

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5386742号
(P5386742)

(45) 発行日 平成26年1月15日 (2014. 1. 15)

(24) 登録日 平成25年10月18日 (2013. 10. 18)

(51) Int. Cl.

F I

G O 2 B 21/06 (2006. 01)

G O 2 B 21/06

G O 2 B 21/36 (2006. 01)

G O 2 B 21/36

G O 1 N 21/64 (2006. 01)

G O 1 N 21/64

B

G O 1 N 21/64

Z

請求項の数 5 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2009-230229 (P2009-230229)
 (22) 出願日 平成21年10月2日 (2009. 10. 2)
 (65) 公開番号 特開2011-76024 (P2011-76024A)
 (43) 公開日 平成23年4月14日 (2011. 4. 14)
 審査請求日 平成24年10月2日 (2012. 10. 2)

(73) 特許権者 301032942
 独立行政法人放射線医学総合研究所
 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
 (73) 特許権者 303035709
 株式会社オブセル
 埼玉県さいたま市緑区太田窪1丁目1番2
 1号
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100103609
 弁理士 井野 砂里
 (74) 代理人 100095898
 弁理士 松下 満

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

放射性物質で構成される試料に照射することにより蛍光を発光させるための励起光を出射する発光器と、

前記試料上における前記励起光の照射位置を第1の所定方向に移動させるとともに、移動前の照射位置から発光された蛍光の照射方向を第2の所定方向に移動させることが可能な走査手段と、

反射光をカットして蛍光を選択する蛍光選択手段と、

前記蛍光選択手段によって選択された蛍光を受光する受光素子と、を備えた蛍光観察するための共焦点顕微鏡において、

前記走査手段と前記受光素子との間に設けられ、長手方向が前記第2の所定方向に対応した方向に沿って延び、前記蛍光を通過させるスリットを備える共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察をするための蛍光の測定方法であって、

前記試料の所定位置に励起光を照射する第1のステップと、

前記蛍光選択手段によって、前記試料において前記励起光の照射位置から反射された励起光の反射光をカットして前記励起光の照射位置からの蛍光及び過去に発光された蛍光を選択する第2のステップと、

前記蛍光選択手段によって選択された蛍光を前記スリットを通して前記受光素子で受光する第3のステップと、

前記走査手段によって前記試料の照射位置を前記第1の所定方向に沿って移動させると

ともに移動前の照射位置から発光された蛍光の照射方向を前記第 2 の所定方向に移動させながら、所定時間間隔毎に前記第 1 のステップから前記第 3 のステップを繰り返すことにより、前記受光素子で受光した蛍光の受光量を、所定時間間隔に対応した蛍光の測定値として測定する第 4 のステップと、

前記第 4 のステップにおいて測定された所定時間間隔の受光量の測定値を、前記走査手段による照射位置の移動量に対応した距離だけ互いに間隔をあけて表示する第 5 のステップと、を備える、

ことを特徴とする蛍光の測定方法。

【請求項 2】

前記試料への前記励起光の照射位置を前記第 1 の所定方向と直交する方向に移動させる第 6 のステップを更に有し、前記第 6 のステップにおいて照射位置を移動させた後、前記第 1 のステップから第 4 のステップを繰り返す、

請求項 1 に記載の蛍光の測定方法。

【請求項 3】

前記スリットは、前記長手方向に垂直な方向の寸法が、前記発光器からの励起光のスポート径の 1 倍から 20 倍である、

請求項 1 または請求項 2 に記載の蛍光の測定方法。

【請求項 4】

前記走査手段は、前記発光器からの励起光を反射するとともに、励起光の照射方向に垂直な軸を中心に回転する回転ミラーまたは前記軸を中心に揺動する揺動ミラーである、

請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の蛍光の測定方法。

【請求項 5】

前記発光器は、励起光としてレーザー光を出射するレーザー発光器である、

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の蛍光の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察をするための蛍光の測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、顕微鏡で蛍光観察を行うのに使用される蛍光顕微鏡は、例えば特許文献 1 に開示されるように、励起光を出射する光源と、光源からの光を試料に導いてこれに照射するための光学レンズや反射ミラー等の光学系と、試料からの蛍光を像として観察するための接眼レンズとを備える。このような蛍光顕微鏡においては、蛍光の情報は、励起光が照射された所定の領域における蛍光の積算値として得られる。したがって、従来の蛍光顕微鏡では、例えばその領域内で蛍光を発している箇所を特定したり、当該箇所での蛍光量を特定したりすることができない。

【0003】

近年では、蛍光観察において、より詳細な蛍光の情報を得るために、共焦点顕微鏡を使用することが提案されている。共焦点顕微鏡は、例えば特許文献 2 に開示されるように、レーザー光を発光するレーザー発光器と、レーザー発光器からのレーザー光を観察対象である試料に照射するためのレンズと、試料からの反射光のうち、焦点以外の位置での反射光をカットするピンホールと、ピンホールを通った光を検出する光検出器とを備える。この共焦点顕微鏡では、焦点以外の位置での反射光をピンホールでカットするため、焦点におけるノイズの少ない測定データを得ることができ、蛍光の情報を局所的に得ることができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2008 - 249669 号公報

10

20

30

40

50

【特許文献2】特開2008-256927号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ところで、例えば、輝尽性発光体のような物質は放射線を照射した後に励起光を照射すると蛍光を発するが、この蛍光の強度の経時変化を知ることによって、その放射線の種類を特定することができることが知られている。このような場合、上述の特許文献1及び特許文献2に記載の顕微鏡においては、1つの測定位置に対して所定の時間、蛍光を測定する必要がある。特に特許文献2の共焦点顕微鏡を用いた場合では、測定箇所を移動させながら繰り返し蛍光を測定する必要があるため、所望の領域にわたって蛍光の経時変化を得るには、相当な時間がかかり、現実的でない。

