

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5955505号
(P5955505)

(45) 発行日 平成28年7月20日 (2016. 7. 20)

(24) 登録日 平成28年6月24日 (2016. 6. 24)

(51) Int. Cl.

F I

G O 2 B 27/60 (2006. 01)

G O 2 B 27/60

G O 2 B 21/00 (2006. 01)

G O 2 B 21/00

請求項の数 21 (全 12 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2010-526211 (P2010-526211) | (73) 特許権者 | 506151659 |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年9月26日 (2008. 9. 26) | | カール ツァイス マイクロスコピー ゲーエムベーハー |
| (65) 公表番号 | 特表2010-540998 (P2010-540998A) | | CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH |
| (43) 公表日 | 平成22年12月24日 (2010. 12. 24) | | ドイツ連邦共和国 07745 イェナ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2008/008204 | | カールツァイスプロメナーデ 10 |
| (87) 国際公開番号 | W02009/043545 | (74) 代理人 | 100105957 |
| (87) 国際公開日 | 平成21年4月9日 (2009. 4. 9) | | 弁理士 恩田 誠 |
| 審査請求日 | 平成23年9月14日 (2011. 9. 14) | (74) 代理人 | 100068755 |
| 審判番号 | 不服2014-21064 (P2014-21064/J1) | | 弁理士 恩田 博宣 |
| 審判請求日 | 平成26年10月17日 (2014. 10. 17) | (74) 代理人 | 100142907 |
| (31) 優先権主張番号 | 102007047468.9 | | 弁理士 本田 淳 |
| (32) 優先日 | 平成19年9月28日 (2007. 9. 28) | | |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ (DE) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 照明された試料を光学的に捕捉するための方法および装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料を深さ分解して光学的に捕捉するための方法であって、
 試料またはその一部が線状の照明によって走査され、
 前記試料の照明が焦点内で少なくとも1つの空間方向において周期的に構造化され、
 前記試料からの光が検出されて前記試料の画像が生成され、
 前記画像を基に少なくとも1つの光学的断面画像および/または解像度が高められた画像が計算される当該方法において、

平面検出器またはカメラ上でラインごとに非デスキャン検出するために、照明された試料からの光によって露光された露光ライン間に間隙が生成され、該間隙の位置が変更されることで、それぞれ1つの位置に対し異なる位相画像を含むM個の画像が記録され、Mは5以上であり、前記平面検出器または前記カメラ上で生成される各画像上の隣接する露光ライン間にM本(Mは5以上)の非露光ラインの間隙が生成されるか、または2.5本の回折によって制限されるラインよりも大きな距離が2本の露光ライン間において前記平面検出器または前記カメラ上に形成され、前記構造化の1つの位置で前記間隙の位置が変更されて試料画像が記録され、この過程がその後、前記構造化のさらなる位置に対して繰り返され、前記間隙の位置が本質的に全ての試料領域を次々に線状に照明するように変更されて試料からの光が検出され、ラインごとの照明および検出の際に、前記照明が複数回スイッチオンおよびオフされ、スイッチをオフした区間内では、照明のスイッチがオンになる次のポジションに走査移動することを特徴とする方法。

10

20

【請求項 2】

照明された 2 つの試料部分の間に間隙が存在するように、試料走査の際に光中断が繰り返される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

画像の計算は、照明された試料領域の間の間隙に割り当てられたカメラ領域を部分的にまたは完全にマスキングし、それによって取得された画像を差引計算することによって行われる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記差引計算は、隣で走査された試料領域が、差引計算された画像内で正しくスケールングして隣に割り当てられるように行われる、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 5】

走査過程中に、前記検出器の前で、ラインによる前記試料の走査方向におけるさらなる光偏向が行われることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

光偏向の速度が、試料と照明光の間の相対移動の速度より大きい、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

光偏向がステップ状又は連続的に行われる、請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

20

照明ラインの回転の際に、照明光の偏光が回転と同期して回転される、請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

複数回の走査が行われ、前記試料上での前記周期的構造化の位置および / または前記試料上での照明光の位置が変位されて、異なる位相画像を含む複数の画像が記録され、それを基に断面画像が計算される、請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

光中断が、電気光学式変調器および / または音響光学式変調器による強度の低減によって行われる、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

