

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-108491
(P2012-108491A)

(43) 公開日 平成24年6月7日(2012.6.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO2B 21/00 (2006.01)	GO2B 21/00	2GO43
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 21/64	2HO52
	E	

審査請求 未請求 請求項の数 23 O L 外国語出願 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2011-231660 (P2011-231660)	(71) 出願人	500178876
(22) 出願日	平成23年10月21日 (2011.10.21)		ライカ マイクロシステムス ツェーエム
(31) 優先権主張番号	10 2010 060 121.7		エス ゲーエムペーハー
(32) 優先日	平成22年10月22日 (2010.10.22)		ドイツ連邦共和国 デー・35578 ヴ
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ェツラー エルンスト・ライツ・シュトラ
			ーセ 17-37
		(74) 代理人	100091867
			弁理士 藤田 アキラ
		(74) 代理人	100154612
			弁理士 今井 秀樹
		(72) 発明者	ヴェルナー クネーベル
			ドイツ連邦共和国 76709 クローン
			アウ ヘーベルシュトラーセ 17/1

最終頁に続く

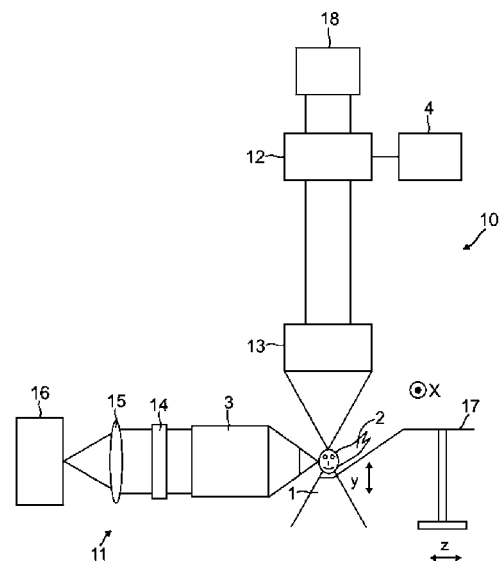
(54) 【発明の名称】 連続的な光シートを用いるSPIM顕微鏡

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】連続的な光シートを用いるSPIM顕微鏡を提供する。

【解決手段】y方向の照明光源4とz方向検出光カメラ16とを有するSPIM顕微鏡(選択的面結像顕微鏡)が開示される。xスキャナ12は、x方向に照明光線を走査することによって、連続的な光シート1を生成する。照明光線の光線経路内に設置されたズーム光学系13を有する照明光学系によって、照明光線の焦点距離を変化させることができる。

【選択図】図3



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

y 方向から画像化対象の物体 (2) へ照明光線 (5、41) を送る光源 (4) と、前記 y 方向に対して略垂直に延び第一の検出方向としての z 方向に、蛍光および / または反射光として前記物体 (2) から発せられる光を検出するカメラ (16) と、を備えて構成される S P I M 顕微鏡において、

前記 y 方向と前記 z 方向に対して略垂直に延びる x 方向に前記照明光線 (5、41) を走査することによって連続的な光シートを生成する x スキャナ (12) であって、前記光シート (1) が前記 x 方向と前記 y 方向によって画定される平面内で連続的に形成される、x スキャナ (12) と、

前記照明光線 (5、41) の光線経路内に設置されたズーム光学系を備え、このズーム光学系が前記照明光線 (5、41) の焦点距離を変更するように構成されている照明光学系と、

を特徴とする S P I M 顕微鏡。

【請求項 2】

前記物体 (2) から送られ蛍光および / または反射光である検出光を、第二の検出方向として前記 y 方向と反対方向に検出する光検出器 (19) を特徴とする、請求項 1 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 3】

S P I M 法により生成される二次元広視野画像と平行して、前記 x 方向に延びる直線を含む、前記物体 (2) の共焦点一次元画像も生成されることを特徴とする、請求項 2 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 4】

前記物体 (2) を前記 z 方向に移動させて、相互に z 方向に離間された複数の光シート (1) がそれぞれの照明面にて連続的に生成されるようにする第一の z スキャナであって、前記各光シート (1) と前記カメラ (16) との間の距離 (L) が一定のままである第一の z スキャナを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 5】

相互に距離に置いて前記 z 方向に離間された前記複数の光シート (1) の各々と関連する、前記連続的に生成される画像を合成して三次元画像とする画像処理ユニット (28) を特徴とする、請求項 4 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 6】

前記物体 (2) から送られ蛍光および / または反射光である検出光を第二の検出方向として前記 y 方向と反対方向に検出する光検出器 (19) を有し、S P I M 法により生成される前記三次元画像と平行して、前記 x 方向と前記 z 方向により画定される平面内で、前記物体 (2) の共焦点二次元画像も生成されることを特徴とする、請求項 5 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 7】

前記物体 (2) に関して前記 z 方向に前記照明光線 (5、41) を移動させて、相互に前記 z 方向に離間された複数の光シート (1) を連続的に生成する第二の z スキャナと、

前記光シート (1) と前記カメラ (16) との間の距離が一定のままであるように、前記第二の z スキャナによる z 方向への前記照明光線 (5、41) の偏向に応じて前記検出光線の経路 (11) を追跡する第三の z スキャナと、

を特徴とする、請求項 1 または請求項 2 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 8】

相互に距離に置いて前記 z 方向に離間された前記複数の光シート (1) の各々と関連する、前記連続的に生成される画像を合成して三次元画像とする画像処理ユニット (28) を特徴とする、請求項 7 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 9】

前記物体 (2) から送られ蛍光および / または反射光である検出光を第二の検出方向と

10

20

30

40

50

して前記 y 方向と反対方向に検出する光検出器 (1 9) を有し、 S P I M 法により生成される前記三次元画像と平行して、前記 x 方向と前記 z 方向により画定される平面内で、前記物体 (2) の共焦点二次元画像も生成されることを特徴とする、請求項 8 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 1 0】

前記照明光線 (5、4 1) の焦点距離を変更するように構成された前記ズーム光学系 (1 3) が、相互に機械的に移動されるレンズ集合を有する光学ズームであることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 1 1】

前記ズーム光学系 (1 3) が、開口数を変化させることによって前記照明光線 (5、4 1) の焦点距離を拡張または短縮させ、したがって前記光シート (1) により照明される前記 y 照明方向の視野の長さを拡張または短縮させるように構成されていることを特徴とする、請求項 1 0 に記載の S P I M 顕微鏡。

10

【請求項 1 2】

前記 x 方向の走査長を変更するように構成された電子ズームを特徴とする、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 1 3】

前記 x 方向の画素数は、選択された x 方向の走査長さとは関係なく、前記電子ズームによって一定に保たれることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 1 4】

