

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6224595号  
(P6224595)

(45) 発行日 平成29年11月1日(2017.11.1)

(24) 登録日 平成29年10月13日(2017.10.13)

(51) Int.Cl.	F 1
GO2B 21/06 (2006.01)	GO2B 21/06
GO2B 21/36 (2006.01)	GO2B 21/36
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 21/64 E

請求項の数 29 (全 60 頁)

(21) 出願番号	特願2014-533422 (P2014-533422)
(86) (22) 出願日	平成24年9月28日 (2012.9.28)
(65) 公表番号	特表2014-532197 (P2014-532197A)
(43) 公表日	平成26年12月4日 (2014.12.4)
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/058027
(87) 国際公開番号	W02013/049646
(87) 国際公開日	平成25年4月4日 (2013.4.4)
審査請求日	平成27年9月23日 (2015.9.23)
(31) 優先権主張番号	102011114500.5
(32) 優先日	平成23年9月29日 (2011.9.29)
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)

(73) 特許権者	501419107 エフ・イー・アイ・カンパニー アメリカ合衆国オレゴン州97124, ヒ ルズバラ, ノースイースト・ドーソンクリ ーク・ドライブ5350
(73) 特許権者	516048541 ティーアイエルエル アイ. ティー. ジ ーエムビーエイチ TILLI I. D. GMBH ドイツ連邦共和国 82166 グレーフ エルフィング イーゲルガルテン 34 Igelgarten 34, 8216 6 Grafelfing, Germany

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】顕微鏡デバイス

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対物レンズと、照明ビーム経路に沿ってサンプルを照明する光源と、両方の空間方向に構造化された平らな照明パターンを前記サンプル上に生成する装置と、1つの画像ビーム経路に沿って前記サンプルから来た光を検出する表面検出器と、前記サンプル上の前記照明パターンを1つの変位方向にシフトする装置と、前記検出器によって前記光が検出されたときに、前記変位方向に沿った前記パターンの異なる位置の位相画像として1つの画像を撮影し、それらの位相画像から、照明されたサンプル領域の全体構造化照明顕微鏡(SIM)画像を計算により再構成する制御ユニットとを備える顕微鏡デバイスにおいて、前記変位方向が、前記照明パターンの主対称軸に対して斜めであり、前記変位方向が、前記照明パターンに応じて、前記SIM画像の再構成に必要な位相画像の数が、照明パターンの強度のフーリエ次数の数に等しい理論上最低限必要な値に一致するような態様で選択されることを特徴とする顕微鏡デバイス。

## 【請求項 2】

前記照明パターンが六角形点パターンであり、前記変位方向が、3つの主対称軸のうちの1つの主対称軸に対して1から20度の範囲にあるように選択され、少なくとも7つの位相画像が最低限必要な値である、請求項1に記載の顕微鏡デバイス。

## 【請求項 3】

前記変位方向が、3つの主対称軸のうちの1つの主対称軸に対して4から20度、好ましくは13から20度の範囲にあるように選択される、請求項2に記載の顕微鏡デバイス

。

【請求項 4】

前記照明パターンを生成する前記装置が、位相画像ごとに、照明されるサンプル表面の全ての領域を前記照明パターンで同時に照明するようになされている、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 5】

前記照明パターンを生成する前記装置が、位相画像ごとに、照明されるサンプル表面の部分領域において前記照明パターンを逐次的に生成および除去するようになされており、照明されるサンプル表面が、前記照明パターンで同時には照明されず、一部分ずつ逐次的に照明されるように、前記部分領域が、全体として、照明されるサンプル表面をカバーし、前記制御ユニットが、実質的にサンプル表面のちょうど照明された部分領域が結像されるときにだけ前記検出器の対応する領域がアクティブになるような態様で前記検出器を制御するようになされている、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

10

【請求項 6】

対物レンズと、照明ビーム経路に沿ってサンプルを照明する光源と、少なくとも 1 つの空間方向に構造化された照明パターンを前記サンプル上に生成する装置と、1 つの画像ビーム経路に沿って前記サンプルから来た光を検出する表面検出器と、前記サンプル上の前記照明パターンを 1 つの変位方向にシフトする装置と、前記検出器によって前記光が検出されたときに、前記変位方向に沿った前記パターンの異なる位置の位相画像として 1 つの画像を撮影する制御ユニットとを備え、照明されたサンプル領域の全体画像が、前記位相画像から計算により再構成され、前記照明パターンを生成する前記装置が、位相画像ごとに、照明されるサンプル表面の部分領域において前記照明パターンを逐次的に生成および除去するようになされており、照明されるサンプル表面が、前記照明パターンで同時には照明されず、一部分ずつ逐次的に照明されるように、前記部分領域が、全体として、照明されるサンプル表面をカバーし、前記制御ユニットが、実質的にサンプル表面のちょうど照明された部分領域が結像されるときにだけ前記検出器の対応する領域がアクティブになるような態様で前記検出器を制御するようになされている顕微鏡デバイス。

20

【請求項 7】

前記照明パターンを生成する前記装置が、前記照明パターンを、一方向に移動するストリップの形態で生成および除去するようになされている、請求項 6 に記載の顕微鏡デバイス。

30

【請求項 8】

前記ストリップの幅が、前記ストリップで照明されたサンプル領域が少なくとも 3 本の検出器線上に結像されるように選択される、請求項 7 に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 9】

前記ストリップが縦方向にだけ構造化される、請求項 7 または 8 に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 10】

前記ストリップが横方向に回折限界がある、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

40

【請求項 11】

前記照明パターンを生成する前記装置が、前記ストリップを、前記ストリップを横切る方向にだけ移動させるようになされている、請求項 7 から 10 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 12】

前記構造化された照明パターンを生成する前記装置が円柱レンズ・アレイを有し、移動するストリップの方向が前記円柱レンズの軸方向に対して平行である、請求項 7 から 11 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 13】

前記ストリップの縦方向の、前記検出器上で前記ストリップの前記結像が、前記検出

50

器表面の部分領域の上だけに及び、曲線状の軌道をたどるために、前記照明パターンを生成する前記装置が、前記パターンが組み合わせられているときに、前記ストリップを、前記ストリップを横切る方向だけでなく、前記ストリップの縦方向にも移動させるように作られている、請求項 7 から 10 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 14】

前記照明パターンの前記変位方向が、前記ストリップの縦方向に 1 つの成分を含む、請求項 7 から 13 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 15】

前記構造化された照明パターンを生成する前記装置が、物体平面または物体平面と共に役する平面に前記照明パターンを生成するようになされている、請求項 7 から 14 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。 10

【請求項 16】

前記構造化された照明パターンを生成する前記装置が、前記対物レンズの瞳内のコヒーレント照明光の干渉する焦点によって、前記照明パターンを生成するようになされている、請求項 15 に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 17】

前記サンプル上の前記照明パターンをシフトする前記装置が、前記サンプル上の前記照明パターンをシフトするために、前記対物レンズの瞳内の前記焦点の大きさの相対的な位相シフトを引き起こすようになされている、請求項 16 に記載の顕微鏡デバイス。 20

【請求項 18】

前記サンプル上の前記照明パターンをシフトする前記装置が、前記対物レンズの瞳内の前記焦点の前記相対的な位相シフトを引き起こすために、前記対物レンズの瞳の中もしくは瞳の近くのガルバノメトリック走査器、音響光学変調器、または圧電アクチュエータとミラーの組合せをその 1 つのアームに備える干渉計を有する、請求項 17 に記載の顕微鏡デバイス。 20

【請求項 19】

前記構造化された照明パターンを生成する前記装置が、1 つの中間画像平面に点パターンを生成する要素を有する、請求項 15 に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 20】

前記中間画像平面に前記点パターンを生成する前記要素が、前記中間画像平面に位置する穴のあいたマスクである、請求項 19 に記載の顕微鏡デバイス。 30

【請求項 21】

前記中間画像平面に前記点パターンを生成する前記要素が、前記中間画像平面に前記照明光の焦点を生成するために前記光源と前記中間画像平面の間に配置されたマイクロレンズ・アレイである、請求項 19 に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 22】

前記サンプル上の前記照明パターンをシフトする前記装置が、前記中間画像平面と第 1 の管状レンズの間の非無限空間にビーム偏向要素を有する、請求項 4、19 から 21 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。 40

【請求項 23】

前記ビーム偏向要素が、動力付きの偏向ミラーまたは回転するガラス窓として作られている、請求項 22 に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 24】

前記中間画像平面に前記点パターンを生成する前記要素にわたって照明光を移動させて、前記照明パターンを逐次的に生成および除去するために、前記照明パターンを生成する前記装置が、1 つの走査レンズを備える走査デバイスを有する、請求項 5、6、19 から 21 のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

【請求項 25】

前記点パターンを含む前記中間画像平面に対して絶対的に対称な平面に前記表面検出器が位置するように作られた、請求項 19 に記載の顕微鏡デバイス。 50

## 【請求項 2 6】

前記中間画像平面が、前記第1の管状レンズと前記対物レンズのうちの一方によって前記サンプル上に結像され、前記サンプルが、前記対物レンズおよび前記第1の管状レンズと同じ第2の管状レンズによって前記表面検出器上に結像され、色分割器によって、前記照明ビーム経路が前記画像ビーム経路から分離される、請求項25に記載の顕微鏡デバイス。

## 【請求項 2 7】

前記サンプルの2光子励起の検出用に作られた、請求項7から26のいずれか一項に記載の顕微鏡デバイス。

## 【請求項 2 8】

光源と対物レンズ(22)からの光で照明ビーム経路(12)に沿ってサンプル(24)を照明することであり、前記光源(10)は前記サンプル上に両方の空間方向に構造化された平らな照明パターン(32)を生成することと、

1つの画像ビーム経路(34)に沿って前記サンプルから来た光を表面検出器で検出することと、

前記サンプル上の前記照明パターンを1つの変位方向にシフトすることと、

前記検出器によって前記光が検出されたときに、前記変位方向(42)に沿った前記パターンの異なる位置の位相画像として1つの画像を撮影することと、

それらの位相画像から、照明されたサンプル領域の全体構造化照明顕微鏡(SIM)画像を計算により再構成することと、

を備える顕微鏡法であって、

前記変位方向が、前記照明パターン(32)の主対称軸(40、40'、40''、140、140')に対して斜めであり、前記照明パターンに応じて、前記SIM画像の再構成に必要な位相画像の数が、照明パターンの強度のフーリエ次数の数に等しい理論上最低限必要な値に一致するように、前記変位方向が選択される

顕微鏡法。

## 【請求項 2 9】

前記照明パターン(32)が六角形点パターンであり、前記変位方向(42)が、3つの主対称軸のうちの1つの主対称軸(40、40'、40'')に対して1から20度の範囲にあるように選択され、少なくとも7つの位相画像が最低限必要な値である、請求項28に記載の顕微鏡法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、対物レンズと、サンプルを照明する光源と、構造化された照明パターンをサンプル上に生成する装置と、サンプルから来る光の検出器と、サンプル上の照明パターンを変位させる装置と、照明パターンの異なる位置におけるサンプルの画像を、照明されたサンプル領域の全体画像がそれから計算により再構成される位相画像として撮影する制御ユニットとを備える顕微鏡デバイスに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

カメラ・ベースの顕微鏡蛍光(広視野)画像は、焦平面からの所望の情報が、プレパラートの他の平面からの情報によって認識できないほどにまで歪められるという欠点を有する。

## 【0003】

選択された層からの分離された情報を見ることができる層画像を生成する目的には従来、1つまたは複数のレーザ・スポットでサンプルを走査する共焦点レーザ走査法が使用されている。

## 【0004】

WO92/14118A1は、表面センサを使用して、構造化された照明(以後、構造

10

20

30

40

50

化照明)を用いて撮影された個々の画像から層画像を計算により生成する顕微鏡を開示している。計算のために使用されるそれらの個々の画像は、プレパラート上の投影された構造の位置によって異なる(これらの画像を以後「位相画像」と呼ぶ)。WO 92/14118 A1に記載されているこの照明構造は、計算に必要な2つの位相画像を生成するために正確に半周期だけ移動させなければならない2次元格子縞パターンであり、パターンがシフトされたときの極めて小さな不正確に対して結果が極めて批判的に反応するように、格子縞パターンの正方形が個々の画素上に正確に結像される必要がある。さらに、周期的な信号(この場合にはシフトされたパターンの変調)を2点だけでサンプリングすることは、ナイキスト-シャノンのサンプリング定理(Nyquist-Shannon sampling theorem)の違反を表し、これは、系統的および周期的な評価の誤りにつながる。10

#### 【0005】

サンプル上に投影されたパターンの異なる位置で生成された位相画像から層画像を計算して生成するこの方法のより実行可能な1つの別法が、WO 98/45745 A1およびWO 02/12945 A2に記載されている。この方法では、2次元構造化照明パターンの代わりに、1次元刻線格子(ruled grating)が使用され、3つ以上の位相画像から所望の層画像を計算するためには、サンプル上のこの格子の投影を少なくとも2回シフトしなければならない。

#### 【0006】

「構造化照明」と呼ばれる、上に示した手順を使用して生成された層写真では、焦点外れ(out-of-focus)情報が、共焦点レーザ顕微鏡の場合よりも良好に抑制される。さらに、この方法は、ストロークの向きに対して垂直な方向の分解能を増大させる。これは、論文「Doubling the lateral resolution of widefield fluorescence microscopy by structured illumination」、M. G. L. Gustafsson、D. A. AgardおよびJ. W. Sedat、Proc. of SPIE 3919: 141~150、2000に記載された方法で使用されている。この方法では、変位によって生成されたある時刻の3つの格子位置が、ある時刻の3つの回転位置と、格子優先方向(0°、120°および240°)に組み合わされた3×3個の位相画像が記録される。回転に関しては3つの向きで十分であり、反対に、平行移動は、3つではなく5つ以上の位置を含むことができる。したがって、直線的な平行移動および回転によって生成された少なくとも9つの位相画像から、最大で2倍に増大した分解能に関して優先方向をもはや持たない層画像が計算される。2030

#### 【0007】

EP 1 936 422 A1は、構造化照明を使用する顕微鏡であって、位相画像を撮影するために回転され、格子線に対して垂直な1つの方向にシフトされる刻線格子によって照明パターンが生成される顕微鏡を記載している。この格子は、サンプルから生じた光の光学的復調にも使用される。1次元刻線格子の代わりに、位相画像を撮影するために格子線に対して垂直な2つの方向にシフトしなければならない2次元格子を使用することもできることも述べられている。40

#### 【0008】

DE 10 2007 047 466 A1は、構造化照明を使用する顕微鏡であって、サンプル上で位相画像を撮影するためにシフトされる照明パターンが、刻線格子または2次元構造化格子によって生成される顕微鏡を記載している。この格子によって対物レンズの瞳の回折分布が生成され、この分布が次いで、例えば回折次数の選択または回転によって操作され、構造化された位相板が回転される。

#### 【0009】

DE 10 2007 047 468 A1は、構造化照明を使用する顕微鏡であって、縦方向に構造化された線形の照明によってサンプルが走査され、このサンプルの走査が、互いにバランスがとられた異なる位相画像を生成するために、異なる位相位置で、すなわ50

ち構造化の方向に線照明をシフトした後に、数回実行される顕微鏡を開示している。サンプル走査および位相シフトのため、円柱レンズによって照明された照明マスクと管状レンズの間に位置するX-Y走査器によって、照明線がシフトされる。サンプルから来た光も同様に、CCD検出器に入射する前にこの管状レンズを通過する。走査方向のサンプルの走査中に光強度を変調するため、光源と照明マスクの間には切替え可能な減衰器がある。CCD検出器上で「非デスキャンド（non-descanned）」検出が実施される。サンプルの走査は、数回繰り返され、検出器上の線パターンは、例えば線1本分だけシフトされ、これは、変調器が接続されるときの対応する遅延によって達成される。単一の位相画像を得るために、ある線を選択することによっておよびそれに隣接する画像領域を「捨てる」ことによって生成された個々の画像を1つにまとめなければならない。このようにすると、続いて調整可能な共焦点性（confocality）が達成される。10

#### 【0010】

DE101 18 463A1およびDE101 55 002A1は、構造化照明を使用する顕微鏡デバイスであって、位相画像を得るために、縦方向に正弦的に変調された線焦点がサンプル上に投影され、その線焦点を縦方向にシフトすることによって異なる位相画像が得られ、続いてそれらの位相画像のバランスが互いにとられる顕微鏡デバイスを開示している。深さ分解能を増大させるため、検出器の上流に、スロット付きの絞りがある。検出器が、中間画像平面を見るCCDカメラであるときには、このスロット付きの絞りを省くことができると述べられている。

