

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5915874号
(P5915874)

(45) 発行日 平成28年5月11日(2016.5.11)

(24) 登録日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(51) Int. Cl.		F I			
GO 2 B	21/06	(2006.01)	GO 2 B	21/06	
GO 2 B	21/36	(2006.01)	GO 2 B	21/36	
GO 1 N	21/17	(2006.01)	GO 1 N	21/17	A
GO 1 N	21/64	(2006.01)	GO 1 N	21/64	E

請求項の数 4 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2014-206876 (P2014-206876)	(73) 特許権者	000006507
(22) 出願日	平成26年10月8日(2014.10.8)		横河電機株式会社
(65) 公開番号	特開2015-135468 (P2015-135468A)		東京都武蔵野市中町2丁目9番32号
(43) 公開日	平成27年7月27日(2015.7.27)	(72) 発明者	山宮 広之
審査請求日	平成27年4月21日(2015.4.21)		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
(31) 優先権主張番号	特願2013-262291 (P2013-262291)		
(32) 優先日	平成25年12月19日(2013.12.19)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	審査官	殿岡 雅仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 顕微鏡装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料に照射する可干渉性を有する照明光を発振する光源と、前記照明光を試料に照射する投影光学系と、前記試料に照射された照明光により前記試料から発生した光を検出する検出部とを備えた顕微鏡装置において、

可干渉性を有する前記照明光を前記投影光学系を介して多数の焦点として光軸に垂直な平面上に投影するとともに、これら多数の焦点の隣り合う焦点の位相を変化させて前記投影された多数の焦点の領域を干渉により小さくし、

可干渉性を有する前記照明光をピンホールアレイを通過させて複数の発散光を発生させるとともに、前記ピンホールアレイを投影することにより前記多数の焦点を光軸に垂直な平面上に投影し、

前記試料から発生した光を検出する検出部を含む検出光学系は、前記試料による回折光と前記試料の通過の光とを干渉させてコントラストを生成することを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項2】

前記ピンホールアレイを構成する各ピンホールは、レンズ効果を有する光学素子と組み合わせられていることを特徴とする請求項1記載の顕微鏡装置。

【請求項3】

前記焦点の間隔は、焦点の第一暗点までの距離の0.6倍から2倍の間の値であることを特徴とする請求項1または請求項2記載の顕微鏡装置。

【請求項 4】

前記試料から発生した光を検出する検出部を含む検出光学系は、検出された画像の高周波成分を抽出する手段を含む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顕微鏡装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、顕微鏡装置に関し、特に光の回折限界を超えた超解像の観察が行える顕微鏡装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

一般に生物研究の分野で用いられる顕微鏡には、二つのタイプが存在する。一つは試料を蛍光染色する蛍光顕微鏡に分類されるものであり、もう一つは試料を蛍光染色せずに資料からの透過光、回折光、反射光を観察する顕微鏡である。これらの顕微鏡としては、明視野顕微鏡、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡などが知られている。

【0003】

図 19 は、特許文献 1 (特開平 5 - 3 3 3 2 7 2 号公報) に記載されている一般的な位相差顕微鏡の構成説明図である。図 19 において、光源 1 と、光学系 2 を構成するコンデンサレンズ 2 a および結像レンズ 2 b と、開口絞り板 3 および位相板 4 とを有している。透明の被観察物 5 は試料テーブル 6 に支持され、コンデンサレンズ 2 a と結像レンズ 2 b との間に配設されている。7 は結像面である。

【0004】

開口絞り板 3 は、光源 1 からの照明光をたとえばリングスリット状などの所定のパターンの絞り光とできるように構成されている。

【0005】

位相板 4 は、透明板 4 a に開口絞り板 3 の開口と同形状となるように位相制御膜 4 b が形成されたものであり、この位相制御膜 4 b は、その透過光の位相に遅れ (または進み) を生じさせるとともに、透過光量を低下させるものである。開口絞り板 3 は光学系 2 の前側焦点位置に配設され、位相板 4 は後側焦点位置に配設されている。

【0006】

光源 1 から照射される光は、まず開口絞り板 3 の光透過部を通過する際にリング状の光に成形され、この光をコンデンサレンズ 2 a により平行光とした後に、被観察物 5 を透過させる。この透過光は、さらに順次結像レンズ 2 b および位相板 4 を経て、結像面 7 に結像する。

【0007】

いま、被観察物 5 が均質で、しかも表面に凹凸などがなければ、開口絞り板 3 でリング状に絞られた照明光はこの被観察物 5 を透過して、位相板 4 における位相制御膜 4 b を通って、直接光 (S 波) としてそのまま結像面 7 に投影される。

【0008】

一方、たとえば被観察物 5 に他の物体 5 a が積層されていてこの観察物 5 に屈折率の差があったり、また表面に凹凸があったりすると、この被観察物 5 の物体 5 a が位置する部位を通過する光は回折し、この回折光 (D 波) は位相板 4 における位相制御膜 4 b の形成領域以外の部位を透過する。しかも、この D 波は S 波に対して位相がずれる。

【0009】

この位相のずれは、被観察物 5 の物体 5 a が存在する部位とそれ以外の部位との屈折率の差およびその厚みにより変化するが、屈折率の差が小さくまた厚みも薄いものであれば $\lambda/4$ となる。ここで、開口絞り板 3 は前側焦点位置に配置され、位相板 4 の位相制御膜 4 b は後側焦点位置に配置されていることから、S 波は必ず位相制御膜 4 b を通過する。

【0010】

10

20

30

40

50

したがって、この位相制御膜 4 b を通過する光の波長を D 波に対して $\lambda/4$ だけ遅れる方向または進む方向にずらせ、かつその透過光量を回折光の光量とほぼ同じ程度に設定しておくことにより直接光と回折光とが干渉し、結像面 7 に結ばれる像には明暗の差が生じる。位相板 4 によって位相を進む方向にずらせれば結像面 7 にはポジティブコントラストが表示され、また位相を遅らせればネガティブコントラストが表示されることになる。

【 0 0 1 1 】

図 20 は、特許文献 2 (特開平 5 - 1 5 0 1 6 4 号公報) に記載されている一般的な蛍光顕微鏡の構成説明図である。図 20 において、たとえば水銀ランプなどの光源 11 から投射された光は、コレクターレンズ 12 で集光される。

【 0 0 1 2 】

干渉フィルター 13 は、コレクターレンズ 12 の出力側光軸と垂直方向の軸をもって回転可能に保持された透過波長シフト用フィルターとして機能する。さらに、この干渉フィルター 13 の出力側には、開口絞り 14、視野絞り 15、所定の透過率を持った励起フィルター 16 および所定の透過率を持ったダイクロイックミラー 17 の順序で配置されている。

【 0 0 1 3 】

ダイクロイックミラー 17 からの反射光は対物レンズ 18 を介して上下動可能なステージ 19 に載置された標本 20 に照射され、この標本 20 から発する 2 種類の蛍光を再度対物レンズ 18 を通ってダイクロイックミラー 17 に導くように構成されている。

