

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6753935号
(P6753935)

(45) 発行日 令和2年9月9日 (2020. 9. 9)

(24) 登録日 令和2年8月24日 (2020. 8. 24)

(51) Int. Cl.

F I

GO 2 B 21/36 (2006. 01)

GO 2 B 21/36

GO 1 N 21/64 (2006. 01)

GO 1 N 21/64

E

請求項の数 14 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2018-535251 (P2018-535251)	(73) 特許権者	506151659
(86) (22) 出願日	平成28年9月29日 (2016. 9. 29)		カール ツァイス マイクロスコピー ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2018-531433 (P2018-531433A)		CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH
(43) 公表日	平成30年10月25日 (2018. 10. 25)		ドイツ連邦共和国 07745 イェナ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/073194		カールツァイスプロメナーデ 10
(87) 国際公開番号	W02017/055405	(74) 代理人	100107766
(87) 国際公開日	平成29年4月6日 (2017. 4. 6)		弁理士 伊東 忠重
審査請求日	令和1年9月9日 (2019. 9. 9)	(74) 代理人	100070150
(31) 優先権主張番号	102015116435.3		弁理士 伊東 忠彦
(32) 優先日	平成27年9月29日 (2015. 9. 29)	(74) 代理人	100091214
(33) 優先権主張国・地域又は機関	ドイツ (DE)		弁理士 大貫 進介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 少なくとも2つのスペクトル幅を区別する高解像度走査顕微鏡法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料の高解像度走査顕微鏡法のための方法であって、
前記試料内の又は前記試料上の点で、回折限界照射スポットを形成するように照射ビームを集光し、前記照射ビームによって前記試料を励起して蛍光ビームを放出させ、
前記点は、空間解像検出装置の検出面上の回折像内に回折限界結像され、その際に、
- 前記検出面は複数の空間チャネルを有し、前記複数の空間チャネルは、前記回折像の回折構造を解像する前記検出装置の空間解像度を特定し、
- 前記検出装置は、前記回折像のビームを検出するための複数の検出素子を有し、
- 前記複数の空間チャネルのそれぞれに対して、そこで導かれるビームを、それぞれ複数のスペクトルチャネルにスペクトル分離し、
得られた複数のチャネルを複数の混合チャネルとして集め、前記混合チャネルには、異なる空間チャネルに由来するビームと、異なるスペクトルチャネルに由来するビームとが集められており、
各混合チャネルを前記複数の検出素子のうちの1つへと導き、
- 前記点を、前記照射スポットの直径の半分より小さいステップ幅で、異なる走査位置へ前記試料に対して相対的に移動させ、
- 前記複数の検出素子から各走査位置に対して強度データを読み取り、前記強度データ及びそれに割り当てられた走査位置から前記試料の像が生成され、前記像は、前記点の結像の解像限界を超えて高められた解像度を有し、

10

20

各検出素子に対して、前記ビームの前記スペクトルチャネル及び前記空間チャネルを考慮し、前記試料のマルチスペクトル像を生成する方法。

【請求項 2】

k が空間チャネルに、n がスペクトルチャネルに、j が検出素子に使用され、 $j < k * n$ が成り立つ、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記複数の混合チャネルの数が、前記複数の空間チャネルの数と等しい、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

- 前記検出面は、入射ファセットを有する複数の光ファイバの束の入射面によって形成され、前記入射面内の前記複数の光ファイバの前記入射ファセットにおいて、前記空間チャネルが始まり、
- スペクトル分離・混合装置は、複数の個別分離素子を備え、前記複数の個別分離素子の数は、分離される空間チャネルの数に相応し、
- 各光ファイバは、前記ビームを前記複数の個別分離素子の 1 つへと導き、前記個別分離素子は前記ビームを前記スペクトルチャネルに分離する、

請求項 1 乃至 3 のうちのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

スペクトル分離されることなく前記複数の検出素子のうちの 1 つへと導かれる少なくとも 1 つの別の空間チャネルが設けられている、請求項 1 乃至 4 のうちのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

前記複数の検出素子によって前記蛍光ビームのスペクトルを高速記録するために、1 つの走査位置に対して前記強度データを読み出し、前記強度データから及び各検出素子に割り当てられた複数のスペクトルチャネルを考慮して、前記走査位置における前記試料のスペクトルを生成する、請求項 1 乃至 5 のうちのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

前記試料の前記マルチスペクトル像を生成する際に、

- 各走査位置に対して連立方程式を立て、前記連立方程式は各検出素子に対して 1 つの方程式を含み、各検出素子に割り当てられたスペクトルチャネル及び空間チャネルは各方程式内に含まれ、
- 前記連立方程式を、前記試料に対する強度情報及びスペクトル情報に従って解く、

請求項 1 乃至 6 のうちのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

高解像度走査顕微鏡法のための顕微鏡であって、

- 蛍光ビームを放出するために励起可能な試料を収容するための試料空間と、
- 前記試料空間にある焦点面及び解像限界を有する光学系と、
- 照射ビームを導入するための入射口を有し、前記光学系を介して前記試料空間を前記照射ビームで照射する照明装置であって、前記光学系は前記照射ビームを前記焦点面内の点に回折限界照射スポットを形成するように集光する、照射装置と、
- 前記光学系によって、前記焦点面内の前記点を、回折像に回折限界結像させるための結像装置と、
- 前記焦点面に共役な面内にある検出面を有する空間解像検出装置であって、
- 前記検出面は複数の空間チャネルを有し、前記複数の空間チャネルは、前記回折像の回折構造を解像する前記検出装置の空間解像度を特定し、
- 前記検出装置は、前記回折像のビームを検出するための複数の検出素子を有し、

10

20

30

40

50

前記検出装置は、分離・混合装置を有し、前記分離・混合装置は、前記複数の空間チャンネルに対して、そこで導かれる前記ビームを、それぞれ複数のスペクトルチャンネルにスペクトル分離し、複数の混合チャンネルを形成するために再び集め、前記分離・混合装置は、前記複数の混合チャンネルに、異なる空間チャンネルに由来するビームと、異なるスペクトルチャンネルからのビームとを集め、各混合チャンネルを前記複数の検出素子のうちの1つへと導く、空間解像検出装置と、

- 前記点を、前記照射スポットの直径の半分より小さいステップ幅で、異なる走査位置に移動するための走査装置と、

- 前記検出素子からの強度データ及びそれに割り当てられた走査位置を読み取り、前記強度データ及びそこに割り当てられた走査位置から前記試料の像を生成するための評価装置であって、前記像は、前記光学系の解像限界を超えて高められた解像度を有し、前記評価装置は、各検出素子に対して、各検出素子に導かれるビームのスペクトルチャンネル及び空間チャンネルを考慮して、前記試料のマルチスペクトル像を生成する、評価装置と、
を備える、顕微鏡。

10

【請求項9】

k が空間チャンネル、n がスペクトルチャンネル、j が検出素子を含み、
 $j < k * n$ が成り立つ、

請求項8記載の顕微鏡。

【請求項10】

前記複数の混合チャンネルの数が、前記複数の空間チャンネルの数と等しい、
請求項8又は9記載の顕微鏡。

20

【請求項11】

スペクトル分離されることなく前記複数の検出素子のうちの1つへと導かれる少なくとも1つの別の空間チャンネルが設けられている、

請求項8乃至10いずれか1項記載の顕微鏡。

【請求項12】

- 前記検出面は、入射ファセットを有する複数の光ファイバの束の入射面によって形成され、前記光ファイバの前記入射ファセットは前記空間チャンネルの始点を特定し、

- スペクトル分離・混合装置は、複数の個別分離素子を有し、前記複数の個別分離素子の数は分離される空間チャンネルの数に相応し、

30

- 各光ファイバは、前記ビームを前記複数の個別分離素子の1つへと導き、前記個別分離素子は前記ビームを前記スペクトルチャンネルに分離する、

請求項8乃至11いずれか1項記載の顕微鏡。

【請求項13】

$j = k$ である、

請求項2記載の方法。

【請求項14】

$j = k$ である、

請求項9記載の顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は試料の高解像度走査顕微鏡法のための方法に関し、

