

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4434882号  
(P4434882)

(45) 発行日 平成22年3月17日(2010.3.17)

(24) 登録日 平成22年1月8日(2010.1.8)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 21/64 (2006.01)** GO 1 N 21/64 E  
**GO 2 B 21/00 (2006.01)** GO 2 B 21/00

請求項の数 7 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2004-248719 (P2004-248719)	(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4番2号
(22) 出願日	平成16年8月27日(2004.8.27)	(74) 代理人	100118913 弁理士 上田 邦生
(65) 公開番号	特開2006-64573 (P2006-64573A)	(74) 代理人	100112737 弁理士 藤田 考晴
(43) 公開日	平成18年3月9日(2006.3.9)	(72) 発明者	河野 芳弘 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリンパス株式会社内
審査請求日	平成19年6月22日(2007.6.22)	審査官	田中 洋介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザ走査型蛍光観察装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数波長のレーザー光を出射するレーザー光源と、  
 該レーザー光源から発せられたレーザー光を波長ごとに分光する分光装置と、  
 該分光装置により分光されたレーザー光を集光させる集光レンズと、  
 該集光レンズの焦点位置近傍に、前記分光装置による分光方向に所定の間隔をあけて配置され、異なる波長のレーザー光をそれぞれ反射する複数の反射部と、該反射部に隣接配置された透過部とを一体的に備える波長選択反射装置と、  
 該波長選択反射装置により反射されたレーザー光を重ね合わせる回折格子と、  
 該回折格子により重ね合わせられたレーザー光を2次元的に走査させる走査部と、  
 該走査部により走査されたレーザー光を試料に集光させる対物光学系と、  
 試料において発せられ、前記対物光学系、前記走査部および回折格子を介して戻り、前記波長選択反射装置の透過部を透過させられた蛍光を検出する光検出器とを備え、  
 前記波長選択反射装置の各反射部の分光方向に沿う幅寸法が透過部よりも細く形成されているレーザー走査型蛍光観察装置。

10

【請求項2】

前記波長選択反射装置が、透明基板に筋状の反射膜をコーティングしてなる請求項1に記載のレーザー走査型蛍光観察装置。

【請求項3】

前記波長選択反射装置が、異なる位置に反射部が設けられた、複数の領域を備えるるとと

20

もに、該領域を切替可能に支持する切替手段を備える請求項 1 または請求項 2 に記載のレーザー走査型蛍光観察装置。

【請求項 4】

前記分光装置が、音響光学素子からなる請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載のレーザー走査型蛍光観察装置。

【請求項 5】

前記波長選択反射装置における分光可能な波長帯域に対応する幅寸法 H 1 と、反射部の幅寸法 H 2 との寸法比が、以下の条件式 ( 1 ) を満足する請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載のレーザー走査型蛍光観察装置。

$$100 : 25 < H1 : H2 < 400 : 1 \quad \dots (1)$$

10

【請求項 6】

複数波長のレーザー光を出射するレーザー光源と、  
該レーザー光源から発せられたレーザー光を波長ごとに分光する分光装置と、  
該分光装置により分光されたレーザー光を集光させる集光レンズと、  
該集光レンズの焦点位置近傍に、前記分光装置による分光方向に間隔をあけて配置され、異なる波長のレーザー光をそれぞれ第 1 の方向に反射する複数の第 1 の反射部と、該反射部に隣接配置され、入射された光を第 2 の方向に反射する第 2 の反射部とを備えるミラー装置と、

該ミラー装置の第 1 の反射部により第 1 の方向に反射されたレーザー光を重ね合わせる回折格子と、

20

該回折格子により重ね合わせられたレーザー光を 2 次元的に走査させる走査部と、  
該走査部により走査されたレーザー光を試料に集光させる対物光学系と、  
試料において発せられ、前記対物光学系、前記走査部および回折格子を介して戻り、前記ミラー装置の第 2 の反射部において反射された蛍光を検出する光検出器とを備え、  
前記ミラー装置の第 1 の反射部の分光方向に沿う幅寸法が第 2 の反射部よりも細く形成されているレーザー走査型蛍光観察装置。

【請求項 7】

前記ミラー装置が、複数の可動ミラーを備え、第 1 の反射部および第 2 の反射部の位置を変更可能に構成されている請求項 6 に記載のレーザー走査型蛍光観察装置。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

この発明は、レーザー走査型蛍光観察装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

試料に励起光を照射して、試料から発生する蛍光を観察する蛍光観察装置においては、蛍光を励起光から分離して検出する必要がある。従来、蛍光を励起光から分離する方法としては、ダイクロイックミラーを用いる方法が一般的である。しかしながら、試料に入射させる励起光の波長と、それによって発生する蛍光の波長とが近接しているため、蛍光を励起光から効率よく分離するダイクロイックミラーの設計は困難な場合が多い。

40

【0003】

このような不都合を回避するために、従来、プリズム等の分光装置を用いて励起光から蛍光を分離することが考えられている ( 例えば、特許文献 1 ~ 3 参照。 )

特許文献 1 は、ダイクロイックミラーを不要とする共焦点蛍光顕微鏡装置を開示している。この共焦点蛍光顕微鏡装置は、光源から発せられた光を複数の縞状の光束に変換する絞りと、プリズムと、プリズムによって分光された各縞状の光束の一部を選択的に反射するミラーとを備え、試料から戻る蛍光を該ミラーに設けられたスリットに通過させることで励起光から分離して光検出器に検出させるようになっている。

【0004】

また、特許文献 2 は、プリズムと絞りを有するミラーとにより光束中の少なくとも 2 つ

50

のスペクトル範囲の光を選択的に検出する装置を開示している。特許文献3は、プリズムと3角形のミラーとにより、共焦点走査型顕微鏡のビーム路において光束中の少なくとも1つのスペクトル領域を選択的に検出する装置を開示している。