#### 【0011】

DE10 2007 009 550B4は、移動するサンプルを観察する顕微鏡デバイスであって、サンプルが、マスクによって構造化された方法で照明され、CCDチップが、適応的に変化可能な絞りとして使用される検出器として使用される顕微鏡デバイスを記載している。20

#### 【0012】

広視野という上述の利点にもかかわらず、構造化照明顕微鏡（structured illumination microscope: SIM）がいまだに共焦点レーザ走査顕微鏡（confocal laser scanning microscope: CLSM）に取って代わることができないのは、この方法に深刻な2つの欠点があるためである。30

#### 【0013】

層画像を生成するのに必要ないいくつかの画像を撮影することは、点走査器によって画像を撮影するよりも少ない時間で済むが、点パターン走査器（回転ディスク）で撮影するのに比べればはるかに時間がかかる。点パターン走査器と比較したときのこの速度の欠点が顕著であればあるほど、層画像を計算するためにより多くの位相画像が必要であり、個々の位相画像の撮影と撮影の間により多くの操作を実行しなければならない。

#### 【0014】

サンプルが厚ければ厚いほど、サンプルが強く着色されていればいるほど、パターンによって引き起こされる個々の画像の輝度変調は小さくなる。したがって、所望の層情報を含む、変調で隠される信号は、バックグラウンド雑音によってマスクされ、雑音によってますますかき消される。したがって、層画像の信号対雑音比も低下する。40

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0015】

【特許文献1】WO92/14118A1

【特許文献2】WO98/45745A1

【特許文献3】WO02/12945A2

【特許文献4】EP1 936 422A1

【特許文献5】DE10 2007 047 466A1

【特許文献6】DE10 2007 047 468A1

10

20

30

40

50

【特許文献 7】DE 1 0 1 1 8 4 6 3 A 1

【特許文献 8】DE 1 0 1 5 5 0 0 2 A 1

【特許文献 9】DE 1 0 2 0 0 7 0 0 9 5 5 0 B 4

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献 1】「Doubling the lateral resolution of widefield fluorescence microscopy by structured illumination」、M. G. L. Gustafsson、D. A. Agard および J. W. Sedat、Proc. of SPIE 3919: 141~150、2000

10

【非特許文献 2】[http://www.aurox.co.uk/wp-content/uploads/som\\_1997\\_3.pdf](http://www.aurox.co.uk/wp-content/uploads/som_1997_3.pdf)

【非特許文献 3】[http://www.msg.ucsf.edu/gustafsson/Files/JMicrosc198\\_82-87.pdf](http://www.msg.ucsf.edu/gustafsson/Files/JMicrosc198_82-87.pdf)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

したがって、本発明の目的は、これらの欠点を緩和すること、および3次元顕微鏡法の標準機器となりうる耐久性のあるデバイスを利用できるようにすることにある。この目的は、とりわけ、必要な位相画像の数をできる限り少なくすることによって、位相画像間の操作の数を減らす（平行移動と回転に代えて平行移動だけにする）ことによって、ならびに個々の位相画像の変調の深さを増大させるのに適した一連の手段によって達成され、これは、信号対雑音比が向上した層画像につながる。

20

【課題を解決するための手段】

【0018】

この目的は、本発明で請求されているように、請求項1に記載の顕微鏡デバイスおよび請求項6に記載の顕微鏡デバイスによって達成される。

【発明の効果】

【0019】

本発明で請求されている請求項1に記載の方法の利点は、対応して選択された2次元照明構造と、この目的のために有利に選択されたサンプルに対する平らな照明パターンの変位方向とによって、必要な位相画像の数をできる限り少なくすることができます。これは特に、個々の位相画像間の必要な操作の回数にあてはまる。先行技術に記載されている平行移動と回転の代わりに、1つの平行移動だけが必要である。

30

【0020】

本発明で請求されている請求項6に記載の方法の利点は、照明パターンが、全てのサンプル領域を同時には捕捉せず、照明パターンが、サンプル上で逐次的に生成および除去され、その際に、視野全体が捕捉されるまで照明パターンが記録されることである。同時に、照明されていない全ての検出器領域が非アクティブに切り替えられる。逐次的に組み合わせられ再び分解されるパターンのこの準共焦点検出によって、変調される深さ、したがって信号対雑音比を低減させうる事実上全ての散乱光が遮蔽される。

【0021】

40

従属請求項には本発明の好ましい構成が記載されている。

【0022】

次に、添付図面を使用して、本発明を、例として詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明で請求されている顕微鏡デバイスの概略的な一例を示す図である。

【図2】本発明で使用する照明パターンの第1の例を示す図である。

【図3】図2に似た図だが、別の例を示す図である。

【図4】図1に似た図だが、本発明で請求されている顕微鏡デバイスの1つの代替例であって、特にサンプルの逐次照明に適した例を示す図である。

50

【図5】マイクロレンズ・アレイ、サンプルおよびカメラ・チップ上の照明パターンの逐次的な生成および除去を示す図である。

【図6 A】図5に似た図だが、円柱レンズ・アレイを使用する変更された2つの異なる実施形態を示す図である。

【図6 B】図5に似た図だが、円柱レンズ・アレイを使用する変更された2つの異なる実施形態を示す図である。

【図7】サンプルにわたって六角形照明パターンを連続的にシフトした1つの検出器画素上の信号の標本特性値（実線）、またはそれぞれの位相画像に対して記録された測定点（点 $I_n$ ）を示す図である。

【図8】1次次数（実線）、2次次数（破線）および3次次数（点線）に対する図7からの個々の高調波部分を示す図である。 10

【図9】式（23）に基づく格子縞パターンを示す図である。

【図10】式（41）に基づく六角形パターンを示す図である。

【図11】六角形パターンのコントラスト特性（破線）および刻線格子のコントラスト特性（実線）を、正規化された構造周波数の関数として示す図である。

【図12】格子縞照明パターンに対する1次次数の周波数空間における変位ベクトルの正射影を示す図である。

【図13】六角形照明パターンに対する1次次数の周波数空間における変位ベクトルの正射影を示す図である。

【図14】焦点ずれの方向の（ほぼ $/NA$ の周期を有する）六角形パターンの非コヒーレント・コントラスト特性にほぼ対応する軸方向の最大値の理論的な強度 - 点像分布関数の特性を表す第1の曲線（実線）、およびコヒーレント照明を仮定した $z$ 方向のこのコントラストを表す第2の曲線（破線）を示す図である。 20

【図15】図14の2本の曲線間の緩やかな遷移を示す図であり、24%から100%の間（中間値：29.4%、38.5%、45%、56%、70%）の異なる3次元コヒーレンス長または異なる相対的な瞳刺激に対する（周期的な構造を結像するときの） $z$ 方向の理論上のコントラスト特性が示されている。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0024】

図1は、構造化照明を使用する、本発明で請求されている顕微鏡デバイスの概略的な第1の例を示す図であり、照明光ビーム12を生成する光源10、マイクロレンズ・アレイ14、ビーム偏向要素16、照明光に対する第1の管状レンズ18、色分割器（color divider）20、顕微鏡対物レンズ22、サンプル24から出現した光に対する第2の管状レンズ26、およびカメラ検出器28（例えばCCDカメラ・チップ）が示されている。レンズ・アレイ14は、光源10と中間画像平面30の間に位置し、空間の2方向で構造化された平らな点パターン31が中間画像平面30に生成されるような態様で、励起光ビーム12を中間画像平面30に焦点を合わせるために使用される。第1の管状レンズ18および対物レンズ22によって、サンプル24上に点パターン31が構造化照明パターン32として結像される。図1に示された例によれば、色分割器20は照明光を反射するように作られている。サンプルで生成された、例えば蛍光と/orすることができる（この場合には照明光が励起光の役目を果たす）光34は、色分割器20を通り抜け、対物レンズ22および第2の管状レンズ26によって検出器28上で結像される。 40

##### 【0025】

異なる位相画像、すなわち3次元的に構造化された照明パターンのサンプル24に対する位相角が異なる画像を記録するため、ビーム偏向要素16によって、照明パターン32をサンプル24に対してシフトさせることができる。制御ユニット36は、この位相シフトを生じさせるのに必要なビーム偏向要素16を、カメラ28による画像撮影と同期させ、そのようにして位相画像を撮影させる。サンプルの所望の層画像を得るため、位相画像相互のバランスをとることができる。

##### 【0026】

10

20

30

40

50

顕微鏡レンズ・アレイ 14 を有する図 1 に示された装置は、レーザ光、すなわちコヒーレント光での励起、あるいは中間画像平面 30 の上流のマイクロレンズ・アレイによるパターンの生成に特に適している。示された中間画像平面 30 に穴のあいたマスク・アレイ（図示せず）を配置することができる。しかし、この穴のあいたマスク・アレイは、放射効率をそれなりに低減させる。コヒーレント光でのみ機能する第 3 の可能性を後に説明する。

【 0 0 2 7 】

図 1 に示された実施形態では、ビーム偏向要素 16 が、中間画像平面 30 と第 1 の管状レンズ 18 の間の非無限空間に位置する。ビーム偏向要素 16 は例えば、動力付きの偏向ミラー、またはピボット回転するように取り付けられたガラス窓とすることができます。動力付きの偏向ミラーは、サンプル上のパターンの位置に影響を与えるだけでなく、瞳ビームにも影響を与え、ガラス窓は反対に瞳ビームを変化させない。作用を受けた照明ビーム 12 のビーム・オフセットがその角度を変化させないためである。しかしながら、異なる位相画像を生成するためには、サンプル 24 上の照明パターン 32 の（照明光波長の大きさ程度の）比較的に小さなシフトだけが必要であるため、偏向ミラーとして作られたビーム偏向要素 16 を適当に配置することによって、対物レンズの瞳内のビーム・オフセットを無視できるほどに小さく維持することができる。ビーム偏向要素 16 を管状レンズ 18 と対物レンズ 22 の間に配置するときにこれと同じことを達成するためには、ビーム偏向要素 16 を対物レンズの瞳の近くに配置しなければならないであろう。

【 0 0 2 8 】

本発明で請求されている方法では、3 次元的に変調された励起光パターンで励起を実行し、サンプルから放出された光の残りの 3 次元変調を評価する。できるだけ大きな変調を達成するため、変調深さを低減させうるビーム経路上の重要な光学要素の数を最小限まで減らすべきである。これは、照明パターンが物体平面でだけ生じるとき、または、これが可能でない場合には、照明パターンが、結像誤差を最大限補償することができるよう画像の平面と共に役する平面で生じるときに最もよく成功する。

【 0 0 2 9 】

図 1 に示された例では、中間画像平面 30 に生成された平らなパターンのサンプル 24 上への投影が使用されるが、代替として、対物レンズの瞳からのコヒーレント照明光の干渉する焦点によって、所望の構造の照明光をサンプル 24 自体にだけ生成することもできる。例えば、サンプル平面 24（すなわち対物レンズ 22 のもう一方の焦平面）の対物レンズの瞳の六角形に配置された 7 つの点から生じたコヒーレント光からの干渉は、六角形のプランケット照明パターン 32（図 3 参照）を生成する。中間画像平面 30 に適当な位相板を挿入して、テレセントリック光学構造のために対物レンズの瞳にこれらの 7 つの点を生成することができる。

【 0 0 3 0 】

次いで、サンプル 24 上で異なる位相画像を撮影するのに必要な照明パターンの変位は、上述のビーム偏向要素 16 によって引き起こすことができるだけでなく、対物レンズの焦点および瞳の振幅の適当な相対的な位相シフトによっても引き起こすことができる。焦点を、照明パターンの回折次数に割り当てることができ、焦点の相対的な位相シフトは、サンプル 24 上の照明パターンのフーリエ次数の相対的な位相シフトに正確に一致する。この位相シフトは例えば、対物レンズの瞳の中もしくは瞳の近くのガルバノメトリック走査器（galvanometric scanner）または音響光学変調器によって生み出すことができ、あるいは無限ビーム経路上の光路に直接に影響を与えることによっても生成することができる（それが例えば、圧電アクチュエータとミラーの組合せを 1 つのアームに備える干渉計として作られているとき）。

【 0 0 3 1 】

サンプルにおける干渉による所望の照明パターンの生成はさらに、高分解能型の全反射蛍光顕微鏡法（total internal reflection fluorescence microscopy : TIRFM）も可能にする。干渉分光法によって生

10

20

30

40

50

成された照明パターンの局所周波数は、焦点相互間の相対距離に依存するため、適当な物体との分解能境界付近のこの周波数を選択することによって、すなわち瞳の縁に焦点を配置することによって、カバー・ガラスからサンプルへの境目において個々の干渉ビーム成分の全反射を達成することができる。これは、表面分解能が増大したTIRF励起を可能にする。しかしながら、サンプルに干渉パターンが生成されたとき、TIRFは、対物レンズの瞳からのサンプル上の6つの点だけが干渉するときにしか保証されないと考えなければならない。位相板を使用して対物レンズの瞳に六角形のパターンを生成する上で説明した手順では、その結果として、干渉の0次数の回折から生じた1つの点を中心にはする六角形に配置された6つの点が回折によって生じる。この0次数の回折が抑制されない場合には、TIRF測定を損ねるかなりの雑音が生じることになる。そのため、照明ビーム経路12上の「より前方の」サンプル24内の対物レンズの瞳内の干渉に必要な6つの焦点を生成するのが有利である。この場合、これはさらに、TIRF角度の可変の整合も可能にする。

#### 【0032】

図1に示された実施形態では、位相画像ごとに、照明されることになっているサンプル表面の全ての領域が、照明パターンで同時に照明される。すなわち、マイクロレンズ・アレイ14（または代替実施形態では点マスクもしくは位相マスク）が、照明光ビーム12によって大面積にわたって完全に照明される。典型的には、光学的に刺激されるこの表面が長方形であり、この表面は、できるだけ均一に光学的に刺激される。

#### 【0033】

照明パターンは、六角形の点パターンであることが好ましい。これは、一方では、六角形パターンが、位相画像のバランスをとった後の画像平面において、例えば格子縞の点パターンよりも3次元的により均質な分解能の増大を提供するためであり（六角形パターンでは、最初に述べたGustafsson他の論文に記載された3回転させた格子とちょうど同じ大きさの分解能の増大が達成される）、他方では、六角形パターンがさらに、線パターンまたは格子縞パターンよりも1.5倍小さい充填率（フィル・ファクタ（fill factor））を有するためである。この充填率のため、不必要的雑音が低減され、したがって不必要的焦平面からの雑音の寄与が低減される。基本的に、3次元的に構造化された照明パターンでサンプルを照明し、続いていくつかの位相画像を評価することによって、照明パターンの3次元位相を変化させるために照明パターンがサンプルに対してシフトされたいいくつかの位相画像が撮影され、次いでそれらの位相画像相互のバランスが適当な方法でとられたときに、不必要的焦点外れ情報が除去された層写真が生成されるだけでなく、関連画像平面内の水平分解能の増大も達成される。そうすることで、空間方向ごとに分解能を最大2倍に増大させることができる。すなわち、回折によって誘起される顕微鏡の分解能の境界を最大で2倍上回ることができる（この効果の説明は例えば、最初に引用したGustafsson他の論文に出ている）。この原理を実際に応用するためには、位相画像を得るのに必要なサンプルと照明パターンの間の運動を、必要な位相画像の数および必要な運動の単純さに関して最適化することが好ましい。

#### 【0034】

本発明の一態様によれば、パターンの主対称軸に対するパターンの変位方向の角度を巧みに選択することによって、この変位方向に沿ってパターンを変位させ、この変位方向に沿って撮影された少數の位相画像を撮影するだけで、分解能が最大限に増大した層写真を達成することが可能であることが分かった。ここで、変位方向は、照明パターンに応じて、画像の再構成に必要な位相画像の数が、考慮した照明パターンの周波数次数の数（すなわち画像の始まりで再結合された照明パターンのフーリエ次数の数）に対して理論上最低限必要な値に一致するような態様で選択される。周波数空間では、これが、選択された変位方向に対して、1つの位相画像から次の位相画像への検討中の各周波数次数が、それぞれの周波数次数の位相シフトが他の周波数次数の位相シフトとはできるだけ大きく異なる、すなわちそれぞれの周波数次数がいわばそれ自体の速度でシフトされるという意味でできるだけ明白な位相シフトを経験するという基準に対応する。