【 0 0 1 4 】

ダイクロイックミラー 17 の出射側には、所定の透過率を有する吸収フィルター 21 と必要に応じて光路を観察系または写真撮影系に切り換えるために光路に挿脱可能に配置されたビームスプリッター 22 が配置されている。

【 0 0 1 5 】

さらに、ビームスプリッター 22 の観察系光路側には接眼光学系 23 が配置され、写真撮影系光路側には写真撮影用接眼レンズ 24 が配置されている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 6 】

【 特許文献 1 】 特開平 5 - 3 3 3 2 7 2 号公報

【 特許文献 2 】 特開平 5 - 1 5 0 1 6 4 号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 7 】

ところで、たとえば細胞の内部構造などのより細かいものを見るためには、解像度を大きくする必要がある。解像度は、異なる 2 点間の識別能すなわち分解能として測ることができ、観察に使う光の波長に比例し、対物レンズの開口数に反比例する。

【 0 0 1 8 】

これらから、波長の短い光を開口数の大きな対物レンズで観察することにより解像度を大きくできるが、観察可能な光の波長はせいぜい 200 nm までであり、光による観察には限界がある。

【 0 0 1 9 】

そこで、光に比べて波長がはるかに短い電子線を光の代わりに使ったのが電子顕微鏡である。ヒトの肉眼での分解能は約 0.1 mm、光学顕微鏡は約 0.2 μ m であるが、電子顕微鏡の分解能は約 0.2 nm である。

【 0 0 2 0 】

光学顕微鏡の千倍もの解像度を有する電子顕微鏡を使うことにより、細胞の詳細な内部構造まで見ることができ、電子顕微鏡は電子線を使うため、細胞を生きたまま観察することはできない。

【 0 0 2 1 】

10

20

30

40

50

本発明は、これらの問題点を解決したものであり、その目的は、超解像の観察が可能な位相差顕微鏡や蛍光顕微鏡などの光学的な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】

【0022】

このような課題を達成するために、本発明のうち請求項1記載の発明は、

試料に照射する可干渉性を有する照明光を発振する光源と、前記照明光を試料に照射する投影光学系と、前記試料に照射された照明光により前記試料から発生した光を検出する検出部とを備えた顕微鏡装置において、

可干渉性を有する前記照明光を前記投影光学系を介して多数の焦点として光軸に垂直な平面上に投影するとともに、これら多数の焦点の隣り合う焦点の位相を変化させて前記投影された多数の焦点の領域を干渉により小さくし、

可干渉性を有する前記照明光をピンホールアレイを通過させて複数の発散光を発生させるとともに、前記ピンホールアレイを投影することにより前記多数の焦点を光軸に垂直な平面上に投影し、

前記試料から発生した光を検出する検出部を含む検出光学系は、前記試料による回折光と前記試料の通過の光とを干渉させてコントラストを生成することを特徴とする。

【0023】

請求項2記載の発明は、請求項1に記載の顕微鏡装置において、

前記ピンホールアレイを構成する各ピンホールは、レンズ効果を有する光学素子と組み合わせられていることを特徴とする。

【0024】

請求項3記載の発明は、請求項1または請求項2記載の顕微鏡装置において、

前記焦点の間隔は、焦点の第一暗点までの距離の0.6倍から2倍の間の値であることを特徴とする。

【0025】

請求項4記載の発明は、請求項1から請求項3のいずれかに記載の顕微鏡装置において

前記試料から発生した光を検出する検出部を含む検出光学系は、検出された画像の高周波成分を抽出する手段を含むことを特徴とする。

【発明の効果】

【0030】

本発明の顕微鏡装置によれば、多数の焦点の領域を干渉により回折限界よりも小さな照明光とすることができ、光の回折限界を超えた超解像の観察が行える。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】本発明に基づく顕微鏡装置31の具体例を示す構成説明図である。

【図2】制御系33の具体例を示すブロック図である。

【図3】ピンホールディスク37の部分拡大図である。

【図4】ピンホールディスク37の断面図である。

【図5】実施形態の第2の制御のときの位相分布および強度分布の図である。

【図6】焦点面FPの正面から見た状態図である。

【図7】回折光の分布例説明図である。

【図8】情報欠落状態を示す模式図である。

【図9】本発明の他の実施例を示す構成説明図である。

【図10】制御系59の具体例を示すブロック図である。

【図11】本発明の他の実施例を示す構成説明図である。

【図12】図11で用いる位相回折格子の説明図である。

【図13】スリットリング41と同じ位置に設けられているコンデンサレンズ42の瞳の説明図である。

【図14】位相板46が配置されている位置における対物レンズ45の瞳の説明図である

10

20

30

40

50

。【図15】位相回折格子76の説明図である。

【図16】本発明の他の実施例を示す構成説明図である。

【図17】本発明の他の実施例を示す構成説明図である。

【図18】スリットリング41の他の構成説明図である。

【図19】一般的な位相差顕微鏡の構成説明図である。

【図20】一般的な蛍光顕微鏡の他の構成説明図である。

【発明を実施するための形態】

【0032】

以下、本発明の実施形態について、図面を参照して説明する。図1は、本発明に基づく顕微鏡装置31の具体例を示す構成説明図である。この顕微鏡装置31は、顕微鏡光学系32と制御系33とで構成されている。

10

【0033】

顕微鏡光学系32は、レーザ光源34と光ファイバ35とコリメータレンズ36とピンホールディスク37とで構成されている。さらに、ピンホールディスク37は、微動ステージ38に連結されている。レーザ光源34としては、たとえば波長405nmのものが用いられる。

【0034】

ピンホールディスク37の前面には投影レンズ39が配置され、投影レンズ39の前面には反射ミラー40が配置されている。反射ミラー40の先にはコンデンサレンズ42が配置され、コンデンサレンズ42の瞳位置にはスリットリング41が配置されている。観察対象の試料43は試料台44に搭載されている。

20

【0035】

試料43を通過した光を観察するために、対物レンズ45が設けられている。ここで、対物レンズ45およびコンデンサレンズ42は、たとえば倍率100倍でNA(開口数)1.2のものが選択され、共役関係になる位置に配置されている。

【0036】

対物レンズ45の瞳位置には位相板46が配置されている。位相板46の先には全反射ミラー47が配置され、その先にはカメラ49に結像するためのチューブレンズ48が配置されている。チューブレンズ48の結像位置にはカメラ49が配置されている。チューブレンズ48と投影レンズ39は、焦点距離が同じものが選択されている。カメラ49としては、たとえば画素サイズが6μmのものが用いられる。

30

【0037】

図2は、制御系33の具体例を示すブロック図である。制御系33は、コントローラ50とディスプレイ51により構成されている。コントローラ50は、入力部52、画像生成部53、光源制御部54、制御部55、微動ステージコントローラ56などで構成されている。画像生成部53はディスプレイ51に接続されている。

