

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-537295
(P2023-537295A)

(43)公表日 令和5年8月31日(2023.8.31)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
G 0 2 B 21/00 (2006.01)	G 0 2 B 21/00	2 G 0 4 3
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	2 H 0 5 2
	G 0 1 N 21/64	E
		B

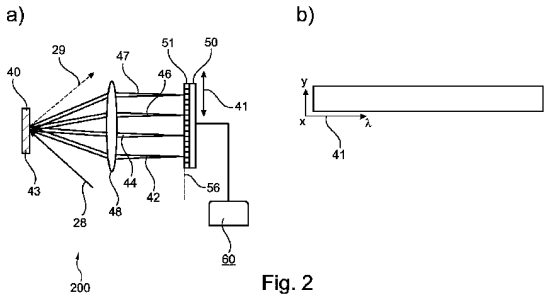
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全37頁)

(21)出願番号	特願2023-506011(P2023-506011)	(71)出願人	506151659
(86)(22)出願日	令和3年7月29日(2021.7.29)		カール ツァイス マイクロスコピー ゲー ーエムペーハー
(85)翻訳文提出日	令和5年3月24日(2023.3.24)		C A R L Z E I S S M I C R O S C O P Y G M B H
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/071269		ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 5 イェナ
(87)国際公開番号	WO2022/023474		カール・ツァイス・プロメナーデ 1 0
(87)国際公開日	令和4年2月3日(2022.2.3)	(74)代理人	110001210
(31)優先権主張番号	102020120190.7		弁理士法人 Y K I 国際特許事務所
(32)優先日	令和2年7月30日(2020.7.30)	(72)発明者	シュウェット ダニエル
(33)優先権主張国・地域又は機関	ドイツ(DE)		ドイツ連邦共和国 イェナ カール・ツァ イス・プロメナーデ 1 0 カール ツァ イス マイクロスコピー ゲーエムペーハ ー内
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	アンハット ティエモ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 放射光検出方法、検出装置及びレーザ走査顕微鏡

(57)【要約】

本発明は、レーザ走査顕微鏡にて放射光、とりわけ少なくとも1個の蛍光色素からの蛍光を検出する方法であり、標本に発する放射光が撮像用光学ユニットにより二次元マトリクスセンサ、特に複数の画素を有して像面内に所在しているそれへと案内され、検出点分布関数とそのマトリクスセンサにより空間オーバーサンプリング要領にて検出される方法に、関する。本方法の特徴は、標本に発する放射光が分散装置にてとりわけ分散方向沿いでスペクトル分離されること、そのスペクトル分離された放射光がそのマトリクスセンサによりスペクトル分解要領にて検出されること、並びに画素領域をなす諸画素により計測された強度の分析中にそれらの画素のうち少なくとも幾つかにてそのスペクトル分離が相殺されること、にある。本発明の付加的諸態様は、レーザ走査顕微鏡における放射光をスペクトル分解検出する検出装置と、レーザ走査顕微鏡とに関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標本 (S) から来る放射光 (28) が、像面 (56) 内に位置し複数の画素 (51) を有する二次元マトリクスセンサ (50) へと、撮像用光学ユニット (48) 経由で案内されるレーザ走査顕微鏡にて、放射光 (28)、とりわけ少なくとも 1 個の蛍光色素からの蛍光を検出する方法であり、

検出点拡がり関数が、前記マトリクスセンサ (50) を用い空間オーバサンプリング様式にて検出される方法であって、

前記標本 (S) から来る前記放射光 (28) が、分散装置 (40) を用い、とりわけ分散方向 (41) 沿いでスペクトル分解されること、

そのスペクトル分解された放射光 (42, 44, 46, 47) が、前記マトリクスセンサ (50) を用いスペクトル分解様式にて検出されること、並びに

画素領域 (71, 72) をなす諸画素 (i, j) により計測された強度 ($I_{i,j}; g_{i,j}$) の評価に際し、それらの画素 (i, j) のうち少なくとも幾つかに関し前記スペクトル分離の反転が行われること、

を特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 記載の方法であって、

色素の放射に割り当てられている少なくとも 1 個の画素領域 (71, 72) が、前記マトリクスセンサ (50) を用い計測されたスペクトルに基づき識別されることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の方法であって、

特定波長 (λ_i) に係る強度値 ($s_p(\lambda)$, $s_{p,i}$) が、前記マトリクスセンサ (50) 上における前記放射光のスペクトル強度分布 ($s_p(\lambda)$, $s_{p,i}$) の決定のため、そのマトリクスセンサ (50) にて前記分散方向 (41) に対し垂直なカラム (i) をなしている複数の画素 (i, j) での計測データ ($I_{i,j}; g_{i,j}$)、とりわけそのマトリクスセンサ (50) のカラム (i) 内の全画素 (i, j) での計測データを総和することによって、決定されることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 2 又は 3 記載の方法であって、

前記画素領域 (71, 72) を識別すべく、前記決定されたスペクトル分布における最大値 (m_{x1} , m_{x2}) 及び最小値 (m_i) が自動サーチされること、並びに

特定色素につき前記点拡がり関数を計算するためのスペクトル限界が、見つかった最大値 (m_{x1} , m_{x2}) 及び最小値 (m_i) に基づきユーザに対し提示されること、或いは前記見つかった最大値 (m_{x1} , m_{x2}) 及び最小値 (m_i) に基づきスペクトル限界が自動定義されること、

を特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1～4 のうち何れか一項記載の方法であって、

前記画素領域 (71, 72) が前記マトリクス検出器 (50) 上で重なり合っていること、並びに

前記個別画素により計測された前記強度のスペクトルアンミキシングが実行されること、

を特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1～5 のうち何れか一項記載の方法であって、

検出点拡がり関数が少なくとも 1 個の蛍光色素に関し決定されることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1～6 のうち何れか一項記載の方法であって、

標本 (S) 上にあり励起光 (14) により同時に照明された複数個の点により放射された放射光 (28) が、前記マトリクスセンサ (50) へと同時に案内され評価されることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1～7 のうち何れか一項記載の方法であって、

前記マトリクスセンサ (50) が光子計数モードで動作することを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1～8 のうち何れか一項記載の方法であって、

画素領域 (71, 72) をなす前記個別画素 (i, j) に関し前記スペクトル分離を反転させるべく、それらの画素 (i, j) により計測された前記強度値 ($I_{i,j}$) が、その画素領域 (71, 72) に係る前記色素に関わる前記放射光の前記スペクトル強度分布 ($s_p(\lambda), s_{p,i}$) を勘案しつつ、且つ前記マトリクスセンサ (50) 上での個別スペクトル成分の空間強度分布 (I^{cal}_i) を勘案しつつ、計算により結合されることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 9 記載の方法であって、

前記分散方向 (41) に対し垂直なカラム (i) をなす諸画素 (i, j) によって計測され、とりわけ前記個別画素領域 (71, 72) 内で最高強度が計測されたカラム (i) をなす諸画素によって計測された、強度分布 (I^{cal}_i) が、前記個別スペクトル成分の前記空間強度分布として用いられることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 1～8 のうち何れか一項記載の方法であって、

画素領域 (71, 72) をなす前記個別画素 (i, j) に関し前記スペクトル分離を反転させるべく、それらの画素 (i, j) により計測された前記強度値 ($g_{i,j}$) が、前記像面 (56) 内にありその個別画素 (i, j) に対しずらされている個所へと、その個別画素 (i, j) の所在個所及びその所在個所に係る前記波長 (λ) に依存する変位ベクトル ($d_{i,j}$) で以て、割り当てられること (画素再割当) を特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 11 記載の方法であって、

前記変位ベクトル ($d_{i,j}$) の波長非依存成分が、参照画素 (12, 3) からその関連画素 (i, j) に至る前記ベクトル ($g_{i,j}$) のベクトル成分を再割当因数、具体的には $-1/2$ によりスケールングすることによって、特定画素 (i, j) に関し取得されることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 11 又は 12 記載の方法であって、

前記画素再割当の実行を経て取得された検出点拡がり関数が、前記分散方向 (x, 41) 沿いとその分散方向に対し垂直な方向 (y) 沿いとで、実質的に同じ形状を有することを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 11 記載の方法であって、

前記変位ベクトル ($d_{i,j}$) であり標本構造に割り当てられた波長域に係るものが、複数枚の走査像の位相相関を評価することにより決定されることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 1～14 のうち何れか一項記載の方法であって、

前記マトリクスセンサ (50) を用い、例えばそのマトリクスセンサ (50) のうち幾つかの画素を用い、とりわけそのマトリクスセンサ (50) の個別画素それぞれを用い、前記色素の蛍光寿命を決定するための時間分解計測が実行されることを特徴とする方法。

【請求項 16】

レーザ走査顕微鏡内で放射光を検出する検出装置、とりわけ請求項 1～15 のうち何れ

10

20

30

40

50

か一項記載の方法を実行する検出装置であり、

複数の画素(51)を有していて像面(56)内にある二次元マトリクスセンサ(50)を備え、標本(S)から来る放射光(28)の検出点拡がり関数がそれにより空間オーバーサンプリング検出される検出装置であり、その放射光(28)をその二次元マトリクスセンサ(50)へと案内する撮像用光学ユニット(48)を備える検出装置であって、分散装置(40)が、前記放射光(28)の前記スペクトル分離向けに設けられていること、

前記マトリクスセンサ(50)が、前記スペクトル分離された検出光(42, 44, 46, 47)の前記スペクトル分解検出向けに構成及び配置されていること、並びに

前記マトリクスセンサ(50)に接続された評価用電子回路(60)が、画素領域(71, 72)をなす前記諸画素(i, j)により計測された前記強度($I_{i,j}$; $g_{i,j}$)の評価範囲内で、それらの画素(i, j)に関し前記スペクトル分離を反転させるべく設けられ且つ構成されていること、

を特徴とする検出装置。

【請求項17】

請求項16記載の検出装置であって、

前記スペクトル分離を反転させるべく、前記評価用電子回路(60)が、画素領域(71, 72)をなす諸画素(i, j)により計測された前記強度値($I_{i,j}$)を、その画素領域(71, 72)に係る前記色素に関する前記放射光のスペクトル強度分布($s_p(\lambda)$, $s_{p,i}$)を勘案しつつ、且つ前記マトリクスセンサ(50)上における個別スペクトル成分の空間強度分布(I^{cal}_i)を勘案しつつ、計算により結合させるよう構成されていることを特徴とする検出装置。

【請求項18】

請求項16又は17記載の検出装置であって、

画素領域(71, 72)をなす前記個別画素(i, j)に関し前記スペクトル分離を反転させるべく、前記評価用電子回路(60)が、それらの画素(i, j)により計測された前記強度値($g_{i,j}$)を、前記像面(56)内にあり前記個別画素(i, j)に対しずらされている個所へと、前記個別画素(i, j)の所在個所及びその所在個所に係る前記波長(λ)に依存する前記変位ベクトル($d_{i,j}$)で以て割り当てるよう(画素再割当)、構成されていることを特徴とする検出装置。

【請求項19】

請求項16～18のうち何れか一項記載の検出装置であって、

前記分散装置(40)が光回折及び／又は光屈折性デバイス、とりわけ格子(43)及び／又はプリズムを備えることを特徴とする検出装置。

【請求項20】

請求項16～19のうち何れか一項記載の検出装置であって、

前記マトリクスセンサ(50)がアナログ積分型検出器及び／又は光子計数型検出器、とりわけsCMOSカメラ、EMCCDカメラ及び／又は(CMOS)SPADアレイを備えることを特徴とする検出装置。

【請求項21】

請求項16～20のうち何れか一項記載の検出装置であって、

前記分散方向(41)が前記マトリクスセンサ(50)の座標方向(x)と同方向であることを特徴とする検出装置。

【請求項22】

請求項16～21のうち何れか一項記載の検出装置であって、

その検出効率を高めるべく、マイクロレンズが前記マトリクスセンサ(50)の上流、とりわけ前記SPADアレイの上流に配置されていることを特徴とする検出装置。

【請求項23】

請求項16～22のうち何れか一項記載の検出装置であって、

前記マトリクスセンサ(50)の前記平面における前記検出点拡がり関数のエアリディ

10

20

30

40

50

スクの直径が、そのマトリクスセンサ（５０）の格子定数の２０倍未満であることを特徴とする検出装置。

【請求項２４】

請求項１６～２３のうち何れか一項記載の検出装置であって、

前記分散方向（４１）における前記マトリクスセンサ（５０）の画素（５１；（ i ， j ））毎スペクトル帯域幅が０．５ｎｍ未満、好ましくは０．４ｎｍ未満、とりわけ好ましくは０．３ｎｍであることを特徴とする検出装置。

【請求項２５】

請求項１６～２４のうち何れか一項記載の検出装置であって、

前記撮像用光学ユニット（４８）がズーム系を備えることを特徴とする検出装置。

10

【請求項２６】

請求項１６～２５のうち何れか一項記載の検出装置であって、

とりわけ諸色素の蛍光寿命を決定すべく、前記マトリクスセンサ（５０）及び前記評価用電子回路（６０）が、例えばそのマトリクスセンサ（５０）のうち幾つかの画素を用い、好ましくはそのマトリクスセンサ（５０）の個別画素それぞれを用い、時間分解計測を実行するよう構成されていることを特徴とする検出装置。