30

前記照明を周期的に構造化するために、1 つの光ビームが複数の部分光ビームに分けられ、前記複数の部分光ビームが干渉して重なり合い、1 本のラインへと成形される、請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記照明と前記試料またはその一部との非線形の相互作用から生じる光が検出される、請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記線状の走査が、複数のラインによって同時に行われることを特徴とする請求項 1 乃至 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

40

様々な変調周波数で構造を結像させることにより、光学的断面厚または光学的解像度を变化させ、複数の波長でそれぞれ照明する際に各々対応する変調周波数を適合させることによって断面厚さが同じに調整されることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

試料を深さ分解して光学的に捕捉するための装置であって、
少なくとも 1 つの波長で前記試料を線状に照明する手段と、
少なくとも 1 つの平面内で照明光を空間的に構造化する手段と、
試料と照明光との間の相対移動を生じさせる手段と、
少なくとも 1 つの検出器上に、前記試料からの光を結像させる手段と、

50

前記試料からの光の位置情報から少なくとも1つの光学的断面画像および/または解像度が高められた画像を計算する手段と、

を含む当該装置において、

試料からの光を非デスキャン検出するために平面検出器またはカメラが設けられており、

前記平面検出器上で照明された試料からの光によって露光された露光ライン間に間隙を生成するために、走査過程中に光を中断させる手段と、

該間隙の位置を変えて、それぞれ1つの位置に対し異なる位相画像を含むM個の画像が記録されるようにする手段であって、Mは5以上であり、前記平面検出器または前記カメラ上で生成される各画像上の隣接する露光ライン間にM本(Mは5以上)の非露光ラインの間隙が生成されるか、または2.5本の回折によって制限されるラインよりも大きな距離が2本の露光ライン間において前記平面検出器または前記カメラ上に形成され、前記構造化の1つの位置で前記間隙の位置が換えられて試料画像が記録され、この過程がその後、前記構造化のさらなる位置に対して繰り返され、前記間隙の位置が本質的に全ての試料領域を次々に線状に照明するように換えられて試料からの光が検出される、前記間隙の位置を変える手段と、

ラインごとの照明および検出の際に、前記照明を複数回スイッチオンおよびオフし、スイッチをオフした区間内では、照明のスイッチがオンになる次のポジションに走査移動する手段とが設けられていることを特徴とする装置。

【請求項16】

照明用ビーム経路内に強度制御手段が設けられているとともに、前記光中断のために電気光学変調器または音響光学変調器が設けられている、請求項15に記載の装置。

【請求項17】

ラインごとの走査過程中に前記検出器上における試料からの光をラインごとに不連続的または連続的に広げるために、検出用ビーム経路内にスキャナが設けられている、請求項15又は16に記載の装置。

【請求項18】

相対移動を生じさせる手段として、少なくとも1つのスキャナが設けられることを特徴とする請求項17に記載の装置。

【請求項19】

異なる位相画像を設定するために、少なくとも1つのスキャナの位置が調節可能であることを特徴とする請求項17又は18に記載の装置。

【請求項20】

照明を構造化する手段として、光軸の周りを回転可能でその透過性が構造化された光学素子が設けられることを特徴とする請求項17乃至19のいずれか1項に記載の装置。

【請求項21】

異なる周波数構造を設定するために、ビーム経路内に旋回可能である異なる周期性を有する複数の格子が設けられることを特徴とする請求項17乃至20のいずれか1項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

照明された試料を光学的に捕捉するための方法および装置に関する。

【背景技術】

【0002】

構造化された照明は、顕微鏡法において、[1]広視野における深度弁別のため、ならびに[2]解像度およびコントラストを高めるために用いられる。その際、一般的には、[3]格子もしくは周期的構造を試料内に投射することにより、または[4]コヒーレントな部分ビームの干渉により、干渉パターンを試料内に生成する。照明構造を変位させることで、周期的構造の様々な位相位置での互いに異なる画像が生成される。これら画像は

10

20

30

40

50

、続いて、光学的断面画像またはコントラストおよび解像度が高まった画像を取得するために、適切に相互に差引計算される。その際、試料の焦点外の領域からの信号が共に検出されること、および検出器のダイナミックレンジが限られているために信号対雑音比が小さくなることが不利な影響を及ぼす。この場合、焦点外の信号の強度は利用可能な試料厚を制限する。これは特に、構造化周波数が回折によって制限される光学系の限界周波数に近づき、したがって原理上構造化のコントラストが低い場合には大きな問題となる。この場合には常にコントラストおよび解像度の向上が達成されるべきである。