【特許文献1】米国特許第5751417号明細書

【特許文献2】特表平9-502269号公報

【特許文献3】特開2001-272275号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、特許文献1の共焦点蛍光顕微鏡は、ダイクロイックミラーを用いることなく励起光から蛍光を分離することができるものの、複数の励起光を同時に照射して、発生する複数の蛍光を観察することはできないという不都合がある。すなわち、ミラーを光軸に交差する方向に移動させることで、ミラーによって反射し励起光の波長およびスリットを通過させる蛍光の波長を変化させることはできるが、複数波長の励起光を同時に照射し、複数波長の蛍光を同時に検出することは困難である。

10

【0006】

また、特許文献2および3の装置によれば、複数波長の光を選択的に検出することができるが、間隔をあけて配置される複数の絞りや複数の3角形ミラーを用意する必要があり、構造が複雑になるとともに装置が大型化する不都合がある。さらに、このように複数の絞りや3角形ミラーを用意する場合には、これらの絞りや3角形ミラーをそれぞれ調節する必要がある、精度よく検出することが困難であるという問題がある。

20

【0007】

この発明は上述した事情に鑑みてなされたものであって、試料から発生する蛍光を効率よく検出することを可能とするとともに、複数波長の励起光を同時に照射して、複数波長の蛍光を同時に検出することを可能とするレーザ走査型蛍光観察装置を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記目的を達成するために、本発明は以下の手段を提供する。

本発明は、複数波長のレーザ光を出射するレーザ光源と、該レーザ光源から発せられたレーザ光を波長ごとに分光する分光装置と、該分光装置により分光されたレーザ光を集光させる集光レンズと、該集光レンズの焦点位置近傍に、前記分光装置による分光方向に間隔をあけて配置され、異なる波長のレーザ光をそれぞれ反射する複数の反射部と、該反射部に隣接配置された透過部とを一体的に備える波長選択反射装置と、該波長選択反射装置により反射されたレーザ光を重ね合わせる回折格子と、該回折格子により重ね合わせられたレーザ光を2次元的に走査させる走査部と、該走査部により走査されたレーザ光を試料に集光させる対物光学系と、試料において発せられ、前記対物光学系、前記走査部および回折格子を介して戻り、前記波長選択反射装置の透過部を透過させられた蛍光を検出する光検出器とを備え、前記波長選択反射装置の反射部の分光方向に沿う幅寸法が透過部よりも細く形成されているレーザ走査型蛍光観察装置を提供する。

30

40

【0009】

本発明によれば、レーザ光源から発せられたレーザ光が分光装置により波長ごとに分光され集光レンズによって焦点位置に集光される。レーザ光は狭い波長帯域を有するので、分光されたレーザ光は、狭い幅の筋状の光束となって波長選択反射装置に入射させられる。波長選択反射装置は、集光レンズの焦点位置近傍に配置された反射部を備えているので、集光された筋状のレーザ光は反射部によって容易に反射される。反射されたレーザ光は回折格子により重ね合わせられて走査部により2次元的に走査され、対物光学系を介して試料に照射される。

【0010】

レーザ光が照射された試料内においては蛍光物質が励起されることにより蛍光が発せら

50

れる。発せられた蛍光は、対物光学系、走査部および回折格子を介して同一光路を戻す。蛍光はレーザ光とは異なる波長を有しているため、回折格子において若干異なる方向に偏向されて、波長選択反射装置に入射される。波長選択反射装置の反射部は透過部よりも細く形成されているので、入射された蛍光は、容易に透過部を透過して光検出器により効率的に検出されることになる。

【0011】

また、反射部は、それぞれ異なる波長のレーザ光を反射するように、分光装置による分光方向に間隔をあけて配置されているので、複数の波長のレーザ光を試料に対して同時に照射することができる。そして、試料から戻る蛍光は、反射部から若干離れた位置において波長選択反射装置に入射されるので、全てのレーザ光に対して発生された蛍光が透過部を容易に透過させられて光検出器により効率的に検出されることになる。

10

【0012】

上記発明においては、前記波長選択反射装置が、透明基板に筋状の反射膜をコーティングしてなることが好ましい。透明基板上に反射膜をコーティングすることで、反射膜を細い筋状に形成しかつ精度よく配置することができる。レーザ光が反射膜からなる反射部によって反射され、蛍光が反射膜間に配される透明基板を通過させられることになる。反射膜の反射率を高めるよりも透明基板の透過率を容易に高めることができるので、光強度の少ない蛍光を損失なく光検出器によって検出させることができる。

【0013】

上記発明においては、前記波長選択反射装置が、異なる位置に反射部が設けられた、複数の領域を備えるとともに、該領域を切替可能に支持する切替手段を備えることとしてもよい。

20

切替手段の作動によって領域を切り替えることにより、レーザ光源から発せられた複数のレーザ光の内の1以上のレーザ光を選択的に反射して試料に入射させることができる。

【0014】

また、上記発明においては、前記分光装置が、音響光学素子からなることとしてもよい。

音響光学素子によれば、入力する周波数を変更するだけで、出射されるレーザ光の角度を容易に変化させることができるので、出射されたレーザ光が反射部に正確に一致するように微調整することが可能となる。

30

【0015】

上記発明においては、前記波長選択反射装置における分光可能な波長帯域に対応する幅寸法H1と、反射部の幅寸法H2との寸法比が、以下の条件式(1)を満足することが好ましい。

$$100 : 25 < H1 : H2 < 400 : 1 \quad \dots (1)$$

【0016】

また、本発明は、複数波長のレーザ光を出射するレーザ光源と、該レーザ光源から発せられたレーザ光を波長ごとに分光する分光装置と、該分光装置により分光されたレーザ光を集光させる集光レンズと、該集光レンズの焦点位置近傍に、前記分光装置による分光方向に間隔をあけて配置され、異なる波長のレーザ光をそれぞれ第1の方向に反射する複数の第1の反射部と、該第1の反射部に隣接配置され入射された光を第2の方向に反射する第2の反射部とを備えるミラー装置と、該ミラー装置の第1の反射部により第1の方向に反射されたレーザ光を重ね合わせる回折格子と、該回折格子により重ね合わせられたレーザ光を2次元的に走査させる走査部と、該走査部により走査されたレーザ光を試料に集光させる対物光学系と、試料において発せられ、前記対物光学系、前記走査部および回折格子を介して戻り、前記ミラー装置の第2の反射部において反射された蛍光を検出する光検出器とを備え、前記ミラー装置の第1の反射部の分光方向に沿う幅寸法が第2の反射部よりも細く形成されているレーザ走査型蛍光観察装置を提供する。

