

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-72016

(P2010-72016A)

(43) 公開日 平成22年4月2日(2010.4.2)

(51) Int.Cl.  
G02B 21/00 (2006.01)

F 1  
G02B 21/00

テーマコード (参考)  
2H052

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2008-235948 (P2008-235948)  
(22) 出願日 平成20年9月16日 (2008.9.16)

(71) 出願人 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 山宮 広之  
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  
Fターム(参考) 2H052 AA07 AA09 AC15 AC34 AD34  
AF21

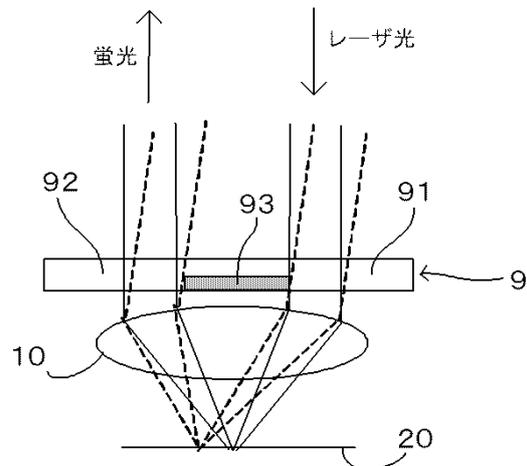
(54) 【発明の名称】 顕微鏡装置

(57) 【要約】

【課題】照明光を容易に走査でき、生体深部の観察に適した顕微鏡装置を提供する。

【解決手段】分離フィルタ9はその一部(領域91)のみをレーザー光が透過可能に構成されているので、レーザー光はこの部分に照射された光のみが通過して対物レンズ10に入る。対物レンズ10によってこのレーザー光は収束されるとともに、光走査ユニット5によってこの収束点は焦点面20上を走査される。このレーザー光によって試料の蛍光指示薬が励起されて、蛍光が発する。この蛍光は対物レンズ10によって捕らえられて、分離フィルタ9に向かうが、分離フィルタ9ではその一部(領域92)のみで蛍光を通過させる。

【選択図】 図3



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

照明光を対物レンズを介して照射することで前記照明光の焦点を前記試料に結ばせるとともに、前記焦点からの戻り光を前記対物レンズを介して取得して検出器で検出する顕微鏡装置において、

前記対物レンズから前記焦点に至る前記照明光の光路と、前記戻り光のうち、前記検出器で検出される光の前記焦点から前記対物レンズに至る光路とが、光路全体に渡り分離されていることを特徴とする顕微鏡装置。

## 【請求項 2】

前記戻り光が蛍光であることを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

10

## 【請求項 3】

前記戻り光が反射、散乱光であることを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 4】

前記照明光の焦点を前記対物レンズの焦点面で走査するとともに、走査された各々の焦点からの戻り光を前記検出器で検出することを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 5】

前記照明光の焦点は、前記照明光の光路中のミラーを駆動することにより走査されることを特徴とする請求項 4 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 6】

前記照明光の焦点は、前記照明光の光路中のマスクパターン部材を駆動することにより走査されることを特徴とする請求項 4 に記載の顕微鏡装置。

20

## 【請求項 7】

前記対物レンズから前記焦点に至る前記照明光が前記対物レンズの瞳位置において通過する領域と、前記戻り光のうち前記検出器で検出される光が前記対物レンズの瞳位置において通過する領域とが、分離されていることを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 8】

前記対物レンズの瞳位置において、前記瞳位置を横断する少なくとも 1 本以上の直線または曲線で分離される区分のそれぞれ別の区分に、前記照明光の通過する領域と前記戻り光の通過する領域が存在することを特徴とする請求項 7 に記載の顕微鏡装置。

30

## 【請求項 9】

前記対物レンズの瞳位置において、前記瞳位置を横断する少なくとも 2 本以上の互いに交差する直線または曲線で放射状に分離される区分のそれぞれ別の区分に、前記照明光の通過する領域と前記戻り光の通過する領域が存在することを特徴とする請求項 8 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 10】

前記対物レンズの瞳位置において、前記瞳位置の内部に存在する少なくとも 1 本以上の閉じた直線または曲線とその内部と外部に分離される区分のそれぞれ別の区分に、前記照明光の通過する領域と前記戻り光の通過する領域が存在することを特徴とする請求項 7 に記載の顕微鏡装置。

40

## 【請求項 11】

前記対物レンズの瞳位置において、前記瞳位置の内部に存在する少なくとも 1 つの円の内部と外部に分離される区分のそれぞれ別の区分に、前記照明光の通過する領域と前記戻り光の通過する領域が存在することを特徴とする請求項 10 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 12】

前記戻り光の光路と、照明光の光路とを分離するための光路制限手段を設けたことを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 13】

前記戻り光は蛍光であり、前記光路制限手段として、波長特性を有するフィルタもしくはミラーを用い、前記検出器で検出される蛍光の光路を制限することを特徴とする請求項 12 に記載の顕微鏡装置。

50

## 【請求項 14】

前記光路制限手段として、波長特性を有するフィルタもしくはミラーを用い、前記対物レンズに入る照明光の光路を制限することを特徴とする請求項 12 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 15】

前記戻り光は反射、散乱光であり、前記光路制限手段として、偏光特性を有するフィルタもしくはミラーを用い、前記検出器で検出される戻り光の光路を制限することを特徴とする請求項 12 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 16】

前記照明光の光路または前記戻り光の光路の一部が、前記光路制限手段としての遮光マスクによって制限されることを特徴とする請求項 12 に記載の顕微鏡装置。

10

## 【請求項 17】

前記光路制限手段を前記対物レンズの瞳位置近傍に設けたことを特徴とする請求項 12 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 18】

前記光路制限手段を前記対物レンズの瞳位置がリレーされた位置の近傍に設けたことを特徴とする請求項 12 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 19】

前記光路制限手段を前記照明光または前記戻り光が平行光をなす光路の部分に設けたことを特徴とする請求項 12 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 20】

前記照明光の光路と、前記戻り光の光路とを別々の光学部品により構成したことを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

20

## 【請求項 21】

前記照明光の焦点の集合がライン状であるとともに、前記検出器による検出される検出点の集合もまた、前記焦点の集合に一致したライン状であることを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

## 【請求項 22】

前記照明光が近赤外レーザ光であることを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

30

## 【0001】

本発明は、照明光を対物レンズを介して照射することで前記照明光の焦点を前記試料に結ばせるとともに、前記焦点からの戻り光を前記対物レンズを介して取得して検出器で検出する顕微鏡装置に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