【 0 0 0 3 】

この問題の解決策は部分的共焦点検出にあり、この検出は、照明ラインの構造化およびそれによって励起される蛍光のスリット検出器による検出の構造化によって可能になる [5]。ただしこの方法は欠点を有している。この構造化はラインに沿ってしか行われない。その結果、コントラストおよび解像度向上の効果はこの方向に限られたままである。したがって特に非線形の構造化の場合 [6] には、あるいは線形の構造化の場合 [7] も、解像度が高められる 1 つの方向と他の全ての空間方向との間の相違が顕著となる。試料面内の任意の方向でのライン走査が必要であり、かつ周期的構造の位相位置の調整も必要である。現況技術によれば、このため相対的な位相位置の制御と走査過程のために別々のアクチュエータが必要になる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 4 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 6 , 9 4 7 , 1 2 7 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 非特許文献 1 】 ニール、エム エー エー (Neil M . A . A .)、ユスカイティス、アール (Juskaityis R .)、ウィルソン、ティー (Wilson T .) : 「従来の顕微鏡での構造化された光による光学的断面の取得方法」、Opt . Lett . 22 (24) : 1905 ~ 1907、1997

【 非特許文献 2 】 ルーコス、ダブリュー (Lukosz W .)、マルシャン、エム (Marchand M .)、 「回折による解像限界を超えた光学的解像度」、Optica Acta 16、241 ~ 255、1963

【 非特許文献 3 】 ハインツマン、アール (Heintzmann R .)、クリーマー、シー (Cremer C .)、 「横方向に変調された励起による顕微鏡法：回折格子を使った解像度の改善」、Proc . of SPIE 3568 : 185 ~ 196、1998

【 非特許文献 4 】 ニール、エム エー エー (Neil M . A . A .)、ユスカイティス、エー (Juskaityis A .)、ウィルソン、ティー (Wilson T .)、 「2本のビームの干渉照明によるリアルタイム3D蛍光顕微鏡法」、Opt . Comm . 153 : 1 ~ 4、1998

【 非特許文献 5 】 ハインツマン、アール (Heintzmann R .)、ジョヴィン、ティー エム (Jovin T . M .)、クリーマー、シー (Cremer C .)、 「飽和パターン化励起式顕微鏡法 - 光学的解像度改善のためのコンセプト」 JOSA A、19 (8) : 1599 ~ 1609、2002

【 非特許文献 6 】 グスタフソン、エム ジー エル (Gustafsson , M . G . L .)、アガルド、ディー エー (Agard , D . A .)、セダト、ジェー ダブリュー (Sedat , J . W .)、 「構造化された照明による広視野蛍光顕微鏡法の横方向解像度の倍増」 Proc . of SPIE 3919 : 141 ~ 150、2000

【 非特許文献 7 】 グスタフソン、エム ジー エル (Gustafsson , M . G . L .)、 「非線形に構造化された照明での顕微鏡法：理論的には無限の解像度をもつ広視野蛍光イメージング」、PNAS 102 : 13081 ~ 13086、2005

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

本発明の目的は、現況技術の欠点を克服することである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 7 】

【図 1】本発明による顕微鏡の概略的な構造を示す図。

【図 2】照明の構造化を示す図。

【図 3】変調器（AOM）をスイッチオンおよびオフした場合の共焦点検出用カメラ上での露光パターンを示す図。

【図 4】瞳内の構造化されたライン照明の次数（構造化されたライン分布のフーリエ変換）を示す図。

【図 5】スキャナによる走査方向および位相位置の調整を示す図であり、（a）は同期した走査移動の場合を示す図であり、（b）は 1 つのスキャナでの走査の場合を示す図。

【図 6】代替案としての検出および図平面に垂直な回転軸を有する追加のガルボ・スキャナ（24）を備える顕微鏡の概略的な構造を示す図。

【図 7】ビーム成形ユニット（8）と共に偏光子が回転することによる光損失および出力適合による損失の補償を示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 8 】