40

【0017】

この発明によれば、レーザ光源から発せられたレーザ光がミラー装置に入射されると、

50

各波長に対応する位置に配置されている第1の反射部により回折格子、走査部および対物光学系を介して試料に照射される。また、試料から発せられた蛍光は、対物光学系、走査部および回折格子を介して戻るが、レーザー光とは波長が異なるために、レーザー光が入射された方向とは異なる方向に反射する。したがって、蛍光は第1の反射部に入射されることなく、それに隣接する第2の反射部に入射せられ、第2の反射部による反射方向に配置されている光検出器によって検出されることになる。この場合において、ミラー装置の第1のミラーは第2のミラーよりも細く形成されているので、ミラー装置に入射された蛍光は、容易に第2のミラーにより反射されて光検出器により効率的に検出されることになる。したがって、複数波長のレーザー光を試料に対して同時に照射し、各レーザー光により励起されて試料から発せられる蛍光を検出することができる。

10

**【0018】**

上記発明においては、前記ミラー装置が、複数の可動ミラーを備え、第1の反射部および第2の反射部の位置を変更可能に構成されていることとしてもよい。

例えば、複数の可動式の微小ミラーを配列してなるデジタルマイクロミラーデバイス(DMD)のように、第1の反射部および第2の反射部により構成されるパターンを任意に切り替えることで、試料に対して照射するレーザー光の波長を任意に選択することができる。

**【発明の効果】****【0019】**

本発明によれば、複数のレーザー光を発生するレーザー光源を使用することにより、分光装置により分光されたレーザー光を細い筋状に形成することができるので、蛍光の透過可能な透過部の面積を大きく確保して、試料から発生する蛍光を効率よく検出することができる。また、試料に対して複数波長のレーザー光を同時に照射して、発生した蛍光を広い透過部によって光検出部に漏れなく透過させることができ、効率よく検出することができるという効果を奏する。

20

**【発明を実施するための最良の形態】****【0020】**

以下、本発明の第1の実施形態に係るレーザー走査型蛍光観察装置について、図1～図3を参照して説明する。

本実施形態に係るレーザー走査型蛍光観察装置1は、図1に示されるように、複数波長のレーザー光を出射するレーザーコンバイナ(レーザー光源)2と、該レーザーコンバイナ2からのレーザー光を導く第1の光ファイバ3と、該第1の光ファイバ3の端面から発せられたレーザー光を平行光に変換する第1のコリメートレンズ4と、複数波長のレーザー光を含む光束を分光して、波長ごとに異なる方向に出射する音響光学素子(分光装置)5と、該音響光学素子5から発せられた複数のレーザー光を分光方向に沿って異なる集光位置に集光する第1の集光レンズ6と、第1の集光レンズ6の焦点位置近傍に配置された波長選択反射板7と、該波長選択反射板7において反射されたレーザー光を集光して平行光にする第2のコリメートレンズ8と、前記波長選択反射板7を挟んで第2のコリメートレンズ8に対向する位置に配置された第3のコリメートレンズ9と、該第3のコリメートレンズ9から出射された平行光を集光するレンズアレイ10と、該レンズアレイ10を構成する各レンズ11の焦点位置に分光方向に並んで配置された複数の光検出器12と、第2のコリメートレンズ9から出射されたレーザー光を合波する回折格子13と、回折格子13により重ね合わせられたレーザー光を集光する第2の集光レンズ14と、該第2の集光レンズ14の焦点位置近傍に端面15aが配置された第2の光ファイバ15と、該第2の光ファイバ15の他端に接続された測定ヘッド16とを備えている。

30

40

**【0021】**

レーザーコンバイナ2は、複数のレーザー発振器(図示略)からの波長の異なる複数のレーザー光を合波して出力するようになっている。レーザー発振器は、例えば、400nm、488nm、543nm、633nm、800nmの波長のレーザー光をそれぞれ発振するようになっている。

50

## 【 0 0 2 2 】

音響光学素子 5 は、所定の周波数を入力されることにより、波長に応じて異なる一定の方向にレーザ光を出射するようになっている。したがって、波長の異なる複数のレーザ光は、音響光学素子 5 において分光され、予め定められた方向に出射されるようになっている。また、音響光学素子 5 は、入力周波数を微調整することができるようになっており、入力周波数を微調整することで、各レーザ光の出射方向を微調整することができるようになっている。

## 【 0 0 2 3 】

前記波長選択反射板 7 は、図 2 および図 3 に示されるように、長形状の透明基板 1 7 の一表面に長辺方向に延びる直線の筋状の反射膜 1 8 をコーティングすることにより構成されている。反射膜 1 8 の位置には、図 3 に示されるように、レーザ光が反射される反射部 7 a が構成され、反射膜 1 8 のない位置には、入射された光がほぼ 1 0 0 % 透過できる透過部 7 b が構成されている。

10

## 【 0 0 2 4 】

波長選択反射板 7 は、長辺方向に沿って並ぶ 5 つの領域 A 1 ~ A 5 に分けられている。第 1 の領域 A 1 には 4 0 0 n m のレーザ光が集光される位置のみに反射膜 1 8 が配置され、第 2 の領域 A 2 には 4 8 8 n m のレーザ光が集光される位置のみに反射膜 1 8 が配置され、第 3 の領域 A 3 には 5 4 3 n m のレーザ光が集光される位置のみに反射膜 1 8 が配置されている。また、第 4 の領域 A 4 には、4 0 0 n m、4 8 8 n m、5 4 3 n m のレーザ光がそれぞれ集光される位置に反射膜 1 8 が配置されている。また第 5 の領域 A 5 には、