顕微鏡観察において、生体の深部観察を行う際には、焦点面以外からの戻り光の影響により、画像のSNは劣化する。この現象はたとえ共焦点顕微鏡を用いたとしても充分取り除くことはできていない。

## 【0003】

40

この、問題点を解消するための技術（USP5,973,828、USP5,969,854、USP6,423,956、DE 4326473）が提案されている。

## 【0004】

これらの技術では、二つの対物レンズを用いて、それぞれの焦点領域が交差するように配置することと共焦点顕微鏡技術を組み合わせるによって、それらの交差領域のみの情報が得られることにより、水平分解能は少々悪くなるが、主として深度方向の分解能を向上させるものである（USP5,973,828の図2参照）。

## 【0005】

また、これらの構成を比較的低NAのレンズで構成した場合には次の効果があることが非特許文献2に記載されている。

50

- (1) 光軸方向の分解能が向上する。
- (2) NAが小さいため、生体深部観察においても収差が発生しにくい。
- (3) 小さい径のものが製作しやすい。
- (4) WDを長くできて深部観察に適する。
- (5) 二つの光路が別々のため、深部観察を行っても観察面以外からの戻り光などのノイズ光の影響を受けにくい。

## 【0006】

また、USP5,973,828の図7には、二つの対物レンズの位置関係を保ったまま焦点位置を走査する走査機構が開示されている。また、非特許文献1、非特許文献2には、対象物をステージ等で移動させて走査する方法が開示されている。

10

## 【0007】

【特許文献1】米国特許第5,973,828号明細書

【特許文献2】米国特許第5,969,854号明細書

【特許文献3】米国特許第6,423,956号明細書

【特許文献4】独国特許第4326473号明細書

【非特許文献1】「Confocal microscope with large field and working distance」, Applied Optics, Vol.38, No.22, pp.4870

【非特許文献2】「Dual-axis confocal microscope for high-resolution in vivo imaging」, Optics Letters, Vol.28, No.6, pp414

## 【発明の開示】

20

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

しかしながら、角度のついた二つの対物レンズを通る光の焦点の位置関係を保ったまま焦点位置を走査する機構は複雑な上に、走査に時間がかかることが考えられる。また、ステージ等を移動させて走査する方法を適用する場合も、実際には極めて長時間の走査時間がかかると考えられる。

## 【0009】

本発明の目的は、照明光を容易に走査でき、生体深部の観察に適した顕微鏡装置を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

30

## 【0010】

本発明の顕微鏡装置は、照明光を対物レンズを介して照射することで前記照明光の焦点を前記試料に結ばせるとともに、前記焦点からの戻り光を前記対物レンズを介して取得して検出器で検出する顕微鏡装置において、前記対物レンズから前記焦点に至る前記照明光の光路と、前記戻り光のうち、前記検出器で検出される光の前記焦点から前記対物レンズに至る光路とが、光路全体に渡り分離されていることを特徴とする。

この顕微鏡装置によれば、対物レンズから焦点に至る照明光の光路と、戻り光のうち、検出器で検出される光の焦点から対物レンズに至る光路とが、光路全体に渡り分離されているので、照明光を容易に走査でき、生体深部の観察に適している。

## 【0011】

40

前記戻り光が蛍光であってもよい。

## 【0012】

前記戻り光が反射、散乱光であってもよい。

## 【0013】

前記照明光の焦点を前記対物レンズの焦点面で走査するとともに、走査された各々の焦点からの戻り光を前記検出器で検出してもよい。

## 【0014】

前記照明光の焦点は、前記照明光の光路中のミラーを駆動することにより走査されてもよい。

## 【0015】

50

前記照明光の焦点は、前記照明光の光路中のマスクパターン部材を駆動することにより走査されてもよい。

【0016】

前記対物レンズから前記焦点に至る前記照明光が前記対物レンズの瞳位置において通過する領域と、前記戻り光のうち前記検出器で検出される光が前記対物レンズの瞳位置において通過する領域とが、分離されてもよい。

【0017】

前記対物レンズの瞳位置において、前記瞳位置を横断する少なくとも1本以上の直線または曲線で分離される区分のそれぞれ別の区分に、前記照明光の通過する領域と前記戻り光の通過する領域が存在してもよい。

10

【0018】

前記対物レンズの瞳位置において、前記瞳位置を横断する少なくとも2本以上の互いに交差する直線または曲線で放射状に分離される区分のそれぞれ別の区分に、前記照明光の通過する領域と前記戻り光の通過する領域が存在してもよい。

【0019】

前記対物レンズの瞳位置において、前記瞳位置の内部に存在する少なくとも1本以上の閉じた直線または曲線でその内部と外部に分離される区分のそれぞれ別の区分に、前記照明光の通過する領域と前記戻り光の通過する領域が存在してもよい。

【0020】

前記対物レンズの瞳位置において、前記瞳位置の内部に存在する少なくとも1つの円の内部と外部に分離される区分のそれぞれ別の区分に、前記照明光の通過する領域と前記戻り光の通過する領域が存在してもよい。

20

【0021】

前記戻り光の光路と、照明光の光路とを分離するための光路制限手段を設けてもよい。

【0022】

前記戻り光は蛍光であり、前記光路制限手段として、波長特性を有するフィルタもしくはミラーを用い、前記検出器で検出される蛍光の光路を制限してもよい。

【0023】

前記光路制限手段として、波長特性を有するフィルタもしくはミラーを用い、前記対物レンズに入る照明光の光路を制限してもよい。

30

【0024】

前記戻り光は反射、散乱光であり、前記光路制限手段として、偏光特性を有するフィルタもしくはミラーを用い、前記検出器で検出される戻り光の光路を制限してもよい。

【0025】

前記照明光の光路または前記戻り光の光路の一部が、前記光路制限手段としての遮光マスクによって制限されてもよい。

【0026】

前記光路制限手段を前記対物レンズの瞳位置近傍に設けてもよい。

【0027】

前記光路制限手段を前記対物レンズの瞳位置がリレーされた位置の近傍に設けてもよい

40

【0028】

前記光路制限手段を前記照明光または前記戻り光が平行光をなす光路の部分に設けてもよい。

【0029】

前記照明光の光路と、前記戻り光の光路とを別々の光学部品により構成してもよい。

【0030】

前記照明光の焦点の集合がライン状であるとともに、前記検出器による検出される検出点の集合もまた、前記焦点の集合に一致したライン状であってもよい。

【0031】

50

前記照明光が近赤外レーザ光であってもよい。

【発明の効果】

【0032】

本発明の顕微鏡装置によれば、対物レンズから焦点に至る照明光の光路と、戻り光のうち、検出器で検出される光の焦点から対物レンズに至る光路とが、光路全体に渡り分離されているので、照明光を容易に走査でき、生体深部の観察に適している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