複数の相互に離間された光シート (1) が連続的に生成される前記 z 方向の走査長を変更できる電子ズームを特徴とする、請求項 4 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の S P I M 顕微鏡。

20

【請求項 1 5】

前記 z 方向に相互に離間された前記光シート (1) の数が、選択された前記 z 方向の走査長さとは関係なく、前記電子ズームによって一定に保たれることを特徴とする、請求項 1 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 1 6】

前記 x 方向に走査される前記照明光線 (5、4 1) は、x 方向への最大走査長さに到達した折り返し地点で、またはその付近でオフにされることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 5

30

【請求項 1 7】

前記カメラ (1 6) は、C M O S カメラ、C C D カメラまたはアレイ検出器からなる群から選択される面検出器であることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 1 8】

前記 y 照明方向と反対の検出光の共焦点検出、前記 z 方向の広視野検出光の S P I M 検出、前記共焦点検出と前記 S P I M 検出の同時検出、の動作モードの間で切り替えるように構成されたスイッチを特徴とする、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の S P I M 顕微鏡。

40

【請求項 1 9】

前記 y 方向から失活光線 (4 0) を前記物体 (2) に送り、前記 z 方向に前記連続的に生成される光シート (1) をより薄くする失活光源であって、前記失活光線 (4 0) は、前記照明光線 (4 1) に関して前記 z 方向にずらされた位置で前記物体 (2) へと送られ、前記 x 方向に走査されるその照明光線と平行に延びる失活光源を特徴とする、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 2 0】

励起光線をベッセルビームに変調するように構成された励起光線変調器を特徴とする、請求項 1 9 に記載の S P I M 顕微鏡。

【請求項 2 1】

50

前記照明光源（４）はパルスレーザであり、
 前記照明光線は多光子レーザ光線であり、
 多光子信号は前記 z 方向に検出されることを特徴とする、請求項１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２２】

前記カメラ（１６）は、前記ＳＰＩＭ信号に加えて、前記多光子信号を検出するように構成された高速カメラであることを特徴とする、請求項２１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２３】

前記 z 方向からの前記多光子信号を抽出し、これを光検出器（４５）に向けることのできる調光ミラー（４３）を特徴とする、請求項２１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、照明光線を y 方向から画像化対象の物体へと送る光源と、物体から発せられる蛍光および／または反射光として発せられる光を、第一の検出方向として z 方向に検出するカメラと、を備え、 z 方向は y 方向に対して略垂直に延びるＳＰＩＭ顕微鏡に関する。

【背景技術】

【０００２】

特に、生体試料の分析は、素早く、かつ試料を損傷せずに行うべきである。多くの用途において、三次元画像を生成することが有益である。特に照明光が蛍光を励起するための励起光の役割を果たす蛍光顕微鏡の分野においては、照明光と試料との相互作用による散乱アーチファクトと吸収アーチファクトを回避するべきである。

20

【０００３】

顕微鏡用試料を、高速で、損傷を与えずに、高い解像度で分析するためには、いわゆるＳＰＩＭ（選択的平面照明顕微鏡若しくは選択的面結像顕微鏡）法が特に適しており、この技術においては、照明光が光シートを生成し、その一方で、蛍光と反射によって生成される検出光が、カメラによって、照明方向と比較して垂直な方向に検出される。

【０００４】

光シートは、略長方形の断面を有する照明対象域（illumination volume）であり、この断面は、第一の断面方向（ここでは z 方向）には非常に薄く、第二の断面方向（ここでは x 方向）には、第一の断面方向と比較して有意に大きい。照明方向（ここでは y 方向）は、第一の断面方向（ここでは z 方向）に対して略垂直かつ、第二の断面方向（ここでは x 方向）に対して略垂直に延びる。光シートは、円柱レンズによって合焦され、光シートの焦点または焦点距離は、照明方向（ここでは y 方向）に延びる特定の範囲と理解するものとし、この範囲で光シートは特に薄く、それによって、照明される対象域がシートの形状を有し、すなわち z 方向に非常に薄く、 x 方向と y 方向にははるかに大きい。

30

【０００５】

円柱レンズを用いる先行技術のＳＰＩＭ法による光シートの生成には、システムの柔軟性が非常に低いという欠点があり、たとえば焦点が固定され、したがって照明される対象域も予め決定される。高解像度とするためには、非常に薄くて長い焦点が有利である。この焦点を走査して、試料についての一方向の三次元画像を得ることができる。長さが長くなると幅も広くなるため、 z 方向の解像度が低下する。これは、照明光学系の開口数が低く、長い焦点とすると、照明対象域の厚さも大きくなることを意味する。これは、検出方向への光学軸に沿った光学解像度が同様に低いことを意味する。

40

【０００６】

励起光と試料の相互作用によって、散乱アーチファクトと吸収アーチファクトが発生し、これらは画像の中で照明軸に沿った筋または陰影として目に見え、これはまた「カーテン効果」とも呼ばれる。

50

【0007】

カーテン効果を低減させるための先行技術による1つの方法はm S P I M法であり、これによれば、テレセントリック構成においてさらに、共鳴ミラーによって、光シートが光軸に関して傾けられ、それによって照明光線がさまざまな角度から試料上に入射し、その結果、散乱アーチファクトと吸収アーチファクトが低減される。簡単に言えば、入射方向を変えることによって、試料内の吸収領域のための幾分かの背景照明が供給され、それによって画像の筋や陰影が減少する。この方式の欠点は、特に、三次元画像を生成するために光シートがz方向に走査されるべきである場合に、より複雑となる点である。それとは別に、これでは焦点が予め決定されることによる柔軟性の低さの問題が解決されない。

【0008】

本発明の目的は、冒頭に記した顕微鏡の柔軟性を改善し、それと同時に、より高い解像度を実現して、より多くの画像データを検出することである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明によれば、上記の目的は、x方向に照明光線を走査することによって連続的な光シートを生成するxスキャナであって、x方向がy方向とz方向に略垂直に延び、光シートがx方向とy方向により画定される平面内で連続的に形成されるxスキャナと、照明光線の光線経路内に配置されたズーム光学系を備え、前記ズーム光学系が照明光線の焦点距離を変更するようになされた照明光学系とによって実現される。

【0010】

本発明の好ましい実施形態によれば、光検出器が提供され、これは、物体から送られた検出光を、第二の検出方向としてy方向の反対方向に検出し、検出光は蛍光および/または反射光である。これは第二のデータストリームを生成し、このデータストリームはこれに加えて、たとえば共焦点画像の生成に使用できる。この選択的な追加画像は、必要に応じてオンまたはオフに切り替えることができる。

