

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-82708

(P2019-82708A)

(43) 公開日 令和1年5月30日 (2019.5.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 2 B 21/06 (2006.01)	G O 2 B 21/06	2 G O 4 3
G O 2 B 21/36 (2006.01)	G O 2 B 21/36	2 H O 5 2
G O 1 N 21/64 (2006.01)	G O 1 N 21/64	F
	G O 1 N 21/64	E

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2019-3287 (P2019-3287)	(71) 出願人	503115205
(22) 出願日	平成31年1月11日 (2019.1.11)		ザ ボード オブ トラストィーズ オブ
(62) 分割の表示	特願2013-527133 (P2013-527133) の分割		ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティ
原出願日	平成23年9月29日 (2011.9.29)		アメリカ合衆国 94305-2038
			カリフォルニア州 スタンフォード メイン クワッド ビルディング 170 サード フロア ビー. オー. ボックス 20386 オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル
		(74) 代理人	100079049
			弁理士 中島 淳
		(74) 代理人	100084995
			弁理士 加藤 和詳
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 高度なイメージング特性を有する顕微鏡イメージング装置、落射蛍光顕微鏡装置、及び落射蛍光顕微鏡装置を使用する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 顕微鏡イメージング解決法のための、システム、方法、及び装置を提供する。

【解決手段】 落射蛍光顕微鏡 100 は、光センサのアレイ 118 を含むイメージ捕捉回路を含む。光学配置 124 が、約 1 mW 未満の励起光 104 を、少なくとも 0.5 mm² である視野 126 内の対象物体 114 に向けてるように、そして、励起光 104 によって引き起こされた落射蛍光エミッション 116 を、光センサのアレイ 118 に向けてるように構成され、光学配置 124 と、光センサのアレイ 118 とは、視野 126 のイメージについて、少なくとも 2.5 μm の解像度を提供するために、それぞれ、対象物体に十分に近い。

【選択図】 図 1

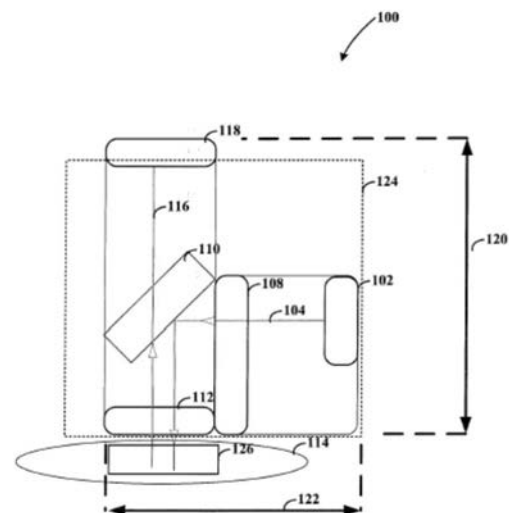


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光センサのアレイを含むイメージ捕捉手段と、
約 1 mW 未満の励起光を、少なくとも 0.5 mm^2 である視野内の対象物体に向けるように、そして、前記励起光によって引き起こされた落射蛍光エミッションを、光センサの前記アレイに向けるように構成された、光学機器とを備え、前記光学機器と、光センサのアレイとは、前記視野のイメージについて、少なくとも $2.5\text{ }\mu\text{m}$ の解像度を提供するために、それぞれ、前記対象物体に十分に近い、
落射蛍光顕微鏡。

【請求項 2】

前記光学機器は、対物レンズと、発光ダイオードと、CMOS イメージセンサアレイとを含み、それぞれが、サイズが 1 立方インチ (約 16.39 cm^3) 未満である統合されたハウジング内に含まれる、請求項 1 に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項 3】

前記光学機器は、対物レンズと、発光ダイオードと、CMOS イメージセンサアレイとを含み、それぞれが、統合されたハウジング内に含まれ、ここで、前記光学機器と、光センサのアレイとは、重量が 2 グラム 未満である、請求項 1 に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項 4】

前記イメージ捕捉手段における、かつ、前記対象物体の、光学倍率は、5 以下である、請求項 1 に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項 5】

前記光学機器は、前記励起光を提供する光源と、光センサの前記アレイと、対物レンズとの間の、セルフアライメントを提供するように構成される、請求項 1 に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項 6】

前記光学機器は、リアルタイムイメージングの間、光センサの前記アレイと、対物レンズとの間の距離を調節することによって、イメージのフォーカシングを提供するように構成される、請求項 1 に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの光学フィルタ要素と、前記励起光を生成する光源とを更に含み、ここで、前記少なくとも 1 つの光学フィルタ要素と、前記光源と、光センサの前記アレイとは、前記顕微鏡から取り外される、及び前記顕微鏡に再取り付けされるように構成される、請求項 1 に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項 8】

前記光学機器と、光センサの前記アレイとは、前記視野のイメージについて、少なくとも $2.5\text{ }\mu\text{m}$ の解像度を、少なくとも 36 Hz のレートにおいて提供するために、それぞれ、前記対象物体に十分に近い、請求項 1 に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項 9】

6 mW 未満を提供するエネルギー源から励起光を生成するように構成された、光源と、センサアレイを含むイメージング回路手段と、
少なくとも 0.5 mm^2 である視野について、少なくとも $2.5\text{ }\mu\text{m}$ のイメージ解像度を提供するために、前記光源、前記イメージセンサアレイ、及び対象物体に十分に接近して動作するように構成された、対物レンズと
を備える、落射蛍光顕微鏡。

【請求項 10】

サイズが 1 立方インチ (約 16.39 cm^3) 未満である落射蛍光顕微鏡であって、前記顕微鏡は、
光を、イメージング対象を含む視野に向けるように構成された、光励起配置と、
向けられた光と、前記イメージング対象との間の相互作用によって引き起こされた蛍光から、イメージデータを生成するように構成された、光センサアレイを含むイメージング

10

20

30

40

50

回路と、

前記蛍光を、前記光センサアレイに、 0.5 mm^2 にわたって、かつ、少なくとも $2.5\text{ }\mu\text{m}$ の解像度で描かれるための前記イメージデータのため、十分な強度及びフォーカスを伴って向けるように構成された、光学配置と

を備える、顕微鏡。

【請求項 11】

サイズが 1 立方インチ ($\text{約 } 16.39\text{ cm}^3$) 未満であるポータブルハウジングを備える、イメージング装置であって、前記ポータブルハウジングは、

励起光を提供する、励起源と、

第 1 の端と、第 2 の端とを有する、光学経路を提供する、細長い機器と

を備え、前記細長い機器は、

前記光学経路の前記第 1 の端における対物レンズと、

前記励起光を、前記対物レンズに向けるように構成及び配置された、1 つ以上の励起要素と、

前記対物レンズから受け取られた落射蛍光エミッション光から、前記光学経路の前記第 2 の端における焦点面を提供するように構成及び配置された、1 つ以上のエミッション要素と

前記焦点面において配置された、かつ、前記落射蛍光エミッション光から、対象物体のイメージを捕捉するように構成及び配置された、光センサのアレイを含む、イメージング回路と

を含み、前記イメージは、複数の個々の毛細血管を捕捉するための十分な視野と、前記個々の毛細血管を相互に区別するための十分な解像度とを有する、イメージング装置。

【請求項 12】

前記対物レンズは、ほぼ平行にされた落射蛍光エミッション光を、前記光学経路内に向け、前記十分な解像度は、毛細血管を通して流れている個々の赤血球を区別する、又は解像することが可能である、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 13】

光センサの前記アレイは、CMOS センサを含む、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 14】

前記細長い機器は、前記対物レンズと、光センサの前記アレイとの間の、前記光学経路内に配置された、アクロマティックレンズを更に含み、前記アクロマティックレンズは、前記対物レンズからの、平行にされた落射蛍光を受け取り、前記平行にされた落射蛍光を、光センサの前記アレイに対応する焦点面上にフォーカスさせるように構成される、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 15】

前記励起源は、発光ダイオードである、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 16】

前記細長い機器は、前記光学経路内に配置された、かつ、前記励起源からの前記励起光を、前記対物レンズに反射し、前記対物レンズからの前記落射蛍光エミッション光を通過させるように構成された、ダイクロイックミラーを更に含む、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 17】

前記イメージング装置は、前記対象物体の連続したイメージを、少なくとも 50 Hz のレートで捕捉するように構成及び配置され、前記イメージは、複数の個々の毛細血管を捕捉するための十分な視野と、前記個々の毛細血管を相互に区別する、かつ、毛細血管を通して流れている個々の赤血球を区別するための、十分な解像度とを有する、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 18】

前記励起源は、前記励起源を別の励起源と交換することを可能にする、締結要素を使用

10

20

30

40

50

して、前記細長い機器に物理的に接続される、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 19】

前記細長い機器は、前記対物レンズと、光センサの前記アレイとの間の、前記光学経路内に配置された、エミッションフィルタを更に含み、前記エミッションフィルタは、前記落射蛍光エミッション光の波長を含む、帯域通過を有するように構成される、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 20】

前記細長い機器は、前記イメージのフォーカシングを可能にするために、前記光学経路内の光学要素を調節するように構成される、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 21】

10

前記イメージング装置は、移動している生体の、インビボのイメージを捕捉するように構成される、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 22】

捕捉されたイメージを、デジタルデータとして送信する、送信器回路を更に含み、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 23】

前記ハウジングに結合された、別の光学システムへの、インタフェースを更に含み、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 24】