試料は蛍光ビームを放出するために照射ビームによって励起され、照射ビームは試料内の又は試料上の点で、回折限界照射スポットを形成するように (zu einem beugungsbegrenzten Beleuchtungsfleck) 集光され、

点は、空間解像度を有する空間解像検出装置上の回折像内に回折限界 (beugungsbegrenzt) 結像され、回折像内の回折構造を解像し、

点は、異なる走査位置に、照射スポットの直径の半分より小さいステップ幅で、試料に対して相対的に移動され、

50

検出装置から各走査位置に対して強度データが読み取られ、強度データ及びそれに割り当てられた走査位置から、試料の像が生成され、像は、点の結像の解像限界を超えて高められた解像度を有する。

【0002】

本発明はさらに、高解像度走査顕微鏡法のための顕微鏡に関し、顕微鏡は、蛍光ビームを放出するために励起可能な試料を収容するための試料空間と、試料空間にある焦点面及び解像限界を有する光学系と、照射ビームを導入するための入射口を有する照射装置であって、照射装置は試料空間を前記光学系を介して照射ビームで照射し、光学系が照射ビームを焦点面内の点に回折限界照射スポットを形成するように集光する、照射装置と、検出装置上の回折像において、光学系によって焦点面内の点を回折限界結像させるための結像装置であって、検出装置の検出面は、焦点面に共役な検出平面にあり、検出装置は回折像の回折構造を解像する空間解像度を有する、結像装置と、点を、照射スポットの直径の半分より小さいステップ幅で異なる走査位置に移動するための走査装置と、検出装置の強度データを読み出し、強度データ及びそこに割り当てられた走査位置から試料の像を生成するための評価装置であって、像は解像限界を超えて高められた解像度を有する、評価装置と、を備える。

【背景技術】

【0003】

生物学的調製物を調査するための光学顕微鏡の1つの古典的応用分野は、発光顕微鏡法（Lumineszenzmikroskopie）である。ここで、特定の染料（いわゆるリン光体又は蛍光体）が、試料（例えば細胞部分）の特徴的マーキングのために用いられる。試料は励起ビームに相当する照射ビームで照射され、それによって励起された蛍光ビームが適切な検出器を用いて捕捉される。このようにして、顕微鏡における、個別に、異なって、着色された細胞部分の表現が可能になる。もちろん、1つのプレパラートの複数の部分を同時に、プレパラートの異なる構造に固有に結合される異なる色素で着色することもできる。この方法はマルチルミネッセンス（Mehrfachlumineszenz）と呼ばれる。それ自体が発光する試料を、色素を添加せずに試料を測定することも可能である。

【0004】

ここでは、発光とは、概して通常どおり、リン光及び蛍光の上位概念として理解され、すなわち両方のプロセスを含む。ここで蛍光が言及される限り、これは全体が含まれると理解されるべきであり、限定的に理解されるべきではない。

【0005】

試料の調査のために、レーザ走査顕微鏡法（LSMとも略される）を適用することが知られており、共焦点検出配置（この場合共焦点LSMと称される）又は非線形試料相互作用（所謂多光子顕微鏡法）によって、対物レンズの焦点面内にある平面のみを結像する。光学的断面が得られ、試料の異なる深さにおける多数の光学的断面の描画は、異なる光学的断面から組み立てられた、試料の3次元像の生成を可能にする。従って、レーザ走査顕微鏡法は、厚いプレパラートを調査するのに適している。もちろん、発光顕微鏡とレーザ走査顕微鏡との組み合わせも使用され、その際、発光試料が異なる深さ平面において、LSMを用いて結像される。

【0006】

原則として、光顕微鏡の光学的解像は、LSMの解像も、物理的法則によって回折限界がある。「高解像度」という用語は、ここでは、回折限界の向こう側（jenseits）の解像度に対して用いられる。

【0007】

US5043570は、「オーバーサンプリング」によって解像度を向上させる試みを記載する。これは、顕微鏡の回折限界の下で、著しく改善された解像度に導かない。

【0008】

非線形過疎化プロセス (Entvoelkerungsprozesse) を用いて、回折限界共焦点 L S M に関して、解像度を 10 倍まで高めることができる。そのような方法は、例えば、U S 5 8 6 6 9 1 1 に記載されている。過疎化プロセスのために、異なる措置が知られている。例えば、D E 4 4 1 6 5 5 8 C 2、U S 6 6 3 3 4 3 2 又は D E 1 0 3 2 5 4 6 0 A 1 等に記載されている。

【 0 0 0 9 】

他の高解像度顕微鏡法は U S 5 8 6 7 6 0 4 において言及されており、そこでは、対象物が周期的構造で走査される。解像度を上昇させるための類似の方法は、E P 1 1 5 7 2 9 7 B 1 において言及される。構造化された照射は非線形プロセス、例えば蛍光の飽和を使用する。この措置は、像生成のために再構成アルゴリズムと、1つの像のために多数の撮影の適用を必要とする。

10

【 0 0 1 0 】

広視野の高解像度を達成する方法は、W O 2 0 0 6 1 2 7 6 9 2 及び D E 1 0 2 0 0 6 0 2 1 3 1 7 から公知である。この P A L M と略称される方法 (フォト活性光学顕微鏡 (Photo Activated Light Microscopy)) は、光学的活性化信号を用いて活性化されることができるマーキング物質を適用する。活性化状態において、マーキング物質は励起ビームによって励起されて、特定の蛍光ビームを放出する。活性化は、活性化されたマーキング分子の少なくともある程度の部分が、隣接する活性化された分子から離間されるように行われ、これらは顕微鏡の光学的解像度において分離され、又は事後的に分離可能のように測定される。発光ビームの撮影後、解像限界が制限されたビーム分布の中心が、これらの分離された分子について求められ、そこから分子の位置が、光学的結像が実際に許容するよりも高い精度で計算される。全試料の結像のために、部分量のマーキング分子の分離は、活性化ビームの照射、その後の励起及び蛍光ビーム結像によって、可能な限り全てのマーキング分子が一度は部分量に含まれ、分離されるまで、繰り返される。

20

【 0 0 1 1 】

ほかの高解像度方法は、H e l l 1 1 の中の "Far-Field Optical Nanoscopy", Science 316, 1153-1158, 2007 及び D E 1 0 2 0 1 3 0 1 7 4 6 8 A 1 に記載されている。E P 2 0 3 7 2 5 5 A 1 は、試料光のマルチスペクトル測定に関するものである。

【 0 0 1 2 】

一般的な方法及び顕微鏡は、E P 2 3 1 7 3 6 2 A 1 から公知である。これは、エアリー走査顕微鏡法 (Airy-Scan-Mikroskopie) として知られている。この文献は、この文献の図 5 に示され記載された実施形態において、試料の回折限界照射を、照射点の回折像を解像する面検出器と組み合わせている。検出器は従って、従来の L S M においてピンホールがあるはずの平面内にある。走査装置は、照射スポットを試料にわたって移動させ、照射スポットによって照射された点の回折像が面検出器上で静止するように設計されている。E P 2 3 1 7 3 6 2 A 1 の概念において、ピンホール面における面検出器は、結像スケールに関して回折像のオーバーサンプリングを引き起こす空間解像度を備え、従って、特別な信号処理と共に、回折像の回折構造のサンプリングを可能にする。

