

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7180964号
(P7180964)

(45)発行日 令和4年11月30日(2022.11.30)

(24)登録日 令和4年11月21日(2022.11.21)

(51)国際特許分類	F I	
G 0 2 B 21/36 (2006.01)	G 0 2 B 21/36	
G 0 1 N 21/17 (2006.01)	G 0 1 N 21/17	A
G 0 2 B 21/06 (2006.01)	G 0 2 B 21/06	

請求項の数 11 (全56頁)

(21)出願番号	特願2016-546932(P2016-546932)	(73)特許権者	306018457 ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア ・ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・ オブ・ニューヨーク アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 2 7、ニューヨーク、ウエスト 1 1 6 番 ストリート 5 3 5、ロー メモリ アル ライブラリ 4 1 2
(86)(22)出願日	平成27年1月20日(2015.1.20)	(74)代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(65)公表番号	特表2017-504836(P2017-504836 A)	(74)代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(43)公表日	平成29年2月9日(2017.2.9)	(74)代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(86)国際出願番号	PCT/US2015/012076	(72)発明者	ヒルマン エリザベス エム シー
(87)国際公開番号	WO2015/109323		
(87)国際公開日	平成27年7月23日(2015.7.23)		
審査請求日	平成30年1月18日(2018.1.18)		
審査番号	不服2021-8822(P2021-8822/J1)		
審査請求日	令和3年7月2日(2021.7.2)		
(31)優先権主張番号	61/969,712		
(32)優先日	平成26年3月24日(2014.3.24)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 三次元イメージング装置および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 光源から受けた光の向きを変えて前記光をサンプル体積内の異なる深さのところを含む斜めの照明された領域に送るよう配置され、前記サンプル体積内の前記異なる深さのところを含む斜めの照明された領域から光を受け、前記光を、前記サンプル体積内の前記異なる深さのところから第 1 の方向に沿った異なる位置からの光の個別の測定を検出することが可能な光検出器に同時に送る光再配向器と、

(b) 前記サンプル体積内に向けられた光を、前記サンプル体積内における前記異なる深さのところから受けた前記光と分離するよう配置されたビームスプリッタと、
を備え、

前記光再配向器は、前記サンプル体積のスキャンの間に、前記サンプル体積の照明された領域の静止画像を前記光検出器に送るよう調整され、前記光再配向器は、単一の平面のスキャンミラーを含み、前記スキャンミラーは、固定の斜画像面が形成されるようにスキャンおよびデスクャンのいずれも実施可能である、イメージング装置。

【請求項 2】

前記単一の平面のスキャンミラーは、

光源から受けた光の向きを変えて前記光をサンプル体積に送るよう配置され、

前記単一の平面のスキャンミラーは、

前記サンプル体積内の異なる深さのところから光を受け、前記光を、第 1 の方向に沿った異なる位置からの光の個別の測定を検出することが可能な光検出器に送るよう配置され

た、請求項 1 に記載のイメージング装置。

【請求項 3】

前記光再配向器は、前記スキャンの間に、照明された前記サンプル体積の前記静止画像を前記光検出器に送るよう制御されることが可能である、請求項 1 に記載のイメージング装置。

【請求項 4】

光源をさらに含み、

前記光源は、パルス光源であるか、及び / 又は照明されたラインまたは照明された平面を提供する平行光源を含む、請求項 1 に記載のイメージング装置。

【請求項 5】

前記光検出器は、一次元画像または二次元画像を測定する検出器アセンブリを含む、請求項 1 に記載のイメージング装置。

【請求項 6】

前記光源から受けた光の向きを変えることにより、前記サンプル体積内の平面を照明する素子をさらに備える、請求項 5 に記載のイメージング装置。

【請求項 7】

前記サンプル体積内の異なる深さのところから光を受け、前記静止画像の向きを補正する素子をさらに備える、請求項 1 に記載のイメージング装置。

【請求項 8】

前記サンプル体積内の異なる深さのところから受けた光をフィルタリングするよう配置された素子、及び / 又は、前記サンプル体積の異なる深さのところから受けた光のビーム幅を変えるアパーチャをさらに備える、請求項 1 に記載のイメージング装置。

【請求項 9】

フォトマニピュレーションツールまたはイメージングツールを含む追加の光学ツールをさらに備える、請求項 1 に記載のイメージング装置。

【請求項 10】

前記フォトマニピュレーションツールは、細胞のオプトジェネティクス励起、抑制、または、修飾ツール、光ピンセットツール、光凝固ツール、光退色ツール、光誘起の細胞死または障害ツール、微小粒子またはナノ粒子からの光放出のための光キャビテーションツール、および、フォトアンケーシングツールからなるグループから選択される、及び / 又は

前記イメージングツールは、光コヒーレンストモグラフィーツール、広視野イメージングツール、スペckルフローグラフィーツール、レーザドップラーツール、レーザスキャン共焦点顕微鏡法ツール、および、2光子顕微鏡法ツールからなるグループから選ばれる、請求項 9 に記載のイメージング装置。

【請求項 11】

請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載のイメージング装置を動作する方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本出願は、2014年1月17日に提出された米国特許仮出願番号第61/928,930、2014年3月10日に提出された米国特許仮出願番号第61/950,608、2014年3月19日に提出された米国特許仮出願番号第61/955,482、2014年3月24日に提出された米国特許仮出願番号第61/969,712、および、2014年12月8日に提出された米国特許仮出願番号第62/088,921の優先権を主張する。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究の記載

本発明は、認可番号R21NS053684、R01NS076628、R01NS063226の国立衛生研究所(NINDS)、認可番号0954796の全米科学財団(キャリア)、および、アメリカ国防総省の総合的科学研究イニシアチブ(DOD)W91

10

20

30

40

50

1NF-12-1-0594による政府支援を受けてなされた。合衆国政府は本発明に対して権利を有する。

【0003】

遺伝子組み換え技術により、ニューロンの活動などの動的な生体内プロセスの蛍光リポータは日々進化し続けている[1、2]。その結果、従来の光シートイメージング技術や2光子顕微鏡法を超えた、生体内イベントを撮像することができる高速三次元光学顕微鏡法の需要が高まっている。

【0004】

従来の光シートイメージング技術は、薄い光のシートを用いてサンプルを側面から照明し、直交方向に位置決めされた第2の対物レンズを用いて照明された平面の画像を取得するものである[3-5]。その後、サンプルをこの相互位置決めされた平面に対して平行移動させることにより、三次元体積画像を形成する。このように対物レンズを2つ配置すること、側面から照明する必要があること、そしてサンプルを物理的に平行移動させることには多くの制約がある。サンプルをマウントして位置決めするのは非常に難易度が高く、イメージングできるサンプルのタイプが限られ、体積イメージングの達成可能速度も制限される。近年の進歩により、直交検出対物レンズ[6]の圧電動作、または、電気的に調整可能なレンズ[7]を介し、検出焦点面を平行移動させることによる調整走査を用いた高フレームレートの光シートイメージングが実現している。しかしながら、2つの平面の平行移動を調整する必要があることから、このイメージングシステムの速度は制限され、対物レンズを2つ配置することもいまだ制約となっている。他のアプローチとしては、標準的な光シートの配置を45度回転させてマウントされていないサンプルのイメージングをより容易にするものがあるが、体積イメージングでは、やはり対物レンズを2つ配置することが必要であり、サンプルを物理的に平行移動させる必要もある[8、9]。単一の対物レンズによる光シート技術で体積イメージングを行うには、圧電対物レンズの走査を用いる必要があるが、光シートが体積全体を掃引しないので、視野が限られる[10]。いずれの場合も、圧電対物レンズのスキャンには、速度に関しても、撮像できる生体内のサンプルの種類に関しても、本質的に制限がある。

【0005】

齧歯類の脳の生体内イメージングでは、遺伝子的に符号化されたカルシウム指示薬を介してニューロンの活動を撮像するための選択方法が行われている[1、2]。しかしながら、2光子顕微鏡法は、通常、体積画像を形成するためには単一の点を順次走査する必要があり、三次元イメージングの速度、解像度、および、視野の間でトレードオフを迫られる[11-14]。広視野、多点、および、時間的集束を実現すれば、より平行化を高めることができるが、コストが増大し、複雑化するとともに、圧電対物レンズのスキャンは依然として必要なので、視野を制限し、得られるレーザ出力も制限してしまうことになる[15]。音響光学デフレクタを用いたランダムアクセススキャンでは、速度を上げるためにサンプル内の数か所をスキャンするが、これは、無傷の脳内の多数のニューロンの活動を迅速に記録する方法として現在好まれている。しかしながら、この方法は、動きに対して非常に敏感であり、特定のニューロン細胞体を事前に選択しなければならず(発火していない状態で細胞が暗くなり得るGCaMPイメージングの場合に限る)、自由な動きを撮像するのに適していない[16、17]。ランダムアクセススキャンは、体積内の測定位置を大幅に減らすことによって速度を上げているが、体積内の選択されていない場所での突発的で予期せぬ変化を検出することができず、正確な意味での画像を形成しない。よって、近年、2光子顕微鏡法が進歩しているといえども、上記のような、ニューロン活動などの生体内プロセスを撮像できる、高速三次元体積光学顕微鏡法の必要性に十分対処できているとは言えない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】Akerboom, J. 他、Optimization of a GCaMP

10

20

30

40

50

- calcium indicator for neural activity imaging (神経活動のイメージングに向けたGCaMPカルシウムインジケータの最適化)、J Neurosci、2012.32(40):p.13819-40
- Chen, T.-W. 他、Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity (ニューロン活動をイメージングするための超高感度蛍光タンパク質)、Nature、2013.499(7458):p.295-300
- Dodt, H.-U. 他、Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain (超顕微鏡検査法: マウスの脳全体におけるニューロンネットワークの三次元視覚化)、Nature Methods、2007.4(4):p.331-336 10
- Verveer, P. J. 他、High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy (光シートの顕微鏡検査法による多量の試料の高解像度三次元イメージング)、Nat Methods、2007.4(4):p.311-3 4)
- Keller, P. J. 他、Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy (走査光シートベースの構造化照明顕微鏡検査法による動物の成長の高速高コントラストイメージング)、Nat Meth、2010.7(8):p.637-642 20
- Ahrens, M. B. 他、Whole-brain functional imaging at cellular resolution using lightsheet microscopy (光シート顕微鏡検査法を用いた細胞レベルの解像度における脳全体の機能的イメージング)、Nat Meth、2013.10(5):p.413-420
- Fahrbach, F. O. 他、Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens (調整可能レンズを用いた高速3D光シート顕微鏡検査法)、Optics Express、2013.21(18):p.21010-21026 30
- Holekamp, T. F., D. Turaga, T. E. Holy、Fast Three-Dimensional Fluorescence Imaging of Activity in Neural Populations by Objective-Coupled Planar Illumination Microscopy (対物レンズ結合型平面照明顕微鏡検査法による神経群活動の高速三次元蛍光イメージング)、Neuron、2008.57(5):p.661-672
- Wu, Y. 他、Inverted selective plane illumination microscopy (iSPIM) enables coupled cell identity lineaging and neurodevelopmental imaging in *Caenorhabditis elegans* (倒立選択的平面照明顕微鏡検査法 (iSPIM) は、結合した細胞の分化系列の同定とカエノラブディティス・エレガンスにおける神経発達イメージングを可能する)、Proceedings of the National Academy of Sciences、2011.108(43):p.17708-17713 40
- Kumar, S. 他、High-speed 2D and 3D fluorescence microscopy of cardiac myocytes (心臓筋細胞の二次元および三次元における高速蛍光顕微鏡検査法)、Optics Express、2011.19(15):p.13839-13847
- Gobel, W., B. M. Kampa, F. Helmchen、Imaging ce 50

- llular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning (高速3Dレーザスキャンを用いた、三次元における細胞網動態のイメージング)、Nature Methods、2007.4:p.73-79
- Glickfeld, L.L.他、Cortico-cortical projections in mouse visual cortex are functionally target specific (マウスの視覚野における皮質間突起は、機能的に特定のターゲットとなるものである)、Nat Neurosci、2013.16(2):p.219-226
- Jia, H.他、Linear integration of spine Ca²⁺ signals in layer 4 cortical neurons in vivo (生体内のレイヤ4の皮質ニューロンにおける脊髄Ca²⁺信号の線形的な集積)、Proceedings of the National Academy of Sciences、2014.111(25):p.9277-9282
- Mittmann, W.他、Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo (生体内でL5体性感覚ニューロンから誘発された活動における2光子カルシウムイメージング)、Nat Neurosci、2011.14(8):p.1089-1093
- Schroedel, T.他、Brain-wide 3D imaging of neuronal activity in *Caenorhabditis elegans* with sculpted light (スカルプ光を用いた、カエノラブディティス・エレガンスのニューロン活動における脳全体の3Dイメージング)、Nat Meth、2013.10(10):p.1013-1020
- Katona, G.他、Fast two-photon in vivo imaging with three-dimensional random access scanning in large tissue volumes (広範な組織において三次元ランダムアクセススキャンを用いた2光子高速生体内イメージング)、Nat Meth 9、201-208、(2012)
- Grewe, B.F.他、High-speed in vivo calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision (生体内の高速カルシウムイメージングは、ニューラルネットワークの活動をミリ秒程度の精度で解き明かす)、Nat Meth、2010.7(5):p.399-405
- Cotton, R.J.他、Three-dimensional mapping of microcircuit correlation structure (マイクロサーキットの相関構造における三次元マッピング)、Front Neural Circuits、2013.7:p.151
- Dunsby, C.、Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy、Opt Express (斜面顕微鏡検査法による光学的断面イメージング)、2008.16(25):p.20306-16
- Dwyer, P.J.他、Confocal reflectance theta line scanning microscope for imaging human skin in vivo (ヒトの皮膚を生体内で撮像する共焦点反射シータ線走査顕微鏡検査法)、Opt Lett、2006.31(7):p.942-4
- Vaziri, A.、C.V.Shank、Ultrafast widefield optical sectioning microscopy by multifocal temporal focusing (多重焦点の時間フォーカシングによる、超高速高視野の光学的断面顕微鏡検査法)、Opt. Express、2010.18(19

) : p . 1 9 6 4 5 - 1 9 6 5 5

Hillman, E. M. C., A. Moore, All-optical anatomical co-registration for molecular imaging of small animals using dynamic contrast (ダイナミックコントラストを用いた小動物の分子イメージングに向けた全光型解剖学的コレジストレーション)、Nature Photonics、2007.1(9): p . 5 2 6 - 5 3 0

Schuster, C. M. 他、Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth (シナプスの適応性の構造的および機能的な成分における遺伝子分析。I. ファシクリンIIは、シナプスの安定性と成長性を制御する)、Neuron、1996.17(4): p . 6 4 1 - 5 4

10

Curtis, N. J., J. M. Ringo, H. B. Dowse, Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, Drosophila melanogaster (フルーツフライ、すなわちキイロショウジョウバエのさなぎの心臓、成虫の心臓、および関連組織の形態学)、Journal of Morphology、1999.240(3): p . 2 2 5 - 2 3 5

Bouchard, M. B. 他、Technical considerations in longitudinal multispectral small animal molecular imaging (縦方向マルチスペクトルにおける小動物の分子イメージングの技術的考察)、J Biomed Opt., 2007.12(5): p . 0 5 1 6 0 1

20

Broxton, M. 他、Wave optics theory and 3-D deconvolution for the light field microscope (明視野顕微鏡検査法に向けた波動光学理論および3Dデコンボリューション)、Optics Express、2013.21(21): p . 2 5 4 1 8 - 2 5 4 3 9

Quirin, S. 他、Simultaneous imaging of neural activity in three dimensions (三次元におけるニューロン活動の同時イメージング)、Frontiers in Neural Circuits、2014(in press)

30

Akerboom, J. 他、Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics (神経活動におけるマルチカラーイメージングに向けて遺伝学的にエンコードされたカルシウムインジケータ、および光遺伝子学との組み合わせ)、Frontiers in Molecular Neuroscience、2013.6

Hillman, E. M. C. 他、Laminar Optical Tomography: demonstration of millimeter scale depth-resolved imaging in turbid media (層状光トモグラフィ: 混濁媒質におけるミリメートルスケールの深さ分解能イメージングの実証)、Opt. Lett., 2004.29(14): p . 1 6 5 0 - 1 6 5 2

40

Truong, T. V. 他、Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy (2光子走査の光シート顕微鏡検査法による高速で奥行きのあるライブイメージング)、Nat Meth., 2011.8(9): p . 7 5 7 - 7 6 0

Horton, N. G. 他、In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain (無傷のマウスの脳内における皮質下組織の生体内三光

50

- 子顕微鏡検査法)、Nat Photon、2013.7(3):p.205-209
 Kobat, D. 他、Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation (長波長励起を用いた深部組織の多光子顕微鏡検査法)、Opt. Express、2009.17(16):p.13354-13364
- Lavagnino, Z. 他、Two-photon excitation selective plane illumination microscopy (2PE-SPIM) of highly scattering samples: characterization and application (非常に散らばっているサンプルにおける、2光子励起の選択的な面照明顕微鏡検査法(2PE-SPIM):特性と応用)、Opt Express、2013.21(5):p.5998-6008 10
- Friedrich, M. 他、STED-SPIM: Stimulated Emission Depletion Improves Sheet Illumination Microscopy Resolution (STED-SPIM:誘導放射の減少はシート照明顕微鏡検査法の解像度を向上させる)、Biophysical Journal、2011.100(8):p.L43-L45
- Planchon, T. A. 他、Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination (Besselビーム平面照明を用いた生細胞の迅速三次元等方性イメージング)、Nat Meth、2011.8(5) 20
):p.417-423
- Lutz, C. 他、Holographic photolysis of caged neurotransmitters (ホログラフィーによるケージ化神経伝達物質の光分解)、Nat Methods、2008.5(9):p.821-827
- Golan, L. 他、Design and characteristics of holographic neural photo-stimulation systems (ホログラフィーによる神経の光刺激システムの設計と特性)、Journal of Neural Engineering、2009.6(6):p.066004
- Jing, D. 他、In situ intracellular calcium oscillations in osteocytes in intact mouse long bones under dynamic mechanical loading (機械的に動的に投入された、無傷のマウスの長い骨の中の骨細胞における、生体内の本来の場所における細胞内のカルシウムの振動)、The FASEB Journal、2014.28(4):p.1582-1592 30
- Carlson, G. C., D. A. Coulter、In vitro functional imaging in brain slices using fast voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell patch recording (セル全体のパッチレコーディングと組み合わせられた高速の電圧感受性ダイメージングを用いた、試験管内における脳のスライスの機能的イメージング)、Nat. Protocols、2008.3(2) 40
):p.249-255
- Xie, W. 他、Imaging atrial arrhythmic intracellular calcium in intact heart (無傷の心臓における、不整脈のある心房の細胞内カルシウムのイメージング)、Journal of Molecular and Cellular Cardiology、2013.64(0):p.120-123
- Sung, Y. 他、Three-Dimensional Holographic Refractive-Index Measurement of Continuously Flowing Cells in a Microfluidic Channel (微小流体チャネルの中を連続的に流れている細胞における、三次元ホログラフィーによる 50

屈折率の測定)、Physical Review Applied、2014.1(1)
: p. 014002

Regmi, R., K. Mohan, P. P. Mondal, Light sheet based imaging flow cytometry on a microfluidic platform (微小流体プラットフォームにおける、光シートによるイメージングのフローサイトメトリ)、Microscopy Research and Technique、2013.76(11): p. 1101-1107

Baik, A. D. 他、Simultaneous tracking of 3D actin and microtubule strains in individual MLO-Y4 osteocytes under oscillatory flow (振動のある流れにおける、個々のMLO-Y4骨細胞の3Dアクチンと微小管の変形の同時トラッキング)、Biochemical and Biophysical Research Communications、2013.431(4): p. 718-723

10

Radosevich, A. J. 他、Hyperspectral in vivo two-photon microscopy of intrinsic contrast (生体内における固有コントラストの2光子ハイパースペクトル顕微鏡検査法)、Opt Lett、2008.33(18): p. 2164-6

Tsai, P. S. 他、Principles, design and construction of a two photon scanning microscope for in vitro and in vivo studies (試験管内および生体内における研究に向けた2光子走査顕微鏡検査法の原理、設計、および構築)、Methods for In Vivo Optical Imaging (R. Frostig, editor)、2002. CRC Press: p. 113-171

20

Pankajakshan, P. 他、Point-spread function model for fluorescence MACROscopy imaging (蛍光マクロスコーピーイメージングに向けた点拡がり関数モデル)、in Signals, Systems and Computers (ASILOMAR)、2010 Conference Record of the Forty Fourth Asilomar Conference on. 2010

Engelbrecht, C. J., E. H. Stelzer, Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (SPIM) (光シートベースの顕微鏡(SPIM)における解像度の向上)、Optics Letters、2006.31(10): p. 1477-1479

30

Hillman, E. M., Optical brain imaging in vivo: techniques and applications from animal to man (生体内における脳の光学的イメージング: 動物から人間への技術と応用)、J Biomed Opt、2007.12(5): p. 051402

Van Staveren, H. J. 他、Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm (脂質内10%における、波長範囲400~1100nmにおける光拡散)、Appl Opt、1991.30(31): p. 4507-14

40

van-der-Zee, P., Measurement and modelling of the optical properties of human tissue in the near infrared (近赤外線における人間の組織の光学特性の測定とモデリング)、in Department of Medical Physics and Bioengineering、1992、University College London: London. p. 313

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】例示的な掃引共焦点配置平面励起(SCAPE)システムのイメージング配置、

50

画像形成および解像度を示す：(a)は、デスキャンされる検出平面を固定させた状態でサンプルを斜光シートで前後に掃引するSCAPEシステムのスキャン/デスキャン配置を示す。動いている構成要素は、体積イメージング速度で前後移動できるポリゴンスキャンミラーだけである；(b)は、放射光が同じ対物レンズで集光される際に、斜光シートがどのようにサンプルを照明するかを示す（「スキャン」、「横」、および、「深さ」（ x' 、 y' 、 z' ）方向は、非デカルトSCAPE座標系を定義する）；(c)は、GC a M P / m C h e r r y - M H C 導入キイロシヨウジョウバエの幼虫を光シートで掃引する際に画像がどのように取得されるかを示す；(d)SCAPEの解像度は、開口数(NA)の小さい入射光シートの軸方向および横方向の解像度($R_{i, lat}$ および $R_{i, ax}$)、開口数(NA)の大きい検出側の軸方向および横方向の解像度($R_{d, lat}$ および $R_{d, ax}$)、および、その間の相対角度に依存する；(e)は、オリンパスの対物レンズX L U M P L F L N (20倍/0.95W)のフーリエ光学モデルの点拡がり関数[20、21]を示す。さらなる光学レイアウト、シミュレーション、および、性能解析については、第4.6章および4.7章を参照されたい；(f)は、検出アームにおける画像回転光学部品、2色イメージングのためのカラー画像スプリッタ、および、デスキャンされた画像面における高速カメラを有するSCAPEシステムの一実施例を詳細に示す。

10

【図2】マウスの脳の脈管構造およびニューロンをSCAPE顕微鏡で見た図である。(c)および(d)のデータは、図1(f)に示したものと同一システムを用い、覚醒しているマウスの画像を1秒につき10体積で取得した：(a)は、SCAPEの画像取得のための配置を示す；(b)は、緑色の光で照明したマウスの皮質の広視野カメラ画像を示す。露出した皮質のカメラ画像は、ほぼSCAPEの視野を示している；(c)および(d)は、覚醒して行動しているマウスを撮像した図であり、血管内テキサスレッドデキストラン(赤)、および、V層のニューロンの皮質樹状突起におけるGC a M P 6 f (緑)を示している；(c)は、0.1秒間に撮影された(x' 、 y' 、 z')空間における単一の $350 \times 800 \times 105$ ミクロンの体積を示す；(d)は、同じSCAPE体積から抽出された別々の $x' - y'$ 平面を示す(各平面は、5つの連続した時点の平均である；(e)は、血管をFITC-dxで染色したウレタン麻酔下のマウスの、4段階の異なる深さ(線形グレースケール)における2光子顕微鏡法とSCAPEとの比較を示す。速度を遅くしたり速めたりするSCAPE画像取得での x' 方向の解像度は、5~10ミクロンの毛細管が、波長488nmの励起によって少なくとも140ミクロンの深さまで解像され得ることを示した。

20

30

【図3】覚醒しているマウスの脳における神経カルシウムの動態をSCAPE顕微鏡で見た図である：(a)は、露出した皮質のカメラ画像は、SCAPEの視野を示している；(b)黄色いラインは、従来の2光子顕微鏡による軸方向断面の位置を示し、黄色いボックスは、SCAPEの深さの範囲を示す；(c)は、SCAPEシステムによって撮像された樹状突起の体積レンダリング(Amira(登録商標)、ボルレン)を示し、それぞれが180秒の撮像期間における特定のイベントに対応している；(d)は、それぞれの樹状突起の色合わせした経時変化の生データを示す(例えば、図28ではさらに多くのイベントも識別された)；(e)は、蛍光 $F(t) = F(t_0)e^{-t/\tau}$ として計算された単一の樹状突起内での発現および消失のマップを示す；(f)は、(e)の色付けされた矢印によって示された領域から抽出した経時変化を示す。枝2および3(b2、b3)がよく似た動態を示す一方で、枝1(b1)に沿った点は、どちらの連続的発火においても、非常に異なる発現と消失の動態を示している。

40

【図4】自由に動くmh c - G a l 4 , U A S - C D 8 : G F P を導入した1齢のキイロシヨウジョウバエの幼虫のSCAPE画像を示す：(a)は、アンファス(en-fac e : 正面を向く)イメージング配置を採用している図である。幼虫は、視野内を自由に這って動くことができる；(b)は、幼虫全体の広視野SCAPE画像を示す；(c)は、(b)に示した白い四角のズーム画像である。1秒当たり20体積で取得された異なる深さ断面の連続画像は、1心拍の動態を示している；(d)は、これらのデータの1断面を表す体積を示す；(e)は、(d)に示された y' 平面の2ミクロンの厚さの断面のキモグ

50

ラフを示す。動物が動いているときの蠕動波および心管のリズミカルな鼓動を示している。オレンジのラインは、(d)に示された体積の時間変化を示す。

【図5】自由に動くキイロショウジョウバエの幼虫の細胞の構造関数および三次元細胞追跡をSCAPE顕微鏡によって示したものである：(a)3歳のmhc-Gal4、UAS-GCaMP6f、UAS-CD8:mCherry導入キイロショウジョウバエの幼虫は、平滑筋において、カルシウム感受性GCaMP(緑)および構造化mCherry(赤)の両方を発現した。毎秒10体積で獲得された(不連続の)画像シーケンスは、筋収縮に対応するGCaMP6f蛍光のパルスを示す；(b)動きの遅い幼虫から抽出したGCaMPの動態である；(c)1歳のNompC-QF;QUAS-tdTomato x ppk-Gal4;UAS-mCD8:GFP導入キイロショウジョウバエの幼虫の生体外における小細胞の解像度を示す、高分解能SCAPEレンジングである。クラスIVおよびクラスIIIの感覚ニューロンおよび弦音器官においてGFPおよびtdTomatoをそれぞれ発現している；(d)は、自由に動作中の上記と同じキイロショウジョウバエの幼虫の生体内SCAPEにおける(不連続な)一連の体積を示す；(e)は、時間の経過にともなう特定のニューロン((d)における丸で囲んでいるもの)の三次元位置を示す四次元追跡アルゴリズムの出力であり、自由に動作する間に動的強度信号の抽出を可能にする。