【0038】

図3は、ピンホールディスク37の部分拡大図である。直径約16μmのピンホールPHが縦横20μmの間隔でマトリックス状に均一に配置されている。

40

【0039】

図4は、ピンホールディスク37の断面図である。ピンホールディスク37の出射側には、すべてのピンホールPHに対してマイクロレンズMLが設けられている。さらに、ピンホールディスク37の入射側には、ピンホールPHの一つおきに1/2波長板PSが設けられている。

【0040】

次に、動作について説明する。

レーザ光源34の出力光は光ファイバ35を介してコリメータレンズ36に入射されて平行光に変換され、この平行光はピンホールディスク37に入射される。ここで、平行光はそれぞれのピンホールPHによって分けられるとともに、ピンホールPHによって拡散

50

されるが、マイクロレンズ M L の作用によってその発散角は適切に調節される。

【 0 0 4 1 】

ピンホールディスク 3 7 を出て発散されたそれぞれの光は、投影レンズ 3 9 によりそれぞれピンホール P H の位置に対応した傾きを有する平行光に変換される。この平行光は反射ミラー 4 0 によって反射された後、コンデンサレンズ 4 2 に投影される。

【 0 0 4 2 】

コンデンサレンズ 4 2 の瞳位置には、スリットリング 4 1 が設けられている。このスリットリング 4 1 の外径は、コンデンサレンズ 4 2 の瞳径とほぼ同じ大きさに設定されている。したがって、このスリットリング 4 1 を通過した光は、コンデンサレンズ 4 2 によって焦点面 F P 上に焦点を結ぶが、これらの光はコンデンサレンズ 4 2 の瞳径の外周部を通過しているために、ほぼ回折限界のスポットに絞られる。

10

【 0 0 4 3 】

これらそれぞれのスポットは、試料 4 3 の内部に位置するように配置された焦点面 F P 上でそれぞれ焦点を結ぶ。これらの焦点において、微小な観察対象によって回折される光と、そのまま通過する光に分けられる。

【 0 0 4 4 】

そのまま通過する透過光は対物レンズ 4 5 によって再び平行光に変換されるが、対物レンズ 4 5 の瞳位置には位相板 4 6 が配置されている。この位相板 4 6 には、スリットリング 4 1 に対応する位置に波長を $1/4$ 波長進ませるような波長板が組み込まれている。さらに、この波長板には、明るさを調節するための N D フィルタも組み込まれている。

20

【 0 0 4 5 】

試料 4 3 を通過した光は、この波長板によって波長を $1/4$ 波長進ませられた後、反射ミラー 4 7 で反射して結像レンズ 1 によりカメラ 4 9 上に結像され、カメラ 4 9 によって撮影される。

【 0 0 4 6 】

一方、観察対象で回折された光は、回折により位相が $1/4$ 波長遅れるとともに、位相板 4 6 の波長板のない部分を通過した後、結像レンズ 4 8 を介してカメラ 4 9 上の透過光と同じ焦点位置の同じ場所に結像する。

【 0 0 4 7 】

この試料 4 3 を回折した光は、試料 4 3 を通過した光に対して位相が $1/2$ 遅れていることからこれらの光は干渉により弱め合って暗くなり、コントラストが付く。

30

【 0 0 4 8 】

ピンホールディスク 3 7 の動作について説明する。

ピンホールディスクを通過する光は互いに干渉性を有するレーザ光であるが、隣り合う光は $1/2$ 波長板によりその光の位相が半波長ずれるようになっていて、これらの光がコンデンサレンズ 1 3 によって焦点を結ぶ。

【 0 0 4 9 】

コンデンサレンズの倍率を前述のように 1 0 0 倍とすると、ピンホールの間隔 $20 \mu\text{m}$ は $0.2 \mu\text{m}$ として投影される。ここで、投影される焦点のエアリーディスク径に着目すると、 $0.61 / \text{NA}$ で示されることから約 $0.2 \mu\text{m}$ となり、焦点の間隔と焦点の第一暗点までの距離すなわちエアリーディスクの半径とがほぼ等しくなる。

40

【 0 0 5 0 】

図 5 は、それぞれの光の点像分布図である。通常、個々の焦点は点線 A で示すように焦点を結ぶが、互いに隣り合う焦点の位相が半波長ずれているために、隣り合う光が重なる部分は互いに弱め合う干渉となり、図 5 の実線 B で示すような点像分布となる。この点像分布は、通常回折限界より細い幅となっている。

【 0 0 5 1 】

図 6 は、焦点面 F P の正面から見た状態図である。隣り合う光のうち、位相が同じものを実線 A で、位相が半波長ずれているものを点線 B で示す。これらは干渉により、図 6 の直線で示される部分が干渉の弱め合う谷となる。したがって、図 6 にハッチングで示すエ

50

リアCのみが選択的に照明されるが、これは通常の照明光で絞られる太い実線の円Dで示すスポットの領域よりも小さい。

【0052】

この限られた領域からの回折光は、カメラ49上で透過光と干渉する。図7はカメラ49上における回折光の分布例図であり、各照明光の焦点の頂上部に極小さな観察対象が存在して光を回折させた場合の回折光の分布を示す。

【0053】

図7に示すように、回折光の分布は、結像系の光学系によって急峻であった照明パターンよりはなだらかになるものの、それでも限られたエリアからの情報はカメラ49に結像される。

【0054】

チューブレンズ48と投影レンズ39は焦点距離が同じものが選択されているため、カメラ49上の焦点の間隔はピンホール間隔と同じ $20\mu\text{m}$ となる。カメラ49の画素サイズはたとえば $6\mu\text{m}$ であり、 $20\mu\text{m}$ に対して十分小さいものが選択されているので、これらの微細な情報が撮影可能である。

【0055】

コントローラ50の制御部55は、光制御部24を介してレーザ光源34の発振を制御する。入力部52は、ここで撮影される画像を保存する。ここで撮影される画像は、図5に示すように狭いスポットからの限られた画像情報であるため、図6に示される谷の部分の情報は欠落している。

【0056】

図8はこのような情報欠落状態を示す模式図であり、隣り合う焦点を小さな実線の円で示している。制御部55は、それぞれ干渉によって情報が欠落している部分を補完するように、微動ステージコントローラ56を介してピンホールディスク37をA B C Dのように移動させるとともに、そこで撮影された画像を入力部52で保存し、それらをもとに画像生成部53でそれぞれの情報を合わせた画像を構築して、ディスプレイ51に表示させる。

【0057】

このような構成によれば、照明光を複数の焦点とするとともに、互いに干渉させて回折限界よりも小さい照明光としていることにより、従来に比べて高分解能で位相差観察が行える。

【0058】

スリットリング41をコンデンサレンズ42の瞳径の外周部に設けていることにより、コンデンサレンズ42のほぼ回折限界の焦点を投影することができ、高分解能が実現できる。

【0059】

ピンホールPHの全面にマイクロレンズMLを配置していることにより、ピンホールPHで回折する光の発散角を調節することができ、光の利用効率を高く改善できる。

【0060】

ピンホールディスク37を微小に移動させて焦点の領域を微動させることにより、試料43を隈なく観察できる。

【0061】

そして、焦点の間隔と焦点の第一暗点までの距離すなわちエアリーディスクの半径とがほぼ等しく設定されているので、照明する領域を効果的に小さくでき、この例が最適である。