30

【 0 0 1 3 】

E P 2 3 1 7 3 6 2 A 1 は、色分析を可能にする実施態様を備えている。そのために、多色性カラープリッタによって設けられた、対応のスペクトルチャネルにある多数の検出器を備える。この措置は、レーザ走査顕微鏡法について長く公知である。しかしながら、この方法は、各カラーチャネルに対して1つの対応のカラープリッタが、対応の検出器とともに必要になる、という不利な点がある。共焦点孔絞 (ピンホール) の後段で非空間解像検出器が使用される、従来のレーザ走査顕微鏡法において、この要求は概ね問題がない。しかしながら、E P 2 3 1 7 3 6 2 A 1 のようにオーバーサンプリングする面検出器を使用する場合には、特にかかる面検出器は高価であり、相当なコストが発生する。さらに、E P 2 3 1 7 3 6 2 A 1 のようなオーバーサンプリングにおいて、これらは、多数の面検出器をサブピクセル精度で相互に位置合わせされねばならず、そうでなければ、

40

50

個別のカラーチャネルの生成された像間での色誤差が発生する虞があるからである。この色誤差は、高解像度像のために、照射スポットの直径に対して小さいステップで移動する、走査位置上の色検出器のデータが移動されることに由来しうる。面検出器が、すべての色チャネルにおいて光軸に対してサブピクセル精度で位置合わせされている場合にのみ、各色チャネルの像は相互に適合する。

【 0 0 1 4 】

DE 1 0 2 0 1 3 0 1 9 3 7 8 A 1 は、EP 2 3 1 7 3 6 2 A 1 から公知の顕微鏡について色分析のための発展形態を提案する。そこでは、2つの空間解像面検出器が、多数の検出素子を有する検出器にビームを導く2つの光ファイバ束によって形成される。検出素子の半分は、光ファイバと結合され、他の半分は別の光ファイバと結合される。スペクトル分配素子 (Ein spektral aufgliederndes Element) は、光ファイバの両方が異なるスペクトルチャネルのビームを受け取るようにさせる。従って、色情報は、大幅に低減された空間解像度を犠牲にして達成される。この問題は、色の数によって深刻になる。

10

【 0 0 1 5 】

DE 1 0 2 0 1 2 2 0 4 1 2 8 A 1、DE 1 0 2 0 1 3 0 1 5 9 3 1 A 1、DE 1 0 2 0 1 3 0 1 5 9 3 2 A 1、DE 1 0 2 0 1 3 0 1 9 3 4 7 A 1、DE 1 0 2 0 1 3 0 1 9 3 4 8 A 1、WO 2 0 1 3 / 1 3 5 4 8 7 A 1 及び DE 1 0 2 0 1 3 0 1 5 9 3 3 A 1 は、EP 2 3 1 7 3 6 2 A 1 の概念を発展させる。

【 0 0 1 6 】

少なくとも2色の像を生成するためのエアリー走査顕微鏡法の発展開発は、その後公開されたドイツ特許出願 DE 1 0 2 0 1 4 1 1 1 1 6 7 A 1 に記載されている。

20

【 0 0 1 7 】

本発明は、冒頭で述べたタイプの方法又は顕微鏡を、色情報を得ることができるよう発展させ、複数の色チャネルに対する位置合わせコストを低減し又は省き、同時に達成可能な空間解像度を可能な限り低減せず、従って多数の色チャネルを可能とする、という課題を基礎とする。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 8 】

【 特許文献 1 】 EP 2 3 1 7 3 6 2 A 1

30

【 特許文献 2 】 DE 1 0 2 0 1 4 1 1 1 1 6 7 A 1

【 発明の概要 】

【 0 0 1 9 】

この課題は本発明によって、試料の高解像度走査顕微鏡法のための方法で解決される。この方法において、
試料は蛍光ビームを放出するために照射ビームによって励起され、照射ビームは試料内の又は試料上の点で、回折限界照射スポットに (zu einem beugungsbegrenzten Beleuchtungsfleck) 集光され、
点は、空間解像検出装置の検出面上の回折像内に回折限界結像され、その際に、
検出面は複数の空間チャネルを有し、複数の空間チャネルは、検出装置の空間解像度を特定し、回折像の回折構造を解像し、
検出装置は、回折像のビームを検出するための複数の検出素子を有し、
複数の空間チャネルのうちの複数個に対して (für die Mehrzahl der Ortskanäle)、
そこで導かれるビームは、それぞれ複数のスペクトルチャネルにスペクトル分離され、複数の混合チャンネルに再び集められ、
各混合チャンネルにおいて異なる空間チャネルに由来するビームが集められ、前記複数の混合チャンネルのうちの複数個に (in die Mehrzahl der gemischten Kanäle) 異なるスペクトルチャネルに由来するビームも集められ、各混合チャンネルは複数の検出素子のうちの1つの上に導かれ、
点は、照射スポットの直径の半分より小さいステップ幅で、異なる走査位置へ、試料に対

40

50

して相対的に移動され、

検出装置から各走査位置に対する強度データが検出装置から読み取られ、強度データ及びそれに割り当てられた走査位置から、試料の像が生成され、像は前記点の結像の解像限界を超えて高められた解像度を有し、

各検出素子に対して、ビームのスペクトルチャネル及び空間チャネルが考慮され、試料の像がマルチスペクトルに生成される。

特に、試料の高解像度走査顕微鏡法のための方法は以下のように構成されており、

試料は蛍光ビームを放出するために照射ビームによって励起され、照射ビームは試料内の又は試料上の点で、回折限界照射スポットを形成するように集光され、

点は、空間解像検出装置の検出面上の回折像内に回折限界 (beugungsbegrenzt) 結像され、その際に、

検出面は複数の空間チャネルを有し、複数の空間チャネルは、検出装置の空間解像度を特定し、回折像の回折構造を解像し、

検出器装置は少なくとも空間チャネルと同じ数の検出器装置を有し、

空間チャネルに入射する回折像のビームは検出素子へ導かれ、

検出装置は、各空間チャネルに受け入れられたビームを複数のスペクトルチャネルへとスペクトル分離するスペクトル分離・混合装置を有し、

各スペクトルチャネルに対して、複数の検出素子の内の複数個が、異なるスペクトルチャネルにおいて異なる空間チャネルからビームを受信するように、空間チャネルから検出素子への個別の割り当てが行われ、

点は、照射スポットの直径の半分より小さいステップ幅で、異なる走査位置に、試料に対して相対的に移動され、

検出装置で各走査位置に対する強度データが読み取られ、強度データ及びそれに割り当てられた走査位置から、試料の像が生成され、像は、前記点の結像の解像限界を超えて高められた解像度を有し、

各検出素子に対して、そこに割り当てられたスペクトルチャネル及び空間チャネルが考慮され、試料の像がマルチスペクトルに生成される。

【 0 0 2 0 】

課題はさらに、高解像度走査顕微鏡法のための顕微鏡によって解決される。この顕微鏡は、

蛍光ビームを放出するために励起可能な試料を収容するための試料空間と、

試料空間にある焦点面及び解像限界を有する光学系と、

照射ビームを導入するための入射口を有する照射装置であって、照射装置は試料空間を前記光学系を介して照射ビームで照射し、光学系が照射ビームを焦点面内の点に回折限界照射スポットを形成するように集光する、照射装置と、

回折像において、光学系によって焦点面内の点を回折限界結像させるための結像装置と、焦点面に共役な面内にある検出面を有する空間解像検出装置であって、その際、検出面は複数の空間チャネルを有し、複数の空間チャネルは、検出装置の空間解像度を特定し、回折像の回折構造を解像し、

検出装置は回折像のビームを検出するための複数の検出素子を有し、検出装置は分離・混合装置を有し、複数の空間チャネルのうちの複数個に対して、そこで導かれるビームを、それぞれ複数のスペクトルチャネルにスペクトル分離し、複数の混合チャネルに再び集め、分離・混合装置は、各混合チャネルにおいて異なる空間チャネルに由来するビームを集め、複数の混合チャネルのうちの複数個に異なるスペクトルチャネルに由来するビームも集め、各混合チャネルを複数の検出素子のうちの1つへと導く、空間分解検出装置と、点を、照射スポットの直径の半分より小さいステップ幅で、異なる走査位置に移動させるための走査装置と、