本発明によれば、広視野において構造化された照明の利点（少ない光学コンポーネント、高い平行化）が、ラインに沿って構造化された照明の利点（コントラストを最大にするための部分共焦点による背景信号の抑制、非線形および線形の試料相互作用のための焦点内の高い強度）と組み合わせられる。提案する装置は、高速で可変で精密な走査方向の回転、および結像した構造化された周期的構造の相対的位相位置の調整を、2 つのスキャナだけで可能にする。これに加え、可変調整可能な共焦点検出を、同時に検出用ビーム経路内での非常に僅かな光損失で可能にする。ドイツ特許出願公開第 1 0 1 5 5 0 0 2 A 1 号を参照されたい。

【 0 0 0 9 】

本発明による解決策は、検出用ビーム経路内に広視野システムと同じ程度の少しのコンポーネントしか含まないライン走査型顕微鏡（図 1 を参照）であることが好ましい。これは具体的には、無限遠のビーム経路向けに補正された対物レンズ（27）、鏡筒レンズ（21）、主カラー・スプリッタ（19）、放出フィルタ（17）、およびカメラ（15）である。励起用ビーム経路内にビーム成形ユニット（8）があり、このビーム成形ユニットは、変調器（5）によって強度変調された光源（3）の光ビームを、長さに沿って変調されたラインへと成形する。図 1 に示した例示的实施形態では、ビーム成形ユニットがライン成形光学系（7）と周期的構造（13）の組合せによって構成されており、（7）と（13）は、光軸（1）の周りを回転し得る機械的なグループ（8）にまとめられている。好ましくは高速のステッピング・モータによって実現されるビーム成形ユニット（8）の回転により、試料内に結像されるラインの x / y 平面内における向きを調整することができる。

【 0 0 1 0 】

本発明によるさらなる一実施形態（図 1 には図示せず）では、ビーム成形ユニット（8）を、同様に光軸（1）の周りを回転し得るただ 1 つの回折性光学素子によって実施することもできる。そのような回折性素子は、1 方向におけるライン成形およびそれに直交する方向におけるライン構造化を、1 工程で実施することができる。

【 0 0 1 1 】

光軸のその後の進路には、第 1 のスキャナ（9）、第 1 のスキャナ（9）に直交するさらなるスキャナ（23）、および走査対物レンズ（11）が存在する。スキャナ（23）の回転軸または旋回軸（25）は、第 1 のスキャナ（9）の回転軸に対して基本的に直交して配置されている。この場合、スキャナ（9）は試料内でのラインの x 方向の変位のために、スキャナ（23）はラインの y 方向の変位のために用いられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

両方のスキャナ（ 9 ）および（ 2 3 ）は、共役な瞳面の近傍に存在している。

図 1 は、本発明による顕微鏡の概略的な構造を示している。

（ 1 ）は光軸、（ 3 ）は光源、（ 5 ）は切替可能な減衰器 / A O M、（ 8 ）は円筒レンズなどのライン成形光学系（ 7 ）を備えたビーム成形ユニット、（ 9 ）は図平面に垂直な回転軸を有するスキャナ、（ 2 3 ）は図平面に基本的に平行な回転軸（ 2 5 ）を有するスキャナ、（ 1 1 ）は走査光学系、（ 1 3 ）は試料と共役な中間画像面内に周期構造を有するマスク、（ 1 5 ）は例えば C C D 受像部マトリクスなどの位置解像型平面センサ、（ 1 7 ）は放出フィルタ、（ 1 9 ）は主カラー・スプリッタ、（ 2 1 ）は鏡筒レンズ、（ 2 7 ）は顕微鏡対物レンズ、（ 2 9 ）は試料である。素子（ 7 ）および（ 1 3 ）は、機械的グループであるビーム成形ユニット（ 8 ）にまとめられており、このユニットは、好ましくは光軸（ 1 ）の周りを回転可能に配置されている。

10

【 0 0 1 3 】

以下に、両方のスキャナ（ 9 ）および（ 2 3 ）と A O M（ 5 ）の協働による、構造化されたラインの位相ならびに画像視野の走査の変位について説明する。

以下では一般性を制限することなく例を考察するが、この例では、ラインは試料内で x 方向に沿っており、画像視野の走査はそれに垂直な y 方向に行われる。x 方向にラインを方向付けするには、ビーム成形ユニット（ 8 ）の対応する方向付けも必要となる。

【 0 0 1 4 】

スキャナ（ 2 3 ）の機能は、このライン方向付けの際に、記録される 2 つ以上の画像の間の構造化の位相位置を変えることにあり、その際、スキャナ（ 9 ）は y 方向での走査過程を担っている。