10

【0006】

本発明の目的は、輝尽性発光体あるいは蛍光物質に広範囲にまばらに分布している蛍光点の蛍光観察を行う場合に、蛍光の経時変化を短時間で容易に測定することができる、共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察をするための蛍光の測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記の目的を達成するために、本発明の共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察をするための蛍光の測定方法は、放射性物質で構成される試料に照射することにより蛍光を発光させるための励起光を出射する発光器と、試料上における励起光の照射位置を第1の所定方向に移動させるとともに、移動前の照射位置から発光された蛍光の照射方向を第2の所定方向に移動させることが可能な走査手段と、反射光をカットして蛍光を選択する蛍光選択手段と、蛍光選択手段によって選択された蛍光を受光する受光素子と、を備えた蛍光観察するための共焦点顕微鏡において、走査手段と受光素子との間に設けられ、長手方向が第2の所定方向に対応した方向に沿って延び、蛍光を通過させるスリットを備える共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察をするための蛍光の測定方法であって、試料の所定位置に励起光を照射する第1のステップと、蛍光選択手段によって、試料において励起光の照射位置から反射された励起光の反射光をカットして励起光の照射位置からの蛍光及び過去に発光された蛍光を選択する第2のステップと、蛍光選択手段によって選択された蛍光をスリットを通して受光素子で受光する第3のステップと、走査手段によって試料の照射位置を第1の所定方向に沿って移動させるとともに移動前の照射位置から発光された蛍光の照射方向を第2の所定方向に移動させながら、所定時間間隔毎に第1のステップから第3のステップを繰り返すことにより、受光素子で受光した蛍光の受光量を、所定時間間隔に対応した蛍光の測定値として測定する第4のステップと、第4のステップにおいて測定された所定時間間隔の受光量の測定値を、走査手段による照射位置の移動量に対応した距離だけ互いに間隔をあけて記録する第5のステップと、を備える、ことを特徴としている。

20

30

【0008】

このように構成された本発明においては、発光器からの励起光が試料に照射されるとき、試料の被照射部分からは、励起光の反射光が発生するとともに、さらに、その被照射部分に放射性物質が存在したり放射化されたりしていると、当該部分から蛍光が発光される。このため、試料の被照射部分からは励起光の反射光と蛍光が混在して発せられることがある。この蛍光を含む場合がある反射光のうち、反射光は、蛍光選択手段を通過させることでカットされ、蛍光を含む場合にはその蛍光のみが選択されて蛍光の情報が得られる。この蛍光の情報は、スリットを通過して共焦点における蛍光の情報として、受光素子で受光され計測される。

40

【0009】

次に、走査手段によって、励起光の照射位置を第1の所定方向に移動させるとともに、移動前の照射位置から発光された蛍光の照射方向を第2の所定方向に移動させると、移動した照射位置からの反射光及び（蛍光が発せられる場合には）蛍光が発せられると共に、移動前の照射位置からの蛍光も発せられる。ここで、スリットは、走査手段と受光素子の

50

間に設けられ、長手方向が第2の所定方向に対応した方向に配置されているので、移動前の照射位置から発光を続けている蛍光があれば、この蛍光はスリットを長手方向に移動しながら通過する。このようにして、受光素子においては、移動前の照射位置における蛍光の情報を得ることができるので、蛍光の受光量の経時変化が計測可能となる。

【0010】

このような構成の本発明では、スリットを用いてスリットの幅以外の蛍光をカットしているので、共焦点における蛍光の情報を得ることができる。したがって、従来の共焦点顕微鏡と同様に、ノイズの少ない蛍光の情報が得られ、蛍光の情報を局所的に調べることができる。よって、例えば試料に局所的に蓄積された放射線情報の蓄積箇所の特定や、その特定箇所における放射線情報の蓄積量等の詳細な情報を得ることができる。

10

また、走査手段により励起光の試料上の照射位置が第1の所定方向に沿って移動され、その移動軌跡上に蛍光物質が存在すれば、その蛍光の情報がスリットを通過して受光素子によって受光される。ここで、第4のステップにおいて、蛍光の照射方向を第2の所定方向に移動させながら、所定時間間隔毎に蛍光の受光量を測定するので、蛍光の経時変化が計測可能となる。この蛍光の受光量の経時変化から、放射線の種類の特定が可能になる。

また、走査手段によって励起光の試料上の照射位置を第1の所定方向に移動させながら蛍光の情報を得ることができるので、短時間で放射性物質あるいは放射化物質の存在場所及びその蛍光観察を行うことができる。

更に、蛍光の受光量の測定値を、走査手段による励起光の照射位置の移動量に対応した距離だけ互いに間隔をあけて記録するので、励起光の照射位置と受光量の測定値の記録点の位置とが互に対応する。したがって、試料における蛍光の受光量の情報と同時に、受光量の分布を得ることができる。よって、蛍光が発せられている位置を容易に特定することができ、またその分布を容易に把握することができる。

20

本発明において、好ましくは、試料への励起光の照射位置を第1の所定方向と直交する方向に移動させる第6のステップを更に有し、第6のステップにおいて照射位置を移動させた後、第1のステップから第4のステップを繰り返す。

このように構成された本発明においては、走査手段によって試料への照射位置を第1の所定方向に沿って移動させながら蛍光の計測を行うとともに、第1の所定方向と直交する方向にも移動させて計測を行うので、蛍光の受光量の情報を二次元で得ることができる。したがって、蛍光が発せられている位置を容易に特定することができ、またその分布を二次元で容易に把握することができる。

30

【0011】

本発明においては、好ましくは、スリットは、長手方向に垂直な方向の寸法が、発光器からの励起光のスポット径の1倍から20倍である。

このように構成された本発明においては、スリットの長手方向に垂直な方向の寸法が適切に設定されているので、長手方向の寸法を長くして直線状の領域について蛍光の測定を可能にしながら、従来の共焦点顕微鏡と同様に焦点以外の領域からのノイズを効果的にカットすることができ、クリアな画像が得られる。

【0012】

本発明においては、好ましくは、走査手段は、発光器からの励起光を反射するとともに、励起光の照射方向に垂直な軸を中心に回転する回転ミラーまたは軸を中心に揺動する揺動ミラーである。