【請求項２７】

レーザ走査顕微鏡、

とりわけ請求項１～１５のうち何れか一項記載の方法を実行するためのレーザ走査顕微鏡であり、

20

励起光（１４）を放射する光源（１２）とりわけレーザを備え、

顕微鏡対物系（２４）を伴っており前記励起光（１４）を調査対象標本（Ｓ）上又は内へと案内する励起ビーム路（１０）を備え、

前記励起ビーム路（１０）上に所在しており少なくとも１個の照明スポット（２７）により前記標本（Ｓ）上を走査するよう働く走査装置（２２）を備え、

前記標本（Ｓ）により放射された放射光（２８）とりわけ蛍光を検出ユニット（３２）へと案内する検出ビーム路（３０）を備え、

前記放射光（２８）を検出する前記検出ユニット（３２）を備え、

励起光（１４）と放射光（２８）とを分離させるメイン色スプリッタ（１８）を備え、
且つ

30

前記光源（１２）を制御し且つ前記検出ユニット（３２）により得られた計測データを評価する制御兼評価ユニット（３４）とりわけＰＣを備える、レーザ走査顕微鏡であって、

前記検出ユニット（３２）が、請求項１６～２６記載の検出装置（２００）を備えることを特徴とする顕微鏡。

【請求項２８】

請求項２７記載の顕微鏡であって、

前記制御兼評価ユニット（３４）が、

決定されたスペクトル分布（ $s_p(\lambda)$ ， s_{p_i} ）における最大値（ m_{x1} ， m_{x2} ）及び最小値（ m_i ）をサーチするよう、

40

且つ、特定色素につき前記点拡がり関数を計算するためのスペクトル限界を、見つかった最大値（ m_{x1} ， m_{x2} ）及び最小値（ m_i ）に基づき提示するよう、或いは

特定色素につき前記点拡がり関数を計算するためのスペクトル限界を、見つかった最大値（ m_{x1} ， m_{x2} ）及び最小値（ m_i ）に基づき独立に定義するよう、

構成されていることを特徴とする顕微鏡。

【請求項２９】

請求項２７又は２８記載の顕微鏡であって、

請求項１～１２のうち何れか一項記載の方法を実行するよう前記検出装置（２００）と併せ前記制御兼評価ユニット（３４）が構成されていることを特徴とする顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明の第1態様は、請求項1の前提部分に従いレーザ走査顕微鏡にて放射光、とりわけ少なくとも1個の蛍光色素(dye)からの蛍光を検出する方法に関する。本発明の更なる諸態様は、請求項16の前提部分に従いレーザ走査顕微鏡にて放射光を検出する検出装置、並びに請求項27の前提部分に係るレーザ走査顕微鏡に関する。

【背景技術】

【0002】

レーザ走査顕微鏡における放射光、とりわけ少なくとも1個の蛍光色素からの蛍光を検出するための一般的な方法が、例えば非特許文献1（以下[Castello et al., 2019]）にて開示されている。このプロセスでは、標本からの放射光が、像面内に座し複数の画素を有している二次元マトリクスセンサへと撮像用光学ユニット経由で案内され、検出点拡がり関数とそのマトリクスセンサを用い空間オーバーサンプリング様式にて検出される。

10

【0003】

レーザ走査顕微鏡における放射光を検出するための一般的な検出装置が同じく[Castello et al., 2019]にて開示されている。一般的な検出装置は、像面内にあり複数の画素を有する二次元マトリクスセンサであり、標本から来る放射光の検出点拡がり関数を空間オーバーサンプリング検出するためのものを備え、且つその放射光をその二次元マトリクスセンサへと案内する撮像用光学ユニットを備える。

20

【0004】

一般的なレーザ走査顕微鏡が同じく[Castello et al., 2019]に記載されており、これは下記の諸部材、即ち励起光を放射する光源、とりわけレーザと、顕微鏡対物系を伴っており調査対象標本上又は内へとその励起光を案内する励起ビーム路と、その励起ビーム路上に所在しており少なくとも1個の照明スポットによりその標本上を走査するよう働く走査装置と、その標本により放射された放射光、とりわけ蛍光を検出ユニットへと案内する検出ビーム路と、励起光と放射光とを分離させるメイン色スプリッタと、その放射光を検出する検出ユニットと、光源を制御し且つ検出ユニットにより得られた計測データを評価する制御兼評価ユニット、とりわけPCとを、備えている。

30

【0005】

生物医学的研究においては、蛍光性生物標本の純粋な撮像に加え、多くの画像ベースで相関的又は統計的な実験及び分析もサポートされることから、共焦点レーザ走査顕微鏡(LSM)が、この数十年来、パワフルなツールとして定着してきている。そのパワーの主原因は、LSMであれば穏当な装置費用で以て複数色素の同時計測が行える、という事実にある。これとの関連で多くのソリューションが知られている。例えば、ダイクロイックフィルタにより様々な部分ビームへの分岐を引き起こすことができ、その上でそれらをそれぞれセンサたるフォトンマルチプライア（光電子増倍管：PMT）へと案内することができる。対照的に、格子又はプリズムを用い放射光をスペクトル分散させた上で、ラインセンサを用いそのスペクトルを検出する構成は、かなり柔軟性が高い。不要なスペクトル域を、そのセンサの上流にある可動ストップを用い、柔軟且つ色素依存的な様式にて阻止することができる。更に、例えば鏡面化ストップを用いスペクトル帯を定めた上で、それらスペクトル帯を別々のPMTに送るソリューションも、知られている。本欄及び後掲の欄における色素の語には、合成色素、蛍光蛋白質の双方を包含する意図がある。更に、固有発光構造を包含する意図もある。例えば、多くの生物学的構造が特定波長でのレーザ照射下で発光することを、自発蛍光等と呼んでいる。

40

【0006】

共焦点顕微鏡システムにおける技術革新には、約30年前に理論的に記述されていたがZEISS社によるLSM880（商品名）が現れる2014まで商業化されていなかった画像走査顕微法(ISM；非特許文献2)がある。カメラ様センサを用いた検出点拡がり関数のオーバーサンプリング計測を基礎としているので、第1に、ピンホールが開口して

50

いるのに共焦点分解能限界を達成することが可能であり、第2に、検出が生来的に並列化されているためシステムの感度が著しく高まる。しかしながら、LSM980（商品名）にて現在実施されているソリューションは、第1に、ファイバベースでの（2Dから1Dへの）画像変換がGaAsPのPMTラインと組み合わせられているため、非常に高価である。第2に、このソリューションでは、その点拡がり関数（PSF）をオーバーサンプリングするのに用いる画素の個数がひどく制限される。この具体的事例ではそれがちょうど32画素とされている。そのため、これらのセンサは、スペクトルチャネルがダイクロイックフィルタにより定められる構成でしか有利に用いることができず、PSFをそのセンサへと案内するのに用いられる光学ズームも必要であり、選定されている対物系（より厳密にはそのエタンドゥヒいてはNA/M比）及び波長の双方にそのPSFが依存している。更に、この検出器テクノロジーのユニットコスト故に、装置1個につき複数の検出器を実装することがほとんどできない。

10

【0007】

センサ側では、近年、いわゆるSPADアレイ又はSPADカメラ（SPAD＝単一光子アバランシェダイオード）の分野で急速な進展があった。原理上、これらのカメラでは、1個の光子アバランシェダイオードにより画素1個が実現されているので、諸画素の個別アクティベーション（駆動）が可能である。更に、それらの画素をいわゆるガイガーモードで動作させるので、エリアセンサ上での光子計数が可能である。即ち、読出し信号が即座にデジタルになるので、1MHzオーダーという極端に高いフレームレートを実現することができる。更に、SPADカメラでは読出し雑音が生じない。読出し雑音は、特に、sCMOSセンサやCCDといった他センサにて生じ、読出し速度が高いと顕著に増大する。EM-CCDは、センサ付近で増幅機構を用いることで読出し雑音以上に信号を強めているので、原理上、単一光子感応性なものとなりうる。しかしながら、これに伴い顕著な増幅器雑音（過剰雑音又は増倍雑音とも呼ばれるもの）が入り込むため、そのセンサの実効感度が半分になる。更に、画素が比較的多数である場合、達成可能な速度が根本的に制限される。sCMOSカメラでは0.3e⁻オーダーなる低い読出し雑音が達成されるので、原理上、そうしたカメラを用いた光子計数が可能である。

20

【0008】

MHz域のフレームレートを有しているため、SPADカメラは、既に、その画素ドウェルタイムが1μsオーダーのLSM用センサとして注目されている。例えば、そうしたカメラを用い、156kfps（fps＝フレーム毎秒）が、1bitデータ深度にて512×128画素なるセンサ分解能で以て得られている。これは約10Gb/sなるデータレートに相当する。このことは、約1000×6個の画素を有するラインセンサにより、1bitデータ深度にて1Mfpsのフレームレートを呈するものさえ実現できそうなことを意味している。未だ、その限界は根本的制限となっておらず、寧ろ膨大なデータレートにより技術的に決定されている。1bitちょうどのデータ深度であれば、およそデッドタイムの逆数に相当する速度、従って10MHzオーダーの速度を達成可能である。ただ、上掲の例では、これは100Gb/sなるデータレートに相当することとなる。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許出願公開第2019／258041号明細書

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】M. Castello et al., "Image Scanning Microscopy with Single-Photon Detector Array", bioRxiv, doi: <http://dx.doi.org/10.1101/335596>

【非特許文献2】http://www.gattaquant.com/files/en_wp_airyscan-detector.pdf

【非特許文献3】Nat Methods 16, 175-178 (2019). <https://doi.org/10.103>

40

50

8/s41592-018-0291-9

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、冒頭で説明したタイプの方法でありひととき万能的な要領にて用いるものを提供することである、と考えられる。更に、その意図は、好適な検出装置及びレーザ走査顕微鏡を明示することにある。この目的は、請求項1の特徴を有する方法により、請求項13の特徴を有する検出装置により、並びに請求項23の特徴を有するレーザ走査顕微鏡により、達成される。

【0012】

本発明に係る方法の有利な変形形態、並びに本発明に係る検出装置及び本発明に係る顕微鏡の好適な例示的实施形態については、とりわけ従属形式請求項及び図面との関連で後に説明する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明によれば、先に明示されたタイプの方法が、標本から来る放射光が分散装置を用いとりわけ分散方向沿いでスペクトル分解される点、そのスペクトル解放射光がマトリクスセンサを用いスペクトル分解様式にて検出される点、並びに画素領域をなす諸画素により計測された強度の評価に際しそれらの画素のうち少なくとも幾つかに関しそのスペクトル分離が反転される点で、更に発展する。

【0014】

本発明によれば、先に明示されたタイプの検出装置が、放射光のスペクトル分離用に分散装置が設けられる点、そのスペクトル分離検出光のスペクトル分解検出向けにマトリクスセンサが構成及び配置される点、並びにそのマトリクスセンサに接続された評価用電子回路が、画素領域をなす諸画素により計測された強度の評価範囲内で、それらの画素に関しスペクトル分離を反転させるべく設けられ且つ構成される点で、更に発展する。

【0015】

本発明によれば、先に明示されたタイプのレーザ走査顕微鏡が、その検出ユニットに本発明に係る検出装置が備わる点で、更に発展する。

【0016】

標本から来る放射光をスペクトル分離させ、ひいては別々な蛍光色素のスペクトル成分を原理的にまずマトリクスセンサの別々な領域上、即ち空間的に分離されている諸領域上に入射させる、という事実が、本発明の本質的着想であると考えられる。それらの領域は識別され、それぞれ蛍光色素に割り当てられる。その上で、個別領域内画素のうち少なくとも幾つかに関しそのスペクトル分離が反転されるため、点拡がり関数を、原理的には既知ISMの場合と同様にして個別蛍光色素に関し決定することができる。従って、様々な蛍光色素に関しめいめいの点拡がり関数を計測することができる。何れにせよ、スペクトル分離が、顕著な強度が計測されるそれらの画素に関し有利にも実行される。

【0017】

本発明の本質的長所は、点拡がり関数をオーバサンプリングすることにより達成され分解能及び感度に関わる諸効果と、スペクトル柔軟性の長所とが、共に得られることであると考えられる。

【0018】

従って、本発明に係る方法、本発明に係る検出装置、並びに本発明に係る顕微鏡では、スペクトル分散型信号分布を伴うISMも可能となる。更に、本発明に係る検出装置、並びに本発明に係る顕微鏡は、ひととき高い光効率及び全体的に安定な構成を達成できる点で際立っている。

【0019】

本発明に係る検出装置は、とりわけ、本発明に係る方法を実行するのに適している。

【0020】

検出点拡がり関数の語は、検出器上における強度分布であり標本平面内の点状発光物体により生成されるものを、意味している。

【0021】

原理上、別々の色素に係る画素領域が検出器で重なり合うこともありうる。重要なのは、少なくともある程度の画素領域間空間分離があることである。明白な通り、評価がより容易且つ良好になるのは、それら画素領域がより明瞭に分離されているときや、個々の色素のスペクトルのシグネチャがより多く異なっているときである。

