66、ダイクロイックミラー64、全反射ミラー67、走査手段71を備えている。

【0071】

レーザ光源61, 65、コリメータレンズ62, 66、ダイクロイックミラー64、全反射ミラー67の構成及び動作は図5で示した第2の実施例と同様であり、この構成に走査手段71を付加した。

【0072】

走査手段71は、ミラースキャン型の走査系を構成するものである。図示しないが、例えばガルバノミラーを用いて2次元でレーザ光を走査する。ガルバノミラーは、DCモータにより縦・横方向に回転できる機構になっている。制御ユニットからの信号によりDCモータを制御してガルバノミラーを回転させて、2次元の任意の位置にレーザスポットを照射することができる。

【0073】

走査手段71から出力された第2, 第3のレーザ光63, 69が顕微鏡40に入り、ダイクロイックミラー43で反射され、対物レンズ44で集光されて試料140にスポット光を照射する。走査手段71の第2, 第3のレーザ光63, 69の2次元スキャンにより、

10

20

30

40

50

試料 140 の形状に合わせた光刺激を可能にする。また、第 2 の実施例と同様に、光刺激を与える第 2 のレーザ光 63 が紫外光であっても、第 3 のレーザ光 69 により、刺激を与えている部分を目視することができる。

【0074】

光刺激についての観察が、試料に対して 2 次元の平面で行われる場合には、3 次元構造を持つ試料の深さ方向に対しては、光刺激が届かない、あるいは不十分であることが考えられる。それにより、光刺激後の試料観察の結果に正確さを欠くことになる。

また、光刺激を行い試料である細胞の一部をマーキングした場合に、このマーキングが、平面方向だけでなく深さ方向に広がる様子を正確に観察することができない。

このような問題を解決するために、上述したように光刺激機能を備えたニポウディスク方式の共焦点顕微鏡を用いて、3 次元の画像計測を行うことにより、光刺激後の試料の観察を 3 次元的に正確に行えるようにすることができる。

【0075】

なお、本発明は、上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図 1】本発明に係る 3 次元共焦点顕微鏡システムの一実施例を示す構成図である。

【図 2】本発明に係る 3 次元共焦点顕微鏡システムで取り扱われる各信号のタイムチャートである。

【図 3】本発明に係る 3 次元共焦点顕微鏡システムで取り扱われる各信号の他のタイムチャートである。

【図 4】本発明に適用される共焦点顕微鏡の一実施例を示す構成図である。

【図 5】本発明に適用される共焦点顕微鏡の第 2 の実施例を示す構成図である。

【図 6】本発明に適用される共焦点顕微鏡の第 3 の実施例を示す構成図である。

【図 7】従来の共焦点顕微鏡システムの一例を示す構成図である。

【図 8】図 7 の共焦点顕微鏡システムが取り扱う各種信号のタイムチャートである。

【図 9】従来の共焦点顕微鏡の一例を示す構成図である。

【符号の説明】

【0077】

- 1 a カメラ
- 2 a 共焦点スキャナ
- 3 a 蛍光顕微鏡
- 4 a アクチュエータ
- 5 a 対物レンズ
- 6 a 画像処理部
- 7 a 波形発生器
- 1 0 同期信号制御器
- 1 1 波形計算部
- 1 2 アクチュエータドライバ
- 2 0 試料
- 2 1 支持台
- 2 2 光路
- 2 3 光路
- 2 4 第 1 のポート
- 2 5 第 2 のポート
- 2 6 ステージ
- 2 7 ステージ支持部
- 2 8 P C
- 3 0 画像計測レーザ光源