10

【図6】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図7】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図8】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

20

【図9】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図10】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図11】フィールドレンズを用いたSCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図12】光空間変調器を用いたSCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図13】成形イメージングファイバ束を用いたSCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図14】検出器側でダイナミックレンジが強調されているSCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図15】異なる対物レンズごとに調整されているSCAPE実施態様の詳細を示す図である。

30

【図16】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。スキャンを簡略化して示している。

【図17】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。二次元画像ではなく線画像(一次元)用の追加のスキャナを用いている。

【図18】屈折率分布型レンズ(GRINレンズ)を用いたSCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図19】(a)~(c)は、SCAPE実施形態の詳細を示す図である。ポリゴンスキャナまたは対物レンズを使用しないSCAPEイメージングの配置を示している。これらの図に示すような特定の実施形態では、前後に回転する単一の反射面を用いてもよい。

【図20】SCAPE実施形態の詳細を示す図である。ダイクロイックまたは偏光ビームスプリッタを用いた組織のフォトマニピュレーション、および/または、単または2光子マニピュレーションのための、同じ対物レンズを介して組織を同時に照明する他のビーム結合方法を示している。

40

【図21】2光子励起のための異なるデータ収集方法、および、検出される光子の収量の見込みをレーザーのタイプにより比較したものを示す。モデリングの結果は、異なる種類のレーザーパルスを生成するための、ラインスキャンとシート照明との間のトレードオフを示した。

【図22】図21に示されたモデルの結果を表す。各構成における光子の生成に影響を及ぼす異なる因子を示している。

【図23】SCAPEの光学配置についてのオプタリクス(Optalix)(登録商標)によるシミュレーションを示す。1枚目の図は、「現実」のレンズおよびオリンパスの

50

対物レンズ X L U M P L F L N (2 0 倍 / 0 . 9 5 W) であり、2 枚目の図は、システムの対物レンズとしての、理想の薄レンズおよび 3 0 m m の焦点距離を有する直径 1 インチのレンズを示している。どちらの図も、ポリゴンの回転が 0 度のビーム経路を示し、中間斜画像面へのマッピングを示している (モデルは、この後に続く画像面回転光学部品は示していない)。図の中段は、物体空間を光シートで掃引する位置のサンプリングを示している。各色は、異なるポリゴン角度を表し、四角のそれぞれは、(中間斜画像面にマッピングされた)カメラのピクセルを表している。赤い四角は、物体空間を掃引したときの励起ビームの焦点に対応する。中間斜画像面における同じ点のデスクャン表現が下段に示されている。これらは、中間斜画像面の前にある最後のレンズの正面に対して向けられている。薄レンズの例は、完璧に近いデスクャンを示しているが、「現実のレンズ」の例は、

10

【図 2 4】S C A P E の点拡がり関数 (P S F) のフーリエ光学モデルを示す：(a) は、S C A P E のイメージング配置を定義している；(b) 励起シートおよび検出点拡がり関数は、倍率 2 0 倍、開口数 (N A) 0 . 9 5、および、作動距離 (W D) 2 m m の対物レンズを基準にモデル化された。対物レンズの半開口 ($p_e = a / 2$) または全開口 ($p_e = a$) を用いた。倍率 2 0 倍では、検出側の開口数が、システムの分解能の重要因子となることがわかった；(c) は、図 1 (e) のズームバージョンを示す。半開口および全開口のどちらでも x および z 断面のプロットが一致した。

20

【図 2 5】位置の関数としての S C A P E 分解能に影響を及ぼす因子のガウスビームに基づくシミュレーションを示す：(a) は、イメージング配置を示す；(b) は、オリンパスの対物レンズ X L U M P L F L N (2 0 倍 / 0 . 9 5 W) での配置を想定した場合の、x 方向の異なるスキャン位置に対する励起シートと「検出円錐」との間の有効角のプロットを示す；(c)、(d) および (e) は、3 つの異なるスキャン位置および 3 つの異なる事例のためのイメージング配置および予測される x - z 平面の点拡がり関数を示す。(c) は 2 0 倍の対物レンズの半開口での検出、(d) は焦点距離 3 0 m m および直径 1 インチのレンズを用いた半開口での検出を示す；(f)、(g)、および、(h) は、x - z 視野の位置の関数としての「解像度マップ」を示す。上段の 2 つは、(図 2 4 (c) に示したように) x - z 平面の焦点位置を横断する点拡がり関数の半値全幅を示す。下段の 2 つは、直交方向における平均点拡がり関数の半値全幅を示す。

30

【図 2 6】検出側の開口数が調整可能になることにより、解像度、スループット、および、被写界深度を向上させ得る S C A P E の光学設計の代替案を示す。照明および検出用スキャンミラーは、体積速度でスキャンし、同期されることにより、スキャンとデスクャンとを同期させ得る。

【図 2 7】蛍光ビーズファントムにおいて収集された S C A P E データを示す。(a) は、4 ミクロンのビーズで収集されたデータの最大強度投影を示す。取得されたすべての被写界深度は、6 0 0 x 1 5 0 0 x 8 2 0 ミクロン (x '、y '、z ' 空間における 1 5 0 0 x 1 2 0 0 x 1 5 0 0 のボクセルに対応する) であり、使用可能な範囲は約 6 0 0 x 1 0 0 0 x 5 5 0 ミクロンであった。挿入画は、イメージング配置対デカルト空間を定義している；(b) は、生きた脳の組織に似た散乱特性を得るため、異なる濃度のイントラリピッド (I n t r a l i p i d) (登録商標) 混合アガロースに懸濁した 2 0 0 n m のビーズを示す。画像は、スキャン方向 (x ') の寸法における最大強度投影を示している。散乱は、イメージングの達成可能な浸入深さに目覚ましい効果を及ぼしている。

40

【図 2 8】生きたマウスの脳の脈管構造の深さに依存するイメージングにおける 2 光子と S C A P E との比較を示す。上段は、各モダリティの層の上から 1 5 0 ミクロンの強度投影である。黄色い点線は、最大強度投影が各寸法に沿って計算される範囲を示す。下段は、図に示されたような各データセットに対する x - z および y - z 平面での最大強度投影を示す。S C A P E データのより表面に近い層で x - z および y - z 平面におけるループ状毛管がはっきり観察されている。S C A P E は、波長 4 8 8 n m の照明を用いて、下行

50

小動脈および上行小静脈などのより深い構造も、ほぼ300ミクロンの深さまで解像する。
 【図29】ナノ散乱およびサンプルの散乱のための200nmのビーズにおける、我々の現在のSCAPEのプロトタイプの点拡がり関数分析を示す。左のパネルは、20ミクロンの厚さの断面において、最大強度投影としての $y' - z'$ 平面の中心スキャンを示す。点拡がり関数分析に選択されたビーズは、色の付いたボックスで示されている。マップは、各寸法におけるビーズのそれぞれのピークボクセルを通じてのSCAPEデータの単一の平面を示す。右側のプロットは、各寸法の中心点による断面を示す(x' で示された測定点によるスプライン補間)。その右には各曲線の半値全幅が示されている。

【図30】覚醒して動いているマウスの脳における自然発生的なニューロン発火を示すSCAPEデータである。図3に示されたデータセット内の発火の追加の分析は、多くの別々のイベントを示している。ニューロンのイベントは、ピクセルのサブセットが閾値を上回るイベントのデータを検索することによってまず識別された((b)のプロット)。(a)の画像は、これらの異なるイベントのそれぞれに対応する異なる画像の平均強度投影を示し、予測される独自のパターンの横方向の樹状突起構造を表している(いくつかの事例では、同じニューロンの再発火に対応する同じパターンが見られる)。これらのニューロンのイベントマップのそれぞれの $x' - y' - z'$ 空間のピークボクセルから信号が抽出され、これらの経時変化は、(d)において生の信号トレースとして示されている。黒点は、経時変化が選択されたイベントを示している。(c)は、これらの経時変化の相関マップである。新しいイベントに対して、繰り返し発火している同じニューロンにイベントが対応している場合を正確に識別している。

【図31】1歳のMHC-GFP導入キイロショウジョウバエの幼虫の2光子顕微鏡法の参考画像である(図4のSCAPE画像と比較されたい)。食物の自己蛍光、および、外角皮における第二高調波の発生と共に、体筋および内臓の平滑筋におけるGFPの発現が見られる。スケールバーは、200 μm である。

【図32】SCAPE実施形態の詳細を示す図である。

【図33】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図34】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図35】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図36】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図37】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【図38】SCAPE実施態様の詳細を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本開示は、顕微鏡を使用した、および、肉眼のイメージングに適用できる新規な三次元イメージングシステムおよび技術に関する。例えば、特定の実施態様では、本開示は、超高速で生きたサンプルの体積イメージングを行う技術に関し、本願明細書中では、掃引共焦点配置平面励起(SCAPE)顕微鏡法として特定している。SCAPEの特定の実施態様は、レーザスキャンニング交差平面トモグラフィー(LSITPまたはL-SIPT)、掃引斜光シート(SOLIS)、または、掃引光シート(SLS)顕微鏡と称されている。2光子および共焦点顕微鏡技術は、生物医学研究に大変革をもたらしたが、費用が高く複雑で、高速の三次元体積イメージングに適用するにはその能力に限界がある。直交する2つの対物レンズによって照明および検出を行う光シート顕微鏡技術は、サンプルの配置に非常に制約があり、サンプルを物理的に平行移動させるか、または、照明面と検出面との同期に手間がかかる。それに対し、SCAPEは、光シートの照明によるオプティカルセクショニングと、マウントされていない多様なサンプルを平行移動させる必要なしに高速で体積イメージングできるユニークなスキャン・デスクラン構成とを組み合わせることにより、上記のような制約を克服し、しかも比較的安価に実行できる。

【0009】

特定の実施態様では、SCAPE顕微鏡法は、単一の対物レンズの正面に角度をつけた掃引光シートを配置する(en-face配置)ことにより画像を取得する。特定の実施

態様では、デスクャンおよび画像回転光学部品により、動く平面を固定の高速カメラにマッピングし、無傷のサンプルを平行移動させることなく、1秒に20体積を超える速さで三次元イメージングを行うことができる。本願にて実証されるように、SCAPE顕微鏡法は、自由に動いているトランスジェニックキイロショウジョウバエの幼虫だけでなく、覚醒して動いているマウスの無傷の脳における自然発生的なニューロン発火を撮像することができる。

【0010】

特定の実施態様では、本開示は、サンプルを三次元イメージングするためのシステムおよび方法を提供する。特定の実施態様では、システムおよび方法は、サンプルに光シートを投影することを含み得る。特定の実施態様では、カメラの平面が光の照明シートの平面と位置合わせされることにより、オプティカルセクショニングが得られる。特定の実施態様では、方法は、照明光シートの掃引を含み得る。特定の実施態様では、照明光シートのスキャン動作中でも、検出された光がデスクャンされることにより、照明光シートと位置合わせされたカメラの固定した検出面が維持される。特定の実施態様では、照明光シートは、サンプルの表面に対し、斜めまたは垂直な角度を有することができる。特定の実施態様では、方法は、カメラの平面での放射光の検出精度を向上すべく、照明シートが斜めを向くよう検出光の平面を回転させることをさらに含む。特定の実施態様では、光シートは、スキャンポリゴンミラーを用いて掃引される。特定の実施態様では、光シートは、他の走査反射または回析素子を用いて掃引される。特定の実施態様では、方法は、掃引された光シートから発せられた光を受け、ポリゴンスキャナを用いてこの受けた光をデスクャンすること、あるいは、照明シートのスキャンと、検出された光の固定検出面へのデスクャンとを同期させるスキャンミラーまたは回析素子の他の組合せを含む。特定の実施態様では、多波長、あるいは、平行なまたは連続した光源が用いられることにより、サンプル内で異なる物理的プロセスが生じるようサンプルを照明することができる。特定の実施態様では、方法は、多色検出およびイメージングを可能にすべく、検出光のスペクトル分離を利用することができる。特定の実施態様では、方法は、ラマン散乱、誘導ラマン散乱、2光子励起蛍光、第二高調波発生、後方散乱、フォースター共鳴エネルギー移動、発光、熱放射、および、光学イメージングおよび顕微鏡法を介して通常検出される他の電磁効果を含む物理的効果からコントラストを検出するのに用いられることができる。

【0011】

特定の実施態様では、開示される内容は、三次元顕微鏡イメージングのためのシステムに関する。特定の実施態様では、開示される内容は、三次元巨視的イメージングのためのシステムに関する。特定の実施態様では、本開示のシステムは、予め決められた光出力を有するレーザを有し得る。特定の実施態様では、本開示のシステムは、平行な/平行にすることが可能な光源、または、予め決められた光出力を有するパルスまたは連続波の光源の組合せを有し得る。特定の実施態様では、本開示のシステムは、1つ以上のビームアライメントミラー、および、反射または回析素子を有し得る。特定の実施態様では、システムは、1つ以上の望遠鏡を有し得る。各望遠鏡は、スキャン望遠鏡の他に、光シートを形成する前にビームを拡大する1つ以上のレンズからなる。特定の実施態様では、システムは、図1(f)に示されたポリゴンミラーを実装し得る。

【0012】

特定の実施態様では、本開示内容にかかるシステムおよび技術は、生きたサンプルの高速生体内三次元体積イメージングを可能にする。さらに、特定の実施態様では、本開示内容は、正面を向いた(en-face)、非接触の、エピ蛍光スタイルのイメージング配置でデータを収集できる。特定の実施態様では、本開示内容は、透過配置でのデータ収集を可能にする。特定の実施態様では、本開示内容は、無傷の器官および組織、例えば、無傷の齧歯類の脳だけでなく、自由に動いている生物体を含む、広視野内で多様なサンプルの三次元動態を撮像することができる。システムは、生きたゼブラフィッシュ(ダニオレリオ)の幼生および成体、シー・エレガンス、および、人間の指先でも実証されてきた。特定の実施態様では、本開示のシステムは、画像固定組織像スライド、免疫組織化学スラ

10

20

30

40

50

イド、および、マイクロ流体チャンバ内の流動を撮像することも可能であることが実証されている。ライフサイエンスを含むまたは超えたさらなる用途は、血管内、内視鏡的、体内、あるいは、角膜または網膜の眼球内イメージングの他にも、三次元流動、流体混合、または、粒子追跡、および、三次元プロフィロメトリを含む。

【 0 0 1 3 】

3 . 2 . スキャンおよびデスキャンを実現するための追加の光学レイアウト

本開示は、図 1 (f) に示された S C A P E の光学レイアウトの多数の代替案を含む。限定ではなく追加の光学配置の例は、図 6 ~ 1 0 に示すものと同じまたは類似のスキャン・デスキャン構成を実現する。特定の実施態様では、スキャンおよび光を戻すデスキャンの両方に 1 つのポリゴンスキャナを用いるのではなく、2 つの物理的に分離しているスキャンミラーを用いることができる。ポリゴンミラーは、物理的に結合されて正確なスキャンおよびデスキャンを可能にする。その一方で、1 秒に 5 0 ~ 1 0 0 体積という高体積速度でも、シートがスキャンされるべき速度が比較的遅ければ (それぞれ 1 秒につき 5 0 ~ 1 0 0 掃引)、2 つの別々のミラーは容易に同期されることができる。2 つ (またはそれ以上) の別々のミラーあるいは、以下に述べるような単一のミラーを用いた実施態様は、ポリゴンミラーの実施態様を上回る利点がある。第一に、ポリゴンがその回転軸に関して回転するにつれ、鏡平面が平行移動するとともに回転するので、ポリゴンの回転は、理想的なスキャンパターンで行われず、その結果、スキャン/デスキャンに誤差が生じる。第二に、ポリゴンの使用は、検出光を、対物レンズのバックアパーチャから出る光のたった半分までに制限してしまう。これは、検出光の開口数 (N A) を制限することになるため、(図 2 4 および 2 5 に示されたモデルによって予測されるように) 結果として生じた画像の解像度を下げ、その一方で、カメラに達する放射光の量も減少する (信号対雑音比が低下する)。開口数 (N A) が大きい検出光を集光することにより、入射光シートと検出光の点拡がり関数との間の有効角は縮小するが、我々のモデルでは、イメージングの点拡がり関数へのこの変化の影響は、放射光すべてを集光することにより、N A が増大し、ポリゴンを用いるよりも解像度を全体的に向上させるというポジティブなものになると予測している。最後に、利用可能なポリゴンの物理的形狀がファセットの物理的大きさを制限するので、検出のためにカメラに届く光の量はさらに減少する。ポリゴンの慣性によって高速の両側スキャンにスキューが生じる可能性がある。

【 0 0 1 4 】

図 6 ~ 1 0、2 6、および、その他に示された代替構成は、ポリゴンミラーによるスキャンよりも改善された方法での検出光の集光およびデスキャンを目標としている。図 6 は、2 つのスキャンミラーによる一実施態様を示す (ミラーは反射、屈折、または、回折素子、音響光学変調器、M E M S デバイス等であってもよい)。1 つのミラーが光シートをスキャンする一方で、それに同期して他のミラーが戻り光をデスキャンする。特定の実施態様では、これによって、必要に応じて、どれくらいの開口数で検出光がカメラに届くかを選択するために、調整可能なアパーチャを使用することができる。図 7 は、より少ない画像回転光学部品による実施態様を示す。以下の第 3 . 3 章でさらに説明するように、カメラの表面が斜画像面と位置合わせされるような角度にカメラを配置している (第 3 . 3 章では、より簡易な実施形態でスループットが向上し、画像回転光学部品に関連する収差も減少する)。図 8 ~ 1 0 は、ポリゴンに類似した単一の平面スキャンミラーを用いたさらに簡易化された S C A P E システムを示す。検出光は、入射するレーザ光と同じ方向に反射される。例えば、ビームスプリッタ (ダイクロイックまたは偏光ビームスプリッタなどの) 1 つ以上の光学素子を用いることにより、検出光を入射光から分離することができる。特定の実施態様では、ビームスプリッタは、対物レンズとチューブレンズとの間、または、スキャナとスキャンレンズとの間の照明アームの無限空間内に配置され、放射光がデスキャンされる検出アームへと該放射光を導く。特定の実施態様では、調整可能な絞りまたは光空間変調器などの素子がビーム経路に沿って配置されることにより、光を成形しかつスキャンし、および/または、開口数の変化あるいは発生した特定の収差 (球面収差、コマ収差など) を補正できる。特定の実施態様では、スキャンミラー (またはそれに相

10

20

30

40

50

当する素子)は、固定の斜画像面が本来のSCAPE構成におけるものとして形成されるようにスキャンおよびデスキャンのいずれも実施できる。特定の実施態様では、スキャンミラー(またはそれに相当する素子)は、平面である。特定の実施態様では、スキャンミラー(またはそれに相当する素子)は、非平面であり、例えば、限定されないが、屈曲、三角、または、湾曲ミラーであってよい。特定の実施態様では、検出アームまたは他の場所において追加の光学部品が用いられることにより、二次元カメラにマップする固定画像面の位置、および、倍率、角度を調整してよい(あるいは、他の実施態様では、追加のデスキャンが行われることにより、線または点検出器による検出を可能にしてよい)。

【0015】

特定の実施態様では、サンプルに入射する光は、円柱レンズ以外の手段によって形成されてよい。サンプルの照明平面は、光源の後ろに配置された走査素子を用い、 y' 寸法で線形光ビームをスキャンすることによって形成されてよい。結果として照明された平面の検出は、平面を形成するスキャンの間にカメラチップを一括露光するか、あるいは、検出用の固定線画像(z' 方向に沿って斜め)を生成すべく、シャッタを回転させるか、または、追加のデスキャンを行うことによりなされ得る。入射光も任意の方法で成形されることにより、例えば、アキシコンレンズ、ベッセルまたはエアリービーム成形、時間的集束、あるいは、特殊な光学素子または光空間変調器による他の成形を用いて、被写界深度を含む性能を強化させることができる。入射ビームの改質により、SCAPEに誘導放出抑制(STED)を取り入れることができる。STEDは、回折が制限されたスポットまたはシートの直径/幅を減少させるために誘導放出抑制を用いる超解像技術である。特定の実施態様では、STEDは、点スキャンのためには焦点付近に位置合わせされたドーナツ形に、ラインスキャンのためには拡大されたドーナツ形に、または、平面スキャンのためには2つの照明光シートのどちらかの側に第2のレーザを位置合わせすることにより達成されてよい。励起シートの幅を狭めるために、STEDをSCAPEに容易に取り入れ得る。特定の実施態様では、STEDの導入は、照明に用いられる光源から赤方偏移した第2の光源を追加することを含み、ビーム経路に沿って配置された円柱レンズ、光空間変調器、または、位相板によってビームをドーナツ形状にするか(例えばラインスキャン用)または2つの光シート(シートによるスキャン用)に成形することによって達成されてよい。図32、33、および、34を参照されたい。

【0016】

特定の実施態様では、カメラの前に画像インテンシファイアが配置されてよい。画像インテンシファイアは、解像度は下げるものの、光量が低くても検出効率を著しく高め、イメージング速度を速める。例えば、図36を参照されたい。アバランシェフォトダイオード、または、光電子増倍管アレイを含む、光量が低い場合のためのさらなる技術が用いられてよい。

【0017】

特定の実施態様では、面内解像度およびSCAPEのセクショニングを向上させるべく、構造化光が用いられてよい(構造化照明、または、薄層斜光照明法(HiLo microscopy)に類似)。異なる空間周波数で照明をパターン化することにより、画像の高低周波数成分が分離され、解像度は、約2倍以上も向上する。特定の実施態様では、このような構造化照明は、SCAPEのラインスキャン構成(図32)の特定の周波数のレーザビームの強度を変調することによって生じ得る。特定の実施態様では、このような構造化照明は、照明経路内の回折格子を用いて生じ得るか、あるいは、光空間変調器を用いて任意のパターンが形成され得る。特定の実施態様では、平面ごとに繰り返される画像が必要であるが、これは解像度を著しく向上させるための許容範囲内のトレードオフであろう。複数の周波数の並列イメージングは、複数のフルオロフォアを励起させてスペクトルを混合することにより、あるいは、励起と放出波長との間の関係が維持される第二高調波発生などのコントラストを撮像する場合に実現し得る。特定の実施態様では、STED法は、構造化光イメージングと組み合わせるとよい。特定の実施態様では、ベッセルビームまたはエアリービームイメージングも、この種のイメージング配置において解像度を高め

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 1 8 】

特定の実施態様では、SCAPEに多色検出を取り入れてよい。特定の実施態様では、このような多色検出は、固定画像面と画像検出器との間に配置された光学部品に依存する。特定の実施態様では、固定画像面と画像検出器との間で、フィルタホイール、および、ダイクロイック素子を有する複数のカメラが用いられてよい。カメラチップの異なる部分において様々な色チャンネルを分離することができ、様々な色チャンネルの分離のために特注の部品が用いられてよい。このような分離は、カメラの画素密度、フレームレート、および、スペクトル分離を実行するために利用可能な光学部品によって本質的に制限される。特定の実施態様では、色は、同じ波長の照明によって励起される2つ（またはそれ以上）のフルオロフォアの結果生じたものであるか、または、検出アーム内の適切な励起光遮断フィルタと、複数のレーザーラインまたは光源とを同時に用いた結果生じたものである。異なるレーザまたは平行にすることが可能な光源を断続的に変調してもよい。図35を参照されたい。

10

【 0 0 1 9 】

特定の実施態様では、SCAPEとの関連で電動レンズが用いられてよい。例えば、これに限定されないが、図37および38は、体積のサンプリングまたは位置決めを調整する手段として、励起および検出平面の垂直位置を調整するために電動レンズを用いたSCAPE構成を示している。

20

【 0 0 2 0 】

3.3. フィールド回転

SCAPEの1つの特徴としては、組織を深さに沿って光ビームまたはシートによって照明することにより、異なる深さのところからデータを収集できることである。これは、生成された画像が軸方向の広がりをもっているなら、レンズは軸方向の広がりをもつ物体の画像を生成できるということである。極端な例では、画像は完全な軸平面画像であり得るが、実際には、励起平面と検出光との間の角度を大きくすることができるので、光シートの照明にはより傾斜した平面が適しており、より優れたセクショニングをもたらすことができる。しかしながら、これは、斜光シートから形成される画像は、斜めであることを意味する。カメラが斜画像面に位置合わせされているのではなく、入射する検出光に対して垂直に配置されている場合、光シートの軸方向の焦点面の上下からの光により、照明された平面のピントがぼけた画像が形成されることになる。画像全体を保持しつつ、画像回転光学部品を用いてこの斜画像面の向きを変更することにより、斜画像面は、垂直に配置されたカメラチップの正面に向けられる。この画像回転スキームにはいくつかの代替案があり、簡易化と光スループットの向上とを両立できる。これらの代替案は、SCAPEのスキャン/デスキャン光学経路の代替構造を含み、画像の回転は、本願明細書中に記載されるような異なるスキャン/デスキャンのアプローチとさまざまに組み合わせてよい。

30

【 0 0 2 1 】

例えば、特定の実施態様では、カメラは、第1の中間画像面に配置されてよい（例えば図9）。予備テストにおいて、画像の角度と一致する傾きのカメラチップが中間画像面に直接配置されている場合、画像回転光学部品は必要ないことがわかった。この構成は、現実のレンズのための我々の既存のレイアウトで発生し得る著しい光損失を解消することができる。特に、これは、平面の向きを変えるためにミラーを挿入することによっても成し得る。特定の実施態様では、画像の倍率を調整するための追加のレンズによって、画像をカメラチップの大きさと一致させることができる。これらのレンズは、画像の相対的な軸方向の倍率を最小化するように設計されているので、カメラチップが光学軸に対して配置されるべき角度を最小化する。このようなアプローチは、システム内のレンズの数を減少することができるので、検出光の収差量を減らすことができる。カラーイメージングは、必要に応じて発光/ノッチフィルタと共にバイーマスクタイプのカラーカメラを用いても達成できるが、画像スプリッタの導入を可能にする画像リレー光学系を取り入れてもよい。

40

【 0 0 2 2 】

50

現在の画像回転光学部品は、中間画像を形成する光の指向性が原因で光を損失してしまう。焦点平面を変えずに光の向きを変えるためには、フィールドレンズが用いられてよく、例えば、潜水艦の望遠鏡内の長い距離にわたって画像をリレーする際に達成し得る。特定の実施態様では、フィールドレンズは、リレーレンズセットの焦点平面に配置されてよい。一例として、これに限定されないが、フィールドレンズのレイアウトのための設計が図11に示されている。図11に示されている設計は、画像回転光学部品の集光効率を向上させ得る。しかしながら、これは、特別な設計のレンズの一例に過ぎず、レンズおよびガラス素子の組合せも可能であり、凹凸レンズ（顕微鏡の対物レンズとして）の組み合わせを用いて、標準的な市販の光学部品を用いるよりも収差を抑制し、スループットを向上させてよい。

10

【0023】

特定の実施態様では、画像面の回転中に光の向きを変えるために他の光学素子が用いられてよい。このような素子は、これらに限定されないが、特定の位置および向きで画像を形成するよう光の向きを変えることができるミラー、ミラーの組合せ、プリズム、グレーティング、デフォーダブルミラー、および、光空間変調器を含んでよい。特定の実施態様では、デスキャンされる画像面の相対位置は、例えば図11に示すような三次元スキャン中は補正光学系が静止し得るように、スキャンの間に変化するとは思われていない。図11は、空間光変調器が、例えば、反射光の位相を調整するなどして、どのように光の向きを変えているかを示している。ここでは、異なる位置に入っていく光の向きを変更してその角度および焦点位置を変更することにより、画像の回転を行ってカメラの位置合わせをより正確にする。