40

このように構成された本発明においては、走査手段が回転ミラーである場合には、回転ミラーを回転させることにより、連続的に一方向に励起光の照射方向を移動させることができる。したがって、簡単な構造で励起光の照射位置を変更することができる。

また、走査手段が揺動ミラーである場合には、揺動ミラーを揺動させることにより、往復方向に励起光の照射位置を移動させることができる。走査手段が揺動ミラーであるので、回転ミラーに比べてコンパクトに構成することが可能となるから、設置に必要なスペースを小さくすることができる。

このように、走査手段によって試料上を走査する場合、停止することなく連続して試料

50

の照射位置を変更させながら試料の蛍光観察を行うことができるから、短時間で蛍光観察を行うことができる。

【 0 0 1 3 】

本発明においては、好ましくは、試料上における励起光の照射位置を、第 1 の所定方向と直交する方向に移動させることが可能な移動手段を更に備える。

このように構成された本発明においては、移動手段が更に設けられているので、走査手段によって試料上における励起光の照射位置を第 1 の所定方向に移動させることができる上に、移動手段によってこの方向と直交する方向にも移動させることが可能となる。したがって、試料の蛍光観察を二次元にわたって行うことができるから、共焦点顕微鏡の操作性が向上する。

10

【 0 0 1 4 】

本発明においては、好ましくは、発光器は、励起光としてレーザー光を出射するレーザー発光器である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】本発明の一実施形態による共焦点顕微鏡の全体構成を示す図である。

【図 2】本発明の一実施形態による蛍光フィルタの波長に対する透過率の関係を示す図である。

【図 3】物質における蛍光強度の経時変化を例示的に示す図である。

【図 4】照射位置の移動前の状態における試料からの反射光及び蛍光の経路を示す図である。

20

【図 5】照射位置の移動後の状態における試料からの反射光及び蛍光の経路を示す図である。

【図 6】照射位置が移動する場合における光電子増倍管での受光状態を示す図である。

【図 7】本実施形態による共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察した際の蛍光の受光結果の表示方法を示す図である。

【図 8】本実施形態による共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察する際の蛍光の受光量を 2 次元で記録する記録方法を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

30

以下、本発明の好ましい実施形態について添付図面を参照して説明する。

図 1 は、本発明の一実施形態による共焦点顕微鏡の全体構成を示す概略図である。この図 1 に示すように、本発明の一実施形態による共焦点顕微鏡 1 は、レーザー光を出射するレーザー発光器 2 と、試料 4 から発せられた蛍光を受光する受光素子としての光電子増倍管 6 と、レーザー発光器 2 からのレーザー光を試料 4 に照射すると共に、試料 4 からの蛍光を光電子増倍管 6 に導く光学系 8 と、試料 4 を載置するための載置台 10 と、を備える。

【 0 0 2 3 】

レーザー発光器 2 は、所定波長の単一波長光を出射するように構成され、本実施形態では、レーザー光の波長は例えば 405 nm である。

40

光学系 8 は、レーザー発光器 2 から試料 4 までのレーザーの経路に沿って配置された、コリメータレンズ 12 と、ビームスプリッタ 14 と、ポリゴンミラー 16 と、走査レンズ 18 と、反射ミラー 20 と、を備える。

ポリゴンミラー 16 は、レーザー光の進行方向に対して垂直な方向に回転可能な回転ミラーであり、ビームスプリッタ 14 からのレーザー光を所定方向に反射する。このポリゴンミラー 16 の回転によって、レーザー光の試料 4 への照射位置が第 1 の所定方向に沿って移動するとともに、試料 4 からの反射光及び蛍光の照射方向が第 2 の所定方向に沿って移動することとなるので、このポリゴンミラー 16 は、本発明の走査手段として機能する。本実施形態では、レーザー光を試料 4 に向かって反射する面と試料 4 からの反射光及び蛍光を光電子増倍管 6 へ向けて反射する面が共通であるので、第 1 の所定方向及び第 2 の

50

所定方向はともに、ポリゴンミラー 16 の回転方向に一致する方向である。このポリゴンミラー 16 は、一定速度で回転可能であり、本実施形態では、12000rpm で回転するように設定されている。

【0024】

また、光学系 8 は、試料 4 から光電子増倍管 6 までの反射光の経路に沿って、前述の反射ミラー 20、走査レンズ 18、ポリゴンミラー 16、及びビームスプリッタ 14 が配置され、それらの下流側に更に、反射プリズム 22 と、蛍光選択手段としての蛍光フィルタ 24 と、コリメータレンズ 26 と、スリット 28 と、を備える。

【0025】

ビームスプリッタ 14 は、レーザー発光器 2 からの励起光を反射するとともに、ポリゴンミラー 16 によって反射された試料 4 からの反射光を透過するように構成されている。

蛍光フィルタ 24 は、試料 4 からの反射光のうち、所定の波長以上の光のみを透過させることによって、レーザー光をカットし蛍光のみを透過させるものである。

図 2 は、蛍光フィルタ 24 の波長に対する透過率の関係を示す。この図 2 の線 A に示すように蛍光フィルタ 24 は、所定波長以上の光を透過するように構成されている。ここで、本実施形態では、蛍光フィルタ 24 の透過最小波長は、図 2 の線 B で示すレーザー光の波長よりも大きく設定されている。また、図 2 の線 C で示すように、試料 4 からの蛍光の波長範囲は、通常、レーザー光の波長よりも長いので、蛍光フィルタ 24 の透過最小波長は、この、試料 4 からの蛍光の波長範囲の下限よりも小さく設定される。このような設定により、蛍光フィルタ 24 は、試料 4 からの反射光のうち、レーザー光の反射光を透過せず、蛍光のみを透過するようになっている。以上のように、蛍光フィルタ 24 の透過最小波長の範囲は、試料 4 の種類、即ち試料 4 からの蛍光の波長範囲や使用するレーザー光の波長等を勘案して適宜設定する。