【0011】

多光子レーザを使用する場合、多光子検出によって画像を生成するために、共焦点検出のほか、デスキャンを行わない(non-descanning)光路を選択することができる。デスキャンを行わない検出経路は、特に厚い試料の場合、集光効率が高くなるという利点を有する。「デスキャンを行わない」という用語は、検出光を検出対物レンズにおいて直接分離することと理解するべきである。

【0012】

S P I M検出光線の経路(z方向)を蛍光の集光に使用し、光を光電子増倍管またはA P DもしくはA P Dアレイへと向ける場合、蛍光の集光に照明光学系を使用する場合より効率ははるかに改善され、これは一般に、照明システムに使用される開口数がS P I M構成の検出システムの開口数より低いからである。

【0013】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、S P I M技術により生成される二次元広視野画像と平行して、選択的に多光子照明を使用することにより、物体の共焦点二次元画像も生成され、これはx方向に延びる直線を含む。この場合、二次元画像は、光シートによって照明され、前述のようにズーム光学系によって変更された照明層を画像化し、その一方で、平行して、いわゆるx-t画像が生成され、これは、特に生体試料の場合に、物体内の特定の要素の移動速度に関する情報を提供しうる、たとえば分子またはその他の細胞部分(細胞小器官)の拡散に関する情報を提供しうる線画像を意味する。

【0014】

好ましくは、三次元画像を生成するために、第一のzスキャナが設置され、これは物体をz方向に移動させ、それによって相互に関してz方向に離間された複数の光シートが、それぞれの照明面において連続的に生成され、各光シートとカメラの間の距離は一定のままとされる。利点は、照明光学系全体のほか、これに加えて選択的にオンに切り替えるこ

10

20

30

40

50

とのできる S P I M 検出光学系と共焦点検出光学系を同じ位置にとどめておくことができ、これに加えて、照明光線をスキャナによって z 方向に偏向させる必要がなく、したがって、照明光学系を単純化できるという点である。別の例においては、照明光学系を移動させること、または照明光線を、たとえば音響光学偏向器 (A O D) または検流計によって偏向させることも可能である。この場合、 S P I M 検出光学系で追跡することが好ましく、これは、 S P I M 検出光学系の対物レンズの位置を変えること、または別の例においては、カメラを含む S P I M 検出光学系全体を移動させることによって実現できる。

【 0 0 1 5 】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、画像処理ユニットが提供され、これは相互の距離において z 方向に離間されたそれぞれの複数の光シートに相関する、連続的に生成される画像を合成して三次元画像にする。

10

【 0 0 1 6 】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、 S P I M 法により生成される三次元画像と平行して、 x 方向と z 方向により画定される平面内で、物体の二次元共焦点画像もまた生成される。

【 0 0 1 7 】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、第二の z スキャナが提供され、これは照明光線を物体に関して z 方向に移動させて、相互に関して z 方向に離間された複数の光シートを連続的に生成し、また、第三の z スキャナが提供され、これは光シートとカメラとの間の距離が変化しないように、第二の z スキャナによる z 方向への照明光線の偏向に応じて検出光線を追跡する。このようにして生成されたデータストリームは、好ましくは画像処理ユニットによって処理され、この処理ユニットは、相互の距離において z 方向に離間されたそれぞれの複数の光シートに相関する、連続的に生成された画像を、各種の利用可能なレンダリング方法 (投射、透過、シェーディング、光線追跡等) によって三次元画像に合成する。好ましくは、レンダリングにより生成される三次元画像に加えて、 S P I M 法により生成される三次元画像と平行して、 x 方向と z 方向により画定された平面において物体の二次元共焦点画像 (多光子による) が生成される。

20

【 0 0 1 8 】

物体のより大きな領域を画像化する場合、これは、いわゆる「ステッチング」、すなわち連続的に画像化された隣接の物体領域を合成することによって実現することができる。この目的のために、物体は x 方向に移動され、新しい領域が照明されて、画像がカメラによって検出される。 x 方向への移動の回数は、物体の大きさ、対物レンズの視野の大きさおよびカメラのパラメータに依存する。また、物体を y 方向に移動させて、物体のより大きな領域を検出することも可能である。これらの画像はすべて、 1 つの大きな全体画像に合成することができる。

30

【 0 0 1 9 】

柔軟性のある光学ズーム装置によって、光シートの大きさ (y 方向と z 方向) を調整できる。

【 0 0 2 0 】

薄い層だけを照明したい場合、ズーム光学系の開口数を大きくすると、その結果、光シートの使用可能な大きさが小さくなる。

40

【 0 0 2 1 】

y 方向に沿って連続的に画像を検出することにより (ステッチング)、 z 方向に沿って解像度が高められた連続画像を検出できる。

【 0 0 2 2 】

ズーム光学系の光学パラメータはわかっているため、適当な画像処理を選択することによって、これらの領域だけを使用して合成することができ、高い解像度が得られる。

【 0 0 2 3 】

照明光線の焦点距離を変化させることのできるズーム光学系は、本発明の好ましい実施形態による光学ズームとすることができ、これは複数のレンズ集合を有し、レンズ集合は

50

相互に関して機械的に移動される。ズーム光学系と照明対物レンズとの組み合わせにより、照明光線の焦点距離は、開口数を変化させることによって拡張または短縮させることができ、それによって、 y 照明方向に光シートによって照明される視野の長さを拡張または短縮できる。

【0024】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、電子ズームが提供され、これは x 方向への走査長さを変更するようになされている。好ましくは、 x 方向への画素数は、電子ズームによって、選択されている x 方向の走査長さに関係なく、一定に保持される。 x 方向への走査長さが短縮され、しかしその短縮された走査長さにわたる走査画素数が一定のままであると、解像度は、共焦点検出の場合、ナイキストの定理による限界に到達するまで高めることができる。

10

【0025】

同時に共焦点検出画像が生成される場合、この画像もまた、解像度が x 方向にナイキストの定理による限界に到達するまで高いが、 x 方向の画像の大きさは小さく、これは電子ズームの機能を有することがわかる。

【0026】

本発明の好ましい実施形態によれば、追加として電子ズームが提供され、それによって z 方向への走査長さを変化させることができ、それに沿って複数の離間された光シートが連続的に生成される。この場合、 x 方向に作用する電子ズームと略同じことが当てはまる。好ましくは、 z 方向に相互に関して離間される光シートの数は、電子ズームにより、選択された z 方向の走査長さに関係なく、一定に保持される。

20

【0027】

他の好ましい実施形態によれば、 x 方向に走査される照明光線は、 x 方向への最大走査長さに到達した折り返し地点で、またはその付近でオフとされる。これによって、折り返し地点においては試料に送られる光が少ないため、試料の損傷を回避できる。これに加えて、これはまた、折り返し地点においては試料の他の領域と比較して、より長時間にわたって照明が維持されることから画像が折り返し地点において特に明るく見える、ということも回避できる。理想的な場合では、 x 方向の走査速度は鋸歯状のグラフをたどる。しかしながら、走査速度が非常に速いと、これを実現することは難しいため、代わりに正弦グラフが選択され、その結果、折り返し地点において、走査経路の中央より走査速度が低下する。特に、正弦曲線の場合、照明光線が折り返し地点においてオフにされると有益である。