20

【0024】

特定の実施態様では、高密度ファイバアレイが画像面に配置され、カメラ面に直接マップされ得る平面に光を向け直すよう用いられてよい。特定の実施態様では、アレイの面は、角度を有しているか、あるいは、例えば、図12に示されるように、入射光に対して角度を有して配置されてよい。

【0025】

3.4 ダイナミックレンジ

より深い組織を撮像するためにSCAPEを用いることに関する潜在的な問題の1つに、浅い層から深い層に行くまでに検出光が減衰してしまうということがある。例えば、斜めから照明された平面の画像は、単一のカメラフレームで取得されるので、表面に一番近い部分は、非常に明るい光によってさらにダメージを受け、および/または、カメラ信号は、長い積分時間、強い光力で飽和され、その一方で、深い組織からの信号は、許容範囲内の励起強度に対するノイズレベルを下回る。このダイナミックレンジを拡大すべく、デスキャン光学系とカメラとの間の中間画像面において、またはその近くで、空間的に変化するアッテネータを用いてもよい。例えば、特定の実施態様では、アッテネータ（例えば部分的に反射するかまたは吸収するガラスまたはフィルム）のストリップを配置して表面組織からカメラに達する光の強度を低下させ、その一方で、より深い層からの光のすべてがカメラに届くようにすることにより、入射光の照明をより明るくするか、または、カメラの積分時間/利得を飽和させずに高め得る。特定の実施態様では、段階的なアッテネータを同様の目的で使用してよい。このようなアッテネータは、物理的に移動できる（あるいは、LCD型の調整可能なフィルタまたはSLMなどの反射表面を用いて変更できる）ことにより、サンプルに固有の方法で減衰量を調整できる。組織の特定の深さにおける組織の相対位置がカメラ面の特定の行にマップされ、その物理的關係は、スキャンの間変化しないので、この構成は有効である（ただし、表面が平らでないもの、スキャンの間にそれ自体が動くものは除く）。摺動するアッテネータの位置、または、空間的に変化するアッテネータからの相対的な減衰パターンに関する情報を用いて、この減衰のために収集されるデータを校正してよく、その結果、絶対強度の画像を取り出すことができる。

30

40

【0026】

50

特定の実施態様では、組織の表面でより空間的に強度が分布するように入力面を成形することにより、より深い組織を明るく照明すべく、表面組織を過剰に照明することもあり得る。特定の実施態様では、これは、光シートの軸平面を、表層を通じて出力密度を低下させるサンプルの表面よりもサンプル内のより深い部分に配置することにより達成され得る。これは、表面構造の解像度を低下させてしまうことがあるが、より深いところの解像度および信号対雑音比を高め得る。このことは、例えば、図14に示すような2光子顕微鏡によるSCAPEに特に有益である。これは、開口数がより大きい照明ビームを用いるか、あるいは、ベッセルビームまたはビームレットの組み合わせなどのより高度なビーム設計によって達成し得る。

【0027】

3.5 異なる対物レンズに対応するための調整

SCAPEイメージングのための配置を提供すべく、特定の実施態様では、入射する励起ビーム光を、対物レンズのバックアパーチャの中心を外した、サンプル内の光シートの角度を決定する位置に入射するよう位置決めしてよい。いくつかの対物レンズは、バックアパーチャの大きさが異なる。対物レンズを変えたい場合、例えば、対物レンズの異なる特性（倍率など）が互いに代替可能に用いられる対物レンズ用ターレット（または同様なもの）を要する場合、光路を変更する必要がある。特定の実施態様では、これは、スキャンレンズとチューブレンズとの組合せの倍率を変えることで達成し得る。それには、対物レンズのバックアパーチャにおけるビーム位置を変更するとともに、凹レンズと凸レンズとの組合せを移動させるズームレンズタイプの配置を取り入れる（図15を参照）。特定の実施態様では、これは、エンジンまたは手動での移動、あるいは、電動レンズを用いて行われてよい。この調整は、特殊な設計のレンズ、または、システムで用いられるようにそれぞれの対物レンズに取り付けられた複合レンズを導入することによってなされ得る。検出側のレンズにも同様な調整がなされることにより、検出側の光学部品の構成や、デスクランおよび画像回転の方法によって、異なるレベルの解像度を提供することができる。特定の実施態様では、検出レンズをさらに平行移動させることにより、カメラにおける画像の最適な焦点の調整が可能になる。SCAPEの高速体積イメージングでは、対物レンズを“Z”軸方向に平行移動させる必要がないため、便利なターレット式の対物レンズが実現できる。

【0028】

3.6 臨床実施

SCAPEは、臨床用途にも実施できる。共焦点内視鏡による検査は、無傷の組織を顕微鏡解像度でイメージングでき、生検およびその場での診断を容易にするため人気のある技術だが、ほとんどの場合、非常に制約のある環境で対物レンズと組織表面との間の距離を物理的に調整する必要があるため、時間がかかる上に三次元データを得るのが難しい。光学的セクションングの能力があるシステムでも、口腔粘膜および肌などのアクセスししやすい組織でさえ、三次元スキャンを用いたイメージングは困難である。これに対し、SCAPEは、ほとんどビデオ速度のイメージングを可能とし、イメージングの間の動きアーチファクトへの耐性もより高いことから、現在の臨床顕微鏡検査技術を高めるとができる。また、リアルタイムで連続した領域を詳細に検査できる「サーチライト」タイプのイメージングによって、組織のより大きい面積をサンプリングすることができる。さらに、SCAPEは、組織とイメージングレンズとの間の距離を物理的に調整する必要をなくすべく、平行移動なしの対物レンズ構成を導入し得る。例えば、特定の実施態様では、一定の厚さのスペーサによって組織を必要なオフセットで保持し、画像は、スペーサと接触している組織の深さの断面の可視化を提供する。

【0029】

SCAPEを微小形態で実現する方法は、幾通りもある。主な制約は、照明された平面の画像を記録できる高速撮像素子（例えばカメラ）が必要なことであるが、これに対処する方法は多数ある。特定の実施態様では、例えば、微小なカメラ（あるいは、例えば、口腔粘膜を撮像するために配置できる微小プローブシステム）を内視鏡の先端に配置してよ

10

20

30

40

50

い。現代のスマートフォン様に開発されたカメラの技術は、非常に高性能であり、例えば、図16の設定では高速取得のためのオプションを提供し得る。図16では、内視鏡先端部、または、細長いイメージングヘッドにおいて微小化されるような光学レイアウトが提供されている。

【0030】

特定の微小実施態様では、身体の外側にある高速カメラでイメージングが行われてよい。特定の実施態様では、例えば、図13に示される二次元光ファイバ束または同様の光導管を介して画像をリレーしてよい。

【0031】

特定の微小実施態様では、画像は、上記の二次元光ファイバ束より安価で密度の高いファイバ束によってリレーできる線状パターンに符号化されるか、あるいは、図17に示すような、ラインスキャンカメラ、アバランシェフォトダイオード、または、光電子増倍管アレイなどの小型線形検出器を用いて、プローブ内での検出を行ってよい。特定の実施態様では、このタイプの構成は、標準的なSCAPE法の延長であり、さまざまなやり方で実現できる（励起側のラインスキャンを有する2光子SCAPEの説明と同様である）。本質的に、励起側に光シートを形成する円柱レンズを用いる代わりに、開口数が小さい（かまたは同様の）（ z' 方向に延びる）単一のビームをスキャンする別のスキャナを用いることにより、 x' 方向に沿ってシートを掃引する前に、 y' 方向に沿ってシートを形成する。なお、ここでは、図1(b)に定義されているSCAPEの座標を参照している。特定の
 実施態様では、従来のSCAPE構成のように、結果としての照明シートを二次元カメラ
 アレイで撮像することができる。このような実施態様では、ラインが y' 軸に沿って掃引
 するにつれ、カメラが単純に露光することにより、シートが形成されて平面を満たし、1
 つの二次元 $y' - z'$ 画像が形成される。特定の実施態様では、この方法は、光学セクショ
 ニングおよび解像度を向上させ得る検出スリット（ラインスキャン共焦点だが直交方向の
 ような）を有することと同様である、カメラの「ローリングシャッター」タイプの撮像と組
 み合わせて同期させることができる。特定の実施態様では、この検出アームの光は、（ x'
 軸に沿って）通常どおりデスキャンされ、シートを形成する線状ビームの動きを修正す
 るために（ y' 軸に沿って）再度デスキャンされてよい。この二次元のデスキャンは、所望の
 時点で、検出側の画像を、（斜めの z' 方向における）サンプルを照明する光のラインに対
 応する単一のラインにしてよい。この入射ビームのスキャン、および/または、さらなる
 デスキャンは、達成可能な4kHzのスキャン/デスキャン速度である y' 方向の掃引速度
 （例えば、平面あたり200 y' ピクセル）を乗じた体積速度（例えば、毎秒20体積）に
 等しいラインスキャン速度で行われてよい。 y' 方向の寸法に沿った光のデスキャンの検出
 は、従来の臨床レンズまたは同様の形態の全励起光シートと組み合わせるか、あるいは、
 シート形態とデスキャンとの他の組合せも可能である。特定の実施態様では、ここで用い
 られる線形検出器は、ラインスキャンカメラまたは線形配列（アバランシェダイオードア
 レイなど）、あるいは、線形配列を導く線形ファイバ束、または、撮像されている z' 軸に
 沿った複数の異なる深さに対応する数の素子を備えた個別の検出器であってもよい。この
 ような線形検出器は、一般的に、かなり迅速に読み出され得る（ y' 方向に沿ったラインの
 数を乗じたカメラの読み出し速度に等しい）。この構成は、内視鏡での実施により適して
 いる。なぜなら、線形ファイバ束がより効率的にイメージングデータを外部の線形イメー
 ジングアレイにリレーするのに用いられ得るからであり、二次元イメージング用のファイ
 バ束より小型で安価だからである。図17におけるレイアウトは、従来の x' 方向および y'
 方向のスキャナが両方向のビームのスキャンおよびデスキャンに用いられ得る標準的な光
 学レイアウトによって達成可能であることに留意されたい。このような実施態様は、励起
 光が対物レンズ（またはそれに相当するもの）の端部に向けられることにより斜めの照明
 ラインを形成する点、また、従来の「共焦点面」は、（ピンホールの代わりに）これらに
 制限されないが、斜めに向けられた線形検出器、画像を直交二次元検出器にマッピングす
 る画像回転および拡大光学系、または、画像を線形二次元検出器に関連付けるための光フ
 アイバ束または光導管を含む上記方法を介してデジタルで撮像され得る対応する斜めの線

10

20

30

40

50

形画像を有する点で従来の共焦点顕微鏡の設計とは異なる。本願明細書に記載の実施態様は、関心領域を従来の $x-y$ ラスタスキャンする間にサンプルの体積のすべての深さから光学的に区分されたデータを獲得するが、共焦点顕微鏡法では、このような検出が入射ビームの焦点に限られ、三次元画像を形成するには、 z 方向において焦点を連続的に平行移動させる必要がある。

【0032】

特定の実施態様では、屈折率分布型レンズ（GRINレンズ）を用いることにより、従来の方式で設計されたSCAPEシステムの物体平面を、組織内の深い面にマッピングできる。特定の実施態様では、このようなGRINレンズは、脳内、または、例えば図18に示すように、胸部内の固形腫瘍に挿入されるニードル内で使用されてよい。

10

【0033】

特定の実施態様では、光シート/検出光のスキャンおよびデスクャンは、MEMS、DLP、デフォーダブルミラー、光空間変調器などのマイクロミラー技術、または、内視鏡（またはプローブ）の先端における同様の技術を用いて達成され得る。

【0034】

3.7 イメージング配置およびスキャンの代替案

ミラースキャナおよび対物レンズを使用せずにSCAPEイメージングの配置を設計するために広範な技術およびアプローチが用いられ得る。特定の実施態様では、図19(a)~(c)に示されるように、単一の反射面が前後に回転してよい。特定の実施態様では、適切に位置合わせされた入力ビームおよび検出平面が相互に位置合わせされ、ミラーの前後移動に合わせ、互いに位置合わせされる。このタイプの設計の特定の実施態様では、スキャナとサンプルとの間にはレンズを配置しない。しかしながら、特定の実施態様では、この測定配置をサンプルにリレーするために中間レンズを追加してもよい。特定の実施態様では、この簡単な構成は、SCAPEの構成が大型でも、また、例えば、MEMSによるマイクロ内視鏡などのように小型でもいずれも有益である。

20

【0035】

3.8 オプトジェネティクス、フォトマニピュレーション、および、マルチモダリティ・イメージング

特定の実施態様では、SCAPE内の対物レンズは、三次元イメージング中は固定されているので、追加で同時に光学的動作を行う際も、あるいは、撮像中に組織を撮像する際も同じレンズを使用することができる（また、サンプルの選択に制約があるものの、他のレンズを用いてサンプルで集束させることも可能である）。従来、2光子および共焦点レーザスキャン顕微鏡法が用いられているが、三次元画像を形成するには、物体を軸方向に上下にスキャンする必要がある。これだとサンプルを物理的に損傷させるだけでなく、同じ対物レンズを介して固定のスポットを同時に照明することは不可能に近い。それに対し、特定の実施態様では、SCAPEのイメージングは、追加のフォトマニピュレーションおよび/またはイメージング技術と共に実行することができる。

30

【0036】

特定の実施態様では、撮像されている組織のオプトジェネティクスまたは同様のフォトマニピュレーションは、例えば、図20に示すように、同じ対物レンズの下で組織を同時に照明するために、ダイクロイックまたは偏光ビームスプリッタ、あるいは、他のビーム結合方法を用いて達成され得る。特定の実施態様では、SCAPEシステムは、入射光の効果をうまく撮像してSCAPE画像に対するフォトマニピュレーションの部位の三次元共レジストレーションを提供できるが、SCAPEのイメージング光とフォトマニピュレーションに用いられる光とを区別するために波長が用いられたい。これは、SCAPEの励起平面が照明されなくても、（デコンボリューション顕微鏡法のように）SCAPEのデスクャン動作によって、サンプルの光学セクションを有効に行うことができるためである。特定の実施態様では、フォトマニピュレーションの光は、いかなるビーム成形光学部品によって生成されてよく、対物レンズの焦点面で単にレーザ光を集束し、ガルバノミラー、音響光学スキャナ、MEMSスキャナ、DLPデバイス、または、光空間

40

50

変調器 (S L M) によってスキャンすることによって生成されてよい。特定の実施態様では、後者は、フォトマニピュレーションの任意の三次元パターンを生成するために用いられてよく、この三次元パターンは、どの領域が励起するかを示すリアルタイムの閉ループガイダンスを用いても、S C A P E イメージングの間に動的に変更することができる。特定の実施態様では、フォトマニピュレーションは、細胞のオプトジェネティクスによる励起または抑制、光学ピンセット、光凝固、例えば、三次元 F R A P (光退色後蛍光回復) のための光退色、光誘起の細胞死または障害、微小粒子またはナノ粒子からの光放出のための光キャビテーション、および、フォトアンケーシングなどを含んでよい。

【 0 0 3 7 】

特定の実施態様では、光コヒーレンストモグラフィー (O C T) を含む、他のモダリティを用いたイメージングも同じ対物レンズによって達成され得る。O C T は、深さを解像するためにコヒーレンスゲーティングを用いるので、S C A P E のように、三次元画像を生成するために対物レンズを軸方向に平行移動させる必要がない。O C T は、組織の詳細な構造を数ミリメートルの深さまで高速でイメージングすることができ、蛍光に対して敏感な S C A P E によってより完全なものとなり得る。これは、臨床イメージングにとって有益な組み合わせであり得る。なぜなら、O C T は、角膜、網膜、および、血管内のイメージングのためにすでに実施されているが、例えば、分子または代謝をイメージングする際に、S C A P E の蛍光への感受性が付加されるとよいだろう。紫外線、可視、または、近赤外線イメージングなどの従来の広視野イメージングも S C A P E と同期して高速で組織の表面を撮像するのに有益である。特定の実施態様では、スペックルフローグラフィー、または、レーザドップラーが実施されてよい。特定の実施態様では、従来のレーザスキャン共焦点顕微鏡法、および 2 光子顕微鏡法も、例えば、補助的なイメージング方法として、または、光励起の位置合わせ方法として、S C A P E システムに組み込まれてよい。特定の実施態様では、三次元イメージングは、対物レンズの平行移動により、または、電動レンズを用いることにより、あるいは、組み合わせられたイメージングシステムの光学部品内で遠隔集束することによりなされ得る。

【 0 0 3 8 】

3 . 9 . 2 光子による実施

2 光子励起を用いて S C A P E を実施することにより、浸入深さ、コントラスト、および、解像度を向上させることができる。(2 光子励起に用いられる) 近赤外光は、例えば、散乱した生体組織などの材料のより深いところまで達する。このことは、S C A P E で用いられる入射光シートは、より深いところまで進むにつれより狭くなり、その一方で、より深いところまで行く途中でエネルギーを損失することを意味する。しかしながら、2 光子顕微鏡法が必要とするレーザ出力は高く、我々の標準的な S C A P E の配置では、2 光子顕微鏡法で通常用いている標準的なレーザによって要求を満たすのは困難である。例えば、ほとんどの 2 光子顕微鏡は、単一の焦点 (約 1 ミクロンの立方) をスキャンするが、散乱したサンプルをより深いところで撮像するために、チタンサファイヤレーザから得られる限りの出力を用いるものもある (レーザでは約 1 . 5 W 、 サンプルではそれ以下) 。この同じ出力が 5 0 0 × 5 0 0 ミクロンの光シート状に広がると、各点で同じ瞬間照明強度を得るには、5 0 0 × 5 0 0 ミクロンにわたりこの出力が必要である。さらに、2 光子励起は、入射電力の二乗 (P^2) の関数としての放射信号を生成するので、初期ビームが 4 つに分割されると、同じドウェル時間にこれらのビームの 1 つからは 1 / 1 6 の信号しか得られないことになる。4 つの点のすべてが同時に撮像されると、4 倍の長い積分時間が与えられ、よって、同じ期間内に 4 点すべてを次々に訪れる必要がある顕微鏡の 4 倍の信号になるが、図 2 1 および 2 2 に示されるように、検出信号は、1 / 4 になってしまう。

【 0 0 3 9 】

これらの光出力の問題に対処すべく、S C A P E による照明は、一筋の照明にすることができ、それを横方向にスキャンすることによりシートが形成されるので、利用可能な出力を光シートへと拡張するよりも 2 光子イメージングの効果を高めることができる (ただ

し、標準的な点スキャン 2 光子顕微鏡法と同じパルス繰り返し数および出力などをレーザーが有するものと想定した場合)。以下のその例を示す。非常に効率の良い焦点、ライン、または、光シート形成では、 $1 \times 1 \times 1$ ミクロンの体積における入射パワーは、 $P_{i, \text{pix}} \text{ laser_power}$ 、 $P_{i, \text{line}} \text{ laser_power} / (z \text{ FOV})$ 、および、 $P_{i, \text{sheet}} \text{ laser_power} / (y \text{ FOV} \times z \text{ FOV})$ によって近似できる。ここでは、 $z / y \text{ FOV}$ は、 z / y における視野のミクロンの寸法を示す。各事例における所定の体積速度に対する積分時間は以下のとおりである。

$$t_{\text{pix}} = 1 / (V_r \times x_{\text{pix}} \times y_{\text{pix}} \times z_{\text{pix}})$$

$$t_{\text{line}} = 1 / (V_r \times x_{\text{pix}} \times y_{\text{pix}})$$

$$t_{\text{sheet}} = 1 / (V_r \times x_{\text{pix}})$$

10

ここでは、 $x / y / z_{\text{pix}}$ は、 $x / y / z$ におけるボクセルの数を表す。2 光子励起のスケールはパワーの二乗として示されるので、各事例の発光強度 \times 積分時間の積は、 $P_i^2 \times t$ となる。(FOV への除算は二乗されない) 単一点のスキャンモデルが最も高い値 $P_{i, \text{pix}}^2 t_{\text{pix}}$ となり、50 VPS での $400 \times 400 \times 200$ の体積 ($x - y - z$) では、単一点のスキャンが 1,600 MHz のピクセルレートを必要とし、これは実現不可能である(80 MHz のパルスの 2 光子顕微鏡法に一般的に用いられるチタンサファイヤレーザーの場合)。光のラインは、光シートより高い発光強度 \times 積分時間 $P_i^2 t$ を示し、カメラのフレームレートがどちらの場合も V_r / x_{pix} になるという点でより優れている(この例では、幾分高い 20,000 fps)。

【0040】

20

特定の実施態様では、再生増幅器、または、標準的なチタンサファイヤレーザーより低い繰り返し率の同様のパルスレーザーを用いて 2 光子励起の性能を高めてよい。再生増幅器は、ほぼ MHz オーダーのレーザーパルスをより高いピークエネルギーを有する低周波パルスに圧縮する。(2 光子顕微鏡法に通常用いられる) 80 MHz のチタンサファイヤレーザーのパルスは、平均パワー(例えば) 7 W の 5 kHz のパルスに圧縮されてよい。これによって標準的な 80 MHz のレーザーよりもパルス毎のパワーが 50,000 倍を上回るようになる。この照明が SCAP E 平面(例えば 500×100 ピクセル)に空間的に広がることにより、80 MHz のレーザーのパルスと等価な瞬間的励起がもたらされる。各平面が再生増幅器からの 2 パルスだけで照明され得るように SCAP E イメージングが 2,000 fps (またはそれと同様) で平面の画像を撮像する場合、パルス繰り返し数が低いのは問題ではない。ラインスキャンタイプの構成を用いて光シートを形成する場合でも同じ効率になることがわかっている。例えば、200 の y' ラインに対する y' 方向のライン速度と、2,000 Hz での平面取得率とを一致させるようレーザーのパルス繰り返し数は、400 kHz に調整されてよい。これにより、ピークパワーは $1 / 200$ になるが、すべての励起光が照明のラインに凝縮され、200 倍になってピークパワーの減少が補償される。サンプルの点ごとに 1 つのパルスと仮定すると、発光される光量には積分またはドウェル時間は考慮されず、パルス繰り返し数を一致させたスキームでは、ラインとシートとは、励起の形態は、ほとんど同等になる。いずれの場合も、二次元検出器アレイまたはカメラ、あるいは画像検出のための他の構成も実装可能である。さらなる計算およびこれらに関わるトレードオフについては、図 2 1 および 2 2 に示されている。

30

40

【0041】

3.10. アルゴリズム

SCAP E データに多くの様々な分析および画像補正方法が適用されることにより、画像の解像度、コントラスト、および、空間線形性が向上し得る。特定の実施態様では、中間レンズおよび対物レンズを含むイメージング配置をモデル化してスキャン中に検出されるカメラのピクセルを物体平面におけるデカルト空間にマッピングしてよい。このモデルを用いることにより、結果として生じるデータの完全なデコンボリューションのための予測される空間変化点拡がり関数を生成してよい。特定の実施態様では、(ラミナー光トモグラフィー (LOT) および拡散光トモグラフィーにおいて見られるように) 光伝播の放射輸送タイプのモデルにより励起光および放射光のいずれの散乱効果も補正するので、補

50

正画像を「再現」することができる。

【0042】

特定の実施態様では、横方向シフトによる調整がなされてよい。SCAPE独自のイメージング配置の優れた効果としては、斜光照明の効果が挙げられる。得られた平面を積み重ねて単純な立方体にするとそのスキューは補正されないため、それぞれの深度を有する層が、その1つ上の層に対して横にずれる。このずれは、光学軸に対する照明シートの角度に直接依存する。特定の実施態様では、この角度を測定するかまたはモデル化するか、または、データから推定するか、あるいは、例えば、軸方向に直線状の物体を用いて、必要であれば非整数シフトの補間により校正することにより、画像の体積はほぼ補正され得る。特定の実施態様では、シートの位置合わせによってx'方向およびy'方向のいずれにもずれが生じ得る。

10

【0043】

特定の実施態様では、デコンボリューションが用いられ得る。SCAPEの点拡がり関数(PSF)は、空間的に変化するが、小さな視野では、実質的に一定に保たれる。この点拡がり関数は、空間的に変化するか否かに関わらず、データセットまたはファントム測定(例えば、アガロースに懸濁された蛍光ビーズなど)から推定し、デコンボリューションによる点拡がり関数を補正するために用いられてよい。上記のように横方向にずらして調整した後にこのステップを適用することにより、実施がより簡単になり、SCAPEの見かけ上の点拡がり関数は、確立されたコンボリューション技術がすでに展開されている共焦点2光子レーザスキャン顕微鏡法に期待されるものにより近くなる。イメージング中の光学素子の位置を正確に把握することを前提として、このシステムのこれらの特性は、システム全体の構成のために視野全体を通じてモデル化することができる。デコンボリューションは、結果として生じたSCAPE画像の解像度およびセクショニングを、解像できる能力の限度内で向上させるだろう。

20

【0044】

特定の実施態様では、拡散バックグラウンド除去法が用いられてよい。例えば、これに限定しないが、散乱した組織を撮像する場合、(特に、単一光子蛍光への)分散バックグラウンド信号は、コントラストに影響を及ぼし、特定の平面上に、他の画像面のゴーストを生じさせ得る。この効果は、励起光および放射光両方の散乱により起き得る。特定の実施態様では、2光子または構造化光のアプローチがこれを改善し得る。しかしながら、特定の实施態様では、体積全体がサンプリングされるので、一定の平面にシャドーイングとなり得るデータに情報が存在することから、数学的補正も実行可能である。特定の実施態様では、スキャン中に横にずれる連続画像のそれぞれの共通パターンがずらされ、スケールリングされ、次の平面から差し引かれることにより、選択的にサンプリングされる平面に対応する各測定値間の差異が特定されてよい。

30

【0045】

特定の実施態様では、ハイパスフィルタリングが用いられてよい。拡散バックグラウンド信号は、所定の画像面の高解像度構造を反映しないことが知られているが、この拡散バックグラウンド信号を除去する簡単な方法は、空間ハイパスフィルタ、または、他の形状のバックグラウンド除去ツールを用いて高解像度の構造を強調することである。同様に、空間ローパスフィルタによってフィルタリングされたデータも除去されてよい。この方法は、実際にうまく機能するよう見いだされたものであり、2光子顕微鏡法と同様の品質の最大強度投影を提供する。

40

【0046】

特定の実施態様では、時空アンミキシングが用いられてよい。PALMおよびSTORMなどの超解像度技術の原理は、関心構造が点滅またはスイッチオン/オフの原因であり得る場合、システムの空間分解能が第1の物体からレイリー範囲内にある他の物体とその物体とを区別できなくても、その場所が決定され得る。時空アンミキシングは動的データに対してはいくらか利益をもたらすことができ、物体すべてが一緒に照明されている場合、一緒にぼやけ、分解不能である物体は、順番に個別に点滅されれば識別可能になる。我