【0062】

このような干渉により点像分布が小さくなる効果は、隣り合う焦点の間隔が第一暗点までの距離の2倍になるまで継続するが、焦点の距離が離れるのにつれて点像分布が小さくなる効果も減少する。

【0063】

10

20

30

40

50

逆に隣り合う焦点の間隔が第一暗点までの距離よりも小さくなると、隣り合う光の外側の光の影響により信号光の強度が小さくなる。しかしながら、干渉により点像分布が小さくなる効果は、隣り合う焦点の間隔が第一暗点までの距離の0.6倍になるまでは継続することが計算により明らかである。

【0064】

したがって焦点の間隔は、焦点の第一暗点までの距離の0.6倍より大きく、2倍より小さいことが好ましい。

【0065】

図9は本発明の他の実施例を示す構成説明図であり、蛍光顕微鏡に応用したものであって、図1と共通する部分には同一の符号を付けている。この顕微鏡装置57は、顕微鏡光学系58と制御系59とで構成されている。

10

【0066】

顕微鏡光学系57は、図1と同様に、レーザ光源34と光ファイバ35とコリメータレンズ36とピンホールディスク37を有する。さらにピンホールディスク37は微動ステージ38に連結されている。レーザ光源34は波長405nmのものが用いられている。

【0067】

ピンホールディスク37の前面には投影レンズ60が配置されており、その前面にはダイクロイックミラーミラー61が配置されている。このダイクロイックミラー61はレーザ光源34の波長は反射し、それよりも長い波長の光は透過するものが選択されている。ダイクロイックミラー61で反射されたレーザ光の先には、対物レンズ62が配置されている。観察対象である試料63は、試料台64に搭載されている。

20

【0068】

対物レンズ62は、たとえば倍率100倍でNA1.2のものが選択されている。ダイクロイックミラー61を通過したその先には、カメラ67に結像するためのチューブレンズ66が配置されている。ダイクロイックミラー61とチューブレンズ66の間には蛍光フィルタ65が配置されており、所望の蛍光帯域のみを通過させる。チューブレンズ66の結像位置にはカメラ67が配置されている。カメラ67は、たとえば画素サイズが6μmのものが用いられている。

【0069】

図10は、制御系59の具体例を示すブロック図である。制御系59は、コントローラ68とディスプレイ69により構成されている。コントローラ68は、高周波成分抽出回路70、一時保存部71、画像生成部72、光源制御部73、制御部74、微動ステージコントローラ75などで構成されている。画像生成部72にはディスプレイ69が接続されている。

30

【0070】

図9の動作を説明する。

レーザ光源34の出力光は光ファイバ35を介してコリメータレンズ36に入射されて平行光に変換され、この平行光はピンホールディスク37に入射される。ここで、平行光はそれぞれのピンホールPHによって分けられるとともに、ピンホールPHによって拡散されるが、マイクロレンズMLの作用によってその発散角は適切に調節される。

40

【0071】

ピンホールディスク37を出て発散されたそれぞれの光は、投影レンズ60によりそれぞれピンホールの位置に対応した傾きを有する平行光に変換される。この平行光は、ダイクロイックミラー61によって反射された後に対物レンズ62に投影される。

【0072】

各光は対物レンズ62によって焦点面FP上に焦点を結ぶが、これらの光は対物レンズ62によりほぼ回折限界のスポットに絞られる。これらのスポットは、試料64の内部に位置するように配置された焦点面FP上でそれぞれ焦点を結ぶ。

【0073】

この焦点位置におけるレーザ光により試料64が励起され、蛍光を発する。この蛍光は

50

対物レンズ 6 2 により再び平行光に変換されてダイクロミックミラー 6 1 を通過し、蛍光フィルタ 6 5 で所望の波長帯域のみが選択された後に、結像レンズ 6 6 によりカメラ 6 7 上に結像され、カメラ 6 7 によって撮影される。

【 0 0 7 4 】

ピンホールディスク 3 7 の動作について説明する。

図 1 の実施例と同様に、ピンホールディスクを通過する光は互いに干渉性を有するレーザー光であるが、隣り合う光は $1/2$ 波長板によりその光の位相が半波長ずれるようになっていて、これらの光が対物レンズ 6 2 によって焦点を結ぶ。

【 0 0 7 5 】

対物レンズ 6 2 の倍率をたとえば 1 0 0 倍とすると、ピンホールの間隔 $20 \mu\text{m}$ は $0.2 \mu\text{m}$ として投影される。ここで、投影される焦点のエアリーディスク径は $0.61 / \text{NA}$ で示されるので約 $0.2 \mu\text{m}$ となり、焦点の間隔と焦点の第一暗点までの距離がほぼ等しくなる。

【 0 0 7 6 】

したがって、そのそれぞれの光は図 1 の実施例と同様に図 5 のようになる。通常、個々の焦点は点線 A で示すように焦点を結ぶが、互いに隣り合う焦点の位相が半波長ずれているために、隣り合う光が重なる部分は互いに弱め合う干渉となるために実線 B で示すような点像分布となる。この点像分布は、通常の回折限界より細い幅となっている。

【 0 0 7 7 】

焦点面 F P の正面から見た状態図も、図 1 の実施例と同様に図 6 のようになる。隣り合う光のうち、実線で示す位相が同じ光と、点線で示す位相が半波長ずれているものとの干渉により、直線で示される部分が干渉の弱め合う谷となる。この結果、図 6 に示すハッチングエリアのみが選択的に照明されるが、これは通常の照明光で絞られるスポット（円で示される領域）よりも小さい。

【 0 0 7 8 】

この限られた領域からの蛍光は、カメラ 6 7 で撮影される。前述の図 7 は、各照明光の焦点の頂上部に極小さな観察対象が存在して光を蛍光させた場合のカメラ上の蛍光の分布も示している。

【 0 0 7 9 】

図 7 に示すように、結像系の光学系によって、急峻であった照明パターンよりもなだらかになるものの、それでも限られたエリアからの情報はカメラ 6 7 に結像される。

【 0 0 8 0 】

チューブレンズ 6 6 と投影レンズ 6 0 は焦点距離が同じものが選択されているため、このカメラ 6 7 上の焦点の間隔はピンホール間隔と同じ $20 \mu\text{m}$ となる。カメラ 6 7 の画素サイズは $6 \mu\text{m}$ と、 $20 \mu\text{m}$ に対して十分小さいものが選択されているので、これらの微細な情報が撮影可能である。

【 0 0 8 1 】

コントローラ 6 8 の動作を説明する。

制御部 7 4 は、光源制御部 7 3 を介してレーザー光源 3 4 を制御する。

【 0 0 8 2 】

カメラからの画像は、高周波成分抽出回路 7 0 に入力されて、高周波成分すなわち超解像成分が抽出される。この画像は一時保存部 7 1 に一時保存される。ここで撮影される画像は、図 5 に示すように狭いスポットからの限られた画像情報であるため、図 6 に示される谷の部分の情報が欠落したものであり、図 8 の模式図のようになる。