10

20

30

40

50

## 【0035】

最初に、後にセクション1から3で説明する詳細な数学的導出の重要な結果の概要を示す。

## 【0036】

図3は、一例として、照明パターンとしての六角形点パターンを示す。このパターンでは、照明パターンの1次周波数次数だけを考慮したときに、対等な3つの主対称方向のうちの1つの主対称方向（図3では符号40で示された主対称方向）に対する変位方向42の角度が $\pm 19.11^\circ$ または $n \times 60^\circ \pm 19.11^\circ$ （ $n = 1, 2, 3, \dots$ ）である（対等な3つの主対称方向を有する六方対称に基づけば、六角形点パターンには3つの1次次数があり、それに応じて、格子縞パターンでは1次次数が2つだけである）。図3に、符号44で示され、変位方向42に対して垂直な方向の角度が主対称軸40'とともに示されており、したがって、主対称軸40'は $10.89^\circ$ である。図3では第3の主対称方向が符号40"で示されている。セクション2.3で述べるように、1次次数に対して第2の解もあり、これは具体的には $10.9^\circ$ である。しかしながら、実用上の理由から（必要な絶対変位がより小さく、フォールト・トレランス（fault tolerance）がより大きいため）、第1の解の方が好ましい。好ましくは、実際には、この角度が $18.6^\circ$ から $19.6^\circ$ の間になるように変位方向42を選択すべきである。

10

## 【0037】

図2は、照明パターンとしての格子縞パターンを示す。このパターンでは、照明パターンの1次周波数次数だけを考慮したときの変位方向42と主対称軸140の間の理論上最適な角度が $71.565^\circ$ である（図2ではもう一方の主対称軸が符号140'で示されている）。基本的に、ここでは、この角度を $n \times 90^\circ \pm 71.565^\circ$ とすることができる（セクション2.2によれば、理論上は第2の解もあるが、実際には、六角形パターンに関して挙げた理由から、第2の解の方が不利である）。しかし、対称性がより高く、充填率がより小さいため、一般に六角形パターンの方が好ましい。

20

## 【0038】

照明パターンの1次周波数次数だけを考慮すると、六角形パターンの場合、変位方向42に沿った少なくとも7つの異なる位相画像を撮影しなければならず、格子縞パターンの場合には、5つの異なる位相画像で十分である。

30

## 【0039】

六角形照明パターンに関してより高い次数を考慮した結果がセクション2.5、特に表1に示されている。それによれば、例えば六角形パターンの第1および2次次数を考慮した最適な変位角は $13.90^\circ$ であり（ $5.21^\circ$ である第2の解は不利である）、画像を完全に再構成するのに13個の異なる位相画像が必要である。六角形パターンの1次、2次および3次次数を考慮すると、最適な変位角は $6.59^\circ$ であり、その場合には、画像を完全に再構成するのに19個の異なる位相画像が必要である。表1はさらに、六角形照明パターンに対して選択される変位角は、実際には、 $1^\circ$ から $20^\circ$ 、好ましくは4から $20^\circ$ （ $1^\circ$ の解の方がより適しているため）の範囲にあるように選択すべきであることを示している。正確な値は、それぞれの用途において考慮される照明パターンのフリエ次数の数に依存する。ほとんどの場合には、選択される変位角が一般に $13$ から $20^\circ$ の間であるように、1次次数または2次次数を考慮すれば十分である。

40

## 【0040】

六角形照明については、充填率が格子縞照明についてよりも小さく、照明されるフィールドはそれぞれ、照明されていない領域によって全方向から取り囲まれ、その結果、個々の位相画像の変調が増幅され、位相画像のバランスをとる際に排除される不必要な焦平面からの雑音の寄与が低減する。

## 【0041】

異なる位相画像に対するそれぞれの位相は、可能な位相角の範囲全体にわたって均一に分布することが好ましい。個々の位相画像に対して必要なパターンの変位は励起光の波長

50

の大きさ程度である（典型的には、照明パターンの3次元構造化は回折境界付近にあり、したがって励起光の波長の大きさ程度である）。照明パターンの必要な変位はこのように非常に小さいため、図1に示されているようにビーム偏向要素16を非無限空間に配置することは重大な問題にはならない。

#### 【0042】

本発明の一態様によれば、照明パターンをサンプルの全ての位置に同時に当て、記録することはせず、視野全体が捕捉されるまでサンプル上で照明パターンを逐次的に生成および除去することで、所望の焦平面以外からの雑音の寄与をさらに低減させることができる。したがって、位相フィールドごとに、照明することになっているサンプル表面の部分領域の照明パターンを生成および除去する。それらの部分領域は、全体として、照明することになっているサンプル表面をカバーする。したがって、それぞれの位相画像は、サンプル表面全体の同時照明によって生成されるのではなく、照明パターンを使用した部分照明によって逐次的に生成される。これを実行する際には、実質的にサンプル表面のちょうど照明された部分領域が結像されるときにだけ検出器領域137がアクティブになるような態様で、検出器28を起動させる。したがって検出器自体は、スロット付きの準共焦点絞りとして使用される。決められたスロット幅で記録することによってカメラ画像を撮影する別の関係から公知のこの技法は、「ローリング・シャッタ（rolling shutter）」技法とも呼ばれている。

#### 【0043】

有利なことに、照明パターンが、「ローリング・シャッタ」が動く方向と同じ方向に移動するストリップの形態に生成および除去される。これが、六角形パターンを使用して図5に示されている。図5の上部には、時刻 $t_0$ における、六方対称に作られたマイクロレンズ・アレイ14上の照明光ストリップ112の位置（図5の左側）、マイクロレンズ・アレイ14によって生成された六角形に構造化された照明パターンのストリップ132のサンプル24上の位置（図5の中央）、およびストリップ132によって照明されたサンプル領域のストリップ型の像137のカメラ・チップ28上の位置（図5の右側。領域137は、時刻 $t_0$ においてアクティブに切り替えられたカメラ・チップの部分にも対応する）が示されており、図5の下部には、時刻 $t_n$ におけるストリップ112、132および137のそれぞれの位置が示されており、図5には、ストリップ112、132および137が移動する方向が符号133で示されている。図5には、それぞれの時点でアクティブでない検出器28の部分が、符号135で示された灰色の部分によって示されている。

#### 【0044】

照明され検出されるストリップ132の方向133に沿った幅が狭くなるほど、この装置は、一方向に共焦点である装置により近づき、境界事例では、この装置がストリップ共焦点顕微鏡（「スリット走査共焦点」）である。ストリップ132の幅が、カメラ・チップ28の高さと一致するように選択される場合、これは、位相画像を撮影する間、照明パターンが動かない図1から3を参照して上で説明した場合に相当する。より幅の狭いストリップ132を選択するほど、不必要的焦平面上の信号の寄与はより抑制され、その結果、変調深さが増大し、信号／雑音比が向上する。しかし同時に、露光時間がより短くなり、それに対応して、所与の信号／雑音比率を達成するためには、パターンの個々の点をより明るくしなければならない。しかしながら、サンプルに当たる光量が増大したときよりもピーク強度が増大したときの方がサンプルの損傷は大きくなるため、共焦点性の増大とともに、励起光によるサンプルの損傷も同様に増大する。サンプルの損傷を防ぐためには、より長い測定時間またはより低い信号対雑音比を許容しなければならない。前者の場合には、サンプルにわたって照明ストリップ132をよりゆっくりと移動させる代わりに、1つのストリップ位置でいくつかの位相画像を撮影し、それらの位相画像から平均をとる。照明ストリップの幅を変化させることによって、信号／雑音比、画像撮影速度およびサンプル損傷間のその時点で最良の妥協点を選択することができる。

#### 【0045】

10

20

30

40

50

(図5に示されているような)六角形パターンを使用するときには、(図5に示されているような)3線照明ストリップ132を使用すると、理論上可能な最も大きな分解能の増大を達成することができ、いずれにせよ、カメラ・チップ28上のアクティブな検出ギャップの幅を、このストリップ幅に正確に一致する幅よりもいくらか小さくまたはいくらか大きく設計することは、アーチファクトを回避するのに有用である。

#### 【0046】

この手順は、(例えばDE10 2007 047 468A1に記載された方法とは対照的に)構造化照明を、カメラ・チップ28上のデスキャンド(descanned)共焦点検出と組み合わせる。例えばDE10 2007 047 468A1に記載された方法とは対照的に、照明パターンの逐次的な生成および除去の間に照明光の強度を時間とともに変調する必要がなく、照明ストリップの1つの位置から次の位置への「フィードスルー(feedthrough)」がなく、1回の走査プロセスの終わりに、検出器チップの全ての線を使用する完全な位相画像が既にあり、その後の画像の共焦点補正の必要がない。

10

#### 【0047】

この提案の方法の実用上の利点を、sCMOSチップを使用して簡単に説明する。そのローリング・シャッタ・モードにおいて、このチップは、10ミリ秒の間に1080本の線を読み出すことができる。これは、10マイクロ秒/画素/線である。8本の画素線上に「エアリー・ディスク(Airy Disk)」が投影される場合、1つの六角形基本セルには、その読み出しに222マイクロ秒かかる24本の画素線が属する。したがって位相画像の撮影には10,222ミリ秒かかる。ビームの戻りにかかる時間を現実的な最大768マイクロ秒と見積もった場合、1つの位相画像を撮影するのに11ミリ秒かかり、高分解能の層画像に必要な全ての位相画像の撮影には7倍の時間、すなわち77ミリ秒かかる。したがって、原理上は、 $2540 \times 1080$ 画素の画像サイズで、1秒当たり13個の層画像が得られる。この目的の共焦点顕微鏡は、この目的により長い時間を必要とし、同時に、劇的により多くのサンプルをロードする。フィールドのサイズを小さくすることにより、それに対応してより速い写真撮影速度を、サンプルローディングを増大させることなく達成することができる。

20

#### 【0048】

図4は、前述のサンプルの逐次構造化照明を実現することができる顕微鏡デバイスを概略的に示す。図1に基づく構造とは対照的に、光源10と顕微鏡アレイ14の間に、走査デバイス50、走査レンズ52および動力付きの走査ミラー54があり、これらは、マイクロレンズ・アレイ14を照明する目的に使用するレーザ・ビーム12をマイクロレンズ・アレイ14を横切って移動させるためのものであり、このレーザ・ビーム12の移動は、マイクロレンズ・アレイ14が、方向133に沿って移動するストリップ112の形に逐次的に照明されるような態様で実施される。その際には、中間画像平面30に、対応して移動する照明された点パターンのストリップが形成され、このストリップは、それに応じて、逐次的に生成および除去される照明パターンの対応して移動するストリップ132が形成するように、第1の管状レンズ18および対物レンズ22によってサンプル24上に結像される。サンプル上で照明ストリップ132を移動させるためには、サンプル上で異なる位相画像を得るために必要な照明光パターンの変位の経路よりもはるかに大きな経路が必要であるため、この目的のために、光源10から見て、走査の間、対物レンズの瞳内のビームの位置が一定であるように対物レンズの瞳と共に役する、平面内の中間画像平面30の前に位置する、特別な走査デバイス50を提供しなければならない。走査デバイス50は、(マイクロレンズ・アレイ14を横切って光ストリップ112を移動させることによって)重大でない照明ストリップ132だけを移動させ、走査光学部品を通過する際にその変調深さが深刻に悪化するであろう非常に決定的に変調された照明光は移動させない。変調深さの悪化はさらに、位相画像の変調深さを特に劣化させるであろう。図4に示された構造では、変調された照明画像が、カメラ画像に対して絶対的に対称な平面でのみ生成されることによって、これらの問題が回避され、その結果、この光学システムの全ての

30

40

50

誤差が補償される。上で述べたのと同様に、中間画像平面30の前のマイクロレンズ・アレイ14の代わりに、中間画像平面30自体に、穴のあいたマスク・アレイ（図示せず）または位相板（同じく図示せず）を導入することができる。上で述べたのと全く同じように、位相画像を生成するのに必要なビームの偏向が、例えばビーム偏向要素16を使用して実行される。

【0049】

図1の例と同様に、六方対称性を有する1つのパターンを使用することが好ましく、その結果、サンプル平面における分解能を最大にすることができる。その際、図4の例でも、図1の例と同様に、レンズ・アレイ14の代わりに、中間画像平面30に置かれた対応する穴のあいたマスクを使用することができる。

10

【0050】

分解能を最大限に増大させることを断念して、より速い画像速度を達成しようとする場合には、六角形パターンの代わりに、ストリップ・パターンを、サンプル上の照明パターンとして生成し、このストリップ・パターンを、図4および5を参照して六角形パターンに関して説明した方法で、逐次的に走査し、照明されていないサンプル領域からの全ての放射を遮蔽することができる（デスキヤンド検出）。本発明のこの態様では、1つの位相画像に対してサンプル上に逐次的に形成される照明パターンが、1つの空間方向、すなわち照明ストリップの縦方向にだけ構造化され、その一方で、この方向に対して垂直な方向、すなわち照明パターンの逐次的な生成および除去の方向133では3次元構造化が実施されない。これは、「ローリング・シャッタ」の同期した移動によって検出器上だけで起こる。

20

【0051】

ここでは、サンプルの一方の側の損傷（ストリップの幅が広いほど、サンプルを局所的に照明する強度は低くなる）と信号／雑音比の向上との間の最適化された妥協を、照明ストリップ132の選択された幅にわたって変調深さを増大させることによって確立することができる。

【0052】

図6Aは、高さにおいて回折限界がある1つのストリップ132だけが照明され、その結果、「スリット共焦点」構造の利点が、構造化されたストリップ照明を使用する構造の利点と組み合わされる境界事例を示す。

30

【0053】

例えば図6Aに示されているようなストリップ・パターンを生成するため、円柱レンズ・アレイ114を使用することができ、それらのレンズの軸方向は、走査デバイス50によって円柱レンズ・アレイ114を横切って移動する照明光ビーム・ストリップ112によって照明ストリップ132が生成および除去される方向133と一致する。あるいは、方向133に対してストリップが平行に走るストリップ・マスクを、中間画像平面30において使用することもできる。しかしながら、円柱レンズ・アレイ114を使用すると、放射効率が（ほぼ）2倍になる。円柱レンズ・アレイ（または格子）を省くことにより、古典的なスロット付きマスク共焦点顕微鏡が得られる。その深さ分解能は、本発明で請求されている装置のそれよりも低いが、画像を撮影するのに単一走査だけが必要であり、3回の走査を必要としない。

40

【0054】

所望の焦平面の外側にある全ての平面からの情報をできるだけ少なくし、そのようにして最も大きな変調深さおよび最適な信号／雑音比を達成するのに適した他の手段は、多光子励起によってサンプル内に所望の照明パターンを生成することにある。その際には、多光子励起の既知の層感度が使用され、多光子励起の非線形性の結果として、実質的に所望の焦平面だけでサンプルの蛍光励起が起こる。このようにすると、サンプル内のさらに深い位置で光の最大変調励起が達成され、位相画像の計算評価では、サンプルの他の平面からの依然として散乱する放出光だけを除去しなければならない。

【0055】

50

プランケット点パターン、すなわちカメラ・チップ全体にわたって広がる点パターンは、あまりに多くの点にレーザ出力を分布させ、励起の二次強度従属性の結果として、非現実的に高いレーザ出力を必要にするであろう。したがって、先に述べたようにしてレーザ出力を幅の狭いストリップ 132 上だけに集中させ、そのレーザ出力を、逐次的に生成および除去される点パターンとして、照明することになっているサンプル表面にわたって導くことが有利である。その結果生じた蛍光は、このときにはアクティブに切り替えられているカメラ・チップ 28 の領域 137 上で、前述の方法で、蛍光に対して平行に、逐次的かつ選択的に検出される。2 倍（または 3 光子励起では 3 倍）の励起波長はより低い分解能を提供するが、この方法は主に、良好なコントラスト、高い速度およびサンプルの低い光子ローディングを目指している。したがって、図 6 A に記載された照明モードは多光子励起に対して特によく適している。 10

#### 【 0056 】

センサ幅のストリップ（多光子励起ではこれが一般に約 1 ストロークであり、これは、十分に高い局所強度が期待されるのがこの方式だけであるためである）の輝度が、十分な信号を得るのに十分に高いとは言えない場合には、照明ストロークの幅を短くすることができる。走査プロセス中に、ストロークを、走査方向に対して垂直にシフトすることができる場合、すなわち走査デバイス 50 が双方向性走査デバイスとして設計されている場合には、この短いフィールドの欠陥を（少なくとも部分的に）埋め合わせることができる。この理由で、単一軸走査器 54 は、2 軸走査デバイス（図示せず）に置き換えられなければならない。多光子顕微鏡法は、好ましい 1 つの方向を有する神経構造体の観察に頻繁に使用されているため、この「アイル走査（a i l e s c a n）」は、多くの場合に、重要な全ての画像要素を検出することができるが、それは、視野の一部分だけにしか及ばない。このアイル走査の一例が、図 6 B に、図 6 A に示した例の変更例として示されている。 20