50

々は、遺伝子符号化された蛍光カルシウムセンサを表わす動物の脳におけるニューロン発火を用いて、この原理が、検出能力に影響を与える光の散乱および拡散バックグラウンドの効果なしに、散乱した組織内において個別のニューロンの樹状突起分岐の枝の解像を可能にすることを示した。このアプローチは、全体積内のボクセルの所定のニューロン発火の経時変化と一致するほどすばやくすべての体積からデータを得ることができるので、SCAPEとうまく機能する。例えば、200のニューロンがそれぞれ自然発火するところで体積の時系列を取得する場合、主成分分析またはブラインド信号源分離などの機械的方法を用いて、データ内の200の一意的なタイミングパターンを識別してよい。体積の各ボクセルの時系列をそれらの分離した経時変化に適合させることにより、それぞれ所定の発火パターンを有する個別のニューロンの三次元の広がり識別できる。十分な三次元時

10

【0047】

4. 実施例

4.1. 導入部

20

トランスジェニック技術により、ニューロンの活動などの動的な生体内プロセスの蛍光リポータは、日々進化している[1、2]。その結果、生体内イベントを撮影する高速の三次元体積測定光学顕微鏡法の必要性が高まっている。なお、本開示で導入するSCAPE顕微鏡法は、既存の顕微鏡技術とは本質的に異なる、体積測定のイメージング速度を実質的に向上させる光シートイメージング技術である。SCAPEは、標準的な落射蛍光顕微鏡の配置における光学的にセクショニングされた三次元データを収集し、対物レンズ(もしあれば)またはサンプルの平行移動を必要とせずに、無傷の齧歯類の脳、および、例えば、キイロショウジョウバエの幼虫などを含む自由に動く生物体を含む多様なサンプルの三次元動態を毎秒20体積を上回る速度で取得することができる。

【0048】

30

従来の光シートイメージング技術では、薄い光のシートを用いてサンプルを側面から照明し、直角に位置合わせされた第2の対物レンズを用いて、照明された平面の画像を取得する[3-5]。このサンプルを、相互に位置合わせされた平面に関して平行移動させることにより、三次元体積測定画像を形成する。この2つの対物レンズの配置、側面からの照明、サンプルを物理的に平行移動する必要性が主な制約となり、サンプルのマウントおよび配置を非常に困難なものにし、イメージングできるサンプルのタイプを制限し、達成可能な体積測定イメージングの速度も制限している。最近の進歩により、直交検出対物レンズ[6]の圧電移動、または、電氣的に調整可能なレンズ[7]を介して、検出平面を平行移動させつつ光シートをスキャンする、フレームレートのさらに高い光シートイメージングが実現している。しかしながら、これらの事例で報告されている最高の体積測定イ

40

【0049】

50

齧歯類の脳の生体内イメージングでは、2光子顕微鏡法による、遺伝的に符号化されたカルシウム指示薬を介してニューロンの活動を撮像する選択方法が用いられている [1、2]。しかしながら、2光子顕微鏡法は、体積測定画像を生成するために単一の点を連続的にスキャンすることが通常必要とされるので、三次元イメージングの速度、解像度、および、視野の間でトレードオフを迫られる [11 - 14]。広視野、多点、および、時間的集束を実現すれば、より平行化を高めることができるが、コストが増大し、複雑化するとともに、圧電対物レンズのスキャンは依然として必要なもので、視野を制限し、得られるレーザ出力も制限してしまうことになる [15]。音響光学デフレクタを用いたランダムアクセススキャンでは、速度を上げるためにサンプル内の数か所をスキャンするが、これは、無傷の脳内の多数のニューロンの活動を迅速に記録する方法として現在好まれている。 [16]。しかしながら、このアプローチは、動きに敏感過ぎ、特定のニューロン細胞体を事前に選択しなければならず、自由に動く生物体に対して実施するのはかなり困難である [17、18]。

10

【 0 0 5 0 】

S C A P E は、上記多数の制約を克服し、特定の実施態様では、光シートの照明による光学セクショニングと、単一の固定した対物レンズを介して、多様な、マウントされていないサンプルの平行移動を必要としない超高速体積測定イメージングを可能にする独自のスキャン/デスキャン構成とを組み合わせている。我々は、覚醒して動いているマウスの脳、および、自由に動いているキイロショウジョウバエの幼虫のいずれの表層も撮像する S C A P E の能力を実証する。これらのサンプルは、従来の光シートイメージングのアプローチでは攻略不可であり、我々の、S C A P E の単一光子による試みでは、2光子顕微鏡法の浸入深さには達し得ないが、体積測定イメージングの速度は、標準的なレーザスキャン顕微鏡法によるものをはるかに超えている。

20

【 0 0 5 1 】

本実施例で用いられる特定の S C A P E の実施態様のイメージング配置を図 1 (a) および (b) に示している。この実施態様では、サンプルは、対物レンズの端から発せられる斜めのレーザ光シートによって照明され、薄い対角面内で蛍光を励起する。速度の遅いスキャナ (ここではガルバノメータのモータに取り付けられたポリゴンミラー) が対物レンズの背面に入射する光の角度を変え、これによって、照明平面がサンプル内を掃引するようになる。照明平面から発せられた光は、同じ対物レンズによって集光され、単純に集束されることにより、照明平面の斜めの動く画像が形成される。しかしながら、同じスキャンミラーからの放射光の反射によって、共焦点シート顕微鏡法 [19] と同じようにこの光がデスキャンされ、動いている光シートと常に相互に位置合わせされる固定の「斜画像面」が形成される (図 2 3 のモデルを参照のこと)。そして、この斜画像面を高速二次元カメラに投影するために画像回転光学部品が用いられる [20] (図 1 (f)、および、完全な光学レイアウトに関しては以下の第 4 . 5 章を参照のこと)。このように、S C A P E は、光シートがサンプルを往復して掃引する際に、それぞれの光シート位置 (x') に対する 1 つの斜めの $y' - z'$ 断面と等価である各カメラフレームで画像を高速で取り込むことにより、三次元体積を得る。サンプルの平行移動も対物レンズも必要とせず、スキャンミラーの単一の ± 4 度の掃引の範囲で 1 つの完全な三次元体積が得られる。

30

40

【 0 0 5 2 】

この独自の配置によって、図 1 (b) に示すような、デカルト視野とは少し異なる構成がもたらされる。図 1 (d) は、S C A P E 分解能を制御する因子を示し、図 1 (e) は、S C A P E の点拡がり関数 (P S F) をシミュレーションしたものを示す。第 4 . 6 章では、S C A P E のイメージング配置の理論上の回折限界の横方向 ($x - y$) の解像度および軸方向 (z) の解像度は、広視野において、従来の光シート顕微鏡の 0 . 4 ~ 2 ミクロンおよび 1 ~ 3 ミクロンにそれぞれ匹敵することをさらに実証する。第 4 . 7 章の非散乱ファントム測定では、600 x 1000 x 550 ミクロンの $x - y - z$ 視野が達成可能であることを実証している。組織をまねたファントムおよび生きているマウスの脳において、浸入深さおよび解像度に対する光の散乱の制限効果も特徴づけられる。

50

【 0 0 5 3 】

イメージング速度の点では、SCAPEは、およそ10～40Hzの体積速度でスキャンミラーを前後に掃引すること以上の動作は必要ないので、イメージング速度は、主にカメラのフレームレート（および信号対雑音比）によって制限される。体積速度は、体積における所望の角度サンプリングステップ数によって序されたカメラのフレームレートに等しい。我々が現在使用しているAndor ZylaのsCMOSカメラは、2、404fpsで横（ y' ）×深さ（ z' ）2560×80の画像を読み出すためにビニングされることができ、その結果、50、100、および、200のスキャン角度（ x' ）での体積がそれぞれ毎秒48、24、および、12体積撮像される。市販のカメラは、第4.8章で説明するように、毎秒300体積を上回る速度でデータを収集できる。我々のsCMOSカメラチップは横幅が大きいため、イメージング速度に影響せずに、1280ボクセル幅までの隣り合った視野で正確に同期した2色イメージングを可能にするスペクトル画像スプリッタを導入することができる。

10

【 0 0 5 4 】

従来のレーザスキャン顕微鏡法では、1MHzのピクセルレートで物理的なz方向スキャンのオーバーヘッドはないものと仮定すると、相当する100×1280×80（ x 、 y 、 z 方向）のボクセル体積が毎秒0.1体積で得られる（10秒につき1体積、または、我々の現在のSCAPEシステムの1秒につき24体積の速度より240倍遅い）。繰り返し率が80MHz（2光子顕微鏡法の基本的なピクセルレートの限界）のチタンサファイヤレーザであってさえも、最高等体積速度は、毎秒7.8体積であろう。

20

【 0 0 5 5 】

なお、我々は、現在の神経科学および生物医学研究に大きく関わる、生体内システムにおけるSCAPE顕微鏡の性能を、2つの非常に難易度の高い実例によって証明する。2種類の生体の1つは、覚醒して動いているマウスの無傷の脳であり、他方は、自由に動いているトランスジェニック・キイロショウジョウバエの幼虫である。哺乳類の脳における多数のニューロンの自発活動のイメージングは、神経科学の研究では緊急優先事項であり、現在の2光子技術に適合している必要はない。我々は、（波長488nmの単一光子の照明を用いた）SCAPE顕微鏡法では、覚醒して動いているマウスの脳の皮層I/IIの樹状突起の枝における画像の自発的なGCaMPの過渡状態を十分な時空間分解能で撮像することにより、単一の三次元樹状突起の異なる深度における発現と消失の動態を解像できることを実証する。我々のキイロショウジョウバエのイメージングの例は、最近のトレンドである小さい生物体のイメージングに着目したものである。ここでは、全身、脳、および、神経系を完全な状態で撮像することに成功し[6、21]、自発的に動作および行動する間の動的な細胞機能を撮影することにより、先例を超える結果を得ている。我々は、自由に動いている幼虫の蠕動匍匐、鼓動、ニューロンの追跡、および、筋収縮の動きおよびカルシウムの動態の体積測定イメージングを実証する。

30

【 0 0 5 6 】

4.2. 結果

ここに示されたすべてのデータは、オリンパスの対物レンズXLUMPLFLN（20倍/0.95Wまたは1.0W；アップライト落射蛍光顕微鏡配置）、および、CWレーザ（30mWまたは50mW、サンプル入射時0.5～5mW、波長488nm）を用いて収集された。ここに示すすべてのデータは、SCAPEの「未処理の」座標系（特に説明がない限り、横方向（ y' ）×スキャン角度（ x' ）×斜めの深さ（ z' ）、図1（b）を参照のこと）。視野は、実験後のシステムの校正によって決定した（以下の第4.5章を参照のこと）。

40

【 0 0 5 7 】

4.2.1. 齧歯類の脳の生体内イメージング

図2は、マウスの脳の生体内SCAPEイメージングを示す。図2（c）は、SCAPEの体積レンダリングを示し、図2（d）は、頭部を固定されて覚醒して動いているマウスを x' - y' 断面の異なる深さで撮像した画像である。マウスの血管内をテキサスレッド

50

デキストランでラベリングして赤くしており、ヒゲのバレル皮質のV層のピラミッド状ニューロンにおいてGC a M P 6 fを発現している。画像は、定位置の2色画像スプリッタを用いて波長488nmの励起で取得された。(x'-y'-z'空間における100×500×80のボクセルに対応する)350×800×105ミクロンの体積の2色画像が毎秒10体積で撮像された。図2(e)は、血管を蛍光共役デキストランで染色したマウスを撮像した2光子顕微鏡法と高解像度SCAPEとの比較を示す。140ミクロンの深さでは、単一の毛細管(5~10ミクロンの大きさ)が解像でき、下行の血管が2光子顕微鏡法より高いコントラストを示している。図28は、より大きい血管をほぼ300ミクロンの深さまで解像できることを示している。動物の準備、位置合わせ、イメージング、および、パラメータについては、第4.4章および4.5章を参照されたい。

10

【0058】

図3は、GC a M P 5 gを発現しているマウスの層Vのピラミッド状ニューロンのSCAPEデータを示す。(x'-y'-z'空間における240×200×40ボクセルに対応する)単色の600×650×134ミクロンの体積が毎秒10体積で撮像された(2×2のビニングを用い、画像スプリッタは不使用)。頭部を固定されたマウスがイソフルラン麻酔からちょうど覚醒したときに180秒分のデータが取り込まれた(スキャンが終わるまでにマウスは完全に覚醒した)。

【0059】

図3(b)は、参考のために同じ動物で取得された2光子画像の層を示す。図3(c)は、互いに区別された層I/IIにおける個別の樹状突起と、図3(d)に示すような特有の発火動態に基づく色分けを示すSCAPE体積を示す[22]。図3(d)に示す経時変化は、180秒の獲得期間に観察された多数の個別のニューロンの発火のうち10個だけを示している(より詳細な分析は図30を参照されたい)。経時変化は、個別の樹状突起における小さな関心領域から抽出したものであり、フィルタリングおよび補間をしていない生データとして示している。個々の発火が明確に区別され、GC a M Pの発現と消失の典型的なパターンが示されている。単一の樹状突起内ですら経時変化の微妙な違いが認められる。図3(e)は、単一の発火での発現および消失tの体積測定マップを示す($F(t) = F(t_0)e^{-t/t}$; $t = 113.5$ 秒)。これらの枝における異なる深さにおいて2×2×1のボクセル関心領域(ROI)から抽出された経時変化は、それらのマップを裏付け、樹状突起の2つの枝が同じ発火動態を有する一方で、1つの枝は全く異なる発現および消失の過渡時にある領域を有していることを示している(図3(f))。大きい振幅の8秒前に起きた同じ樹状突起内での発火において同じ挙動が見られ、この挙動はこのニューロンの特性であり、過渡効果ではないことを実証している。

20

30

【0060】

4.2.2.自由に動いている生物全体のイメージング

スライドガラスの上でリン酸緩衝生理食塩水中を自由に動いている1歳~3歳の間の年齢と大きさが異なるキイロショウジョウバエを撮像した。いくつかの事例では、横方向への動きを制限するためにアガロースチャンネルを用いた。図4は、1歳のミオシン重鎖(mhc)-Gal4, UAS-CD8: GFP導入の幼虫のSCAPE画像を示す。体壁、心管、および、内臓の平滑筋を含むすべての筋肉において緑色の蛍光タンパク質(GFP)の発現が見られる[23, 24](図31は、同様の幼虫の2光子画像を示す)。動物を自由に動かせつつ、(x'-y'-z'空間における120×800×80のボクセルに対応する)430×1330×134ミクロンの視野を毎秒20体積で撮像した。図4(b)は、全身のSCAPE体積レンダリングを示し、図4(c)は、心管の拍動を撮像した際の、2か所の異なる深さにおける3つの連続したSCAPE x'-y'画像面を示す。図4(e)のキモグラフは、単一の横方向スキャン位置から取られた2つの深度の平面の平均を示す。周辺の筋肉の収縮を示すせん動波と、毎秒2~3拍の心管のリズミカルな拍動とが撮影されている。

40

【0061】

図5(a)および5(b)は、筋肉中にmCherryおよびGC a M P 6 fを共発現

50

させた3歳のmh c - G a l 4、U A S - G C a M P 6 f、U A S - C D 8 : m C h e r r y 導入キイロショウジョウバエの幼虫からのデータを示す。幼虫の腹側の一点をガラス側に固定することにより幼虫の前進運動を制限する。波長488nmで励起したフルオロフォアにより、(x' - y' - z' 空間における100 × 300 × 100ボクセルに対応する)2色の300 × 1000 × 264ミクロンの視野が毎秒10体積で撮像された。大きい幼虫のプロービングヘッドが伸びても縮んでも完全に視野に入る。図に示すS C A P E画像シーケンスには、それぞれの筋肉の収縮にともなうG C a M P 蛍光のパルスを表す細胞内カルシウムの動態と並行して、筋肉の動きおよび収縮の複雑な三次元動態が示されている。図5(c)は、動作をより制限された他の幼虫から抽出したG C a M P カルシウムの動態を示す。

10

【0062】

図5(c)および5(d)は、クラスI I Iのd a 感覚ニューロンと、クラスI Vのd a 感覚ニューロンとの2つのサブタイプのニューロンにおいて、T d T o m a t o およびG F P を共発現させた1歳のN o m p C - Q F ; Q U A S - t d T o m a t o x p p k - G a l 4 ; U A S m C D 8 : : G F P 導入キイロショウジョウバエの幼虫で得られたデータを示す。(x' - y' - z' 空間における80 × 240 × 100ボクセルに対応する)2色の260 × 800 × 265ミクロンの視野が毎秒10体積で得られた。画像シーケンスは、動物が前に向かって這っているときの脳の三次元動作の波を示す選択された(不連続の)フレームである。動物の内臓内に食物の自己蛍光も見られる[25]。M A T L A B (登録商標)で記載されている四次元動作追跡アルゴリズムにによって、図5(e)に示すように四次元空間における個別のニューロンの位置を追跡した。これらのニューロンはG C a M P を発現していないが、データは、自由に移動しているすべての生物体の個別のニューロンからの信号を継続的に追跡し、かつ、測定するためにS C A P E を使用する実現可能性を示しており、検出信号の動作に依存する変化を比率計量的に説明するために(図5aのような)2色標識化が用いられ得る。図5(c)は、体外で非常に高いスキャン解像度で得た同じ系統の幼虫のS C A P E 体積レンダリングを示す。サンプリングレートのトレードオフによって大きい体積を高速でイメージングできるようになるが、この画像は、個々の細胞体およびプロセスが明確に解像できており、S C A P E の本来有する非常に高い解像度を実証している。

20

【0063】

4.3. 考察

S C A P E は、無傷の生きて自由に動く多様な種類のサンプルの三次元構造および機能を撮像することができる、新規で超高速な体積測定顕微鏡法のアプローチの1つである。S C A P E のサンプルは、平行移動させる必要がないので、多目的な光シートの配置に大変有益であり、従来のレーザスキャン顕微鏡技術に比べて体積測定におけるイメージング速度が1桁向上する。スピニングディスク共焦点などの広視野技術と比べて、S C A P E は、物理的なz方向スキャンを必要とせず、選択的な平面照明の利点を活用するので、生体内イメージングでの光損傷を抑制することができる。我々のシミュレーションおよびファントム測定は、従来の共焦点光シート顕微鏡法に比べ、S C A P E は、解像度および浸入深さについてのわずかなトレードオフで、多くの利点を有することを実証している。

30

40

【0064】

実施例に示されているすべてのS C A P E 画像は、安易に入手可能な光学部品によって構成した50,000ドルを超えるベンチトッププロトタイプを用いて得られた。すべてのデータは、収集時のものであり、改造またはデコンボリューションはしていない[26、27]。第4.6章に記載された代替案の高開口数構成に加えて、赤方偏移したフルオロフォア[28]、モデルベースのまたは面間デコンボリューション[29]、および、軸外透過に最適化された光学部品を用いることにより、解像度および浸入深さを向上させることができると予測している。S C A P E のさらなる向上のための導入は、2光子励起(例えば、[30]に記載する線形掃引励起、および、向上した浸入深さに対するI R シフト励起波長[31~33]、光シートの厚みを制限するための誘導放出抑制(S T E D

50

) [3 4]、および、解像度を向上させるためのベッセルビームまたは構造化された光の導入を含んでよい。我々は、また、SCAPEのen-faceで平行移動なしの構造は、細胞活動への同時オプトジェネティクス操作によって生きた脳にビデオ速度の体積測定マイクロ顕微鏡法を実行できる第2ビーム構造化光励起技術と組み合わせるのに理想的であることに注目している [3 6、3 7]。

【 0 0 6 5 】

覚醒して動いているマウスの脳におけるSCAPEの結果は、表層においてさえ、完全な体積測定イメージングに多大な利益をもたらすことを実証した。体積におけるすべての点をサンプリングすることは、動作に敏感である必要はなく、関心領域を事前を選択するという時間の無駄をすることもなしにすべての自発活動を撮像し、それらの自発的動態に基づいて樹状突起の三次元体積レンダリングを可能にすることを意味する。マウスの脳内では、我々のSCAPEのベンチトッププロトタイプの空間分解能は、2光子顕微鏡よりは確かに劣るが、ニューロンの動態の複雑な動態の三次元分析を非常に高いサンプリングレートで行うには十分であること示した。キロショウジョウバエについての我々の結果は、SCAPEイメージングは、大きい三次元視野を毎秒20体積まで撮像し、1齢から3齢の動いている幼虫の自由な挙動および細胞機能を撮像できることを示した。覚醒して動いている完全な生物体における完全な脳および神経系を細胞レベルの解像度でリアルタイムに三次元サンプリングする能力は、生物学および神経科学の研究において最先端である。

【 0 0 6 6 】

我々の低価格のSCAPEプロトタイプは、小型であり、扱いが簡単であり、リアルタイムに結果を提供する。したがって、我々は、細胞複製、三次元細胞培養における機能および動作、無傷の人工組織のイメージング [3 8 ~ 4 0] から、マイクロ流体およびフローサイトメトリスシステムにおける三次元動態のイメージング [4 1 ~ 4 3] までに及ぶSCAPEの多くの追加の用途も想定している。図に示していないデータでは、SCAPEのイメージングがシー・エレガンス、ダニオレリオ（ゼブラフィッシュ）、および、人間の指先にさえ有効であることがわかっている。SCAPEの導入に基づく内視鏡またはグリーンレンズは、動物、および、おそらく人間の侵襲的イメージングに実施可能である。ある倍率の範囲では、SCAPEは、動的表面プロフィロメトリ、または、三次元粒子速度測定などのライフサイエンスを超えた環境での用途にも用いられ得る。

【 0 0 6 7 】

4 . 4 . 方法

イメージングシステム

我々の現在のSCAPEシステムのプロトタイプは図1 (f) に示されている。システムの主な構成要素を以下に示す。

1) オリンパスの対物レンズX L U M P L F L N (2 0 倍 / 0 . 9 5 W ; アップライト落射蛍光顕微鏡配置) 。

2) C W レーザ (3 0 m W または 5 0 m W 、 サンプル入射時 0 . 5 ~ 5 m W 、 波長 4 8 8 n m) (8 5 - B C D - 0 3 0 - 1 1 5 、 メレズグリオ社製) 。

3) ガルバノメータのモータ (6 2 4 0 H A 、 ケンブリッジテクノロジー社製) にカスタム装着したシステムのスキャン素子である軽量の 1 2 面ポリゴンスキャンミラー (D T - 1 2 - 1 3 8 - 0 4 3 、 リンカーンレーザー社製) 。

4) A n d o r Z y l a の s C M O S カメラ (Z y l a - 5 . 5 - C L 1 0) 。

5) 2 色イメージングのための光度計用 D V - 2 画像スプリッタ。

システムの他のすべての部品は、標準的な光学および光学機械構成要素である。我々のプロトタイプの完全な構成、および、光路については、校正手順と共に以下の第 4 . 5 章で説明する。

【 0 0 6 8 】

生きたマウスのイメージング

図 2 (a) ~ (d) および図 3 に示したマウスは、皮質の V 層におけるピラミッド状二

ユーロンにクレリコンピナーゼを発現しているトランジェニックマウス (R b p 4 : C r e , G E N S A T) であり、 C r e 誘発性の遺伝的に符号化できるカルシウム指示薬である G C a M P を担持するアデノ随伴ウィルスの皮質注射を受けている (A A V 2 : h S y n : F L E X : G C a M P 5 g または 6 f P E N N ベクトルコア) 。生後 6 ~ 8 週間のオスのマウスにウィルスの皮質注射をした (およそ 2 5 g) 。機能的に識別される領域をウィルス注射のターゲットとすべく、1 回のヒゲ刺激の間に、固有の光学信号でイメージングすることにより、まず各マウスのパレル皮質をマッピングした。注射の後に、マウスは、頭部を慢性的に固定するためにヘッドプレートを埋め込まれた。術後回復してから、2 週間で動物を頭部固定に慣れさせ、その後、イソフルラン麻酔をして 2 m m の頭蓋窓を埋め込み、一晩かけて回復させた。数日後、動物は、行動に関するタスクについての訓練を受けた。図 3 に示すマウスは、3 0 ~ 6 0 秒の行動セッションの間に、ヒゲ刺激による検出タスクを実行しながら 2 光子顕微鏡によるイメージングを受けた。

10

【 0 0 6 9 】

S C A P E イメージングの間、マウスは、S C A P E の対物レンズの下に通常の行動パターンの設定で配置され、3 0 分続くセッションの間にデータが収集された。図 2 (a) ~ (d) に示されるマウスは、1 4 0 μ M のテキサスレッドデキストラン (7 0 , 0 0 0 M W) を約 0 . 1 m l 尾静脈注射して血管系を赤で共標識するため、S C A P E イメージングの前にイソフルレンで短時間麻酔された。その後、動物は、頭部を固定され、環境に順応させられた。図 3 に示すマウスは、頭部固定の間、イソフルレンで短時間麻酔された。1 8 0 秒の S C A P E スキャンの終わりにマウスは完全に覚醒した。

20

【 0 0 7 0 】

鋭形の頭蓋窓が開けられ、ウレタン麻酔され、5 % のフルオレセインイソチオシアネートデキストラン (7 0 , 0 0 0 M W , 4 6 9 4 5 - F シグマ社製) を 0 . 1 m l 尾静脈注射された野生型マウスから図 2 (e) における血管のイメージングデータを得た。S C A P E イメージングの後に、マウスは、比較イメージングのための特注のアップライト型 2 光子顕微鏡 [4 4] に移送された (第 4 . 5 章を参照されたい) 。マウスは、恒温パッドに配置され、手術およびイメージングの間中、パルスオキシメトリによってモニタされた。

【 0 0 7 1 】

キイロショウジョウバエの幼虫

30

1 齢 ~ 3 齢の生きた幼虫を標準的な条件下で飼育し、標準的な落射蛍光顕微鏡 (オリンパス B X 5 1) で目視検査することにより選択した。その後各幼虫をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で洗浄して表面のゴミを取り除き、スライドガラスの上の P B S 滴に配置した。アップライト型 S C A P E 対物レンズがサンプルを損傷させずにカバースリップの上部の水滴に浸され得るよう、約 1 m m の厚みのスペースを用いてサンプルを覆うガラスのカバースリップを緩く支持した。いくつかの事例では、幼虫は、イメージング中に動きを制限されるよう、アガロースチャンネル内に配置された。いくつかの事例では、イメージング中にサンプルを手動で平行移動させることにより、視野内に収まるようにした (例えば図 4) 。図 5 (a) ~ (b) に示す大きい 3 齢の幼虫を、その端部は自由に動かせるが、視野からはみ出るような前進運動はできないよう、その腹側表面の中心でシアノアクリレートの小滴を用いてカバーガラスに固定した。さらなる幼虫 (図示せず) は、逆の構成の S C A P E によって撮像された。図 5 (c) は、幼虫を 1 0 分間 1 0 0 % エタノールに浸して安楽死させた後、死後に撮像したものを示す。

40

【 0 0 7 2 】

S C A P E の画像解析および可視化

本願に示される比較的単純な視覚化および分析は、M A T L A B (登録商標) および A m i r a (登録商標) を用いて実行された。生データとしての平面画像を示し、特に記載のない限り、平滑化、補間、および、レジストレーションはしていない。三次元体積レンダリングは、特注のカラーマップを使用した A m i r a (登録商標) 5 . 2 . 1 (ヴィサージュイメージング社) のボルレン (V o l r e n) モジュールを用いて生成した。すべ