【0022】

本発明に係るレーザ走査顕微鏡、とりわけその制御兼評価ユニットは、本発明に係る方法を実行するようその検出装置と併せ構成することができる。

【0023】

スペクトル分離の情報処理的反転のやり方については、幾つかの例を後に説明する。

【0024】

本方法のとりわけ好適な変形形態においては、色素の放射に割り当てられている少なくとも1個の画素領域が、マトリクスセンサを用い計測されたスペクトルに基づき識別される。

【0025】

有利なことに、マトリクスセンサ上における放射光のスペクトル強度分布がまず決定される。その上で、例えば、それらの画素領域をその強度分布に基づき識別することができる。更に、その強度分布を、そのスペクトル分離の情報処理的反転に用いることができる。本発明に係る方法のとりわけ好適な変形形態においては、分散方向に対し垂直な方向に沿いマトリクスセンサのカラム内の複数個の画素の計測データ、とりわけそのマトリクスセンサのカラム内の全画素の計測データを総和することによって、特定波長に係る強度値が決定され、マトリクスセンサ上における放射光のスペクトル強度分布の決定に供される。

【0026】

このデータ、即ち放射光のスペクトル強度分布に関するデータは、例えば計測環境の変化後に、自動決定することができる。計測環境の変化は、主として調査対象標本における変化、オブション的には調査された標本の所在個所における変化であると考えられるものであり、オブション的にはその標本又は標本所在個所に別々の色素を設えておくことができる。

【0027】

捕捉又は追加として、スペクトル分布に関するデータを継続的に決定する手段、とりわけ多数の先行計測結果特に直前先行計測結果をもとに自動決定する手段を、設けることができる。この変形形態は、データ記録の個別開始が必要ない点で有利である。

【0028】

ご理解頂ける通り、本願記載の何れの評価向けであれ、複数通りの計測データを加算することで、より良好な信号対雑音比を達成することができる。必要であれば、所望のデータを得るべく平均が求められる計測結果の個数を、違えることもできる。

【0029】

本発明に係る方法の更に好適な変形形態においては、その上で、その決定されたスペクトル分布における最大値及び最小値が自動サーチされ、ひいてはそれら画素領域が識別されるので、特定色素の点拡がり関数を計算するためのスペクトル限界を、見つけた最大値及び最小値に基づきユーザに提示することができる。これに代え、その見つけた最大値及び最小値に基づきスペクトル限界を自動定義することもできる。従って、本発明に係る顕微鏡内の制御兼評価ユニットは、決定されたスペクトル分布における最大値及び最小値をサーチするよう、且つ、特定色素の点拡がり関数を計算するためのスペクトル限界を見つけた最大値及び最小値に基づき提示するよう、構成することができる。これに代え、その制御兼評価ユニットを、特定色素の点拡がり関数を計算するためのスペクトル限界を見つけた最大値及び最小値に基づき独立に定義するよう、構成することもできる。

【0030】

スペクトルの重なり合う色素又は蛍光蛋白質を伴う標本も、本発明に係る方法並びに本発明に係る顕微鏡を用い、撮像及び計測することができる。

【0031】

本発明に係る方法の好適変形形態には、画素領域がマトリクス検出器上で重なり合っていて、その個別画素により計測された強度のスペクトルアンミキシングが実行されるものがある。スペクトルをアンミキシングする方法は原理的に既知である。

【0032】

本願記載のスペクトル分岐反転法に加え、そうしたスペクトルアンミキシング法が、そのスペクトル分岐の反転前又は後に更に実行されよう。

【0033】

例えば、その分散反転をまず、自由選択個数のスペクトル帯、二色素の場合であれば典型的には純粋放射を伴う2個の領域と重複放射を伴う1個の領域とに関し実行することができ、それに後続して画像走査顕微法、次いでそれらのチャンネルのアンミキシング、この例では3個のチャンネルのアンミキシングを適用することができる。

【0034】

本方法を用い、画素における特定スペクトル成分の相対比率を決定することができる。これは、画素再割当（後述）に関するルールに従い、例えば、画素の全強度ではなく加重成分のみがずらされる（変位させられる）ことを意味している。本発明に係る構成を用い、それに対応する参照スペクトルを記録することができる。次のステップでは、更に、スペクトルアンミキシングを例えばライン毎に実行することができ、個々のスペクトルの荷重、即ちそれをもとにスペクトル加重された成分が生成される荷重を、決定することができる。とはいえ、スペクトルアンミキシング法以外にもスペクトル成分分離方法があり、その例としてはPCS、SCA、「深層学習」の使用等がある。

【0035】

本発明に係る方法の働きにより、とりわけ、少なくとも1個の蛍光色素に関し検出点拡がり関数を決定することができる。とはいえ、別々の放射スペクトルを有する複数の色素に関し1回の計測による計測データをもとに検出点拡がり関数を決定できることも、本発明の際立った長所である。

【0036】

利用されているマトリクスセンサのサイズ、具体的にはそのマトリクスセンサの画素数の面で許容される場合は、本発明に係る方法のマルチポイント変形形態も原理的に実現可能である。この場合、標本上の複数個の点が励起光により同時に照明され、それらの点により放射された放射光が、マトリクスセンサへと同時に案内され評価される。この場合には、励起ビーム路及び検出ビーム路を、マルチスポット励起及び検出向けに構成しなければならない。

【0037】

第1の好適変形形態においては、画素領域をなす個別画素に関しスペクトル分離を反転させるべく、それらの画素により計測された強度値が、その画素領域に係る色素での放射光のスペクトル強度分布を勘案しつつ、且つマトリクスセンサ上での個別スペクトル成分の空間強度分布を勘案しつつ、計算により結合される。

【0038】

これに対応し、且つそのスペクトル分離を反転させるべく、本発明に係る検出装置の評価用電子回路は、画素領域をなす諸画素により計測された強度値を、その画素領域に係る色素での放射光のスペクトル強度分布を勘案しつつ、且つマトリクスセンサ上での個別スペクトル成分の空間強度分布を勘案しつつ、計算により結合させるよう構成することができる。

【0039】

個別スペクトル成分の空間強度分布により、色素の点拡がり関数のスペクトル成分のうちマトリクスセンサ上で互いにずれているスペクトル成分が、分散方向に沿って空間的に重

10

20

30

40

50

なり合う度合いが決まる。

【0040】

この場合、分散方向に対し垂直なカラムをなす諸画素、とりわけ個別画素領域内で最高強度が計測されたカラムをなす諸画素によって計測された強度分布を、個別スペクトル成分の空間強度分布として用いることができる。これは、マトリクスセンサ上における検出点拡がり関数が回転対称でありいわば円形である、という仮定に基づいている。回転対称な光学ユニットが用いられている場合にこれが良好な仮定となる。

【0041】

もう一つの重要な方法変形形態群においては、画素領域をなす個別画素に係るスペクトル分離の反転が画素再割当により達成される。スペクトル的に非分解的な方法に関しては、それが画像走査顕微法（ISM）をもとに知られているので、例えば[Castello et al., 2019]を参照されたい。

10

【0042】

それを踏まえ、画素領域をなす個別画素に関しスペクトル分離を反転させるべく、本発明に係る検出装置の評価用電子回路を、それらの画素により計測された強度値を像面内にありその個別画素に対しずれている個所へと、その個別画素の所在個所及びその所在個所に係る波長に依存する変位（ずれ）ベクトルで以て割り当てよう（画素再割当）、構成することができる。

【0043】

これらの方法変形形態においては、諸画素により計測された強度値を、像面内にありその個別画素に対しずれている個所へと割り当てることによって（画素再割当）、画素領域をなす個別画素に関しスペクトル分離を反転させることができる。この場合、既知の画素再割当によるそれと同様、変位ベクトルが、その個別画素の所在個所のみならず、その所在個所に係る波長にも依存する。

20

【0044】

具体的には、こうして変位ベクトルを画素再割当に係る画素毎に決定し、またその変位ベクトルを、関連する画素の所在個所とその関連画素に係る波長とに依存させる。その上で、その関連画素に関し計測された強度値が、その関連画素に対しずれている個所へと、その変位ベクトルにより割り当てられる。

【0045】

例えば、その変位ベクトルの波長非依存成分を、参照画素から関連画素に至るベクトルのベクトル成分を再割当因数によりスケールリングすることによって、特定の画素に関し得ることができる。再割当因数たる $-1/2$ は、励起と放射とで点拡がり関数がそっくりである（ストークスシフトは無視）、即ち特定画素により計測された強度値が参照画素から関連画素に至る経路のちょうど半ばにある像面内個所に割り当てられるであろう、との仮定の下で得られる。

30

【0046】

具体的には、画素再割当は、得られる検出点拡がり関数が分散方向沿いとその分散方向に対し垂直な方向沿いとで実質的に同じ形状を有するものとなる要領にて、実行される。これは、回転対称な光学ユニットが用いられているときには検出点拡がり関数が必ず円形対称な強度分布を有するものとなる、という仮定に基づいている。

40

【0047】

とはいえ、対応する変位ベクトルを得る方法は他にもある。例えば、標本構造に割り当てられた波長域に係る変位ベクトルを、複数枚の走査像の位相相関を評価することにより決定することができる。

【0048】

本発明に係る検出装置においては、アナログ積分型及び／又は光子計数型検出器をマトリクスセンサとして用いることができる。sCMOSカメラ、EMCCDカメラ及び／又は電荷積分型センサを用いるのが望ましい。マトリクスセンサにSPADカメラが備わること、或いはSPADカメラをマトリクスセンサとして用いることが、とりわけ有利であ

50

る。マトリクスセンサ、とりわけSPADカメラを、個々の光子を計数できる光子計数モードで動作させることが、ひととき有利である。このモード、別の呼び方では「ガイガーモード」は、信号対雑音比がひととき好適である点で際立っている。

【0049】

用いられるセンサに関するコストが近年顕著に下落していることは、本発明にとりひととき有利なことである。本願記載の構成では、ファイバ結合を伴う従来のPMTテクノロジーを用いることはほとんど考えられない。

【0050】

とりわけ、光回折及び／又は光屈折性デバイスを、本発明に係る検出装置にて分散装置として用いることができる。その分散装置を、格子とりわけ線格子、及び／又は、プリズムを、備えるものとするのがとりわけ望ましい。原理上はグリズム、即ちプリズムと格子を組み合わせたものを用いることもできる。可調又は可制御な素子、例えばDMD（DMD＝デジタルマイクロミラーデバイス）、MEMS（MEMS＝微細電気機械システム）又はSLM（SLM＝空間光変調器）も同様に使用可能である。

【0051】

本発明に係る検出装置のとりわけ好適な変形形態においては、分散方向がマトリクスセンサの座標方向と同方向、とりわけそれに対し平行な方向とされる。例えば、分散方向と同方向沿いにある画素群のことを画素ローと呼ぶことができ、その分散方向に対し垂直な方向沿いにある画素群のことを画素カラムと呼ぶことができる。マトリクスセンサのアライメント（整列）を、分散方向が画素ローの方向に対し平行となる要領で行うことが、各画素カラム内の諸画素が厳密に同じ波長域、端的に言えば厳密に同じ波長に割り当てられる点で有利である。

【0052】

マトリクスセンサの寸法設定及び／又はそのマトリクスセンサ上での光学撮像との関わりでは、そのマトリクスセンサの画素ピッチ（原理上は格子定数）を、色素のスペクトル帯域幅に亘り、そのマトリクスセンサの平面における検出点拡がり関数のエアリディスクの幅変化よりも大きくなるように選ぶことが、望ましい。この文脈で言えば、マトリクスセンサ及び／又はそのマトリクスセンサ上の光学像を、分散方向沿いにおけるそのマトリクスセンサの画素毎スペクトル帯域幅が0.5nm未満、好ましくは0.4nm未満、より好ましくは0.3nmとなる要領にて寸法設定することも、望ましかろう。点拡がり関数の計算、具体的には離散デコンボリューション（畳込み解除）の実施を考慮し、これらの構成にて、その計算が単純化される仮定を置くことが可能である。より厳密には、この場合、色素のスペクトルを通じエアリディスクの幅が実質的に波長に依存しないことを、良好な近似で以て仮定することができる。それにもかかわらず、十分なスペクトル分解能が得られる。

【0053】

とりわけ望ましいことに、マトリクスセンサ及び／又はそのマトリクスセンサ上の光学像を更に、そのマトリクスセンサの平面における検出点拡がり関数のエアリディスクの直径が、そのマトリクスセンサの格子定数の20倍未満、とりわけ好ましくは格子定数の7倍未満、とりわけ望ましくはそのマトリクスセンサの格子定数の5倍未満となる要領にて、寸法設定することができる。こうした寸法設定により、離散デコンボリューションの計算を、有利なことに比較的少ない波長個数、具体的にはその個々のエアリディスクによりカバーされる画素の個数に対応する個数に、限定することができる。

【0054】

好適なことに、マトリクスセンサ上におけるエアリディスクの直径を格子定数の3倍超にすることができるので、その最終段階がISMと等価な方法を最終的に実行することができる。

【0055】

SPADアレイセンサは、TCSPC（時間相関性単一光子計数）又は「ヒストグラム化」又は「時間窓化検出」（FLIM＝蛍光寿命撮像顕微法）による蛍光寿命情報の計測

10

20

30

40

50

に、ひときわ適している。これにはパルス励起と適切に構成されたセンサとが必要である。これと、Airyscan（登録商標）法との組合せとが、例えば非特許文献3に記載されている。