以下、本発明による顕微鏡装置の実施形態について説明する。

【実施例1】

【0034】

以下、図1～図4を参照して、実施例1の顕微鏡装置について説明する。

【0035】

図1は、実施例1の顕微鏡装置の構成を示すブロック図である。

【0036】

図1に示すように、本実施例の顕微鏡装置1は、近赤外の波長のレーザ光を出力するレーザ光源2を備え、その前面には電動シャッタ3が配置されている。さらに、レーザ光の向きを変えるためのダイクロイックミラー4とレーザ光を走査するための走査光学ユニット5とを備えている。

【0037】

ダイクロイックミラー4はレーザ光の波長を反射し、レーザ光により励起された蛍光を透過させる特性を有する。走査光学ユニット5は、一本の軸の周りに回転可能な可変ミラー5aと、可変ミラー5aの軸にほぼ直交する軸の周りに回転可能な可変ミラー5bとを備える。

【0038】

また、顕微鏡装置1は光を収束させる瞳投影レンズ6とレーザビームを偏向するミラー7及び結像レンズ8と対物レンズ10を備える。対物レンズ10の瞳位置の近傍には分離フィルタ9が設けられている。

【0039】

図2は、分離フィルタ9の構造を示す図である。図2に示すように、分離フィルタ9はレーザ光のみを通過する領域91と、上記の蛍光のみを通過する領域92と、遮光領域93とによって構成されている。

【0040】

また、顕微鏡装置1は試料12を載せるステージ11を有する。また、ダイクロイックミラー4の近傍には試料12から発生した蛍光を選択的に透過する蛍光フィルタ13と、蛍光ビームを収束させるレンズ14とピンホールが形成されたピンホール部材15と、ピンホール部材15のピンホールを通過した光を検出する検出器16とが設けられている。

さらに顕微鏡装置1はコントローラ17と表示モニタ18を有し、コントローラ17による制御に基づいて、電動シャッタ3の開閉、光学走査ユニット5によるレーザ光の走査、光検出器16からの信号の取得、表示モニタ18への情報出力が実行される。

【0041】

次に、本実施例の顕微鏡装置の動作について説明する。

【0042】

試料12には、レーザ光源2からの光によって励起される蛍光指示薬が導入された状態で、ステージ11上に配置される。

【0043】

レーザ光源2からのレーザ光は、電動シャッタ3が開いている時には電動シャッタ3を通過し、ダイクロイックミラー4によって光走査ユニット5へと導かれ、光走査ユニット5によって任意の方向に走査される。レーザ光はさらに瞳投影レンズ6、反射ミラー7、結像レンズ8を通過し、対物レンズ10の瞳位置近傍の分離フィルタ9に入射される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

図 3 は、分離フィルタ 9 の機能を示す図である。

## 【 0 0 4 5 】

分離フィルタ 9 はその一部（領域 9 1）のみをレーザ光が透過可能に構成されているので、レーザ光はこの部分に照射された光のみが通過して対物レンズ 10 に入る。対物レンズ 10 によってこのレーザ光は収束されるとともに、光走査ユニット 5 によってこの収束点は焦点面 20 上を走査される。このレーザ光によって試料の蛍光指示薬が励起されて、蛍光が発する。この蛍光は対物レンズ 10 によって捕らえられて、分離フィルタ 9 に向かうが、分離フィルタ 9 ではその一部（領域 9 2）のみで蛍光を通過させる。

## 【 0 0 4 6 】

図 1 に示すように、分離フィルタ 9 を通過した蛍光は、レーザ光とは逆向きに進み、結像レンズ 8、反射ミラー 9、瞳投影レンズ 6、光走査ユニット 5 を介してダイクロイックミラー 4 へ導かれる。蛍光はダイクロイックミラー 4 を透過して、蛍光フィルタ 13 によって特定の波長成分が選択的に透過されて、レンズ 14 と、ピンホール 15 によって焦点面 20 からの蛍光のみが選択されて検出器 15 へ入る。

## 【 0 0 4 7 】

光検出器 16 からの出力信号は、コントロールユニット 17 へ導かれ、走査光学ユニット 5 による走査制御に同期してデジタル信号に変換され、走査位置と対応させて画像データを作成し、表示モニタ 18 上に表示し、あるいは、作成されたデータを内部のメモリに記憶する。

## 【 0 0 4 8 】

図 4 は、対物レンズ 10 の収束点近傍を示す図である。図 4 に示すように、右側からのレーザ光により蛍光物質を励起して、左側から蛍光を検出しており、対物レンズ 10 の瞳を部分的にしか使用していないため、水平方向分解能はやや悪くなるが、図 4 のハッチング領域の蛍光が選択的に検出されるために、深さ方向分解能が優れている。

## 【 0 0 4 9 】

このとき、レーザ光の光軸と検出蛍光の光軸が概ね 90 度となるように構成するときに図 4 に示すハッチング領域が最も小さくなるので最も良好な分解能が得られる。また、レーザ光の光路と検出蛍光の光路が分離されているので、レーザ光により励起される図 4 のハッチング領域以外の蛍光が、容易には検出されなくなっており、深部観察時に S N 良く画像が撮影できる。

## 【 0 0 5 0 】

また、ハッチング領域のみの蛍光が戻ってくるので、ピンホール 15 を用いなくても共焦点効果は得られるが、ピンホール 15 を挿入することで一層 S N が良くなる。

## 【 0 0 5 1 】

ここで分離フィルタ 9 の設置位置は対物レンズ 10 の瞳位置の近傍が望ましいが、瞳位置が投影される光走査ユニット 5 内部かその近傍でも良く、また光走査ユニット 5 とダイクロイックミラー 4 の間の平行光路に挿入しても良い。分離フィルタは、対物レンズ 10 の瞳位置がリレーされた位置の近傍に設置されればよい。

## 【 0 0 5 2 】

また、分離フィルタのパターンはこれに限らず、透過する光を選択する各領域が放射状に、あるいは、同心円状に設けられてもよく、同様の効果が得られる他のパターンでも良い。