【0026】

スリット 28 は、その長手方向が、ポリゴンミラー 16 の回転によって移動する励起光の反射光及び蛍光の移動方向に光学的に対応する走査方向（第 2 の所定方向）に沿って配置されている。即ち、図 1 の構成では、スリット 28 の長手方向は、ポリゴンミラー 16 の回転軸に垂直な方向に配置されている。スリット 28 の幅（短手方向の寸法）は、小さければ小さいほど高解像度の蛍光の情報が得られるが、小さくすると光量が小さくなるので、これらを勘案して適宜設定する。本実施形態では、スリット 28 の幅（短手方向の寸法）は、レーザー光のスポット径の 1 倍から 20 倍、好ましくは 1 倍から 3 倍に設定され、例えば 10 μm に設定される。

また、スリット 28 の長さ（長手方向の寸法）は、蛍光寿命に対応して発生するレーザー光の反射光及び蛍光の、ポリゴンミラー 16 の回転によってスリット 28 の位置で移動する範囲に応じて、即ち、レーザー光の反射光及び蛍光のスリット 28 上での最大移動範囲よりも大きく設定されることが好ましい。本実施形態では、反射光の移動範囲は載置台 10 上で 2mm 程度であるので、スリット 28 の長さを 10mm 程度に設定している。スリット 28 は、例えばステンレス鋼をレーザー加工することによって形成される。

【0027】

光電子増倍管 6 は、図示しないパソコンに接続されており、スリット 28 を通過して受光した蛍光を A/D 変換によりデジタル信号に変換し、パソコンに出力する。光電子増倍管 6 は、試料 4 からの蛍光を受光する受光部 30 を有し、本実施形態ではこの受光部 30 は、スリット 28 のあらゆる位置を通る蛍光を受光するように構成された単一の受光部である。したがって、受光部 30 で得られる蛍光の受光量は、スリット 28 の任意の位置を通る蛍光の合計値となる。

載置台 10 は、反射ミラー 20 で反射されたレーザー光の照射方向に垂直で且つポリゴンミラー 16 の回転によるレーザー光の照射位置の移動方向 D に直交する方向（Y 方向）に、試料 4 を移動可能に構成された移動手段としての移動機構 11（図ではローラのみを表示）を有する。

なお、移動機構は、試料 4 の深さ方向を含んだ 3 次元の蛍光情報を得るために、試料 4

10

20

30

40

50

の厚み方向に沿った方向（Z方向）にも移動可能に構成し、試料4を2方向（YZ方向）に移動させるように構成してもよい。

【0028】

このように構成された共焦点顕微鏡1では、次のように作用する。

本実施形態では、試料4として、輝尽性発光体あるいは蛍光物質を採用する。この試料4にレーザー光を照射すると、当該照射部分に放射線情報が蓄積されている場合、レーザー光の照射により、試料4は蛍光を発生する。本実施形態では、その蛍光の分布、強度、経時変化等を測定することによって、放射線の種類の特定や、蓄積された放射線情報の位置及びその強さ等を測定するために、共焦点顕微鏡1を用いる。

【0029】

ここで、レーザー光を試料4に照射したときの蛍光の発生傾向、即ち蛍光の強度の経時変化は、試料4によって特有である。図3には、ある物質における蛍光強度の経時変化を例示的に示す。この図3において、例えば、蛍光強度の初期の増加度合い、最大強度とその強度が現れる時間、最大強度後の蛍光強度の減少度合い等は、放射線の種類によって特有の値を有するものである。そこで、試料4における蛍光強度の経時変化を測定することにより、放射線の種類の特定を行う。

【0030】

図4は、本実施形態による共焦点顕微鏡1における試料4からの反射光及び蛍光の経路を示す図である。なお、図4においては、光路の違いをわかりやすくするため、一部誇張して記載する。この図を参照して共焦点顕微鏡1の動作を説明する。

図4において、まず、試料4を載置台10に固定し、レーザー発光器2からレーザー光を出射する。レーザー光は、コリメータレンズ12によって平行光としてビームスプリッタ14に入射し、このビームスプリッタ14で反射されてポリゴンミラー16に入射する。入射したレーザー光は、ポリゴンミラー16で反射され、試料4上の第1の照射位置 P_A に結像される。

【0031】

試料4の第1の照射位置 P_A 点にレーザー光が照射されると、レーザー光が反射されるとともに、当該部分に放射線情報が蓄積されていれば、 P_A 点の走査時に試料4は蛍光 E_0 を発する。この蛍光は、レーザー光の反射光を含んだ状態で、反射ミラー20で反射され、走査レンズ18を通過してポリゴンミラー16で反射され、ビームスプリッタ14を透過して反射プリズム22に入射し、この反射プリズム22によって反射される。反射プリズム22によって反射された、試料4から発せられる蛍光及びレーザー光の反射光は、蛍光フィルタ24によってレーザー光の波長の反射光がカットされ、蛍光の波長の光のみが選択される。蛍光のみとなった光は、コリメータレンズ26を通過してスリット28に結像する。共役点においてスリット28を通過することにより、焦点以外の領域からのノイズをカットし、クリアな画像が得られる。

【0032】

スリット28を通過した蛍光は、光電子増倍管6によって受光部30の P_a 点において受光される。光電子増倍管6からの光量アナログ信号をパソコンでA/D変換し、プログラムによって可視化してディスプレイ等に表示する。

【0033】

ここで、ポリゴンミラー16は、一定の所定回転数で連続的に回転している。したがって、ポリゴンミラー16が回転すると、試料4に照射されるレーザー光の位置は、載置台10上でX方向に沿って移動する。また、この移動に伴って、スリット28における試料4からの蛍光の入射位置は、スリット28の長手方向に沿って移動する。

【0034】

前述の図4において、ポリゴンミラー16が角度 だけ回転すると、試料4に照射されるレーザー光の位置は、試料4上においてD方向に直線状に移動し、例えば照射位置が P_A 点から第2の照射位置の P_B 点まで移動する。このとき、 P_B 点に蛍光物質が存在すると、その P_B 点からの蛍光は、図4において一点鎖線で示すように、ポリゴンミラー16で