【0056】

更に、本発明によりスペクトル分解が可能となる。この組み合わせは、とりわけ、非常に魅力的である。

【0057】

本発明に係る方法のある好適変形形態においては、色素の蛍光寿命を決定するための時間分解計測が、マトリクスセンサを用い、例えばそのマトリクスセンサのうち幾つかの画素を用い、とりわけそのマトリクスセンサの個別画素それぞれを用い実行される。

【0058】

本発明に係る検出装置のある有利な発展形態は、とりわけ諸色素の蛍光寿命を決定すべく、マトリクスセンサ及び評価用電子回路が、時間分解計測を例えばそのマトリクスセンサのうち幾つかの画素を用い、好ましくはそのマトリクスセンサの個別画素それぞれを用い実行するよう、構成される点で際立っている。

【0059】

従って、それらマトリクスセンサ及び電子回路は、この用法にて好ましくも時間分解計測を実行可能で、ひいては各画素で以て蛍光寿命の決定が可能な要領にて、設計されるべきである。即ち、本発明のこれらの変形形態では、スペクトル分解型FLIMを画像走査と組み合わせることが可能である。これらの計測ではパルスレーザを用いるのが有利である。

【0060】

マトリクスセンサの検出効率を高めるべく、マイクロレンズを、そのマトリクスセンサの前、即ちそのマトリクスセンサの上流に配置することができる。

【0061】

本発明に係る検出装置の撮像用光学ユニットは、放射光の画像を変化させるズーム系、とりわけ画素毎のスペクトル帯域幅をスケールリングするためのそれを、備えるものとすることができる。

【0062】

そして、根本的に既知な要領に従い、本発明に係る顕微鏡を、励起光を阻止する手段、とりわけ少なくとも1個の放射フィルタを備えるものと、することができる。複数の放射フィルタを有するチェンジャ装置、例えばフィルタホイールを、好ましくも設けることができる。とはいえ、本発明に係る検出装置は、放射光の不要スペクトル成分が評価されない方法変形形態とすることも可能である。そうした目的で、例えばそのマトリクスセンサの対応する画素群、とりわけ画素カラムを、受動的又は不活性な状態に設定することができる。

【0063】

本発明に係る方法、本発明に係る検出装置、並びに本発明に係るレーザ走査顕微鏡の更なる長所及び特徴を、添付図面を参照して以下説明する。図面は下記の通りである。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】本発明に係るレーザ走査顕微鏡の模式的な外観を示す図である。

【図2】本発明に係る検出装置の模式的な外観を示す図である。

【図3】様々な数値開口に関しエアリディスクの直径を波長の関数として明示する図である。

【図4】回折格子における分散角の曲線を波長の関数として明示する図である。

【図5】典型的な色素の放射スペクトルが記されている図である。

【図6】分散方向に対し垂直な方向に沿いマトリクスセンサの複数の画素に亘る検出点拡がり関数の曲線を明示する図である。

【図7】シミュレート画像を示す図（図7a）、画素カラム内画素数に対しプロットされ

10

20

30

40

50

た計数率を明示する図（図 7 b）、並びに分散方向沿い画素数に対しプロットされた計数率を明示する図（図 7 c）である。

【図 8】多くのシミュレート画像をもとに積算された画像を示す図（図 8 a）、画素カラム内画素数に対しプロットされた平均計数率を明示する図（図 8 b）、並びに分散方向沿い画素数に対しプロットされた平均計数率を明示する図（図 8 b）である。

【図 9】標本内に二種類の色素が存在している状態で多くのシミュレート画像をもとに積算された画像を示す図（図 9 a）、それら二種類の色素に関し分散方向沿い画素数に対してプロットされた平均計数率を明示する図（図 9 b）、それらの色素の放射領域に対するスペクトル制限の許で分散方向沿い画素数に対しプロットされた平均計数率を明示する図（図 9 c）、並びにそれら二種類の色素の放射最大値にそれぞれ関連付けられている複数の画素カラム内の画素数に対しプロットされた平均計数率を明示する図（図 9 d）である。

10

【図 10】画素再割当の原理を説明する目的でスペクトル分解を省きマトリクスセンサの模式的表現を示す図である。

【図 11】本発明の根本的な目的及び画素領域を説明する目的で本発明に係る検出装置のマトリクスセンサの模式的表現を示す図である。

【図 12】スペクトル分解と併せ画素再割当の原理を説明する目的で本発明に係る検出装置向けのマトリクスセンサの模式的表現を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0065】

20

同様の部材及び同様に動作する部材を、総じて、同じ参照符号により図中に示すことにする。

【0066】

図 1 には、本発明に係るレーザ走査顕微鏡 100 の模式的表現が示されている。本質的構成部材として、この顕微鏡 100 はまず、励起光 14 を放射する光源 12、とりわけレーザと、その励起光を調査対象標本 S 上又は内へと案内する顕微鏡対物系 24 付励起ビーム路 10 と、その励起ビーム路 10 上にあり少なくとも 1 個の照明スポット 27 でその標本 S 上を走査する走査装置 22 とを備えている。放射光 28 を検出する検出ユニット 32 を伴う検出ビーム路 30 も、放射光 28 とりわけ蛍光検出ユニット 32 へと案内すべく、設けられている；その放射光は、励起輻射 14 への露出の結果としてその標本 S により放射されたものである。本発明に従い設けられているメイン色スプリッタ 18 には、励起光 14 と検出光 28 とを分離させる働きがある。そして制御兼評価ユニット 34、とりわけ PC とされうるそれが、光源 12 を制御すべく、且つ検出ユニット 32 により得られた計測データを評価すべく、設けられている。本発明によれば、検出ユニット 32 には本発明に係る検出装置 200 が備わる。

30

【0067】

光源 12 により放射された励起光 14 は、偏向鏡 16 を経てメイン色スプリッタ 18 に達し、そのメイン色スプリッタにて走査装置 22 の方向に案内される；その走査装置は、顕微鏡対物系 24 の後方瞳に対し光学共役な平面内に配置することができる。走査装置 22 を経た励起光 14 は、走査対物系及びチューブレンズを経て顕微鏡対物系 24 に達し、その顕微鏡対物系が、その励起光 14 を、標本 S 上又は内にある標本平面 26 内照明スポット 27 に合焦させる。走査対物系及びチューブレンズは、図 1 では 1 個の部材 23 として模式的に描かれている。

40

【0068】

その後、標本 S 上又は内の対励起光 14 露出領域から放射輻射 28 が放射される；これは、典型的には、その標本 S に前以て設えられている色素からの蛍光である。その後は、その放射輻射 28 が、先に励起光 14 が辿った「逆走査（デスクャン）」検出ビーム路 30 上と同じ経路に沿いメイン色スプリッタ 18 へと遡行するものの、今度はそれがそのメイン色スプリッタを透過し、そして本発明に係る検出装置 200 が備わる検出ユニット 32 に達する。検出ユニット 32 による計測で得られたデータが制御兼評価装置 34 により

50

評価される。その制御兼評価装置 3 4 の働きで、光源 1 2 及び走査ユニット 2 2 を制御することもできる。

本発明に係る顕微鏡 1 0 0 は、とりわけ共焦点レーザ走査顕微鏡とされる。

【0069】

図 2 a) には、本発明に係る検出装置 2 0 0 の例示的实施形態の模式的表現が示されている。本質的構成部材として、レーザ走査顕微鏡 1 0 0 内放射光 2 8 のスペクトル分解検出用検出装置 2 0 0 は、調査対象標本 S から来る放射光 2 8 をスペクトル分離させる分散装置 4 0 と、そのスペクトル分解放射光を空間分解検出する二次元マトリクスセンサ 5 0 と、そのスペクトル分解放射光を二次元マトリクスセンサ 5 0 上へと案内する撮像用光学ユニット 4 8 とを備えている。

10

【0070】

図 2 a) に描かれている例示的实施形態では分散装置 4 0 が線格子 4 3、より厳密には反射格子とされており、検出対象放射光 2 8 がその線格子 4 3 上に下側からある角度にて入射している。格子 4 3 に代えプリズム又はグリズムを用いることもできる。マトリクスセンサ 5 0 上における信号の明確なスペクトルスミアリングは重大である；そのスペクトルスミアリングは、原理上、その個所における波長分布との関わりで線形及び非線形の何れにもなりうる。ただ、必ず単調なものとなる。図示されている例示的实施形態では、格子 4 3 の諸ラインが紙面に対し垂直に延びていることが原因で、図 2 a) 中で縦方向に延びる分散方向 4 1 に沿いスペクトル分岐が生じる。参照符号 2 9 により示されているのは 0 次回折光である。0 次回折光 2 9 は、用いなくともかまわないが、入射光に沿い再び格子 4 3 上へと案内すること、オプション的には偏向回転付でそうすることで、検出効率を高めることができる。

20

【0071】

放射光 2 8 はピンホール（ここでは図示せず）により共焦点フィルタリングされており、光学システム（同じくここでは図示せず）により平行化された上で分散装置 4 0 へと差し向けられる。

【0072】

その後は、個々のスペクトル成分 4 2、4 4、4 6、4 7 が撮像用光学ユニット 4 8 上、即ち図 2 a) にてレンズ素子として模式的に記されているその上に入射する。原理上、撮像用光学ユニット 4 8 は、複数のビーム整形部材を備えるものとすることができ、更にはとりわけズーム系を備えるものとする事ができる。

30

【0073】

撮像用光学ユニット 4 8 は、それら別々なスペクトル成分 4 2、4 4、4 6、4 7 を、複数の画素 5 1 を有するマトリクスセンサ 5 0 上に合焦させる。マトリクスセンサ 5 0 は例えば SPAD マルチラインカメラとすることができ、それに備わるラインを例えば 5 本とすることができ、また各ラインに備わる画素を 8 0 0 個、即ちカラム 8 0 0 本相当とすることができる。

【0074】

図 2 b) には、マトリクスセンサ 5 0 のエリアの模式的表現が示されている。マトリクスセンサ 5 0 は、分散方向 4 1 がロー方向に沿い延びる要領、即ち図 2 b) 中に示されている座標系の x 方向に対し平行に延びる要領で、格子 4 3 に対し位置決めされている。カラム方向は y 方向に対し平行に延びている。例えば、図 2 b) にて青色スペクトル成分をスペクトルの左縁に所在させることができ、赤色スペクトル成分をスペクトルの右縁に所在させることができる。指数 i、j はそれぞれマトリクスセンサ 5 0 のカラム、ローへのラベル付けに用いられており、いわば画素 (i, j) が第 i カラム内で第 j ロー内の画素となる。

40

【0075】

図 2 a) には、本発明に従い設けられた評価用電子回路 6 0 が模式的に描かれており、これは、マトリクスセンサ 5 0 に接続されると共に、画素領域をなす諸画素 (i, j) により計測された強度 I_i, j の評価中にそれらの画素 (i, j) に係るスペクトル分離を

50

反転させるよう構成されている。

【0076】

評価用電子回路60、例えばデータグラバをも備えるそれを、例えばFPGAの態、マイクロコントローラの態、或いはそれに比肩する諸部材の態で実施することができる。本質的には、そのハードウェアにできるだけ近いところ、即ちマトリクスセンサ50にできるだけ近いところでデータボリュームの低減を達成することで、評価用電子回路60から制御PCへと、即ちとりわけ図1記載の発明に係る顕微鏡100の制御兼評価ユニット34へと、できるだけ連続的にデータを流すことが可能となる。

【0077】

図2a)の状況は、分散素子40の働きで分散方向41に沿い大きく明確な色収差が生じ、別々な波長が引き離され従って個別検出可能になる、という結果を伴う状況としても、記述することができる。それに対し垂直な方向、即ち図2b)中のy方向では、点拡がり関数が本質的に不変のまま保たれる。とはいえ、放射光28をスペクトル分散させることでその点拡がり関数がある程度壊され、このシステムを用いISM撮像を果たすやり方が自明ではなくなる。

【0078】

これを達成するため、ここでは撮像用光学ユニット48がまず、マトリクスセンサ50の寸法を基準として、即ち図示例ではSPADカメラの寸法を基準として寸法設定される。例えば、マトリクスセンサ50の画素ピッチ、即ちマトリクスセンサ50の格子定数とも呼べるそれを、 $a = 25 \mu\text{m}$ とすることができる。

【0079】

エアリディスクの直径については、下記の通り、光の波長と数値開口とに依存することが知られている。

$$d_{\text{Airy}} = 1.22 \lambda / \text{NA} \quad (1)$$

【0080】

ISMに係る信号を評価するには、空間方向毎に少なくとも3～4画素分、点拡がり関数をオーバーサンプリングしなければならない。450nmから800nmに至る関連波長域に関しこれを成し遂げるには、そのセンサが照明されているときに、検出側数値開口がおおよそ $\text{NA} = 0.01$ であることが求められる。このことは図3における図解から明らかであり、そこではエアリディスクの直径が諸数値開口に関し波長の関数として示されている。この場合、図3中の図解にてy軸がなしているグリッドは、SPADカメラの想定画素サイズたる $25 \mu\text{m}$ に相当している。