検出素子からの強度データ及びそれに割り当てられた走査位置を評価し、強度データ及びそこに割り当てられた走査位置から試料の像を生成するための評価装置であって、像は光学系の解像限界を超えて高められた解像度を有し、評価装置は、各検出素子に対して、そ

10

20

30

40

50

ここに導かれるビームのスペクトルチャネル及び空間チャネルを考慮し、試料の像をマルチスペクトルに生成する、評価装置と、
を備える。

【 0 0 2 1 】

とりわけ、高解像度走査顕微鏡法のための顕微鏡には、次のものが設けられている。
蛍光ビームを放出するために励起可能である試料を収容するための試料空間と、
試料空間にある焦点面及び解像限界を有する光学系と、
照射ビームを導入するための入射口を有する照射装置であって、照射装置は試料空間を前記光学系を介して照射ビームで照射し、光学系が照射ビームを焦点面内の点に回折限界照射スポットを形成するように集光する、照射装置と、
光学系によって焦点面内の点を回折像に回折限界結像させるための結像装置と、
焦点面に共役な面内にある検出面を有する空間解像検出装置であって、その際、検出面は複数の空間チャネルを有し、複数の空間チャネルは、検出装置の空間解像度を特定し、回折像の回折構造を解像し、検出器装置は少なくとも空間チャネルと同じ数の検出器装置を有し、空間チャネルに入射する回折像のビームは検出素子へ導かれ、検出装置は、各空間チャネルに受け入れられたビームを複数のスペクトルチャネルへスペクトル分離するスペクトル分離・混合装置を有し、分離・混合装置は、検出素子のうちの複数の異なるスペクトルチャネルにおいて異なる空間チャネルからビームを受信するように、各スペクトルチャネルに対して空間チャネルから検出素子へと個別の割り当てをもたらす、空間解像検出装置と、
点を、照射スポットの直径の半分より小さいステップ幅で、異なる走査位置に移動するための走査装置と、
検出素子からの強度データ及びそれに割り当てられた走査位置を読み出し、強度データ及びそこに割り当てられた走査位置から試料の像を生成するための評価装置であって、像は光学系の解像限界を超えて高められた解像度を有し、評価装置は、各検出素子に対して、そこに導かれるビームのスペクトルチャネル及び空間チャネルを考慮し、試料の像をマルチスペクトルに生成する、評価装置と、
を備える。

【 0 0 2 2 】

E P 2 3 1 7 3 6 2 A 1 から公知であり、ここで記載されている顕微鏡及び方法の基礎ともなる原理は、検出平面内で、回折像の回折構造が解像されるように必要な大きさにされた、多数の空間チャネルにおいて、ビームを受け入れる。スペクトル解像度を達成するために、各空間チャネルのビームは固有のビーム路に導かれる。分離素子は、複数の空間チャネルのうちの複数の個のビーム (Strahlung der Mehrzahl der Ortskanäle) を、複数のスペクトルチャネルへ (in mehrere Spektralkanäle) 分離し、その後分離された複数のビームを、異なる所から、好ましくは異なる空間チャネル及び異なるスペクトルチャネルからのビームを、新たな無関係なビーム路、即ち混合チャネルへと集めて混合する。したがって、複数の混合チャネルは、同時に種々のスペクトルチャネル及び種々の空間チャネルからのビームを含む。複数の混合チャネルのそれぞれは、その混合チャネル内のビームの合計強度を測定する 1 つの検出素子へと導かれる。検出素子で受光されるビームが、どの空間チャネル及びスペクトルチャネルから組み合わせられたのか、各検出素子について既知である。この既知情報によって、評価において、結像の回折限界を上回る位置情報及び色情報を得ることができる。

【 0 0 2 3 】

混合は、複数の空間チャネルのうちの複数の個について、受け取られたビームが複数のスペクトルチャネルへスペクトル分離されることによってもたらされる。この状態において、各空間チャネルに対して複数のスペクトルチャネルがある。これらのスペクトルチャネルは、その後再び混合チャネルに集められて導かれる。その際、もちろん 1 つの空間チャネルのスペクトルチャネルが再びまとめられることはなく、異なる空間チャネルのスペクトルチャネル、及び / 又は、異なるスペクトルチャネルの空間チャネルがまとめられる。

その結果、分離・混合装置は、各スペクトルチャンネルに対して、空間チャンネルから検出素子への個別の割り当てをもたらす。複数の、特に全ての検出素子は、異なるスペクトルチャンネルで、異なる空間チャンネルからのビームを受信する。

【0024】

この、スペクトル情報及び空間情報の混合又は再分配は、物理的には点像分布関数 (PSF) の操作として理解されることができる。例えば冒頭で述べたようなエアリーディスクの形態では点像分布関数が結像又は光学系によって回折制限されているので、点像分布関数は検出面上に存在する。この点像分布関数は、ビーム感受性検出素子への伝達の際に、スペクトル情報及び空間チャンネルの再分配によって操作され、その結果、色情報および位置情報がビーム感受性検出要素上で混合され、それらが検出面 / ピンホール面内とは異なるように分布される。分解 (Entmischung) 及び再構成は、その後も問題なく可能である。なぜなら、走査位置が離間しているステップ幅が小さいことに起因して、点状エミッタの各回折像が試料内で複数回、検出面上の異なる位置に結像され、それによって再分配により操作された点像分布関数が求められるからである。

【0025】

スペクトル分離の品質は、像情報の取得、即ちデータ技術的分離の際のエラーによってではなく、スペクトル分離・混合におけるスペクトル分割の品質によって支配される。混合は、例えば、検出器平面、即ち検出面がある平面のファイバケーブルによって生じ、それにより空間チャンネルの複数のビーム路は、ほとんどクロストークなしで並列化され、任意に (belibig) 再分配されることができる。その後、スペクトル分離、即ち個々の空間チャンネルに対する色分割 (chromatische Aufspaltung) が行われる。

【0026】

理想的には、空間チャンネルのスペクトルチャンネルは、混合チャンネル内でまとめられるスペクトルチャンネルについての有効な点像分布関数が可能な限り最大に異なるように再び集められ混合される。このようにして、空間情報及び色情報 (分解) を取得するために立てられた連立方程式は、多数の線形独立方程式 (linear unabhängige Gleichungen) を含む。

【0027】

本発明によるプロセスは、空間チャンネルの数を減少させることなく、1つの検出装置で1つのスペクトル情報を取得することを可能にする。空間チャンネルの数は、生成された像が光学系の空間解像度を超えてどのくらい高い密度で (wie stark) 解像されるかということに最終的に影響を及ぼす。各スペクトルチャンネルに対して専用の検出器が用いられる従来技術を使用する際は、検出素子の数が、空間チャンネルの数とスペクトルチャンネルの数との積に等しくなる。本発明については、対照的に好ましく、使用される検出素子の数がこの積より小さい。特に好ましくは、検出素子の数は、空間チャンネルの数に等しい。

【0028】

本発明の枠組みにおいて、例えば規格化のために使用され得る、例えばスペクトル参照信号又は中性参照信号 (neutrales Referenzsignal) を生成するために、1つのスペクトルチャンネル又は空間チャンネルだけからのビームで個別の検出素子に衝突することが可能である。可能な限り最大の空間解像度及びスペクトル解像度を考慮すると、各検出素子が少なくとも2つ、好ましくはすべてのスペクトルチャンネルのビームを受信することが好ましい。

【0029】

幾何学形状が検出面内において回折像を撮影するために必要な像フィールドからずれた検出器を使用できるようにするために、従来技術において知られている方法は、光ファイバ束の形態の再分配素子を備え、入射ファセットが束の入射面内にあり、検出面を形成する。従って、光ファイバの入射ファセットは空間チャンネルを特定する。この周知の概念の発展において、スペクトル分離・混合装置は光ファイバの下流に配置され、個別の分離素子を備え、各空間チャンネルに各光ファイバが割当られ、各光ファイバは、そこで導かれる各空間チャンネルのビームを個別の分離素子に伝送し、個別の分離素子はこの空間チャンネル