#### 【 0057 】

2 次元照明パターンでは、できるだけ少ない数の位相画像から最適な結果を得ることを可能にするためにパターンを直線的にシフトしなければならない最適な角度が存在するが、ストリップ・パターン（すなわち一方向にだけ変調された 1 つの照明パターン）を使用するときには、ストリップを横切る方向の 1 つの成分の変位が 1 つの変調位相を有し、3 つの異なる位相画像のうち少なくとも必要な数の画像を撮影することができる限りにおいて、基本的に、個々の位相画像間の照明パターンの好ましい変位方向は存在しない。同じ測定装置によって、高速モード（逐次ストリップ構造を含み、必要な位相画像が 3 つだけである）と、例えば少なくとも 7 つの位相画像を含む六角形照明パターンを使用する 1 つの高分解能モードとを、中間画像平面 30 の上流のマイクロレンズ・アレイ 14（または中間画像平面 30 に配置されたいずれも図示されていな穴のあいたマスクもしくは位相板）以外は置き換える必要なしに、迅速かつ容易に切り換えることを可能にするためには、六角形パターンに対して最適な変位角をビーム偏向 16 が可能にするように、ビーム偏向 16 の向きを選択することが好ましい。この場合、再び、同じ装置を使用して、（少なくとも）3 つの位相画像を生成する線状ストリップ照明の変位を実現することができる。 30

#### 【 0058 】

照明平面における前述の分解能の増大に加えて、構造化照明はさらに、z 方向の分解能の増大も可能にする。これは、周期的なコヒーレント光パターンを使用した表面照明では、トールボット（T a l l b o t）効果により、対物レンズの実際の焦平面の上下に一連の 2 次焦点が自動的に生じることによる。両方向の最初の 2 次焦点は、より低い強度を有する反転されたパターンを表す。同時に、z 方向のこれらの焦点は全て、個々の回折限界焦点よりも鮮明である。1 次元刻線格子の場合に関して、これは既に Gustafsson 他によって記述されている。ここでは、六角形構造を有する 2 次元照明も、評価された画像においてより良好な結果を与える。六角形パターンの 3 本の線だけまた 4 本以上の線が同時に照明されるときには、分解能に対して有利な効果も生じる。 40

#### 【 0059 】

10

20

30

40

50

このように、本発明で請求されている方法を使用すると、光学顕微鏡の横方向と軸方向の両方の分解能を明らかに増大させることができ、このことは、サンプルの高度に分解された3次元画像を撮影することを可能にする。

【0060】

次に、格子縞パターンおよび六角形パターンに対する最適な変位角の数学的導出を説明する。

1. 1次元構造化照明

現在において一般的な全ての構造化照明法では、1つの空間方向の1つまたは複数の周波数を有するパターンが使用される。その際には、いくつかの位相画像を撮影し、撮影と撮影の間にはパターンまたはパターンの画像をシフトしなければならない。1つの空間方向の1つの周波数を仮定すると、1番目の位相画像の1つの画素( $x, y$ )の強度は下式のように書くことができる。

【0061】

【数1】

$$I_l(x, y) = I_0 + I_s \cos\left(\underbrace{k_g}_{\frac{2\pi}{p_g}}(x - x_0) - \alpha_l\right)$$

10

20

【0062】

$k_g$ は格子の空間周波数、したがって $p_g$ は周期であり、 $x_0$ は、座標系の零点に対する強度ピークの絶対位置である。 $I_0$ は非共焦点信号、 $\alpha_l$ は位相変位の量、 $I_s$ は、全ての画素全体に対して光学的断面図(またはさらに準共焦点画像)を与えるいわゆる切断信号(sectioning signal)を表す。

【0063】

一般性を失うことなく、前述の式では格子周波数が $x$ 方向の周波数である。

【0064】

前述の式の未知の変数は、 $I_0$ 、 $I_s$ および $x_0$ または $k_g x_0 = \alpha_0$ である。

【0065】

30

この $\cos$ 関数が複素指数関数で書かれ、 $(x) := k_g x - \alpha_0$ を使用する場合には下式が得られる。

【0066】

【数2】

$$I_l(x, y) = I_0 + \frac{1}{2} I_s e^{i\Phi(x)} e^{-i\alpha_l} + \frac{1}{2} I_s e^{-i\Phi(x)} e^{i\alpha_l} \quad (1)$$

【0067】

40

(いくつかの位相画像に対応する)添字1のいくつかの値に対して、式(1)は一次方程式系を与える。3つの未知数 $I_0$ 、 $I_s$ および $\alpha_0$ があることに基づくと、定義または重複定義された方程式系を得るために、少なくとも3つの方程式が必要である。

【0068】

しかしながら、解決可能性は、 $\alpha_l$ に対してどんな値を選択するかにも依存する。

【0069】

特に3つの行(したがって3つの位相画像)に対しては、この式が下式を与える。

【0070】

【数3】

$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ I_3 \end{pmatrix} = \underbrace{\begin{pmatrix} 1 & e^{-i\alpha_1} & e^{i\alpha_1} \\ 1 & e^{-i\alpha_2} & e^{i\alpha_2} \\ 1 & e^{-i\alpha_3} & e^{i\alpha_3} \end{pmatrix}}_{=: \hat{A}} \begin{pmatrix} I_0 \\ \frac{1}{2}I_s e^{i\Phi} \\ \frac{1}{2}I_s e^{-i\Phi} \end{pmatrix}$$

10

(2)

【0 0 7 1】

この  $3 \times 3$  方程式系は、

【0 0 7 2】

【数4】

 $\hat{A}$ 

【0 0 7 3】

の行列式が 0 でない限り解くことができる。その行列式が 0 でなければ

【0 0 7 4】

【数5】

 $\hat{A}$ 

【0 0 7 5】

を逆行列にするにすることができるためである。

【0 0 7 6】

【数6】

 $\hat{A}$ 

20

【0 0 7 7】

の行が直交する

【0 0 7 8】

【数7】

$$\alpha_l = \{0, \frac{2\pi}{3}, \frac{4\pi}{3}\}$$

30

【0 0 7 9】

を選択することによって、条件付けされた可能な方程式系が得られる（最大行列式）。

【0 0 8 0】

40

【数8】

$$\hat{A} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{-i\frac{2\pi}{3}} & e^{i\frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{-i\frac{4\pi}{3}} & e^{i\frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix}$$

10

【0 0 8 1】

【数9】

$$\hat{A}$$

【0 0 8 2】

は、因数

【0 0 8 3】

【数10】

$$\sqrt{3}$$

20

【0 0 8 4】

を除いた場合にユニタリ行列である。すなわち、

【0 0 8 5】

【数11】

$$\hat{A}$$

【0 0 8 6】

の逆行列は、その隨伴行列

【0 0 8 7】

【数12】

30

$$\hat{A}^{-1} = \frac{1}{3} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{i\frac{2\pi}{3}} & e^{-i\frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{i\frac{4\pi}{3}} & e^{-i\frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix}$$

40

【0 0 8 8】

に比例する。

【0 0 8 9】

解として、焦点外れ信号

$$I_0 = I_1 + I_2 + I_3 \quad (4)$$

とは別に、断面図

【0 0 9 0】

【数13】

$$I_s = |I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{3}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{3}}| = \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_2 - I_3)^2 + (I_3 - I_1)^2} \quad (3)$$

【0091】

が得られる。

【0092】

式(3)は、技術文献において、ウィルソン(Wilson)アルゴリズムとして知られている(例えば[http://www.aurox.co.uk/wp-content/uploads/som\\_1997\\_3.pdf](http://www.aurox.co.uk/wp-content/uploads/som_1997_3.pdf)を参照されたい)。前述の状況を解釈する別の可能性は、個々の位相画像の(空間周波数)スペクトルを重畠することである。 10

【0093】

線形蛍光励起用の顕微鏡対物レンズの焦平面では、放射の強度分布  $E(x, y)$  が下式によって与えられる。 20

【0094】

【数14】

$$E(\vec{x}) \propto O(\vec{x})S(\vec{x})$$

【0095】

【数15】

$$O(\vec{x})$$

【0096】

は物体の蛍光体の局所密度、

【0097】

【数16】

$$S(\vec{x})$$

【0098】

は励起光の強度である。放射スペクトルに対する畠込み定理に基づくと下式が得られる。 30

【0099】

【数17】

$$\tilde{E}(\vec{k}) \propto \tilde{O}(\vec{k}) * \tilde{S}(\vec{k}) = \int dk' \tilde{O}(\vec{k}') \tilde{S}(\vec{k} - \vec{k}') \quad (5)$$

【0100】

【数18】

$$S(\vec{x}) \equiv \text{一定}$$

【0101】

の場合には

【0102】

【数19】

$$\tilde{S}(\vec{k}) \propto \delta(\vec{k})$$

【0103】

が当てはまり、したがって、

【0104】

【数20】

$$\tilde{E}(\vec{k}) \propto \tilde{O}(\vec{k}).$$

10

【0105】

も当てはまる。

【0106】

格子を用いた周期的な励起

【0107】

【数21】

$$S(\vec{x}) = 1 + \cos(\vec{k}_g \vec{x} - \Phi_0)$$

【0108】

20

を使用すると、

【0109】

【数22】

$$\tilde{S}(\vec{k})$$

【0110】

に対する一組のディラック (Dirac) デルタ分布が生じる。

【0111】

【数23】

$$\tilde{E}(\vec{k}) \propto \tilde{O}(\vec{k}) * \underbrace{\left( \delta(\vec{k}) + \frac{C_g}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}_g) e^{-i\Phi_0} + \frac{C_g}{2} \delta(\vec{k} + \vec{k}_g) e^{i\Phi_0} \right)}_{S(\vec{k})} = \quad (6)$$

30

$$= \tilde{O}(\vec{k}) + \frac{C_g}{2} \tilde{O}(\vec{k} - \vec{k}_g) e^{-i\Phi_0} + \frac{C_g}{2} \tilde{O}(\vec{k} + \vec{k}_g) e^{i\Phi_0} \quad (7)$$

【0112】

$C_g$  は、物体の厚さが 0 の場合（したがって焦点外れ信号が全くない場合）に達成することができる格子のコントラストを表す。式 (7) から、位相画像のスペクトルが、物体スペクトルのいくつかの重畠からなることが明らかであり、原点はそのたびに、対応する周波数にシフトされている。

40

【0113】

これらの重畠された次数の分離の後、増大した横方向の分解能を有する画像を計算することが可能である（最初に 1 つの方向）。（例えば [http://www.msg.ucsf.edu/gustafsson/Files/JMicrosc198\\_82-87.pdf](http://www.msg.ucsf.edu/gustafsson/Files/JMicrosc198_82-87.pdf) を参照されたい。）

ここでの次数の分離は、断面図と雑音の分離と正確に同じように機能する。以下ではこの概念を超分解能 (superresolution) と呼ぶ。

2 . 1 行列

【 0 1 1 4 】

【数 2 4 】

$\hat{A}$

【 0 1 1 5 】

1 次元構造化照明に関して、行列

【 0 1 1 6 】

【数 2 5 】

$\hat{A}$

10

【 0 1 1 7 】

は、 $3 \times 3$ よりも多くの成分を有することができる。格子周波数がおよそ  $n$  A i r y に設定される場合、(式(1)と同様に)格子の画像内の回折の  $n$  個の次数が再結合される。

【 0 1 1 8 】

【数 2 6 】

$$I_l(\vec{x}) = I_0(\vec{x}) + \frac{1}{2} \sum_{m=1}^n I_s^{(m)}(\vec{x}) e^{i\Phi_m(\vec{x})} e^{-i\alpha_{l,m}} + \frac{1}{2} \sum_{m=1}^n \underbrace{I_s^{(-m)}(\vec{x})}_{I_s^{(m)}} \underbrace{e^{-i\Phi_m(\vec{x})}}_{e^{i\Phi_{-m}(\vec{x})}} \underbrace{e^{i\alpha_{l,m}}}_{e^{-i\alpha_{l,-m}}} = \quad (8)$$

20

$$= \underbrace{e^{i\Phi_0(\vec{x})}}_{e^{i\Phi_0(\vec{x})}} \underbrace{e^{-i\alpha_{l,0}}}_{e^{-i\alpha_{l,0}}} I_0(\vec{x}) + \sum_{m=1}^n e^{-i\alpha_{l,m}} \cdot \frac{1}{2} I_s^{(m)}(\vec{x}) e^{i\Phi_m(\vec{x})} + \sum_{m=-1}^{-n} e^{-i\alpha_{l,m}} \cdot \frac{1}{2} I_s^{(m)}(\vec{x}) e^{i\Phi_m(\vec{x})} \quad (9)$$

【 0 1 1 9 】

したがって、画素

【 0 1 2 0 】

【数 2 7 】

$\vec{x} = (x, y)$

30

【 0 1 2 1 】

上の信号は、 $N = 2n + 1$  個の次数の重畠によって与えられる。添字 1 は、1 番目の位相画像を表し、添字 m は、対応するそれぞれの周波数の高調波次数を表す。

【 0 1 2 2 】

【数 2 8 】

$$\Phi_m(\vec{x}) = \vec{k}_m \circ \vec{x}$$

【 0 1 2 3 】

が当てはまる。

40

【 0 1 2 4 】

式(9)を行列表記法で書くことができる。

【 0 1 2 5 】

【数29】

$$\underbrace{\begin{pmatrix} I_1(\vec{x}) \\ I_2(\vec{x}) \\ \vdots \\ I_M(\vec{x}) \end{pmatrix}}_{\text{測定値}} = \hat{A} \cdot \begin{pmatrix} I_0(\vec{x}) \\ \frac{1}{2}I_s^{(1)}(\vec{x})e^{-i\Phi_1(\vec{x})} \\ \frac{1}{2}I_s^{(-1)}(\vec{x})e^{+i\Phi_1(\vec{x})} \\ \frac{1}{2}I_s^{(2)}(\vec{x})e^{+i\Phi_2(\vec{x})} \\ \vdots \\ \frac{1}{2}I_s^{(-n)}(\vec{x})e^{+i\Phi_n(\vec{x})} \end{pmatrix} \quad (10)$$

10

20

【0126】

Mは、取得した測定値（位相画像）の数を表す。式(10)の右辺のベクトルはN = 2n + 1個の成分を有し、したがって

【0127】

【数30】

$$\hat{A}$$

【0128】

はM × N行列である。

【0129】

30

【数31】

$$\hat{A}$$

【0130】

が全単射（bijective）であり、逆行列にするためには、下式

$$M = N$$

および

【0131】

【数32】

$$\text{rang}(\hat{A}) = N$$

40

【0132】

が当てはまらなければならない。

【0133】

【数33】

$$\hat{A}$$

【0134】

の成分は下式によって与えられる。

【0135】

50

【数34】

$$\hat{A}_{l,m} = e^{-i\alpha_{l,m}} \quad (11)$$

【0136】

1つの位相画像から次の位相画像へ常に同じ横方向の変位

【0137】

【数35】

$$\vec{\Delta}$$

【0138】

が起こり、最初の位相画像 ( $l = 1$ ) が全く変位しないとみなされる場合には、下式が当てはまる。

【0139】

【数36】

$$\alpha_{l,m} = (l-1)\delta\Phi_m = (l-1)\vec{k}_m \circ \vec{\Delta} \quad (12)$$

【0140】

(一般性を失うことなく  $\times$  方向の) 格子のこの特別なケースに対しては、

【0141】

【数37】

$$\vec{k}_m = m \frac{2\pi}{p} \hat{e}_x$$

【0142】

および

【0143】

【数38】

$$\alpha_{l,m} = (l-1) \cdot m \cdot \Delta \frac{2\pi}{p} \cdot \cos(\theta) \quad 30$$

【0144】

である。 は、変位方向と  $\times$  軸の間の角度を表し、

【0145】

【数39】

$$\Delta = |\vec{\Delta}|$$

【0146】

である。

【0147】

したがって、この格子に関しては、周波数方向に対して垂直な方向を除く任意の変位方向が可能である。

【0148】

10

20

30

40

【数40】

$$\Delta = \frac{p}{N} \frac{1}{\cos(\theta)}$$

【0149】

が選択される場合には、

【0150】

【数41】

$$\alpha_{l,m} = (l-1) \cdot m \cdot \frac{2\pi}{N}$$

(13)

10

【0151】

であり、この特別な選択に対する

【0152】

【数42】

$$\hat{A}_{l,m} = e^{-i(l-1)m\frac{2\pi}{N}}$$

20

【0153】

は離散的フーリエ変換を与え、下式が当てはまる。

【0154】

【数43】

$$\sum_m \hat{A}_{l,m} \hat{A}_{n,m}^* = \sum_{m=1}^N e^{-i(l-n) \cdot m \frac{2\pi}{N}} = N \cdot \delta_{l,n}$$