【0081】

図4には、1000ライン/mmの格子に関し、nm単位の波長に対する度単位の分散角の曲線が示されている。例えば、格子43・SPADカメラ50間にある撮像用光学ユニット48の焦点距離が $f = 50 \text{mm}$ であると想定されている場合、それにより、上掲のスペクトル域に関し約730画素に亘るスペクトル分布がもたらされる。従って、1個の画素51上に託されるスペクトル帯域幅がおおよそ $\Delta \lambda$ (画素) $= 0.5 \text{nm}$ となる。

【0082】

原理上、分散スミアリングされた信号分布をもとに点拡がり関数を復元するには、様々なスペクトル成分を数値的に積分しなければならない。この要領でそれら画素の強度がひとたび得られたら、次ステップにて画像走査顕微(ISM)法を適用することができる。

【0083】

個々の画素51上への入射強度は $I_{i,j}$ により表され、また指数 i によりカラム、即ちx方向及び分散方向41に沿い延びるその番号が表される。指数 j によりロー、即ちy方向に沿い延びるその番号が表される。

【0084】

強度 $I_{i,j}$ は下記の通り書き表すことができる。

【数1】

10

20

30

40

50

$$I_{i,j} = \int_{\Delta\lambda} Sp(\lambda) \left[\int_{\Delta x_i} Airy(x - x_0(\lambda), \lambda) dx \int_{\Delta y_j} Airy(y - y_0(\lambda), \lambda) dy \right] d\lambda \quad (2)$$

【0085】

ここで、 $Sp(\lambda)$ は励起された蛍光色素の放射スペクトルであり、 $Airy(x, \lambda)$ は点拡がり関数の空間強度分布に対応するエアリ関数であり、そのエアリ関数内の波長 λ は、とりわけ、そのエアリ関数 $Airy(x, \lambda)$ の幅を決めるパラメタを代表している。 x_0 は点拡がり関数の中心を表している。その点拡がり関数の中心、即ち最大強度の点は、従って分散 $x_0(\lambda)$ により定まり、且つカラム中心 y_0 に対する光学的手段による調整分により定まる。

【0086】

通常、一般的な蛍光色素（蛍光体）のスペクトル分布は、およそ $\delta\lambda = 50\text{ nm}$ なるスペクトル帯域幅を有している（図5参照）。図3中のグラフによれば、この帯域幅に亘るエアリ関数の幅変化は、 $10\text{ }\mu\text{m}$ よりもかなり小さい。即ち、その点拡がり関数に関しスペクトル放射重心の幅が λ_0 に設定されていれば、誤差は画素の $1/4$ 以下となる；これは特にスペクトルの弱放射エッジエリアにて生じるものであり、従ってほとんど寄与してこない。そのため、 $Airy(y - y_0, \lambda)$ を、良好近似で以て $Airy(y - y_0, \lambda_0)$ により置換することができる。これにより、 y 座標沿いPSF項が λ に対し独立になるので、それを λ 座標沿い積分の外に引き出すことができる。

【0087】

このとき、一次元デコンボリューション問題が、励起されている蛍光色素のスペクトル $Sp(\lambda)$ が判明しているときの x 方向沿いスペクトルスミアリングからの無摂動エアリ関数の計算内に、残っている。この脈絡における情報処理及びハードウェア労力を過小評価するべきではない。結局のところ、少なくとも 4×730 個の画素からの信号を評価しなければならない。

【0088】

後に説明する通り、更なる仮定を置くことで、評価用電子回路60が負う情報処理負荷を更に軽減することができる。置かれる第1の仮定は、その無摂動点拡がり関数が径方向対称であるというものである。これは、分散方向41即ち x 方向のスペクトルに沿った点拡がり関数の空間的拡がりを、それに対し直交する方向、即ち y 方向における可読強度分布 $I_j(y)$ をもとに決定できることを、意味している。更に、 $\Delta\lambda < 0.5\text{ nm}$ での画素毎スペクトル帯域幅が非常に狭いので、その画素の拡がりによる分散性信号スミアリングは良好な近似で以て無視することができ、その画素毎スペクトルが区分毎に一定であると仮定できるという結果になる。更に、積分範囲の幅、即ちそれに亘り積分を形成しなければならない画素の個数も、直交方向即ち y 方向に沿い決定された強度分布をもとに決定することができる。図3中の図解から明らかな通り、5個の画素に亘る積分で全く十分である。これにより、前述した問題につき下記の離散化版がもたらされる。

【数2】

$$I_{i,j} = I_j^{(y)} \sum_{n=i-2}^{i+2} sp_n \int_{\Delta x_i} Airy(x - x_0(\lambda_n)) dx \quad (3)$$

10

20

30

40

50

【0089】

ここに、 sp_n は関連画素のスペクトル位置における蛍光色素の離散化強度である。これを受け、画素 (i, j) にて計測された強度 $I_{i, j}$ に従い隣の画素を中心とするエアリ関数の諸成分を決定することが、課題となる。これとの関連では、直交方向即ち y 方向にて計測されたデータから近似値を得ることもできる。

【0090】

まず、分散方向に対し垂直な方向に沿い全画素に亘り、即ちカラム内の全画素に亘り、信号の総和を計算することが有利である。これにより正規化可能な放射スペクトルがもたらされ、図5に示されている分布が現れる結果となる。これをもとに、離散積分値を計算するのに必要なスペクトル分布離散化値 sp_i を決定することができる。図5には、一例として、第1の波長 λ_i の第1の画素 (i, j) に係るスペクトル sp_i の値と、すぐ隣にあり波長 λ_{i+1} に対応する画素 $(i+1, j)$ におけるスペクトル sp_{i+1} の値とが示されている。スペクトル分布がひとたび決定されたならば、画素 i に対する近隣の画素 $i-2, i-1, i+1, i+2$ の寄与分を、 y 方向沿い強度関係をもとに決定することができる。図6に示されているエアリ関数の空間分布例では、スペクトルの値 sp_{i+1} にて5個の画素に関し下記の比例強度分布がもたらされよう。

$I^{cal}_i = (I(i-2), I(i-1), I(i), I(i+1), I(i+2)) = (0.008, 0.16, 0.65, 0.16, 0.008)$

【0091】

図6にはスペクトル位置 i の sp_i に関し、即ちSPADカメラ50にて画素番号 $i+1$ の隣にある画素 i に関し、図5中のスペクトルに対応しており低めな点拡がり関数の値も示されている。

【0092】

こうして決定された値により、最後に残った積分

【数3】

$$\int_{\Delta x_i} \text{Airy}(x - x_0(\lambda_n)) dx$$

の離散化を行うことができる。その後、画素 (i, j) にて計測された強度 $I_{i, j}$ に係る下記の表現が得られる。

【数4】

$$I_{i,j} = \sum_{n=i-2}^{i+2} sp_n P_{n,j} = \sum_{n=-2}^2 sp_{i-n} P_{i-n,j}$$

(4)

【0093】

ここに、 $P_{n, j}$ は、隣の画素 n を中心とするエアリ関数の強度のうち画素 (i, j) にて決定された成分である。 $P_{n, j}$ には

【数5】

$$I_j^{(y)} * \int_{\Delta x_i} \text{Airy}(x - x_0(\lambda_n)) dx$$

なる寄与分が含まれている。最後のステップでは、総和記号の脇に振られている変位 n を基準として諸画素の強度コンテンツを並べ替える。これは、結局、それが注目対象たる特定画素 (i, j) からの信号ではないが、蛍光色素に係る点拡がり関数の関連標本化成分の総和であるからである。この指数並べ替えは、共通の基準位置に対するそのスペクトル分散放射の点拡がり関数のずれに、物理的に相当しており、これは例えば分散プリズムを

経る 2 回目の通過により光学的に達成することができる。これにより、専ら計測データをもとに決定された点拡がり関数に関し下記の式がもたらされる。

【数 6】

$$I|_{n=-2,\dots,2,j} = \sum_i s p_{i-n} P_{i-n,j} \quad (5)$$

【0094】

10

光子計数型マトリクスセンサがガイガーモードである場合、 $P_{i-n,j}$ により、マトリクスセンサ画素毎に検出された光子 $N_{i-n,j}$ が、決定されるべき P S F の諸サブ画素に対し、下記の通り所与センサ位置での P S F の具体的な事前校正済分布に従い割り当てられる。

【数 7】

$$P_{i-n,j} = I_{i-n}^{\text{cal}} \cdot N_{i-n,j} \quad (6)$$

20

【0095】

これにより、考察下色素に係る画素領域の諸画素に関し、本発明によるスペクトル分岐反転が実施される。

【0096】

分散性信号スミアリングを無視することにより生じる誤差が大き過ぎそうであれば、対抗手段として、大きめのセンサアレイや焦点距離が長めの撮像用光学ユニットを用いることができる。例えば、用いるアレイを 4×1400 画素のものとし焦点距離を $f = 100 \text{ mm}$ とすることで、画素毎帯域幅が直ちに $\Delta \lambda < 0.25 \text{ nm}$ となる。即ち、どのような場合でも、合理的な動作点を見つけることができる。マトリクスセンサ 50 のロー数を数個に制限する必要はない。高いフレームレートを達成できるのであればかなり多くの画像ラインにすることが可能であり、それによってマルチポイント励起を伴う計測も可能になる。本発明に係る方法では、こうして所与フレームレートにおける並列化の因数倍に画素ドウェルタイムを延ばすことができるため、そうした並列化が有益である。

30

【0097】

L S M における光子個数の制限は、上述した原理の適用に関わる問題を孕んでいる。マトリクスセンサ 50 はデジタル信号、即ちセンサ画素毎の光子と画像を供給する。続いて、マトリクスセンサ 50 の画像 1 枚が、L S M 画像全体のうち 1 個の画素へと変換される。マトリクスセンサ 50 上に入射する光子束が例えば数メガヘルツのオーダでありえ、L S M の画素ドウェルタイムが $1 \mu \text{ s}$ のオーダであるべきであるので、例えば 4×730 個の画素に亘り全体として画素ドウェルタイム当たり数個の光子しか分布しない。従って、マトリクスセンサ 50 の画素の大半がデータとしては 0 を供給し、ほんの数画素しか 1 を供給しないこととなる。そのため、マトリクスセンサ 50 の直接読出し 1 回では、使用可能な結果を配給することさえできない。加えて、光子の放射及び検出が統計的事象であるので、長期平均での光子分布は、そうした少数の光子による画像 1 枚からは導出することさえできない。このことが図 7 a) に描かれており、同図では、図 5 記載の色素スペクトルへの露出に係り S P A D カメラ 50 から得られる 1 枚の画像が、 $1 \mu \text{ s}$ なる露出持続時間により $I \text{ p h o t} = 10 \text{ MHz}$ なる光子束で以てシミュレートされている。画素毎スペクトル帯域幅は 0.5 nm である。見えている事象はほんの数個であり、それらは約 520 nm にある色素放射最大値の付近、5 ライン S P A D カメラ 50 の中心ライン上で、群れを成している。図 7 b) に示されているのは、S P A D カメラ 50 の画像ライン沿い

40

50

(x 方向沿い)での各事例の信号の総和であり、それにより点拡がり関数が再現されている。図 7 c) に示されているのはカラム内、即ち y 方向沿いの全画素の計数事象の総和であり、その色素の検出スペクトルにそっくりである。自明な通り、先に説明したアルゴリズムは、図 7 中のデータに対し有意義に適用することさえできない。

【0098】

従って、システムを、積分画像で以て校正する必要がある。とはいえ、原理的にこれは非常に高速なプロセスであり、複数回の画像走査は一般に必要でない。このことが、10 MHz なる平均光子束による個別画像 1000 枚の平均に関し、図 8 a) に描かれている。積分時間はこの場合たった 1 ms であり、画像ライン 1 本の走査にほぼ相当している。図 8 b) 中の点拡がり関数は総和信号をもとに決定されたものであり、5 個の画素上で予期される上述の強度分布を概ね厳密に再現しており、また図 8 c) 中のスペクトルも理解することができる。

10

【0099】

図 8 b) 及び図 8 c) の計測を踏まえ、 s_{p_i-n} 及び $P_{i-n,j}$ に係るデータを得ることができ、それらを例えば評価用電子回路 60 のメモリ内に格納することができる。その上で、走査像画素毎の SPAD 画像をルール (等式 5) に従い評価することができる。整数の光子個数値を、今や、浮動小数点値に変換して輝度比を得ることができる。

【0100】

本発明によるスペクトル分離反転の第 2 のオプションであり、色素に割り当てられている画素領域の諸画素に係るものに、画素再割当法に基づくものがある。それについて、図 10 ~ 図 12 を参照し記述することにする。

20

【0101】

まず、既知の画素再割当法を、[Castello et al., 2019] 上での用語法に従いそれ自体を指向する描写で以て図 10 に基づき説明する。

【0102】

画像走査の状況として、点状照明源を用い標本が走査され、その標本に対し固定されている共焦点二次元検出器アレイを用い空間分解様式にてその標本による逆放射強度が計測される状況を、考える。その共焦点マトリクスセンサが $n \times m$ 個の画素 (i, j) を有しており、その指数 i, j が 1 からそれぞれ n, m 及んでいるとする。