50

でのデータが“SCAPE”(x'-y'-z')画像空間(図1(b)参照)に示されている。図2(e)および図28に示されるSCAPEデータでは、それぞれの深度での平面を一定の線形係数だけずらすことにより、斜光シートのスキュー効果を補正した。2光子データをx-y平面においてデジタル的に回転させ、SCAPE画像の視野の向きと一致させる。マウスの脳における樹状突起の発火、および、キイロシヨウジョウバエのニューロンの追跡についてのさらなる詳細および時空間分析に関しては、第4.5章を参照されたい。

【0073】

4.5. 補助的な方法

SCAPEのプロトタイプ設計および光路

図1(f)に示すように、SCAPEは、ガルバノメータのモータ(6240HA、ケンブリッジテクノロジー社製)にカスタム装着した12面ポリゴンスキャンミラー(DT-12-138-043、リンカーンレーザー社製)を用いて実施することができる。本実施形態では、SCAPEは、ファセットを1回掃引する毎に1つの体積全体を取得するので、ポリゴンは回転せずに、比較的小さい角度範囲を双方向にスキャンする。よって、十分なミラー表面領域を維持しつつ、大きいファセットのデューティサイクルの制限を克服し得る。イメージング速度が高い場合、ポリゴンの動きは連続すると見なされるが、ガルバノメータを用いてこの動きを制御することにより、カメラの動きとカメラによる撮影とを正確に同期できる。ガルバノメータは、カメラのフレームキャプチャ信号によって駆動されるクロックを有するDAQアナログ出力ボードによって駆動される。

【0074】

ここに示すすべてのデータは、出力30mW、波長488nmであり、サンプルへの光出力が0.5~5.05mWであるレーザ(85-BCD-030-115、メスグリオ社製)を用いて収集された(サンプルの明るさ、所望のスキャン速度、および、サンプルの感光性に依存する)。ビームアライメントミラーの後に、2つの円柱レンズからなる5倍アナモルフィック顕微鏡を用いてビームを一方向に拡大し、その後、50mmの焦点距離を有するさらなる円柱レンズにより光シートを形成する(それぞれソーラボ社のLJ1695RM-A、LJ1267RM-A、および、LJ1695RM-A)(図1(a))。このビームは、スキャンの掃引の中心部ではオフセットになるが、スキャンレンズの正面に対して垂直になる角度でポリゴンの1つのファセットに入射する(この角度は、ポリゴンのファセット数の関数である)。その後、走査望遠鏡を用いて対物レンズのバックアパーチャの端部で反射ビームを撮像することにより、サンプル内に斜光照明面を形成した。ビームは、対物レンズの真のフロントアパーチャで集束されるはずであり、平面は、ポリゴンのファセットと共役関係にある[45]。走査望遠鏡のレンズは、AC254-050-A1およびAC508-100-A1であり、対物レンズの開口数(NA)の使用を最大限生かすように選択される倍率を有している。よって、倍率は、対物レンズのバックアパーチャの直径と、2つの隣接するポリゴンファセットの中心同士の距離との比率に等しくなるはずである。ここに示されている画像のすべては、オリンパスの対物レンズXLUMPLFLN(20倍/0.95W)を用いて取得された。なお、開口数、作動距離、および、視野の順応性を高めるべく、他の対物レンズ、および、色消しレンズを用いてもよい(上記の条件を満たすにはスキャン望遠鏡を適切に調整することが必要である)。対物レンズの開口数(NA)が変化すると、入射光と検出光との交角の変化、および、個別の励起および発光の点拡がり関数の変化の両方によって解像度が変わることになる(第4.6章を参照)。

【0075】

波長488nmの励起ビームと反対側の対物レンズのバックアパーチャからの蛍光発光を、スキャン望遠鏡を介してポリゴンミラーの隣接するファセットにマッピングした。ポリゴンは、この光を固定した検出アームにデスクャンした。我々の現在のシステムでは、この検出アームの最初の2つのレンズがスキャンアーム望遠鏡内のそれらと一致する(ポリゴンから順にソーラボ社のAC254-050-A1およびAC508-100-A1

10

20

30

40

50

)。この望遠鏡からの光は、斜面で集束されてよく、撮像されている物体内の照明面の画像に対応する。ダズビーの方法 [19] に続き、我々は、一对の対物レンズを用いて平面を生成し、回転させた。ここで用いられる対物レンズは、必要な開口数 (NA) および短い作動距離を提供することにより、検出光を捕獲しつつ、平面を回転させることができる。現在使用している対の対物レンズは、オリンパス U P L a n S A p o (20 倍 / 0 . 75 NA)、オリンパス U P L a n F L (10 倍 / 0 . 30 NA)、または、オリンパス L C P L a n F L (20 倍 / 0 . 40 NA) である (倍率は調整可能)。この最後の対物レンズからの光は、最後のレンズ (A C 5 0 8 - 0 7 5 - A、ソーラボ社製) を用いて高速 s C M O S カメラで集束される。

【 0 0 7 6 】

蛍光イメージングでは、斜画像面が光学的に回転された後、カメラの正面の平行空間に配置された 5 0 0 n m のロングパスフィルタ (F F 0 1 - 4 9 6 / L P - 2 5、セムロック社製) を用いて、励起光が遮断された。2色イメージングでは、2チャンネルの市販の画像スプリッタ (D V 2、フォトメトリクス社製) が導入され、回転画像面をスペクトル分離し、隣り合う2つのリレー画像をカメラチップに再配置した。本事例では、クロマ 5 6 5 d c x r ダイクロミックフィルタ、 $5 2 5 \pm 2 5$ n m のバンドパスフィルタ、および、 $6 0 0 \pm 2 5$ n m のバンドパスフィルタからなる緑 / 赤のフィルタキューブが用いられた (バンドパスのそれぞれはエドモンドオプティクス社の 8 6 9 8 4 および 8 4 7 8 5)。

【 0 0 7 7 】

ここに示される画像には、1 T b の固体ハードドライブ (高速データストリーミング用) を有する高性能デスクトップにインストールされたアンドールのプロプライエタリソフトウェアを用いて動作する、A n d o r Z y l a の s C M O S カメラ (Z y l a - 5 . 5 - C L 1 0) が用いられた。ガルバノメータに装着されたポリゴンミラーの動きは、カメラのフレームグラブ信号と同期したナショナルインスツルメンツ社製のアナログ入力 / 出力ボードを介して制御された。

M A T L A B (登録商標) で記述されている簡単なグラフィカルユーザインターフェース (G U I) を用いてスキャンパターンを生成し、カメラストリーミングおよびガルバノメータ位置信号をトリガしてモニタし、レーザシャッターおよび動物のシミュレーションを制御した (使用先)。

【 0 0 7 8 】

我々の S C A P E システムのプロトタイプは、標準的なレンズを介した光の軸外の伝播に起因する収差や、スルーブットおよび視野に対しては最適とは言えない。我々のシミュレーションによって導かれる多くの改良は、照明の有効領域をより大きくすることができる。特に、我々のモデルは、サンプルから発せられる光の「最大径」をサンプリングすることにより解像度およびスルーブットをめざましく向上させることができ (図 2 5 を参照)、このサンプリングは、ポリゴンスキヤナ (戻り光の半分だけをデスクャンする) の代わりに2つの別々のスキヤン素子を用いる (第 4 . 6 章および図 2 6 を参照) ことによって成し得ることを実証した。特定の実施形態では、S C A P E は、さらに、M E M S 技術 (小型化にも適する) 光空間変調器 (ビーム成形、構造化された光、S T E D パターニング、および、適応制御光学補正を向上させる) および、音響光学偏向器の利用もあり得る。2光子の導入に際して、1つのラインで1つのカメラフレームを満たすよう同期されたさらなるスキヤンミラーを用いてポリゴンミラー上のラインをスキヤンしてよい (光力が十分であれば、標準的なガルバノメータに対して 4 , 0 0 0 L P S まで可能であり、2 , 0 0 0 F P S のカメラ撮影に適する)。光シート全体を照明することによって2光子が励起できるよう、標準的なチタンサファイヤレーザよりも低い繰り返し数で高エネルギーパルス生成する再生増幅器を用いてもよい。例えば、2 k H z のパルスは、カメラフレーム毎に1つの光シート全体を照明できる。

【 0 0 7 9 】

生体内 2 光子顕微鏡との比較方法

S C A P E と比較するための 2 光子顕微鏡データは、我々の自作の 2 光子顕微鏡システ

10

20

30

40

50

ム [4 4] を用いて収集された。このシステムは、M a i T a i H P レーザ、および、スペクトル的に分解された検出器である浜松光電子増倍管 R 3 8 9 6 を用いる。図 2 (e) および 2 8 に示された 2 光子データは、5 0 5 ~ 5 6 0 n m の発光フィルタ、8 0 0 n m の励起を有する F I T C - d x、および、オリンパスの対物レンズ X L U M P L F L N (2 0 倍 / 0 . 9 5 W) によって収集された。図に示された 2 光子画像は、3 ミクロンの深度において、7 5 0 ミクロンの視野に対応する 4 0 0 × 4 0 0 の x - y 平面ピクセルにより取得された。

【 0 0 8 0 】

比較する S C A P E データ (図 2 (e) および 2 8 に示す) は、波長 4 8 8 n m を有する 0 . 4 m W のレーザー光を用いて収集された。 (9 2 4 × 6 6 7 × 3 7 5 ミクロンの (x - y - z) 体積に対応する) 3 0 0 の角度位置 (x ') および 1 0 0 0 × 5 0 0 ピクセル (y ' - z ') 平面の低速スキャンを平面毎に 2 5 0 m s の積分時間で実行した結果、信号対雑音比が最大になった (2 0 0 ミクロンでの同様のコントラストは、毎秒 1 0 体積において 2 . 4 m W の照明および積分時間 2 . 9 m s で見られた) 。ダイナミックレンジを高めるべく、5 0 % の反射プラスチックフィルムのストリップをポリゴンと検出アームとの間に配置することにより、脳のごく表面から出る信号を減衰させた。カメラにおける浅い位置の v / s 深度信号はスキャンの初めから終わりまで一定なので、この種の空間に依存する減衰は、有効である。

10

【 0 0 8 1 】

2 光子イメージングとの直接比較を可能にすべく、斜光シートの角度によって生じる深さに依存するスキューに対して S C A P E データを補正した。これは、 (y、x 両方向の) スキュー角を選択し、連続する深度におけるフレームを一定の線形係数だけ横にずらすことによってなされた。2 光子データをデジタル的に回転させ、両方向のデータセットを得て、それらの関心領域を一致させた。

20

【 0 0 8 2 】

システム校正

それぞれのイメージング実験の後に、以下の方法を用いて、我々の現在の S C A P E システムの校正係数を測定した。これらの校正によって、S C A P E 空間がデカルト空間へと形式的に変換されることはないが、各軸に沿った現実の (ミクロンの) 寸法に結果を残している。

30

【 0 0 8 3 】

深さ軸の校正

蛍光テープ内にコーティングされた平面に斜光シートが集束された。1 インチの 1 / 1 0 0 0 の増分のマイクロマニピュレータステージを用いて深さ寸法 (z) に沿ってサンプルを平行移動させ、カメラチップに沿った画像のずれ (深さ方向における) をピクセル内で計算した。この校正係数を用いて、z ' 方向におけるピクセル空間をサンプル z 内の現実の深さに変換した。

【 0 0 8 4 】

横軸の校正

システムを用いて、標準的な顕微鏡テストサンプル (本例では、蛍光染色したスズランの茎の切片) を撮像した。1 インチの 1 / 1 0 0 0 の増分のマイクロマニピュレータステージを用いて、横方向寸法 (y) に沿ってサンプルを平行移動させた。 (y 方向における) カメラチップに沿った画像のずれをピクセル内で計算した。この校正係数を用いて横方向のピクセルを y 方向における実際の距離に変換した。

40

【 0 0 8 5 】

スキャン軸の校正

単一の体積内の連続したフレームの間にも角度間隔があると仮定した場合、標準的な顕微鏡テストサンプル (本例では、蛍光染色したスズランの茎の切片) の 2 組の測定値からスキャン軸変換係数を計算した。まず、ポリゴンスキャナ (0 . 0 1 体積 / 秒) の最大角度範囲でサンプルの高解像度体積スキャンを得た。次に、中心位置に固定した照明平面に

50

よって、マイクロマニピュレータステージを用いて同じサンプルを x 方向に物理的に平行移動させることにより、1 インチの 1 / 1 0 0 0 の増分での画像を得た。スキャン範囲で 2 つのデータセットを比較し、ポリゴンの 1 度の角度スキャンと等しいミクロン単位の物理的な平行移動を決定した (係数 K として定義 ; 単位 $\mu\text{m} / \text{度}$)。所定のデータセットでは、変換係数は、以下の式によって表される。この校正係数を用いて、角度ステップを x 方向における実際の距離に変換した。

【数 1】

$$\text{Conversion Factor } \left(\frac{\mu\text{m}}{\text{step}} \right) = K * \frac{\text{Total polygonal scan angle}}{\text{Number of steps per volume}}$$

10

【0086】

生体内データ分析方法 ; マウスの樹状突起分析

図 3 (c) に示されている色分けされた樹状突起は、まず、ニューロンのイベントの四次元データセットを検索することにより得られた。ピークの前の 1 0 ~ 2 0 のフレームに関する各イベントのピークのマップを用いて、発火している樹状突起の位置を識別し、これらのピクセルから、同じニューロンにおける他のイベントの表現としての経時変化を抽出した。所定のニューロンの各発火のマップが比較されてソートされることにより、識別されたイベントが同じニューロンと一致することが確かめられた。これらの一致したニューロンをすべてのイベントで平均化することにより、所定の時間的に相関する樹状突起の三次元マップが生成された。平均化された体積のそれぞれは、A m i r a (登録商標) のボルレン関数を用いてレンダリングされ、独自のカラーマップで表された。各マップにおけるピークピクセルの位置から抽出された経時変化を (生のフィルタリングされていないデータとして) プロットしたものを図 3 (d) に示している。

20

【0087】

図 3 (e) ~ (f) の樹状突起内の動態の分析は、M A T L A B (登録商法) を用いて行われた。生データは、まず 1 . 5 H z のローパスフィルタでフィルタリングされ、その後、特定のニューロンのイベントを囲む時間窓が、イベントのピークの時間と共に識別された。ボクセルの経時変化をこの時間窓の開始に正規化し、(ピークまでの) 上昇および (ピークからの) 下降スロープを表す各経時変化のログを線形関数に適合させた。この適合の傾きの逆数を各ボクセルの発現または消失の時定数 () として記録した。ピーク値が予め決められた閾値を超えないボクセルはゼロに設定した。結果として生じた時定数の体積マップは、「物理学の」カラースケールを用いて A m i r a (登録商標) で視覚化した。さらなる監視および経時変化を抽出するためのボクセルは、M A T L A B (登録商標) の時定数体積の個別の切片を視覚化することによって識別された。

30

【0088】

ニューロンの追跡アルゴリズム (キイロショウジョウバエの幼虫)

図 5 (e) に示されたニューロンの追跡は、M A T L A B (T M) で実行され、幼虫の内臓の混合発光信号からの G F P ニューロンサブセットの澄んだ緑色の信号を、まずスペクトル分離することによってなされた [4 4]。時系列の開始時におけるニューロンの位置は、深さ (z ') の最大強度投影から手作業で選ばれた。その後、まず、(y ' および z ' を見出す) 深さの最大強度投影から、連続するフレームを分析して開始点の選択された半径内のピーク強度の点を識別し、このピーク強度の位置を、y ' および z ' によって定義される列内の x ' の関数として見出した。次のフレームに移動する前に「開始」位置をアップデートした。

40

プロセスは、誤差のないよう管理されているが、ほぼリアルタイムで進行した。

【0089】

4 . 6 . 補足情報 S 1

4 . 6 . 1 . スキャン / デスキャン配置

我々の現在のベンチトップシステムは、安易に入手可能な構成要素によって組み立てら

50

れており、軸外透過に対しては最適化されていない。よって、原理を実証してはいるものの、我々の測定値は、SCAPEの能力の理論限界を捉えていない。これらの限界値を完全に理解すべく、我々は、SCAPEシステムのいくつかの計算モデルを開発した。第1に、SCAPEのオプタリクス(Optalix)(登録商標)モデルであり、これは、SCAPEのデスクランの配置によって、システムを移動中の照明平面が固定カメラにマッピングされる方法を実証するのに用いられる。1つのモデルは、オリンパスの対物レンズXLUMPLFLN(20倍/0.95W)を含む現在の我々のシステムのレンズに基づき生成され、他のモデルは、薄レンズ近似を用いて生成され、30nmの焦点距離を有する直径1インチのレンズがシステムの対物レンズとして含まれている。シミュレーションは、所定のポリゴン回転角度に対する物体空間における光シートの位置を識別し、照明された平面をデスクランされた中間斜画像面にマッピングする(図1(a)参照)。

10

【0090】

図23に示すように、薄レンズの例は、照明シートが、固定した中間斜画像面をほぼ完全にデスクランできることを示している(非常に広い視野が達成可能なことにも注目されたい)。システムの倍率を1倍とすると、この平面は、(最後のレンズと)共役的な画像空間においてポリゴンが0度回転のときの物体空間における励起シートと同じ斜角を有する。実際のレンズの場合では、実際のアクロマティックレンズの像面湾曲、および、ポリゴンのわずかな平行移動から生じる20ミクロンくらいのエッジのブレはあるものの、オリンパスの対物レンズXLUMPLFLN(20倍/0.95W)を用いたデスクランパターンでも十分である。実際には、このブレによってデスクランされた画像のカメラの焦点がぼやけるが、開口数が小さい検出路ではこの影響は少ない。オリンパスの対物レンズXLUMPLFLN(20倍/0.95W)における視野も、90度より大きい入射角度でレンズのエッジに入射する光のレンズ内のアパーチャリングによって制限される(視野の中心から外れる)。

20

【0091】

これらのシミュレーションは、デカルト空間からの予測される歪みを示す、SCAPEの全体的な角度スキャンパターンも実証する。ここに示されるすべてのデータは、このパターンに対して修正されておらず、目立つスケールリングはほとんどない。しかしながら、絶対的な寸法測定値が要求される場合、このようなシステムに特有のモデルは、三次元デカルト空間にこの歪んだ測定空間をマッピングするのに容易に用いられ得る。

30

【0092】

4.6.2. システムの解像度

次に、我々は、2つの異なるモデルを利用するためのSCAPEの回折限界解像度について考察した。1つは、光シートによるイメージングの点拡がり関数を計算するためのエンゲルブレットおよびステルザーの方法に従う三次元フーリエ光学分析[46]に基づくものであり、図1(e)に示す点拡がり関数を生成するのに用いた。このモデルは、オリンパスの対物レンズXLUMPLFLN(20倍/0.95W、作動距離(WD)2mm、フロントアパーチャの半径2.3mm)の配置に基づくものであり、瞳孔平面に軸外アパーチャを有することにより、収差のある励起光シート(488nm)、および、図24(a)で定義されるような我々の「半開口」ポリゴン配置 $p_e = a/2$ に対応する検出点(530nm)を生成することができる。このモデルでは、実際に点拡がり関数(PSF)をさらに小さくし得る、SCAPEの検出側における画像回転光学部品の付加的影響は考慮していないことに留意されたい。図24(b)は、このシステムの拡がり関数(PSF)がどのように生成されるかを示す。図24(c)は、半開口($p_e = a/2$)および全開口($p_e = a$)の検出に対する、点拡がり関数を通じたx方向およびz方向の断面を示す。

40

【0093】

第1のフーリエモデルは、SCAPEスキャンの中心点の「理想的な」解像度を示しているが、SCAPEのスキャンパターンの重要な特徴は、その解像度が視野内の位置の関数として変化するという点である。これは、コマ収差などのレンズに基づく収差と、励

50

起シートと有効な「検出円錐」との間の交角とが組み合わさって起きる。大きな視野で高い分解能を有するスキャンビームを生成する必要がある場合、これらの効果を評価すべく、我々は、レンズ収差よりむしろ交角の影響を主に取り入れる回転ガウスビームに基づく単純な点拡がり関数 (PSF) モデルを使用した (なお、検証のために個別の点をフーリエモデルと比較した)。簡潔に言うと、初期直径が p_i であり、かつ、焦点が $z = d$ の励起ビーム (図 25 (a) に示すイメージング面を想定) がモデル化されて角度 θ で回転された。検出 (発光) 側を表す第 2 の二次元ガウスビームもシミュレーションされた。開口数はアパーチャ p_e によって定義され、角度 θ で回転すると、その焦点は、 $z = d$ で励起ビームと交差する。2 つのビームの積が計算されて、交差した点拡がり関数 (PSF) が形成された [47]。このプロセスは、焦点面 $z = d$ の上下の位置 z_n において照明ビームと交差する検出路と、スキャン範囲にわたる θ および z_n の異なる組とに対して繰り返された。点拡がり関数は、視野の両極の 3 つの異なるスキャン位置における 3 つの異なる配置 (全開口の 2.0 倍の対物レンズ、半開口の 2.0 倍の対物レンズ、および、3.0 mm の焦点距離を有する、対物レンズとしての 1 インチレンズ) に対して生成された。このモデルは、これらの事例のそれぞれに対する広視野の関数としての、 x 方向および z 方向における点拡がり関数の半値全幅 (FWHM) を評価するためにも用いられた。

【0094】

図 25 (b) におけるプロットは、開口数 (NA) 0.95 および作動距離 (WD) 2 mm の対物レンズに対する、異なる x スキャン位置および深さ z_n における励起シートと「検出円錐」との間の交角を示す。通常の視野内では、従来の光シートによる望遠鏡法に等しい、「半開口」の設定が 90 度に近い交角を維持する。図 25 (c) ~ (e) に示す点拡がり関数は、励起シートと検出円錐との間の交角の変化によって生じた点拡がり関数に対するスキャン位置の予測可能な影響を実証する (このモデルは、収差または画像回転アームにおける点拡がり関数の追加のリマッピングを説明するものではないことに留意されたい)。図 25 (f) ~ (h) のマップには、視野にわたる x および y 方向の解像度の推定パターンが示されている。実際には、我々は、例えば、オリンパスの対物レンズ X L U M P L F L N (2.0 倍 / 0.95 W) 内の入射光をクリッピングすることにより、このモデルの範囲より小さい視野を用いており、 $b > 0$ mm である x 方向の位置では信号をほとんど検出しない。しかしながら、視野の拡大は、特殊なレンズ設計により可能である。対物レンズとしての 3.0 mm のレンズのシミュレーションは、視野の特定の領域が非常に大きな視野 (cm オーダー) で驚くべき良好な解像度を達成し得ることを同様に実証した。キイロショウジョウバエの成虫全体としての鮮明なサンプルを撮像すべく、SCAPE はこの顕微鏡イメージング構成に用いられている。

【0095】

「全開口」と「半開口」とによる検出を比較する場合、開口数が大きい我々のフーリエモデルによって予測されたように、対物レンズに関しては、システムの解像度における重要因子は、励起シートと検出路との間の角度よりも、検出側の開口数である。我々の第 1 世代の設計におけるポリゴンスキャン素子では、入射光と検出光との間の角度を最大にすべく、検出路の開口数を意図的に制限することを選択した。しかしながら、2 つの交差するビーム経路間の角度 (θ) を最大化することと、スループット、横方向分解能、および、軸方向分解能を向上させるべく検出光の開口数を最大化すること、との間には明らかなトレードオフがある。我々のシミュレーションは、検出光の開口数を最大化することは、システムの分解能および被写界深度に最も有意な効果を与えており、システムのスループットを著しく向上させるであろうことを示している。我々は、このモデル化から、検出側の開口数を増大させることは非常に有益であるという結論に達した。このモデル化によって導かれる、SCAPE 用の他の可能性のあるシステム構成が図 26 に示されている。この事例では、全角度の放射光がダイクロイックビームスプリッタを用いて分離され、第 2 のガルバノメトリックミラーを用いてデスキャンされた。この構成により、ポリゴンミラーの回転を伴わずかな平行移動によるデスキャンの不正確さも改善した (図 23)。ミラーは、(100 Hz を下回る) 体積獲得速度でスキャンするので、ミラーの同期

10

20

30

40

50

が問題になる可能性は低い。光のラインから光シートを生成するために第3のスクヤナを取り入れてもよく、これは2光子SCAPEにも好適である。

【0096】

補足情報S2

第4.6章のシミュレーションでは、SCAPEの分解能の本質的な限界を定義する一方で、ある範囲のファントム測定を実行して我々のSCAPEシステムの現在のプロトタイプイメージング性能を実証した。本願明細書に示す生体内イメージングの例のほとんどでは、イメージング速度を最大にするには、(カメラの行数に対応するので、測定される最大深度にも対応する)撮像深度の数が選ばれる。これは、カメラでピニングする行数は、カメラの読み出し速度に直接影響するからである(第4.8章を参照のこと)。以下のファントム測定は、非散乱対散乱サンプルにおける我々の現在のシステムのプロトタイプの視野を実証するだけでなく、我々の現在の分解能が我々の予測する「最高条件の」モデルにどれだけ近いかを決定する。

10

【0097】

ファントムは、標準的な緑の蛍光ビーズを用いて生成された。ビーズの直径は4ミクロン(ライフテクノロジーズ社製、F-8859)、または、200nm(ライフテクノロジーズ社製、F-8811)である。ビーズを1%の低温アガロース(05073、フルカ社製)に凝集させないように懸濁した。20%のイントラリピッド(I141、シグマ社製)を用いて200nmのビーズファントムの2つをさらに散乱させ、波長488nmにおいて約 1mm^{-1} および 2mm^{-1} の減少した散乱係数 μ_s' を得た([48、49]に基づく溶液1:36および1:18)。これらの値は、ラットおよびマウスの脳における報告された散乱係数の範囲を網羅するために選ばれた[48、50]。

20

【0098】

調製された寒天液を顕微鏡スライドに接着した内径5mmのリザーバに満たし、すぐにガラスのカバースリップで覆うことにより、小さい円盤に成形した。

ガラスのカバースリップ、および、アガロース(寒天)ファントム(脂質を含むもの)を用いることにより、我々の覚醒マウスの実験における頭蓋窓の配置および屈折率に関して、適正な近似を得ることができる。

【0099】

SCAPEシステムでは、画像回転面でオリンパスの対物レンズLCP1anFL(20倍/0.40NA)を用いることにより(いくつかの研究で用いられているオリンパスの対物レンズUP1anFLN(10倍/0.30)ではなく)、カメラにおける画像の倍率を最大化した(視野は狭くなるが、システムの点拡がり関数のサンプリングを最高にした)。DV-2画像スプリッタは省略し、ファントムからのすべての光を500nmのロングパスフィルタで捕獲した。ファントムは、手書きで示したデータより多いスキャン寸法(x')ステップで撮像され、システムの点拡がり関数の詳細が再び得られた。画像は、システムの点拡がり関数の深度および散乱への依存性を調べるためだけでなく、システムの三次元視野を調べるために取得された。

30

【0100】

4.7.1. 視野

図27は、我々の現在のシステムの視野を実証するために取得したSCAPEの測定値を示す。図27(a)は、ナノ散乱アガロースにおける4ミクロンの蛍光ビーズで収集されたデータを示す。それぞれの寸法に対して最大強度投影の画像を示している。データは、挿入画に定義されているような完全なデカルト空間ではないSCAPEの x' 、 y' 、 z' 空間に示されている。すべての寸法は、第4.5章で説明した校正測定を介してミクロンに変換された。600ミクロンに対応するスキャン(x')範囲が用いられ、均一に満たされた。横(y')寸法の視野は、カメラセンサの幅に対応するが、照明光シートの横幅と、検出光学部品による戻り光のアーチャリングとによって検出信号が制限される。したがって、この構成で使用可能な視野は、約1mmである。深さ(z')軸がカメラの多数の行によって取得されることにより、可能な浸入深さが明確に示される。