30

【0155】

したがって

【0156】

【数44】

$$\hat{A}$$

【0157】

はユニタリ行列に比例する。

【0158】

明らかに、1つの画素上のこの信号は、N個の点で離散的に走査される（N個の高調波部分を有する）周期関数として思い浮かべることができる（図（7）を参照されたい）。

40

【0159】

それらの高調波部分の相対強度は求められるため、この離散的フーリエ変換は正確な変換である。図（8）は、図（7）から数学的に分解された部分を示す。

【0160】

格子の代わりに、（いくつかの方向の周波数の次数を有する）より一般的な周期構造が使用されるときにも、式（10）の表現は当てはまる。本明細書に記載されているようなより一般的な周期構造に対して最適に解くことができる状況を達成するため、 $\alpha_{l,m}$ （したがって、m番目の位相画像の1番目の次数に対する位相変位）は、式（13）のように書くことができるはずであり、

50

【0 1 6 1】

【数45】

$$\alpha_{l,m} = (m-1) \cdot l \cdot \frac{2\pi}{N}$$

【0 1 6 2】

いくつかの方向の周波数を有する構造に対するフーリエ次数は、望みどおりに示すことができる。

【0 1 6 3】

この点に関して、最適に解くことができる、ということは、行列の最適な条件付けまたは最少の条件数を意味する。行列の条件数は、一次方程式系の解において誤差がどのくらい伝播するのかを示す。したがって、条件数に対する可能な最も小さな値は1となる。

【0 1 6 4】

【数46】

$$\hat{A}\vec{x} = \vec{y} \quad (14)$$

$$\Rightarrow \vec{x} = \hat{A}^{-1}\vec{y} \quad (15)$$

$$\Rightarrow \frac{\|\delta\vec{x}\|}{\|\vec{x}\|} \leq \frac{\|\delta\vec{y}\|}{\|\vec{y}\|} \cdot \text{cond}(\hat{A}) \quad (16)$$

$$\text{cond}(\hat{A}) := \|\hat{A}\| \cdot \|\hat{A}^{-1}\| \quad (17)$$

【0 1 6 5】

条件数が最小の(1)となるのは、

【0 1 6 6】

【数47】

$$\hat{A}$$

【0 1 6 7】

がユニタリ行列である場合である。(ユニタリ行列(およびそれらの逆行列)の固有値は全て

【0 1 6 8】

【数48】

$$\mathbb{C}$$

【0 1 6 9】

の単位円上にある。このことから、式(17)によって、それは

【0 1 7 0】

【数49】

$$\text{cond}(\hat{A}) = 1 \cdot 1 = 1$$

【0 1 7 1】

に従う)。

## 2.2 チェス盤

前述の方法の1つの展開として、いくつかの方向の周波数を含む構造を使用することに

10

20

30

40

50

よって、位相画像が生成されている間にこの構造が一方向にだけ変位するときに、いくつかの方向の周波数部分を互いから分離することもできるかどうかを検討した。

【0172】

一方で、これに対する動機付けは、準共焦点構造化照明（格子は1つの向きに移動し、回転しない）の従来の方法が非常に異方性であること、すなわちコントラストが焦平面から一方向にのみ再構成されることである。

【0173】

他方で、2つ以上の方の周波数部分の評価は、光軸に対して構造体を回転させず、位相画像をほとんど使用しない超分解能評価を可能にする。変位が一方向にだけ起こることは、超分解能を有する構造化照明の使用を単純にし、この概念をより高速かつより堅牢にする。

【0174】

この状況を式(2)のそれと比較した場合、数学的課題が、個々の周波数を1つの明白な位相変位で一度に特徴づけること、したがってそれらを識別可能にすることにあることは明白である。

【0175】

辺の長さ  $a$  のチェス盤のフーリエ表現

【0176】

【数50】

$$\mathfrak{S}(x, y)$$

10

20

【0177】

は以下のとおりである。

【0178】

【数51】

$$\mathfrak{S}(x, y) \propto \quad (18)$$

$$\int d\vec{k} e^{i\vec{k}(\vec{x}-\vec{x}_0)} \left( \sum_{m,n=-\infty}^{+\infty} \delta(\vec{k} - \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix}) \right) \text{sinc}\left(\frac{k_x a}{2}\right) \text{sinc}\left(\frac{k_y a}{2}\right) \quad (19) \quad 30$$

$$\cdot \cos\left[\frac{a}{2}(k_x + k_y)\right] = \quad (20)$$

$$\sum_{m,n=-\infty}^{+\infty} e^{i\frac{\pi}{a}(\vec{x}-\vec{x}_0) \cdot \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix}} \text{sinc}\left(\frac{\pi m}{2}\right) \text{sinc}\left(\frac{\pi n}{2}\right) \cos\left[\frac{\pi}{2}(m+n)\right] = \quad (21)$$

$$\sum_{m,n=-\infty}^{+\infty} e^{i\frac{\pi}{a}((x-x_0)m+(y-y_0)n)} \text{sinc}\left(\frac{\pi m}{2}\right) \text{sinc}\left(\frac{\pi n}{2}\right) \cos\left[\frac{\pi}{2}(m+n)\right] = \quad (22) \quad 40$$

$$1 + \sum_{m,n} \left( \frac{2(-1)^{\frac{m-1}{2}}}{m\pi} \right) \left( \frac{2(-1)^{\frac{n-1}{2}}}{n\pi} \right) e^{i\frac{\pi}{a}[(x-x_0)m+(y-y_0)n]} \quad (23)$$

(m+n) 直線

【0179】

チェス盤は、チェス・ゲームでも一般に行われているように、または図(9)に示されているように、この表現で方位が定められる。

50

【 0 1 8 0 】

したがって、チェス盤の空間周波数ベクトルは一般に下式によって与えられる。

【 0 1 8 1 】

【数 5 2】

$$\vec{k}_{m,n} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix}$$

【 0 1 8 2 】

10

顕微鏡対物レンズの分解能境界に近いチェス盤の周波数が選択された場合には、1次次数

【 0 1 8 3 】

【数 5 3】

$$\vec{k}_{1,1} =: \vec{k}^+ \text{ および } \vec{k}_{1,-1} =: \vec{k}^-$$

【 0 1 8 4 】

だけが画像に再結合される。

【 0 1 8 5 】

20

【数 5 4】

$$\mathfrak{S}(x, y) \propto 1 + \frac{8}{\pi^2} \cos \left[ \frac{\pi}{a} (x + y) - \Phi_0^+ \right] + \frac{8}{\pi^2} \cos \left[ \frac{\pi}{a} (x - y) - \Phi_0^- \right]$$

【 0 1 8 6 】

ここでは、チェス盤の2つの周波数方向が添字 + および - で示されている。

【 0 1 8 7 】

式(1)と同様に下式が得られる。

【 0 1 8 8 】

30

【数 5 5】

$$I(x, y) = I_0 + I_s^+ \frac{8}{\pi^2} \cos \left[ \frac{\pi}{a} (x + y) - \Phi_0^+ \right] + I_s^- \frac{8}{\pi^2} \cos \left[ \frac{\pi}{a} (x - y) - \Phi_0^- \right] \quad (24)$$

【 0 1 8 9 】

式(1)と比べると、この式には5つの未知数

【 0 1 9 0 】

【数 5 6】

$$I_0, I_s^\pm \text{ および } \Phi_0^\pm$$

40

【 0 1 9 1 】

がある。したがって、これらの未知数を決定するのに少なくとも5つの位相画像が必要である( $N = 5$ )。

【 0 1 9 2 】

横方向の変位について

【 0 1 9 3 】

【数 5 7】

$$\vec{\Delta} = (\Delta_x, \Delta_y)$$

【 0 1 9 4 】

50

により次数  $i$  に対して生じる位相変位は、

【0 1 9 5】

【数 5 8】

$$\delta\Phi_l = \vec{k}_l \circ \vec{\Delta}$$

【0 1 9 6】

であり、したがって、これは、周波数ベクトル

【0 1 9 7】

【数 5 9】

10

$$\vec{k}_l$$

【0 1 9 8】

上への変位ベクトルの正射影によって与えられる。

【0 1 9 9】

したがって、

【0 2 0 0】

【数 6 0】

$$\hat{A}$$

20

【0 2 0 1】

に対する式(2)の場合のようにユニタリ行列を得るためにには、

【0 2 0 2】

【数 6 1】

$$\vec{\Delta}$$

【0 2 0 3】

となるような変位ベクトル

【0 2 0 4】

30

【数62】

$$\vec{k}^+ \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_+$$

$$\vec{k}^- \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_- = \kappa\delta\Phi_+$$

 $\Leftrightarrow$ 

10

$$\Delta_x + \Delta_y = \frac{a}{\pi}\delta\Phi_+$$

$$\Delta_x - \Delta_y = \kappa\frac{a}{\pi}\delta\Phi_+$$

 $\Leftrightarrow$ 

20

$$\Delta_x = \frac{(1+\kappa)a}{2\pi}\delta\Phi_+$$

$$\Delta_y = \frac{(1-\kappa)a}{2\pi}\Phi_{\text{shift}}$$

【0205】

を探し出す。1つのパラメータ  $a$  はまだ決定されていない。

【0206】

変位ベクトル  $\vec{\Delta}$  が、

【0207】

【数63】

30

$$\tan(\theta) = \frac{\Delta_y}{\Delta_x} \Rightarrow \theta = \arctan\left(\frac{1-\kappa}{1+\kappa}\right)$$

【0208】

となるような  $x$  軸に対する角度  $\theta$  を含む場合には、 $\kappa$  の任意の値に対して、上述の式を満たすことができる。

40

【0209】

ここで位相変位  $\Phi_{\text{shift}}$  は下式によって与えられ、

【0210】

【数64】

$$\alpha_{l,0} \equiv 0 \quad (25)$$

$$\alpha_{l,+} = (l-1)\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (26)$$

$$\alpha_{l,-} = (l-1)\kappa \Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (27)$$

【0211】

は、

【0212】

【数65】

$$\vec{\Delta}$$

【0213】

と

【0214】

【数66】

$$\vec{k}^+$$

【0215】

の間の角度を表す ( $= + 45^\circ$ )。この変位の経路に対して

【0216】

【数67】

$$\Delta = \frac{a}{5 \cos(\gamma)}$$

【0217】

が選択される場合には、

【0218】

【数68】

$$\alpha_{l,+} = (l-1) \frac{2\pi}{5} \quad (28)$$

$$\alpha_{l,-} = (l-1)\kappa \frac{2\pi}{5} \quad (29)$$

【0219】

が生じる。

【0220】

【数69】

$$\hat{A} = \exp(-i\alpha_{l,m})$$

【0221】

がユニタリ行列となるような2つの可能な の値があることを示すことができる。

【0222】

$$_1 = 2 \quad (30)$$

$$_2 = 3 \quad (31)$$

10

20

30

40

50

これは、2つの異なる方位角 (orientation angle) の下で1つの解が可能であることを意味する。

【0223】

技術的に見れば、 $\gamma = -45^\circ$  に対するより小さな角度が生じる解が好ましいはずである。これは、一方で、絶対変位

【0224】

【数70】

$$\Delta = \frac{a}{5} \frac{1}{\cos(\gamma)}$$

10

【0225】

が、 $\gamma$  の増大とともに大きくなることによる。しかし、これを、無条件で必要以上に大きくすべきではない。他方で、 $\gamma$  の誤差は、 $\Delta$  に直接に依存する。

の誤差に対しては下式が生じる。

【0226】

【数71】

$$\delta\kappa = \delta \left( \frac{\cos(90^\circ - \gamma)}{\cos \gamma} \right) = \delta(\tan(\gamma)) = (1 + \tan^2(\gamma))\delta\gamma \quad (32)$$

20

【0227】

したがって、チェス盤の可能な1つの方位の誤差は、 $\gamma$  の値が大きいほど、行列

【0228】

【数72】

$$\hat{A}$$

【0229】

の条件付けに対してより大きな影響を有する。

【0230】

30

これらの考慮事項に基づけば、より好ましくは、チェス盤に対しては  $\gamma$  をマジック角として使用すべきである。

【0231】

【数73】

$$\theta_1 = \arctan\left(-\frac{1}{3}\right) \approx -18.435^\circ$$

40

【0232】

第2の可能な角度は

【0233】

【数74】

$$\theta_2 = \arctan\left(-\frac{1}{2}\right) \approx -26.565^\circ$$

【0234】

となる。

【0235】

50

添字 + および - が付けられた上記の周波数を互いに入れ替えることによって、 + 1 8 . 4 3 5 ° の角度が可能であることが明らかである。

【 0 2 3 6 】

一般性を失うことなく変位方向が x 軸に沿って配置される場合、前述の条件は、チェス盤パターンを回転させることによって達成される。

【 0 2 3 7 】

+ 1 8 . 4 3 5 ° だけ回転させた後、チェス盤は下式によって与えられる。

【 0 2 3 8 】

【 数 7 5 】

$$1 + \frac{8}{\pi^2} \underbrace{\cos\left(\frac{2\pi}{\sqrt{10}a}(2x+y) - \Phi_0^+\right)}_{\Phi^+(\vec{x})} + \frac{8}{\pi^2} \underbrace{\cos\left(\frac{2\pi}{\sqrt{10}a}(x-2y) - \Phi_0^-\right)}_{\Phi^-(\vec{x})} \quad 10$$

【 0 2 3 9 】

x と y を入れ替えることによって、このパターンを - 1 8 . 4 3 5 ° 回転させた場合の表現が得られる。

【 0 2 4 0 】

カメラ上のチェス盤の 1 番目の位相画像は以下のとおりである。

【 0 2 4 1 】

【 数 7 6 】

$$I_l(x, y) = I_0 + I_s^+ \frac{8}{\pi^2} \cos(\Phi^+(\vec{x}) - 2\alpha_l) + I_s^- \frac{8}{\pi^2} \cos(\Phi^-(\vec{x}) - \alpha_l) \quad 20$$

【 0 2 4 2 】

式 ( 2 8 ) ~ ( 3 1 ) による  $\alpha_{l,m}$  によれば、  $\alpha_1 = 2$  の場合、

【 0 2 4 3 】

【 数 7 7 】

$\hat{A}$

【 0 2 4 4 】

に対して、下式が生じる。

【 0 2 4 5 】

【 数 7 8 】

$$\hat{A} = \frac{1}{\sqrt{5}} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) \end{pmatrix} \quad 40$$

【 0 2 4 6 】

この行列はユニタリ行列であり、したがって、逆行列はちょうど以下のようになる。

【 0 2 4 7 】

50

【数79】

$$\hat{A}^{-1} = \frac{1}{\sqrt{5}} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp(i\frac{2\pi}{5}) & \exp(i\frac{4\pi}{5}) & \exp(i\frac{6\pi}{5}) & \exp(i\frac{8\pi}{5}) \\ 1 & \exp(i\frac{8\pi}{5}) & \exp(i\frac{6\pi}{5}) & \exp(i\frac{4\pi}{5}) & \exp(i\frac{2\pi}{5}) \\ 1 & \exp(i\frac{4\pi}{5}) & \exp(i\frac{8\pi}{5}) & \exp(i\frac{2\pi}{5}) & \exp(i\frac{6\pi}{5}) \\ 1 & \exp(i\frac{6\pi}{5}) & \exp(i\frac{2\pi}{5}) & \exp(i\frac{8\pi}{5}) & \exp(i\frac{4\pi}{5}) \end{pmatrix}$$

10

【0248】

したがって、断面図の解に対して下式が生じる。

【0249】

【数80】

$$I_0 = I_1 + I_2 + I_3 + I_4 + I_5 \quad (33)$$

$$I_s^+ = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{5}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{5}} + I_4 e^{i\frac{6\pi}{5}} + I_5 e^{i\frac{8\pi}{5}} \right| \quad (34) \quad 20$$

$$I_s^- = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{4\pi}{5}} + I_3 e^{i\frac{8\pi}{5}} + I_4 e^{i\frac{2\pi}{5}} + I_5 e^{i\frac{6\pi}{5}} \right| \quad (35)$$

【0250】

残りの2つの解は、

【0251】

【数81】

30

$$I_s^+ \text{ および } I_s^-$$

【0252】

に対する上に挙げた解と複素共役である。したがって、

【0253】

【数82】

$$I_s^+ \text{ および } I_s^-$$

【0254】

の2乗平均平方根、すなわち

40

【0255】

【数83】

$$\sqrt{< I_s^2 >} = \sqrt{(I_s^+)^2 + (I_s^-)^2}$$

【0256】

に対して、下式が生じる。

【0257】

【数 8 4】

$$\sqrt{< I_s^2 >} = \sqrt{(I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_4)^2 + (I_3 - I_5)^2 + (I_4 - I_1)^2 + (I_5 - I_2)^2} \quad (36)$$