【0103】

その意図が、長方形アレイ上でのスペクトル計測結果を後の段階にて評価することにあるので、単純さに鑑みここでは長方形アレイを想定する。とはいえこれ自体は制約ではなく、原理的には他の幾何形状の画素化センサも考えられる。とりわけ、それにより良好なフィルファクタ (充填率) が得られることから、六角形の構成がしばしば用いられている。

30

【0104】

その上で、明瞭な表現とするため、物面から中間像面までの倍率が 1 であると仮定する。また、有利さに鑑み、センサの各画素が 1 エアリ単位 (AU: エアリ単位) より小さいと仮定する。この事例は画像走査における標準的な仮定、即ち PSF が空間オーバーサンプリング要領にて検出され且つ各画素が 1 AU より小さな (又は 0.8 AU より小さく或いはより良好なことに 0.3 AU より小さな) 実効ピンホールを表している、との前掲の仮定に相当している。原理上、この構成は、画素サイズよりも小さな PSF でもうまく稼働する。とはいえ、その場合、スペクトルを計測すること及びスペクトル共焦点画像を記録することしかできない。ひいては、画像走査を有意な要領で用いることができない。

40

【0105】

画像走査顕微鏡は線形且つ空間不変なシステムであり、いわば標本平面がマトリクスセンサの像面 56 内へと線形的に写像されるものであると、考えることができる。変数 x により、像面 56 即ちマトリクスセンサ平面内位置を標本平面内へと逆投影したものの位置を、表すことにする。その点 x における走査位置がその標本内にある場合、即ち換言すればその照明強度の最大値がその標本内の位置 x にある場合、画素 (i, j) により計測さ

50

れた強度 $g_{i,j}(x)$ を下記の通りコンボリューション（畳込み）として記述することができる。

【数 8】

$$g_{i,j}(x) = (h_{i,j} * f)(x) \\ = \int h_{i,j}(x - x')f(x')dx'$$

(7)

10

【0106】

ここに、 $h_{i,j}(x) = h^{exc}(x) h^{em}(x - d_{i,j})$ は、個々の考察対象センサ画素に係る実効 P S F である。 $h_{i,j}(x)$ は、励起の P S F たる $h^{exc}(x)$ と放射の P S F たる $h^{em}(x - d_{i,j})$ との積である。原理上、励起の P S F たる $h^{exc}(x)$ は計測できるので、既知であると仮定することができる。正しい検出 P S F を得るには、個々の画素のサイズを無視できない場合、その画素の幾何形状を記述するアパーチャ関数を $h^{em}(x - d_{i,j})$ に畳込む必要があるだろう。 $d_{i,j}$ は検出器アレイの面内ベクトルであり、参照素子例えばそのセンサの中心にある素子と画素 (i, j) との間のオフセットに相当している。従って $d_{i,j}$ を下記の通り書き表すことができる。

【数 9】

$$d_{i,j} = \begin{pmatrix} d_{i,j}^x \\ d_{i,j}^y \end{pmatrix}$$

(8)

20

【0107】

単純に考えれば、実効 P S F たる $h_{i,j}(x)$ の最大値が関数 $h^{exc}(x)$ 及び $h_{i,j}(x - d_{i,j})$ の最大値同士のほぼ中間点に所在する、即ちほぼ位置 $s_{i,j} = d_{i,j} / 2$ にあると、仮定することができる。これが厳密に成り立ちそうなのは、無収差システムでは励起 P S F と放射 P S F とがそっくりな場合であり、蛍光でそれが成り立ちそうなのはストークスシフトがない場合である。画素再割当の基本的着想では、想定上、画素 (i, j) により計測された強度の大半が、像面 5 6 における関連画素の位置座標に対応していない標本内位置に由来する。単純に考えれば、実効 P S F の最大値が関数 $h^{exc}(x)$ 及び $h_{i,j}(x - d_{i,j})$ の最大値同士の中間点にあるものと想定される場合、計測画素 (i, j) による強度が由来する個所は標本平面内の位置 $s_{i,j} = d_{i,j} / 2$ となる。

30

【0108】

画素再割当及び画像走査の基本的着想は、参照画素に対しずれている信号をその参照画素の方向に沿い逆にずらすこと、並びにそれらの信号を加算することにある。原理上、これは直感的に明白なことであり、何故ならこの要領で動作する共焦点システム内のマトリクスセンサの各画素 (i, j) が変位画像を供給するからである。その逆ずらしに加え、それらの画像を単純に相互位置揃えすることもできるし、他形態の計算例えばマルチビューデコンボリューションを用い全画素からの信号を計算によりうまく相互結合させることもできる。

40

【0109】

図 10 には、 5×5 個の画素を有するマトリクスセンサ 5 4 を用い共焦点画像走査が行われる場合に関してその状況及びラベルが示されている。中央にある画素 $(3, 3)$ が参照画素として働いている。円 5 7 は画素 $(5, 4)$ に係る実効 P S F の重心を表している。ただ、その P S F の拡がり是一般にその円 5 7 よりもかなり大きく、それが図 10 に示

50

されているのは専らその P S F の最大値の位置を明示するためである。

【0110】

画像走査により、より良好な光学的分解能と信号対雑音比 (S N R) の改善とを達成できることが知られている。フィルタの使用により画像走査にて色依存性を実現できることが知られている。ストリップ格子の使用により二色を含む P S F を計測及び評価することも知られている。

【0111】

しかし、自明な通り、複数の点にて直にスペクトルを計測すればかなり多くの情報が得られる。更に、それをデータのスペクトルアンミキシングに役立てることができる。加えて、そうした計測向けに画像走査の肯定的特性を用いることが有利であろう。

10

【0112】

本願記載の発明に係る検出装置を用いることで、例えば、マトリクスセンサ 50 上の画素領域に対応する特定放射帯の諸スペクトル成分がスペクトル的に結合される要領にて計測を実行することができ、ひいては、そのスペクトル帯に関しいわゆる画像走査 (別の呼び方ではエアリ走査又は光学再割当) 法を実行することができる。この結合が、独立形式請求項の用語法にて、スペクトル分岐の反転と呼ばれているものである。

【0113】

放射帯に係る諸画素の組合せを作り出すには、その格子その他の分散デバイスの分散的影響を、N 個の隣り合う画素に関し、即ち画素領域をなす諸画素に関し、反転させることが必要である。

20

【0114】

結局、これは、その分散が反転される要領にてその分散素子を通じ光が遡行することが可能な状況に、比肩している。これにより、ひいては、空間情報しか含んでおらず且つ諸スペクトル成分がやはりある点拡がり関数をなし空間的に重畳されている P S F が、もたらされることとなろう。これに類することが例えば特許文献 1 に記載されている。とはいえ、光学的手段による分散の反転は常に可能なことではない。例えば格子をスペクトル分岐に用いるのが望ましく、何故ならそれらにより線形分散がもたらされるからである。とはいえ、効率が限定的なため格子の複数使用、即ち光の往路及び復路双方での使用は有利ではない。更に、純粋に光学的な分散反転装置は複雑、高価であり調整するのが困難である。

30

【0115】

格子によりもたらされる線形分散の場合、関係 $\lambda = k x$ が、そのマトリクスセンサの長手方向 x 沿い波長割当に適用される。ここで、 k はその分散の強度に依存する比例定数であり、ひいてはその格子のライン幅に依存する。従ってその単位は nm/mm である。とはいえ、原理上、この考察は格子のみに適用されるものではなく、分散素子たるプリズムにも適用されうる。しかしながら、その場合、センサ上での所在個所と波長との間の関係を、もはや、単純な線形関係を用い記述することができない。ひいては計測結果の校正及び評価が幾ばくか異なるものとなる。

【0116】

更に、線形分散が諸波長に亘るスペクトル (波長毎の諸画素) の最適サンプリングにつながるし、位置・波長間関係が線形に保たれるので、格子の使用が望ましい。プリズムの使用は、ある種の状況下では光学的にやや効率的となるが、それが原因でスペクトルの青色部分のサンプリングがより良好になる一方で、赤色波長がスペクトル的に「抑圧」されるためうまくサンプリングされなくなる。厳密には、残念ながらこれは不利なことであり、何故なら、長めの諸波長が選ばれていると励起／検出がより行われづらくなり、特に生体標本を撮像する場合にそうなるからである。この場合、複数通りの染色が、特に本発明に係る装置で以て容易に検出されうるようにすべきである。

40

【0117】

ここで例示的实施形態を示す。図 11 にはマトリクスセンサが示されると共に 2 個のスペクトル帯が模式的に示されており、またそれらスペクトル帯が、例えば、青色・緑色の

50

放射領域（画素領域 7 1）とより橙色・赤色な放射領域（画素領域 7 2）とを有する蛍光
 輻射標本のスペクトルシグネチャに対応している。原理上、データ評価のための作業セッ
 トは、1 個又は 2 個の円形対称点拡がり関数 8 0（P S F）が生じる要領にて特定のスペ
 クトル帯を、ひいては画素領域 7 1 及び／又は 7 2 をなす諸画素の信号を、結合させるこ
 とになる。それ自体は既知な画像走査法を用いこの要領で得られる P S F の爾後又は同時
 評価をもとにして、その標本の画像を、画像走査の有利な諸特性がスペクトル分解能と結
 びついたもの、即ち両色素をその画像内で表現可能なものとするができる。その表現
 を透明に保つため、この場合、そのセンサの別々の画素上に重なる程度にそれら色素がス
 ペクトル分離されている、とまず仮定した。この状況は有利である。とはいえ、この構成
 を用い、スペクトル的に重なり合う色素又は蛍光蛋白質を伴う標本を、撮像及び計測する
 こともできる。これについては本明細書の概要部分にて説明済である。

10

【0 1 1 8】

図 1 2 には、本発明に係る検出装置のマトリクスセンサ 5 0 の詳細が、分散放射光 2 8
 を計測するのに用いられる画素（ i, j ）と併せ示されている。放射光 2 8 は方向 i 沿い
 で分散的に分岐されている。これは、各カラム i が一波長に割り当てられていることを意
 味している。方向 j 沿いでの分散波長分岐はないので、そこでは空間情報しか利用するこ
 とができない。図 1 2 に示されている状況では、画素（1 2, 3）が参照画素を表しており、
 それに係る参照波長が λ_r とされており、その参照画素に対し他の諸画素の信号が関
 連付けされている。これは、既知の画像走査顕微法にて現在まで行われてきているそれに
 類する要領にて、他の諸画素の信号が参照画素（1 2, 3）の方へと押し戻されることを
 意味している。この場合の「押し戻し」は、そのマトリクスセンサの平面内、従って標本
 平面内で数値的に決定された個所に、個々の画素の信号が割り当てられることを意味して
 いる。とはいえ、既知方法とは対照的に、この場合の変位は、その分散が正しく勘案され
 る要領にて実行されねばならない。

20

【0 1 1 9】

即ち、本質的な改変点は、変位ベクトル $d_{i,j}$ に関し、その変位路が二部分で構成さ
 れることが仮定される点にある。

$$d_{i,j} = 2 s_{i,j} + \xi_i$$

$$\xi = \xi(\lambda) \quad (9)$$

【0 1 2 0】

ここで、 $\xi(\lambda)$ は波長の関数である。例えば、この関数に関し採用しうる選択肢には
 次のものがある。

$$\xi_i = \kappa(\lambda_i / \lambda_r - 1) \quad (10)$$

【0 1 2 1】

比例定数 κ は長さの単位を有しており、その分散素子の分散強度により、とりわけ利用
 されている格子 4 3 の格子定数により決定される。

【0 1 2 2】

従って、変位路は下記の通り表される。

【数 1 0】

$$d_{i,j} = \begin{pmatrix} d_{i,j}^x \\ d_{i,j}^y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2 s_{i,j}^x + \xi_i \\ d_{i,j}^y \end{pmatrix}$$

(11)

40

【0 1 2 3】

従って、本例では分散が x 方向のみで影響を及ぼす。そのため、図 1 2 では、プロット
 されている画素（1 2, 5）に係る変位ベクトルが分散によっては変化しなそうな一方で
 、プロットされている画素（8, 4）に係る変位ベクトルが分散成分を有することとなる
 う。

50

【 0 1 2 4 】

その上で、実効 P S F の重心に関し下記のもの得られる。

【数 1 1】

$$s_{i,j} = \begin{pmatrix} \frac{d_{i,j}^x - \xi_i}{2} \\ \frac{s_{i,j}^y}{2} \end{pmatrix}$$

(12)

10

【 0 1 2 5 】

このように、従来の画像走査（エアリ走査）評価に比肩する要領での、分散に対し垂直な方向沿いでの変化はないが、分散方向沿いの伸長／圧縮は存在する。これは、その波長が参照波長から遠く離れているほど多く補正され、ひいては実効 P S F の重心が参照画素方向に沿いより近くにずれる結果となる要領にて、実施される。それにより、それら重心がもはや画素・参照画素間変位長の半分のところではなくなり、寧ろ参照画素の近くへと幾ばくかずれる。これにより、従って、最終的に全画素の寄与分が計算により結合されるようにするためにそれら画素の諸成分をどのようにずらさねばならないかにつき、ルールが提供される。オプション的には、ここで更なる校正を用い、正しい $s_{i,j}$ を決定するようにしてもよい。とはいえ、特に多光子顕微法を用い調査されることが多い厚手標本の場合に生じうる通り、変位ベクトルが標本誘起性収差の影響を受けることがある（C a s t e l l o e t a l . , 2 0 1 9 ; 図 1 c）。センサの個別画素の画像データのみをもとにしてそれら押し戻しベクトルを決定する策には、次欄で与えられるものがある。