20

前記装置は、外部光学データ記録 / 設定システムとインタフェースするための、同期化回路を含み、ここで、前記同期化回路は、前記イメージング装置と、前記外部光学データ記録 / 設定システムとの間で通信されるデータのための、同期化情報を提供する、フレームアクティブ信号を通信するように構成及び配置される、請求項 11 に記載のイメージング装置。

【請求項 25】

慢性実験の間の、共通イメージング位置の反復イメージングのための、正確な顕微鏡アライメントを可能にするために、支持構造物のベースプレートに、前記落射蛍光顕微鏡を取り付けるステップ、及び再度取り付けるステップを含む、請求項 1 に記載の落射蛍光顕微鏡装置を使用する方法。

【請求項 26】

30

慢性実験の間の、共通イメージング位置の反復イメージングのための、正確な顕微鏡アライメントを可能にするために、支持構造物のベースプレートに、前記落射蛍光顕微鏡を取り付けるステップ、及び再度取り付けるステップを含む、請求項 10 に記載のイメージング装置を使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許文献は、「Microscopy Imaging Device with Advanced Imaging Properties (高度なイメージング特性を有する顕微鏡イメージング装置)」と題され、2010年8月27日に出願された、米国仮特許出願第61/377,591号の、35 U.S.C. § 119に基づく利益を主張するものである。本特許文献、及び、基となる仮出願において提出された付録は、それらの中で引用された参考文献を含めて、参照によって本明細書中に全面的に援用される。

40

【0002】

本開示の態様は、一般に、顕微鏡イメージング装置 (例えば、ミニチュア落射蛍光イメージング装置) に関する。

【背景技術】

【0003】

光学顕微鏡は、多くの場合、かなりのサイズ及び経費の機器として設計される。

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

バイオメディスンにおけるイメージングの役割が増大しており、光学顕微鏡のミニチュア化された統合が、多くの新しい応用分野の進歩を促進する。例えば、大量生産可能な、ごく小さい顕微鏡は、自由に行動している動物内の、特に脳内の、細胞のイメージングのために有用な可能性があり、このイメージングは、細胞動力学が、動物行動にどのように関係しているかを理解するために有用である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

以下に限定されないが、本開示の態様は、大量生産可能な部品から作られた、ミニチュアの ($< 2\text{ g}$)、統合された蛍光顕微鏡に関し、これは、半導体光源と、イメージセンサとを含み、 $\sim 0.5\text{ mm}^2$ の領域全体にわたるイメージングを可能にする。そのような装置は、十分なイメージ品質、及び/又は解像度での、細胞動力学の高速観察のために構成されてもよく、そのような観察は、最大 100 Hz のフレーム取得レートにおいて、活動中のマウスの脳の動力学を見るために有用である。ミニチュア顕微鏡の使用は、様々な異なる用途 (例えば、9つの小脳マイクロゾーンにわたって延在する最大 200 を超えるプルキンエ神経細胞における、 Ca^{2+} スパイクを同時に追跡すること) のために有用であり得る。

10

【0006】

本開示の態様は、落射蛍光顕微鏡に関する。この顕微鏡は、光センサのアレイを有するイメージ捕捉回路を含む。光学配置が、約 1 mW 未満の励起光を、少なくとも 0.5 mm^2 である視野内の対象物体に向けるように、そして、励起光によって引き起こされた落射蛍光エミッションを、光センサのアレイに向けるように構成される。光学配置と、光センサのアレイとは、視野のイメージについて、少なくとも $2.5\text{ }\mu\text{m}$ の解像度を提供するために、それぞれ、対象物体に十分に近い。

20

【0007】

本開示のいくつかの実施形態は、 6 mW 未満を提供するエネルギー源から励起光を生成するように構成された、光源を有する、落射蛍光顕微鏡に関する。この顕微鏡は、センサアレイを含むイメージング回路と、少なくとも 0.5 mm^2 である視野について、少なくとも $2.5\text{ }\mu\text{m}$ のイメージ解像度を提供するために、光源、イメージセンサアレイ、及び対象物体に十分に接近して動作するように構成された、対物レンズとを含む。

30

【0008】

本開示の他の実施形態は、 1 立方インチ ($\sim 16.39\text{ cm}^3$) 未満を占める落射蛍光顕微鏡に関する。そのような顕微鏡は、光を、イメージング対象を含む視野に向けるように構成された、光励起配置を含む。光センサアレイを含むイメージング回路が、向けられた光と、イメージング対象との間の相互作用によって引き起こされた蛍光から、イメージデータを生成するように構成される。光学配置が、蛍光を、光センサアレイに、(イメージデータが、 0.20 mm^2 にわたって、かつ、少なくとも $3\text{ }\mu\text{m}$ の解像度で描かれるための、十分な強度及びフォーカスを伴って) 向けるように構成される。他の実施形態では、イメージデータのための強度及びフォーカスは、少なくとも 0.5 mm^2 である視野について、少なくとも $2.5\text{ }\mu\text{m}$ のイメージ解像度で描くために十分なものである。

40

【0009】

本開示の他の実施形態と一致して、イメージング装置は、サイズが 1 立方インチ ($\sim 16.39\text{ cm}^3$) 未満であるポータブルハウジングを含む。ポータブルハウジングは、励起光を提供するように構成された、励起源を含む、いくつかの要素を含む。構造物も含まれ、この構造物は、第1の端と、第2の端とを有する、光学経路を提供するように構成される。構造物は、光学経路の第1の端における対物レンズと、励起光を、対物レンズに向けるように構成及び配置された、1つ以上の励起要素と、対物レンズから受け取られた落射蛍光エミッション光から、光学経路の第2の端における焦点面を提供するように構成及び配置された、1つ以上のエミッション要素とを含む。イメージング回路は、焦点面にお

50

いて配置された、かつ、落射蛍光エミッション光から、対象物体のイメージを捕捉するように構成及び配置された、光センサのアレイを含み、イメージは、複数の個々の毛細血管を捕捉するための十分な視野と、個々の毛細血管を相互に区別するための十分な解像度とを有する。

【 0 0 1 0 】

本開示のいくつかの態様が、複数の説明される実施及び適用例において例示され、それらのうちのいくつかは、図面内に示され、特許請求の範囲において特徴付けられる。上記の概要は、本開示の、各説明される実施形態、又は全ての実施を説明することを意図するものではない。

【 0 0 1 1 】

本開示の態様は、以下の、本開示の様々な実施形態の詳細な説明を、添付の図面と関連付けて考慮することによって、より完全に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】本開示の実施形態と一致する、落射蛍光顕微鏡装置のブロック図を示す。

【図 2】本発明の実施形態と一致する、外部光源を有する落射蛍光顕微鏡装置のブロック図を示す。

【図 3】本開示の実施形態と一致する、ミニチュア蛍光顕微鏡の断面を示す。

【図 4】本開示の実施形態と一致する、対物レンズと、その中の光線伝搬とを示す。

【図 5】本開示の実施形態と一致する、2つのレンズ要素と、追加のスペクトルフィルタリング構成要素とを使用した、イメージング経路の光線追跡図を示す。

【図 6】本開示の実施形態と一致する、顕微鏡システムのブロック図を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

本開示は、様々な修正及び代替形態に適用できるが、それらのうちの特定のものが、例示の目的のために、図面内に示され、更に詳細に説明される。しかし、その目的は、説明される特定の実施形態に開示を限定することではないということを理解されたい。反対に、その目的は、本開示の精神及び範囲内に入る全ての修正、均等物、及び代替物を網羅することである。

【 0 0 1 4 】

本開示は、様々な異なるタイプの装置、及びプロセスに適用可能であると考えられ、本開示は、落射蛍光イメージング用途に特に好適であることが見い出された。本開示は、そのような用途に必ずしも限定されないが、本開示の様々な態様は、この状況を使用した様々な例の説明を介して評価されてもよい。

【 0 0 1 5 】

本発明のいくつかの例示的实施形態と一致して、落射蛍光イメージングは、顕微鏡装置、及びシステムの使用を介して促進される。例えば、装置、及び/又はシステムの、特定の態様は、対象物体、又は細胞内に、落射蛍光を生成するために使用される、励起光についての、超低レベルの使用を可能にする。いくつかの態様は、広い視野の、高解像度を有するイメージングを可能にする。更に別の態様は、リアルタイム、又はほぼリアルタイムで見られることが可能な、イメージの高速捕捉に関する。これらの促進事項は、限定的なものではないが、これらは、本開示の複数の異なる実施形態に関連する。

【 0 0 1 6 】

特定の態様は、励起光の光源と、イメージングのための対象物体、又は細胞との間の近接に関する。落射蛍光イメージングの場合、励起光と、対象物体との間の相互作用が、イメージング蛍光の生成を引き起こす。励起光は、対象物体に向けられ、そして、蛍光体、蛍光マーカー、又は蛍光プローブによって吸収されるように構成された特定の波長を有する。蛍光体は、次に、異なる（例えば、より長い）波長における光を放出する。吸収される光の量は、対象物体に送達される励起光の量に関連する。このようにして、生成される蛍光の量は、励起光の量と相互に関連する。様々な光送達メカニズムが、光が媒体を介し

10

20

30

40

50

て進行するにつれての、光の減衰を減少させるのに役立つ可能性があるが、光の減衰は、媒体を介した進行の距離が増加するにつれて、増加する。また、空気、及びその他の媒体を使用する場合、媒体の組成、及びその他の分散属性が、光の送達、及び／又は減衰において重要な役割を果たす可能性があり、その一方で、光路長の減少（主として、空気を介した光の進行の減少をもたらす）は、減衰を減少させることにはほとんど関与しない。顕微鏡装置、及びシステムの設計は、励起光の光源の、対象物体に近接した配置を可能にし、これにより、短い光路の使用が促進される。これは、低パワーの光源の使用を促進するために、及び／又は、低レベルの光を使用してイメージを捕捉するために、特に有用である。