20

## 【 0 0 2 5 】

反射部 7 a と透過部 7 b の幅寸法は、光の波長の幅に比例する。

本実施形態においては、両端に配される反射部 7 a の間において 4 0 0 ~ 8 0 0 n m の波長帯域の光を分光できるようになっているので、両端の反射部 7 a 間の幅寸法 H 1 を 4 0 0 とした場合、各反射部 7 a の幅寸法 H 2 は、理想的なレーザ光の場合には 1 でよい。この場合、例えば、領域 A 5 において、4 0 0 n m の光の反射部 7 a と、4 8 8 n m の光の反射部 7 a との間に配される透過部 7 b の幅寸法は 8 7、4 8 8 n m と 5 4 3 n m の反射部 7 a 間の透過部 7 b の幅寸法は 5 4、5 4 3 n m と 6 3 3 n m の反射部 7 a 間の透過部 7 b の幅寸法は 8 9、6 3 3 n m と 8 0 0 n m の反射部 7 a 間の透過部 7 b の幅寸法は 1 6 6 となる。

30

## 【 0 0 2 6 】

上記の場合に、分光可能な波長帯域 4 0 0 ~ 8 0 0 n m に対応する幅寸法 H 1 に対する反射部 7 a の幅寸法 H 2 の比は 4 0 0 : 1 である。レーザ光源として半導体レーザを用いる場合には、温度変化等による波長のばらつき等が生ずるので、分光可能な波長帯域に対応する幅寸法 H 1 と反射部 7 a の幅寸法 H 2 との比を 4 0 0 : 5 程度にすることが望ましい。さらに、組立調整上、作業を簡単にしたい場合には、寸法比 H 1 : H 2 を 4 0 0 : 2 5 程度にすることが好ましい。

## 【 0 0 2 7 】

また、分光可能な光の波長帯域を小さくすれば装置をコンパクトにできる。その場合には、例えば、分光可能な波長帯域を 5 0 0 ~ 6 0 0 n m のように 1 0 0 n m 程度にしてもよく、このとき、寸法比 H 1 : H 2 は 1 0 0 : 2 5 となる。

40

したがって、以下の条件式 ( 1 ) を満たすことが好ましい。

$$100 : 25 < H1 : H2 < 400 : 1 \quad \dots (1)$$

## 【 0 0 2 8 】

波長選択反射板 7 は、リニアガイド 1 9 によって長辺方向に移動可能なスライダ 2 0 に固定されている。スライダ 2 0 は図示しないモータおよびボールネジ等の直動機構によって波長選択反射板 7 の長辺方向の位置を変化させることができるようになっている。これにより、波長選択反射板 7 の 5 つの領域 A 1 ~ A 5 の内のいずれか 1 つの領域にレーザ光

50

および蛍光が入射されるように切替可能に構成されている。

【0029】

これにより、光路上に配置された領域A1～A5に配置された反射膜18に対応する波長のレーザー光L1は、図3に示されるように、ちょうど反射膜18の位置に入射されて反射され、鎖線で示されるように、その波長に対応する反射膜18が存在しない場合には、レーザー光L2は、透過部7bを透過して捨てられるようになっている。

【0030】

光検出器12は、例えば、光電子増倍管(PMT:Photomultiplier Tube)である。

前記回折格子13は、第2のコリメートレンズ8から出射された1つのレーザー光を反射し、または、異なる波長の複数のレーザー光を合波して反射する一方、試料Aから戻る1または複数の波長の蛍光Fを分光して第2のコリメートレンズ8に入射させるようになっている。

10

【0031】

第2の光ファイバ15は、シングルモードファイバであり、その端面15bが、後述する測定ヘッド16の先端に配置された対物レンズ21の焦点位置と共役な位置関係になっている。

測定ヘッド16は、試料Aに対向する先端に対物レンズ21を固定した筐体22内に、第2の光ファイバ15により伝播されてきた光を平行光に変換する第4のコリメートレンズ23と、第4のコリメートレンズ23から発せられた平行光を2次的に走査する走査部24と、該走査部24により走査されたレーザー光を集光して中間像を形成する瞳投影レンズ25と、中間像を形成したレーザー光を集光して対物レンズ21に入射させる結像レンズ26とを備えている。

20

走査部24は、例えば、相互に直交する軸線回りに揺動可能に支持された2枚のガルバノミラーからなるいわゆる近接ガルバノミラーにより構成されている。

【0032】

このように構成された本実施形態に係るレーザー走査型蛍光観察装置1の作用について、以下に説明する。

本実施形態に係るレーザー走査型蛍光観察装置1によって、例えば、400nmの波長を有するレーザー光のみに対する蛍光観察を行う場合には、リニアガイド19を作動させてスライダ20を移動させることにより、領域A1が光路上に配置されるように設定しておく。そして、レーザーコンバイナ2からレーザー光を出射する。このとき全てのレーザー発振器をONにして全ての波長を含むレーザー光L1, L2を出射することにしてもよく、また、対応する400nmの波長を有するレーザー光L1を出射するレーザー発振器のみをONしておくことにもよい。

30

【0033】

全てのレーザー発振器をONにして、全ての波長を含むレーザー光L1, L2を出射させると、レーザー光L1, L2は第1のコリメートレンズ4によって平行光にされた後に音響光学素子5に入射される。音響光学素子5においては、レーザー光L1, L2は波長ごとに分光され、それぞれ単一波長を有する筋状の光束となって、波長ごとに定まる異なる方向に向かって出射される。そして、出射された各レーザー光L1, L2は、第1の集光レンズ6によって集光され、その焦点位置近傍に配置されている波長選択反射板7に入射される。

40

【0034】

波長選択反射板7は、領域A1が光路中に配置されているので、波長400nmのレーザー光の集光位置に対応する位置のみに反射膜18が配置される。したがって、波長400nmのレーザー光L1のみが反射部7aにより反射され、他の波長のレーザー光L2は透過部7bを透過して捨てられる。または、他の波長のレーザー発振器をOFFにしておけば、レーザー光L1のみが反射部7aにより反射される。