10

20

30

40

50

反射された後、照射位置が移動する前の第 1 の照射位置 P_A 点における蛍光の経路と同じ経路（図 4 において実線で示す）をたどる。この結果、 P_B 点から発せられた蛍光は、 P_A 点にレーザー光が照射された場合の蛍光の受光位置 P_1 点に到達し、当該位置において受光部 30 に受光されることとなる。

以上のように、レーザー光の照射を受けたときに発せられた蛍光は、受光部 30 において常に受光位置 P_1 点で受光される。

【0035】

図 5 は、本実施形態による共焦点顕微鏡 1 においてポリゴンミラー 16 を所定角度回転させたときの試料 4 からの反射光及び蛍光の経路を示す。この図 5 に示すようにポリゴンミラー 16 の回転によって試料 4 に照射されるレーザー光の位置が照射位置 P_B 点に移動したとき、 P_B 点に放射性が蓄積されている場合には、 P_B 点から発せられた蛍光は、前述の図 4 において説明し且つ図 5 において実線で示すように、受光部 30 において受光位置 P_1 点で受光される。一方、 P_A 点から蛍光が継続的に発せられている場合には、 P_A 点から発せられた蛍光は、図 5 に一点鎖線で示すように、 P_1 点よりもスリット 28 の長手方向に移動し、受光部 30 において受光位置 P_2 点で受光される。

【0036】

図 6 は、本実施形態による共焦点顕微鏡 1 においてレーザー光の照射位置及び蛍光の照射方向を移動させる前及び移動させた後の受光部 30 における蛍光の様子を模式的に示す。まず、レーザー光の照射位置を移動させる前、即ちレーザー光が P_A 点に照射される場合、試料 4 の照射位置 P_A に放射線が蓄積されている場合に発生する蛍光 E_0 は、図 6 (A) に示すようにスリット 28 に対応した長方形の領域内の P_1 点に現れる。なお、この図 6 においては、蛍光 E_1 の受光量を、その円の大きさで表す。つまり、蛍光 E_{A1} の半径が大きいほど、受光量が大きいことを示す。受光部 30 は、スリット 28 の全域において通った蛍光を受光するので、蛍光をそれらの受光量の合計として受光する。なお、図 6 (A) においては、蛍光 E_{A1} のみが受光されているので、この場合には、受光部 30 は、蛍光 E_{A1} の受光量を、スリット 28 からの受光量 G_1 として受光する。

【0037】

ポリゴンミラー 16 を所定角度回転させると、前述のようにレーザー光の照射位置が P_A 点から P_B 点に移動すると共に、 P_A 点から発せられる蛍光の照射方向が、受光部 30 において P_1 点から P_2 点に移動する。ここで、通常、試料 4 には放射線が密集して蓄積されていることは少なく、まばらに分布していることが多い。そこで、本実施形態では、照射位置 P_A 点には放射線が蓄積され、照射位置 P_B 点には放射線が蓄積されていないとして説明する。

【0038】

前述の図 4 において P_1 点において照射位置 P_A 点からの蛍光が E_1 の強度で受光された後、ポリゴンミラー 16 が回転すると、図 6 (B) に示すように、照射位置 P_A 点からの蛍光は P_2 点に移動して受光される。このとき、ポリゴンミラー 16 が回転して蛍光の照射方向が移動する間の所定時間だけ時間が経過しているため、 P_A 点からの蛍光の強度 E_2 は、強度 E_1 から所定時間経過した後の強度を示し、本実施形態では、強度 E_1 よりも小さくなっている。

一方、 P_A 点からの蛍光を P_2 点で受光しているとき、レーザー光は P_B 点を照射しているが、本実施形態では P_B 点には放射線が蓄積されていないため、照射位置 P_B 点からは蛍光が発せられない。したがって、図 6 (B) に示すように、照射位置 P_B 点に対応する受光部 30 における受光位置 P_1 点においては、蛍光が検出されない。よって、図 6 (B) において受光部 30 が受光する受光量 G_2 は、照射位置 P_A 点からの蛍光の強度 E_2 と等しい。

【0039】

その後、ポリゴンミラー 16 が回転してレーザー光の照射位置及び蛍光の照射方向が移動するに従って、図 6 (C) 及び図 6 (D) に示すように、照射位置 P_A 点から発せられた蛍光の強度は、受光部 30 において受光位置を P_3 、 P_4 と移動しながら、それぞれ E_3

10

20

30

40

50

、 E_4 として検出される。ここで、本実施形態では、蛍光の強度 E_3 、 E_4 は、時間の経過と共に徐々に小さくなっている。また、本実施形態では、照射位置 P_A 点の周辺には放射線が蓄積された箇所がないため、照射位置がポリゴンミラー16の回転に従って移動しても、図6(C)における受光位置 P_1 、 P_2 、図6(D)における受光位置 P_1 、 P_2 、 P_3 、及び図6(E)における P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 には蛍光が検出されない。したがって、図6(C)、図6(D)及び図6(E)における受光部30での受光量は、それぞれ $G_3 = E_3$ 、 $G_4 = E_4$ 、 $G_5 = E_5$ となっている。なお、図6(E)においては、照射位置 P_A 点からの蛍光も消滅しているため蛍光が検出されず、 E_5 が0となるので受光量 G_5 は0となる。

【0040】

10

ここで、実際には、ポリゴンミラー16は連続的に回転しているので、受光部30にはポリゴンミラー16の回転と共に蛍光が長手方向に沿って移動し、蛍光の情報が連続的に送られている。そこで、本実施形態では、パソコンにおいて所定時間毎に蛍光強度(蛍光の受光量 G)の測定を行うように設定されている。したがって、パソコンは、ポリゴンミラー16が だけ回転する毎に、所定回数の蛍光強度のサンプリングが行われるように、サンプリング時間が設定されている。