【 0 0 8 3 】

制御部 7 4 は、図 8 に示すそれぞれ干渉による情報の欠落部分を補完するように、微動ステージコントローラ 7 5 を介してピンホールディスクを移動させるとともに、そこで撮影された画像を一時保存部 7 1 で保存し、それらをもとに画像生成部 7 2 でそれぞれの情報を合わせた画像を構築してディスプレイ 6 9 に表示させる。

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

この場合も、照明光を複数の焦点とした上で互いに干渉させて回折限界よりも小さい照明光としたことにより、従来よりも高分解能な蛍光画像観察が行える。

【0085】

また、ピンホール全面にマイクロレンズを配置したことにより、ピンホールで回折する光の発散角を調節できるので、光の利用効率を高く設定できる。

【0086】

また、ピンホールアレイを微小移動させて焦点の領域を微動させることができ、試料を隈なく観察することができる。

【0087】

また、撮影された画像のうちの高周波成分を抽出することにより、焦点近傍の画像情報を抽出ことができ、あたかも共焦点顕微鏡のような焦点近傍のスライス像を観察できる。

【0088】

さらに、焦点の間隔と焦点の第一暗点までの距離をほぼ等しくしたので、照明する領域を効果的に小さくできる。

【0089】

図11も本発明の他の実施例を示す構成説明図であり、図1と共通する部分には同一の符号を付けている。図1と図11の相違点は、図11では図1のピンホールディスク37に代えて、図12に示すような位相回折格子76を用いていることである。この位相回折格子76もピンホールディスク37と同様に微動ステージ38に連結されている。

【0090】

図12において、位相回折格子76はたとえば9 μ mピッチで区切られており、ハッチング部76aは白色部76bに対して通過する光の位相を $\pi/2$ 遅らせる構造になっている。

【0091】

コンデンサレンズ42および対物レンズ45は、たとえば倍率40倍でNA0.95のものが選択され、共役関係になる位置に配置されている。

【0092】

対物レンズ45の瞳位置には位相板46が配置されている。位相板46の先には全反射ミラー47が配置され、その先にはカメラ49に結像するためのチューブレンズ48が配置されている。チューブレンズ48の結像位置にはカメラ49が配置されている。チューブレンズ48と投影レンズ39は、焦点距離が同じものが選択されている。カメラ49としては、たとえば画素サイズが2 μ mのものが用いられる。

【0093】

次に、動作について説明する。

レーザ光源34の出力光は光ファイバ35を介してコリメータレンズ36に入射されて平行光に変換され、この平行光は位相回折格子76に入射される。ここで位相回折格子76の作用によって0次光と一次回折光に回折される。図11では一次回折光のみを示している。

【0094】

この一次回折光は投影レンズ39の作用によって反射ミラー40で反射された後、図13に示すようにコンデンサレンズ42の瞳位置に集光される。なお、コンデンサレンズ42の瞳位置にはスリットリング41が設けられていて、このスリットリング41の開口の外径は、コンデンサレンズ42の瞳径とほぼ同じ大きさに設定されている。

【0095】

このスリットリング41は、位相回折格子76を通過した0次光を遮る役割を果たす。一次回折光はコンデンサレンズ42により二つの平行光となり、試料43の内部に来るように配置された焦点面FP上に干渉縞を形成する。

【0096】

試料43が位相物体である場合を考える。

10

20

30

40

50

試料 4 3 をそのまま通過する透過光は、レンズ 4 5 の瞳位置で焦点を結ぶ。対物レンズ 4 5 の瞳位置には位相板 4 6 が配置されている。この位相板 4 6 のスリットリング 4 1 に対応する位置には波長を 1 / 4 波長進ませるような波長板 4 6 a が組み込まれていて、波長板 4 6 a の部分には明るさを調節するための ND フィルタも組み込まれている。

【 0 0 9 7 】

試料 4 3 を通過した光は波長板 4 6 a によって波長を 1 / 4 波長進ませられた後、反射ミラー 4 7 で反射し、結像レンズ 4 8 によって 2 つの平行光に変換され、カメラ 4 9 上で再び干渉縞を形成する。

【 0 0 9 8 】

位相物体である試料 4 3 によって回折された光は、回折によって位相が 1 / 4 波長遅らせられた後に対物レンズ 4 5 に入射される。この回折光の大部分は位相板 4 6 の波長板のない部分を通過した後に、結像レンズ 4 8 によってカメラ 4 9 面上に結像する。

【 0 0 9 9 】

試料 4 3 を回折した光は試料 4 3 を通過した光に対して位相が 1 / 2 遅れていることから、これらの光が干渉して弱め合うことで暗くコントラストが付くことになり、像を形成する。

【 0 1 0 0 】

図 1 3 は、スリットリング 4 1 とともに同じ位置に設けられているコンデンサレンズ 4 2 の瞳の説明図である。瞳の円周近傍にはリング状の一次回折光 F 1 の照射部 4 2 a が形成され、このリング状の照射部 4 2 a を除く部分は遮光部 4 2 b として形成されている。

【 0 1 0 1 】

図 1 4 は、位相板 4 6 が配置されている位置における対物レンズ 4 5 の瞳の説明図である。円周近傍にはリング状に重なり合うように位相板 4 6 が位置していて、透過光 TL が照射される。

【 0 1 0 2 】

図 1 5 は、位相回折格子 7 6 の動作説明図である。

位相回折格子 7 6 を通過する光は互いに干渉性を有するレーザ光であるが、位相回折格子 7 6 の格子 7 6 a と 7 6 b で形成される縞の隣り合う光の位相が半波長ずれるようになっている。これによって以下の角度の方向に一次回折光が発生する。

$$P \cdot \sin \theta = \lambda / 2$$

ここで、ピッチ P を 9 μm とすると、 $\sin \theta$ は 0 . 0 2 3 となる。

【 0 1 0 3 】

また、投影レンズ 3 9 として焦点距離 f が 1 8 0 mm のものを選ぶと、コンデンサレンズ 4 2 の中心から 4 . 1 mm の所に焦点を結ぶ。コンデンサレンズ 4 2 の f 4 . 5 は、NA 0 . 9 5 とすると瞳の半径は 4 . 3 mm となり、瞳径の外周付近に焦点を結ぶ。

【 0 1 0 4 】

位相回折格子 7 6 によって発生した 1 次回折光と - 1 次回折光は、図 1 3 に示すように、コンデンサレンズ 4 2 のリング状の照射部 4 2 a における直径の線上の点対称となる位置に二つの焦点 F 1、F 2 を結ぶ。

【 0 1 0 5 】

コンデンサレンズ 4 2 のリング状の照射部 4 2 a に結像された 1 次回折光と - 1 次回折光は、図 1 4 に示すように、対物レンズ 4 5 の円周近傍にリング状に設けられている位相板 4 6 に透過光 TL として照射される。