40

50

イメージングの深さは、検出ビーム経路における光のアーチャリングだけでなく、励起光および放射光の減衰および散乱によっても制限される。この構成では、約550ミクロンの有効範囲が明確に示される。

【0101】

他の重要な効果は、 $z' - x'$ 方向の投影において見られる。さらに図29を参照すると、我々のモデリング結果と一致して、光シートの厚みによって、光シートの焦点面の上下でイメージングの点拡がり関数が斜めに広がっている(図29の $x' - z'$ 平面)。低散乱のサンプルでは、最適解像度が z' 方向の視野の中心に来るようにサンプルの表面の下に焦点面を配置することにより、最大浸入深さが実現し得る。なお、最適焦点距離は、点拡がり関数の斜めの広がりが表面およびより深い断面で見られるよう、サンプルの表面下約200~400ミクロンにある。我々は、図23の実際のレンズのモデリングで予測されたデスクァンの不完全性および像面湾曲のからの影響は最小限であることをこれらの画像が示していることに注目している。

10

【0102】

図27(b)は、異なるレベルでアガロースに散乱した200nmのビーズファントムから収集されたデータを示している。散乱により、より深い層へノから移動する検出光が損失するばかりでなく、光シートの広がりに起因する、深度にともなうさらなる信号減衰が生じる。減少した約 1mm^{-1} の散乱係数に対して有効な浸入深さは、およそ約250ミクロンであることがわかっており、 μ_s' が約 2mm^{-1} では、浸入深さは、150~200ミクロンに低下する。表面下約250ミクロンに光シートの焦点面を配置することによって非散乱ファントムにおけるデータが得られる一方で、散乱ファントムのデータは、サンプルの表面により近い焦点面によって得られる。これによって浸入深さを幾分犠牲にするが、有効な視野内での信号および解像度を最大にする。ここに示される画像は、波長488nmのレーザー光源を用いて得られたことに注目されたい。488nmでの組織の散乱レベルは、非常に高く、標準的な共焦点顕微鏡では、生きた組織での使用に限界がある。組織における散乱は、波長が長いほど指数関数的に低くなるので($\mu_s' = \text{ほぼ } A \cdot b$)、散乱した組織へのきわめて高い浸入深さを実現するには長めの励起波長(例えば>600nmまたは近赤外線)でSCAPEを実施することが期待されるだろう。位置合わせ、開口数、およびスループットの最適化により、より深い位置での信号対雑音比も向上し、適切なスケージングにより有効範囲も拡大する。

20

30

【0103】

4.7.2. 生体内の脳組織における浸入深さの定量化

SCAPEの浸入深さおよび分解能に対する生体内の脳の光学特性の影響をさらに実証するために、我々は、生きたマウスに蛍光共役デキストランを静脈注射した後、SCAPEおよび2光子顕微鏡を用いて比較のためのイメージングを行った。静脈内をラベリングすることにより、皮質の、均一濃度の染料で満たされている直径5~10ミクロンオーダーの深いところにある毛管までの構造が得られる(上記のイメージングされた蛍光ビーズに対しても同じターゲットを提供する)。動物の準備に関しては第4.4章、イメージングのパラメータおよび位置合わせに関しては第4.5章を参照されたい。

【0104】

図2(e)は、SCAPEおよび2光子顕微鏡により、4段階の異なる深度で取得した $x - y$ 平面の対照比較を示している。図28は、深さの関数としての2つのデータセットをさらに比較したものであり、2光子データとSCAPEデータにおいてそれぞれ略同一な $x - y$ および $y - z$ 平面での最大強度投影を示している。最大強度投影を向上させるべく、この事例のみ、SCAPEデータ(図2(e)に示す)から拡散背景を取り除くためにハイパスフィルタ(MATLAB(登録商標)「アンシャープ」)が適用された。どちらの技術に対しても、各深度の平面が各々の平均に正規化された。2光子データでは、複数の段階の深度をカバーすることが要求されるレーザーパワーを4段階で上げるようにし、SCAPEでは、深さによって信号を漸次減衰するようにした。

40

【0105】

50

この比較により、SCAPEは、2光子顕微鏡法と同様な性能によって、生体内での略等方性解像度を提供し、表皮層のループ状毛管を示し得ることが実証された。より深い深度(>200ミクロン)では、より大きい下行小動脈および上行小静脈が解像され、SCAPEは、実際のところ、2光子顕微鏡法よりもこれらの軸方向に配向した構造に対してより強いコントラストを提供する。これは、1つには、SCAPEによる角度を付けた照明により、表面の血管の真下にある血管からの信号の減衰を防ぐことができるからである(図2(e)の2光子画像でも見られる)。波長488nmの励起を用いることにより、より大きい下行の血管における信号が、生体内のおよそ300ミクロンの深さまで解像できる。6倍を上回る出力および340Hzのフレームレートでは、ほぼ同一のコントラストおよび信号対雑音比が観察され、34の角度ステップによって毎秒10体積が得られた。浸入深さを著しく向上すべく、波長がより長く、潜在的に2光子を実装しているSCAPEが期待される。

10

【0106】

4.7.3. 解像度および散乱効果

図29は、我々のシステムの分解能のより詳細な分析を示す。非散乱の200nmのビーズファントムで得られたデータ(図29-1)と、 μ_s' が約 1mm^{-1} の散乱ビーズファントムで得られたデータ(図29-2)とを分析した。システムの点拡がり関数は、(シミュレーションで我々が予測したように)空間的に異なるので、平均化するのではなく、図に示すように各ファントムにおける異なる深さでのビーズの範囲で、生の、単一のビーズの点拡がり関数を示している。

20

各点拡がり関数による断面を半値全幅(FWHM)と共に右側に示す。これまでのように、我々の校正手順に基づいて寸法をミクロンに変換するが、データは、 $x'-y'-z'$ 空間に固有のサンプル解像度で示されている。

【0107】

興味深いいくつかの特徴が観察された。まず、 $x'-y'$ および $y'-z'$ 平面の点拡がり関数はおおむね円形であり、我々の最適化されていない光路におけるコマ収差などによるいくらかの歪みが見られる。 $x'-z'$ 平面での投影は、我々のシミュレーションで予測したように細長い斜めの形状をしており、これは、光シートの厚み、および、我々のプロトタイプが比較的小さい開口数で検出することによる。予測したように、この点拡がり関数形状の深さの関数としての変化は、光シートがその焦点面に対して狭くなっていくことに対応する。このシミュレーションは、検出における開口数が大きいほど歪みが改善することを予測している。

30

【0108】

すべての寸法における相対的な解像度は、位置合わせによって異なり得ることに注目されたい。これらの測定に際し、我々は、視野を最大化すべく、コマ収差を抑止するためのアパーチャは用いず、その結果、向上した $x'-z'$ 平面の解像度が下がる代わりに y' 寸法が広がった。画像回転光学部品の位置合わせも深さに依存する収差および信号損失の原因となり、図23におけるモデリングで予測したような像面湾曲のせいで我々の現在のシステムは決して完璧とは言えない。

【0109】

散乱したサンプルにおけるデータは、予測したように、深さが増すほど信号が減少することを示す。しかしながら、散乱がシステムの分解能に顕著な影響を与えているようには見えないことが興味深い。我々は、このことは、両ファントムの最も深いビーズの点拡がり関数に基づくものであり、光シートの収差、像面湾曲、および、検出用光学部品の不完全性が原因であり得る歪みを呈する、と結論付けた。この最深点拡がり関数は、非散乱ファントムではなく散乱ファントムの浅いところからサンプルが採られるが、この位置は、上記のような散乱サンプルにおける光シートの焦点面のより浅い位置と一致する。この収差が起きる深さは、光の散乱が結果として生じ得ないように、本質的に2つのサンプル間で一致する。この長さのスケールでは、散乱の主な影響は、ぼけを発生させるというよりは、検出可能な信号が減少することであり、波長がより長く、2光子を導入したSCAPE

40

50

Eは、散乱したサンプルでの侵入深さの点で著しい利益をもたらすことを再び示している。

【0110】

どちらのサンプルでも、我々のシステムの広視野における解像度は、マウスに関してはほとんどの場合2~3ミクロンであることがわかった(y'方向の収差によって解像度は4~7ミクロンになる)。我々は、この解像度は、カスタムメイドの光学部品、位置合わせの最適化、および、より大きい開口数での検出によって劇的に向上することを期待している。しかしながら、生体内イメージングの体積測定フレームレートおよび視野を最適化すべく、本願明細書に示すサンプル密度のデータは、用いられているサンプル密度より低いことに注目されたい。例えば、図3に示されるデータは、x'-y'-z'空間における240x200x40のボクセルを用いて、それぞれのボクセルがx'-y'-z'空間における2.5x3.25x3.6ミクロンに対応するよう、600x650x134ミクロンの視野をサンプリングすることにより、選択されたボクセルのサイズを我々の現在のシステムの光学系の点拡がり関数と同様にしている。

【0111】

4.8. 補足情報S3

本実施例で用いられているSCAPEにおいて移動する構成要素は、低速スキャンミラーだけなので、システムのイメージング速度は、主にカメラのフレームレート(および、最終的には信号対雑音比)によって制限される。所定の撮像における1秒あたりの体積速度(VPS)は、体積における所望のx'方向の角度ステップの数によって除されるカメラのフレームレートである。

本願明細書に示されたデータに用いられる様々なパラメータを以下に示す。

【表1】

図	カメラy'-z' FOV (ピクセル)	#角度ステップ(x')	カメラfps	VP S	ピクセルレート(MHz)
2	1400x80 (2色、幅500)	100	1000	10	40
3	400x40 (2x2ビニング)	240	2404	10	38.5
4	800x80 (1x1ビニング)	120	2404	20	153.9
5	700x100 (2色、幅300、 2x2ビニング)	100	1000	10	70
6	660x100 (2色、幅240、 2x2ビニング)	80	800	10	52.8

【0112】

体積測定イメージングの速度は、各体積への角度ステップ(x')をより少なく選択することにより上昇し得るが、それによって、対応する角度範囲によっては、サンプル密度が低下するか、または、x'軸に沿った視野が狭まることになるだろう。行数を減らすためにビニングすることにより、カメラのフレームレートを80行あたり2404fpsまでと著しく向上させることができる(=我々が現在使用している安価なAndor Zyla sCMOSカメラの深度)。

重要なのは、本願明細書で実証された速度を上回るカメラが市販されているということである。例えば、NAC Memrecam HX-3は、75,000fpsで384x288のフレームをサンプリングすることができ、適切な信号対雑音比を仮定すると、横サ

ンプリングのステップが200である視野において毎秒375体積を撮像可能である。

【0113】

最終的に、SCAPEの特定の実施形態の速度限界は、非常に速いフレームレートを得るために要求される非常に短い積分時間において実現可能な信号対雑音比によって制御されることになる。したがって、雑音レベル、サンプルにおけるフルオロフォアの効率性、有効なレーザパワー、および、満足な画質を得るのに十分な照明強度に耐え得るサンプルの能力と、カメラの感度との間で性能のトレードオフが生じることになる。したがって、この限界は、サンプルに依存し、かつ、選択されるシステムの用途によって決定されるだろう。このような、サンプルに依存する体積測定スキャンレートの本質的な限界は、すべての光学イメージングシステムに当てはまる。とはいうものの、SCAPEは、共焦点広視野蛍光イメージングと比べて光損傷を最小限にするはずであるという点で、すべての光シートのイメージングアプローチと特徴を共有している。

10

【0114】

我々のSCAPEシステムのプロトタイプは、 $7 \times 7 \mu\text{m}$ の小さいピクセルを有する比較的安価なsCMOSカメラを用いる例において、ポリゴンスキャナによる検出時のアパーチャリングによりスループットが減少したことを実証している。それでもなお、我々は、生きたサンプルをイメージングした際には、光退色または光毒性が最小限になる証拠を見た。したがって、我々は、ピクセルサイズがより大きい冷却カメラ、および、より高いレーザパワーを用い、ますます明るく安定してきている生体内フルオロフォアを取り入れてスループットを向上させることにより、一般的な生体サンプルにおいて毎秒50体積を上回る実用的なSCAPEの体積測定スキャンレートを直ちに可能にするだろう。

20

【0115】

5. 参考文献

記載された多数の文献は、そのすべての内容が参照により本願明細書に組み込まれる。

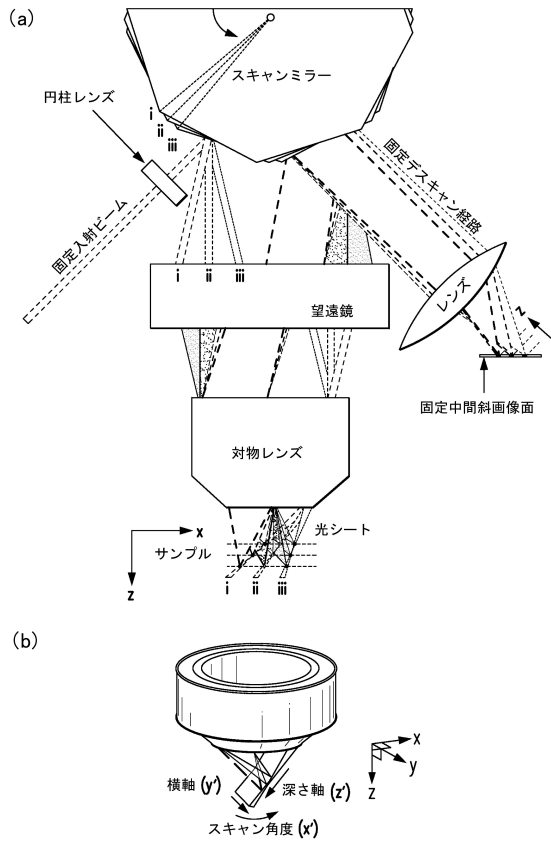
30

40

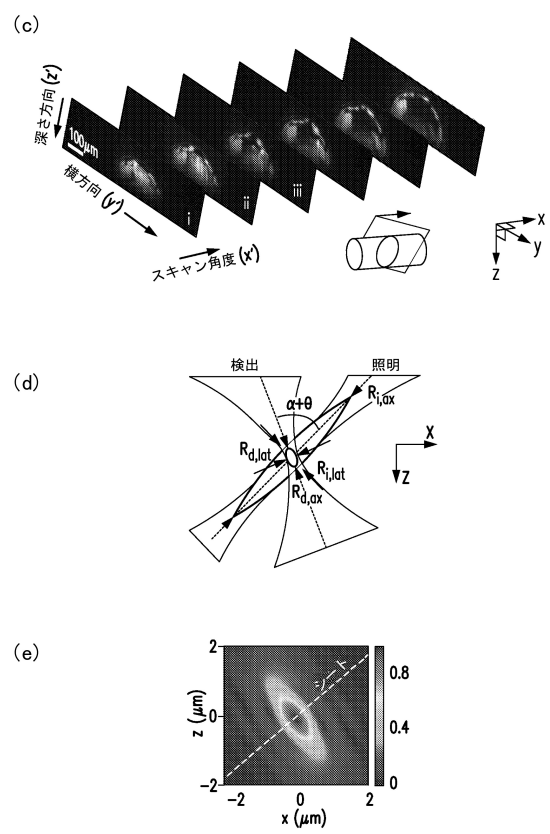
50

【図面】

【図 1 - 1】



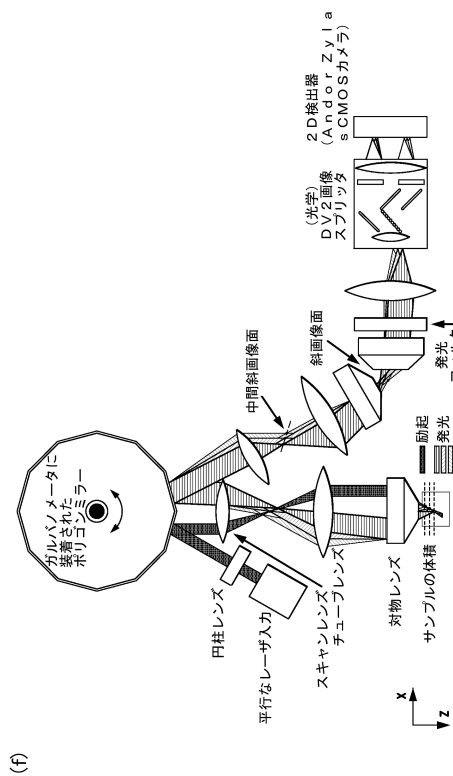
【図 1 - 2】



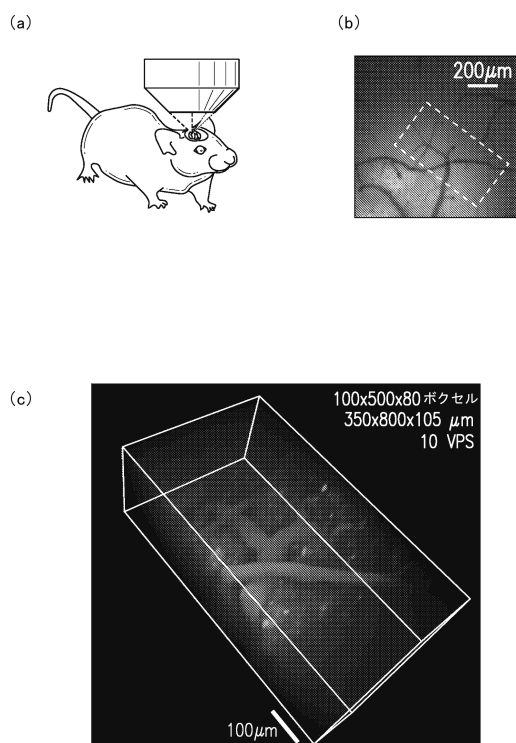
10

20

【図 1 - 3】



【図 2 - 1】

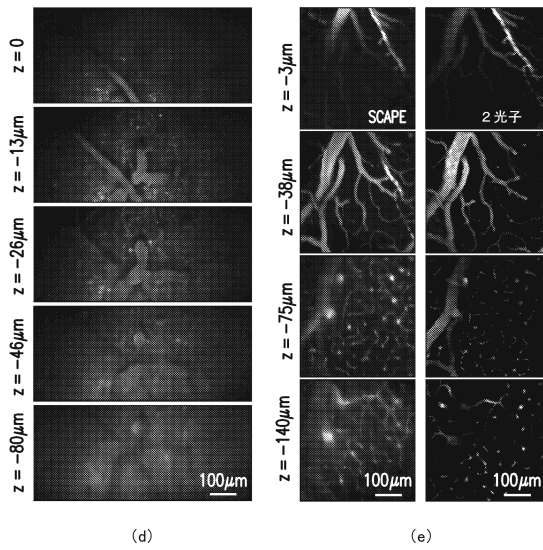


30

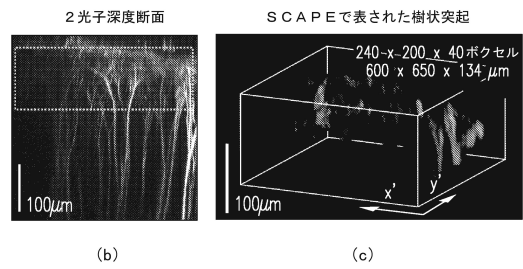
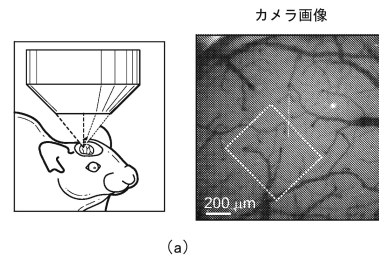
40