30

【0028】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、カメラは、CMOSカメラ、CCDカメラまたはアレイ検出器からなる集合から選択される面検出器である。SPIM法は広視野顕微鏡法であるため、カメラが検出光の位置推定を行うべきである。

【0029】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、本発明による顕微鏡が提供され、これは次の動作モードの間で切り替えるようになされたスイッチを備える。すなわち、 y 照明方向と反対の検出光の共焦点検出、 z 方向への広視野検出光のSPIM検出および、上記の共焦点検出とSPIM検出の同時検出、である。

40

【0030】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、失活光源 (deactivation light source) が提供され、この光源は y 方向から失活光線 (deactivation light beam) を物体に送り、 z 方向に連続的に生成される光シートをより薄くし、失活光線は、照明光線に関して z 方向にずらされて物体に送られ、 x 方向に走査されるその照明光線に平行に延びる。好ましくは、失活光線の断面は変調されており、それが z 方向に見たときに、励起光線の中央の前後に2つの最大値を有し、この中央では励起光線は最大値の間のゼロ地点を有している。しかしながら、別の例においては、2つの別々のレーザ光線を失活光線として送ること、または光シートを片側だけ薄くする、すなわち z 方向に見たときに、励起光線の前また

50

は励起光線の後で1つの失活光線だけを供給することも可能である。

【0031】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、励起光線変調器が提供され、これは励起光線をベッセルビームに変調するようになされている。ベッセルビームは、光線の断面にわたって均一でない強度分布を有し、比較的鮮鋭な主要最強部といくつかの重要なサイドローブがある。特に、STEP失活光線を追加した場合、サイドローブは失活によって抑制することができ、それによって、励起光線の中央に狭い主要最強部だけが残る。ベッセルビームはさらに、比較的不透明な部分の背後で少なくとも部分的に再形成される(reform)ため、カーテン効果をさらに減少させるという利点を有する。

【0032】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、照明光源はパルスレーザであり、照明光線は多光子レーザ光線であり、多光子信号がz方向に検出される。特定の利点は、SPIM検出光学系の開口数はより大きく、したがって、多光子信号検出のために、より高い信号強度の検出が可能となる点である。

【0033】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、カメラは、SPIM信号に加えて多光子信号を検出するようになされた高速カメラである。高速カメラは、たとえば、512×512のフォーマットで毎秒最大1000枚の画像を検出できる。

【0034】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、調光ミラーが提供され、これによってz方向から多光子信号を抽出し、これを光検出器に向けることができる。光検出器は一般にカメラより高速であるが、位置推定は行わないものの、位置推定が多光子照明光線を介して提供できれば、それは絶対的に必要なものではなく、この位置推定は多光子照明の場合、特に容易に行われ、これは、この種の照明の場合、ある時点で物体の中のどの小さな対象域が照明されているかがわかるため、信号検出には、全方向からの光を検出できるからである。

【0035】

以下に、本発明を、図面を参照しながら説明する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】先行技術によるSPIM法の基本原理を示す概略斜視図である。

【図2】先行技術によるSPIM法による照明光線の経路と検出光線の経路の概略図である。

【図3】本発明による顕微鏡の概略図である。

【図4】図3に示される本発明による顕微鏡をx走査方向に見た概略図であり、照明光線の経路と検出光線の経路が含まれる。

【図5】図4に示される顕微鏡をy照明方向から見た概略図である。

【図6】先行技術によるSTED原理もまた示す概略図である。

【図7】位相板によるSTED失活光線の変調を示す概略図である。

【図8a】座標x、y、zとした、励起光線の断面のほか、これに関係する強度分布である。

【図8b】座標x、y、zとした、励起光線と失活光線との比較のほか、x方向への走査によって生成される連続光シートおよび強度分布である。

【図9】多光子信号を検出するためにSPIM検出光学系を追加で使用する、本発明の他の実施形態の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

図1は、先行技術によるSPIM顕微鏡の原理を簡潔に示しており、この顕微鏡は「選択的平面結像(Selective Plane Imaging)」法の原理に基づいて動作する。照明はy方向に、物体の特定の物体面を照明する光シートによって行われる。検出方向は、光シート1

10

20

30

40

50

に対して略垂直に、すなわち z 方向に延び、検出光の検出は対物レンズ 3 によって行われる。図 1 に示されるように、光シート 1 は、z 方向に高い解像度を得るために、内側部分の範囲にわたり特に薄くあるべきである。高い解像度は、光シート 1 が物体内で狭い焦点を有する場合に得られる。

【0038】

以下により詳しく説明するように、この焦点距離は変更することができ、画像化される視野はより大きくなるが、焦点の鮮鋭さが低下し、したがって光シート 1 の狭さが低下し、したがって z 方向への画像の解像度が低下する。具体的な用途によっては、z 方向への解像度は低い、同時に、より厚い光シートに基づく、より大きな視野とより大きな画像化対象域を得ることが有益かもしれない。より大きな画像化対象域はまた、生成された画像でも画像の中の関心対象物をよく見ることができれば有益かもしれないが、同時に、より大きな画像化対象域とすることは、画像化された対象域の中に関心対象物が確かに含まれていることを確認しやすいという利点を有する。その後、関心対象物について、はるかに高解像度の画像を生成するべきであれば、ズーム光学系によって連続的な光シート 1 の焦点を操作して、焦点をより小さく、しかしより鮮鋭にすることが可能である。

10

【0039】

共焦点走査顕微鏡と異なり、SPIM法により z 方向の検出光を検出するには、SPIM法が広視野顕微鏡法であることから、検出された光の位置推定が必要である。位置推定は一般に、カメラ、たとえば CCD カメラまたは CMOS カメラによって行われる。物体の三次元画像を SPIM 法で生成すべき場合、光シート 1 を z 方向に走査でき、さまざまな照明面で得られた画像を合成して、三次元画像を生成することができる。この画像処理はまた、この場合は z 方向の「レンダリング」と呼ばれる。

20

【0040】

図 2 は、SPIM 顕微鏡の先行技術による照明光線の経路を概略的に示す。レーザ 4 は照明光線 5 を生成し、これがビームエキスパンダを通じてコリメートレンズ 6 に送られ、その後円柱レンズ 7 によって引き継がれて、光シート 1 が物体に合焦される。対物レンズは検出光を集光し、これをカメラ 9 に向ける。光シートの焦点は、レンズ集合の中の要素を移動させることによって変更することができ、この図 2 による、ごく単純化された例においては、円柱レンズ 7 をコリメートレンズ 6 に関して移動させることによる。