【0 2 5 8】

実際には、パターンの方位角  $\alpha$  は誤差を有する。前述の評価においてこの誤差を測定し、補償することができる。

【0 2 5 9】

較正記録では、(

【0 2 6 0】

【数 8 5】

10

$$\tilde{O}(\vec{k}) \approx \delta(\vec{k})$$

【0 2 6 1】

となるように、できるだけ均一に蛍光を発している層上のいくつかの位相画像を記録する。その際には、そのたびに、パターンを、同じ未知の位相だけ、1つの画像から次の画像へ変位させる。サンプル内のチェス盤の周波数が既知の場合には、この位相変位を、ほぼ  $1/10$  周期の理論値に設定することができる。(重要なのは、較正時に、あまりに大きな変位を選択しないことだけである。)

方程式(7)と同様に、この状況では、画像の空間周波数スペクトルに対して下式が生じる。

20

【0 2 6 2】

【数 8 6】

$$\begin{aligned} \tilde{E}_l(\vec{k}) \propto & \underbrace{\delta(\vec{k})}_{\approx \tilde{O}(\vec{k})} + \frac{C_s^+}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}^+) e^{-i(\Phi_0^+ + l\alpha^+)} + \frac{C_s^+}{2} \delta(\vec{k} + \vec{k}^+) e^{i(\Phi_0^+ + l\alpha^+)} + \\ & + \frac{C_s^-}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}^-) e^{-i(\Phi_0^- + l\alpha^-)} + \frac{C_s^-}{2} \delta(\vec{k} + \vec{k}^-) e^{i(\Phi_0^- + l\alpha^-)} \end{aligned}$$

30

【0 2 6 3】

この一連の較正位相画像のフーリエ変換では、チェス盤次数のそれぞれの正のピーク(したがって

【0 2 6 4】

【数 8 7】

$$\delta(\vec{k} - \vec{k}^\pm)$$

【0 2 6 5】

を有するピーク)を探し出し、それらの実数部を、画像の添字の関数として評価する。

40

【0 2 6 6】

【数 8 8】

$$\Re \left( \frac{C_s^\pm}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}^\pm) e^{-i(\Phi_0^\pm + l\alpha^\pm)} \right) = \frac{C_s^\pm}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}^\pm) \cos(\Phi_0^\pm + l\alpha^\pm)$$

【0 2 6 7】

したがって、モデル

$$a + b \cos(cx + d) \quad (37)$$

に対する当てはめは、チェス盤のそれぞれの周波数方向について、較正物体上のコントラ

50

スト

【0 2 6 8】

【数 8 9】

$$C_s^{\pm} = 2 \frac{b}{a}$$

【0 2 6 9】

、出発位相

【0 2 7 0】

【数 9 0】

10

$$\Phi_0^{\pm} = d$$

【0 2 7 1】

および探し出した位相変位

【0 2 7 2】

【数 9 1】

$$a_l^{\pm} = c^{\pm}$$

【0 2 7 3】

を与える。決定された + および - 方向の位相変位は、変位方向に対するパターンの方位角 20  
を与える。

【0 2 7 4】

【数 9 2】

$$\theta = \arctan \left( \frac{c^+ - c^-}{c^+ + c^-} \right) \quad (38)$$

【0 2 7 5】

$c^+$  と  $c^-$  の比は、上で定義したパラメータ と全く同じであり、行列

【0 2 7 6】

30

【数 9 3】

$$\hat{A}$$

【0 2 7 7】

で考慮することができる。

【0 2 7 8】

【数 9 4】

$$\frac{c^+}{c^-} = \kappa \quad (39)$$

【0 2 7 9】

40

【数95】

$$\hat{A} = \frac{1}{\sqrt{5}} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{8\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{6\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{4\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{2\pi}{5}) \end{pmatrix} \quad (40)$$

10

【0280】

このマジック角に対して、 $\kappa = 2$  であり、

【0281】

【数96】

$$\hat{A}$$

【0282】

はユニタリ行列である。偏差のために、

【0283】

【数97】

$$\hat{A}$$

【0284】

を逆行列にすると補正された評価が得られる。

【0285】

2つの可能なマジック角  $\kappa_2$  に対しても前述の解法を同様に実施することができる。

## 2.3 六角形

上述のチェス盤パターンの代わりに、六角形パターンを使用して、パターンを1つの空間方向に変位させたときに記録された位相画像を評価することも可能である。

30

【0286】

これに対する動機付けは、六角形パターンが3つの空間方向の周波数を含むことである。超分解能構造化照明に対する先行技術では、格子の3つの方位に位相画像が記録される格子が使用される。従来、相対的に等方性の点像分布関数を最終的に得るために、格子の方位に関しては  $120^\circ$  が選択される。この角度は、六角形のベース周波数方向間に存在する。

【0287】

図(10)に示されているようなベース周期  $a$  を有する六角形パターン

【0288】

【数98】

$$\mathfrak{H}(\vec{x})$$

【0289】

【数99】

$$\mathfrak{H}(\vec{x}) = \sum_{m,n} \delta\left(x - m\frac{2a}{\sqrt{3}}\right) \delta\left(y - n2a\right) + \sum_{m,n} \delta\left(x - \left(m + \frac{1}{2}\right)\frac{2a}{\sqrt{3}}\right) \delta\left(y - \left(n + \frac{1}{2}\right)2a\right) \quad (41)$$

40

50

【0290】

に対して、フーリエ表現は、

【0291】

【数100】

$$\mathfrak{H}(\vec{x}) = \sum_{m,n} (1 + e^{-i(m\pi+n\pi)}) e^{i(m\sqrt{3}\frac{\pi}{a}x + n\frac{\pi}{a}y)} = 2 \sum_{m,n} e^{i(m\sqrt{3}\frac{\pi}{a}x + n\frac{\pi}{a}y)} \quad (42)$$

(m+n) 直線

【0292】

と書かれる。

【0293】

周波数ベクトルに関しては一般に下式が生じる。

【0294】

【数101】

$$\vec{k}_{m,n} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} m\sqrt{3} \\ n \end{pmatrix} \quad (43)$$

【0295】

半径がベース周波数

【0296】

【数102】

$$|\vec{k}| = \frac{2\pi}{a}$$

【0297】

である円上には、予想されるように、六角形の以下の3つのベース周波数ベクトル

【0298】

【数103】

$$\vec{k}_{0,2}, \vec{k}_{1,1} \text{ および } \vec{k}_{1,-1}$$

【0299】

がある。

【0300】

10

20

30

【数104】

$$\vec{k}_{0,2} = \frac{2\pi}{a} \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix} =: \vec{k}_1 \quad (44)$$

$$\vec{k}_{1,-1} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} \sqrt{3} \\ -1 \end{pmatrix} =: \vec{k}_2 \quad (45)$$

$$\vec{k}_{1,1} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} \sqrt{3} \\ 1 \end{pmatrix} =: \vec{k}_3 \quad (46)$$

【0301】

$m$ と $n$ の符号を入れ替えると、関連する負の周波数ベクトルが得られる。

【0302】

ここで、六角形対称の重要な特性が明らかであり、具体的には、それは、ベース周波数の周波数ベクトルが正三角形を張ること、または下式が当てはまることである。

【0303】

【数105】

$$\vec{k}_1 + \vec{k}_2 = \vec{k}_3 \quad (47)$$

【0304】

1次次数だけを吟味した場合には下式が得られ、

【0305】

【数106】

$$\mathfrak{H} \propto 1 + \underbrace{\frac{1}{3} \cos\left(\frac{2\pi}{a}y - \Phi_0^1\right)}_{=: \Phi^1(\vec{x})} + \underbrace{\frac{1}{3} \cos\left(\frac{\pi}{a}(\sqrt{3}x - y) - \Phi_0^2\right)}_{=: \Phi^2(\vec{x})} + \underbrace{\frac{1}{3} \cos\left(\frac{\pi}{a}(\sqrt{3}x + y) - \Phi_0^3\right)}_{=: \Phi^3(\vec{x})} \quad (48)$$

【0306】

または、(式(24)に対応する)位相画像の測定強度が得られる。

【0307】

【数107】

$$I_l(x, y) = I_0 + I_s^{(1)} \cos(\Phi^1(\vec{x}) - \alpha_l^1) + I_s^{(2)} \cos(\Phi^2(\vec{x}) - \alpha_l^2) + I_s^{(3)} \cos(\Phi^3(\vec{x}) - \alpha_l^3) \quad (49)$$

【0308】

六角形の場合には、7つの未知変数

【0309】

【数108】

$$(I_0, I_s^{(1),(2),(3)}, \Phi^{(1),(2),(3)}(\vec{x}))$$

【0310】

があり、したがって、評価するためには7つの位相画像が必要である( $N = 7$ )。

【0311】

チエス盤と同様に、六角形に対しても、以下のように書くことができる。

【0312】

10

20

30

40

50

【数109】

$$\vec{k}_1 \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_1$$

$$\vec{k}_2 \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_2 = \kappa\delta\Phi_1$$

【0313】

この場合には、式(47)に従って、さらに下式が当てはまる。

【0314】

【数110】

10

$$\vec{k}_3 \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_3 = (1 + \kappa)\delta\Phi_1$$

【0315】

<sub>shift</sub>は任意の位相変位を表す。

【0316】

挿入は下式を与える。

【0317】

【数111】

20

$$\vec{k}_1 \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_1$$

$$\vec{k}_2 \circ \vec{\Delta} = \kappa\delta\Phi_1$$

↔

$$\frac{2\pi}{a} \Delta_y = \delta\Phi_1$$

$$\frac{\pi}{a} \sqrt{3} \Delta_x - \frac{\pi}{a} \Delta_y = \kappa\delta\Phi_1$$

30

↔

$$\Delta_x = \frac{a(2\kappa+1)}{2\pi\sqrt{3}} \delta\Phi_1$$

$$\Delta_y = \frac{a}{2\pi} \delta\Phi_1$$

40

【0318】

この変位ベクトルとx軸の間の角度に関して、角度

【0319】

【数112】

$$\tan(\theta) = \frac{\Delta_y}{\Delta_x} \Rightarrow \theta = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{(2\kappa + 1)}\right)$$

【0320】

が設定された場合には、前述の条件を達成することができる。

10

【0321】

ここで、位相変位  $\alpha_{l,m}$  に関して下式が得られる。

【0322】

【数113】

$$\alpha_{l,0} \equiv 0 \quad \forall l \quad (50)$$

$$\alpha_{l,\pm 1} = \pm(l-1)\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (51)$$

$$\alpha_{l,\pm 2} = \pm(l-1)\kappa\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (52)$$

$$\alpha_{l,\pm 3} = \pm(l-1)(1+\kappa)\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (53)$$

【0323】

は、

【0324】

【数114】

$$\vec{\Delta}$$

20

30

【0325】

と

【0326】

【数115】

$$\vec{k}_1$$

【0327】

の間の角度である。

40

【0328】

再び、

【0329】

【数116】

$$\Delta = \frac{a}{N \cos \gamma} = \frac{a}{7 \cos \gamma}$$

【0330】

が選択され、下式が得られる。

【0331】

50

【数117】

$$\alpha_{l,\pm 1} = \pm(l-1)\frac{2\pi}{7} \quad (54)$$

$$\alpha_{l,\pm 2} = \pm(l-1)\kappa\frac{2\pi}{7} \quad (55)$$

$$\alpha_{l,\pm 3} = \pm(l-1)(1+\kappa)\frac{2\pi}{7} \quad (56)$$

10

【0332】

チェス盤の方法と同じく、ここでも、 $\alpha$ に対する2つの可能な値がユニタリ行列

【0333】

【数118】

 $\hat{A}$ 

【0334】

を与えることを示すことができる。

【0335】

$$_1 = 2 \quad (57)$$

$$_2 = 4 \quad (58)$$

20

したがって、この場合も、変位ベクトルと $x$ 軸の間の2つの方位角が可能であり、チェス盤の場合と同様の考慮から、 $\alpha = -90^\circ$ に対してより小さな値が生じる角度が選択される（

【0336】

【数119】

$$(\delta\kappa = \frac{1}{2}\sqrt{3}(1 + \tan^2(\gamma)))$$

【0337】

30

)

【0338】

【数120】

$$\theta_1 = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{5}\right) \approx 19.107^\circ$$

(59)

【0339】

第2の（理論上）可能な角度は

【0340】

【数121】

40

$$\theta_2 = \arctan\frac{\sqrt{3}}{9} \approx 10.893^\circ$$

【0341】

となる。

【0342】

六角形パターンの $60^\circ$ 対称性に基づき、さらに負の周波数方向を考慮すると、 $\{n60^\circ \pm 19.107^\circ \mid n \in \mathbb{Z}\}$ の全ての角度が可能であることが明らかである。

【0343】

ここでは、 $x$ 軸と

50

【0 3 4 4】

【数1 2 2】

 $\vec{\Delta}$ 

【0 3 4 5】

の間の角度が  $_{1-90^\circ} \quad 70^\circ \quad 89^\circ$  である。上記のように、一般性を失うことなく

、

【0 3 4 6】

【数1 2 3】

10

 $\vec{\Delta}$ 

【0 3 4 7】

が x 軸の方向に選択される場合には、所望の方位に向けるために、六角形パターンを  $70^\circ \quad 89^\circ$  回転させなければならない。

【0 3 4 8】

式(50)～(56)による  $_{1,m}$  によれば、 $_{1} = 2$  の場合、

【0 3 4 9】

【数1 2 4】

20

 $\hat{A}$ 

【0 3 5 0】

に対して、下式が生じる。

【0 3 5 1】

【数1 2 5】

$$\hat{A} = \frac{1}{\sqrt{7}} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} \end{pmatrix}$$

30

【0 3 5 2】

これらの解に対して、具体的には下式が生じる。

【0 3 5 3】

40

【数126】

$$I_0 = I_1 + I_2 + I_3 + I_4 + I_5 + I_6 + I_7 \quad (60)$$

$$I_s^{(1)} = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{8\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{10\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{12\pi}{7}} \right| \quad (61)$$

$$I_s^{(2)} = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{8\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{12\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{10\pi}{7}} \right| \quad (62)$$

$$I_s^{(3)} = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{12\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{10\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{8\pi}{7}} \right| \quad (63)$$

10

$$\langle I_s^2 \rangle = \sqrt{(I_1 - I_4)^2 + (I_2 - I_5)^2 + (I_3 - I_6)^2 + (I_4 - I_7)^2 + (I_5 - I_1)^2 + (I_6 - I_2)^2 + (I_7 - I_3)^2} \quad (64)$$

【0354】

チェス盤の場合と同じく、六角形に関しても、較正によって方位の誤差を決定することができ、同様に評価の際に補償することができる。

20

【0355】

六角形に対する条件(47)に基づけば、プロジェクティビリティ・テスト(p l a u s i b i l i t y t e s t)を実施する1つの可能性が存在する。

【0356】

3つの全ての次数に対する較正に関しては、(ほぼ)常に下式が当てはまらなければならない。

【0357】

$$c_1 + c_2 = c_3$$

$c_k$ は、式(37)の場合と同じ当てはめパラメータを意味する。

30

【0358】

したがって例えば、自動化されたシステムでは、ある較正記録(または評価)が類似的にまたは誤って規定されたかどうかを確認することが常に可能である。

【0359】

第1章の場合のように、格子が回折の1つの次数だけを含む場合であっても、3つ以上の位相画像を計算して1つの解を得ることができる。N個の位相画像が撮影された場合にはN個の周波数次数を互いから分離することができる。1つの次数だけが含まれる場合には、残りの次数に対しては解として0が与えられる。

【0360】

このことは、他方で、相対位相変位

【0361】

【数127】

$$\frac{2\pi}{5}$$

40

【0362】

を有する格子に式(33~35)を当てはめることもできることを意味する。この場合には5つの画像を撮影しなければならない。ここで、自明でない解は(33)および(34)である。

【0363】

位相画像間の相対位相変位としてちょうど

50

【0364】

【数128】

$$\frac{2\pi}{7}$$

【0365】

が選択され、合計7つの位相画像が撮影されるときには、全く同じ方法で、式(60)から(63)を、格子パターンおよびチェス盤状パターンに当てはめることができる。

【0366】

パラメータ およびその誤差を、使用するパターンから独立して定式化することができる。 10

【0367】

$$\begin{aligned} &= \cos(s) - \sin(s) \tan & (65) \\ &= \sin(s) (1 + \tan^2) & (66) \end{aligned}$$

$s$  は、その構造の対称の角度であり、

【0368】

【数129】

$$\theta_s = \begin{cases} 90^\circ & (\text{チェス盤}) \\ 60^\circ & (\text{六角形}) \end{cases}$$