20

【 0 0 1 5 】

それぞれ異なる位相位置での記録画像（「位相画像」）から、断面画像の計算（再構成）が行われる。ドイツ特許出願公開第 1 0 1 5 5 0 0 2 号を参照されたい。

図 2 は、照明の構造化を示している。

【 0 0 1 6 】

スキャナ（ 9 ）が時間 $t = t_3 - t_1$ にわたって線形に走査する間に、カメラが同期して少なくとも t の露光時間で画像を取り込む場合、対象物の広視野画像と同等の結果が得られる。その際、焦点外の背景もともに検出される。本発明によれば断面画像の計算に属する各位相画像を記録する際に、y 方向での走査過程と同期して、変調器（ 5 ）により、照明を同じやり方で周期的にスイッチオンおよびオフする場合に、共焦点フィルタリングが可能になる。

30

【 0 0 1 7 】

その際、スキャナは、スイッチのオンおよびオフを伴う連続的な走査移動だけでなく、有利には、スイッチをオフにした区間内では、照明のスイッチがオンになる次のポジションへと迅速に移動することもでき、このポジションで照明された走査過程が続行される。この移動は、ステッピング・モータを用いる場合のようにステップ状に行うことも可能であろう。

【 0 0 1 8 】

40

本発明に基づく方法により、カメラ面内で y 方向に構造化された露光が生じる（図 3 を参照）。本発明の有利な一形態では、カメラの露光ラインの間隔は、試料上をライン照明する際の焦点外の背景が、試料内での次のラインの照明に対応するカメラ上の領域内に混信するのを最小限に抑えるように選択される。ナイキストの定理（検出器ラインは、回折によって制限されるラインの半分の幅に相当する）に基づき対象物を走査する場合、経験的に、隣の露光ラインとの間隔 M は 5 ~ 1 0 ラインで十分であろう。この場合、カメラによって捕捉される次の画像では、露光されるラインパターンが好ましくは 1 ラインだけ変位され、これは変調器のスイッチをオンする際の対応する遅延によって達成される。つまり例えば最初に第 1 ライン、第 1 0 ライン、第 2 0 ラインが露光され、その後第 2 ライン、第 1 1 ライン、および第 2 1 ラインが露光される。

50

【 0 0 1 9 】

対象物照明をラインごとに変位させるこの工程は、画像視野内の試料の全ての区間が走査されるまで繰り返され、その際、この記録過程の結果として1つの位相位置につきM枚の画像が存在する。

【 0 0 2 0 】

代替案として、露光ラインの間隔調整のために、まず周期的構造の複数の位相位置で記録を行い、その後、間隔を変えて再び複数の位相画像を記録してもよい。

これらの画像のそれぞれは、この場合も、既に述べた方法に加えて、好ましくは試料保全のためにできるだけ低い強度で、同じスキャナ調整で記録を繰り返し、続いて平均化することによって生じ得る。この方法は、試料内での褪色過程に基づくアーチファクトを減少させ得る。こうして1つの位相位置につきM枚の画像を差引計算することにより、共焦点性を調整することができる。

10

【 0 0 2 1 】

特に、個々の画像について、受像部によって捕捉された、露光された受像部ラインの間に露光された背景を差し引かなければならない。対象物内での露光ラインは、カメラ上の互いに分離した領域に一義的に割り当て得るので、この背景は、受像部上で容易に識別することができる。

【 0 0 2 2 】

1つの位相位置の全てのM枚の画像を単純に足し合わせると、広視野画像に相当する結果が得られる。対象物の焦点内の相応の照明されたラインに対応するラインを選択した後で画像を足し合わせると、共焦点画像が得られる。この工程では、選択されたラインに隣接する画像領域は前述のようにマスクされ、評価はされない。これは、仮想スリット絞りの機能に相当する。この利用されないマスクされた画像領域が、焦点外の散乱光の検出位置に相当するからである。その際、共焦点性は1 Airy - Unit (2ラインが選択される) からM Airy - Unitまで変化させることができる(仮想スリット絞り)。

20

【 0 0 2 3 】

図3は、変調器(AOM)をスイッチオンおよびオフした場合の共焦点検出用カメラ上での露光パターンを示している。

この場合、画像記録の速度は、非共焦点検出に比べてM分の1に低下する。50枚の画像の画像取り込みを基礎とすると、M=5の場合(構造化の1つの位相位置での)完全な画像は100ms後に得ることができる。ただし構造化方向ごとに、異なる位相位置でN=3~5枚の画像を記録しなければならないことを考慮する必要がある。したがって3つの構造化方向での線形の構造化の場合、典型的には9枚の画像が生じ[7]、これはM=5の場合、1つの平面ごとに約1sの画像記録時間になる。