30

【0041】

図 3 は、本発明による SPIM 顕微鏡の概略的構造を示しており、照明光線の経路は参照番号 10 で示され、SPIM 検出光線の経路は参照番号 11 で示される。照明光学系の光線経路 10 は、これに加えて共焦点検出光線の経路の機能も有するが、これは照明方向と比較して反対方向に延びる。

【0042】

まず、照明光学系の光線経路について説明する。レーザ 4 が発生する照明光はスキャナ 12 を介してズーム光学系 13 に送られる。スキャナ 12 は、物体 2 を照明するための連続的な光シート 1 を生成する。光シート 1 を連続的に生成するために、照明レーザ光線は x 方向、すなわち図 3 によれば、それぞれ図の平面から出る、または図の平面に入る方向に走査される。レーザ光線は、たとえば、円形の断面を有するが、別の例においては、その断面形状が変調されてもよく、たとえば、楕円の断面にして、楕円の断面の長軸が x 方向に延びるようにしてもよい。同様に、照明光線の経路は、たとえば長方形とすることができ、あるいはその他どのような形状にしてもよい。

40

【0043】

SPIM 検出光線の経路 11 は z 方向、すなわち照明光線の経路 10 が延びる y 方向に対して略垂直に延びる。照明ビーム光線の経路と検出光線の経路との垂直の関係を若干ずらすことが有利かもしれず、たとえば、2つの経路の間で 90°より小さい、または大きい角度を、たとえば物体内の部分または粒子のための背景照明を提供するため等を選択することができる。たとえば mSPIM 法として知られているように、異なる角度から画像を検出して、その後、これらを合成することが可能である。以下に、説明を簡単にするた

50

めに、長方形の関係について説明するが、理解するべき点として、ずれた角度も包含され、これはしかしながら、多かれ少なかれ90°に近いと理解されるべきである。反射または蛍光発生のいずれかによって物体2から発せられた検出光は、対物レンズ3によって集光される。特に、マルチカラー検出の場合、カラーフィルタ14が対物レンズの下流に設置され、特定の波長の検出光がフィルタにかけられ、この光は次に、管状レンズ15を介して、カメラ16、たとえばCCDカメラ16に向けられる。

【0044】

三次元画像を生成するために、物体キャリア17をz方向に走査して、物体2の中の連続的に異なる照明面を照明することができ、照明面の各々は、x方向に走査される走査レーザ光線によって走査され、したがって各々の照明面において連続的に形成される、連続的に形成される光シート1によって照明される。z方向に隣接する複数の連続的に形成される光シート1は、z方向に「レンダリング」によって合成することができる。

10

【0045】

三次元画像をz駆動の「レンダリング」で生成するべきである場合、物体2を移動させることは、物体内のそれぞれの隣接する照明面と対物レンズとの間の距離が一定であるという点で有利であり、これは、照明光線の位置も変化しなければ、カメラ16の位置も変化しないからである。別の例において、光シート1をたとえば検流計によってz方向に走査することも可能である。これには、しかしながら、対物レンズ3もまた移動させて、それぞれの照明面と物体との間の距離が同じにする必要がある。別の例においては、もちろん、対物レンズ3、フィルタ14、管状レンズ15およびカメラ16を含むS P I M検出光学系の全体を移動させることも可能である。

20

【0046】

照明検出光学系の光線経路10は、前述のように、共焦点検出光線の経路の機能をさらに有していてもよく、その目的のために、物体から反射された光をy方向に検出し、および/または発せられた蛍光を検出するために、検出器18を設置することができる。検出光線の経路11を通じてS P I M法により画像を検出すると同時に、平行して共焦点画像検出を実行することも可能であり、これは、光シート1がx方向への走査によって連続的に生成されるからである。生成される共焦点画像は、S P I M検出によって検出される画像と比較して、一次元低い。たとえば、S P I M検出によって二次元画像だけが生成される場合、すなわち1つの画像面だけの画像の場合、いわゆるx-t画像、すなわち1次元直線画像を検出することも可能である。これは、たとえば、蛍光を発生するためにマーカによりマークされるか、染色される特定の分子の拡散速度を測定するために使用でき、その一方で、同時に画像化される二次元S P I M画像からは、異なる情報、たとえば物体の画像化された画像面内のどの分子が他のどの分子と結合するかという情報が提供されるかもしれない。

30

【0047】

S P I M検出によって、z駆動で三次元画像が生成される場合も同じことが言え、すなわち共焦点二次元画像が生成される。このように、たとえば、三次元形状の物体の中のどの分子が他のどの分子と結合するかを判定することが可能であり、その一方で、平行して、特定の面を通じて拡散する分子の拡散速度も測定できる。“n”次元のS P I M画像と平行して“n-1”次元の共焦点生成画像を同時に検出することにより、その組み合わせで、追加の判断が可能となり、たとえば追加の速度情報から、物体2の中でどの個体の要素、たとえば分子またはその他の要素が移動しているかを判断することができる。特に、顕微鏡の分野において、これによって生体内での新たな用途が見出される。

40

【0048】

図4は、本発明の別の実施形態を示す。同様の要素には、それ以前の図面と同じ参照番号が付与されている。また、この図において、S P I M検出光線の経路は参照番号11で示されており、その一方で、照明光線の経路は参照番号10で示されている。また、図4によるこの実施形態において、照明光線の経路10は、追加の検出光線の経路の機能を有し、開口20を通じて共焦点検出光21を受け、フォトダイオード19によって信号検出

50

が行われ、それぞれの信号は画像処理ユニット 22 を介してモニタ 23 に送られる。検出光は、ダイクロイックミラー 24 によってフォトダイオード 19 へと偏向される。フォトダイオード 19 の代わりに、その他の光センサ、たとえばアバランシェダイオード、光電子増倍管またはカメラを設置することができる。これは共焦点画像検出に関するものであるため、位置推定は不要であり、これは、位置に関する情報は走査された照明光線から得られ、すなわち、ある時点で物体のどの画像点が照明されているかがわかり、したがって、その特定の画像点から受け取った信号が、信号を受信する直前に照明されていた画像点からのものであるという情報がわかるからである。したがって、共焦点検出にはカメラのためのコストが不要となる。