【 0 0 1 7 】

様々な蛍光源が、本明細書で説明する 1 つ以上の実施形態と一致して使用されてもよい。特定の蛍光源についての言及は、その他の蛍光源（例えば、G F P、G C a M P、及びその変異体などの、遺伝子的にコードされた蛍光タンパク質）の使用を必ずしも除外するものではない。

【 0 0 1 8 】

本開示の他の態様は、光学部品、フィルタ、及びカメラの、1 つのハウジング内への統合に関し、これは、ファイババンドル、及びその関連する制限の全ての、除去のために特に有用な可能性がある。

【 0 0 1 9 】

更に他の態様は、落射蛍光からイメージデータを捕捉するための、イメージセンサに相対的な、対象物体、又は細胞の近接に関する。イメージ解像度、及びイメージング時間は、イメージセンサによって収集、及び検出されることが可能な、落射蛍光の量に関連する。対象物体と、イメージセンサとの間の光路の特性に起因する、落射蛍光の減衰は、望ましくない可能性がある。顕微鏡装置、及びシステムの、注意深い設計は、イメージセンサの、対象物体に近接した配置を可能にし、これにより、短い光路の使用が促進される。

【 0 0 2 0 】

また、本開示によれば、顕微鏡装置の対物レンズの近接は、対象物体のイメージング中に、対象物体に相対的に設定される。対物レンズと、対象物体との間の大きな距離は、対象物体において受け取られる励起光の量、及び、対物レンズによって受け取られ、収集される、蛍光の量に対して、有害な影響を有する可能性がある。従って、対象物体に相対的な、対物レンズの近接を設定することは、有利な可能性がある。

【 0 0 2 1 】

本開示の実施形態は、比較的広い視野にわたってイメージデータを捕捉し、イメージデータが対象物体の高解像度を提供する、顕微鏡装置、及びシステムに関する。本開示の 1 つのそのような実施形態は、視野をイメージングするために提供される、センサ要素又はピクセルのアレイを有する、イメージ捕捉回路を含む。センサ要素は、視野の様々な部分にわたって、落射蛍光を検出する。センサ要素は、イメージの捕捉、及び生成を促進するための、十分な感度、及び対象物体への近接を有するように構成されてもよい。

【 0 0 2 2 】

本開示の他の実施形態は、イメージ捕捉のための、露光時間の長さに関する。蛍光体が励起されるにつれて、蛍光体は、その、蛍光を発する能力を失い始める可能性があり、これは、フォトリーチングと呼ばれる場合がある。その上、落射蛍光イメージングは、対象物体による励起光の吸収を含む。この吸収された光のうちのいくらかは、熱に変換される。この生成された熱は、露光時間に制限を課す可能性がある（例えば、生物材料／細胞の加熱は、細胞損傷、及び、更には、細胞死をもたらす可能性がある）。露光時間は、しかし、励起光の強度が減少させられた場合、増加させられてもよい。励起光の強度は、例えば、対象物体と、イメージセンサとの間の光結合が向上した場合、減少させられることが可能である。光毒性作用は、局部加熱より有害な可能性がある。本開示の態様は、イメージ捕捉、及びデータの関連する処理に悪影響を及ぼす、これらの作用を、減らす、又は除去する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

本開示の特定の実施形態は、特定の目標（例えば、イメージ捕捉レート、解像度、視野サイズ、又はイメージング深度）のために、イメージ品質、イメージを向上させるための、露光時間の調節と組み合わせた励起光強度の調節に関する。

【 0 0 2 4 】

本開示の他の態様によれば、比較的低い光学ズームが、小さなサイズの対象物体のための視野の高解像度イメージングに関連して使用される。特定のレベルのイメージングのために必要とされる、光学ズームに対する制約は、本明細書で説明する様々な態様と一致する顕微鏡装置、及びシステムの、注意深い設計、及び適用を介して、減らされることが可能である。

10

【 0 0 2 5 】

本開示の実施形態は、本明細書で説明する態様と一致する顕微鏡装置、及び／又はシステムを使用した、対象物体のリアルタイムイメージングに関する。これらの実施形態のうちのいくつかでは、イメージングレートは、一定の解像度を保ちながら、視野を減少させることによって、増加させられ、イメージ捕捉時間は、露光時間、及び／又は達成可能なフレームレートを減少させることによって、減少させられ、なぜならば、そのようなリアルタイムイメージングは、全視野のサイズ、及び所望されるイメージ解像度と相互に関連するからである。必要に応じてこれと共に実施される別のファクターは、使用されるイメージセンサのタイプ、及び応答性を含む。イメージをリアルタイムで見ることが望ましい場合、更に他のファクターは、表示のためにイメージデータを伝送、及び処理する能力に関する。

20

【 0 0 2 6 】

本開示の更に他の実施形態は、インビボの、又はインビトロの、落射蛍光イメージングの促進に関する。例えば、生きている対象の、インビボのイメージングは、外部刺激、及びその他のファクターを、捕捉されたイメージと相互に関連付けるために、特に有用な可能性がある。この相互関連は、例えば、捕捉されたイメージの特性を、外部刺激と関連付けることによって、診断／調査ツールとして使用されてもよい。高フレームレートにおけるリアルタイムイメージングは、そのような相互関連を、時間の関数として、更に提供することが可能である。

【 0 0 2 7 】

30

本開示の一実施形態は、顕微鏡装置の様々な構成要素の取り外し、及び再取り付けを容易にする、モジュラー設計を有する、顕微鏡装置、及び／又はシステムに関する。取り外し、及び再取り付けは、モジュラー構成要素を、新たな、及び／又は異なるモジュラー構成要素と交換するために使用されてもよい。例えば、光源は、同じ、又は異なる光学及び電気特性を有する、新たな光源と交換されてもよい。光センサのアレイ、及び／又は光方向付け要素（例えば、鏡、フィルタ、及びレンズ）も、除去、及び交換されてもよい。所望される場合、光センサも、除去、及び交換されてもよい。

【 0 0 2 8 】

本開示と一致するいくつかのその他の実施形態では、イメージング装置のうちの1つ以上は、外部光学データ処理（記録、及び／又は設定）システムとインタフェースするための、同期化回路を含む。同期化回路は、フレーム基準／アクティブ信号を通信するように構成及び配置された、ロジック回路（例えば、プログラマブル、又はセミプログラマブルチップ（マイクロコントローラ、又はASIC））を含む。一般的な適用例では、フレームアクティブ信号が、（例えば、IEEE通信標準において規定されているような）同期化情報を、イメージング装置と、外部システムとの間で通信されるデータのために、それらのデータと共に提供する。そのような光学データ記録／設定システムは、ソフトウェアをインストールするため、実験及び手順のためのセットアップパラメータを設定するため、そのような実験及び手順の間に視覚フィードバックを提供するため、並びに、操作及び更なる調査のために光学データを記録するために、使用されてもよい。

40

【 0 0 2 9 】

50

更に別の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されたイメージ装置を使用する方法に関する。装置のうちのいくつかは、支持/安定性を提供し、更に、顕微鏡（再）アライメントを可能にする、基礎構造物として働く、ベースプレートを含む。これらの方法は、顕微鏡アライメントが正確であることを可能にするために、落射蛍光顕微鏡をベースプレートに取り付けるステップ、及び再度取り付けるステップを含む。そのような正確さは、例えば、慢性実験の間の、共通イメージング位置の反復イメージングのために十分なものでなければならない。

【0030】

ここで図面を参照すると、図1は、本開示の一実施形態と一致する、落射蛍光顕微鏡装置のブロック図を示す。落射蛍光顕微鏡装置100は、寸法120及び122内に、複数の構成要素を含む。寸法120及び122に対して垂直に延在する、更なる寸法は、図示されていない。必ずしも限定されないが、これらの寸法のそれぞれは、1インチ（約2.54cm）未満であってもよい。その他の実施形態と一致して、寸法は、わずかにより大きい（例えば、数センチメートル程度）。

10

【0031】

落射顕微鏡装置100は、光源102を含む。この光源102は、励起光104を生成する。特定の実施では、光源102は、発光ダイオード（LED）、又は有機発光ダイオード（OLED）である。励起光104は、光学配置124によって、対象物体114に、そのイメージングのために向けられる。光学配置は、1つ以上の対物レンズ112と、（ダイクロイック）ミラー110と、励起フィルタ108と、エミッションフィルタ（図示せず）とを含んでもよい。対象物体114からの落射蛍光116は、対物レンズから/によって、イメージ捕捉回路118に向けられる。落射蛍光顕微鏡装置100は、視野126からの光を方向付けて、視野126についてのイメージデータを捕捉するように構成される。

20

【0032】

本開示の様々な実施形態では、顕微鏡装置100は、イメージフォーカシング光学要素（例えば、アクロマティックレンズ）、及びエミッションフィルタのうちの、1つ以上を更に含んでもよい。これら、及びその他の要素は、顕微鏡装置100の光学特性を制御するのに役立つ可能性がある。