## 【 0 0 5 3 】

このように、実施例 1 の顕微鏡装置によれば、レーザ光を投光する光学系と、検出する光学系を分離したので、光軸方向の分解能に優れている。また、投光系の光学系と検出系の光学系とを別々に構成したので、投光系の光学系の通る様々な場所からのノイズとなる蛍光が、検出系の光路に入り難い構成となっており、極めて S N 比が良く、組織の深部観察に適している。

## 【 実施例 2 】

10

20

30

40

50

## 【0054】

以下、図5を参照して、実施例2の顕微鏡装置について説明する。

## 【0055】

図5は、実施例2の顕微鏡装置の構成を示すブロック図である。実施例1と同一構成要素には同一符合を付し、説明を省略する。

## 【0056】

図2に示すように、実施例2の顕微鏡装置1Aでは、レーザ光源2Aからのレーザ光の光束を絞り、光軸中心を外した光路を通していている。また、戻り光(蛍光)を選択する遮光マスク21が設けられている。

## 【0057】

図5において、太線はレーザ光の光束を示している。レーザ光の光路は太線で示す光路を通り、図5において対物レンズ10の右側から光が入る。試料11からの蛍光は図の実線で示すように瞳径を満たす太い光束で戻り、遮光マスク21でその一部のみが取り出され、ピンホール15を通った光が光検出器16で検出される。

## 【0058】

遮光マスク21を通る光は対物レンズ10の左側を通る光束なので、遮光マスク21は、実施例1の分離フィルタ9と実質的に同様に作用する。また、遮光マスクはピンホール部材15の近傍に設けても良い。

## 【0059】

本実施例の顕微鏡装置では、実施例1の効果に加えて、レーザ光の大半を使用できるので効率が良いという利点がある。

## 【実施例3】

## 【0060】

以下、図6~図8を参照して、実施例3の顕微鏡装置について説明する。実施例1と同一構成要素についての説明は省略する。実施例3の顕微鏡装置では、実施例1の顕微鏡装置に対し、分離フィルタの構造が異なっている。

## 【0061】

図6は、本実施例の顕微鏡装置で使用される分離フィルタ9Aの構造を示す図である。

## 【0062】

図6に示すように、分離フィルタ9Aはレーザ光のみを通過する領域91A、遮光領域93Aおよび蛍光のみを通過する領域92Aが順次、内側から外側に向けて同心円状に設けられている。

## 【0063】

図7は、分離フィルタ9Aの機能を示す図である。

## 【0064】

図7に示すように、本実施例の顕微鏡装置では、レーザ光源からのレーザ光の光束を絞り、分離フィルタ9Aの領域91Aに対応する光束としている。領域91Aを通ったレーザ光は対物レンズ10で収束される。収束点からの蛍光は領域92Aを通ったものが同じ光路を返って行く。

## 【0065】

図8は、対物レンズ10の収束点近傍を示す図である。図8に示すように、本実施例では、光軸に近い領域からのレーザ光により蛍光物質を励起して、外側から蛍光を検出している。これにより、図8のハッチング領域の蛍光が選択的に検出されるために、実施例1と同様、深さ方向分解能が優れている。

## 【0066】

ここで分離フィルタ9Aの設置位置は対物レンズ10の瞳位置の近傍が望ましいが、瞳位置が投影される光走査ユニット5内部かその近傍でも良く、また光走査ユニット5とダイクロミックミラー4の間の平行光路に挿入しても良い。分離フィルタは、対物レンズ10の瞳位置がリレーされた位置の近傍に設置されればよい。

## 【0067】

10

20

30

40

50

本実施例の顕微鏡装置では、実施例 1 の効果に加えて、レーザ光の大半を使用できるので効率が良いという利点がある。

【実施例 4】

【0068】

以下、図 9 を参照して、実施例 4 の顕微鏡装置について説明する。実施例 4 の顕微鏡装置では、実施例 1 と異なる走査方式を採用している。

【0069】

図 9 は、実施例 4 の顕微鏡装置の構成を示すブロック図である。実施例 1 と同一構成要素には同一符合を付し、説明を省略する。

【0070】

図 9 に示すように、本実施例の顕微鏡装置では、レーザ光源からのレーザ光がスキャナユニット 40 に入射される。

【0071】

スキャナユニット 40 は、レーザ光源に連結された光ファイバの先端からレーザ光を照射するレーザ光照射部 41 と、コリメータレンズ 42 とを備える。また、スキャナユニット 40 は、アレイ状にマイクロレンズが配置されたマイクロレンズディスク 43 と、同じパターンでピンホールが配置されたピンホールディスク 44 とを有し、それらは連結ドラム 45 で連結されるとともに、モータ 46 で一体的に回転可能な構成になっている。マイクロレンズディスク 43 とピンホールディスク 44 の間にはダイクロイックミラー 47 が配置されている。また、スキャナユニット 40 には蛍光フィルタ 48、カメラレンズ 49

10

20

、カメラ 50 が配置されている。

【0072】

スキャナユニット 40 のピンホールディスク 44 の下部には結像レンズ 8 と対物レンズ 10 が配置されている。対物レンズ 10 の瞳位置の近傍には実施例 1 と同様の分離フィルタ 9 が設けられている。この分離フィルタ 9 に代えて、実施例 3 の分離フィルタ 9A を用いてもよい。カメラ 50 とモータ 46 はコントローラ 17 に接続され、回転の同期と露光時間が調整されている。

【0073】

次に、本実施例の顕微鏡装置の動作について説明する。

【0074】

レーザ光照射部 41 における光ファイバの先端からの光は、コリメータレンズ 42 によって平行光へと変換される。この光はマイクロレンズディスク 43 に照射され、個々のマイクロレンズの作用によってダイクロイックミラー 47 を透過した後、ピンホールディスク 44 のマイクロレンズに対応するピンホール上で焦点を結ぶようになっている。

【0075】

ピンホールディスク 44 を通過した光は、結像レンズ 8 において、通過したピンホールディスク 44 のピンホールに対応する傾きを有する平行光に変換される。対物レンズ 10 に平行光が入射されると、その傾きに応じて焦点面に焦点を結像するので、対物レンズ 10 に入射された光はその傾きに対応した位置で焦点を結ぶ。

【0076】

図 9 では光軸中心の光を実線で示し、光軸からずれた光線の例を破線で示す。焦点で発生した蛍光は、対物レンズ 10 で集められて平行光となる。ここで分離フィルタ 9 の効果によって、入射光は図 9 において対物レンズ 10 の右側から照射され、対物レンズ 10 の左側を通る光がフィルタ 9 を通過して、戻っていく（図 3 参照）。この蛍光は同じ光路を通過して再びピンホールディスク 44 の同じピンホールを通過する。ここでピンホールを通過した光はダイクロイックミラー 47 によって反射されて蛍光フィルタ 48 で波長成分が選択され、カメラレンズ 49 の作用によりカメラ 50 で結像する。