10

20

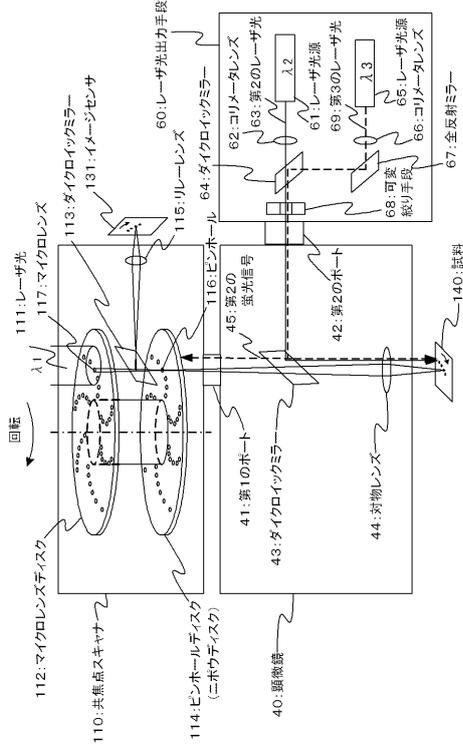
30

40

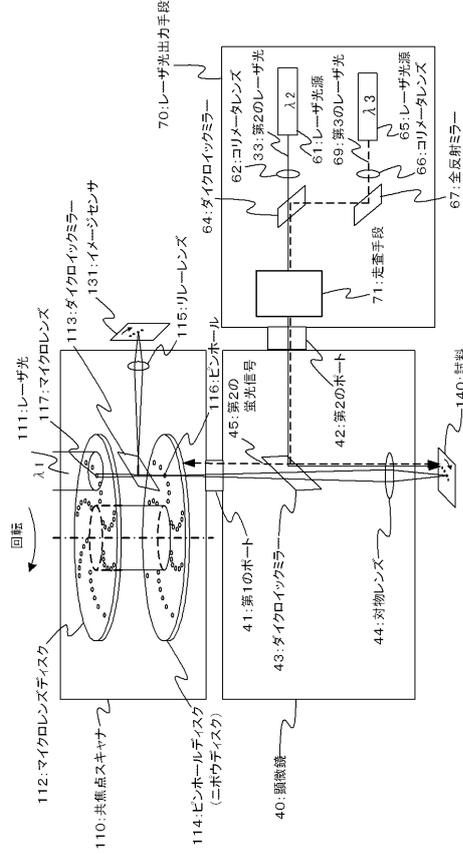
50

3 1	ファイバ	
3 2	光刺激レーザー光源	
3 3	ファイバ	
4 0	顕微鏡	
4 1	第 1 のポート	
4 2	第 2 のポート	
4 3	ダイクロイックミラー	
4 4	対物レンズ	
4 6	ステージ	
5 0	レーザー光出力手段	10
5 1	レーザー光源	
5 2	コリメータレンズ	
5 3	第 2 のレーザー光	
6 0	レーザー光出力手段	
6 1	レーザー光源	
6 2	コリメータレンズ	
6 3	第 2 のレーザー光	
6 4	ダイクロイックミラー	
6 5	レーザー光源	
6 6	コリメータレンズ	20
6 7	全反射ミラー	
6 8	可変絞り手段	
6 9	第 3 のレーザー光	
7 0	レーザー光出力手段	
7 1	走査手段	
1 1 0	共焦点スキャナ	

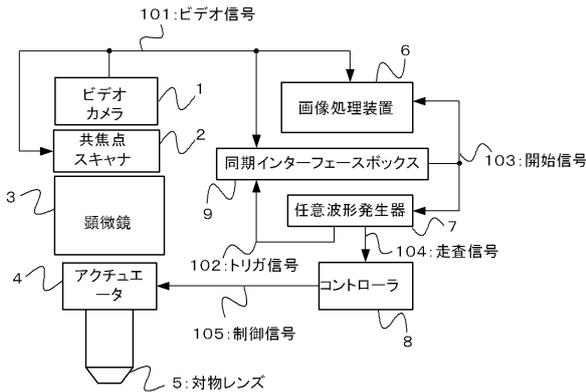
【図5】



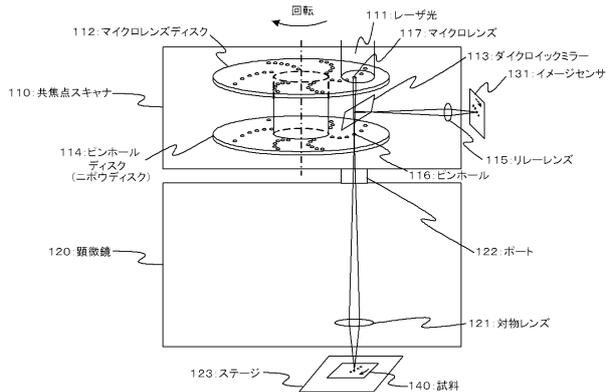
【図6】



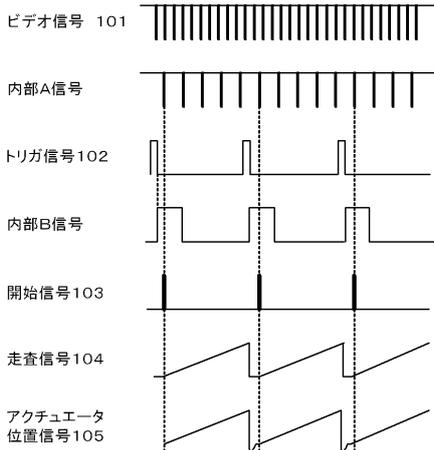
【図7】



【図9】



【図8】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2004-004678(JP,A)
特開平10-206742(JP,A)
特開2002-072102(JP,A)
特開2006-003805(JP,A)
特開2003-050360(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/00
G02B 21/06 - 21/36
G01N 21/62 - 21/74