【0033】

一実施形態と一致して、示された要素は、それぞれ、例えば、寸法120、122を有する1つのハウジング内の、比較的小さな領域内に統合される。様々な構成要素のそのような統合は、光源102から対象物体114までの、そして、イメージ捕捉回路118に戻るまでの、光学経路の長さを減少させるために特に有用な可能性がある。この光学経路の減少は、顕微鏡装置100の複数の異なる特性及び機能を促進する、設定パラメータの一部であってもよい。例えば、いくつかの実施形態では、顕微鏡は、面積が最大 1 mm^2 のイメージング視野について、 $1\text{ }\mu\text{ m}$ までの解像度を有するイメージを提供することが可能である。

30

【0034】

特定の例示的实施形態は、光センサのアレイ118を使用して構成される。光学配置124は、約 1 mW 未満の励起光104（様々な実施形態は、より高い励起パワー（例えば、 100 mW ）を提供する）を、少なくとも 0.5 mm^2 である視野126内の対象物体114に向けるように、かつ、励起光104によって引き起こされた落射蛍光エミッション116を、光センサのアレイ118に向けるように構成される。様々な実施形態では、視野126は、少なくとも 1 mm^2 であってもよい。光学配置124、及び光センサのアレイ118は、それぞれ、視野126のイメージについて、少なくとも $2.5\text{ }\mu\text{ m}$ の解像度を提供するために、対象物体114に十分に接近して構成される。他の実施形態では、光学配置124、及び光センサのアレイ118は、少なくとも $1\text{ }\mu\text{ m}$ の解像度を提供するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、試料における励起光パワーは可変であり、特定の構成、及びイメージング制約に応じて、 $100\text{ }\mu\text{ W} \sim 100\text{ mW}$ の範囲内で

40

50

あってもよい。

【0035】

本開示の一実施形態と一致して、光源102は、最大37ルーメン又は6mWの光を送達してもよい。しかし、光源102がそのような強度の光を提供することは、必ずしも必要条件ではない。その上、対象物体によって受け取られる光の量は、光源102によって提供される光の量より（減衰率に応じて）少ない。例えば、一実施形態の減衰は、光源における6mWが、対象物体において送達される1mWの励起パワーに対応することをもたらす。同様に、試料における100mWの励起パワーを送達するために、光源は、最大600mWを提供するように構成されてもよい。

【0036】

図1は、様々な構成要素を、寸法120、122内にあるものとして示すが、その他の実施形態が可能である。例えば、図2は、本発明の一実施形態と一致する、外部光源を有する落射蛍光顕微鏡装置のブロック図を示す。落射蛍光顕微鏡装置200は、外部光源214を含む。この外部光源214は、寸法216及び218内に複数の構成要素を含む、光学配置250に結合される。寸法216及び218に対して垂直に延在する、更なる寸法は、図示されていない。必ずしも限定されないが、これらの寸法のそれぞれは、1立方インチ（約16.39cm³）未満であってもよい。その他の実施形態と一致して、寸法は、数センチメートル程度である。

【0037】

本開示の一実施形態と一致して、外部光源214は、光ファイバケーブル212を介して、光学配置250に結合される。外部光源214、及び光ファイバケーブル212からの、励起光は、（省略可能な）励起フィルタ208を通過する。（ダイクロイック）ミラー204、及び対物レンズ206は、励起光を、対象物体210に向ける。特に、励起光は、視野220に向けられる。励起光は、対象物体210内の蛍光体が、落射蛍光を発することを引き起こす。この落射蛍光は、（ダイクロイック）ミラー204、及び対物レンズ206によって、光センサ202に向けられる。

【0038】

本開示の様々な実施形態では、顕微鏡装置200は、イメージフォーカシング光学要素（例えば、アクロマティックレンズ）、及びエミッションフィルタのうちの1つ以上を、イメージング経路内に更に含んでもよい。これら、及びその他の要素（図1には図示せず）は、顕微鏡装置200の光学特性を制御するのに役立つ可能性がある。

【0039】

光源214は、光学配置250に近接して配置されないが、対象物体210、対物レンズ206、及び/又は光センサ202の間の近接に起因して、対象物体210に送達される励起光の量は依然として低レベルに設定されることが可能である。特に、この近接は、対象物体と、光センサとの間の有効な光結合を提供するために、特に有用であり得る。従って、落射蛍光は、イメージ特性の割に、低い強度のものであってもよい。その上、対象物体210におけるより低レベルの励起強度は、フォトリージング、加熱、又はその他の悪影響がファクターとなる前の、励起光へのより長い露光を可能にし得る。

【0040】

以下の説明は、実験的实施形態の詳細を提供する。実験的实施形態は、様々なパラメータ及び結果に関する、例及び詳細を提供するが、これらの態様は、本開示の様々なその他の実施形態を必ずしも限定するものではない。実験的实施形態は、小さな落射蛍光顕微鏡を提供するように構成及び配置された。顕微鏡は、光源、光学部品、フィルタ、及びカメラを、1つのハウジング内に含む、特別に統合された配置を含むものであった。

【0041】

ミニチュア落射蛍光顕微鏡についての、統合のレベル、及び、結果として得られるサイズ規模は、多数の適用例における使用のために構成されてもよい。特に困難な適用例は、例えば、マウス、又は類似した生体内の、インビボの脳イメージングに関する。少なくとも1つのそのような適用例において、顕微鏡は、目をさまして行動している間の、インビ

10

20

30

40

50

ボの脳イメージングのために、マウスの頭の上に取り付けられるように設計される。これ、及びその他の適用例のために構成されるようにするために、顕微鏡は、厳しい物理的サイズ及び質量の要件を考慮して設計された（例えば、目をさまして活発に行動している間、マウスによって容易に運ばれるように）。例えば、成体マウスが質量約 25 g であるとする、顕微鏡は、3 g 以下であるように設計された。その他の設計考慮事項は、イメージ品質、信頼性、及び速度を中心とするものであった。

【0042】

一実施形態は、高速な、細胞レベルの脳イメージングの、イメージングのために構成された。大規模製造のコスト及び容易さは、蛍光顕微鏡の設計におけるもう 1 つのファクターであった。特定の実施形態は、低コストで大量生産可能な（例えば、スケーラブルな、かつ大量生産に適した）統合された装置として構成及び設計された。

10

【0043】

図 3 は、そのような考慮事項、及び本開示のその他の実施形態と一致して設計された、ミニチュア蛍光顕微鏡の断面を示す。縦の矢印は、励起（下向き矢印）、及びエミッション（上向き矢印）の経路を示す。1 つのハウジング 300 は、光源 314、及びイメージ捕捉回路 302、並びに、蛍光フィルタセット（エミッションフィルタ 306、及び励起フィルタ 316）、及びマイクロ光学部品（コレクタレンズ 312、ダイクロイックミラー 310、アクロマティックレンズ 308、対物レンズ 318、及びフォーカシングメカニズム 304）を含む。光源、及びカメラと、フィルタセット、及び顕微鏡光学部品との、この統合は、インビボのイメージングなどの、様々な用途における、高解像度イメージ捕捉を促進する。

20

【0044】

一実施形態と一致して、小さく、集光光学部品との統合に適しており、低コストで大量生産可能な、半導体発光ダイオード（LED）が、励起光源のために使用される。相補型金属酸化膜半導体（CMOS）イメージセンサが、カメラのために使用される。

【0045】

本開示の特定の実験的实施形態では、図 3 に示す LED 光源は、カスタマイズされた 6 mm × 6 mm のプリント回路基板（PCB）（これは、ヒートシンクも含む）上に取り付けられた、青色 LED 314 を使用して実施されてもよい。ドラムマイクロレンズ 312 が、イルミネーションを収集するために使用され、イルミネーションは、次に、4 mm × 4 mm の励起フィルタ 316 を通過し、ダイクロイックミラー 310 から偏向されて出て、イメージング経路に入る。勾配屈折率（GRIN）対物マイクロレンズ 318 が、イルミネーションを、サンプル上にフォーカスさせる。サンプルからの蛍光エミッションは、対物レンズ 318、ダイクロイック 310、4 mm × 4 mm エミッションフィルタ 306、及びアクロマティックダブレットチューブレンズ 308 を通って戻り、アクロマティックダブレットチューブレンズ 308 は、イメージを、電力及び信号調整電子回路を有する 8.4 mm × 8.4 mm の PCB 上に取り付けられた、CMOS イメージセンサ 302（640 × 480 ピクセル）上にフォーカスさせる。LED 光源と、CMOS カメラと、光学構成要素とは、モジュラー設計を使用して、顕微鏡ハウジング 300 内に統合され、モジュラー設計は、励起 LED、及び CMOS カメラチップなどの、個々の構成要素が、様々な用途ニーズのために交換されることを可能にする。その上、メモリ回路が、イメージデータを記憶するために統合されてもよい。モジュラー態様は、顕微鏡をイメージング対象から除去することなしに、メモリ回路が除去、及び交換されることを可能にする（例えば、顕微鏡は生体に取り付けられたままであってもよい）。従って、捕捉されたイメージは、ローカルに記憶され、次に、メモリ回路の除去によって回収され、メモリ回路は、ラップトップコンピュータなどの、外部装置とインタフェースするように構成されてもよい。

30

40

【0046】

例示的实施形態では、顕微鏡ハウジングは、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）を使用して製造され、カメラ位置の調節によってサブミクロン精度までのフォーカシング

50

を可能にする、内蔵の機械的イメージフォーカシング機能を有する。その他の材料（例えば、生体適合性、及び耐溶剤性材料）も、様々な所望される用途に一致して、使用されてもよい。顕微鏡は、標準USBインタフェースを有する外部データ取得PCBを介して、コンピュータにプラグ接続されて、リアルタイムイメージ取得、表示、並びに、カメラ及び光源制御を提供してもよい。