30

【 0 0 2 4 】

スキャナ(9)が画像視野全体を単調に(速度 v_s で)走査するのではなく、レーザのスイッチをオフにした時間内は最大速度 v_{max} で移動する場合には、少し有利な状況が生じる。こうすると、確かにスキャナの制御および同期性に対しより高い要求が課されるが、画像記録時間は、

【 0 0 2 5 】

【 数 1 】

$$sf = \frac{M}{(M-1)\frac{v_s}{v_{max}} + 1}$$

40

倍に、つまりおおよそM倍($v_{max} \gg v_s$ の場合)に、またはカメラの最大画像記録レートまで上昇する。

【 0 0 2 6 】

線状の構造化された照明では、構造化周波数が増大するにつれて、円形の瞳を通して透過される比較的高い次数の長さが短くなることに留意しなければならない(図4を参照)

50

。これは照明側で、0次との干渉のコントラストが低くなることを意味する。ただし、比較的高い次数間の干渉のコントラストは、瞳を対称的に通過する場合には変わらず100%である。さらに画像内で、回折によって制限されるラインの幅がより大きくなる。限界周波数に対して正規化された構造化周波数 f の場合、

【0027】

【数2】

$$b = (2\sqrt{1-f^2})^{-1}$$

の拡幅 b (ライン幅を完全な NA の場合の最小幅で割った) が得られる。

【0028】

10

限界周波数の90%の典型的な構造化周波数 ($f = 0.9$) の場合は15%の拡幅が得られる。限界周波数の95%で既に拡幅は60%に上昇する。この拡幅は、構造化周波数および対物レンズの伝達関数によって決まる解像度には影響を及ぼさないが、焦点外の背景の抑制には影響を及ぼし、また共焦点フィルタリングのために考慮しなければならない。

【0029】

図4は、瞳内の構造化されたライン照明の次数 (構造化されたライン分布のフーリエ変換) を示している。

1次の回折次数が干渉し合うことにより、試料上に構造化されたラインが生成される。回折次数の間隔は s であり、 a は瞳の大きさである。 s と b の比が、限界周波数に対して正規化された構造化周波数 f である。

20

【0030】

図3に示した x 方向に平行なラインは、1つの構造化方向だけを表している。カメラ上のラインの向きは、ユニット (8) (図1) の回転によって調整することができる。周期的構造の変位方向および位相位置は、スキャナ (9) および (23) によって調整される。

【0031】

図5に、ラインの向きが任意である一般的な場合を図示する。

図5は、同期した走査移動の場合 (a) および1つのスキャナで走査する場合 (b) のスキャナによる走査方向および位相位置の調整について説明するためのものである。

30

【0032】

この場合、投射された構造の位相位置 (双方向矢印) は走査過程中的両方のスキャナ (9) および (23) の相対的な一定のオフセットによって決まるが、好ましくはそれに垂直な走査方向 (矢印) は、両方のスキャナの相対速度によって確定される。ただし試料の走査をスキャナ (9) だけで実施することも可能である。こうするとシステム制御が簡略化される。走査方式に応じて、一般的に検出器によって決定される画像視野を、ラインが回転する場合にもできるだけ均質に照らすことを保証することができる。

【0033】

ここまで述べてきた装置構成では、試料内に投射される構造の成形はビーム成形ユニット (8) によって保証されている。本発明によれば、ユニット (8) は、ライン成形光学系 (7) と周期的構造 (13) の組合せから成ることができる。その際、ライン成形光学系はパウエル・レンズを含むことができる。周期的構造は、位相構造、振幅構造、またはその両方の組合せでよい。さらにビーム成形ユニット (8) 全体を回折性光学素子で置き換えることができる (ドイツ特許出願公開第10155002号も参照のこと)。この素子は、変位の回数を減らすために、試料上で1つまたは複数の構造化されたラインを最小間隔 M で生成することができる。

40

【0034】

M ラインパターンで試料を順次走査することの潜在的な問題は、画像記録時間中の試料移動によって発生する。これは、構造化された照明のための方法の原理的な問題であり、画像記録時間を最小にすることでできるだけ小さく保つべきである。したがって、対象物