【0035】

波長選択反射板7により反射された波長400nmのレーザー光L1は、第2のコリメートレンズ8によって平行光にされた後に、回折格子13において反射される。ここで、第

50

2のコーリメートレンズ8を通過してきたレーザ光L1は波長400nmのレーザ光L1のみであるため、回折格子13では、所定の偏向角度で第2の集光レンズ14に向けて反射されるのみとなる。

【0036】

第2の集光レンズ14により集光されたレーザ光L1は、その焦点位置に配置されている第2の光ファイバ15の端面15aに入射され、第2の光ファイバ15内を伝播されて測定ヘッド16に伝達される。

第2の光ファイバ15を介して伝播されてきたレーザ光は、第4のコーリメートレンズ23により平行光に変換され、走査部24により2次的に走査され、瞳投影レンズ25、結像レンズ26および対物レンズ21を介して試料Aに照射される。そして、試料Aにおいて波長400nmのレーザ光により励起されて発生した蛍光Fは、対物レンズ21、結像レンズ26、瞳投影レンズ25、走査部24および第4のコーリメートレンズ23を介して第2の光ファイバ15の端面15bに集光される。

10

【0037】

第2の光ファイバ15の端面15bは、対物レンズ21の焦点位置と共役な位置関係に配置されているので、共焦点ピンホールとして機能し、対物レンズ21の焦点位置近傍から戻る光のみが第2の光ファイバ15内に入射される。これにより、光検出器12により検出される蛍光Fは、対物レンズ21の焦点位置近傍からの蛍光Fのみとなり、試料Aの所定の深さ位置に配される対物レンズ21の焦点位置に2次的に広がる試料Aの蛍光画像を取得することが可能となる。

20

【0038】

第2の光ファイバ15内を伝播して戻る蛍光Fは、第2の集光レンズ14によって平行光にされた後、回折格子13において反射されることにより分光され、波長ごとに定められた方向に向けて出射される。波長ごとに分光された蛍光Fは第2のコーリメートレンズ8を通過させられることで集光されて波長選択反射板7に入射される。これらの蛍光Fは入射されたレーザ光L1、この例の場合には、波長400nmのレーザ光L1に近接するが異なる波長を有しているため、波長選択反射板7のレーザ光L1とは異なる位置に入射せられる。

【0039】

測定ヘッド16から戻る戻り光の中に、波長400nmのレーザ光L1が含まれている場合には、該レーザ光L1は同一の光路を戻ることによって、回折格子13によりもと来た方向に反射される。したがって、レーザ光L1は、波長選択反射板7の反射膜18に一致する位置に入射されることにより波長選択反射板7を透過することなく反射される。一方、戻り光の中の蛍光Fは、波長400nmとは異なる波長を有しているために、波長選択反射板7の反射膜18とは異なる位置に入射される。反射膜18からなる反射部7aに隣接する領域には反射膜18よりも十分に広い透過部7bが設けられ、透過部7bは反射防止処理等を施されてほぼ100%が透過させられるようになっているので、波長選択反射板7に入射した蛍光Fはそのほぼ全てが透過部7bを透過させられて第3のコーリメートレンズ9により平行光にされた後に、レンズアレイ10によって、それぞれの波長ごとに用意されている光検出器12に入射されることになる。

30

40

【0040】

また、波長488nmまたは543nmのレーザ光L1を試料Aに照射して蛍光観察を行う場合、波長400nm、488nm、543nmの3つの異なる波長のレーザ光L1を試料Aに同時に照射する場合、および、波長400nm、488nm、543nm、633nm、800nmの5つの異なる波長のレーザ光L1を試料Aに同時に照射して蛍光観察を行う場合には、それぞれ、リニアガイド19を作動させてスライダ20を波長選択反射板7の長辺方向に移動させることにより、波長選択反射板7の領域A2~A5のいずれかが光路上に配置されるように設定する。

これにより、領域A2~A5に入射されたレーザ光L1、L2は、その波長に対応する位置に反射膜18が存在するレーザ光L1のみが、反射膜18によって反射されて試料A

50

に照射され、試料Aから戻る蛍光Fが、波長選択反射板7の透過部7bを透過して対応する光検出器12により検出されることになる。

【0041】

このように、本実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置1によれば、レーザコンバイナ2を採用することによって、個々のレーザ発振器において発振されるレーザ光L1, L2の波長帯域を狭い波長帯域に限定することができる。したがって、音響光学素子5による分光後のレーザ光L1, L2を細長い筋状に形成することができ、筋状の反射膜18によってそれぞれの波長のレーザ光L1を反射することができる。その一方で、反射膜18に隣接する広い範囲の透過部7bによってレーザ光L1の波長に隣接する波長帯域の蛍光Fを漏れなく効率的に透過させて光検出器12により回収することができる。

10

【0042】

その結果、ダイクロイックミラーを使用することなく蛍光Fをレーザ光L1から分離することができる。また、ストークスシフトが小さく、ダイクロイックミラーによっては分離が困難な場合においても、蛍光Fとレーザ光L1とをより確実に分離することができる。

【0043】

本実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置1においては、第2の光ファイバ15に測定ヘッド16を接続することにより、第2の光ファイバ15を湾曲させて測定ヘッド16を自由な姿勢に配置することができる。したがって、試料Aに対して種々の方向から対物レンズ21を近接させる用途や、実験小動物等の試料Aを生きたままの状態を観察する際に、試料Aに対物レンズ21を装着したままの状態を試料Aの活動を許容する用途等に適している。

20

【0044】

なお、これに代えて、図4に示されるように、第2の光ファイバ15をなくして対物レンズ21を固定式にした構造のレーザ走査型蛍光観察装置1を採用してもよい。この場合、第2の光ファイバ15に代えて、第2の集光レンズ14の焦点位置近傍に配置されるコンフォーカル絞り27を配することが好ましい。このようにすることで、第2の光ファイバ15の端面15bが果たしていたコンフォーカル絞りの機能を直接置き換えて、同様の作用効果を達成することができる。