【0047】

本開示の実施形態は、イメージング経路の設計及び制御、並びに、落射蛍光顕微鏡の設計に関する。イメージング経路は、対物レンズを、その他の光調整及び指向構成要素と共に含む。追加の構成要素は、例えば、スペクトルフィルタリング構成要素、及び/又は、アクロマティックダブレットイメージングチューブレンズを含んでもよい。

10

【0048】

図4は、本開示の一実施形態と一致する、対物レンズと、その中の光線伝搬とを示す。特定の実施形態では、対物レンズ402は、GRIN対物レンズである。GRIN対物レンズは、径方向に沿って減少する屈折率プロファイルを有する円柱レンズであり、これは、図4に示すように、対象物体404から来た光線406が、正弦波経路内を伝搬することをもたらす。GRINレンズは、小さなフォームファクター、及び他のマイクロ光学部品との統合のしやすさにより、並びに/あるいは、他のタイプの対物レンズに比較して光路長が減少することにより、特に有用であり得る。

【0049】

本開示の一実験的实施形態では、試料からの蛍光エミッションを収集するために使用されるGRIN対物レンズは、直径2mm、ピッチ長0.245である。ピッチ長1は、1つの完全な正弦波経路の光線伝搬に対応し、従って、ピッチ長0.245は、図4に示すように、平行光線と考えられるものに近い光線をもたらす。対物レンズ開口数(NA)は、0.45である。収集された蛍光エミッションは、ダイクロイックミラー、及びミニチュアエミッションフィルタを通過し、蛍光イメージは、次に、15mmの焦点距離を有するアクロマティックレンズによって、CMOSイメージセンサ上にフォーカスさせられる。

20

【0050】

図5は、本開示の一実施形態と一致する、2つのレンズ要素と、追加のスペクトルフィルタリング構成要素とを有する、イメージング経路の、光線追跡図を示す。光線は、試料面上の点が、CMOSカメラ上に、どのようにイメージングされるかを示す。光線(502、504、506、508、510)が、試料面内の5つの別個の点源から、CMOSカメラ上のイメージング点まで追跡されている。イメージング経路の設計、及び光線追跡シミュレーションは、ソフトウェアモデリングを使用して実行された。対象物体512から発する光線は、GRIN対物レンズ514を通過する。GRIN対物レンズ514は、光線を平行にする。光線は、次に、ダイクロイックミラー516によって、アクロマティックレンズ518に向けられる。エミッションフィルタ520は、反射された励起光などの、望ましくない光波長をフィルタリングして除去する。光線は、次に、センサレイ/カメラ522に当たり、ここで、光線は、記録され、対象物体512のイメージを生成するために使用される。

30

40

【0051】

イメージング経路によって提供される光学倍率、及び、光学要素は、所望される用途に応じて構成されてもよい。その上、光学倍率に対する要求は、対物レンズの、対象物体への近接、及び、対象物体と、対物レンズと、イメージ捕捉回路との間の近接によって補われてもよく、これにより、低い光学倍率(1~4×)で、1mm²より大きな、広い試料視野をイメージングし、同時に、少なくとも1µmの、高い空間解像度を依然として提供することを可能にし得る実施形態がもたらされる。

【0052】

実験、及び関連する実施形態と一致して、顕微鏡光学倍率範囲は、4.5~5.5×である。作動距離、すなわち、対物レンズの表面近傍から、焦点が合っている試料面内の点

50

までの距離は、約 $150 \sim 200 \mu\text{m}$ 、又は約 $50 \sim 250 \mu\text{m}$ である（これらの寸法は、焦点面の正確な位置付けに依存する可能性がある）。光学設計の性能は、その解像度能力によって評価されてもよく、この1つの尺度は、光学的点拡がり関数の半値全幅（FWHM）である。この手法で計算された、イメージング経路の、軸上の、横方向空間解像度は、約 $1.2 \mu\text{m}$ であり、視野の周辺においては、約 $1.6 \mu\text{m}$ まで劣化した。この測定は、しかし、必ずしも限定的なものではなく、なぜなら、達成可能な空間解像度は、カメラピクセルサイズ（但し、これに限定されない）を含む、様々なファクターの関数でもあるからである。

【0053】

本開示の態様は、対象物体と、励起源と、イメージセンサとの間の、イルミネーション経路の特性に関する。例えば、イルミネーション経路の注意深い設計は、観察中の試料の、効率的、かつ均一な励起を提供することが可能である。励起光源の、イルミネーション経路への結合は、試料を励起するための、十分な、かつよく制御されたイルミネーションを提供するために有用であり得る。一実験的实施では、 470 nm 付近における、イルミネーションのスペクトルピークを有する、青色LEDが、励起光源として使用された。LEDは、ヒートシンクを備えた $6 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ のPCB上に取り付けられた。ヒートシンクは、LED接合温度を、動作中に安定に保つために役立つ。

【0054】

LEDイルミネーション出力は、局所領域にわたってのみ、駆動電流と比較して（一次）線形である（実際の伝達関数は、曲線である）。しかし、出力は、温度依存性を示す。実験結果は、試料において必要とされるイルミネーションパワーを送達するために、 $20 \sim 30 \text{ mA}$ の駆動電流で十分であることを示した。この駆動電流は、LEDの駆動電流の最大定格の、約50分の1（ $1/50$ ）であった（例えば、最大駆動電流は 1 A であり、一般的な駆動電流は 20 mA である）。所与の駆動電流に対して、LED接合は、一般に、LEDがオンになった後、約60秒で、平衡温度に達し、LEDイルミネーション出力は安定した。いくつかの実施形態では、フィードフォワード、又はフィードバックシステムと結合された、組み込み型の、又は外部の温度測定を介して、LED光出力は、温度変化の間、リアルタイムで安定させられてもよい。例えば、温度センサ（例えば、感温抵抗体、又は温度検出用ダイオード）、及び/又は電流センサから受け取ったデータが、LEDに提供される電力の量を制御するために使用されてもよい。いくつかの実施形態では、そのような制御を提供する制御回路は、製造中に、又はその後の時点において、較正されてもよい。

【0055】

一実験的实施形態と一致して、LEDイルミネーションは、ドラムレンズによって収集され、ミニチュア蛍光励起フィルタを通過し、次に、ダイクロイックミラーから反射されて出て、ダイクロイックミラーによって、イルミネーションは、GRIN対物レンズ内に、そして、試料に向けられる。システムは、試料視野全体にわたる、平均光パワー密度における、空間的に均一な、一様なイルミネーションを達成するための、試料への光の収集及び送達のために設計された。これは、ケーラーイルミネーションを近似することによって達成されてもよい。ケーラーイルミネーションでは、光源と、試料面とは、別個の共役面の組の上にあり、これにより、光源が試料上にイメージングされないことが確実にされ、平均光パワー密度における、試料の均一なイルミネーションがもたらされる。

【0056】

一実験的实施形態によれば、蛍光フィルタセットは、励起イルミネーションを、蛍光エミッションから分離するように構成される。フィルタセットは、励起フィルタ、ダイクロイックミラー、及びエミッションフィルタという、3つの部分を含む。フィルタ、及びダイクロイックの、スペクトルプロファイルは、青の励起、及び緑のエミッションを可能にするように構成された。これらのスペクトルプロファイルは、フルオレセインとその反応性誘導体、及び、緑色蛍光タンパク質（GFP）などの遺伝子的にコードされた蛍光タンパク質などの、幅広い範囲の合成蛍光プローブのイメージングに適している。特定の実験

的实施について、特定のスペクトル特性、及びフィルタセットの寸法は、以下の通りであった。励起フィルタは、帯域通過フィルタであり、 $480/40\text{ nm}$ のスペクトルと、 $4\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 1.05\text{ mm}$ の寸法とを有し、エミッションフィルタも、帯域通過フィルタであり、 $535/50\text{ nm}$ のスペクトルと、同様の、 $4\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 1.05\text{ mm}$ の寸法とを有し、ダイクロミックミラーは、 506 nm を超える波長を通過させる、長い通過スペクトルプロファイルを有し、 $4\text{ mm} \times 4.8\text{ mm} \times 1.05\text{ mm}$ の寸法を有していた。他の実施形態では、フィルタセットは、様々な励起/エミッションスペクトルを有する、複数の蛍光マーカの励起及びイメージングのための、複数の波長励起を可能にするように構成されてもよい。

【0057】

本開示の実施形態は、CMOSイメージセンサの使用に関する。CMOSイメージセンサは、CMOSで設計及び製造された、デジタルイメージングセンサである。これは、低コストで大量生産されることが可能なイメージセンサを提供するために、特に有用であり得る。その上、CMOS技術の使用は、低電力、及び高速の、両方において動作する解決法を提供するために有用であり得る。CMOSイメージセンサは、デジタルピクセルを使用して実施されることが可能であり、ここで、光子からビットへの変換は、ピクセルごとのアナログ-デジタルコンバータと、ダイナミックメモリとを使用して、ピクセルレベルにおいて直接行われる。これは、高速イメージング用途のために、及び、ダイナミックレンジエンハンスメントなどの、高速捕捉から利益を得る静止及びビデオレートイメージング用途のために、特に有用な可能性がある。