また、異なる照射位置において発せられる蛍光は、ポリゴンミラー16の同一反射面で反射されて検出器に入力する場合と、異なる面で反射されて検出器に入力する場合があるが、計測上は区別をする必要はない。

【0041】

20

以上のようにポリゴンミラー16を回転させながら蛍光の受光量を測定する作業を繰り返すことにより、ポリゴンミラー16の所定角度 毎、即ち、所定時間毎における蛍光の受光量を測定する。また、ポリゴンミラー16が回転するに従ってレーザー発光器2からのレーザー光がポリゴンミラー16の次の面に照射されると、照射位置が初めから繰り返される。そこで、ポリゴンミラー16の反射面の切り替わりに同期させ、載置台10の移動機構11によって載置台10上の試料4をY方向に所定距離移動させて試料4の前回走査したラインの隣の走査ラインにおいてレーザー光を走査し、これを繰り返すことにより、試料4の蛍光の測定を2次元に行うことができる。

【0042】

次に、受光部30で受光した蛍光の受光結果をパソコン処理して表示する方法について説明する。

30

図7は、本実施形態による共焦点顕微鏡1を用いて蛍光観察した際の蛍光の受光結果の表示方法を示す図である。

まず、照射位置 P_A 点における蛍光の受光量 G_1 を、第1の記録点として図7に示すように記録する。そして、ポリゴンミラー16が所定角度 回転して照射位置が射位置 P_B 点に移動した場合における蛍光の受光量 G_2 を、第2の記録点として、第1の記録点から所定距離 H' 離れた位置に記録する。以下、同様にして、照射位置を移動した後の蛍光の受光量 G を所定距離 H' 毎に記録する。

【0043】

本実施形態では、照射位置 P_A 点からの蛍光が4回のサンプリングにわたって検出されたため、図7では G_1 から G_4 の4つの蛍光が記録されている。また、5回目のサンプリング時には、前述の図6(E)に示すように照射位置 P_A 点からの蛍光が消滅しているため、蛍光が観察されず、図7では受光量 G_5 が0として記録される。

40

ここで、所定距離 H' は、照射位置 P_A 点と照射位置 P_B 点との間の距離 H (図5参照)に対応して設定される。この照射位置 P_A と照射位置 P_B との間の距離 H は、ポリゴンミラー16の回転角度、ひいては回転時間及びサンプリング周期に関係し、即ち蛍光の受光量 G のサンプリング時間に関係している。したがって、この図7の表示は、蛍光強度の経時変化をも表す。この図7のような記録を解析することにより、試料4における蛍光強度の経時変化を知ることができ、その増減の傾向から放射線の種類の特定が可能となる。

【0044】

50

図 8 は、本実施形態による共焦点顕微鏡 1 を用いて蛍光観察する際の蛍光の受光量を 2 次元で記録する記録方法を示す図である。この図 8 に示すように、ポリゴンミラー 16 の回転によって試料 4 へのレーザー光の照射位置を D 方向に移動させながら、移動機構 11 によって試料 4 を Y 方向に所定距離移動させて測定を行うことにより、試料 4 の蛍光の測定値を 2 次元に記録する。ここで、図 8 における記録点の Y 方向の所定距離 I' は、試料 4 の Y 方向の所定距離 I に対応して設定される。したがって、受光量 G の記録は、試料 4 における蛍光の受光量（蛍光強度）の 2 次元分布を表す。図 8 においては、試料 4 の 3 箇所においてそれぞれ異なる種類の蛍光が発光していることを示す。このような記録を解析することにより、試料 4 において放射線情報が蓄積された箇所及び蓄積量を特定することが可能となる。

10

【0045】

なお、走査ライン上に蛍光発光点が複数存在し、スリット 28 の中に重複して蛍光発光点がある場合には、前述の発光の経時変化の観察の際には、複数点からの蛍光が合計された形で受光部 30 で受光されるが、蛍光発光位置の特定に関しては、重複した箇所の蛍光強度を比較することにより、判定可能である。

【0046】

さらに、その他、得たい情報に応じて、蛍光強度の情報を所定範囲にわたって積算する等の適宜の手法を用いて、蛍光強度の情報から所定の情報を算出することが可能となる。

【0047】

このように構成された本実施形態によれば、次のような優れた効果を得ることができる。

20

スリット 28 が、ポリゴンミラー 16 の回転による試料 4 からの反射光及び蛍光の移動方向に沿って形成されているので、ポリゴンミラー 16 の回転によってレーザー光を移動させて連続走査することによって、試料 4 上に存在する蛍光の情報が得られる。すなわち、蛍光の所在位置が検出でき、検出した各蛍光の蛍光強度の経時変化も測定できることから、放射線の種類の特定が可能になる。また、従来では、蛍光の経時変化を測定するためには、1 つの測定箇所について停止したまま所定時間が経過するまで測定しなければならず、実際には膨大な時間がかかってしまい、現実的でなかった。これに対して、本実施形態の共焦点顕微鏡 1 によれば、ポリゴンミラー 16 によって試料 4 の照射位置を移動させながら蛍光の経時変化の測定を行うことができるので、従来と比較して格段に高速に蛍光の経時変化を測定することができる。

30

【0048】

スリット 28 を設けたので、共焦点以外の蛍光をスリット 28 によってカットすることができる。したがって、従来の共焦点顕微鏡と同様に、ノイズの少ない蛍光の情報を得ることができる。これにより、スリット 28 によってクリアな画像を維持しながら、蛍光の経時変化を測定することができる。また、このとき、スリット 28 の幅を、スポット径に近い適切な寸法範囲内に設定したので、従来の共焦点顕微鏡と同様な、局所的な高解像度の蛍光情報を得ることができる。

【0049】

レーザー光の照射位置を変更する走査手段として、ポリゴンミラー 16 を設けたので、ポリゴンミラー 16 を単純に一方向に回転させることによって、簡単な構造で、レーザー光の方向を連続的に一方向に変更することができる。また、ポリゴンミラー 16 が一定速度で回転するので、レーザー光の移動速度も一定となるから、試料 4 の蛍光強度を一定間隔で容易にサンプリングすることができる。