【0045】

また、上記実施形態においては、レーザコンバイナ2から発せられた複数波長のレーザ光L1, L2を含む光束を、各波長のレーザ光L1, L2ごとに分光する分光装置として、音響光学素子5を採用した場合について説明したが、これに代えて、図5および図6に示されるように、複数のダイクロイックミラー28, 29およびミラー30, 31を組み合わせた分光装置32を採用することにしてもよい。この場合に、各ダイクロイックミラー29の角度を微調整することにより、各波長のレーザ光L1, L2の第1の集光レンズ6による集光位置を分光方向に微調整することができる。図5は図1と同様の第2の光ファイバ15を用いた例、図6は図4と同様の第2の光ファイバ15を有しない例をそれぞれ示している。

30

【0046】

また、分光装置としては音響光学素子5や上記ダイクロイックミラー28, 29等を組み合わせたものに限定されるものではなく、例えば、プリズムのような他の任意の分光装置を採用することができる。

40

【0047】

次に、本発明の第2の実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置40について、図7～図9を参照して説明する。

なお、本実施形態の説明においては、上述した第1の実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置1, 1と構成を共通とする箇所同一の符号を付して説明を簡略化することにする。

【0048】

50

本実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置40は、図7に示されるように、第1の実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置1において使用していた波長選択反射板7に代えて、複数の微小ミラーを備えるミラーアレイ41を採用してもよい。

【0049】

ミラーアレイ41は、図8に示されるように、第1の実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置1における波長選択反射板7の反射部7aと同様の位置に、直線的な筋状に配置され、第1の反射角度に固定された第1のミラー41aと、透過部7bと同様の位置に配置され、第2の反射角度に固定された第2のミラー41bとを備えている。また、第1の実施形態の波長選択反射板7の長辺方向に沿って配列された複数の領域(A1~A5)と同様の領域A1~A5(図示略)を備え、各領域内において、これらミラー41a, 41bは、領域全体に伸びている。

10

【0050】

第1のミラー41aは、各波長のレーザ光L1の第1の集光レンズ6による集光位置に配置され、レーザ光源2から送られてきたレーザ光L1を第2のコリメートレンズ8に向けて反射するように第1の反射角度が設定されている。また、第2のミラー41bは、第2のコリメートレンズ8から戻る蛍光Fが入射される位置に配置され、蛍光Fを第1の集光レンズ6とは異なる方向に配置されている光検出器12に向けて反射するように第2の反射角度が設定されている。

【0051】

第2のミラー41bは、第1のミラー41aと同等の幅寸法を有しているが、2つの第1のミラー41aの間に複数本の第2のミラー41bを配置することにより、第1のミラー41aの分光方向に沿う幅寸法を、第2のミラー41bの幅寸法と比較して十分に小さく設定している。第1のミラー41aは、その位置に集光された、ごく限られた波長帯域を有するレーザ光L1を反射することができれば足り、その波長のレーザ光L1を照射された試料Aから発生されたレーザ光L1の波長に隣接する比較的広い波長帯域の蛍光Fを広い第2のミラー41bに入射させる必要があるからである。

20

また、試料Aに照射するレーザ光L1の波長を変更する場合には、リニアガイド19を作動させて、ミラーアレイ41をその長辺方向に沿って移動させ、光路中に配置される領域A1~A5を変更することができる。

【0052】

このように、本実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置40によっても、ダイクロイックミラーを使用することなく、蛍光Fをレーザ光L1から分離し、効率的に検出することができるという点で、第1の実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置1とほぼ同等の作用効果を奏する。

30

【0053】

なお、上記実施形態においては、異なる反射角度に固定された第1のミラー41aと第2のミラー41bとを有するミラーアレイ41を採用し、試料Aに照射するレーザ光L1を変更するときにはリニアガイド19によってミラーアレイ41を長辺方向に移動させる方式を採用したが、これに代えて、図9(a)に示されるように、ミラーアレイ41として、複数の可動式の微小ミラー42を配列してなるデジタルマイクロミラーデバイス(DMD)のような走査ミラー素子を採用することにしてもよい。

40

【0054】

この場合に、試料Aに照射するレーザ光L1の波長に応じて、第1の実施形態に係る波長選択反射板7の反射部7aおよび透過部7bと同様のパターンとなるように第1の反射部42aと、第2の反射部42bを構成し、これらの反射部42a, 42bの反射角度を異ならせるとともに、必要に応じて反射部7a、透過部7bのパターンを変更することにより、複数波長のレーザ光L1を試料Aに同時に照射して、試料Aから発生する複数波長の蛍光Fを光検出器12により効率的に検出することができる。

なお、図10に示されるように、第2の光ファイバ15を有しない構造を採用してもよい。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】本発明の第1の実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置を示す模式図である。

【図2】図1のレーザ走査型蛍光観察装置の波長選択反射板を示す正面図である。

【図3】図2の波長選択反射板におけるレーザ光の反射および蛍光の透過の様子を示す模式図である。

【図4】図1の変形例に係るレーザ走査型蛍光観察装置を示す模式図である。

【図5】図1の他の変形例に係るレーザ走査型蛍光観察装置を示す模式図である。

【図6】図1の他の変形例に係るレーザ走査型蛍光観察装置を示す模式図である。

【図7】本発明の第2の実施形態に係るレーザ走査型蛍光観察装置を示す模式図である。 10

【図8】図7のレーザ走査型蛍光観察装置のミラーアレイにおけるレーザ光および蛍光の反射の様子を示す模式図である。

【図9】図9のミラーアレイの変形例を示す模式図である。

【図10】図7のレーザ走査型蛍光観察装置の変形例を示す模式図である。

## 【符号の説明】

【0056】

A 試料

A1 ~ A5 領域

1, 1, 40, 40 レーザ走査型蛍光観察装置

2 レーザコンバイナ(レーザ光源) 20

5 音響光学素子(分光装置)

6 第1の集光レンズ(集光レンズ)

7 波長選択反射板(波長選択反射装置)

7a 反射部

7b 透過部

12 光検出器

13 回折格子

17 透明基板

18 反射膜

19 リニアガイド(切替手段) 30

20 スライダ(切替手段)