50

【 図 2 - 2 】



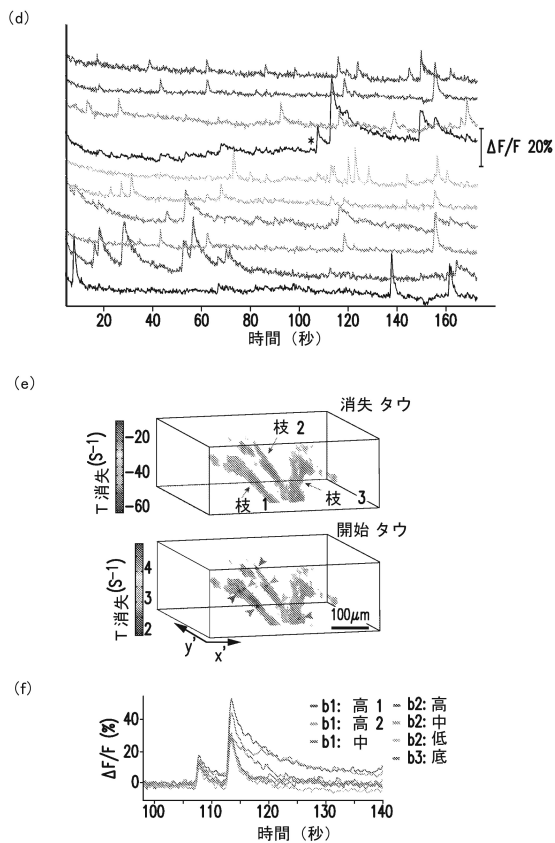
【 図 3 - 1 】



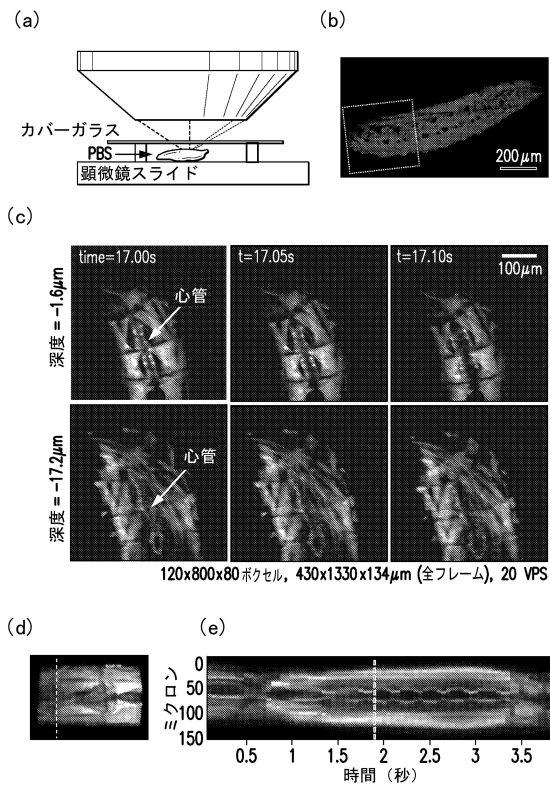
10

20

【 図 3 - 2 】



【 図 4 】

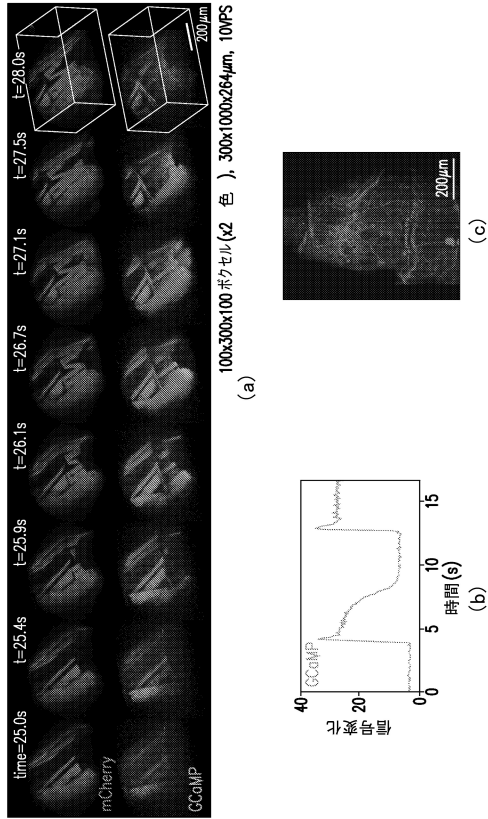


30

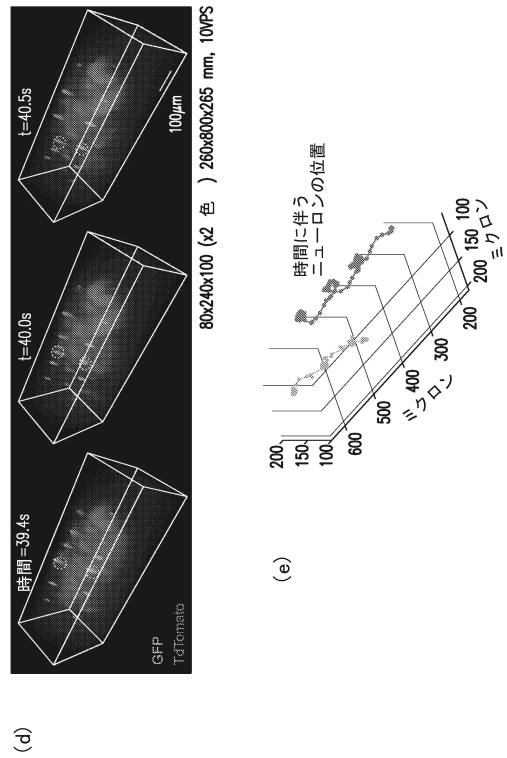
40

50

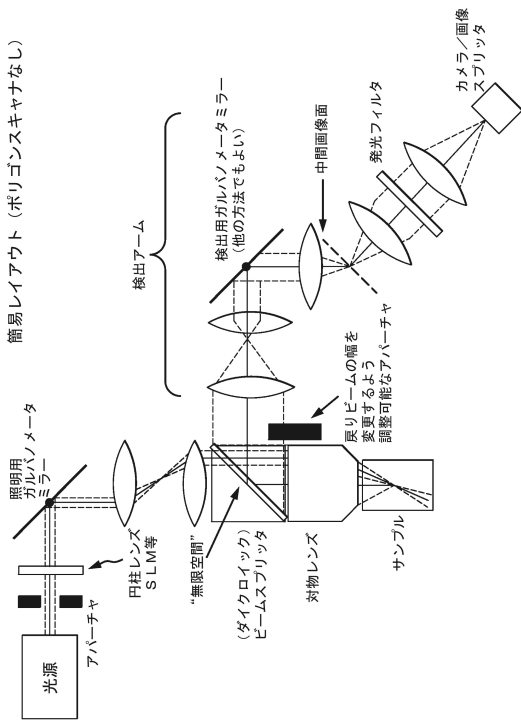
【 図 5 - 1 】



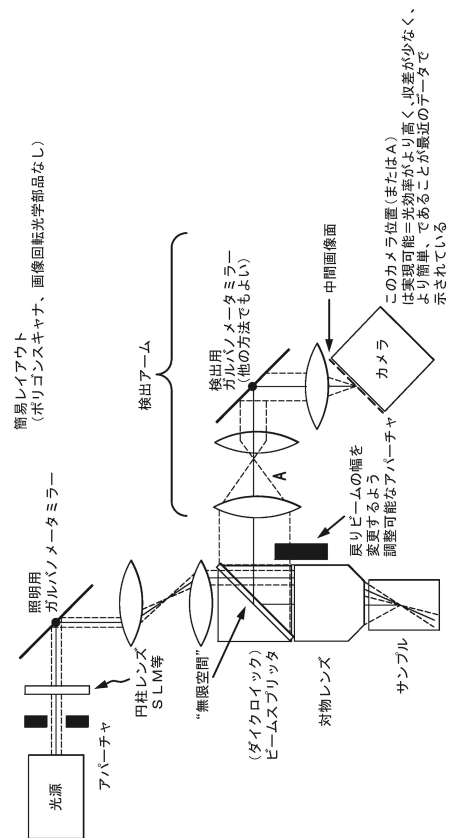
【 図 5 - 2 】



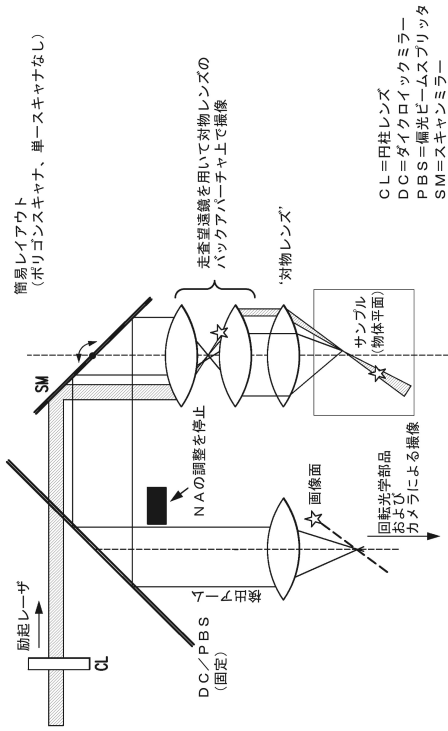
【 図 6 】



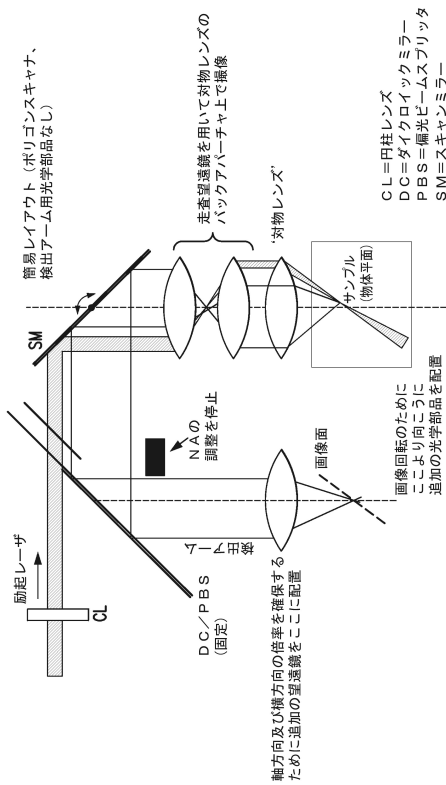
【 図 7 】



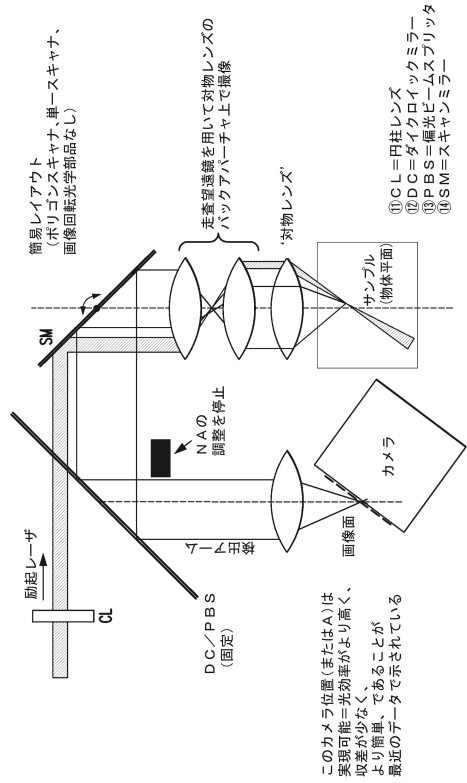
【図 8】



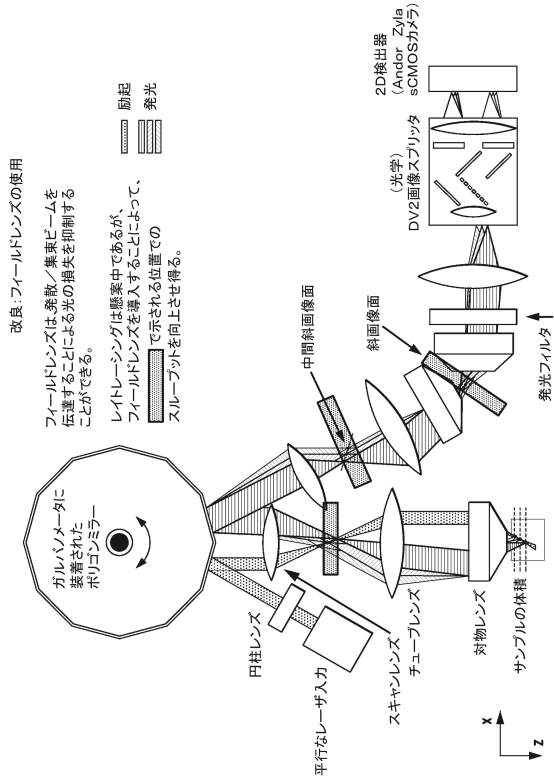
【図 10】



【図 9】



【図 11】



10

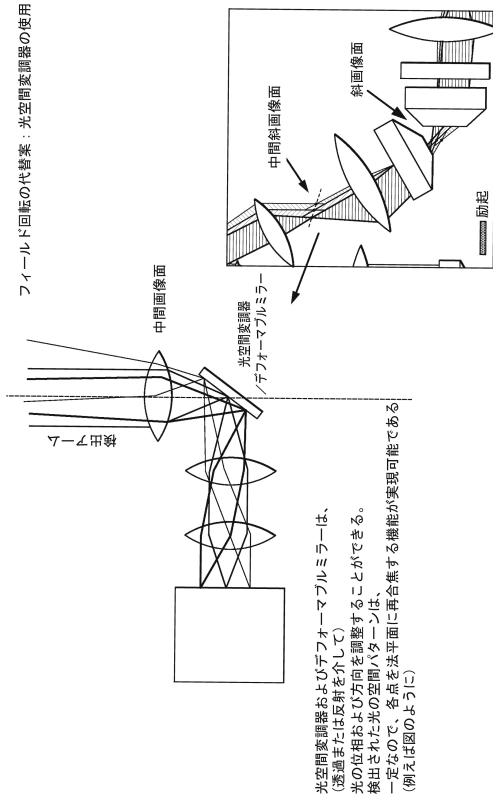
20

30

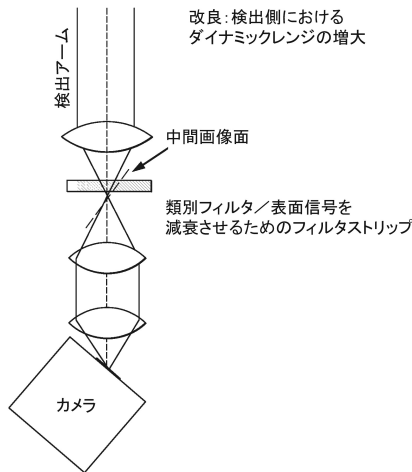
40

50

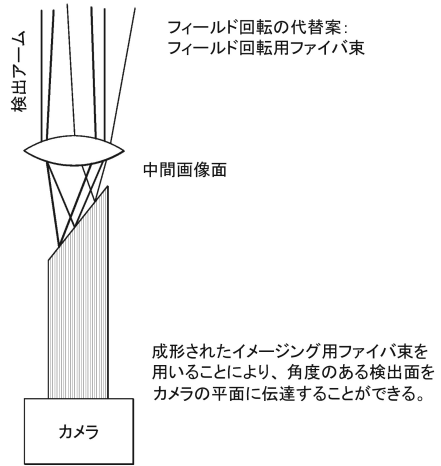
【図 1 2】



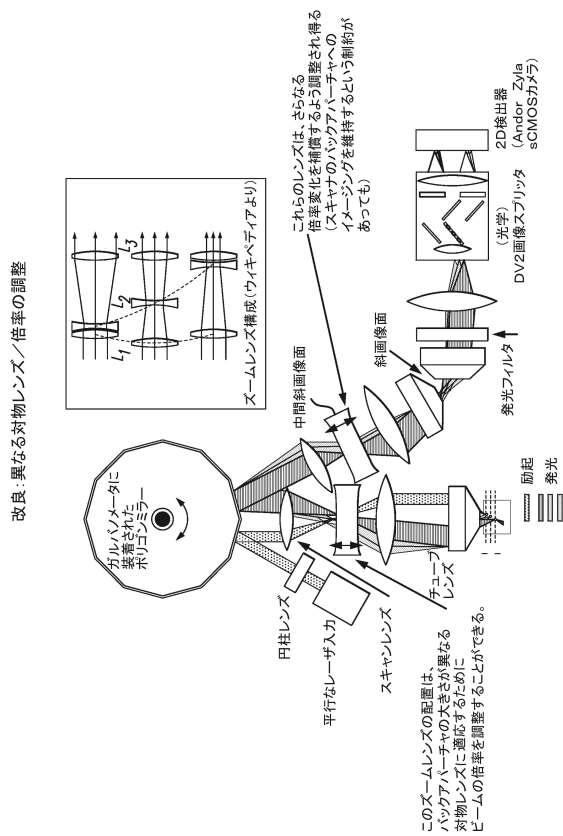
【図 1 4】



【図 1 3】



【図 1 5】



10

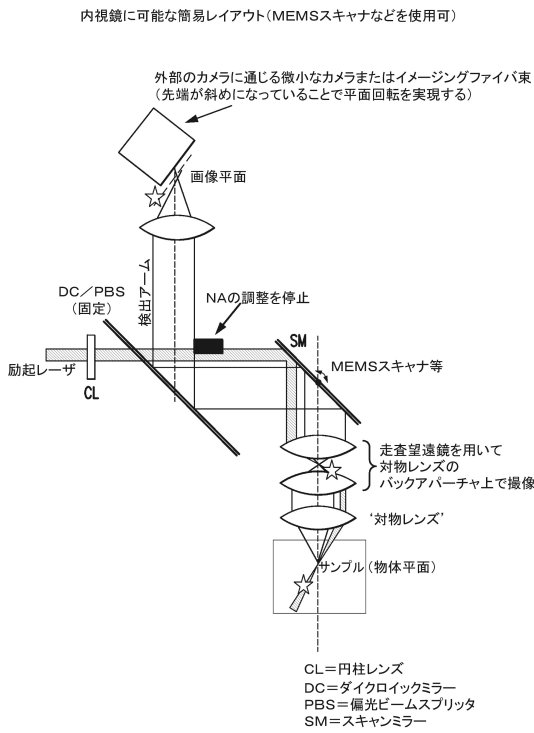
20

30

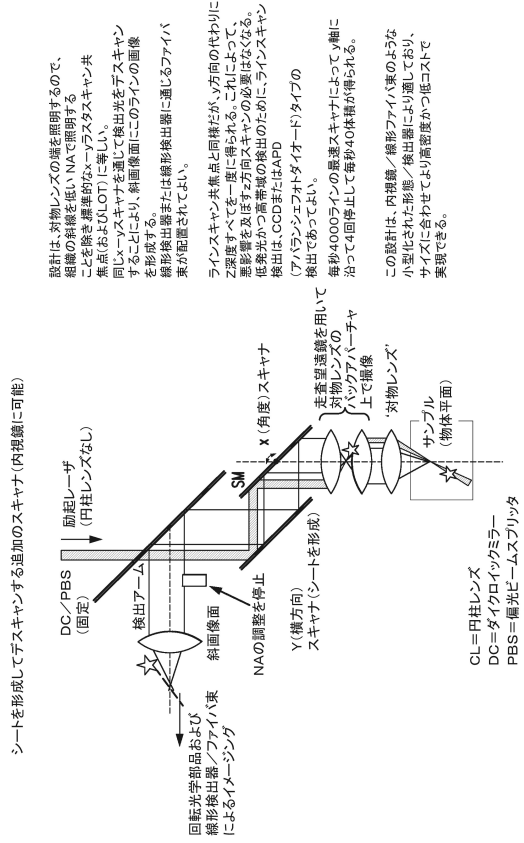
40

50

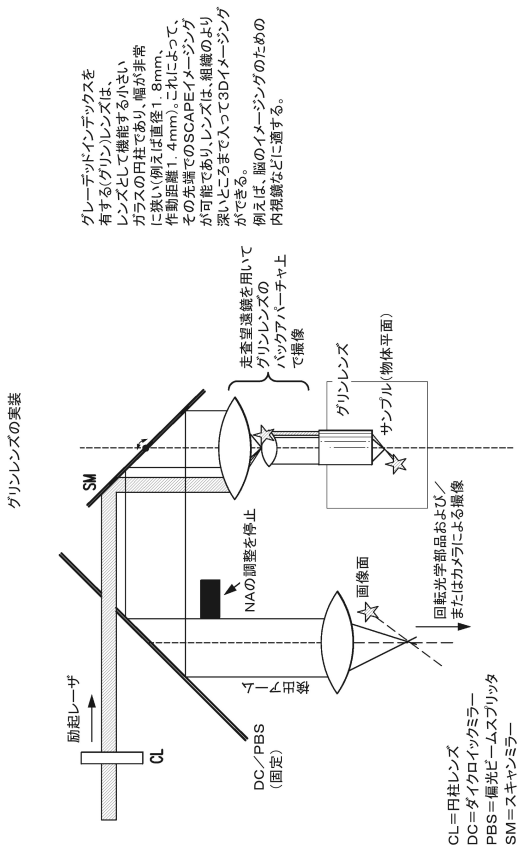
【図 16】



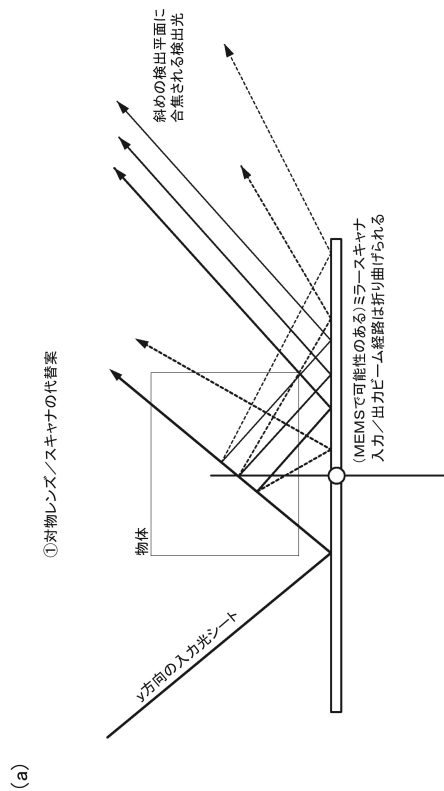
【図 17】



【図 18】



【図 19 - 1】



10

20

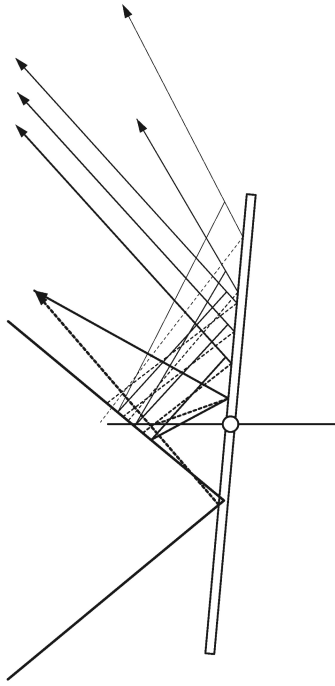
30

40

50

【図 19 - 2】

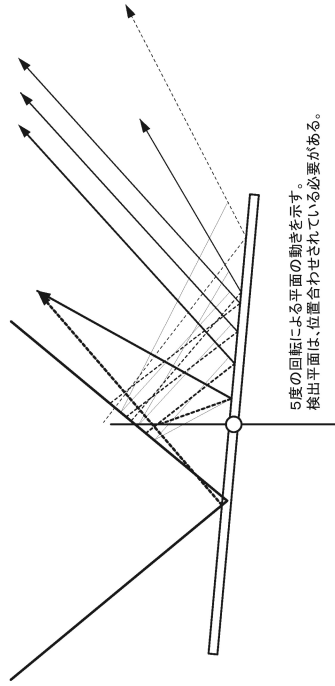
対物レンズ/スキヤナの代替案



(b)

【図 19 - 3】

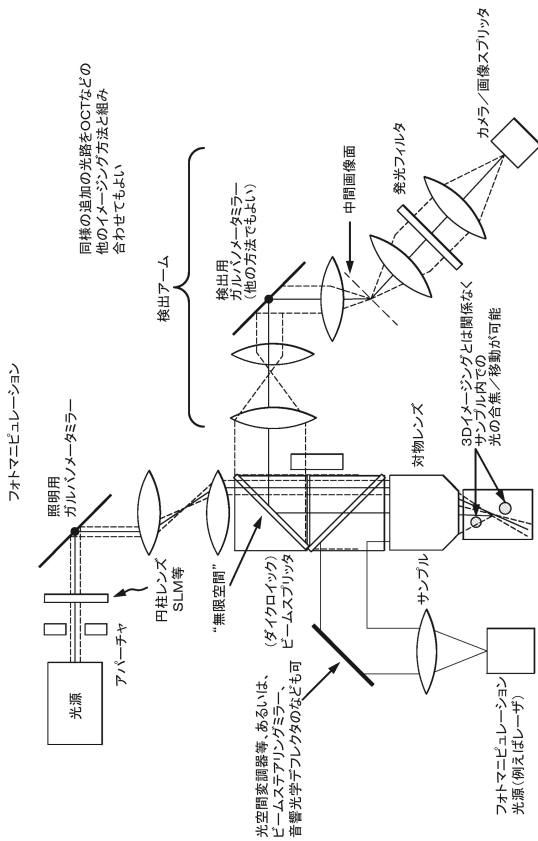
対物レンズ/スキヤナの代替案



5度の回転による平面の動きを示す。
検出平面は、位置合わせされている必要がある。

(c)

【図 20】



同様の追加の光路をOCTなどの他のイメージング方法と組み合わせてもよい

検出アーム

検出用ガルバノメータミラー (他の方法でもよい)

中間像面
発光フィルタ
カメラ/画像スプリッタ

3Dイメージングとは関係なく、サンプル内での光の合焦/移動が可能

フォトマニピュレーション

照明用ガルバノメータミラー

対物レンズ

カメラ/画像スプリッタ

検出アーム

発光フィルタ

中間像面

検出用ガルバノメータミラー

他の方法でもよい

同様の追加の光路をOCTなどの他のイメージング方法と組み合わせてもよい

3Dイメージングとは関係なく、サンプル内での光の合焦/移動が可能

検出アーム

発光フィルタ

中間像面

検出用ガルバノメータミラー

他の方法でもよい

同様の追加の光路をOCTなどの他のイメージング方法と組み合わせてもよい

3Dイメージングとは関係なく、サンプル内での光の合焦/移動が可能

検出アーム

発光フィルタ

中間像面

検出用ガルバノメータミラー

他の方法でもよい

同様の追加の光路をOCTなどの他のイメージング方法と組み合わせてもよい

3Dイメージングとは関係なく、サンプル内での光の合焦/移動が可能

検出アーム

発光フィルタ

中間像面

検出用ガルバノメータミラー

他の方法でもよい

同様の追加の光路をOCTなどの他のイメージング方法と組み合わせてもよい

3Dイメージングとは関係なく、サンプル内での光の合焦/移動が可能

検出アーム

発光フィルタ

中間像面

検出用ガルバノメータミラー

他の方法でもよい

同様の追加の光路をOCTなどの他のイメージング方法と組み合わせてもよい

3Dイメージングとは関係なく、サンプル内での光の合焦/移動が可能

検出アーム

発光フィルタ

中間像面

検出用ガルバノメータミラー

他の方法でもよい

同様の追加の光路をOCTなどの他のイメージング方法と組み合わせてもよい

3Dイメージングとは関係なく、サンプル内での光の合焦/移動が可能

検出アーム

発光フィルタ

中間像面

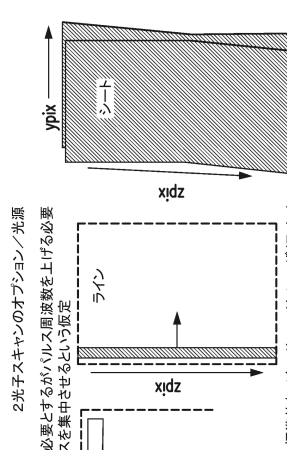
検出用ガルバノメータミラー

他の方法でもよい

同様の追加の光路をOCTなどの他のイメージング方法と組み合わせてもよい

3Dイメージングとは関係なく、サンプル内での光の合焦/移動が可能

【図 21 - 1】



2光子スキヤンのオブジョン/光源
シートの広がりにはよりパワーを必要とするがパルス周波数を上げる必要はないので、再生増幅器はパルスを集中させるという仮定

標準的なナタンサブファイバレーザ (スポット)

- パルス繰り返し数
- パルス幅 (最大/最小) $= P / \text{PulseRate}$
- 1パルスあたりのパワー $= P / \text{PulseRate}$
- 1ピクセルあたりの時間 $= 1 / \text{PulseRate}$
- 1ピクセルあたりのパルス数 $= \text{PulseRate} \times \text{pix}$
- 1ピクセルあたりの光子 $= 1 \times \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{PowerPerPix}$
- 1ピクセルあたりの光子 $= 1 \times \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{PowerPerPix}^2$

標準的なナタンサブファイバレーザ (ライン)

- パルス繰り返し数
- パルス幅 (最大/最小) $= P / \text{PulseRate}$
- 1パルスあたりのパワー $= P / \text{PulseRate}$
- 1ピクセルあたりの時間 $= 1 / \text{PulseRate}$
- 1ピクセルあたりのパルス数 $= \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix}$
- 1ピクセルあたりの光子 $= 1 \times \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix} \times \text{PowerPerPix}$
- 1ピクセルあたりの光子 $= 1 \times \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix} \times \text{PowerPerPix}^2$

再生増幅器 (シート)

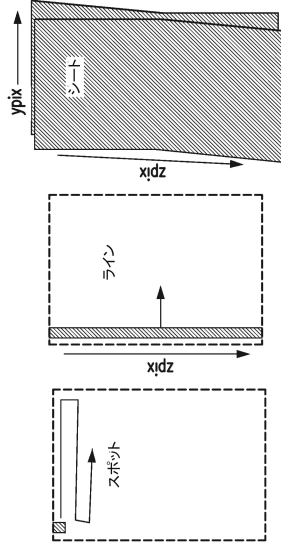
- パルス繰り返し数 $= \text{PulseRate} \times \text{pix}$
- 1パルスあたりのパワー $= P / \text{PulseRate}$
- 1ピクセルあたりの時間 $= 1 / \text{PulseRate}$
- 1ピクセルあたりのパルス数 $= \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix}$
- 1ピクセルあたりの光子 $= 1 \times \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix} \times \text{PowerPerPix}$
- 1ピクセルあたりの光子 $= 1 \times \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix} \times \text{PowerPerPix}^2$

再生増幅器 (ライン)

- パルス繰り返し数 $= \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix}$
- 1パルスあたりのパワー $= P / \text{PulseRate}$
- 1ピクセルあたりの時間 $= 1 / \text{PulseRate}$
- 1ピクセルあたりのパルス数 $= \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix}$
- 1ピクセルあたりの光子 $= 1 \times \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix} \times \text{PowerPerPix}$
- 1ピクセルあたりの光子 $= 1 \times \text{PulseRate} \times \text{pix} \times \text{zpix} \times \text{PowerPerPix}^2$

【 図 2 1 - 2 】

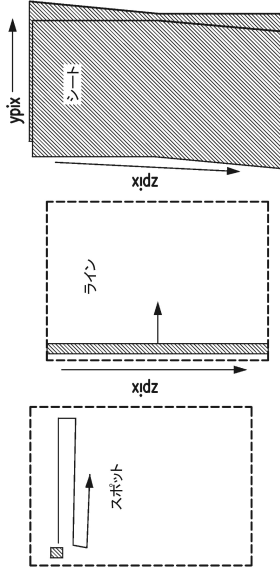
シートの広がりにはよりパワーを必要とするがハリス周波数を上げる必要はないので、再生増幅器はハリスを集中させるという仮定



ピクセルレートが80MHzを超えるとスポットをスキャンすることは不可能である(標準的なレーザーのハリス繰り返し数の場合)。体積速度が速い場合に起きる。測定により多くのハリスが集められる場合に、ライン構成にはこのレーザーを用いることができる。しかしながら、 $(zpix \cdot P) / zpix$ に広がることにより1ピクセルあたりのパワーが低下することは、蛍光発光がレーザーパワーの二乗に比例するので測定毎のハリス (numPulse * zpix) が多くなるにもかかわらず、全体的に検出される光子が少なくなることを意味する。この場合は、zpix因子によるものである。ライン構成は、スリットとして機能し、より優れた共焦点を提供するためにカメラのローリングシャッタと組み合わせられて用いられる。

【 図 2 1 - 3 】

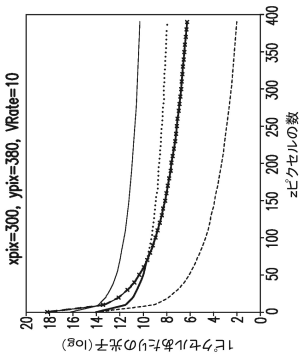
シートの広がりにはよりパワーを必要とするがハリス周波数を上げる必要はないので、再生増幅器はハリスを集中させるという仮定



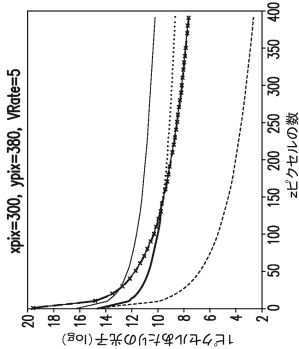
ラインおよびシートスキャンは、ハリス結合のために再生増幅器が用いられた場合に等価であることがモデルによって確認された(1ライン/シートあたり1ハリスと仮定)。再生増幅器は、ハリス繰り返し数80MHzの標準的なラインスキャンモードより非常に優れているが、信号は、標準的な2光子低速スポットスキャンより少なくなる。毎秒5、10、20体積の体積速度については次のページのモデルのプロットを参照されたい。

【 図 2 2 - 1 】

—— スポット、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 スポット、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準) (ダッシュ < 1ピクセルあたり1ハリス)
 - - - - - ライン、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 - - - - - ライン、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 - - - - - 領域A: シート、ハリス繰り返し数 = 1140000
 - - - - - 領域A: シート、ハリス繰り返し数 = 3000
 - - - - - スポット、ハリス繰り返し数 80MHz (VR = 1.0) 固定