40

【0077】

ここでマイクロレンズディスク 43 とピンホールディスク 44 を一体的に回転させると、ピンホールを通過する光が、対応する焦点面上を走査し、さらに個々の蛍光は再び同じ

50

ピンホールを通過した後に、カメラ50の撮像素子上を走査する。この動作によって焦点面の蛍光がカメラ50に投影されて観察が可能となる。また、この際に焦点面以外の光は、ピンホールをほとんど通過できないためにほとんどカメラ50に到達することができない。これによって、カメラ50は焦点面の光のみの共焦点画像を撮影することになる。

【0078】

また、図3のように右側から励起して、左側から検出しており、対物レンズ10の瞳を部分的にしか使用していないため、水平方向分解能はやや悪くなるが、図3のハッチング領域の蛍光が検出されるために、深さ方向分解能が優れている。

【0079】

このとき、レーザ光の光軸と検出蛍光の光軸が概ね90度となるように構成するときに図3のハッチング領域が最も小さくなるので分解能に優れる。また、本実施例においても、レーザ光の光路と検出蛍光の光路が分離されているので、レーザ光が励起した図3のハッチング領域以外の蛍光が、容易には検出されなくなっており、深部観察時にSN良く画像が撮影できる。

【0080】

なお、試料近傍で、隣り合ったピンホールを通る光学系の光路どうしが重なると、SNの劣化を招くので、極力試料付近での光路が重ならないような間隔を有するピンホールバターンのピンホールディスク54等を採用することが望ましい。

【0081】

実施例4の顕微鏡装置では、ディスクの回転によりレーザ光を走査するスキャナユニット40を使用するので、実施例1の効果に加えて、走査速度が速いという利点がある。

【実施例5】

【0082】

以下、図10を参照して、実施例5の顕微鏡装置について説明する。

【0083】

図10は、実施例4の顕微鏡装置における対物レンズ周辺の構成を示すブロック図である。図10は、実施例1と異なる部分を示しており、他の部分は実施例1と同様に構成されている。

【0084】

本実施例の顕微鏡装置では、結像レンズ8から試料12に至る光学的な構成が実施例1と異なっている。

【0085】

図10に示すように、本実施例ではダイクロイックミラー51を用いて、結像レンズ8から試料12に至る照明光の光路と検出系の光路を分離している。すなわち、結像レンズ8の先には、レーザ光の波長の光を反射しレーザ光の波長よりも長い波長の光を反射するダイクロイックミラー51が配置されている。さらにその近傍には3枚の反射ミラー52, 53, 54が配置されている。さらに対物レンズ10Aとして、比較的径の大きいものが選定されている。

【0086】

このように構成された本実施例の顕微鏡装置では、結像レンズ8で平行光に変換された近赤外のレーザ光は、ダイクロイックミラー51およびミラー52で反射され、対物レンズ10Aに対して、その主軸に平行で主軸にオフセットした光として入射される。

【0087】

図10に示すように、光は試料12で焦点を結び、試料12からは蛍光が発せられる。この蛍光の一部は、図10に示すように照明光と対物レンズ10Aの主軸に対して対称となる別の光路を通過して対物レンズ10Aで再び平行光に変換され、ミラー54およびミラー53で反射される。この蛍光は、蛍光の波長に対して透過特性を有するダイクロイックミラー51を透過して、照明光と同じ光路を戻す。以下は実施例1と同様に戻り、ダイクロイックミラー4を透過して検出器16で検出される(図1)。

【0088】

10

20

30

40

50

実施例 4 の顕微鏡装置によれば、実施例 1 と同様、レーザ光を投光する光学系と、検出する光学系を分離したので、光軸方向の分解能に優れている。また、投光系の光学系と検出系の光学系とを別々に構成したので、投光系の光学系の通る様々な場所からのノイズとなる蛍光が、検出系の光路に入り難い構成となっており、極めて S N 比が良く、組織の深部観察に適している。

【実施例 6】

【0089】

以下、図 1 1 を参照して、実施例 6 の顕微鏡装置について説明する。

【0090】

図 1 1 は、実施例 6 の顕微鏡装置 1 B の構成を示すブロック図である。実施例 1 と同一構成要素には同一符合を付し、その説明は省略する。

10

【0091】

実施例 6 の顕微鏡装置では、ライン状の光を投影する。本実施例の顕微鏡装置は、図示しないレーザ光からのレーザを照射するファイバ 6 1 を有する。ファイバ 6 1 の先には、コリメートレンズ 6 2、シリンダリカルレンズ 6 3、紙面に垂直方向に延びるスリットが開口したスリット部材 6 4、および結像レンズ 6 5 がある。光走査ユニット 5 A は紙面に垂直な回転軸で回転するガルバノミラー 5 a を有する。実施例 1 におけるガルバノミラー 5 b (図 1) に代えて、固定ミラー 6 8 が配置されている。また、実施例 1 におけるピンホール部材 1 5 (図 1) に代えて、紙面に垂直方向に延びるスリットが開口したスリット部材 6 6 が配置され、光検出器としてライン CCD 6 7 が用いられている。

20

【0092】

以下、本実施例の顕微鏡装置 1 B の動作について説明する。

【0093】

レーザ光源からの光は、光ファイバ 6 1 によって点光源として伝えられ、コリメートレンズ 6 2 で平行光に変換され、シリンダリカルレンズ 6 3 によってライン状に集光される。この集光点に配置されたスリット 6 3 を通過した光は、結像レンズ 6 4 を通過する。

【0094】

この後、この光は図 1 1 に示すように、実施例 1 と同様の光路を介して対物レンズ 1 0 によって焦点面に結像され、紙面に垂直なライン状となる。このラインからの蛍光は対物レンズ 1 0 で回収されるが、ライン上の個々の点は、実施例 1 と同様、分離フィルタ 9 の効果で図 3 のハッチング領域のみの蛍光が回収される。この蛍光はレンズ系によってスリット部材 6 6 のスリットに再び結像され、このスリットを通過した焦点面からの光のみがライン CCD 6 7 で検出される。

30

【0095】

さらに、ガルバノミラー 5 a を操作することにより、ラインは焦点面上をラインに垂直な方向に走査され、この情報はライン CCD 6 7 で検出されて、コントローラ 2 0 で画像化される。