【0058】

特定の実施では、 640×480 ピクセルの解像度を有し、各ピクセルが $5.6\text{ }\mu\text{ m} \times 5.6\text{ }\mu\text{ m}$ の寸法を有する、CMOSイメージセンサが使用された。CMOSイメージセンサは、 $5.6\text{ mm} \times 5.8\text{ mm}$ のチップスケールパッケージ内にパッケージされた。センサ出力は、シリアル化デジタル低電圧差動信号(LVDS)フォーマットにおけるものであった。そのようなLVDSフォーマットは、最小数の相互接続を使用してインタフェースすることを促進するために特に有用であり、これは、顕微鏡に取り付けられる線の数を最小にするための、重要な考慮事項であり得る。

【0059】

センサの、表1に示す実験的特徴付けについて、以下に簡単に説明する。暗電流ショットノイズからのノイズ寄与が些細であるように、完全な暗闇の中で、十分に短い露光によって取得された、 1000 イメージフレームにおける、ピクセル強度の標準偏差を計算することによって、ピクセル読み出しノイズが評価された。暗電流と、暗信号不均一性(DSNU)(デバイスの不一致に起因する、ピクセルのアレイ間での暗電流のばらつき)とが、暗闇の中で、十分に長い露光時間によって、 1000 フレームを捕捉し、次に、時間ノイズを理想的に平均する目的で、フレームを平均して1つのイメージとすることによって評価された。暗電流と、暗信号不均一性とは、次に、平均されたイメージ内のピクセルの平均、及び標準偏差から見い出された。これらの実験的に特徴付けられたセンサ仕様と、センサのその他の既知の電子特性とを使用して、CMOSイメージセンサが解析的にモデル化され、一連の入射光子束密度にわたるイメージング忠実度が評価された。

【表1】

パッケージサイズ	$5.6 \times 5.8\text{ mm}^2$
アレイサイズ	640×480 ピクセル
ピクセルサイズ	$5.6 \times 5.6\text{ }\mu\text{ m}^2$
フレームレート	$36\text{ fps}/\text{Hz}$
ピクセル読み出しノイズ	10 e^-
暗電流(室温)	$900\text{ e}^-/\text{s}$
暗信号不均一性	$30\text{ e}^-/\text{s}$
フルウェルキャパシティ	$52,000\text{ e}^-$

10

20

30

40

50

【0060】

実験結果は、例示的なものであり、限定的であることを意図するものではない。例えば、表1のフレームレート/イメージ捕捉速度(36Hz)は、特定の実験パラメータの状況におけるものと理解されるべきである。例えば、捕捉された視野(FOV)は、少なくとも 0.5 mm^2 であったが、これは、最大 1 mm^2 、又はそれ以上であってもよい。より小さなFOVは、より高いフレームレートを可能にする(例えば、100Hzにおいて $370\text{ }\mu\text{m} \times 370\text{ }\mu\text{m}$)。

【0061】

本開示の実施形態と一致する一適用例は、インビボのマウス脳イメージング実験に関する。一般的なインビボのマウス脳イメージング実験の場合、センサ面上に入射する光子束密度は、 10^{11} 光子/cm²/秒程度であり、これは、20,000電子/ピクセル/秒に対応するため、CMOSイメージセンサは、インビボのマウス脳イメージング実験の場合、光子ショットノイズ制限領域内で動作する。従って、イメージングが低光量状態において実行される適用例についての、CMOSイメージセンサのピクセル読み出しノイズ、及び暗電流の数値、関連する考慮事項は、イメージング忠実度にわずかな影響しか与えない。評価された60dBのセンサダイナミックレンジと共に、これは、インビボの脳イメージングデータセットにおいて観察される信号強度の範囲を捕捉するために十分すぎるほどであると考えられ、CMOSイメージセンサのイメージング性能メトリクスは、用途ニーズに応えるのに適していることが示された。

【0062】

本開示の実施形態は、顕微鏡装置への、イメージデータ、制御信号、及び/又は電力の、通信に関する。多くの適用例について、顕微鏡の侵入性(intrusiveness)は、関連する考慮事項である。この側面は、顕微鏡装置に、通信、及び/又は電力を提供するために使用される、線の数によって悪影響を及ぼされる可能性がある。従って、本開示の様々な態様は、顕微鏡と、(制御、並びに/あるいは、イメージ記憶及び処理機能を提供することが可能な)外部システムとの間の、線の数減らすことに関する。特定の実験的实施と一致して、2線式I2Cインタフェースが、制御情報を顕微鏡装置と通信するために使用される。I2Cインタフェースは、線を、SCLK、及びSDATAとして定義し、シリアルインタフェースを使用して通信し、これにより、線の数少ない解決法を提供する。いくつかの実施形態では、動きを容易にするため、及び、接続線へのねじれ歪みを減らす、又は除去するために、追加の回転要素(例えば、コミュテータ)が使用されてもよい。様々なその他のプロトコル、及び通信解決法が可能である。

【0063】

本開示の特定の実施形態と一致して、入力電力供給は、イメージセンサに送達される前に、低ドロップアウト電圧レギュレータ(LDO)によって、ステップダウンされ、調整される。入力クロック信号(162MHz)は、イメージセンサに送信される前に、クロックバッファに伝送され、クロックバッファによって復元される。受信されたクロック信号は、次に、27MHzマスタクロック信号を内部で生成するために使用される。センサのイメージデータ出力は、10ビットデジタル化フォーマットにおけるものであり、2線式シリアルLVDSプロトコルを介して伝送される。本開示は、しかし、いかなる特定の通信プロトコルにも、電力提供メカニズムにも、必ずしも限定されるものではない。

【0064】

図6は、本開示の一実施形態と一致する、顕微鏡システムのブロック図を示す。顕微鏡600の、電子的にアクティブな構成要素のうちの2つは、光励起源602と、センサアレイ604とを含む。いくつかの実施形態では、顕微鏡600は、電力、及び制御信号を、外部インタフェースモジュール650から受信する。これは、様々な回路及び構成要素(例えば、電力供給、メモリ記憶、及び/又はイメージ処理)が、顕微鏡から遠く離れて配置されることを可能にする。インタフェースモジュール650は、独立型の構成要素として機能するように、又は、コンピュータなどの、別の装置と接続するように設計されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、インタフェースモジュール 6 5 0 は、顕微鏡データの取得及び制御を提供するように構成され、かつ、顕微鏡イメージング装置の外部にある。別の実施形態では、（入力／出力（I／O）インタフェース 6 1 6 を有する、又は有さない）インタフェースモジュール 6 5 0 は、顕微鏡装置 6 0 0 と統合されてもよい（例えば、重量／サイズが、そのような統合を排除しない用途のために）。

【 0 0 6 6 】

本開示の一実施形態によれば、インタフェースモジュール 6 5 0 は、入力／出力（I／O）インタフェース 6 0 6（送信器／受信器／トランシーバ回路）を含む。この I／O インタフェース 6 0 6 は、顕微鏡 6 0 0 に電力、制御を提供するために、及び、顕微鏡 6 0 0 からのイメージデータを伝送するために、使用されてもよい。例えば、電力が、1 つ以上の電力レギュレータ 6 1 0 から提供されてもよく、制御信号が、制御インタフェース 6 1 4 から提供されてもよく、光励起源 6 0 2 に電力を供給するためのドライバ信号 6 0 8、イメージデータが、（イメージ）データ処理ユニット又は回路 6 1 2 に通信されてもよい。従って、顕微鏡 6 0 0 も、インタフェースモジュール 6 5 0 との通信を可能にするための、1 つ以上の送信器／受信器／トランシーバ回路を有するように構成されてもよい。

【 0 0 6 7 】

本開示の一実施形態では、I／O インタフェース 6 0 6 は、顕微鏡 6 0 0 に、有線接続を使用して接続される。有線接続は、電力、及び通信信号を、任意の数の異なるプロトコルを使用して伝送してもよい。特定の用途（例えば、活動中の生体のインビボのイメージング）は、軽く、柔軟で、かつ、その他の点で、イメージングの対象による動きに適した、有線接続から利益を得る。従って、いくつかの実施形態は、ピン／線の数が少ない通信プロトコル、及び解決法を実施する。

【 0 0 6 8 】

本開示の他の実施形態と一致して、I／O インタフェース 6 0 6 は、無線通信を使用するように設計される。顕微鏡イメージング装置の無線制御、及び無線データ転送は、いくつかの動いているイメージング対象が、相互に十分に近接して、並行してイメージングされている場合に、特に有用な可能性がある。非限定的な一例では、I／O インタフェース 6 0 6 は、ISO／IEC 14443 から導かれるニアフィールド通信などの、磁界誘導を使用してもよい。ニアフィールド通信は、例えば、誘導結合を介して、電力が、顕微鏡に、無線で提供されることも可能にする。その他の無線通信プロトコル、及び解決法も可能である。

【 0 0 6 9 】

様々な実施形態と一致して、インタフェースモジュール 6 5 0 は、ラップトップ／デスクトップコンピュータなどの、別の装置とインタフェースする、入力／出力（I／O）インタフェース 6 1 6 を有するように設計される。この入力／出力（I／O）インタフェース 6 1 6 は、顕微鏡 6 0 0 からの、捕捉されたイメージを提示するための、表示画面も含んでもよい。いくつかの実施形態と一致して、I／O インタフェース 6 1 6 は、インタフェースモジュール 6 5 0 の一部として統合されてもよく、又は、（例えば、有線又は無線通信リンクを介して接続された）別個の構成要素であってもよい。