【0049】

連続的に生成される光シート 1 の焦点を変更するために、ズームレンズ 25 を、別のレンズ 26 に関して y 方向に移動させてもよい。実際の用途においては、レンズ集合がこの目的のために設置されるが、簡素化のために、説明する実施形態では、ズームレンズ 25 を 1 枚だけ示す。したがって、ズーム光学系 13 は、照明対物レンズ（マクロ対物レンズ）との組み合わせにより、焦点距離の範囲 27 を変更する光学ズームとなる。簡素化のために、SPIM 検出光学系の詳細は、図 4 では省略されており、これらの光学系はすでに、対物レンズ 3、フィルタ 14 および管状レンズ 15 を含むものとして図 3 に示されているからである。概略的に示されている CCD カメラ 16 は、z 方向に受け取る検出光のための x-y 面における位置推定ステーションとなる。SPIM 画像処理ユニット 28 を介して、CCD カメラにより受け取られた信号は処理され、SPIM モニタ 29 に送られる。物体 2 内の多数の面を照明するべきである場合、物体キャリア 17 を z 方向に移動することができる。図 4 の例から明確にわかるように、照明面と CCD カメラとの間の距離 L は常に一定である。図 3 に関してすでに説明したように、照明光線を z 方向に移動させ、その一方で、物体 2 を同じ位置に保持することも可能であり、また、代わりに CCD カメラを移動させることによって、あるいは実行しやすい方法として、対物レンズ 3 の CCD カメラ 16 に関する位置を変えることもできる。

【0050】

図 5 は、図 4 に示される実施形態を異なる視点から、すなわち照明光線の方向に見た、すなわち y 方向に見た図である。ここには、特に、連続的に形成される光シート 1 を生成するために、x 方向に走査される個々の画像点 30 が示されている。ダイクロイックミラー 24 は、検出光をフォトダイオード 19 の方向に偏向させる。物体キャリア 17 は、z 方向に走査することができ、すなわち CCD カメラ 16 の方向に移動することができ、また CCD カメラから遠ざかるように移動させることができ、物体内の異なる照明面が照明される。

【0051】

別の好ましい実施形態において、光シート 1 は、STED (Stimulated Emission Depletion (誘導放出抑制)) を適用することによってさらに狭めることができ、すなわち、より薄くして、z 方向により高い解像度とすることができる。先行技術から知られている STED 顕微鏡の基本構造を図 6 に示す。励起光線 31 と失活光線 32 がビームコンバイナによって、この実施形態ではたとえばダイクロイックフィルタによって合成されて、統合光線経路 34 として対物レンズ 3 を通って物体 2 へと向けられる。それらの間には、いくつかのその他の光学素子、たとえばレンズ、光伝導ファイバまたはカラーフィルタ等を設置できる。失活光線は一般に、その強度分布において変調され、これはたとえば位相板によって実現できるが、その目的のために特に構成されたレンズによっても実現可能である。変調は、失活光線がその中心においてゼロ地点を有するように実行することができ、これは、強度がゼロ地点においてゼロであるか、または非常に低く、このゼロ地点の周囲に、均一の環状の強度最大値が得られることを意味する。蛍光顕微鏡で使用される染料は、特定の励起波長と失活波長で反応して、特によく蛍光を励起し、または蛍光を失活させる。一般に、励起波長と失活波長は相互に異なり、励起光線と失活光線は相互に関して時間的に遅延されて物体に送られる。励起により、特定の大きさの画像点を励起して、蛍光

10

20

30

40

50

を発生させることができ、その一方で、その直後に、励起の中心の周囲で失活を適用することができ、それによって物体 2 のこの画像点から発せられた蛍光を狭めて小さな画像点とし、したがって解像度を改善することができる。マルチカラー蛍光顕微鏡では、さまざまな異なる染料を使用でき、これらは異なる励起波長によって相互に区別され、すなわちさまざまな波長の励起光によって、蛍光を発生するために特に強力な励起を行うことができる。

【 0 0 5 2 】

好ましくは、染料は、これらが共通の同じ失活波長で失活でき、さまざまな失活波長を供給する必要がなくなるような組み合わせで選択することができる。

【 0 0 5 3 】

対物レンズ 3 を通って物体から送り戻される検出光 3 5 は、ビームスプリッタ、この場合は同様にダイクロイックミラー 3 7 によって、レンズと適当な開口 3 8 を通って送られ、光検出器 3 6 への散乱光を除去することができる。

【 0 0 5 4 】

位相板 3 9 による失活光線 4 0 の変調を図 7 に示す。位相と強度分布はどちらも、このような位相板 3 9 によって変調可能である。この目的のために、位相板は、失活光線 4 0 は変調されるが、励起光線 4 1 は変調されないように設計され、すなわち、変調は、励起光線 4 1 と比較して失活光線 4 0 については異なる波長に依存する。

【 0 0 5 5 】

理解すべき点とし、STED原理はまた、図 4 に示されるように、照明光線の経路 1 0 にも実装できる。この場合においては励起光と等しい照明光のためのレーザ 4 に加えて、失活光を生成するために他のレーザを設置することができる。励起光線と失活光線は、いずれも、図 6 に示されるように、1 つの光線経路に合成することができ、また、失活光線を別の光線の経路に沿って送ることもできる。また、励起光線と失活光線を、1 つのレーザ 4 (白色光レーザ) だけで生成することも可能であろう。この目的のために、光線を分割し、光線の一部が音響光学素子、たとえば音響光学可変フィルタ (AOTF) を通過するようにし、ここで所望の波長を選択できる。パルスレーザの使用により、励起光線と失活光線との間で、いわゆる遅延ステージによって時間遅延を発生させることができる。

【 0 0 5 6 】

本発明の 1 つの実施形態を図 8 a と図 8 b に示す。図 8 a は、円形の励起光線 4 1 の断面を示す。方向 x 、 y および z は、図 4 と図 5 に示されているように、図 8 a と図 8 b にも示されている。励起光線の強度分布プロファイルが右側に示されており、これは一般に、回折による比較的小さいサイドローブを除いて、ガウス分布に従っている。図 8 b は失活光線 4 0 を示しており、これは、励起光線 4 1 の両側に最大強度があり、それらの間に、強度がゼロであるか、または少なくとも非常に低いゼロ地点があるように変調されている。図 8 b からわかるように、失活光線 4 0 の、ゼロ地点の両側に配置された最大強度は、断面が円形ではなく、その断面は、励起中心から遠い方面する側と比較すると、中心に向かって平坦化された曲率を有する。図 8 b において破線で示されている、連続的に生成される光シート 1 として、中心領域の小さな帯状部分だけが残り、この部分においては、失活光は蛍光を失活させない。励起光線 4 1、失活光線 4 0 および連続的に生成される光シート 1 の断面の右側に、励起光線 4 1 と失活光線 4 0 の強度分布が、図 8 b に示されている。

【 0 0 5 7 】

STED失活光線は、選択的に、これに加えてオンにすることができ、またはオフにすることができ、これもまた、 x 方向に線ごと、または画素ごとに行うことができる。失活光線がいつオンにされたか、またはオフにされたかの情報はわかるため、それぞれのデータストリームを分割でき、すなわち、より厚い光シートに基づき、それぞれより大きな照明面積 (照明焦点の断面と比較) とより大きな照明対象域をカバーする画像を生成するための第一のデータストリームと、より薄い光シートに基づき、より小さな照明面積 (照明焦点の断面に関して) とより小さな照明対象域での画像を生成するための第二のデータストリー