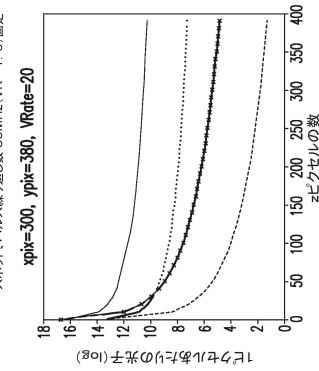


—— スポット、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 スポット、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準) (ダッシュ < 1ピクセルあたり1ハリス)
 - - - - - ライン、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 - - - - - ライン、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 - - - - - 領域A: シート、ハリス繰り返し数 = 5700000
 - - - - - 領域A: シート、ハリス繰り返し数 = 1500
 - - - - - スポット、ハリス繰り返し数 80MHz (VR = 1.0) 固定

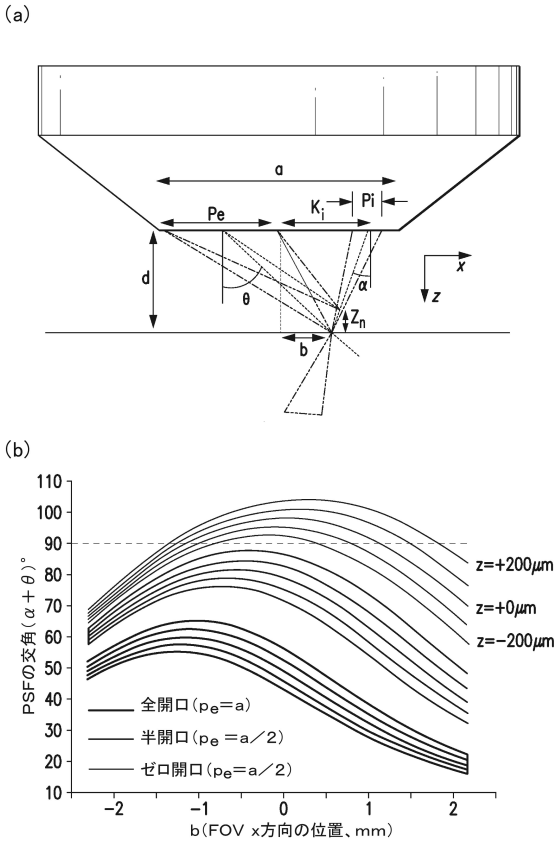


【 図 2 2 - 2 】

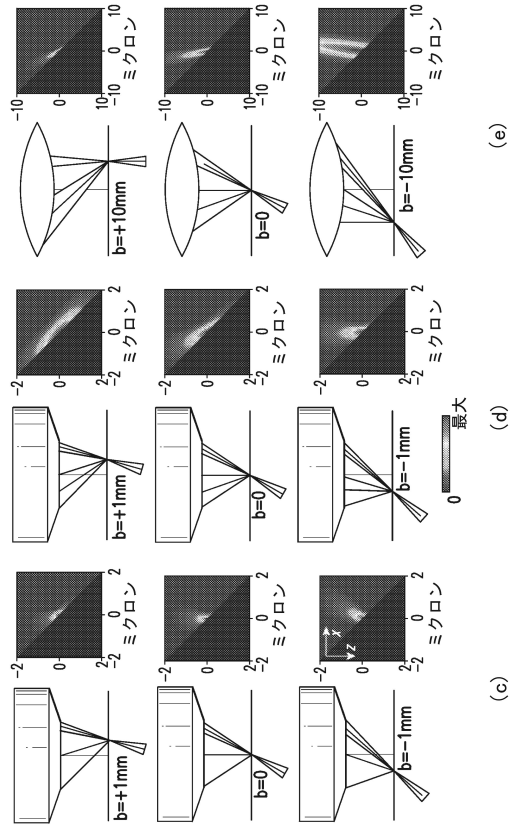
—— スポット、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 スポット、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準) (ダッシュ < 1ピクセルあたり1ハリス)
 - - - - - ライン、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 - - - - - ライン、ハリス繰り返し数 (80MHz 標準)
 - - - - - 領域A: シート、ハリス繰り返し数 = 2280000
 - - - - - 領域A: シート、ハリス繰り返し数 = 6000
 - - - - - スポット、ハリス繰り返し数 80MHz (VR = 1.0) 固定



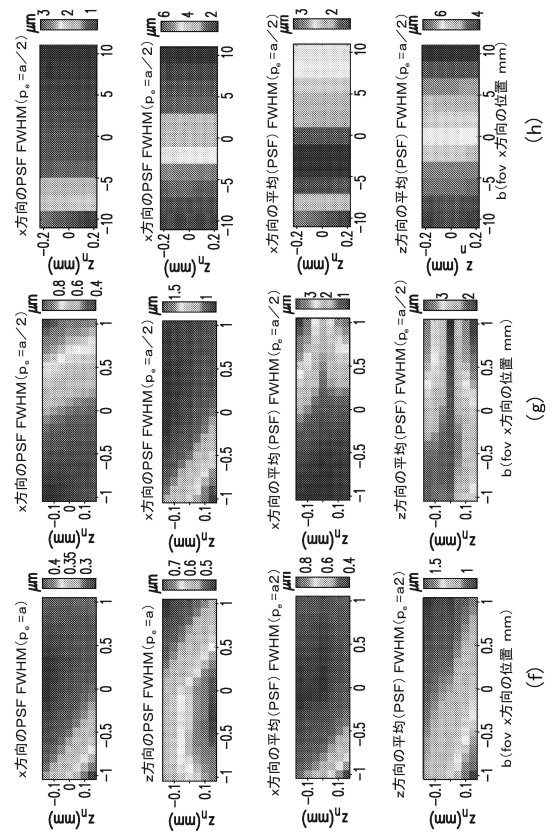
【図 2 5 - 1】



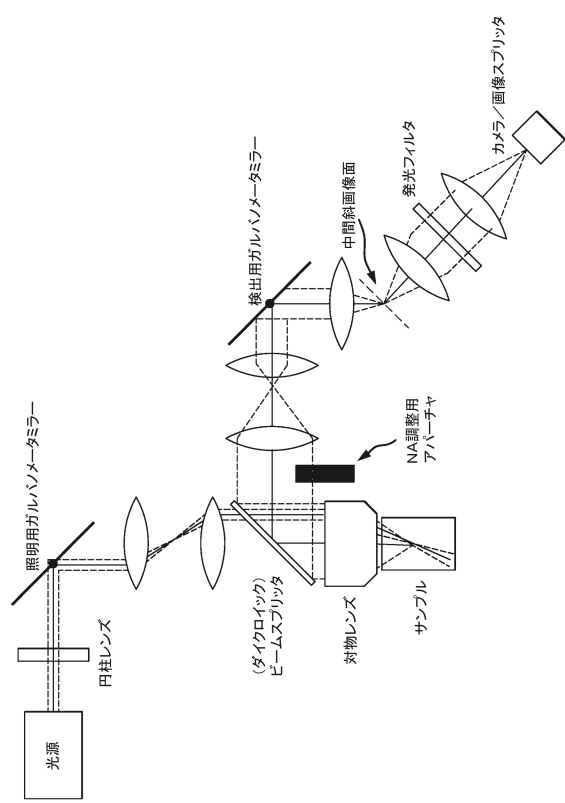
【図 2 5 - 2】



【図 2 5 - 3】



【図 2 6】



10

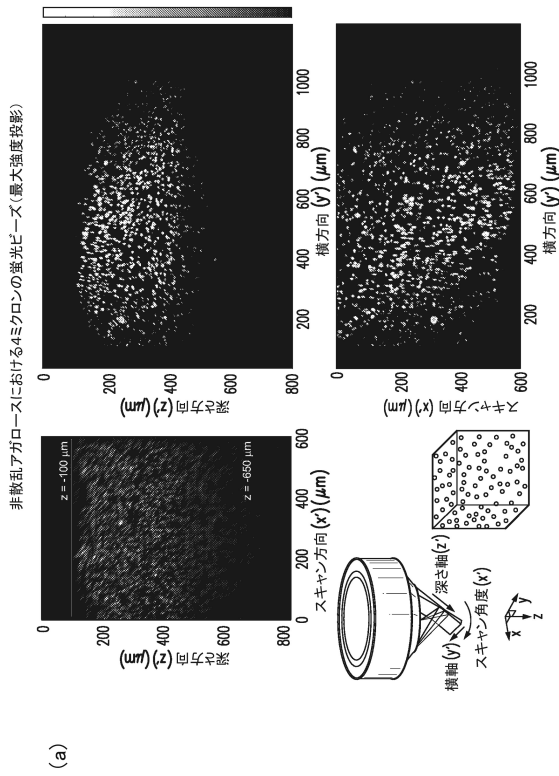
20

30

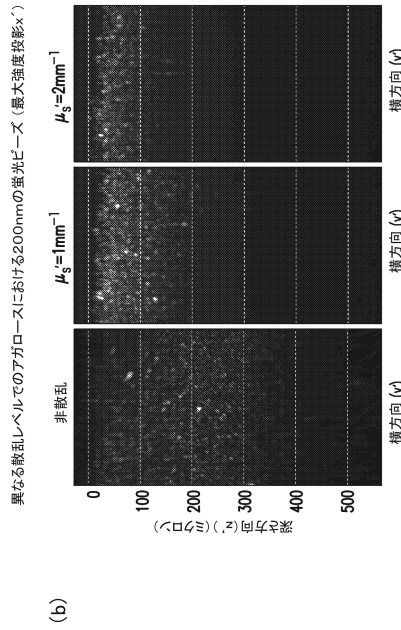
40

50

【図 27 - 1】



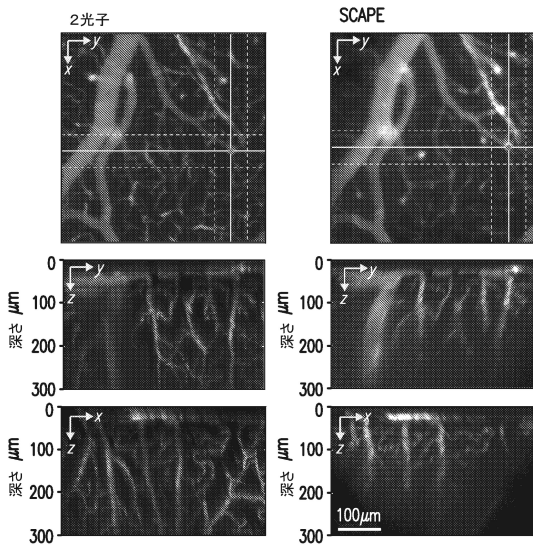
【図 27 - 2】



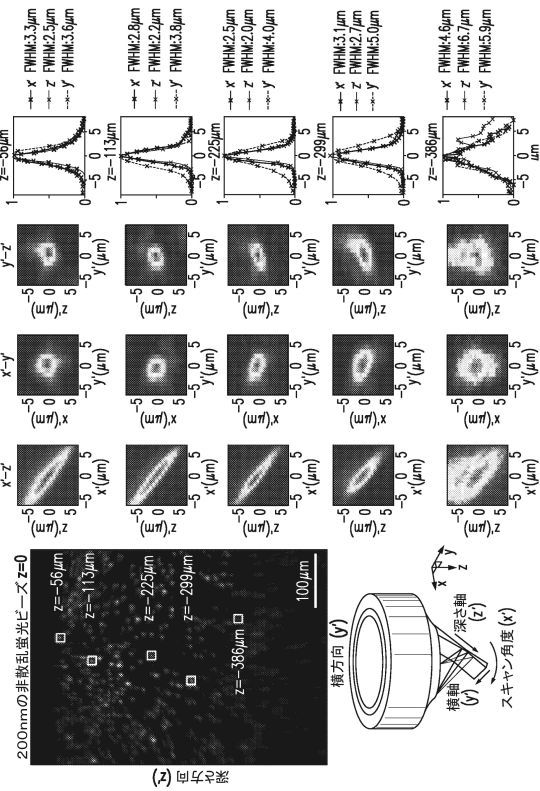
10

20

【図 28】



【図 29 - 1】

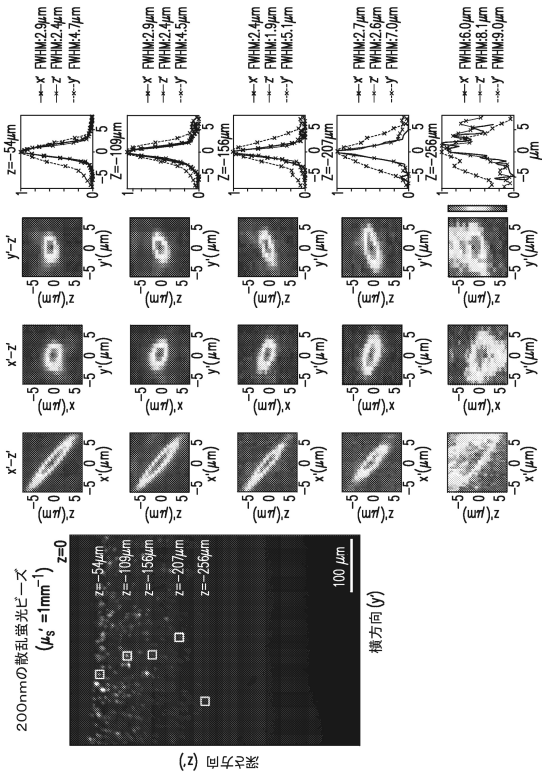


30

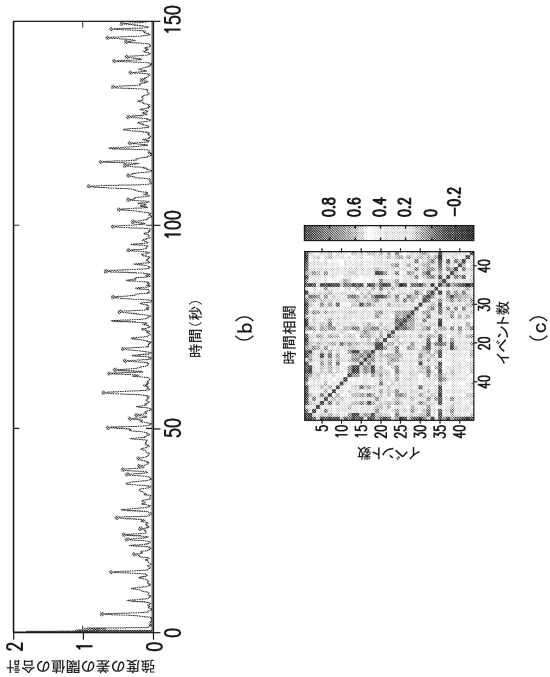
40

50

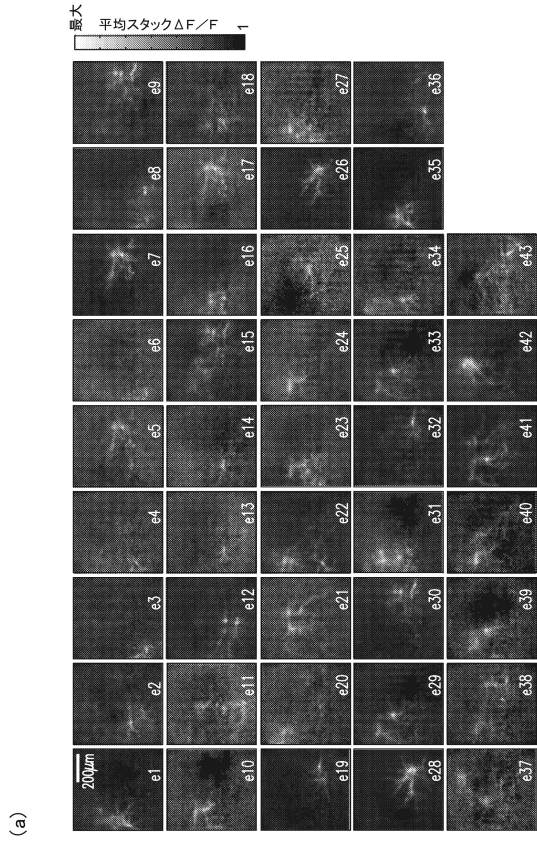
【図 29 - 2】



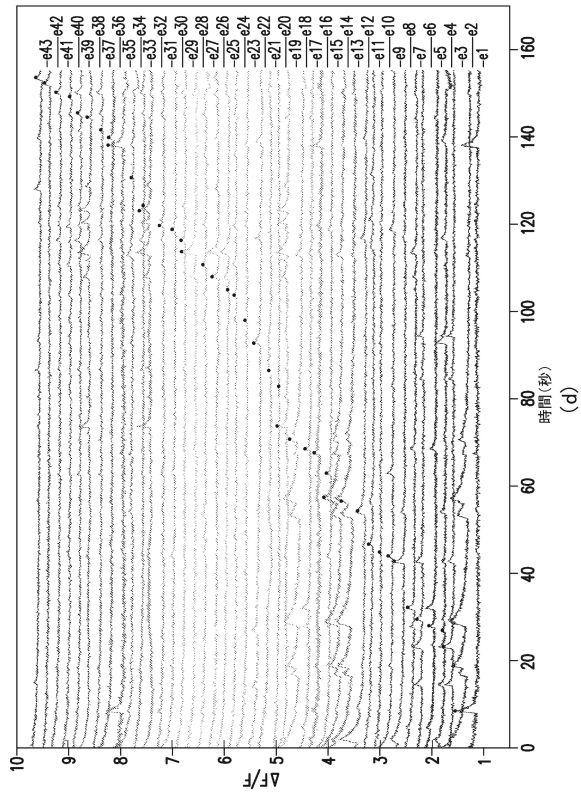
【図 30 - 2】



【図 30 - 1】



【図 30 - 3】



10

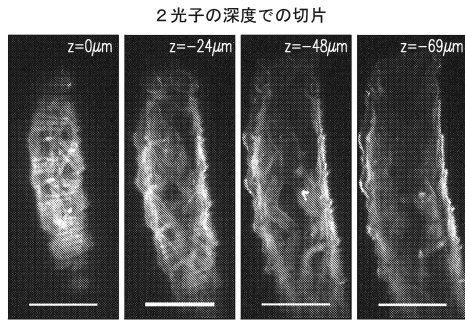
20

30

40

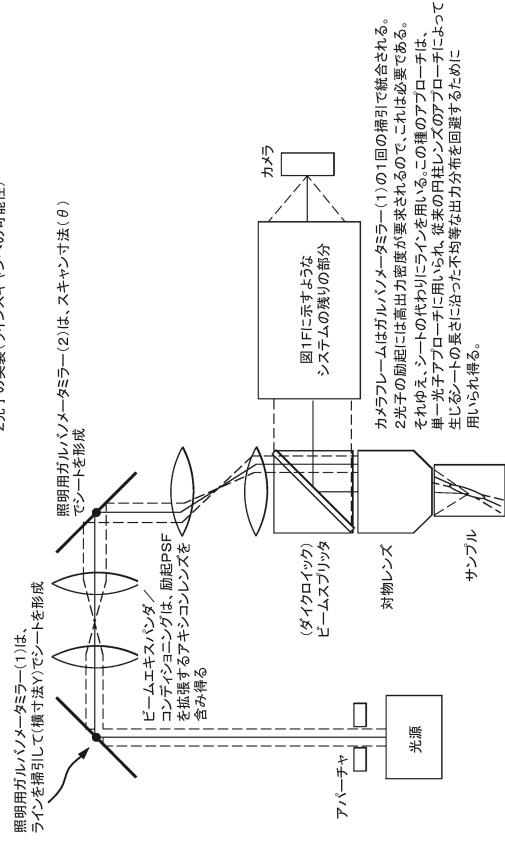
50

【 図 3 1 】



【 図 3 2 】

2光子の実装(ラインスキヤンへの可能性)

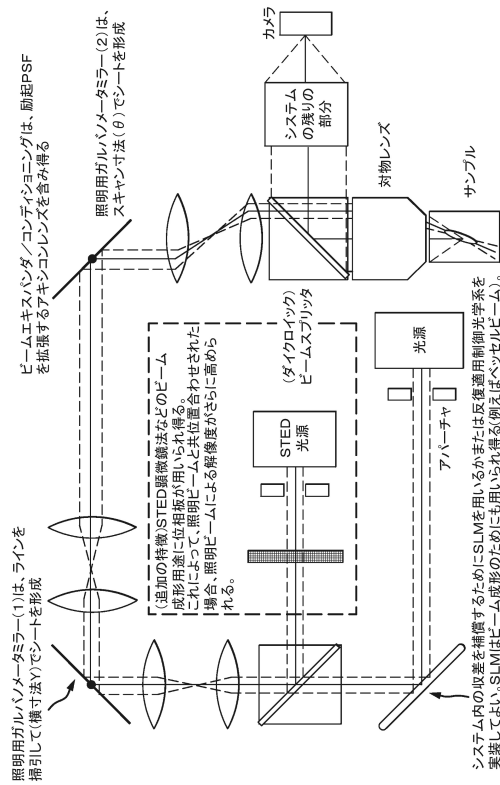


10

20

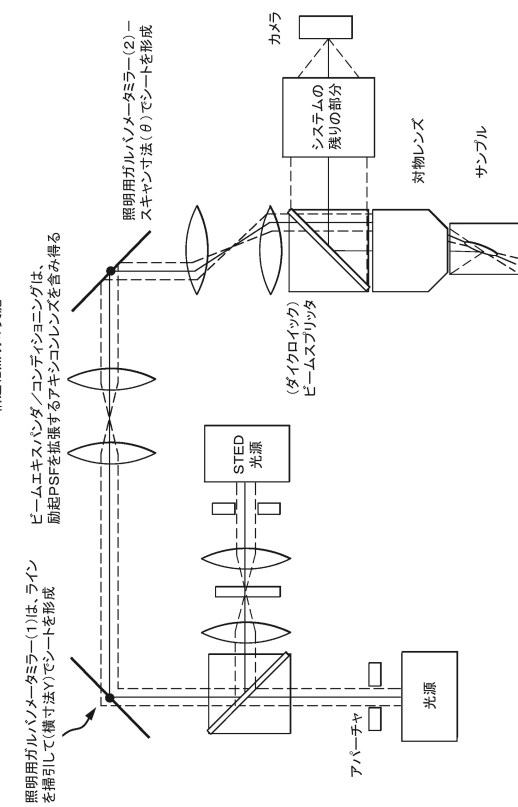
【 図 3 3 】

適応制御光学系またはSTEDの実装



【 図 3 4 】

構造化照明の実施

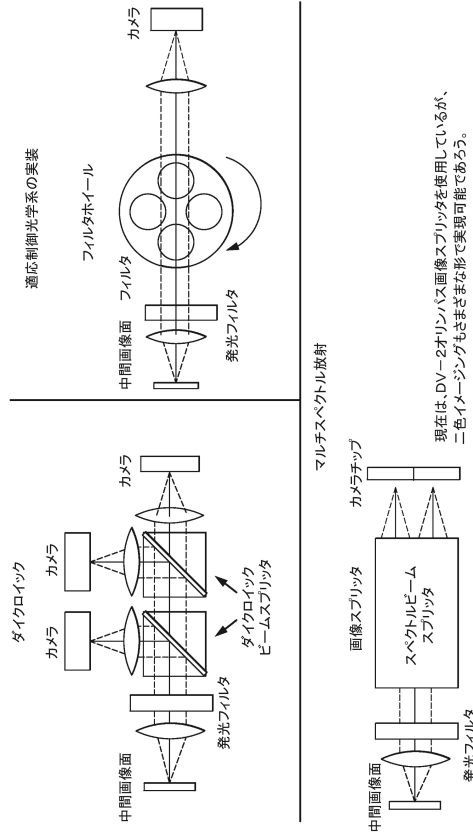


30

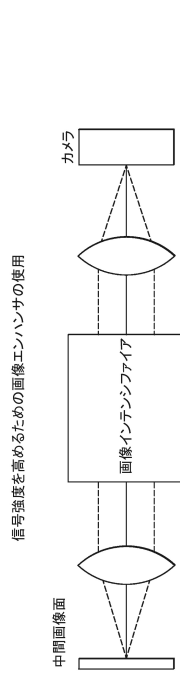
40

50

【図 3 5】

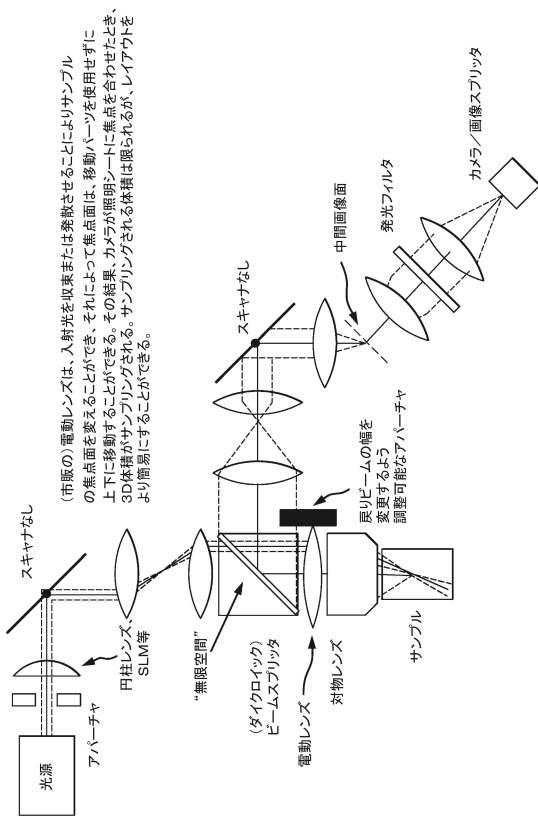


【図 3 6】

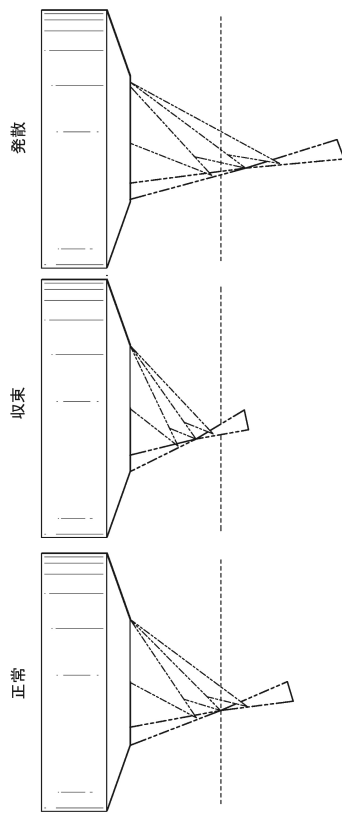


画像インテンシファイアは、解像度に関してコストを増大させる可能性があるが、抽出された蛍光の強度を向上させる可能性を有する。システムの既存の解像度によっては、このトレードオフによってコストが大幅に異なるという可能性がある。

【図 3 7】



【図 3 8】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 62/088,921

(32)優先日 平成26年12月8日(2014.12.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/928,930

(32)優先日 平成26年1月17日(2014.1.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/950,608

(32)優先日 平成26年3月10日(2014.3.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/955,482

(32)優先日 平成26年3月19日(2014.3.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 10025, ニューヨーク, ウエスト 112番 ストリート
521

(72)発明者 ブシャー ル マシュー ビー

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 10032, ニューヨーク, ウエスト 164番 ストリート
559, アパート 6F

合議体

審判長 加々美 一恵

審判官 野村 伸雄

審判官 瀬川 勝久

(56)参考文献 特開2005-189290(JP, A)

国際公開第2014/009080(WO, A1)

特表2005-536312(JP, A)

米国特許出願公開第2012/0140240(US, A1)

米国特許出願公開第2009/0231689(US, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G02B 21/36

G02B 21/06

G01N 21/17