20

【 0 1 2 6 】

〔位相相関による変位ベクトルの決定〕

考察下事案向けのもうひとつのデータ評価策に、色素に係る帯域をなしておりここで評価される諸波長がその標本の非常に具体的な空間的構造により総じて特徴付けられる、またその構造が対応する色素を用いもちろんマーキングされているのでその構造が全スペクトル成分に亘り究極的にはそっくりである、という仮定に基づくものがある。その上で第 2 の色、例えば図 1 1 中の青色・緑色スペクトル（画素領域 7 1）が、その標本の別の区別可能構造（例、例えば D A P I を用いラベル付けされている細胞核）により区別される。従って、僅かに異なる色で放射するにせよ、それらの画像が皆、最終的には概ねそっくりな構造的内容を有するものとなる、という仮定をなすことができる。この場合の位相相関は、それ自体、別の実施形態とされるにふさわしい〔C a s t e l l o e t a l . , 2 0 1 9 〕。

30

【 0 1 2 7 】

この場合、まず、その走査像の諸画素が $n = (n_x, n_y)$ に従い番号付け及びラベル付けされる。このやり方では、 $N_x \times N_y$ 個の画像点で構成される画像が $g_{i,j}(n)$ 、但し $n_x = 1, \dots, N_x$ 及び $n_y = 1, \dots, N_y$ で表される。更に、いわゆるコレログラム（この場合は参照画素（3, 3）に関するそれ）が下記のとおり定義される。

40

【数 1 2】

$$r_{i,j} = FFT^{-1} \left(\frac{FFT(g_{i,j})FFT(g_{3,3})^*}{|FFT(g_{i,j})FFT(g_{3,3})^*|} \right)$$

(13)

50

【0128】

この場合のFFT及び FFT^{-1} は、それ自体既知な要領に従い、それぞれ（高速）フーリエ変換及びその逆変換を表すものである。そして、このコレログラムの最大値により個々の変位ベクトルがもたらされ、それにより画像コンテンツが必須的に押し戻される。

【数13】

$$(s_{i,j}^x, s_{i,j}^y) = \arg \max_{(n_x, n_y)} (r_{i,j}(n))$$

(14)

10

【0129】

本方法の技術的範囲は、[Castello et al., 2019]にて論じられているものと同様である。結局、この手順は、様々な画素をもたらす画像の位置揃え（レジストレーション）として知られるものに、類似している。この評価の利点は、原理上、分散がわかっている必要さえなく、このアルゴリズムを用い別の関数曲線による分散をも扱えることにある。更に、この方法は、そのセンサ上における画像の収差にあまり依存しない。とはいえ、情報処理支出は高めとなる。

【0130】

原理上、画像走査をもとにした更なる既知方法も本発明向けに用いることができる。[Castello et al., 2019]をもう一度参照されたい。データ評価との関連でマルチビューデコンボリューションとして知られているものもそこで論じられており、それを本発明にて用いることもできる。更に、Zeiss（登録商標）Airyscan（登録商標）についての刊行文献を助力とすることができる。

20

【0131】

即ち、これによって、共焦点スペクトルセンサのデータをPSFの空間的オーバーサンプリングで以て評価できるもう一つのやり方、ひいてはより高いSNRで以てより良好な分解能の画像を同時決定するのと同時にそのスペクトルを確認できる別のやり方が、指し示されている。

【0132】

上述の通り、スペクトルそれ自体は、常に、カラム内の諸画素、即ち分散方向に対し垂直な方向（前掲の図3では方向j）の諸画素を総和することによって、得ることができる。

30

【0133】

[多色励起への適用]

本発明に係る方法は、複数の色素の同時検出に対しても、非常に有利に適用することができる。この目的を果たすには、積分限界、特に分散方向41におけるそれを、柔軟に定義できることが有利である。この場合の積分限界は、その枠内で点拡がり関数の個別的スペクトルの寄与分が特定色素に関し総和されねばならない限界、という意味である。これにより、例えば、その点拡がり関数の拡がりを色素毎に個別校正することが可能となる。これについて、図9との関連でより詳細に説明する。

40

【0134】

図9a)には、二種類の色素への露出時におけるSPADカメラ50のシミュレート記録1000枚の総和が示されており、それぞれ個別画像に係る光子束が10MHz、露出持続時間が1μsとされている。図9b)には、その画像データをもとに決定されたスペクトル全体が示されている。図9c)には、その積分帯域幅が制約されているときに得られる部分スペクトルが示されている。そして、図9d)には、図9c)に示されている部分領域にて決定された点拡がり関数が示されている。

【0135】

[自動化オブション]

本システムの校正は、選択されている対物系及び調査される色素にとりわけ依存するの

50

で、常に、厳密にはある固定されたプリセット実験にしか適用されない。そのため、その実験の修正後に、図 8 及び図 9 に従いその平均化画像データを評価しその校正データを例えば評価用電子回路 60 のメモリ書き込むことによって、その校正につき本システムに再学習させるのが有利である。

【0136】

最近（数回）の LSM 画像走査をもとにした校正データの継続的更新は、より有利なことである。これにより、その実験環境の変化に対し独立に本システムを反応させることが可能となる。

【0137】

更に有利な態様は、積分限界を定義することによりスペクトルチャネルを自動設定するオプションにある。これは、1 nm 又は更に精細な増分でのスペクトル空間の高分解能サンプリングにより、行うことが可能となる。例えば、最大値及び最小値を探し出すアルゴリズムにて、図 9 b) 記載の積分信号を用い積分限界を、或いはそれと等価なスペクトルチャネルを、定義するための提唱事項を決定することができる。即ち、本システムによれば、未知標本からの放射を効率的に検出して有利な色素分離をプリセットすることもできる。オプション的には、マトリクスセンサ 50 の y 方向沿いカラムであり、その上に励起光 14 の波長を有する光が入射するものが、評価されないことや不活化されることもある。

【符号の説明】

【0138】

- 10 励起ビーム路、
- 12 光源、
- (12, 3) 参照画素、
- 14 励起光、
- 16 偏向鏡、
- 18 メイン色スプリッタ、
- 22 走査装置、
- 23 チューブレズ、
- 24 顕微鏡対物系、
- 26 標本平面、
- 27 照明スポット、
- 28 放射光、
- 29 0 次回折、
- 30 検出ビーム路、
- 32 検出ユニット、
- (3, 3) 参照画素、
- 34 制御兼評価ユニットとりわけ PC、
- 40 分散装置、
- 41 分散方向、
- 42 放射光 28 のスペクトル成分、
- 43 格子、
- 44 放射光 28 のスペクトル成分、
- 46 放射光 28 のスペクトル成分、
- 47 放射光 28 のスペクトル成分、
- 48 撮像用光学ユニット、
- 50 二次元マトリクスセンサ、
- 51 マトリクスセンサ 50 の画素、
- 53 画素のサイズ、
- 54 マトリクスセンサ、
- 56 像面（＝マトリクスセンサ 50 の平面）、

10

20

30

40

50

57	関数 $s_{5,4}$ の重心、	
60	評価用電子回路、	
71	色素の画素領域、	
72	色素の画素領域、	
80	円形対称な点拡がり関数、	
100	レーザ走査顕微鏡、	
200	検出装置、	
a	マトリクスセンサ50のグリッド定数、	
$d_{i,j}$	画素再割当変位ベクトル、	
$d_{i,j}^x$	変位ベクトル $d_{i,j}$ の x 成分、	10
$d_{i,j}^y$	変位ベクトル $d_{i,j}$ の y 成分、	
$g_{i,j}(n)$	位置 n にある画像、	
$g_{i,j}, g_{i,j}(x)$	画素 i, j により計測された強度値、	
$g_{i,j}$	像面56内画素 i, j に至る位置ベクトル、	
$h^{em}(x)$	放射のPSF、	
$h^{ex}(x)$	励起のPSF、	
$h_{i,j}(x)$	画素 i, j に係る実効PSF、	
i	マトリクスセンサ50のカラム、	
(i, j)	画素、	
j	マトリクスセンサ50のロー、	20
m	マトリクスセンサ50のローの個数、	
m_i	スペクトル分布 s_{p_i} における最小値、	
m_{x1}	スペクトル分布 s_{p_i} における最大値、	
m_{x2}	スペクトル分布 s_{p_i} における最大値、	
n	マトリクスセンサ50のカラムの個数、	
n	画像点に至る位置ベクトル、	
n_x	画像点に至る位置ベクトル n の x 成分、	
n_y	画像点に至る位置ベクトル n の y 成分、	
$r_{i,j}$	画素 i, j に係るコレログラム、	
s1	色素の放射スペクトル、	30
s2	色素の放射スペクトル、	
$s_{i,j}$	実効PSFたる $h_{i,j}(x)$ の最大値に至る位置ベクトル、	
$s_p(\lambda)$	スペクトル分布(連続)、	
s_{p_i}	スペクトル分布(離散)、	
x	標本平面内へと逆投射される像面56内個所、	
x	マトリクスセンサ50の座標方向(=分散方向)、	
y	マトリクスセンサ50の座標方向(分散方向に対し垂直)、	
$Airy(x, \lambda)$	エアリ関数、	
I^{cal}_i	空間強度分布、	
$I_{i,j}$	画素 i, j により計測された強度値、	40
N_x	x 方向における画像点の個数、	
N_y	y 方向における画像点の個数、	
FFT	高速フーリエ変換、	
FFT^{-1}	逆高速フーリエ変換、	
$P_{i-n,j}$	色素の点拡がり関数のスペクトル成分であり分散方向41に沿わずれて	
いる成分の、	マトリクスセンサ50上での空間的重なり合いに関する重なり合いデータ、	
PSF	点拡がり関数、	
S	標本、	
SNR	信号対雑音比、	
$\xi(\lambda), \xi_i(\lambda)$	変位ベクトル $d_{i,j}$ の波長依存成分、	50

$\delta \lambda$ 色素のスペクトル帯域幅、
 λ 波長、
 λ_i マトリクスセンサ50のカラム*i*における波長、
 λ_r 参照画素の所在個所又はカラムにおける波長、
 k 変位ベクトル d_i, j に係る分散をモデル化するための定数。

【図面】

【図1】

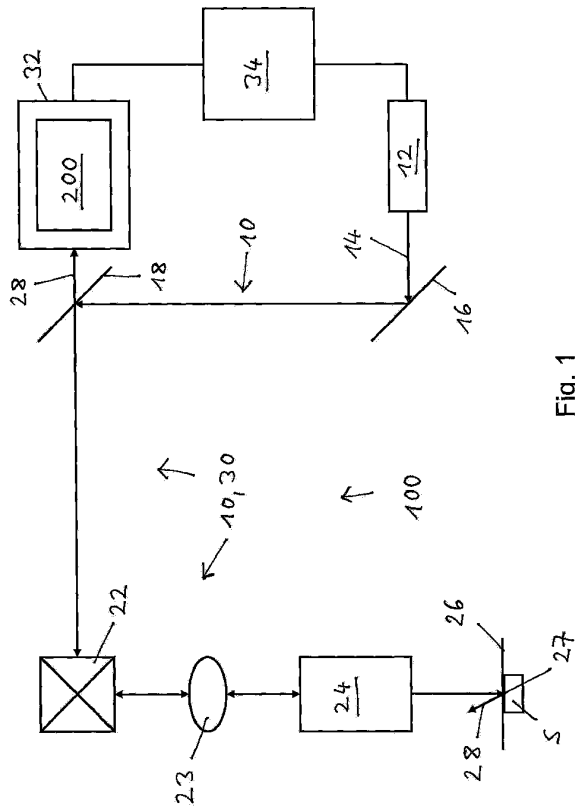
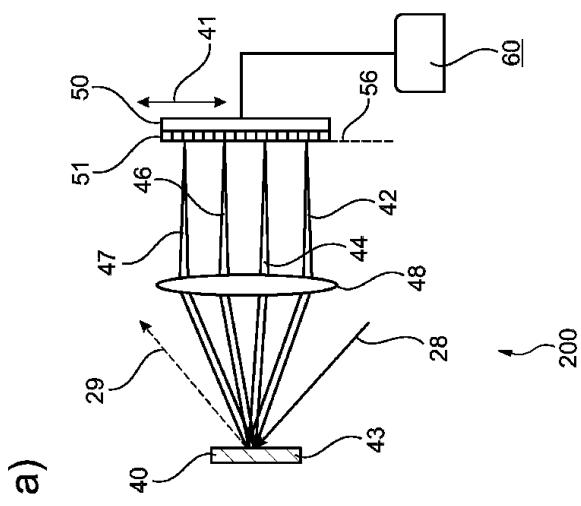


Fig. 1

【図2a）】



a)