40

【0050】

蛍光フィルタ 24 を設けたので、簡単且つ安価な構造で、試料 4 からの反射光から蛍光のみを選択することができる。

【0051】

光電子増倍管 6 の受光部 30 が、スリット 28 の任意の位置を通った蛍光の情報をその合計値として受光するので、光電子増倍管 6 の構造を簡単にできるとともに、蛍光の情報

50

量を限定できるから、パソコンでの蛍光の情報処理を簡単に行うことができる。

なお、本実施形態の光電子増倍管 6 の受光部 6 は、試料 4 の複数箇所における蛍光の情報を合計した状態で受光する。したがって、もし仮にポリゴンミラー 16 の一面の回転で試料 4 を走査する領域において放射線が蓄積された箇所が複数存在するとすれば、受光部 30 においては、これら複数箇所における蛍光の情報を重畳した形で得ることとなる。しかしながら、試料 4 において放射線が蓄積された領域は、複数の箇所が密集して存在するとよりはむしろ、特定の一箇所の領域に存在するのが一般的である。したがって、本実施形態のように、複数箇所における蛍光の情報を合計した値を使用して蛍光の経時変化を測定しても、複数箇所の放射線が重畳されることはまれである。

よって、本実施形態では、試料 4 上のある一点の蛍光の経時変化を時系列で測定することができる。また、これにより、本実施形態では、連続走査して得られた計測値を解析することにより、簡易且つ安価な方法で試料 4 上の特定の一点における放射線の種類やその蓄積量を知ることができる。

【0052】

光電子増倍管 6 で受光した蛍光の受光量 G を、図 4 に示す照射位置 P_A 点とその所定時間後の照射位置 P_B 点との間の距離に対応した距離 H' だけ隔てた位置に記録し、また Y 方向に移動して測定した蛍光の受光量 G を、 Y 方向の移動距離 I に対応した距離 I' だけ隔てた位置に記録するので、記録における記録点間の距離を試料 4 の位置と関連させることができる。したがって、本実施形態のような記録方法により、試料 4 における蛍光の分布を得ることができる。

また、上記の所定距離 H' は、計測間隔（測定時間間隔）にも関連があるため、この記録方法により、蛍光の経時変化を容易に知ることができる。

【0053】

本発明は、以上の実施の形態に限定されることなく、例えば、上記実施形態では発光器としてレーザー光を出射するレーザー発光器を用いていたが、これに限らず、レーザー以外の光を用いてもよい。

共焦点顕微鏡は、上述の実施形態のように放射線の蓄積状態を測定するものに限らず、蛍光観察を行う任意の測定に適用できる。例えば、DNA チップ、タンパク質の動態、光化学反応、量子ドットなどを測定するのに使用でき、生物学、化学、製薬学、材料学などの分野に応用可能である。

【0054】

蛍光選択手段は、蛍光フィルタに限らず、例えばバンドパスフィルタやシャープカットフィルタでもよく、またその他のフィルタ等を単体でまたは組み合わせて、蛍光のみを選択できるように構成してもよい。

走査手段は、上記実施形態では、ポリゴンミラーを用いていたが、これに限らず、発光器からの光を所定の一方方向に連続的または断続的に移動させることができるものであれば、その構造は任意である。したがって、走査手段は、例えばガルバノミラーのような揺動ミラー等であってもよい。

スリットの寸法は、発光器の種類、スポット径、走査手段の速度や移動機構の移動速度等に応じて、良好な蛍光強度の情報が得られるように適宜設定すれば良く、上述の寸法範囲に限定されない。