21 対物レンズ(対物光学系)

24 走査部

32 分光装置

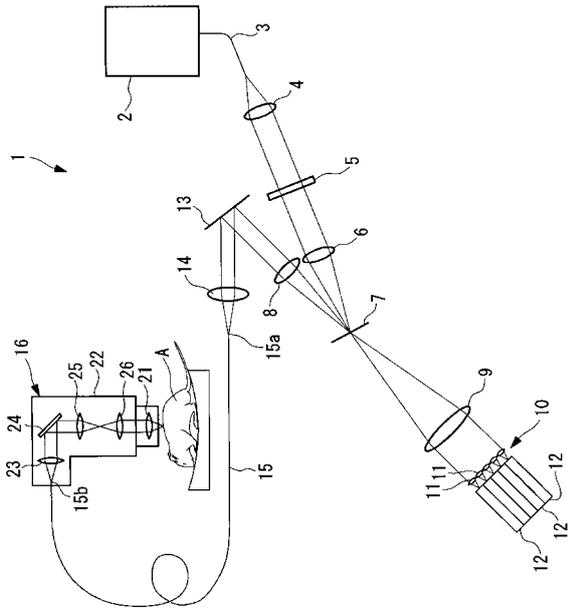
41, 41 ミラーアレイ(ミラー装置)