20

【0369】

は、前述のとおり、

【0370】

【数130】

$$\vec{k}_1$$

【0371】

と

【0372】

【数131】

$$\vec{\Delta}$$

【0373】

の間の角度である。

## 2.3.1 六角形のコントラスト

格子パターンまたはチェス盤パターンとは対照的に、六角形パターンの充填率は(1/2ではなく)1/3である。

【0374】

このことは、一方で、サンプルにおける光量が小さくなることを意味し、他方で、六角形のこの充填率を基にすると、やや異なる変調伝達関数が生じることを意味する(これが図(11)に示されている)。

【0375】

【数132】

$$\tilde{\nu} = \frac{\lambda}{NA}$$

【0376】

は、(PSF半値幅に対して)正規化された構造周波数であり、それぞれの場合に、この構造周波数は0から2の間になければならない。( 50

【 0 3 7 7 】

【 数 1 3 3 】

$$\tilde{\nu} = 2$$

【 0 3 7 8 】

はちょうど光学的カットオフ周波数に対応する。) 準共焦点構造化照明に関して、構造周波数

【 0 3 7 9 】

【 数 1 3 4 】

$$\tilde{\nu} \approx 1$$

10

【 0 3 8 0 】

は、z 方向のこの周波数に対する構造の画像が最小の半値幅を有するため特に有利である。この周波数に対して、非コヒーレントの場合には、六角形に対しておよそ 1.28 倍強いコントラストが得られる。

【 0 3 8 1 】

コヒーレントの場合には、この効果が劇的に低下せざるを得ないが、コヒーレントの場合には、明らかに高いコントラストを提供する位相基板を使用することもできる。

2.4 幾何学的解釈

20

2.4.1 チェス盤

式 ( 1 2 )

【 0 3 8 2 】

【 数 1 3 5 】

$$\alpha_{l,m} = (l-1)\vec{k}_m \circ \vec{\Delta} = (l-1)|\vec{k}_m|\Delta \cos(\theta_m)$$

【 0 3 8 3 】

を仮定すると、 $\alpha_{l,m}$  の成分 ( したがって

【 0 3 8 4 】

30

【 数 1 3 6 】

$$\hat{A}$$

【 0 3 8 5 】

の成分) が、変位ベクトル

【 0 3 8 6 】

【 数 1 3 7 】

$$\vec{\Delta}$$

【 0 3 8 7 】

40

の対応するそれぞれの周波数ベクトル上への正射影に依存することは明らかである。

【 0 3 8 8 】

チェス盤のマジック角に関して、変位ベクトルの周波数ベクトル

【 0 3 8 9 】

【 数 1 3 8 】

$$\vec{k}^+$$

【 0 3 9 0 】

上への正射影は、変位ベクトルの周波数ベクトル

【 0 3 9 1 】

50

【数139】

 $\vec{k}^-$ 

【0392】

上への正射影のちょうど2倍である(図(12)を参照されたい)。例えば45°の方位角が選択された場合、これらの2つの正射影の長さは同じになり、このことから、 $\vec{k}_1$ 、 $\vec{k}_2$ に関して、

$$l, \pm_1 = l, \pm_2$$

となり、したがって  $\vec{k}_1$  および行列

【0393】

【数140】

 $\hat{A}$ 

【0394】

は特異行列となるであろう。

2.4.2 六角形

六角形に関しては、マジック角が、変位ベクトルの

【0395】

【数141】

 $\vec{k}_2$ 

【0396】

上への正射影が

【0397】

【数142】

 $\vec{k}_1$ 

【0398】

上への正射影のちょうど2倍である変位ベクトルに対して明確に確認された方向を表す。

30

このことから、式(47)によって、変位ベクトルの

【0399】

【数143】

 $\vec{k}_3$ 

【0400】

上への正射影は

【0401】

【数144】

 $\vec{k}_1$ 

【0402】

上への正射影のちょうど3倍になる(図(13)を参照されたい)。

40

2.5 他のマジック角

2.5.1  $N = 13$ 

コヒーレントなレーザ励起によって、画像内の六角形の2次高調波次数も再結合される場合が生じることがある。量

【0403】

【数145】

$$\frac{2\pi}{a}$$

【0404】

を有する式(44)～(46)の3つの1次次数に加えて、式(43)に基づく周波数

【0405】

【数146】

$$|\vec{k}| = \sqrt{3} \frac{2\pi}{a}$$

10

【0406】

を有する追加の3つの次数に関して下式が生じ、

【0407】

【数147】

$$\vec{k}_{1,-3} = \frac{\pi}{a} \sqrt{3} \begin{pmatrix} 1 \\ -\sqrt{3} \end{pmatrix} =: \vec{k}_4 \quad (67)$$

20

$$\vec{k}_{1,3} = \frac{\pi}{a} \sqrt{3} \begin{pmatrix} 1 \\ \sqrt{3} \end{pmatrix} =: \vec{k}_5 \quad (68)$$

$$\vec{k}_{2,0} = \frac{2\pi}{a} \sqrt{3} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} =: \vec{k}_6 \quad (69)$$

30

【0408】

下式が当てはまる。

【0409】

【数148】

$$\vec{k}_4 = \vec{k}_2 - \vec{k}_1 \quad (70)$$

$$\vec{k}_5 = \vec{k}_1 + \vec{k}_3 \quad (71)$$

$$\vec{k}_6 = \vec{k}_2 + \vec{k}_3 = \vec{k}_4 + \vec{k}_5 \quad (72)$$

40

【0410】

または

【0411】

【数149】

$$\vec{k}_2 = \vec{k}_1 + \vec{k}_4 \quad (73)$$

$$\vec{k}_3 = 2\vec{k}_1 + \vec{k}_4 \quad (74)$$

$$\vec{k}_5 = 3\vec{k}_1 + \vec{k}_4 \quad (75)$$

$$\vec{k}_6 = 3\vec{k}_1 + 2\vec{k}_4 \quad (76)$$

10

【0412】

合計6つの次数が再結合され、したがって  $2 + 6 + 1 = 13$  の測定が必要である。より明瞭な定式化のため、セクション2.3の場合のように、ベクトル

【0413】

【数150】

$$\vec{k}_1$$

【0414】

および

【0415】

【数151】

$$\vec{k}_4$$

【0416】

を

【0417】

【数152】

$$\vec{k}_1$$

【0418】

および

【0419】

【数153】

$$\vec{k}_2$$

【0420】

の代わりに基底と考える。

【0421】

上記の解法と同様に、この場合も、

【0422】

【数154】

$$\vec{k}_1$$

【0423】

および

【0424】

20

30

40

【数 1 5 5】

$$\vec{k}_4$$

【0 4 2 5】

に対する位相変位  $\varphi_{l,m}$  を検討する。

【0 4 2 6】

【数 1 5 6】

$$\alpha_{l,\pm 1} = (l-1) \underbrace{\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\theta_{\pm 1})}_{\pm \delta \Phi_1 = \pm \vec{k}_1 \circ \vec{\Delta}} \quad (77)$$

$$\alpha_{l,\pm 4} = (l-1) \underbrace{\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\theta_{\pm 4})}_{\kappa \cdot \delta \Phi_1 = \kappa \cdot (\pm \vec{k}_1) \circ \vec{\Delta} = \pm \vec{k}_4 \circ \vec{\Delta}} = \kappa \Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\theta_{\pm 1}) \quad (78)$$

【0 4 2 7】

 $\pm_1$  および  $\pm_4$  は、

【0 4 2 8】

【数 1 5 7】

$$\vec{\Delta}$$

【0 4 2 9】

と

【0 4 3 0】

【数 1 5 8】

$$\vec{k}_{\pm 1}$$

【0 4 3 1】

または

【0 4 3 2】

【数 1 5 9】

$$\vec{k}_{\pm 4}$$

【0 4 3 3】

との間の角度を表す。式 (73) ~ (76) から下式が得られる。

【0 4 3 4】

【数 1 6 0】

$$\alpha_{l,\pm 2} = \pm(l-1)(\vec{k}_1 + \vec{k}_4) \circ \vec{\Delta} = \pm(l-1)(1+\kappa) \cdot \delta \Phi_1 \quad (79)$$

$$\alpha_{l,\pm 3} = \pm(l-1)(2\vec{k}_1 + \vec{k}_4) \circ \vec{\Delta} = \pm(l-1)(2+\kappa) \cdot \delta \Phi_1 \quad (80)$$

$$\alpha_{l,\pm 5} = \pm(l-1)(3\vec{k}_1 + \vec{k}_4) \circ \vec{\Delta} = \pm(l-1)(3+\kappa) \cdot \delta \Phi_1 \quad (81)$$

$$\alpha_{l,\pm 6} = \pm(l-1)(3\vec{k}_1 + 2\vec{k}_4) \circ \vec{\Delta} = \pm(l-1)(3+2\kappa) \cdot \delta \Phi_1 \quad (82)$$

【0 4 3 5】

式 (77) ~ (78) は幾何学的に下式を導く。

【0 4 3 6】

10

20

30

40

50

【数161】

$$\begin{aligned}\frac{2\pi}{a}\Delta_y &= \delta\Phi_1 \\ \frac{\pi}{a}(\Delta_x - \sqrt{3}\Delta_y) &= \kappa\delta\Phi_1\end{aligned}\tag{83}$$

 $\Leftrightarrow$ 

(84)

$$\begin{aligned}\Delta_x &= \frac{a}{2\pi\sqrt{3}}(3 + 2\kappa)\delta\Phi_1 \\ \Delta_y &= \frac{a}{2\pi}\delta\Phi_1\end{aligned}\tag{85}$$

 $\Leftrightarrow$ 

(86)

$$\tan\theta = \frac{\Delta_y}{\Delta_x} = \frac{\sqrt{3}}{3+2\kappa}\tag{87}$$

【0437】

上記のとおり、ここでも、ユニタリ行列を得るための および最終的には

【0438】

【数162】

 $\hat{A}$ 

【0439】

に対する2つの可能な値が存在する。

【0440】

$$_1 = 2 \quad (88)$$

$$_2 = 8 \quad (89)$$

したがって、

【0441】

【数163】

$$\theta_1 = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{7}\right) \approx 13.898^\circ\tag{90}$$

【0442】

および

【0443】

【数164】

$$\theta_2 = \arctan\frac{\sqrt{3}}{19} \approx 5.20^\circ$$

【0444】

である。関連する

【0445】

【数165】

 $\vec{\Delta}$ 

【0446】

10

20

30

40

50

と

【0 4 4 7】

【数166】

 $\vec{k}_1$ 

【0 4 4 8】

の間の角度  $\gamma_1 = \gamma_1 - 90^\circ$  に関して、 $\gamma_1 = 76.102^\circ$  および  $\gamma_2 = 84.8^\circ$  が生じる。 $\gamma_{l,m}$  全体に対する  $\gamma_2$  に関して、下式が得られ、

【0 4 4 9】

【数167】

$$\alpha_{l,m} = \underbrace{\frac{2\pi}{13}}_{\delta\Phi_0} \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 12 & 3 & 10 & 4 & 9 & 2 & 11 & 5 & 8 & 7 & 6 & 0 & 0 \\ 0 & 2 & 11 & 6 & 7 & 8 & 5 & 4 & 9 & 10 & 3 & 1 & 12 & 0 & 0 \\ 0 & 3 & 10 & 9 & 4 & 12 & 1 & 6 & 7 & 2 & 11 & 8 & 5 & 0 & 0 \\ 0 & 4 & 9 & 12 & 1 & 3 & 10 & 8 & 5 & 7 & 6 & 2 & 11 & 0 & 0 \\ 0 & 5 & 8 & 2 & 11 & 7 & 6 & 10 & 3 & 12 & 1 & 9 & 4 & 0 & 0 \\ 0 & 6 & 7 & 5 & 8 & 11 & 2 & 12 & 1 & 4 & 9 & 3 & 10 & 0 & 0 \\ 0 & 7 & 6 & 8 & 5 & 2 & 11 & 1 & 12 & 9 & 4 & 10 & 3 & 0 & 0 \\ 0 & 8 & 5 & 11 & 2 & 6 & 7 & 3 & 10 & 1 & 12 & 4 & 9 & 0 & 0 \\ 0 & 9 & 4 & 1 & 12 & 10 & 3 & 5 & 8 & 6 & 7 & 11 & 2 & 0 & 0 \\ 0 & 10 & 3 & 4 & 9 & 1 & 12 & 7 & 6 & 11 & 2 & 5 & 8 & 0 & 0 \\ 0 & 11 & 2 & 7 & 6 & 5 & 8 & 9 & 4 & 3 & 10 & 12 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 12 & 1 & 10 & 3 & 9 & 4 & 11 & 2 & 8 & 5 & 6 & 7 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (91)$$

【0 4 5 0】

したがって、この場合の

【0 4 5 1】

【数168】

$$\hat{A}_{l,m} = \exp(-i\alpha_{l,m})$$

【0 4 5 2】

もやはりユニタリ行列である。

【0 4 5 3】

角度  $\gamma$  に基づく六角形パターンの方位および 1 つの画像から次の画像への位相変位

【0 4 5 4】

【数169】

$$\frac{2\pi}{13}$$

【0 4 5 5】

を有する 13 個の位相画像の記録によって、六角形の 1 次次数および 2 次次数を互いから

10

20

30

40

50

分離することができる。

【0456】

これらの考慮は主にコヒーレントな場合に関する。この場合には、周期的に構造化された励起のコヒーレンスから、図(14)に示すように、軸方向の幅の狭いPSFが生じる。部分コヒーレント光(例えばコヒーレンス絞りによって容易に生成することができる)に関しても同様に、z方向の幅の狭い(構造)焦点が生じる。顕微鏡対物レンズの部分的な照明に関しては、図(15)に示すように、部分コヒーレンスが生じる。

【0457】

コヒーレント光を使用したときのこの焦点の狭幅化は、使用される構造周波数

【0458】

【数170】

$\tilde{\nu}$

【0459】

が約0.7よりも大きい場合にのみ生じる。z方向のPSF半値幅の最小値は(コヒーレンス度にかかわらず)常に

【0460】

【数171】

$\tilde{\nu} = 1$

10

【0461】

である。

2.5.2 N = 19

さらに

【0462】

【数172】

$$|\vec{k}| = 2 * \frac{2\pi}{a}$$

【0463】

30

を有する周波数ベクトル

【0464】

【数173】

$$\vec{k}_7 := \vec{k}_{0,4} = 2\vec{k}_1 \quad (92)$$

$$\vec{k}_8 := \vec{k}_{2,-2} = 2\vec{k}_2 \quad (93)$$

$$\vec{k}_9 := \vec{k}_{2,2} = 2\vec{k}_3 \quad (94)$$

40

【0465】

を検討した場合、(相対位相変位が

【0466】

【数174】

$$\frac{2\pi}{19}$$

【0467】

の)1つの解に対して全体で19個の位相画像が必要であることが明らかである。

【0468】

前述の方法と同様に、ここでもユニタリ行列を構築することが可能である。の可能な

50

値として以下の値が得られる。

【0469】

$$_1 = 6 \quad (95)$$

$$_2 = 10 \quad (96)$$

式(87)から、関連する の値は以下のとおりである。

【0470】

$$_1 = 6.59^\circ \quad (97)$$

$$_2 = 4.31^\circ \quad (98)$$

2.5.3 その他の解

ある種の状況下で構造化照明とともに非線形超分解能を使用するためには、計算において、（撮影された対応する数の位相画像に対して）六角形のよりいっそう高次の次数を考慮する必要があるであろう。N = 43 の値まで、ユニタリ行列、したがって理論上の最適解が見つかった。

【0471】

【表1】

n	1	2	3	4	5	6
N	7	13	19	31	37	43
$\kappa_1$	1	2	6	4	9	5
$\kappa_2$	5	8	10	24	25	35
$ \vec{k} /\frac{2\pi}{a}$	1	$\sqrt{3}$	2	$\sqrt{7}$	3	$2\sqrt{3}$
$\theta_1 [^\circ]$	19.11	13.90	6.59	8.95	4.72	7.59
$\theta_2 [^\circ]$	7.59	5.21	4.31	1.95	1.87	1.36