【0055】

光学系の構成は、上記実施形態に記載したものに限らず、任意に設定することができる。

【符号の説明】

【0056】

- 1 共焦点顕微鏡
- 2 レーザー発光器
- 4 試料
- 6 光電子増倍管

10

20

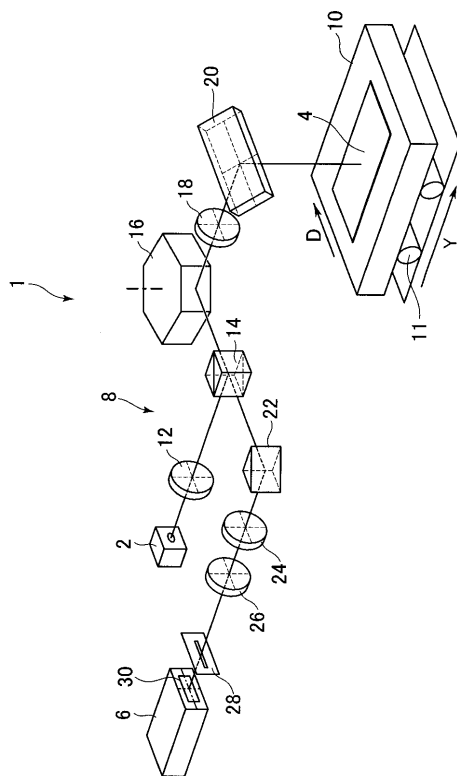
30

40

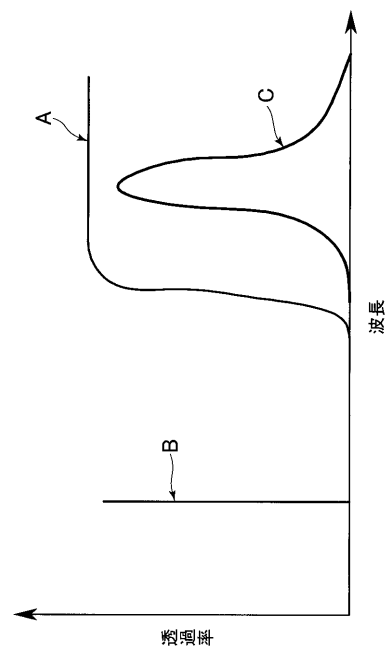
50

- 16 ポリゴンミラー
- 24 蛍光フィルタ
- 28 スリット
- 30 受光部

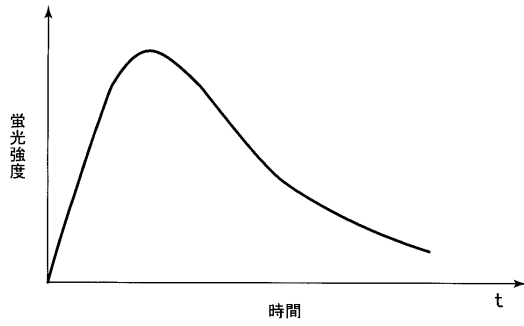
【図1】



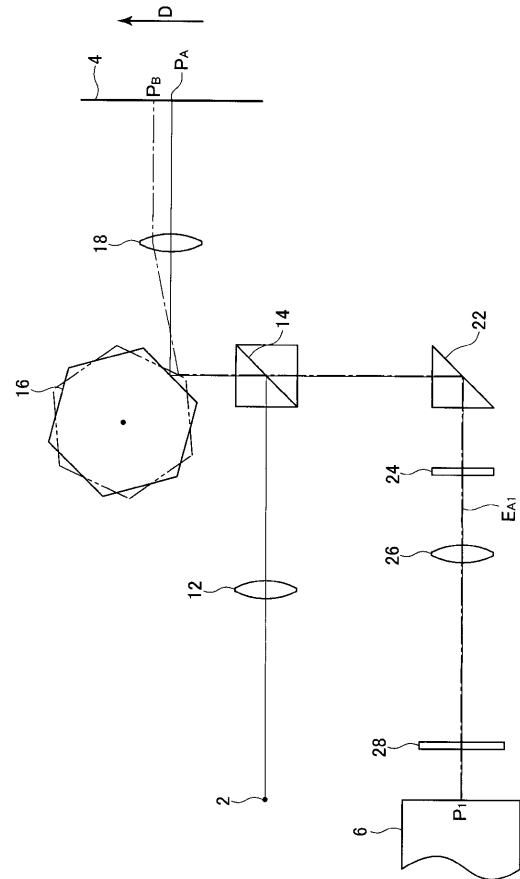
【図2】



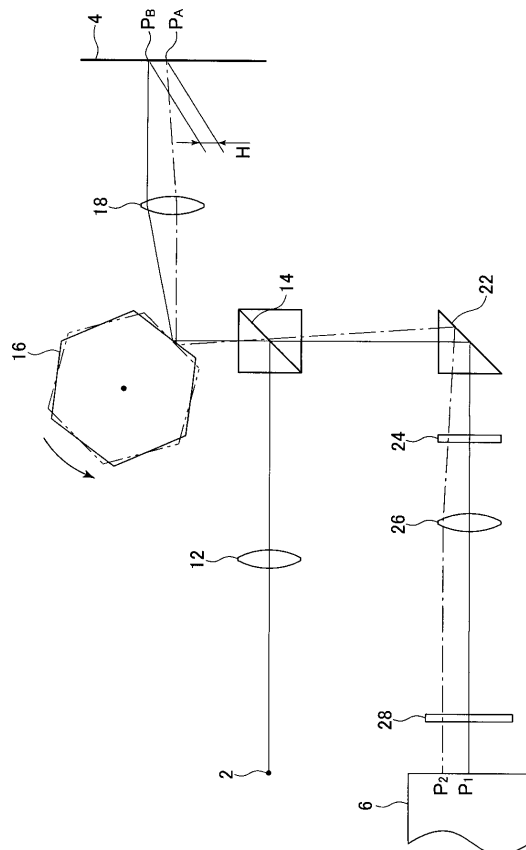
【図 3】



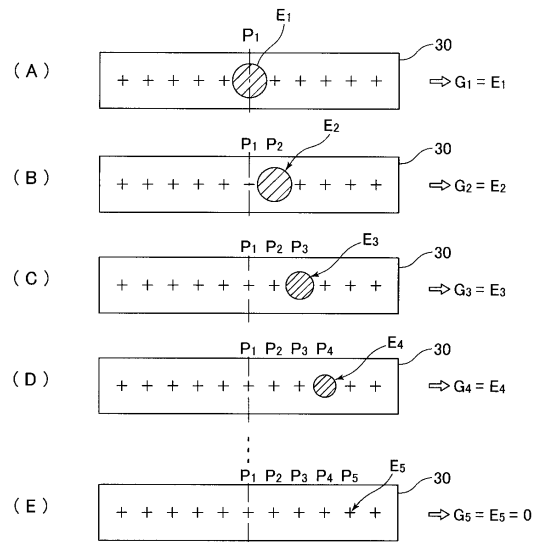
【図 4】



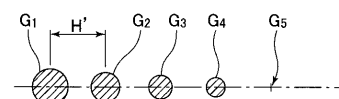
【図 5】



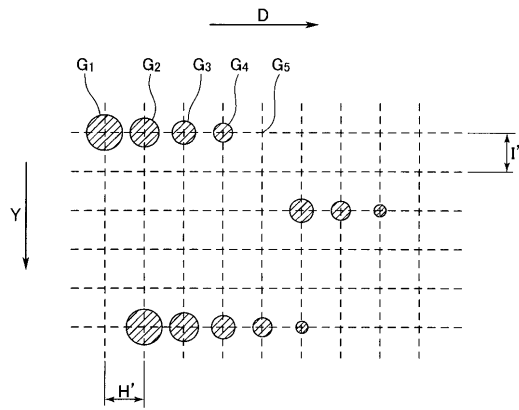
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(74)代理人 100098475

弁理士 倉澤 伊知郎

(74)代理人 100144451

弁理士 鈴木 博子

(72)発明者 安田 伸宏

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

(72)発明者 小俣 公夫

埼玉県さいたま市緑区太田窪1丁目1番地21号 株式会社オブセル内

審査官 堀井 康司

(56)参考文献 特開2002-062603(JP,A)

特開2005-121602(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/06

G01N 21/64

G02B 21/36