50

と検出器の間での蛍光損失が最小の、高感度の検出が大きな意味をもつ。M枚のライン画像の代わりに1枚だけ画像を取り込み、それにもかかわらず共焦点検出を可能にする、Mラインパターンでの順次走査に代わる代替案を以下に説明する。この場合、ライン・スキャナでは対象物がラインごとに順次走査されるという事実を利用する。こうすると、検出用ビーム経路内で、さらなる素子により、検出光の不連続的なラインごとの偏向を実現することが可能となり、したがって対象物を間隙なしで走査するにもかかわらず、検出器上に図3のようなラインパターンが生じる。このように画像全体を検出器上で結像させるには、検出器が、画像のために必要であるラインのM倍のラインを有することが前提条件である。典型的な値は、1枚の画像につき500ラインである。M=5で2500本の必要な検出器ライン数が生じる。ライン偏向のための素子として、例えばガルボ・スキャナを検出器の前で使用してもよい(図6参照、スキャナ(24))。カメラ上のピクセルサイズが $5\mu\text{m}$ である場合、最大偏向角度が得られ、上で挙げた例ではカメラ上で $(2500 - 500) \times 5\mu\text{m} = 10\text{mm}$ の変位が起こる。これは、カメラからスキャナまでの間隔が50mmの場合、(10度の偏向に対して)5度の走査角に相当する。対象物内で走査されるラインが、ラインの間隔にかぶって描き込まれないように、スキャナ(24)の不連続的な偏向中に(例えばAOMまたはAOTFにより)露光をオフにすることが有用である。ただし連続的な露光の実現も考えられる。なぜならスキャナ(24)の走査速度は、スキャナ(9)の走査速度に比べて非常に速くなければならないので、スキャナ(24)の移動中の露光は無視することができる。例えば、上で述べたようにy方向の偏向を担うスキャナ(9)と同じ偏向軸をもつスキャナ(24)は、スキャナ(9)が次の検出されるラインポジションに進む前に、スキャナ(9)の順次のライン走査の1つのラインポジション内で、例えば10回の変位した不連続的なスキャン・ジャンプを生じる。その際、スキャナ(9)は連続的に走査することも可能であるが、スキャナ(24)は高い偏向速度で常に不連続的に駆動されなければならない。この場合、時間 t_d におけるスキャン・ジャンプの合間の時間 t_i が、カメラ上での有効なライン積分時間に相当する。少なくとも $M \cdot t_d < t_i$ でなければならない。

【0035】

このスキャン・ジャンプは、平面検出器上に、照明された試料の互いに間隔をあけた信号を生じ、この信号は、特に図3に基づき上記で詳しく説明したように、その意味通り検出器の互いに間隔をあけた領域に対応している。

【0036】

図6は、代替案としての検出および図平面に垂直な回転軸を有する追加のガルボ・スキャナ(24)を備える顕微鏡の概略的な構造を示している。

対象面内での構造化のコントラストができるだけ高い構造化された照明を得るために、顕微鏡法では通常であるような比較的高い開口数の光学系を使用する場合、偏光に留意しなければならない。最大のコントラストは、図4に示したように、照明光の偏光が、瞳面内での回折次数を結ぶ線に垂直(つまり画像面内でのラインの位置に垂直)である場合にだけ可能である。したがって照明光の相応の偏光は、ビーム成形ユニット(8)の回転と同期して、絞りの回転と一緒に回転されなければならない。前者は、線形に偏光された励起光のビーム経路内で、2板の回転によって生成し得ることが好ましく、その際、波長板の回転角度は、ビーム成形ユニットの回転角度の半分である。これに対応して図1および図6のビーム経路内で供給源(3)と主カラー・スプリッタ(19)の間に回転可能な波長板を設けることができる。代替案としてビーム成形ユニットが、正しい向きの線形に偏光された光だけを透過させる偏光子を備えることもできる。これは、回転に応じた光損失を引き起こし(図7を参照)、この光損失は、適切な同期化された光変調によって補償することができる。

【0037】

図7は、ビーム成形ユニット(8)と一緒に偏光子が回転することによる光損失、および出力適合による損失の補償を示している。

本発明は前述の実施形態だけに限定するものではない。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 8 】