のビームをスペクトルチャンネルに分離する。その後、自由ビーム光学系としてのビームは、検出素子を有する検出器上に伝送されることができ、検出素子が配置される幾何学形状、及び、個別分離素子が配置される幾何学形状は相互に適合するように調整される。例えば、検出器ラインが検出器として用いられる場合、個別分割素子もライン形状に整列される。あるいは、個別分離素子の後にビームを再び光ファイバに入射結合 (einzukoppeln) させ、各光ファイバを検出素子へと導くことも可能である。

【 0 0 3 0 】

回折ディスク (Beugungsscheibchen) は、円形状の絞りにおける光学ビームの回折の際に生じる。減少するビーム強度のリングによって取り囲まれた、中心最大、回折ディスクが現れる。幾何光学の法則に従って完璧な顕微鏡で、すなわち収差がなかったとしても、1 点を 1 点に正確に結像することはできず、絞りでの光の回折によって、ぼけたスポット状に結像するだけである。これは回折限界結像と呼ばれる。同じことが、点の回折限界照射の場合にもあてはまる。2 点は古典的ビーム光学において、回折像内の結像の最大が少なくとも回折ディスクの半径 r だけ互いに離れている場合、所謂レイリー基準 (Rayleigh-Kriterium) に従って分離される。スポットの形状は、アパーチャの形状に相反して依存しており、特に、そのサイズは、アパーチャのサイズに反比例する。回折ディスクのサイズは、第 1 種ベッセル関数の第 1 ゼロ点になり、およそ $r = 0.6098$ である。回折ディスク (すなわち中心回折スポット) は、英国の天文学者ジョージ・ビドル・エアリー (George Biddell Airy) の名をとってエアリーディスク (Airy-Scheibchen) と名づけられる。走査型顕微鏡において、照射の際にも結像の際にも、アパーチャは、光学系の円形の台によって与えられ、円形状である。回折ディスクのサイズはさらに波長に依存するため、励起のために働く回折限界照射では、ストークスシフト (stokesverschoben) の場合より、即ち長い波長の蛍光ビームの場合より小さくなる。「回折限界」という用語は、ここではアッペの理論に従った回折限界に限られるべきではなく、実際の不十分さ又は制限の理由から理論的最大の 20% だけ外れるような場合も含む。ここでも、個別の像は、回折構造と呼ばれる構造を有する。それは、オーバーサンプリングされる。

【 0 0 3 1 】

EP 2 3 1 7 3 6 2 に A 1 による再構築方法において、照射スポットのサイズよりも小さいステップ幅での走査シフトに基づいて、試料内の各個別の点に対して多数の測定があるために、立てられて解かれるべき連立方程式における過度の特定 (Überbestimmtheit) となり、従って、個別の点に対する空間表記及び強度だけでなく、スペクトル範囲の表記、即ち色も高解像度で提示される。

【 0 0 3 2 】

本発明の概念は、レーザ走査顕微鏡について知られているように、並列化された形態において複数のスポットに対して同時に実行されることができ、その場合、試料上の複数のスポットは走査されてスキャンされ、複数のスポットの個別の像は検出平面内において隣り合って静止している。以下の説明は、例示的に個別の点スポットでのスキャンに集中する。しかしながら、これは限定的に解釈されるべきものではなく、説明された特徴及び原理は、複数の点スポットの平行走査及び線スポットの使用についても適用される。後者はもちろん、線の延在方向に対して横向きにのみ回折限界であり、従って、この説明のこれに関する特徴は、(線の延在方向に対して横向きの) 1 方向にのみ適用される。

【 0 0 3 3 】

試料の所望の領域の結像は、通常の LSM のように走査して実行される。照射及び結像又は相応の装置は、照射スポットを試料にわたって導き、同時に、試料を結像し、照射スポットと一致する点を検出器に関して再現する (wieder descannt)、共通の光学的走査装置を有するので、ズーム光学系を、照射装置と結像装置との共通部分に設けることができる。ズーム光学系は、回折像を面検出器のサイズに適応させ、さらに対物レンズの選択によって変化し得る対物レンズ瞳に、利用可能な照射ビームをエッジ損失なく完全に結合させるところができる。

【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

50

個別の像の回折構造の解像度は、さらに、試料のスキャンの間これに沿ってシフトするスポットの移動方向を求めることを可能にする。この移動方向は基本的に（例えば、走査ミラーまたは移動可能な試料ステージの）スキャナの機構から知られているが、機械的な理由により残留誤差が生じる。これらは、交差相関（Kreuzkorrelation）によって検出器アレイの個々のピクセルの信号を評価することによって除去することができる。ここで、試料内の相互に隣接する像ピクセルに関して、照射点の回折限界結像に基づいて、ある程度の量重なり合うが、それらの中心は隣接しているという事実を利用する。このような像ピクセルの信号を交差相関させることによって、走査機構の不可避の公差に起因する残りの残存誤差を低減または完全に排除することができる。

【 0 0 3 5 】

10

方法がここに記載されている限り、評価装置、例えば制御デバイスは、顕微鏡の動作において、これらの方法ステップを実施する。

【 0 0 3 6 】

上記及び下記において説明される特徴は、記載された組み合わせにおいてだけでなく、別の組み合わせ、又は単独の構成において、本発明の要旨を逸脱することなく、適用可能であることが理解されよう。

【 0 0 3 7 】

以下では、本発明の発明特定事項も開示する添付の図面に基づいて、本発明を例示的に、より詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

20

【 0 0 3 8 】

【図 1】高解像度顕微鏡法のためのレーザ走査顕微鏡を模式的に示す図である。

【図 2】図 1 に示された顕微鏡の検出素子上に異なる空間チャンネル及び異なるスペクトルチャンネルからのビームがどのように混合されるかを模式的に示す図である。

【図 3】図 1 に示された顕微鏡の検出装置の入力側における点像分布関数を模式的に示す図であり、点像分布関数は 2 色についてプロットされている。

【図 4】図 1 に示された顕微鏡の分離・混合装置の作用によって生じる点像分布関数を模式的に示す図である。

【図 5】図 1 に示される顕微鏡の分離・混合装置の実施形態を模式的に示す図である。

【図 6】図 1 に示される顕微鏡によって実施される、少なくとも 2 つのスペクトル帯を区別する高解像度走査顕微鏡法のための顕微鏡法に関するフローチャートである。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 9 】

図 1 は、試料 2 の顕微鏡法のために構成されるレーザ走査顕微鏡 1 を模式的に示す図である。レーザ走査顕微鏡（以下 L S M と省略する）1 は、制御デバイス C によって制御され、照射ビーム路 3 及び結像ビーム路 4 を備える。照射ビーム路は試料 2 内のスポットを照射し、結像ビーム路 4 は検出のためにそのスポットを回折限界結像する。照射ビーム路 3 及び結像ビーム路 4 は、光学系を共有する。

【 0 0 4 0 】

試料 2 の照射は、L S M 1 において、供給されるレーザビーム 5 によって、行われ、レーザビーム 5 は、機能的にはもはや必要でない偏向ミラー 6 及びレンズ 7 を介してミラー 8 に結合される。ミラー 8 は、レーザビーム 5 を、反射角をもって入力結合素子、例えば放射フィルタ 9、に入射させる。見やすくするために、レーザビーム 5 についてはその主軸のみが描かれている。

40

【 0 0 4 1 】

レーザビーム 5 は、放射フィルタ 9 で反射した後、スキャナ 10 によって 2 軸に偏向され、レンズ 11 及び 12 によって対物レンズ 13 を介して回折限界照射スポット 14 として試料 2 内の焦点面 29 に集光される。照射スポット 14 は、図 1 の構成では点状であるが、線状の照射スポットも可能である。照射スポット 14 の位置（例えば点）で励起される蛍光ビームは、焦点面 29 から、対物レンズ 13、レンズ 11 及び 12 を介して再びス