【 0 0 7 0 】

I／O インタフェース 6 0 6 及び 6 1 6 について本明細書で説明する様々な例は、限定的なものではない。I／O インタフェースは、カスタム設計されてもよく、又は、既存の通信プロトコルに適合するように実施されてもよい。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、メモリ 6 1 8 は、イメージデータを、並びに／あるいは、データ処理ユニット又は回路 6 1 2 による実行のためのソフトウェア命令を、記憶するために使用されてもよく、データ処理ユニット又は回路 6 1 2 は、特殊化されたプロセッサ（例えば、フィールドプログラマブルゲートアレイ）を使用して、又は、特殊化されたソフトウェア命令を実行するように構成された汎用マイクロプロセッサを使用して、実施され

10

20

30

40

50

てもよい。メモリ 618 は、不揮発性メモリ（例えば、フラッシュ）、及び／又は、揮発性メモリ（例えば、揮発性ランダムアクセスメモリ（RAM））を提供する回路を含んでもよい。

【0072】

本開示の特定の実施形態は、顕微鏡 600 内に含まれる 2 枚のプリント回路基板（PCB）を使用して実施される。第 1 の PCB 602 は、発光ダイオード（LED）を含む。第 2 の PCB 604 は、相補型金属酸化膜半導体（CMOS）イメージング／カメラチップを含む。これらの PCB は、両方が、外形 1.5 mm のポリ塩化ビニル（PVC）の 1 つのシース内に入れられた 9 本の細くて柔軟な線（LED PCB 602 への 2 本の線、及びカメラ PCB 604 への 7 本の線）を介して、カスタム外部システム 650 に接続される。外部システム 650 は、汎用 USB イメージングデータ捕捉アダプタを介して、コンピュータとインタフェースする。この構成は、リアルタイムの顕微鏡制御及びデータ取得、並びに、イメージの即時表示を可能にするために特に有用な可能性がある。

10

【0073】

集積回路間（I2C）シリアル通信インタフェースが、I2C コントローラ 614 を使用して提供される。I2C インタフェースは、PCB 604 の一部である（CMOS）イメージング／カメラチップの動作及び機能を制御するために使用されてもよい。イメージング／カメラチップから出力されたイメージデータは、シリアル化され、デジタル低電圧差動スイング（LVDS）フォーマットに従って伝送される。

20

【0074】

本明細書で説明する様々な実施形態と一致して、実験的蛍光顕微鏡は、製造、組み立て、及びテストされてもよい。顕微鏡の製造、組み立て、及びテストのプロセスは、本質的に、分散され、能率化されて実施されてもよい。カメラ PCB と、LED PCB とは、別個に製造されてもよく、また、レンズと、フィルタとは、別々に生産又は調達される。顕微鏡ハウジングは、その製造を容易にするために、一揃いの、個々の部品として製造されてもよい。

【0075】

イメージング光学部品を使用して、又は使用せずに、カメラ PCB は、電力、カメラ制御、及び有効な出力データの存在について、テストされてもよい。LED PCB のテストは、イルミネーション出力が監視されている間の、LED の駆動を含んでもよい。完全に組み立てられた後、顕微鏡ハウジングは、光学部品と、LED PCB、及びカメラ PCB との、アライメントを維持するように設計される。顕微鏡ハウジングは、軽量で、化学的耐性があり、堅く、機械加工が可能な、黒いポリエーテルエーテルケトン（PEEK）で作られた。黒いハウジングが、迷光の大部分を吸収したが、黒いフェルト又はその他の吸光材料の薄い層が、光を反射する傾向がある位置に貼られてもよい（例えば、接着されてもよい）。カメラ PCB を保持するハウジング部分と、顕微鏡本体との間の、ねじ込み式インタフェース（threaded interface）は、それら 2 つの間の間隔の細密調整を提供するように構成される（焦点が合っている試料面を、取得されるイメージ内に設定するために）。顕微鏡設計のモジュラー性は、必要に応じた、様々な部品（例えば、カメラ PCB、LED PCB、フィルタ、及びダイクロイックセット）の除去、及び交換を可能にする。

30

40

【0076】

この方法と一致して製造された実験的顕微鏡は、様々な特徴についてテストされた。表 2 は、活動中のマウスの脳の、インビボのイメージングに使用された、実験的に製造されたミニチュア蛍光顕微鏡（イメージアライメントなし）についての様々な仕様を示す。

【表 2】

寸法	$8.4 \times 13 \times 22 \text{ mm}^3$
質量	2 g
解像度	$2.5 \mu\text{m}$
視野	0.48 mm^2
光子束	$3 \times 10^{11} \text{ ph/cm}^2/\text{s}$
SNR	37 dB
イメージング期間	40～50分

【0077】

10

顕微鏡の変調伝達関数(MTF)に基づく、シミュレートされた顕微鏡解像度は、 $2.3 \mu\text{m}$ であると判定された。測定された顕微鏡解像度は、上の表2に記載したように、約 $2.5 \mu\text{m}$ であると経験的に評価された。顕微鏡解像度は、シーメンススター解像度テストパターンをイメージングすることによって測定された。

【0078】

実験的顕微鏡の解像度能力をテストするために、鋭いエッジ、傾斜したバーが、合成シーンとして使用され、仮想顕微鏡を使用してイメージングされた。平均エッジ応答、又は線広がり関数が、次に、傾斜したバーのデジタルイメージの様々な断面において導かれ、MTFが、次に、計算された。結果は、カメラピクセルピッチによって判定された、ナイキストレートが、 89 サイクル/mm であることが見い出されたことを支持する。これは、試料面内の $2.2 \mu\text{m}$ の特徴サイズに対応する。MTF10、すなわち、コントラストが、理想的なコントラストの10%に劣化する解像度は、 $2.3 \mu\text{m}$ であることが示された。

20

【0079】

本開示の、明示的に説明した実施形態からの、複数の変形が可能である。例えば、顕微鏡は、バッテリーなどの、ローカルパワーサプライを含むように構成されてもよい。他の例では、顕微鏡のアレイが、対象物体のそれぞれのイメージを捕捉するように配置されてもよい。

【0080】

特定の実施形態は、生体の、インビボのイメージングに関する。以下で説明する様々な実施形態は、統合された顕微鏡の、頭蓋上への取り付けによって、移動、及びその他のマウス行動と同時に、微小循環を調べるための、小脳虫部のイメージングに関する。それにもかかわらず、本開示は、これに限定されるものではなく、様々な異なる分野、及び用途に適用可能である。

30

【0081】

インビボのイメージングに関する特定の実験的実施形態では、(複数の実験において)マウス脳上に固定されたミニチュア顕微鏡を使用した、脳イメージングが、活発な歩行行動を示しているマウスについて、1回実施された。顕微鏡は、マウスが麻酔をかけられている間に取り付けられ、イメージングは、麻酔から解除されてから約15～60分後に開始された。頭蓋に取り付けられた顕微鏡を使用して、マウス行動、及び、相互に関連する、虫部における微小循環の、複数のビデオクリップが、様々な行動について捕捉可能である。例えば、行動領域内を歩き回っているマウスは、第1の行動を表し、運動用回し車上で走っているマウスは、第2の行動を表す。一実験的实施では、FITCデキストランの静脈注射に続いて、 100 Hz でイメージを捕捉する統合された顕微鏡を使用して、微小循環が記録された。この蛍光染料は、血漿を標識し、これにより、赤血球が暗いレリーフ内で見られること(to be seen in dark relief)を可能にした。個々の赤血球が、毛細血管を通して流れるのが目撃された。生理機能における光誘起変化の可能性を減らすために、各イメージングセッションについて、連続イルミネーションの期間、及び平均電力は、 $< 5 \text{ 分}$ 、及び $< 600 \mu\text{W}$ に制限された。少なくとも2分が、イメージングセッションの間に経過することが可能にされ、実験の間の総イメージング

40

50

期間は、一般に約 4 5 分であった。フレイム取得レートは、小脳血管系、及び微小循環イメージング実験については、約 1 0 0 H z、カルシウムイメージング調査については、3 0 ~ 4 6 H z であった。

【 0 0 8 2 】

いくつかのインビボの適用例について、本明細書で説明したが、本開示の装置、及び方法は、その他のイメージング解決法（形態判定、薬剤スクリーニング、及びその他の適用例など）のために使用されることが可能である。

【 0 0 8 3 】

一実施形態と一致して、本明細書で説明した統合された顕微鏡の使用は、様々な生体についての表現型の識別を容易にする。これは、際立った特徴を識別するために使用されることが可能な、高解像度イメージングによって容易にされる。例えば、表現型は、野生型、及び e r b b 3 突然変異体のゼブラフィッシュについて、A l e x a - 4 8 8 を用いたミエリン塩基性タンパク質の蛍光免疫標識を使用して、識別されてもよい。脊髄、及び後外側神経が、イメージングされ、野生型の魚における区別のために使用されてもよい。e r b b 3 の魚では、シュワン細胞が、後外側神経を発達させない。

10

【 0 0 8 4 】

別の実施形態と一致して、統合された顕微鏡の使用は、ウェルプレート内の正確な細胞計数分析を容易にする。例えば、カルボキシフルオレセインを使用して標識された、生きている M C F 7 ヒト乳がん細胞の、塩基濃度（C O 4 . 0 × 1 0 5 細胞 / m L ）が、6 つの濃度のそれぞれについて、8 サンプルウェルを使用して、希釈されてもよい。必要に応じて、自動化アルゴリズムが、イメージ内の細胞の、高速、かつ効率的な計数を提供するために使用されてもよい。