【0096】

実施例 6 の顕微鏡装置 1 B では、照明光の焦点の集合がライン状であるとともに、前記検出される検出点の集合もまた、焦点の集合に一致したライン状としたので、実施例 1 の効果に加えて、ラインを 1 方向に走査する構成にしたので走査時間を短縮できるという利点がある。

40

【実施例 7】

【0097】

以下、図 1 2 を参照して、実施例 7 の顕微鏡装置について説明する。

【0098】

図 1 2 は、実施例 7 の顕微鏡装置 1 C の構成を示すブロック図である。実施例 1 と同一構成要素には同一符合を付し、その説明は省略する。

【0099】

本実施例の顕微鏡装置 1 C は、投光光学系と検出光学系を完全に分離した構成をとる。

50

## 【0100】

図12に示すように、投光系の光学系は、実施例1における光路中のダイクロイックミラー4を用いていない。また、結像レンズ8の光は、対物レンズ10にオフセットして入射するようになっており、実施例1の分離フィルタ9は除去されている。また対物レンズ10で回収される蛍光は、投光系の光と対物レンズ12の光軸に対して対称となり、結像レンズ71、ミラー72、瞳投影レンズ73、2枚のガルバノミラー74a、74bを有する光走査ユニット74を有する。蛍光フィルタ13から光検出器16に至る光路は、実施例1と同様に構成されている。

## 【0101】

本実施形態の顕微鏡装置1Cでは、レーザ光源2の光は、電動シャッタ3、光走査ユニット5、瞳投影レンズ6、反射ミラー7、結像レンズ8を介して、対物レンズ10に入射し、対物レンズ10によって焦点を結ぶ。焦点からの蛍光は対物レンズ10で回収される。このとき、結像レンズ8からの光が対物レンズ10にオフセットして入射し、回収される蛍光もオフセットした方向に回収されることで、実施例1と同様の効果で図3のハッチング領域のみからの蛍光が回収される。

## 【0102】

この蛍光は平行光に変えられて結像レンズ71を通りミラー72で反射し、瞳投影レンズ73によって、再び平行光に変換され、光操作ユニット74を通り、蛍光フィルタ13で波長成分を選択される。その後、レンズ14の作用でピンホール15に集光され、レンズ14とピンホール15によって焦点面からの光のみが選択されて検出器16へ入る。

## 【0103】

また、コントロールユニット17は光走査ユニット5で焦点面上を走査させる時には、同期して光走査ユニット74を駆動して、光走査ユニット74に入る平行光の向きが変化しても、ピンホール15に向かう光の向きが変化しないように制御を行う。

## 【0104】

光検出器16からの出力信号は、コントロールユニット17へ導かれ、走査制御に同期してデジタル信号に変換され、走査位置と対応させて画像データを作成して表示モニタ18上に表示し、あるいは、画像データを内部のメモリに記憶する。

## 【0105】

このように、実施例7の顕微鏡装置1Cでは、照明光の光路と戻り光の光路とを別々の光学部品により構成し、光路を完全に分離したので、実施例1の効果に加えて、投光系の戻り光などの迷光を確実に除くことができるため、一層画像のSNが良くなるという効果がある。

## 【実施例8】

## 【0106】

以下、図13および図14を参照して、実施例8の顕微鏡装置について説明する。

## 【0107】

図13は、実施例8の顕微鏡装置1Dの構成を示すブロック図、図14は、分離フィルタの機能を示す図である。実施例1と同一構成要素には同一符合を付し、その説明は省略する。

## 【0108】

本実施例の顕微鏡装置は、戻り光が蛍光ではなく反射、散乱光である顕微鏡装置に本発明を適用したものである。

## 【0109】

図13に示すように、顕微鏡装置1Dでは、実施例1におけるダイクロイックミラー4の代わりに偏光ビームスプリッタ81が用いられ、蛍光フィルタ13の代わりに偏光フィルタ84が用いられる。また、分離フィルタ9の代わりに、偏光を用いた分離フィルタ82が用いられている。図14に示すように、分離フィルタ82の右側領域82aと左側領域82bは、それぞれ通過させる直線偏光の偏光方向が90度異なった偏光フィルタにより構成され、右側領域82aと左側領域82bの間には遮光領域82cが設けられている

10

20

30

40

50

。さらに対物レンズ 10 の前には、1/4 波長板 83 が挿入されている。

【0110】

このように構成された顕微鏡装置 1D では、レーザ光は直線偏光を有し偏光ビームスプリッタ 81 で反射した後、実施例 1 と同様の光路を通り、分離フィルタ 82 に入る。ここでレーザ光の偏光を通すように構成された、分離フィルタ 82 の右側領域 82a のみを透過する。この光は 1/4 波長板 83 で円偏光へと変換され、対物レンズ 10 によって焦点を結ぶ。焦点からの反射、散乱光は対物レンズ 10 で集められて、もう一度 1/4 波長板 83 を通過することにより、入射レーザとは 90 度偏光方向の異なる偏光となり、分離フィルタ 82 の左側領域 82b を透過する。ここで戻り光は、右側領域 82a とは偏光方向が 90 度異なっているので右側領域 82a は透過できない。左側領域 82b を透過した光は、レーザ光の光路を逆方向に戻り、今度は偏光ビームスプリッタ 81 を透過した後に、偏光フィルタ 84 でその偏光成分を選択され、ピンホール 18 を介して検出器 19 で検出される。

10

【0111】

このように、実施例 8 の顕微鏡装置によれば、生体深部の反射、散乱光を検出できるようになる。また、レーザ光を投光する光学系と、検出する光学系を分離したので、光軸方向の分解能に優れている。また、投光系の光学系と検出系の光学系とを別々に構成したので、投光系の光学系の通る様々な場所からのノイズとなる光が、検出系の光路に入り難い構成となっており、極めて SN 比が良く、組織の深部観察に適している。

20

【実施例 9】

【0112】

以下、図 15 を参照して、実施例 9 の顕微鏡装置について説明する。

【0113】

図 15 は、実施例 1 の顕微鏡装置 1 に使用される分離フィルタ 9 に代えて使用される分離フィルタ 9B の構造を示す図である。他の要素は実施例 1 と同様である。

【0114】

分離フィルタ 9B は、透過光を選択する領域を放射状に配置したものである。図 15 に示すように、分離フィルタ 9B はレーザ光のみを通過する領域 91B と、蛍光のみを通過する領域 92B と、遮光領域 93B とによって構成されている。領域 91B および領域 92B が、それぞれ光軸を対象点として対向した位置に配置されている。