50

キャナ 10 まで導かれ、その後結像方向において再び静止光ビームとなる。このビームは放射フィルタ 9 を通過する。放射フィルタ 9 は、照射スポット 14 における蛍光ビームをその波長状態について選択し、レーザビーム 5 の、例えば励起光として作用し得る、照射ビームを阻止するという機能を付加的に有する。付加的に、照射ビームを阻止するために任意の放射フィルタ 15 が設けられている。レンズ 16 は、照射スポット 14 の位置全体が、検出平面 18 内にある回折限界回折像 17 内に結像されるようにする。検出平面 18 は焦点面 29 に対する共役平面であり、試料 2 内の照射スポット 14 はその中に位置する。

【 0 0 4 2 】

照射スポット 14 の回折像 17 は、検出装置 19 の検出平面 18 において記録される (aufgenommen)。それは、検出平面 18 内においてスポット 14 の回折限界像 17 を空間的に解像し、ピンホール面におけるオーバーサンプリングをもたらす。

【 0 0 4 3 】

制御デバイス C は、LSM のすべての部品、特にスキャナ 10 及び検出装置 19 を制御する。制御デバイスは、後述されるように、異なる走査設定に対して各個別像 17 のデータを記録し、その回折構造を分析し、試料 2 の高解像度全体像を生成する。

【 0 0 4 4 】

図 1 の LSM 1 は、例示的に、試料上でスキャンされる単一の照射スポット 14 を示すものである。同時に、例えば、図 1 の紙面に対して垂直に延在する線状照射スポットによるスキャンのためにも適用されることができる。図 1 の LSM 1 を、複数の相互に隣接する点状照射スポットが試料内でスキャンするように実施することもできる。それらの対応する回折像 17 は、従って検出平面 18 内においても同様に相互に隣接して存在する。検出装置 19 は、その後、相互に隣接する照射像 17 を検出平面 18 内で検出するために、相応に制御される。

【 0 0 4 5 】

検出装置 19 は、分離・混合装置 30 を介入させることで検出アレイ 24 を提供する光ファイバ束 20 を備える。光ファイバ束 20 は、個別光ファイバ 21 から構成される。光ファイバ 21 の入射ファセット 26 は、検出平面 18 にある光ファイバ束の入射端を形成する。光ファイバ 21 の入射ファセット 26 は、従って、空間チャンネル又は画素の入射端を構成し、それによって、照射スポット 14 の回折像 17 は受け取られる (aufgenommen)。

【 0 0 4 6 】

図 1 の実施形態の照射スポット 14 は、例示的に点状スポットとして示されているので、回折像 17 はエアリーディスクであり、その範囲は図 1 において検出平面 18 を示す円の中にある。図 1 がこの点に関する簡略化を含む点に留意されたい。光ファイバ束の入射端の範囲は、回折像 17 の範囲を覆うほど大きい。

【 0 0 4 7 】

光ファイバ束 20 内の個別の光ファイバ 21 は、その出射端で分離・混合装置 30 に接続されており、その実施形態が図 5 に示されている。そこから、複数の光ファイバ 28 を有するさらなる光ファイバ束 27 が、例えば長手方向に延在するプラグ 23 へとつながる。プラグ 23 内において複数の光ファイバ 28 の出射側端部が相互に隣接して置かれる。プラグ 23 は、検出器ライン 24 の幾何学的配列に適合するように形成されており、即ち、光ファイバ 28 の各出射側端部は、検出器ライン 24 の検出素子 24 のすぐ前に置かれる。

【 0 0 4 8 】

検出装置 19 の実施例は、分離・混合装置 30 の接続及び結束について、例示的である、ということに留意すべきである。原則として顕微鏡 1 に対しては、1 つの検出装置 19 で十分であり、検出装置 19 は、検出平面 18 において回折像 17 のオーバーサンプリングを行い、そのようにして得られる空間チャンネルを分離・混合装置 30 を介して検出素子 25 まで導く。特に、ここでは、検出素子によって実現されるピクセルを有する矩形の検

10

20

30

40

50

出面であることもできる。

【 0 0 4 9 】

分離・混合装置 3 0 が無ければ、関連する共役検出平面 1 8 内の、焦点面 2 9 内の照射スポット 1 4 によって照射された点の回折限界結像において、回折像 1 7 が生じるはずであり、回折像 1 7 は対物レンズ 1 3 の円形状のアパーチャに基づく回折ディスクである。かかる回折ディスクの発生は、一般的には明細書において既に述べられた。E P 2 3 1 7 3 6 2 A 1 に記載されているような顕微鏡法技術において、回折像 1 7 のオーバーサンプリングによってその構造が分析され、照射スポット 1 4 の最小寸法に対して小さいステップ幅を有する走査位置との関係において、回折限界結像の解像度を越えた構造解明が行われる。

10

【 0 0 5 0 】

この原理を説明するために、焦点面 2 9 内で、回折限界解像度では捕捉できないほど互いに近接した 2 つの点が検討され得る。(この仮定実験において円形である)照射スポットの直径に対して小さいステップ幅での照射スポット 1 4 の走査において、まず両位置のうちの 1 つが照射スポットにあるとする。回折像 1 7 内のビーム強度は、この第 1 位置が照射スポット 1 4 の中へ移行するにつれて増加する。照射スポット 1 4 は、回折限界特性に起因して、中心に向かって増加する強度を有する。従って、回折像 1 4 におけるビームの強度は、検討される第 1 の位置が照射スポットの中心にますます移動するにつれて増大する。照射スポット 1 4 の中心が検討される位置を超えて移動すると (über die betrachtete Stelle hinweggewandert

20

ist)、この第 1 位置からのビームの強度は再び減少する。概念的に仮定された第 2 点が隣接していなかったとすると、ビーム強度は回折像 1 7 内において、減衰するであろう。ここで、回折像 1 7 内におけるビーム強度の増加及び減少は、(ステップ幅及び第 1 位置の蛍光感度を考慮して)まさに照射スポット 1 4 の照射強度の経過と相関する。しかしながら、近接した第 2 位置が存在するので、この第 2 位置は蛍光パターンを回折パターン 1 7 に付与し始め、照射スポット 1 4 の中心により近づくほど多くなる。さもなければ、第 2 位置に対しては、第 1 位置に対してともちろん正確に同じことがあてはまる。結果において、唯一の蛍光放射位置だけがあったとしたら、スリット位置に対して、回折像 1 7 内の異なる照射強度が得られる。面検出器 1 9 のデータの評価、及び実際の走査位置の考慮によって、2 つの位置が焦点面 2 9 内で蛍光放射するか、どの距離にあるかも、これらの 2 つの位置が回折限界結像でそれだけでは識別可能でないにも関わらず、数学的に求められる。当業者に技術的に公知の変換において、面検出器 1 9 のデータ評価のために各走査位置について、特に焦点面 2 9 内における強度、位置の間隔などの複数の未知数を含む 1 つの方程式が立てられる。走査位置が多数あることにより、重畳して決定され (ueberbestimmt)、蛍光放射する位置のビーム強度及び距離を、即ち、従って位置を求められるようにする連立方程式が得られる。これは、さらに後述される。

30

【 0 0 5 1 】

分離・混合装置 3 0 は、検出平面 1 8 内にある点像分布関数の操作をもたらす。ビームプロファイルは、空間チャンネルごとに、即ち画素ごとに再分類される。この再分類をより容易に理解できるようにするために、簡単な例として 2 色スペクトル情報が、即ち 2 つのスペクトルチャンネルの適用が、1 0 の空間チャンネルの場合において考察されうる。空間チャンネルは、アラビア数字 1 ~ 1 0 で表示される。1 0 の空間チャンネルは、説明のために I ~ X で番号付けられた 1 0 の検出素子 2 5 に対応する。同様に、光ファイバ束 2 0 は、総数 1 0 の入射ファセット 2 6 を有し、従って、1 0 の空間チャンネルが分離・混合装置 3 0 に導かれる。分離・混合装置 3 0 は、これらの空間チャンネルのうちのそれぞれを、例えば 1 つの赤色スペクトルチャンネル R 及び 1 つの緑色スペクトルチャンネル G の、2 つのスペクトルチャンネルに分離する。分離・混合装置 3 0 は、その後、2 つの異なる空間チャンネルからの 2 つの異なるスペクトルチャンネルを、常にペアで一緒に混合し、従って 1 0 の混合チャンネルを形成する。これらは、検出素子 2 5 へ導かれる。図 2 は、その場合に得られる状態を模式的に示す。ここでは、番号 I . . . X を有する 1 0 の検出素子 2 5 が、模式的に