41a 第1の反射部

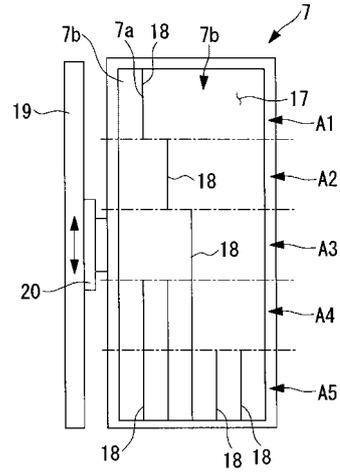
41b 第2の反射部

42 可動ミラー

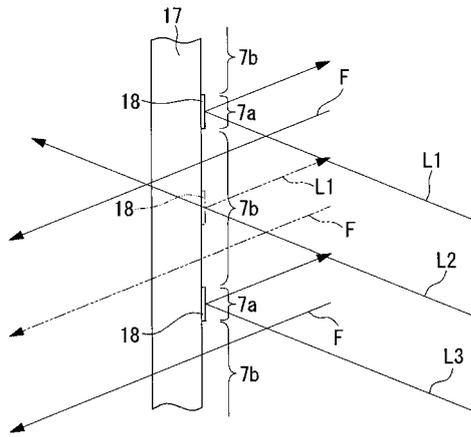
【図 1】



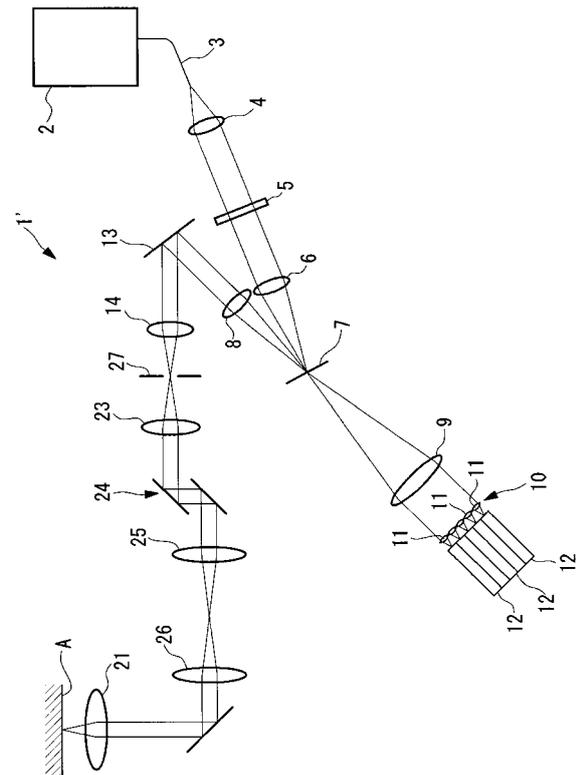
【図 2】



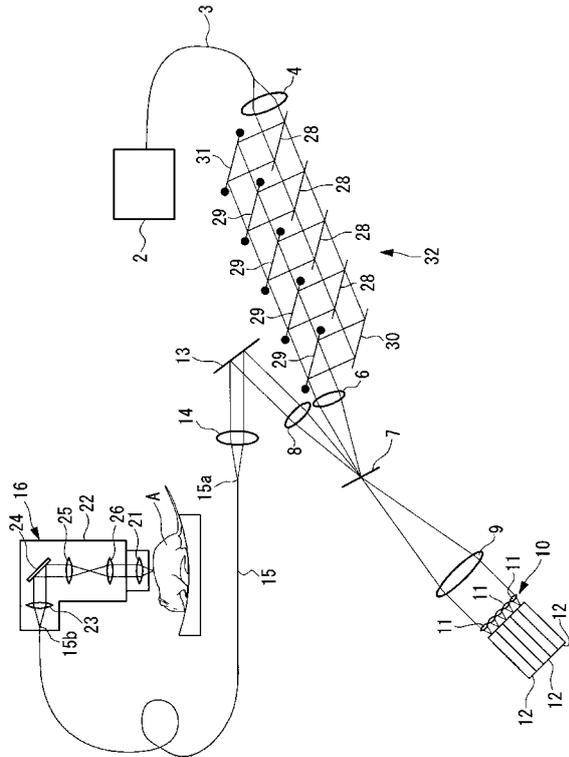
【図 3】



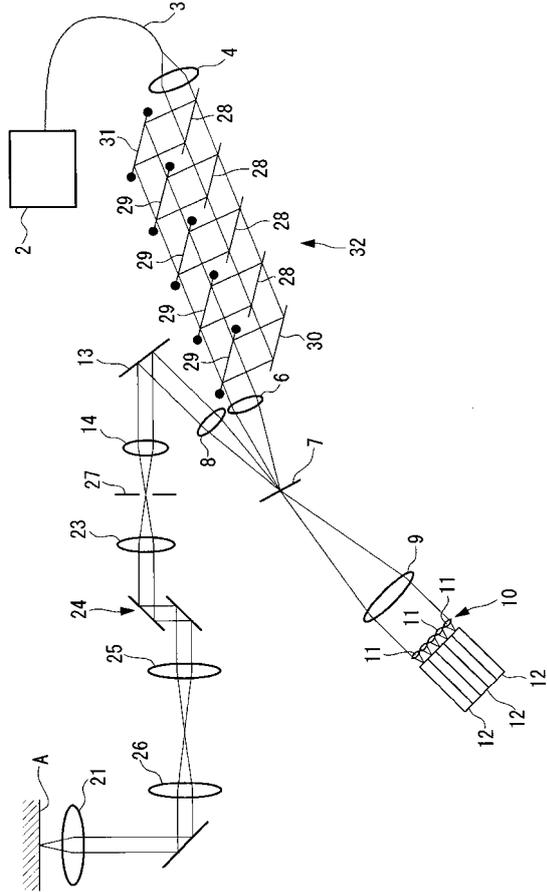
【図 4】



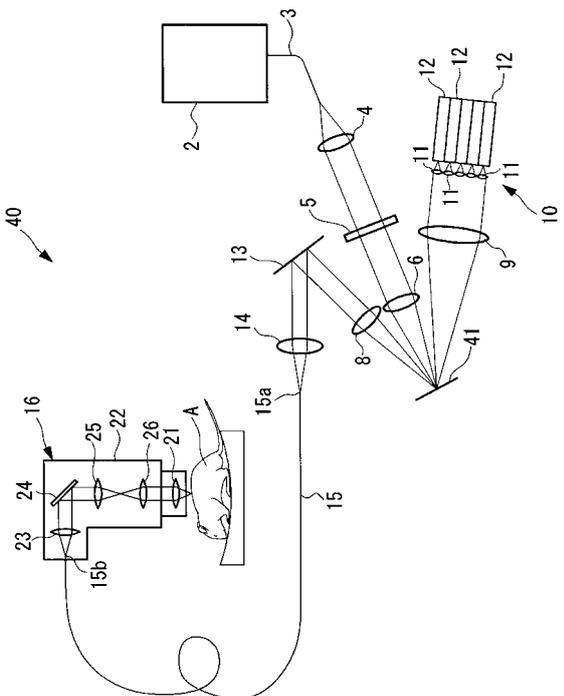
【 図 5 】



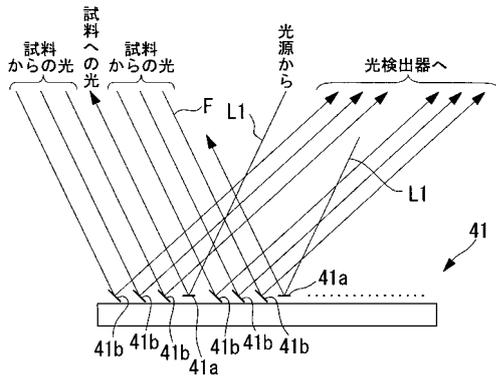
【 図 6 】



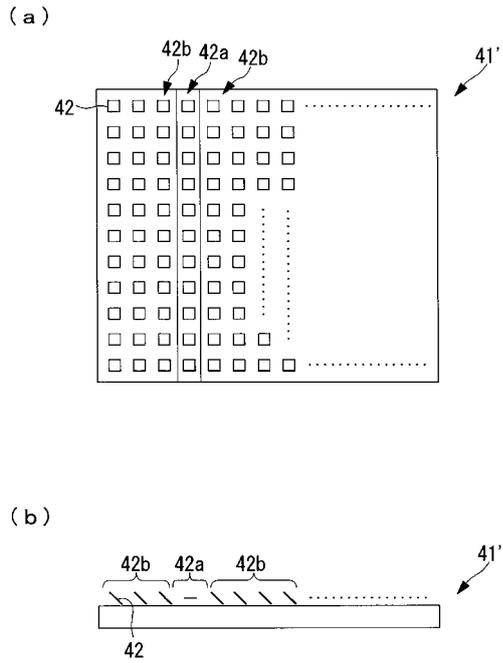
【 図 7 】



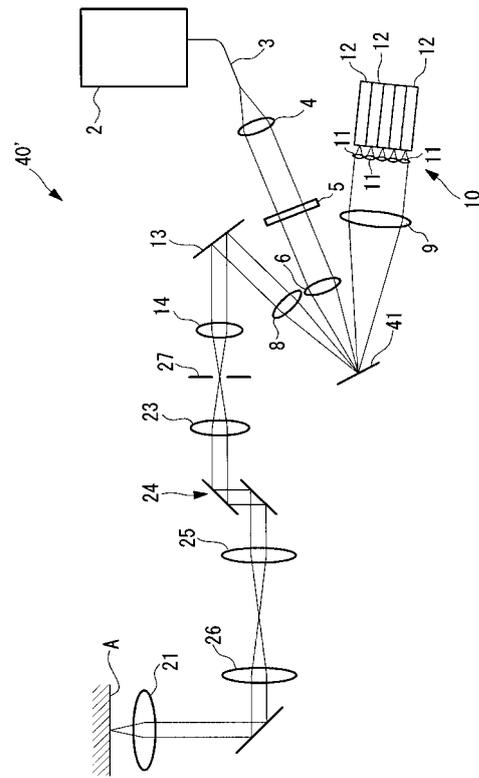
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2003-161888(JP,A)  
特開平07-244238(JP,A)  
特開2004-069574(JP,A)  
米国特許第5751417(US,A)  
特開2002-267933(JP,A)  
特表2004-537747(JP,A)  
特開2002-340673(JP,A)  
特開2003-228034(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00 - 21/74  
G02B 21/00 - 21/36  
G01J 3/00 - 3/52  
JSTPlus/JST7580(JDreamII)