30

【0115】

分離フィルタ 9B では、投光系と検出系が対物レンズ 10 の瞳のそれぞれ向かいあう位置を使用するので、焦点が小さくなり、より分解能が向上する。

【0116】

本発明の適用範囲は上記実施形態に限定されることはない。本発明は、照明光を対物レンズを介して照射することで照明光の焦点を試料に結ばせるとともに、焦点からの戻り光を対物レンズを介して取得して検出器で検出する顕微鏡装置に対し、広く適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0117】

40

【図 1】実施例 1 の顕微鏡装置の構成を示すブロック図。

【図 2】分離フィルタの構造を示す図。

【図 3】分離フィルタの機能を示す図。

【図 4】対物レンズの収束点近傍を示す図。

【図 5】実施例 2 の顕微鏡装置の構成を示すブロック図。

【図 6】分離フィルタの構造を示す図。

【図 7】分離フィルタの機能を示す図。

【図 8】対物レンズの収束点近傍を示す図。

【図 9】実施例 4 の顕微鏡装置の構成を示すブロック図。

【図 10】対物レンズ周辺の構成を示すブロック図。

50

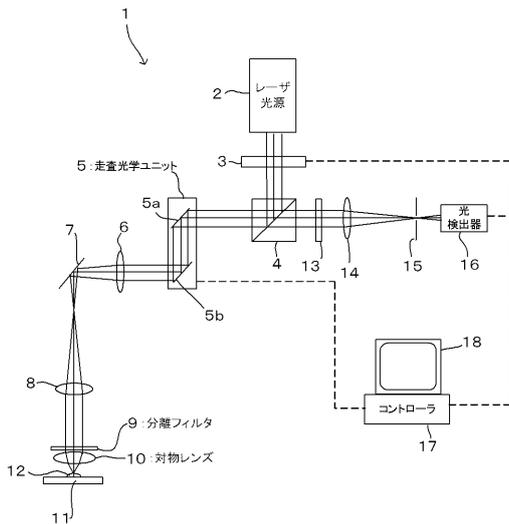
- 【図 1 1】 実施例 6 の顕微鏡装置の構成を示すブロック図。
- 【図 1 2】 実施例 7 の顕微鏡装置の構成を示すブロック図。
- 【図 1 3】 実施例 8 の顕微鏡装置の構成を示すブロック図。
- 【図 1 4】 分離フィルタの機能を示す図。
- 【図 1 5】 分離フィルタの構造を示す図。

【符号の説明】

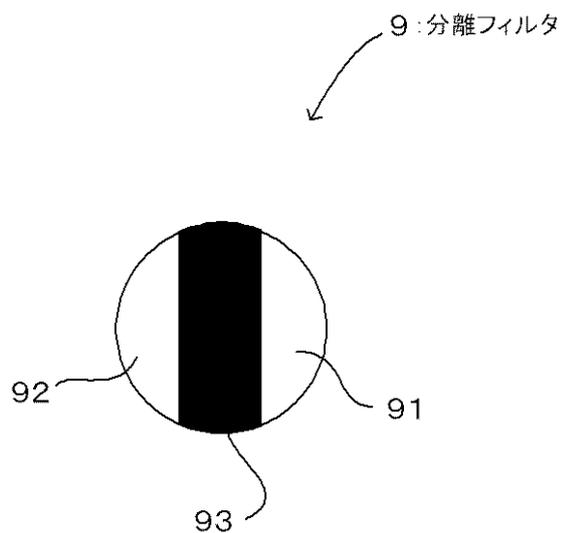
【 0 1 1 8 】

- 9 , 9 A , 9 B 分離フィルタ ( 光路制限手段 )
- 1 0 対物レンズ
- 1 0 A 対物レンズ
- 1 6 光検出器 ( 検出器 )
- 2 1 遮光マスク ( 光路制限手段 )
- 4 0 スキャナユニット ( 光路制限手段 )
- 5 1 ダイクロイックミラー ( 光路制限手段 )
- 6 7 ライン CCD ( 検出器 )
- 8 2 分離フィルタ ( 光路制限手段 )