【 0 1 0 6 】

これら 1 次回折光と - 1 次回折光はコンデンサレンズ 4 2 によって二つの平行光に変換され、焦点面上に干渉縞を形成する。

【 0 1 0 7 】

これら二つの光は NA 0 . 9 相当の傾きを有する光となり、干渉縞のピッチ P 1 は、 $2 \cdot P 1 \cdot NA = \lambda$ となる。ここで、P 1 は 0 . 2 2 5 μm となり、ほぼ回折限界に近い縞を形成する。

10

20

30

40

50

【0108】

対物レンズとして $f 4.5$ で $NA 0.95$ のものを選び、チューブレンズ 48 は $f 180 \text{ mm}$ のものを選ぶとする。

【0109】

試料 43 を通過した光は、対物レンズ 45 によってその瞳位置に焦点を結ぶ。瞳位置には位相板 46 が配置されていて、スリットリング 41 の開口に対応する位置に、位相を $1/4$ 波長進ませる波長板が組み込まれている。この波長板上に光は焦点を結ぶ。

【0110】

これらの光は、照明光学系と共役の関係になっている。位相板 45 を通過した光はチューブレンズ 48 によって二つの平行光に変換され、カメラ 49 上で $9 \mu\text{m}$ のピッチを有する干渉縞を形成する。ここでカメラの画素をたとえば $2 \mu\text{m}$ とすると、干渉縞よりも十分細かく、干渉縞を忠実に撮像できる。

10

【0111】

さらに焦点面で回折が発生すると、これらの回折光と通過光が干渉を起こす。

たとえば焦点面にピッチ $P 1$ よりも細かく $P 1$ の半分よりは大きい周期構造があると仮定する。照明光のピッチが $P 1$ であるため $P 1$ のピッチで回折が起こり、カメラ 49 の面上ではモアレが発生する。このモアレは照明光のパターンが分かっているため、逆演算によって焦点面の周期構造を求めることができる。モアレは投影したピッチの $1/2$ 程度の周期構造によって発生するため、逆演算によって従来よりも分解能が約 2 倍の情報を得ることができる。

20

【0112】

また、このままの状態では焦点面における干渉縞の明の部分の情報しか得ることができないが、干渉縞をたとえばピッチ $P 1$ が $P 1/3$ ずつ移動するように位相回折格子 76 をステージ 38 によって移動させながら画像を撮影し、焦点面のすべての場所の情報を演算によって求めることができる。

【0113】

なお、上記の方法で高分解能になるのは縞を有する 1 方向だけであるが、ステージ 38 によって位相回折格子 76 をたとえば 120 度ずつ回転させた位置において上記の撮影をそれぞれ行うことにより、複数の方向成分の高解像情報が得られる。最終的にこれらの情報を合成することで高解像画像が作成できる。

30

【0114】

また、位相回折格子 76 を回転させると、照明光はスリットリング 41 の開口部に焦点を結び、さらに位相板 46 上の波長板上で焦点を結ぶことになる。この場合には、スリットリング 41 と位相板 46 を回転させる必要がなくなるので、装置全体の構成を簡略化できる。

【0115】

上記実施例では位相回折格子 76 を用いる例を示したが、これに限らず、たとえば空間位相変調素子を用いても構わない。

【0116】

このように、試料 43 に回折限界に近い縞を生じる照明光を照射してこの照明光の試料 43 を透過した光を再びカメラ 49 上に投影するとともに、照明光による試料 43 の回折光をカメラ 49 上に投影させて透過光と回折光を干渉させることにより、撮影される画像から高分解能画像を再構築できる。

40

【0117】

試料 43 を透過した光の波長を $1/4$ 波長板で操作することにより、試料 43 が位相物体であっても回折光と照明光が干渉を起こすことから、コントラストのある画像を得ることができる。

【0118】

スリットリング 41 をコンデンサレンズ 42 の瞳径の外周部に設けることにより、コンデンサレンズ 42 のほぼ回折限界の縞を投影することができる。

50

【0119】

スリットをスリットリング41としてリング状に構成しているので、位相回折格子76を回転させても、照明光スリットを回転させなくてもよい。

【0120】

また、位相板46もリング状に配置したので、位相回折格子76を回転させても、位相板46を回転させる必要はない。

【0121】

図16も本発明の他の実施例を示す構成説明図であり、図1と共通する部分には同一の符号を付けている。図1と図16の相違点は、図16では図1のスリットリング41を用いていないことである。なお、観察対象である試料43は光吸収体であるとする。

10

【0122】

ここで試料43をそのまま通過する透過光は、対物レンズ45の瞳位置で焦点を結ぶ。試料43を通過した光はその光の一部を吸収された後に、波長板がないのでそのまま反射ミラー47で反射し、結像レンズ48によって2つの平行光に変換され、カメラ49上で再び干渉縞を形成する。

【0123】

本実施例の場合、観察対象の光吸収体によって発生する回折光は、対物レンズ45で回折されて反射ミラー47で反射され、結像レンズ48によってカメラ49の面上に結像される。図1に示した実施例とは異なり、光吸収体を通過した光と回折した光とは等位相であるため、カメラ49の面上で干渉して像を形成する。

20

【0124】

また、レーザ光源34として複数の波長を有するものを使用して各波長ごとに像の撮影を行い、各波長ごとの透過光の像を求めることによりカラー情報を得ることができる。試料43が光吸収体であっても高分解能に観察できる。

【0125】

図17も本発明の他の実施例を示す構成説明図であり、明視野顕微鏡に応用した例であって、図1と共通する部分には同一の符号を付けている。図1と図17の相違点は、顕微鏡光学系である。

【0126】

図17では、反射ミラー40の代わりにハーフミラー81を用い、チューブレンズ48およびカメラ49をハーフミラー81の後方に配置している。

30

【0127】

スリットリング41としては、たとえば図18に示すように構成されたものを用いる。図18において、中心部には0次光を遮るために遮光部41aが設けられているが、遮光部41aの大きさは必要最小限となっている。遮光部41aの外周は開口部41bとして形成されている。位相回折格子76によって発生した1次回折光と-1次回折光は、図13と同様に、スリットリング41の直径の線上の点対称となる位置に入射される。

【0128】

そして、コンデンサレンズ42の代わりに対物レンズ45を配置している。

【0129】

照明系は、図1、図9、図11に示す他の実施例と同様に動作する。図17の実施例では、観察する試料43は表面が平坦な高反射物体とし、たとえばガラスなどの表面状態を詳細に観察するような場合を考える。

40

【0130】

図17において、1次回折光は、投影レンズ39の作用によってハーフミラー81で反射された後に対物レンズ45の瞳位置に集光される。また、対物レンズ45の瞳位置にはスリットリング41が設けられている。

【0131】

前述のように、このスリットリング41の開口の外径はコンデンサレンズ42の瞳径とほぼ同じ大きさに設けられている。ここでこのスリットリング41は位相格子を通過した

50

0次光を遮る役割を果たす。1次回折光は対物レンズ45により二つの平行光となり、試料43の表面に来るように配置された焦点面FP上に干渉縞を形成する。

【0132】

ここで、試料43をそのままそのまま反射する光は対物レンズ45の瞳位置で再び焦点を結ぶ。この光はハーフミラー81を通過し、結像レンズ48によって2つの平行光に変換され、カメラ49上で再び干渉縞を形成する。