20

【 0 0 8 5 】

一実施形態と一致して、自動化アルゴリズムは、カスタム細胞計数アルゴリズム内の、連続した解析ステージを使用する。（コンピュータ）プロセッサ回路（例えば、メモリ回路 / プロセス命令を提供するための媒体を含む）などの、ロジック回路が、カルボキシフルオレセインを使用して標識された、生きている M C F 7 ヒト乳がん細胞の（生）蛍光イメージに対して、コントラスト等化を実行する。プロセッサ回路は、次に、結果として得られたイメージを、バイナリフォーマットに変換し、これに対して、初期セグメンテーションが実行される。単一の細胞が、次に、識別され、計数される。形態学的フィルタリングの、反復のラウンドが、初期セグメンテーションの後に残っていた、複数の細胞のクラスタの、個々の細胞へのセグメンテーションを可能にする。

30

【 0 0 8 6 】

本開示の実施形態は、顕微鏡イメージング装置を、より大きな光学システムの一部として使用することに関する。例えば、顕微鏡イメージング装置は、長期の、慢性イメージングを容易にするために、インビボで埋め込まれてもよい。これは、モバイル電源と、制御 / 処理回路とを提供することによって容易にされ得る。これら、及びその他の要素は、顕微鏡イメージング装置のハウジング内に統合されてもよく、又は、（例えば、対象上の他の場所に配置された制御ユニットへの有線接続を使用して）外部接続されてもよい。別の例では、顕微鏡イメージング装置は、例えば、インビボの内視鏡検査を容易にするために、又は、外科手術的処置の間、対象を監視するために、特殊化された光学装置と接続して使用されてもよい。

40

【 0 0 8 7 】

上述の、及び図に示した、様々な実施形態は、説明の目的のためにのみ提供されたものであり、本開示を限定するものと解釈されるべきではない。上記の説明及び例示に基づいて、当業者は、本明細書中に例示及び記載された、例示的实施形態及び適用例に厳密に従うことなく、本開示に対して、様々な修正及び変更が行われ得ることを、容易に認識するであろう。例えば、インビボのイメージング以外の適用例が、同様のアプローチを使用した実施に適している可能性がある。加えて、上記の例示的实施形態及び実施のうちの 1 つ以上は、デジタル及び / 又はアナログ回路、並びに / あるいは、ソフトウェアベースのア

50

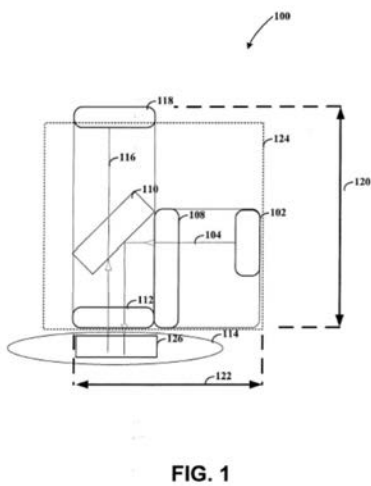
プローチを含む、様々なアプローチを使用して実施されてもよい。これらのアプローチは、本開示の様々な例示的实施形態に関連して実施される。そのような修正及び変更は、特許請求の範囲に記載されたものを含む、本開示の真の範囲から、逸脱するものではない。

【 0 0 8 8 】

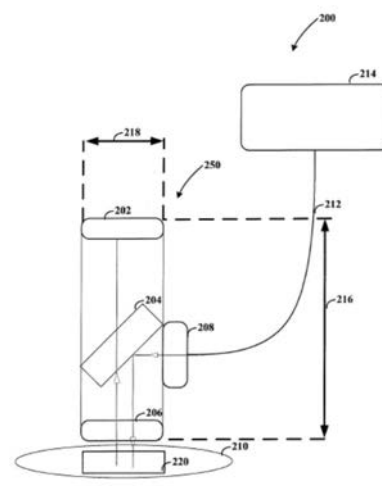
上述のように、本開示に関する、特定の適用例、及び背景の詳細について、上記で、以下の説明において、及び本明細書中で引用された参考文献の全体を通して、説明した。付録内の実施形態は、上述の実施形態及び実施のうちの1つ以上に関連して、並びに、図面に示したもの、及び以下に記載するものに関連して、実施されてもよい。基となる仮出願において提出された、参照によって本明細書中に全面的に援用される付録が参照される。

10

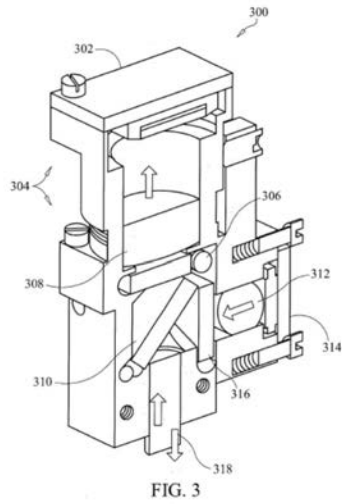
【 図 1 】



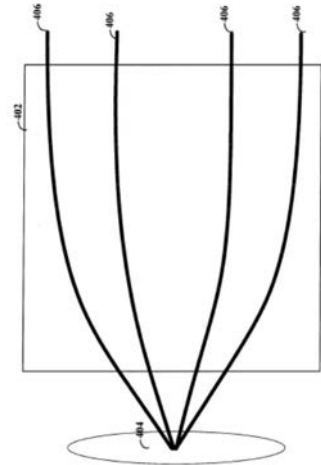
【 図 2 】



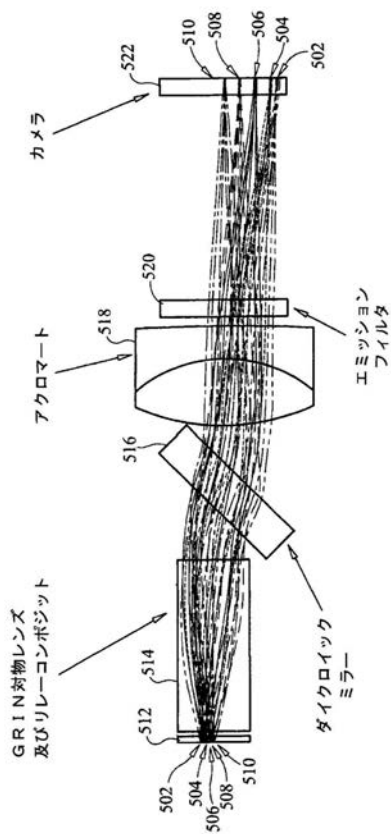
【図 3】



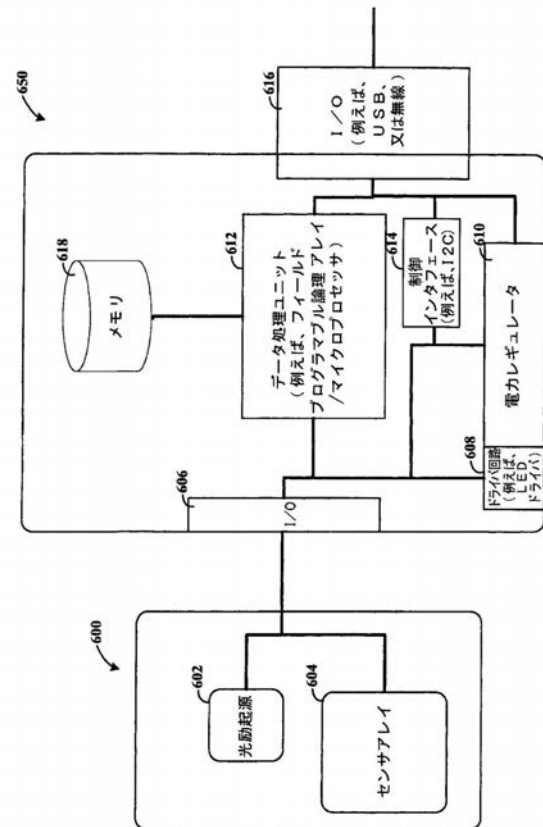
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【手続補正書】

【提出日】平成31年1月11日(2019.1.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光センサのアレイを含むイメージ捕捉手段と、

約 1 mW 未満の励起光を、少なくとも 0.5 mm^2 である視野内の対象物体に向けるように、そして、前記励起光によって引き起こされた落射蛍光エミッションを、光センサの前記アレイに向けるように構成された、光学機器とを備え、前記光学機器と、光センサのアレイとは、前記視野のイメージについて、少なくとも $2.5 \mu\text{m}$ の解像度を提供するために、それぞれ、前記対象物体に十分に近い、

落射蛍光顕微鏡。

フロントページの続き

- (72)発明者 ゴーシュ クナル
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア州 スタンフォードキャンパス ドライブ 1 2 1
アパートメント ナンバー 1 3 1 3 エー
- (72)発明者 バーンズ ラウリー
アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア州 メンロ パーク アシュトン アベニュー 2
0 5 2
- (72)発明者 エルガマル アップス
アメリカ合衆国 9 4 3 0 1 カリフォルニア州 パロ アルト ハミルトン アベニュー 1 4
8 5
- (72)発明者 シュニッツァー マーク ジェイ
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア州 パロ アルト クラーク ウェイ 1 2 7 7
- (72)発明者 コッカー エリック
アメリカ合衆国 9 4 3 0 3 カリフォルニア州 パロ アルト ニュウェル 4 5
- (72)発明者 ホ タット ウェイ
アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州 パロ アルト スタンフォード アベニュー
1 5 5 5

F ターム(参考) 2G043 AA03 CA05 EA01 FA01 FA02 FA06 HA01 HA09 JA03 LA03
2H052 AA09 AB01 AC04 AC26 AC33 AD06 AD31 AF14