40

50

ブロックとして示されており、そこに、異なる空間チャンネルからのスペクトルチャンネル R 及びスペクトルチャンネル G がそれぞれまとめられる。検出器ライン 25 の下側に番号 1 ~ 10 の空間チャンネルが設けられ、そこからスペクトルチャンネル G のビームが出る。空間チャンネルの対応する番号 1 ~ 10 は、検出器ライン 24 を介して、スペクトルチャンネル R から出る。例えば、番号 I を有する検出素子 25 は、空間チャンネル番号 1 からの緑色スペクトルチャンネル G 及び空間チャンネル番号 6 からの赤色スペクトルチャンネル R を含む。

【0052】

図 3 及び 4 は、この空間チャンネルによる再分類の効果を示す。図 3 は、検出平面 18 における点像分布関数を示し、番号 1 ~ 10 の空間チャンネルにわたって線形の断面として簡略化されている。点像分布関数 32a は赤色スペクトルチャンネル R に、点像分布関数 32b は緑色スペクトルチャンネル G にあてはまる。これらの点像分布関数に対する分離・混合装置の作用は、図 4 で見るることができる。赤色スペクトルチャンネル R についての点像分布関数は、緑色スペクトルチャンネル G と全く異なっている。

【0053】

検出面 18 にわたる走査プロセスの間、例えば照射スポットが移動すると、緑色の色チャンネル G 内で蛍光放射する物点から、赤色の色チャンネル R において蛍光放射する物点に対して顕著に、番号 I ~ X を有する個別の検出素子 25 での強度が増加又は減少する順序が変わる。赤色の色チャンネル R の場合に、例えば、まず番号 I ~ III を有する検出素子 25 が高いビーム強度を示し、その後他の検出素子 25 が続いたとすると、他方で緑色の色チャンネル G において蛍光放射する (fluoresziert) 物点において、まず番号 IV ~ VI を有する検出素子が最初に高い強度を示すであろう。

【0054】

点像分布関数のこのドラスティックな色依存変調によって、連立方程式を立てる際の検出器ライン 25 上の色情報の単純な (einfaches) 分離が可能となる。評価装置として機能する制御デバイス C には、分離・混合装置 30 が分離及び混合の際に行う割り当てが既知であり、従って、制御デバイス C は、像形成の際に、顕微鏡 1 の光学的解像度を超える空間解像度を有する 1 つの像だけでなく、同時にスペクトルチャンネルに関する情報もたらし。

【0055】

もちろん、2 つの色チャンネル及び 10 の空間チャンネル又は 10 の検出素子 25 を有する図 2 及び 4 を参照した説明は、単なる例示であり、かつ、本発明の原理の理解のためにだけ役立てられるべきである。色チャンネルのより大きな数及び空間チャンネルの別の数も使用されることができる。

【0056】

図 5 は、分離・混合装置 30 のための可能な実施形態を例示的に示す。分離・混合装置 30 は、光ファイバ束 20 の光ファイバ 21 が連結される入射カップラ 31 を備える。図 5 に示すように、光ファイバ 21 はすでに、再分類を行うことができ、従って所望の空間チャンネルが入射カップラ 31 において隣同士に配置される。光ファイバ束 20 は、この関係において、分離・混合装置 30 の機能的部品である。

【0057】

入射カップラ 31 から、各空間チャンネル内のビーム 32 は、例えば異なるプリズム 34 及び 35 のような、個別分離素子から成るライン 33 上に導かれる。これらのプリズムは、ここでは再び例示的に 2 つの色チャンネル R 及び G として描かれているビームを、光ファイバ 28 が接続されている出射カップラ 34 へと導く。これらが個々の検出素子 25 に至ることで、図 5 の構造となる。これは、検出器ライン 24 に代えて、一群の個々の即ち独立した検出素子 25 を用いることができることを示す。あるいは、出射カップラ 34 に代えて検出器ラインを直接設けることもできる。個々の分離素子 34、35 におけるライン 33 は、場合によっては、ビームを検出器ラインに導く後段の光学系、例えばミニレンズ光学系など、によって補われる。

【0058】

分離・混合装置 30 は、空間チャンネルからのビームを異なるスペクトルチャンネルに、ここでは R 及び G に、分離し、これらを再び混合し、従って混合チャンネルが生ずる。図 5 の図において一番下のチャンネルは、例えば、入射カップラ 31 の一番下のコネクタに接続されている空間チャンネルから生じるビーム 32 からの赤色スペクトルチャンネル R を含む。さらに、この混合チャンネルは、入射カップラ 32 においてすぐ上にあるコネクタに接続されている空間チャンネルから生じるビーム 32 からの緑色スペクトルチャンネル G を含む。光ファイバ束 30 を介した再分類 (Umsortierung) との組み合わせにおいて、分離・混合装置 30 による実質的に自由に付与可能な分離及び再分類が実現される。

【 0 0 5 9 】

連立方程式の構築の数学的分析のより正確な説明のために、導入として、まず分離・混合装置 30 が無かった場合を考慮する。O (r) は対象物を表し、E (r) は励起の点像分布関数 (P S F) を表わし、H (r) は検出の P S F を表わすと、各像点に対して信号 D (r , p) が得られる。ここで、r は照射スポットの位置 p からの距離を表す。：

【 0 0 6 0 】

【数 1】

$$D(\mathbf{r}, \mathbf{p}) = \int_{\mathbf{r}} O(\mathbf{p} - \mathbf{r}') E(\mathbf{r}') H(\mathbf{r}' + \mathbf{r}) d\mathbf{r}' \quad (1)$$

位置 p に関する D (r , p) のフーリエ変換は次のようになる：

【 0 0 6 1 】

【数 2】

$$D(\mathbf{r}, \omega) = O(\omega) FT_{\mathbf{r}} \{ E(\mathbf{r}') H(\mathbf{r}' + \mathbf{r}) \}$$

実空間の積はフーリエ空間における以下の畳込みになる：

【 0 0 6 2 】

【数 3】

$$D(\mathbf{r}, \omega) = O(\omega) \int_{\omega} E(\omega') H(\omega - \omega') e^{i(\omega - \omega') \mathbf{r}} d\omega' \quad (2)$$

位置 r においてキャリア関数を導入する：

【 0 0 6 3 】

【数 4】

$$EH(\mathbf{r}, \omega) = FT_{\mathbf{r}} \{ E(\mathbf{r}') H(\mathbf{r}' + \mathbf{r}) \}$$

式 (2) から次の式が得られる：

【 0 0 6 4 】

【数 5】

$$D(\mathbf{r}, \omega) = O(\omega) EH(\mathbf{r}, \omega) \quad (3)$$

面検出器上の異なる位置 r は、ウィーナーフィルタ (Wiener - Filter) (参

10

20

30

40

50

照 http://en.wikipedia.org/wiki/Wiener_convolution) によって結合される。

【 0 0 6 5 】

【 数 6 】

$$\tilde{O}(\omega) = \frac{\sum_{\mathbf{r}} D(\mathbf{r}, \omega) E H^*(\mathbf{r}, \omega)}{\langle |n(\omega)|^2 \rangle / \langle |O(\omega)|^2 \rangle + \sum_{\mathbf{r}} |E H(\mathbf{r}, \omega)|^2},$$

(4)