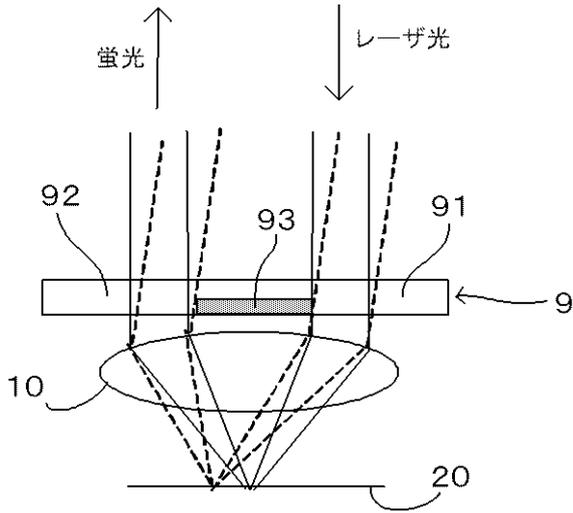
【 図 1 】



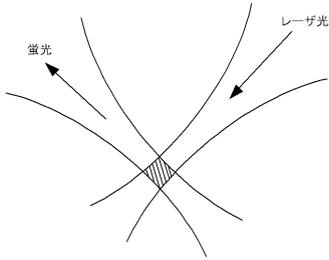
【 図 2 】



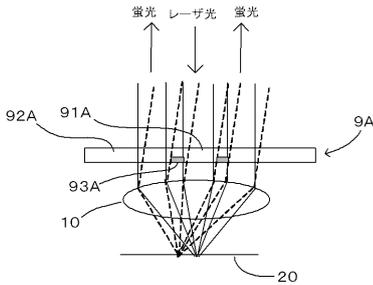
【図3】



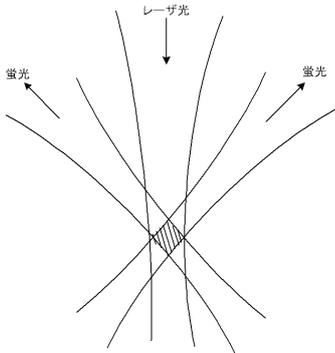
【図4】



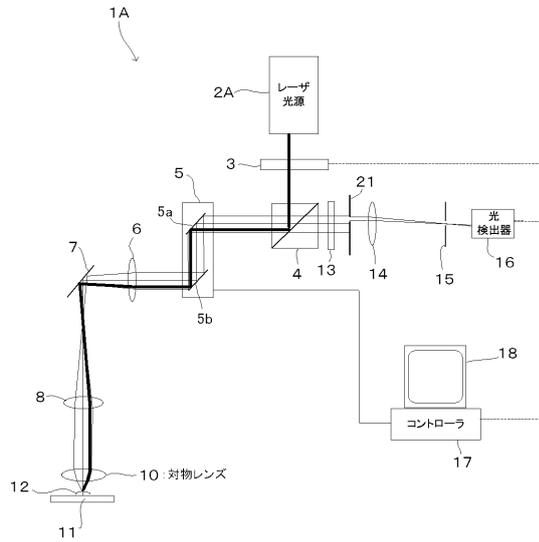
【図7】



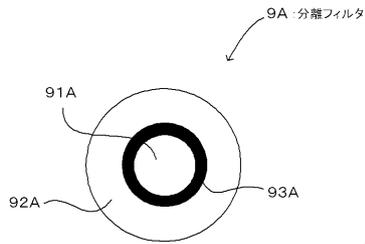
【図8】



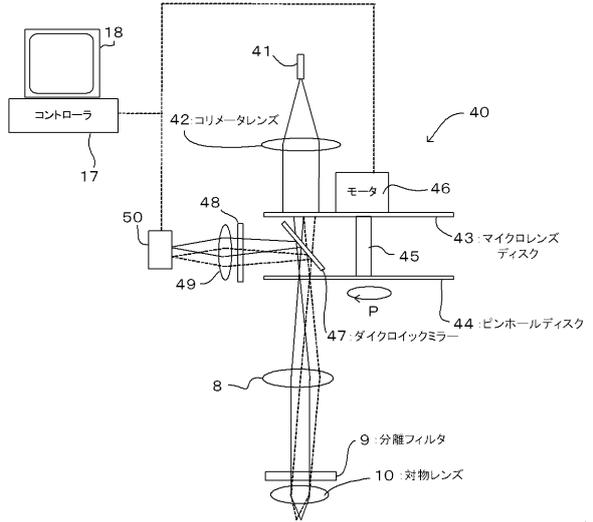
【図5】



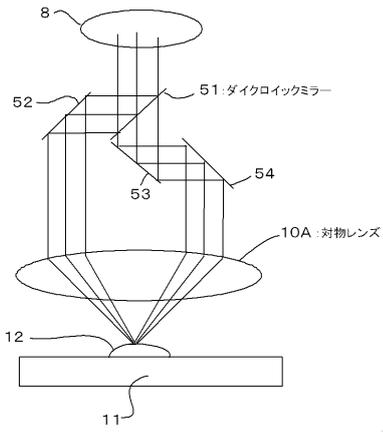
【図6】



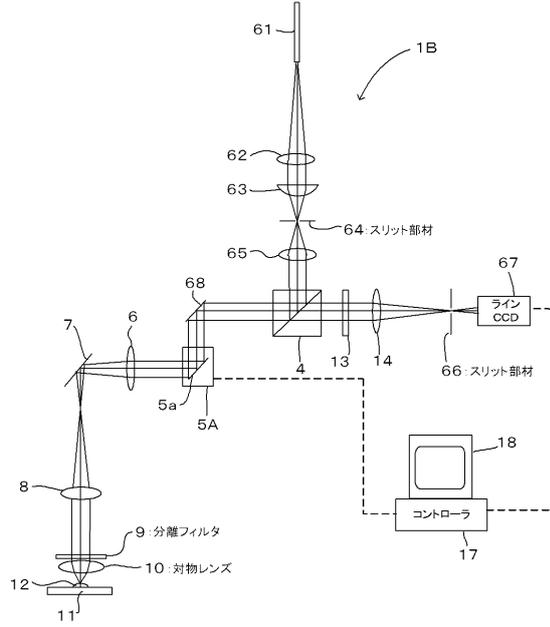
【図9】



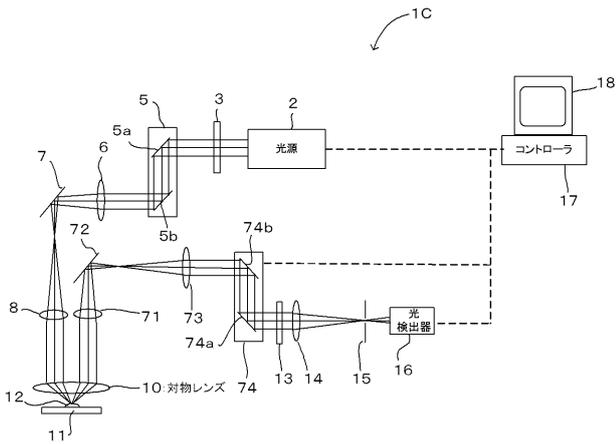
【図10】



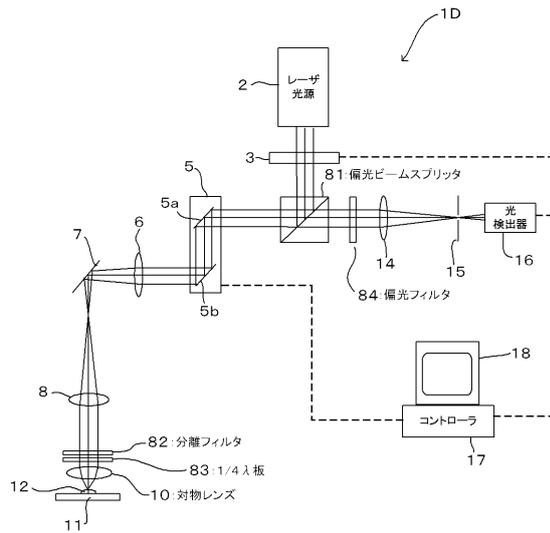
【図11】



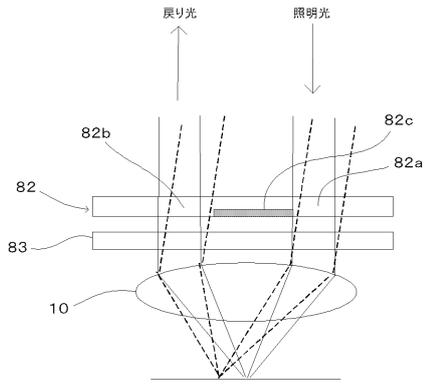
【図12】



【図13】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