【0133】

また、試料43の表面に散乱体がある場合、この散乱体によって散乱された光は対物レンズ45で回収されてハーフミラー81を通過し、結像レンズ48によってカメラ49面上に結像する。ここで、この試料43で散乱した光と試料43で反射した光が干渉し、像

10

【0134】

なお、本実施例でも、複数の波長の光源を用いてカラー情報を得てもよい。

【0135】

これにより、試料43が反射物体であっても、高分解能で観察できる。

【0136】

以上説明したように、本発明によれば、多数の焦点の領域を干渉により回折限界よりも小さな照明光とすることができ、光の回折限界を超えた超解像の観察が行える顕微鏡装置が実現できる。

【符号の説明】

20

【0137】

31、57 顕微鏡装置

32、58 顕微鏡光学系

33、59 制御系

34 レーザ光源

35 光ファイバ

36 コリメータレンズ

37 ピンホールディスク

38 微動ステージ

39 投影レンズ

30

40 反射ミラー

41 スリットリング

42 コンデンサレンズ

43、63 試料

44、64 試料台

45、62 対物レンズ

46 位相板

47 全反射ミラー

48、66 チューブレンズ

49、67 カメラ

40

50、68 コントローラ

51、69 ディスプレイ

52 入力部

53、72 画像生成部

54、73 光源制御部

55、74 制御部

56、75 微動ステージコントローラ

60 投影レンズ

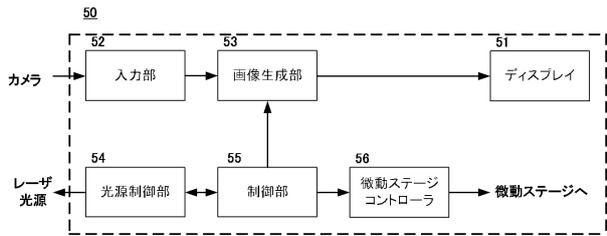
61 ダイクロイックミラー

70 高周波成分抽出回路

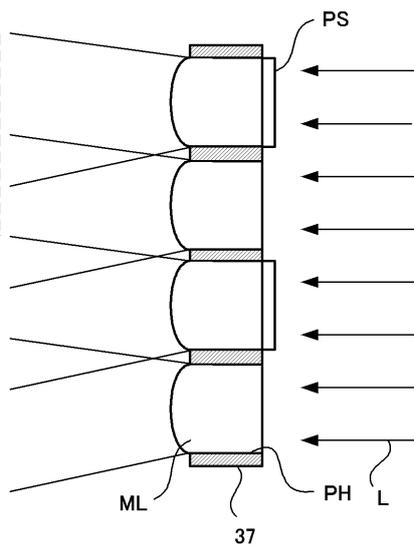
50

- 7 1 一時保存部
- 7 6 位相回折格子

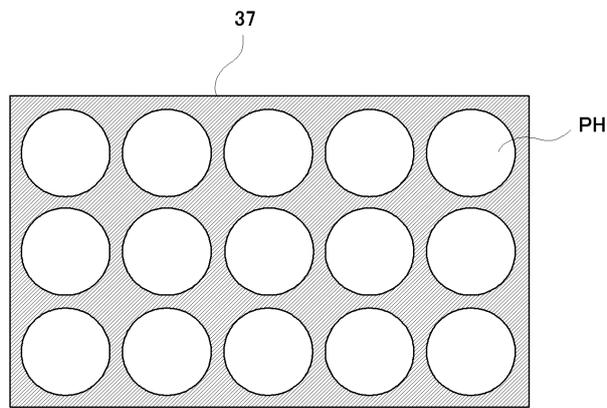
【図2】



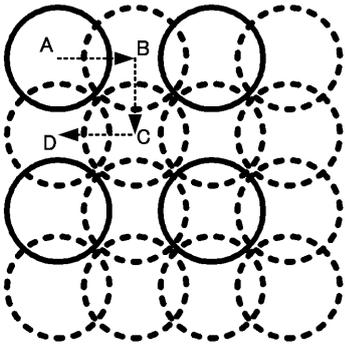