当業者には、発明の概念の改変および変更を理解することができる。

したがって例えば、本発明は多点構成（米国特許第 6 0 2 8 3 0 6 号を参照のこと）および別の点構成のような別の照明分布にも適用可能であり、ニプコー円板および広視野での検出の際にも適用可能である。

【 図 1 】

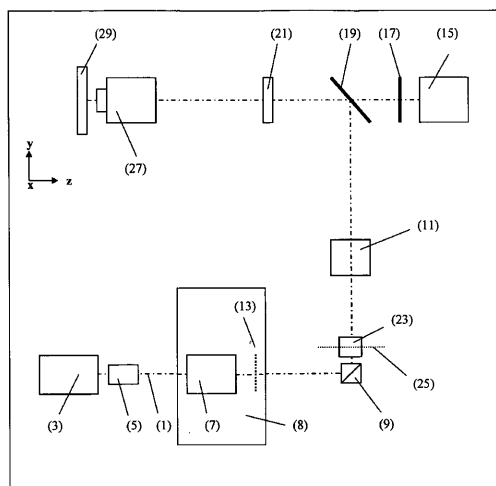
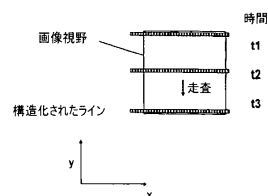
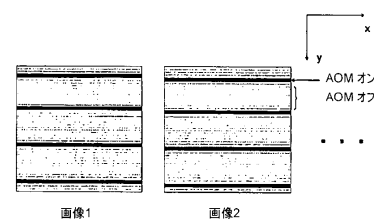


Abb.1

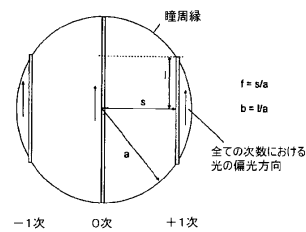
【 図 2 】



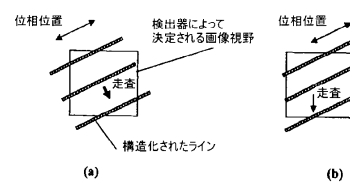
【 図 3 】



【 図 4 】

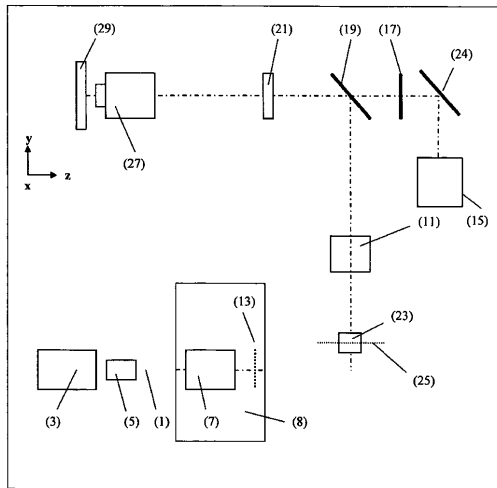


【 図 5 】

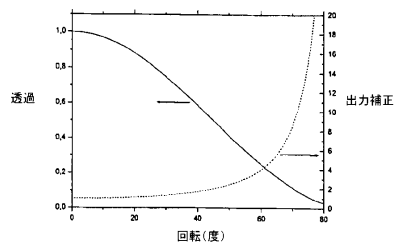


【図 6】

Abb.6



【図 7】



フロントページの続き

(72)発明者 ケンペ、ミハエル

ドイツ連邦共和国 0 7 7 5 1 イェナ アム メンヒェンベルグ 8

(72)発明者 シュヴェルトナー、ミハエル

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 3 イェナ エルンスト - アッペ - プラッツ 5 アパートメント
8 0 8

(72)発明者 ヴォレシエンスキー、ラルフ

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 3 イェナ リヒャルダ - フーフ - ヴェーク 2 6

合議体

審判長 藤原 敬士

審判官 西村 仁志

審判官 鉄 豊郎

(56)参考文献 国際公開第2007/043314(WO, A1)

特開2002-323660(JP, A)

特開2001-235683(JP, A)

M. A. A. Neil, R. Juskaitytis, and T. Wilson, Method
of obtaining optical sectioning by using st
ructured light in a conventional microscope
, Optics Letters, 米国, Optical Society of Ameri
ca, 1997年12月15日, Vol. 22, Issue 24, pp. 1905 - 1907

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B27/60

G02B21/00