10

20

30

40

50

ムに分割できる。これによって、同時に、S T E D光線を追加することによって、z方向に、高解像度の画像と、S T E D光線を追加せずに、z方向に、より低い解像度であるが、物体内のより大きな対象域を照明する利点を有する画像を生成することができる。

【0058】

S T E D光線を追加し、またはオフにすることとは無関係に、この顕微鏡によって、平行して、同時に、n次元のS P I M顕微鏡画像とn - 1次元の共焦点生成画像を生成することができる。その一方で、これらの画像はまた、平行して、それぞれS T E D光線を追加でオンにし、またはオフにすることによって、高い解像度で、または低い解像度でz方向に生成することができる。全体として、以下のデータセットを生成する4つの別々のデータストリームを同時に生成することが可能である。

i) 高解像度であるが、物体の中の、より小さな対象域を画像化する三次元データセット(S P I M)、

i i) 低解像度であるが、物体の中の、より大きな対象域を画像化する三次元データセット(S P I M)、

i i i) 高解像度でのz方向の二次元共焦点画像、

i v) より低解像度でのz方向の二次元共焦点画像。

【0059】

1つの平面だけを光シートで照明するべきである場合、以下の画像を同時に生成できる。

i) 高解像度であるが、物体の中の、より小さい対象域を画像化する二次元画像(S P I M)、

i i) 低解像度であるが、物体の中の、より大きい対象域を画像化する二次元画像(S P I M)、

i i i) 高解像度でのz方向の一次元共焦点画像x - t、

i v) より低解像度でのz方向の一次元共焦点画像x - t。

【0060】

z方向への光シート数はxの寸法に依存せず、すなわち、異なる画像フォーマットから選択でき、たとえばx方向の画素数を512とし、その一方でz方向の画素数をより多く、またはより少なくすることができる。z方向へのギャップのない連続データセットを取得するために、z方向への供給動作は、常に確実にある程度重複するように選択しなければならない(ナイキストの定理)。

【0061】

図9は本発明の別の実施形態を示しており、図3による実施形態と同じ構成部品には同じ参照番号が付与されている。これに加えて、照明対物レンズ42が設置され、これはズーム光学系13に追加して設置することができる。照明対物レンズはまた、光学ズームの一部とすることができ、たとえば図4に示される実施形態による例のとおりである。

【0062】

連続レーザー(連続波、C W)による照明とは異なり、多光子蛍光顕微鏡にはパルスレーザーも使用でき、これは、長い波長で比較的低いエネルギーの励起光子を送るため、試料への損傷を回避するのに特に適しており、これは生体試料の場合に特に重要となりうる。S P I M信号の検出のように、調光ミラー43によって、z方向に延びる検出光線の経路44から多光子信号も抽出することができ、これは光電子増倍器またはアバランシェフォトダイオード45によって検出できる。それ以外に、S P I M信号は、図3に関してすでに説明したように、カメラ16によって検出することができる。

【0063】

カメラ16が十分な速度で作動すれば、図9に示す実施形態をさらに変形したものとして、調光ミラー43がなくてもよく、その代わりに、カメラ16を使って多光子信号を検出することができる。多光子照明とz方向、すなわち照明方向に対して垂直の方向への信号検出の場合、物体上の各照明点に関して、カメラ16には直線が画像化されるため、物体上のx方向に延びる走査線を連続的にx方向に走査することによって、カメラ16では

10

20

30

40

50

ある領域が連続的に照明され、これは、データを整理して線に戻すソフトウェアによって整理する必要がある。z方向に連続して走査することによって、物体上のいくつかの線を検出して、さらに処理し、物体のある領域の画像とすることができる。

【0064】

簡単に言えば、SPIM信号検出構造の上記のような変形版は、多光子信号検出に使用され、これは高速カメラ、たとえばフォーマット512×512で毎秒最高1000枚の画像を検出できるカメラを使えば可能である。

【0065】

多光子信号検出のためのSPIM信号検出構造の特定の利点は、信号の強度が有意に増強されることであり、そのいくつかの理由の1つは次のものである。光シートを生成するためには、一般に、低い開口数の照明対物レンズ、たとえば0.04NAの範囲の開口数の対物レンズが使用される。ここで、多光子照明から生成された信号の検出にSPIM検出経路を使用する場合、使われる対物レンズの開口数(NA)がはるかに高い(たとえば、1.0NA)ため、有意に高い信号の強度を得ることができる。これは、信号強度が20倍超、改善されることを意味する。

10

【0066】

SPIM検出光線の経路(z方向)が蛍光の検出に使用され、光が光電子増倍器またはAPDもしくはAPDアレイに送られ、あるいは上述の変形版によれば、高速カメラに直接送られる場合、y方向の信号検出のための照明光学系を使用する場合より、効率ははるかに改善され、これは一般に、使用される照明システムの開口数がSPIM構成の検出システムの開口数より低いからである。

20

【0067】

多光子検出を使用することにはいくつかの利点がある。ほとんど排他的に焦点の合った蛍光色素だけが励起され、これは、励起には、いくつかの光子が多かれ少なかれ同時に到達することが必要となるからであり、この同時の到達はほとんど排他的に焦点の中で発生し、換言すれば、焦点の外の励起の可能性は非常に低い。他の利点は、IR範囲の(散乱が低い)波長を使用すると、浸透深度がより深くなることである。他の利点はピンホールが不要であることであり、これは、発生された光の全体を照明焦点に割り当てることができるからである。これによってまた、全方向からの光を集光することが可能である。これに対して、共焦点顕微鏡は、散乱および反射光を抑制する必要があり、これによって信号の強度が弱められる。信号強度を高めることにおける上記のすべての利点とは別に、照明強度は低く、したがって試料への損傷が回避され、その一方で、このソリューションはさらに、構造的な利点を提供し、これは、SPIM顕微鏡にすでに備わっている検出光学系を多光子信号検出に使用できる点であり、それによって、構造面でのコストを追加せずに、比較的安価なソフトウェアのコストだけで、上記の利点のすべてを得ることができる。

30

【0068】

STED技術はさらに、多光子照明にも使用することができ、多光子モードで約300nmの解像度を多光子プラスSTEDモードではわずかに数nmの解像度まで下げることができる。

【0069】

ソフトウェアの観点から、カメラ16によって検出されたデータを線と画素に分離して、同時に、SPIM画像と多光子画像を生成することもまた可能である。これによって、SPIMモードと多光子モードとを切り替える必要がなくなり、あるいは、別の例において、SPIMモードと多光子モードでの同時動作を切り替えの選択肢として追加することができる。