10

20

30

【0472】

表1：Nに対する関連値および対応するそれぞれのマジック角を含む六角形に対する全ての可能な解の概要

3. 雜音

パート(2.1)で既に指摘したとおり、ユニタリ行列

【0473】

【数175】

$$\hat{A}_{m,l} := \frac{1}{\sqrt{N}} e^{-i \frac{2\pi}{N} ml}$$

40

【0474】

を用いた評価における平均誤差（より正確には誤差の分散の平均値）は不变である。

【0475】

【数176】

$$\langle |\delta I_s^{(m)}|^2 \rangle = \left\langle \sum_{l,n} \hat{A}_{m,l}^{-1} \delta I_l \underbrace{(\hat{A}_{m,n}^*)^{-1}}_{\hat{A}_{n,m}} \delta I_n \right\rangle = \quad (99)$$

$$= \frac{1}{N} \left\langle \sum_{l,n} e^{i \frac{2\pi}{N} m(l-n)} \delta I_l \delta I_n \right\rangle = \frac{1}{N} N \langle \delta(I_l)^2 \rangle \quad (100)$$

$$= \langle |\delta I_l|^2 \rangle \quad (101)$$

10

【0476】

式(100)を調べるため、左辺の和は平均して  $l = n$  の寄与だけを与えると考えることができる。これは、異なる未処理の画像上の測定誤差は相関しないためである。

【0477】

式(10)と比較すると、

【0478】

【数177】

$$\hat{A}$$

【0479】

20

の選択に対する未処理の画像のある種の変調が

【0480】

【数178】

$$\sqrt{N}$$

【0481】

倍に増幅されることが明らかである。

【0482】

【数179】

$$\hat{A}^{-1} \begin{pmatrix} I_1(\vec{x}) \\ I_2(\vec{x}) \\ \vdots \\ I_M(\vec{x}) \end{pmatrix} = \sqrt{N} \begin{pmatrix} I_0(\vec{x}) \\ \frac{1}{2} I_s^{(1)}(\vec{x}) e^{-i\Phi_1(\vec{x})} \\ \frac{1}{2} I_s^{(-1)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_1(\vec{x})} \\ \frac{1}{2} I_s^{(2)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_2(\vec{x})} \\ \vdots \\ \frac{1}{2} I_s^{(-n)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_n(\vec{x})} \end{pmatrix} \quad (102)$$

30

40

【0483】

したがって、この評価の相対誤差に関して下式が生じる。

【0484】

【数180】

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{|\delta I_l|}{I_{\text{in-focus}}} \quad (103)$$

50

## 【0485】

可能な方位誤差を考慮する場合、この誤差には行列の条件数も含まれる。

## 【0486】

## 【数181】

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} = \text{cond}(\hat{A}) \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{|\delta I_l|}{I_{\text{in-focus}}}$$

## 【0487】

入力誤差  $|I_l|$  の分布がポアソン分布であると仮定した場合、全体として、この評価における相対誤差に対して、下式が得られる。 10

## 【0488】

## 【数182】

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} = \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} \quad (104)$$

## 【0489】

ここで、 $\gamma$  は検出器利得、 $K$  は、(検出された焦点外れ部分に応じて)達成されたサンプル中の構造体のコントラスト、 $\Phi_{\text{in-focus}}$  は、焦点が合った部分から放出された単位時間当たりの光子、 $\tau$  は、未処理画像に対する総露光時間である。 20

## 【0490】

計算された未処理画像の数が取得の所要時間に影響しないことは明らかである。評価に対して異なる値  $N_1$  および  $N_2$  ( $N_2 > N_1$ ) を使用する任意の 2 つの方法の誤差を比較した場合、

## 【0491】

## 【数183】

$$\tau_2 = \tau_1 \frac{N_1}{N_2}$$

30

## 【0492】

の選択に  $N_2$  個の画像を使用する方法の評価誤差は、 $N_1$  個の画像だけを計算する方法の評価誤差と同じであることが明らかである。

## 【0493】

したがって、取得速度に関して、撮影される位相画像の数は、取得速度を直接に決定するものではない。いずれにせよ、以下のことに注意を払うべきである。

## 【0494】

- いかなる場合も、 $N$  に対する値が、個々の位相画像上の信号強度がカメラの読み取り雑音 (read noise) に近づくほど大きな値には設定されないこと。

## 【0495】

- カメラが、 $N$  内に完全な画像を読み出すことができる。

40

## 【0496】

チェス盤および六角形に関するパート (2.2) および (2.3) に記載された方法に関しては、チェス盤の場合の任意の評価では 2 つ、六角形の場合には 3 つの独立した断面または準共焦点画像が存在する。

比較のため：格子を使用し、例えば 7 つの未処理画像を評価すると、同じ露光時間を持つ 3 つの未処理画像が計算された場合よりも

## 【0497】

【数184】

$$\sqrt{\frac{3}{7}}$$

【0498】

[原文のまま] だけ小さい誤差の準共焦点画像が得られる。いずれにせよ、式(60)～(63)を使用すると、式(60)（非共焦点画像）および式(61)（準共焦点画像）に対する解が1つだけ得られる。残りの解は、（格子の画像に1次次数だけが含まれる場合[原文のまま]）、0または平均誤差を与える。

【0499】

チェス盤または六角形に対するいくつかの断面を平均することによって、この場合も相対誤差が低下する。

【0500】

【数185】

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} = \begin{cases} \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{2NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} & \text{チェス盤} \\ \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{3NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} & \text{六角形} \end{cases} \quad (105)$$

【0501】

六角形に関して、充填率に基づいて、最大1.28倍強いコントラスト値を達成することができると思われる場合（セクション(2.3.1)と比較されたい）、特に六角形

【0502】

【数186】

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} \approx \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{4.91NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} \approx \frac{1}{2.2} \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} \quad (106)$$

【0503】

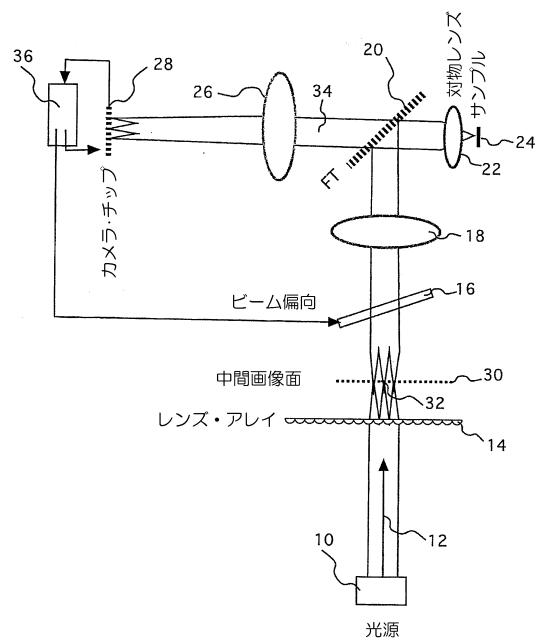
に対して、1から2倍小さい誤差が得られる。したがって、理論上は、六角形を使用した準共焦点構造化照明は、格子と比較して、評価において、4分の1の露光時間で、同じ信号対雑音を与えるはずである。

10

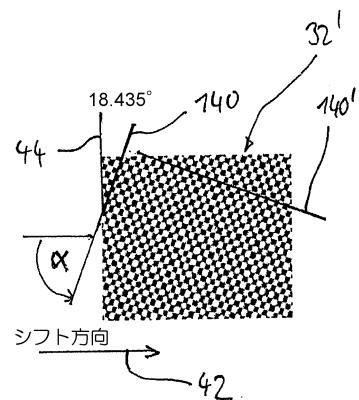
20

30

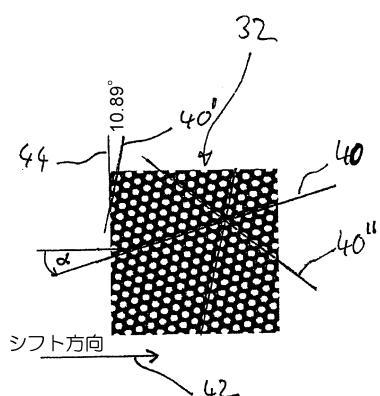
【図1】



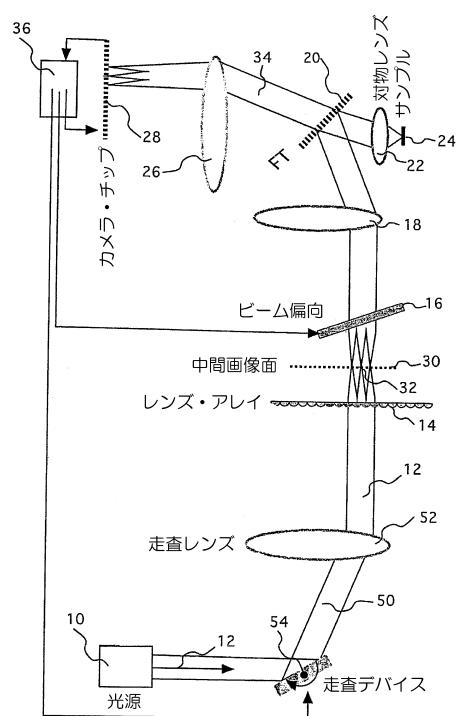
【図2】



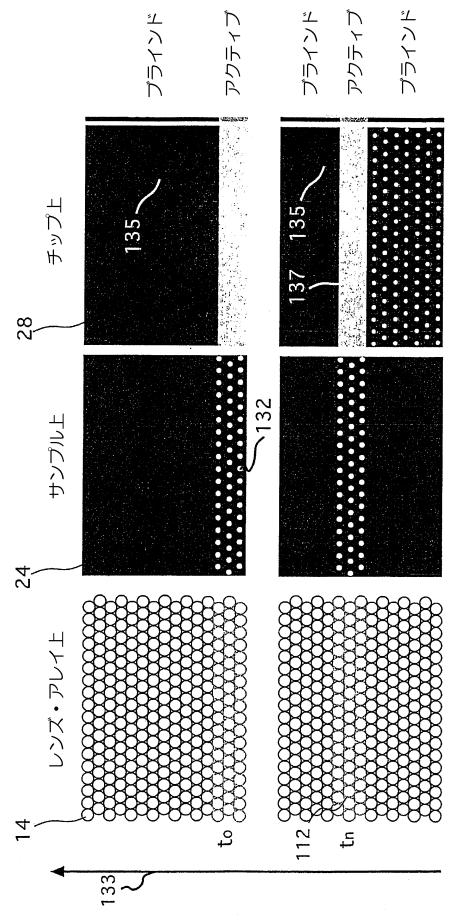
【図3】



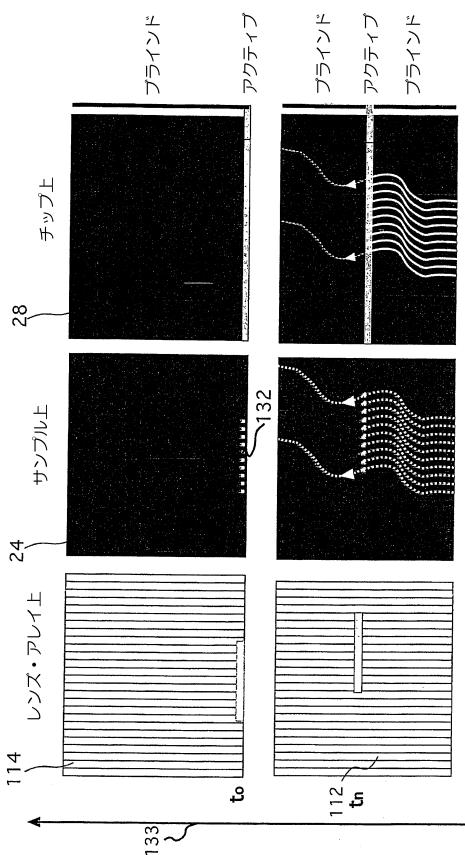
【図4】



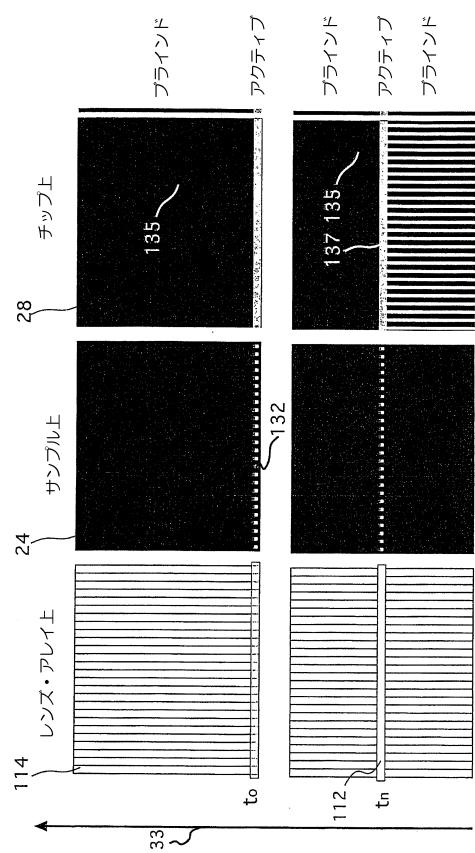
【図5】



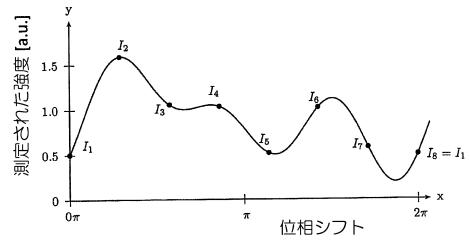
【図6 B】



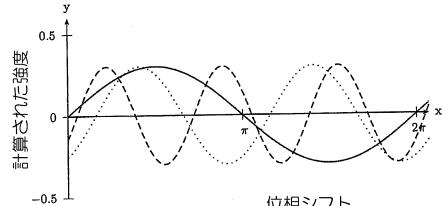
【図6 A】



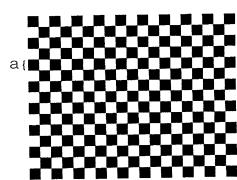
【図7】



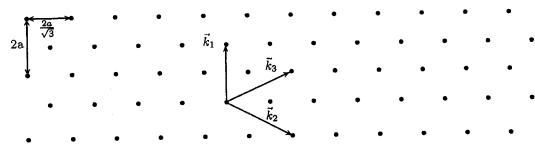
【図8】



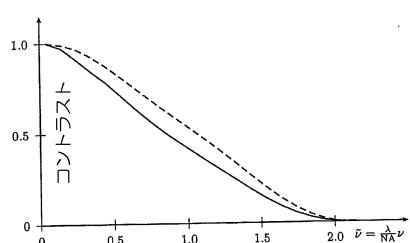
【図9】



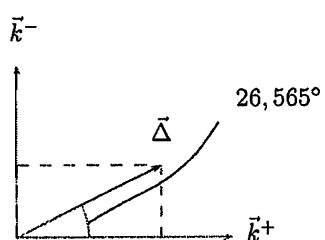
【図 1 0】



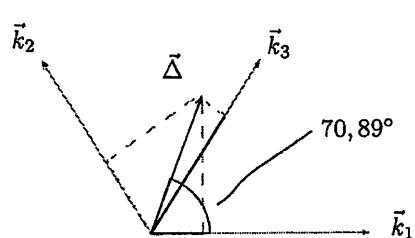
【図 1 1】



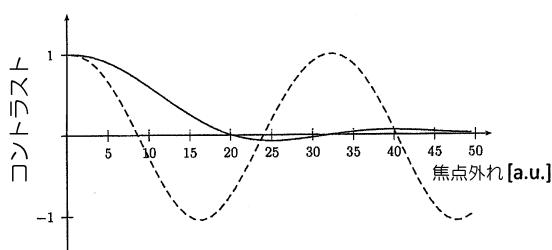
【図 1 2】



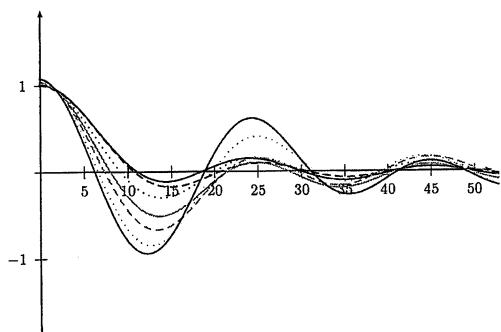
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100103171

弁理士 雨貝 正彦

(72)発明者 ライナー・ウール

ドイツ連邦共和国 82166 グレーフェルフィンク バーンホフストラッセ 89

(72)発明者 マルティン・シュロップ

ドイツ連邦共和国 81373 ミュンヘン ピルクハイマーストラッセ 2a

審査官 越河 勉

(56)参考文献 特表2004-506234 (JP, A)

米国特許出願公開第2003/0086067 (US, A1)

特表2011-515710 (JP, A)

米国特許出願公開第2011/0019064 (US, A1)

国際公開第2008/152605 (WO, A1)

特表2009-543101 (JP, A)

米国特許出願公開第2010/0066823 (US, A1)

特表2008-507719 (JP, A)

米国特許出願公開第2006/0017001 (US, A1)

特開2002-196249 (JP, A)

米国特許出願公開第2002/0041439 (US, A1)

米国特許第06248988 (US, B1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 21/00, 21/06 - 21/36

G01N 21/64