10

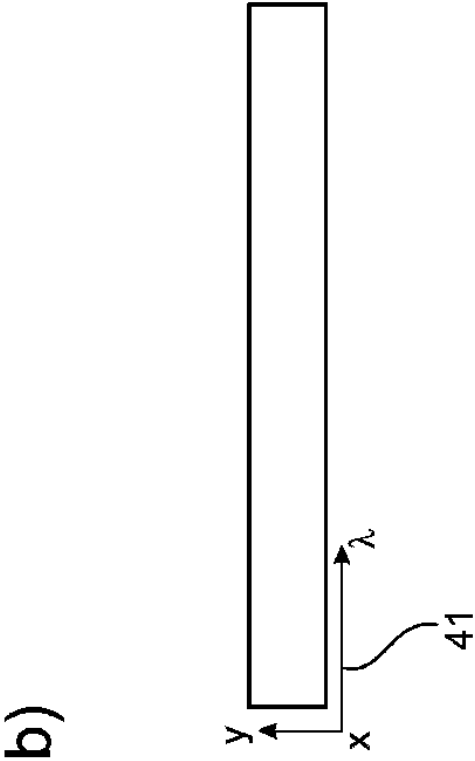
20

30

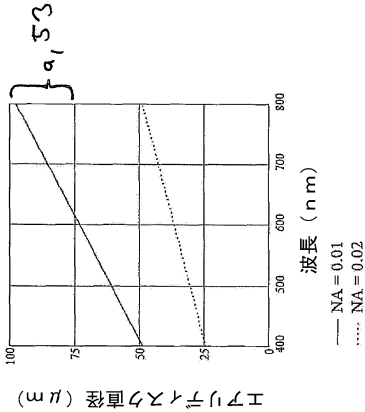
40

50

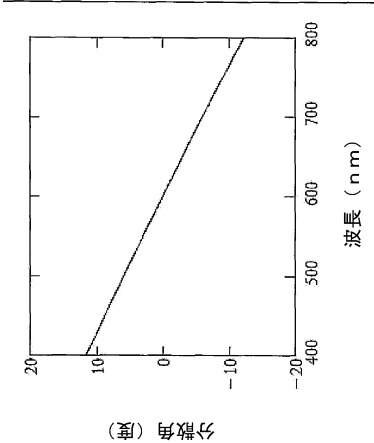
【図 2 b）】



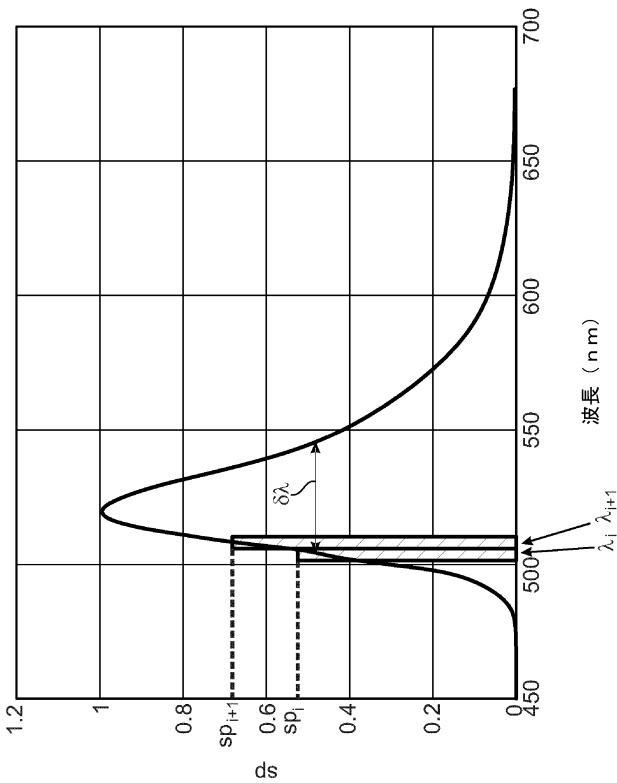
【図 3】



【図 4】



【図 5】



10

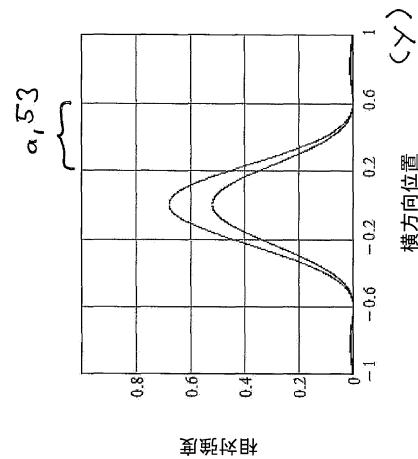
20

30

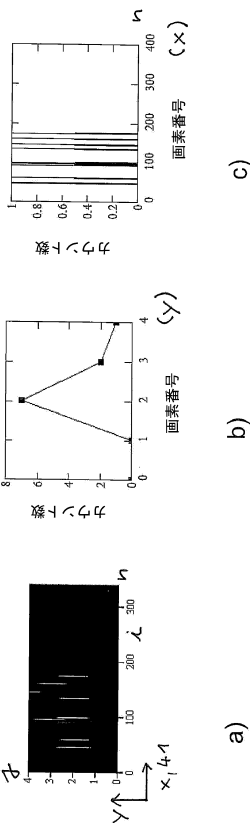
40

50

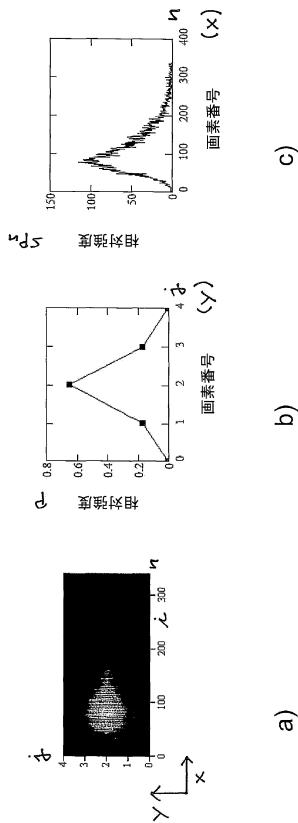
【図 6】



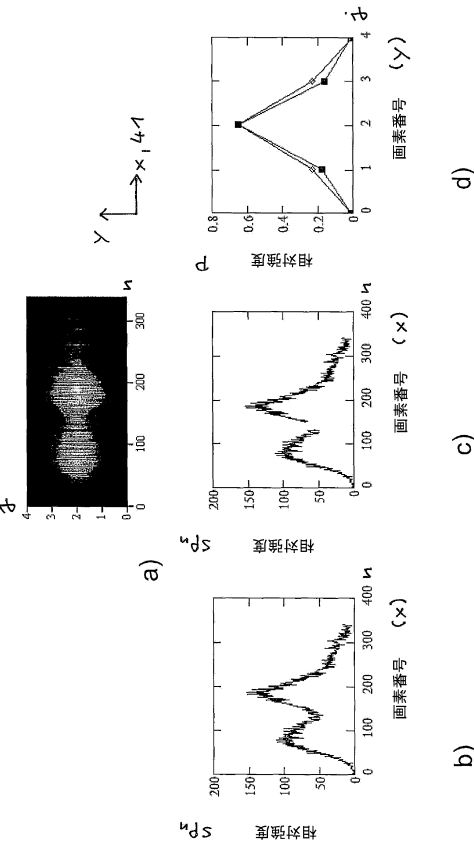
【図 7】



【図 8】



【図 9】



10

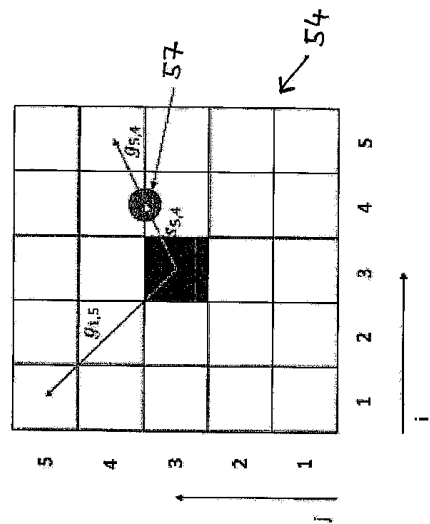
20

30

40

50

【図 10】



【図 11】

Fig. 10

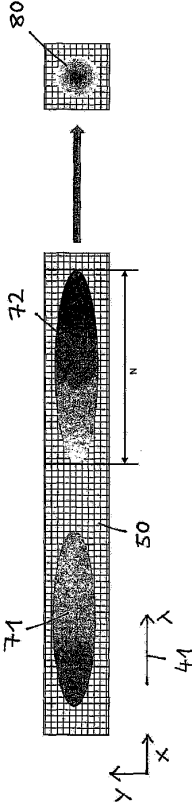


Fig. 11

【図 12】

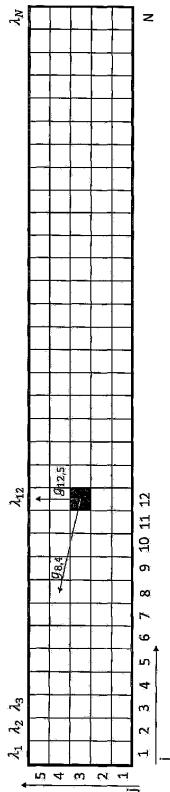


Fig. 12

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2021/071269
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N21/6458 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, COMPENDEX, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Marco Castello ET AL. "Image Scanning Microscopy with Single-Photon Detector Array" <i>bioRxiv</i> , 02 June 2018 (2018-06-02), Retrieved from the Internet: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/335596v1.full.pdf DOI: 10.1101/335596 XP055717311 cited in the application	1-29
A	Huff Joseph ET AL. "The Airyscan Detector from ZEISS Confocal Imaging with Improved Signal-to-Noise Ratio and Superresolution" <i>Carl Zeiss Microscopy GmbH - Technology Note</i> , 01 July 2015 (2015-07-01), Retrieved from the Internet: http://www.gattaquant.com/files/en_wp_airyscan-detector.pdf [retrieved on 2020-04-15] XP055685579 cited in the application	1-29
A	US 2020003551 A1 (SIRAT GABRIEL Y [FR]) 02 January 2020 (2020-01-02) paragraphs [0193] - [0467]; figures	1,16,27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 October 2021		Date of mailing of the international search report 27 October 2021
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Politsch, Erich Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2021/071269

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020003551	A1	02 January 2020	EP	2628041	A2	21 August 2013
				EP	3418788	A1	26 December 2018
				FR	2966258	A1	20 April 2012
				JP	6062858	B2	18 January 2017
				JP	2013545127	A	19 December 2013
				US	2013176574	A1	11 July 2013
				US	2016178354	A1	23 June 2016
				US	2018073862	A1	15 March 2018
				US	2020003551	A1	02 January 2020
				US	2021048289	A1	18 February 2021
				WO	2012049381	A2	19 April 2012
.....							

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2021/071269

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01N21/6458

ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, COMPENDEX, INSPEC, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Marco Castello ET AL: "Image Scanning Microscopy with Single-Photon Detector Array", bioRxiv, 2. Juni 2018 (2018-06-02), XP055717311, DOI: 10.1101/335596 Gefunden im Internet: URL: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/335596v1.full.pdf in der Anmeldung erwähnt ----- -/--	1-29

☒ Weitere Veröffentlichungen sind die Fortsetzung von Feld C zu entnehmen
 ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Oktober 2021

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/10/2021

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Politsch, Erich

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2021/071269

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Huff Joseph ET AL: "The Airyscan Detector from ZEISS Confocal Imaging with Improved Signal-to-Noise Ratio and Superresolution", Carl Zeiss Microscopy GmbH - Technology Note, 1. Juli 2015 (2015-07-01), XP055685579, Gefunden im Internet: URL: http://www.gattaquant.com/files/en_wp_airyscan-detector.pdf [gefunden am 2020-04-15] in der Anmeldung erwähnt	1-29
A	US 2020/003551 A1 (SIRAT GABRIEL Y [FR]) 2. Januar 2020 (2020-01-02) Absätze [0193] - [0467]; Abbildungen	1,16,27

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2021/071269

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2020003551 A1	02-01-2020	EP 2628041 A2	21-08-2013
		EP 3418788 A1	26-12-2018
		FR 2966258 A1	20-04-2012
		JP 6062858 B2	18-01-2017
		JP 2013545127 A	19-12-2013
		US 2013176574 A1	11-07-2013
		US 2016178354 A1	23-06-2016
		US 2018073862 A1	15-03-2018
		US 2020003551 A1	02-01-2020
		US 2021048289 A1	18-02-2021
		WO 2012049381 A2	19-04-2012

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (April 2005)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ドイツ連邦共和国 イェナ カール・ツァイス・プロメナーデ 1 0 カール ツァイス マイクロス
コピー ゲーエムベーハー内

(72)発明者 シャハト ピーター

ドイツ連邦共和国 エアフルト アム ドルフトール 9

F ターム (参考) 2G043 AA03 EA01 FA01 FA02 FA03 FA06 GA03 GA04 GA06 GA08
GB01 GB21 HA01 HA02 HA05 HA06 HA09 JA02 JA03 JA04 JA05
KA08 KA09 LA01 LA03 MA01 MA04 NA01 NA02 NA04
2H052 AA08 AA09 AC15 AC34 AF14 AF25