40

【0070】

要約すれば、本発明による顕微鏡では、共焦点顕微鏡の部分的態様、すなわち照明光学系の部分的態様がSPIM法に基づく画像生成に適用され、照明光学系がさらにズーム光学系へと改造される。本発明によれば、さらに、SPIM法によって生成される画像より次元低い共焦点画像を生成することができ、あるいは、別の例において、共焦点画像に

50

追加して、また S P I M 法により生成された画像の代わりに、多光子画像を生成することができる。これは、S P I M 法により生成される画像をはるかに高い柔軟性で変更できるだけでなく、共焦点検出または多光子検出によって追加の画像情報が得られ、また、特定の用途に応じて、得られた画像をオーバーレイとして S P I M および / または多光子画像と合成することもできる。S T E D 光線を追加し、またはオフにすることによって、画像にさらに変更を加えることができ、さまざまな画像についてさらに追加のデータストリームを生成することが可能であり、これらは同時に生成されるという利点がある。これによって、顕微鏡に多種多様な有益さを持たせることができ、これには、画像変調の可能性および、それと同時に、分析可能な画像情報の数における相乗効果が伴う。

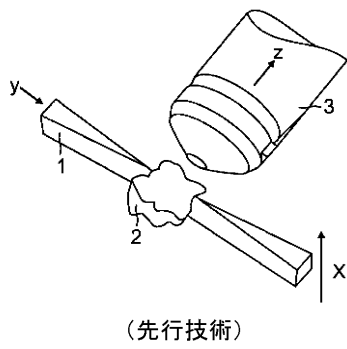
【符号の説明】

【0071】

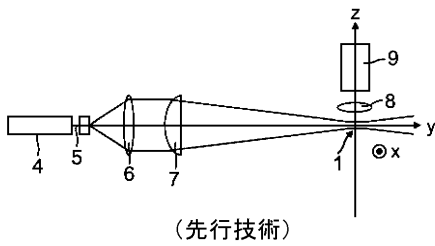
- | | | |
|----|------------------|----|
| 1 | 光シート | |
| 2 | 物体 | |
| 3 | 対物レンズ | |
| 4 | レーザ | |
| 5 | 照明光線 | |
| 6 | コリメートレンズ | |
| 7 | 円柱レンズ | |
| 9 | カメラ | |
| 10 | 照明光線の経路 | 20 |
| 11 | 検出光線の経路 | |
| 12 | スキャナ | |
| 13 | ズーム光学系 | |
| 14 | カラーフィルタ | |
| 15 | 管状レンズ | |
| 16 | カメラ | |
| 17 | 物体キャリア | |
| 18 | 検出器 | |
| 19 | フォトダイオード | |
| 20 | 開口 | 30 |
| 21 | 検出光 | |
| 22 | 画像処理ユニット | |
| 23 | モニタ | |
| 24 | ダイクロイックミラー | |
| 25 | ズームレンズ | |
| 26 | レンズ | |
| 27 | 焦点距離の範囲 | |
| 28 | S P I M 画像処理ユニット | |
| 29 | S P I M モニタ | |
| 30 | 照明点 | 40 |
| 31 | 励起光線 | |
| 32 | 失活光線 | |
| 34 | 統合光線経路 | |
| 35 | 検出光 | |
| 36 | 光検出器 | |
| 37 | ダイクロイックミラー | |
| 38 | 開口 | |
| 39 | 位相板 | |
| 40 | 失活光線 | |
| 41 | 励起光線 | 50 |

- 4 2 照明対物レンズ
- 4 3 調光ミラー
- 4 4 検出光線の経路
- 4 5 光電子増倍器またはアパランシェフォトダイオード

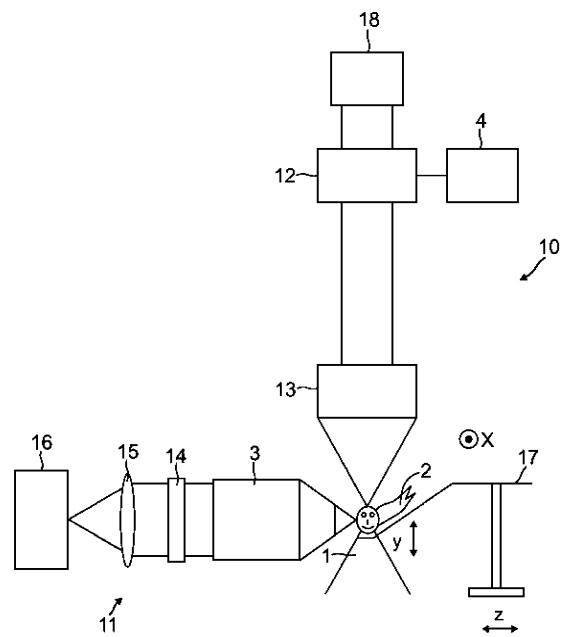
【 図 1 】



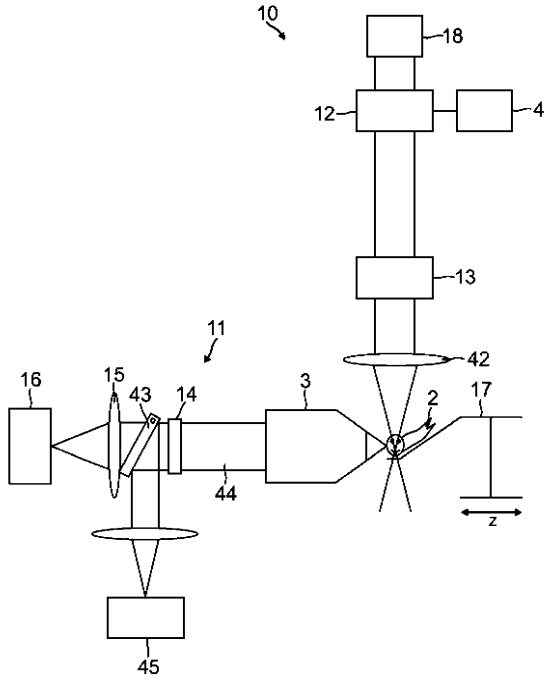
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(72)発明者 ヴォルフガング エストライヒヤー

ドイツ連邦共和国 6 8 1 6 3 マンハイム エミール・ヘッケル・シュトラッセ 6

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA02 GA04 GB01 HA01 HA02 HA09 JA02

LA03

2H052 AA07 AA09 AA10 AB05 AC06 AC15 AC34 AD20 AF14 AF25

【外国語明細書】

2012108491000001.pdf

2012108491000002.pdf

2012108491000003.pdf

2012108491000004.pdf