【図4】



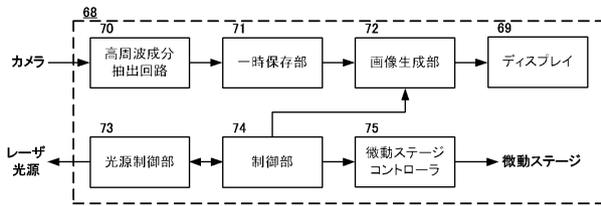
【図3】



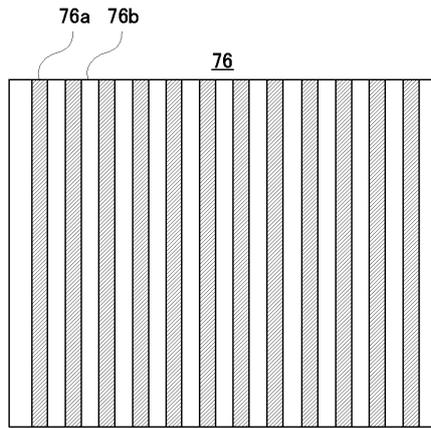
【図8】



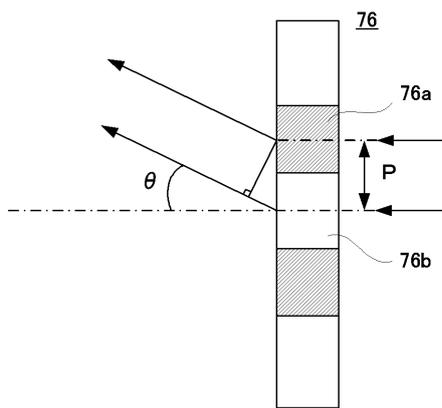
【図10】



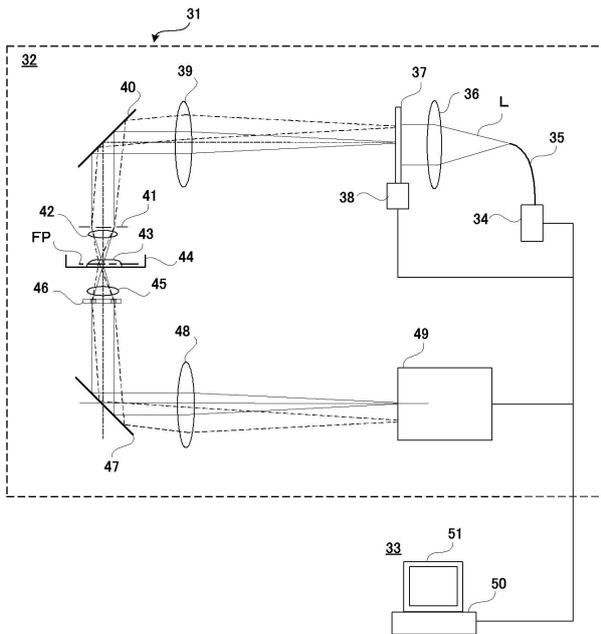
【図12】



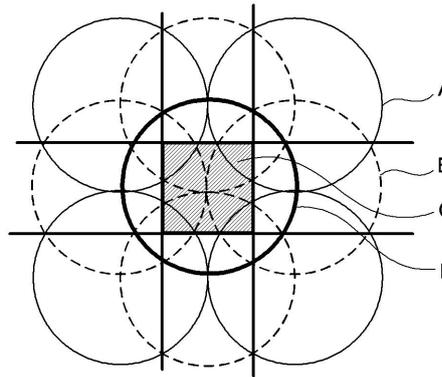
【図15】



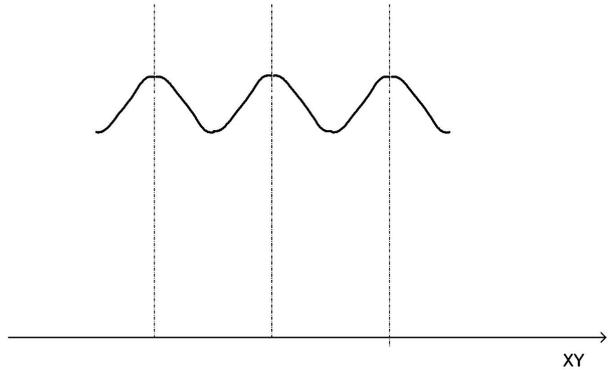
【図1】



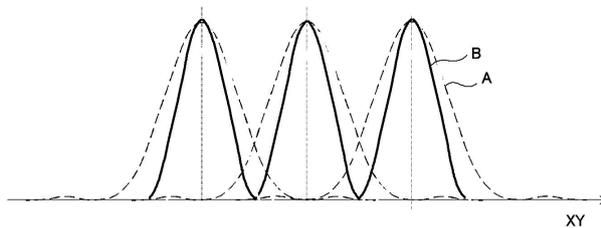
【図6】



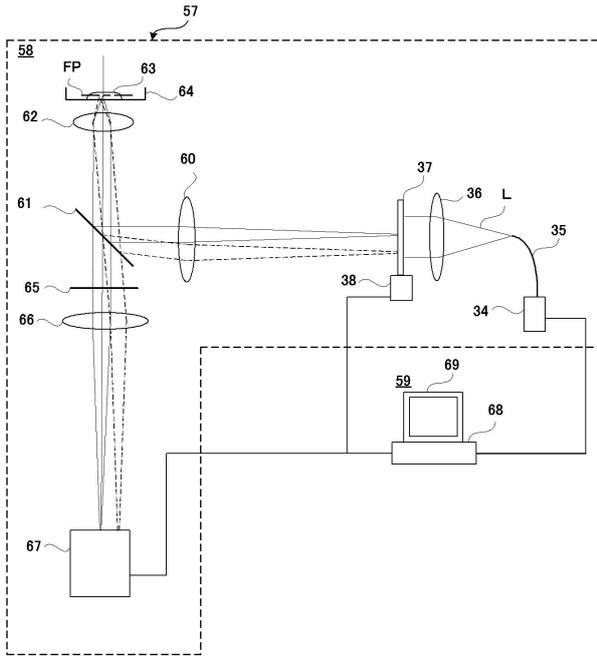
【図7】



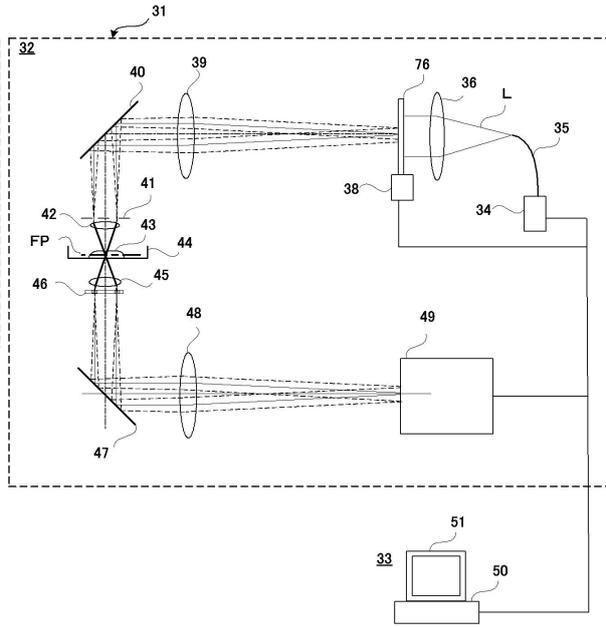
【図5】



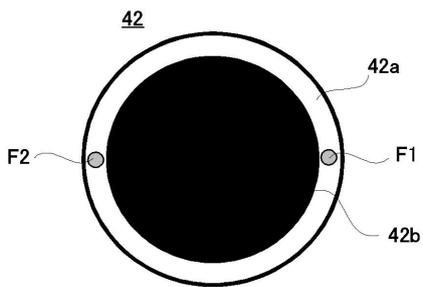
【 9 】



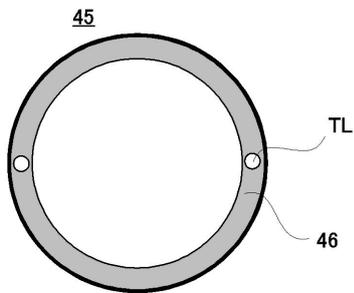
【 11 】



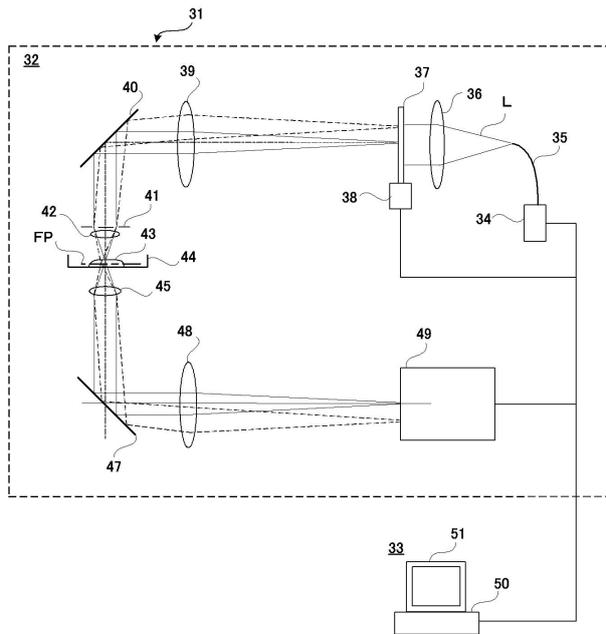
【 13 】



【 14 】



【 16 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開2013-130853(JP,A)
特開平05-333272(JP,A)
特開2009-169236(JP,A)
特開2003-255231(JP,A)
特開2013-020083(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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