10

ここで、

【 0 0 6 6 】

【 数 7 】

$$\langle |O(\omega)|^2 \rangle$$

及び

【 0 0 6 7 】

【 数 8 】

20

$$\langle |n(\omega)|^2 \rangle$$

は、信号 (" O ") 及び雑音 (n) の対応のスペクトルパワー密度である。

【 0 0 6 8 】

エアリー走査顕微鏡での再結合の式 (2) は、一色に対して成り立つ (以下では、用語「色」は、「スペクトルチャンネル」という、より簡単な表現が適用される) 。複数の色が各位置において混合され、重みづけ関数は、分離・混合装置 3 0 によって個別のスペクトルチャンネル及び空間チャンネルを混合チャンネル内でまとめるという役割を果たす。そうすると次の式が得られる。 :

30

【 0 0 6 9 】

【 数 9 】

$$D(\mathbf{r}, \omega) = \sum_c O_c(\omega) E H_c(\mathbf{r}, \omega) + b B(\omega).$$

(5)

ここで、b はオフセットであり、B () はオフセットスペクトルである。 :

40

【 0 0 7 0 】

【 数 1 0 】

$$B(\omega) = \begin{cases} 1, & \omega = 0 \\ 0, & \omega \neq 0 \end{cases}.$$

(6)

オフセットは、追加色

【 0 0 7 1 】

50

【数 1 1】

$$O_{c+1}(\omega) = b$$

とみなすことができ、その重みは

【0 0 7 2】

【数 1 2】

$$EH_{c+1}(\mathbf{r}, \omega) = B(\omega)$$

10

である。したがって、式 (5) は、以下の形に書きかえられることができる。 :

【0 0 7 3】

【数 1 3】

$$D(\mathbf{r}, \omega) = \sum_{\hat{c}} O_{\hat{c}}(\omega) EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega).$$

(7)

各周波数

【0 0 7 4】

【数 1 4】

20

$$EH_{c+1}(\mathbf{r}, \omega) = B(\omega)$$

について、色は直線回帰によって分離され得る。 :

【0 0 7 5】

【数 1 5】

$$\sum_{\mathbf{r}} \left| D(\mathbf{r}, \omega) - \sum_{\hat{c}} O_{\hat{c}}(\omega) EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega) \right|^2 = \min.$$

30

(8)

値

【0 0 7 6】

【数 1 6】

$$O_x(\omega)$$

を考慮した式 (8) の最小化は、各周波数

【0 0 7 7】

【数 1 7】

40

$$EH_{c+1}(\mathbf{r}, \omega) = B(\omega):$$

について線形方程式の系へとつながる。 :

【0 0 7 8】

【数 1 8】

$$\sum_{\mathbf{r}} D(\mathbf{r}, \omega) EH_x^*(\mathbf{r}, \omega) = \sum_{\hat{c}} O_{\hat{c}}(\omega) \left\{ \sum_{\mathbf{r}} EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega) EH_x^*(\mathbf{r}, \omega) \right\}. \quad (9)$$

オフセットを書き出すと以下の式が得られる。：

【0 0 7 9】

【数 1 9】

10

$$\left\{ \begin{array}{l} \sum_{\mathbf{r}} D(\mathbf{r}, \omega) EH_x^*(\mathbf{r}, \omega) = \sum_{\hat{c}} O_{\hat{c}}(\omega) \left\{ \sum_{\mathbf{r}} EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega) EH_x^*(\mathbf{r}, \omega) \right\} + B \sum_{\mathbf{r}} EH_x^*(\mathbf{r}, 0) \\ \sum_{\mathbf{r}} D(\mathbf{r}, 0) = \sum_{\hat{c}} O_{\hat{c}}(0) \sum_{\mathbf{r}} EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, 0) + B, \end{array} \right. \quad (10)$$

ここで、 \times はすべての解像されるべき色を通り、行列で次のように記載される。：

【0 0 8 0】

【数 2 0】

20

$$[D(\mathbf{r}, \omega)]_{\mathbf{r}} [EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega)]_{\hat{c}, \mathbf{r}}^* = [O_{\hat{c}}(\omega)]_{\hat{c}} [X(\omega)]_{\hat{c}, \hat{c}}. \quad (11)$$

ここで、

【0 0 8 1】

【数 2 1】

$$[X(\omega)]_{\hat{c}, \hat{c}} = ([EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega)]_{\hat{c}, \mathbf{r}} [EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega)]_{\hat{c}, \mathbf{r}}^*)$$

30

である。

【0 0 8 2】

【数 2 2】

$$[O_{\hat{c}}(\omega)]_{\hat{c}}$$

に対する解は、次のように導かれる。：

【0 0 8 3】

【数 2 3】

40

$$[O_{\hat{c}}(\omega)]_{\hat{c}} = [D(\mathbf{r}, \omega)]_{\mathbf{r}} [EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega)]_{\hat{c}, \mathbf{r}}^* [X(\omega)]_{\hat{c}, \hat{c}}^{-1} A(\omega). \quad (12)$$

ここで、 $A(\quad)$ はアポディゼーションフィルタ (Apodisationsfilter) であり、例えば：

【0 0 8 4】

【数 2 4】

$$A(\omega) = \frac{\det([EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega)]_{\hat{c}, \mathbf{r}} [EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega)]_{\hat{c}, \mathbf{r}}^*)}{\det([EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega)]_{\hat{c}, \mathbf{r}} [EH_{\hat{c}}(\mathbf{r}, \omega)]_{\hat{c}, \mathbf{r}}^*) + w(\omega)} \quad (13)$$

である。1 色しかなければ、式 (4) と同様に、次のようになる。:

【0 0 8 5】

【数 2 5】

10

$$O(\omega) = \frac{[D(\mathbf{r}, \omega)]_{\mathbf{r}} [EH(\mathbf{r}, \omega)]_{\mathbf{r}}^*}{([EH(\mathbf{r}, \omega)]_{\mathbf{r}} [EH(\mathbf{r}, \omega)]_{\mathbf{r}}^*) + w(\omega)} \quad (14)$$

色解像能力は、行列

【0 0 8 6】

【数 2 6】

$$[X(\omega)]_{\hat{c}, \hat{c}}$$

によって定義される。雑音の影響を受けていないデータの場合、色解像度のための行列の行 / 列

20

【0 0 8 7】

【数 2 7】

$$[X(\omega)]_{\hat{c}, \hat{c}}$$

は、色を分解するために線形独立でなければならない。これは、異なる色のための点像分布関数の間に差異がある場合、すでに満たされる。2 色の実施例については、すでに図 3 及び 4 を参照して説明された。この場合、解像されるべき色の数はステップ位置の数 r より 1 つ小さい。

30

【0 0 8 8】

雑音の影響を受けているデータの場合、解法のロバスト性 (die Robustheit der Losbarkeit) は行列

【0 0 8 9】

【数 2 8】

$$[X(\omega)]_{\hat{c}, \hat{c}}$$

の条件数 (Konditionszahl) によって決定される。一般に、行列 S の条件数は、

【0 0 9 0】

【数 2 9】

40

$$\kappa(S) = \|S\| \|S^{-1}\|$$

として定義される。ここで

【0 0 9 1】

【数 3 0】

$$\|\cdot\|$$

は、マトリックスの規格を表す。条件数がより大きいほど、入力データにおけるエラーに

50

関する解はより少なくなる。即ち、雑音に関して堅牢 (belastbar) である。ノイズフリーデータのために、有限条件数、即ち無限よりも小さい任意の大きさの値は、色解像のためにすでに十分である。しかしながら、実際には雑音の影響を受けている測定値があるので、そのため行列

【 0 0 9 2 】

【 数 3 1 】

$$[X(\omega)]_{\hat{k}, \hat{\epsilon}}$$

は、可能な限り少ない条件数を有するように設計される。これを達成するために、個別の点像分布関数によって分離及び混合に起因して生ずる、異なる色の寄与分の差異は、各検出位置において、可能な限り大きくなければならない。図 4 の実施例において、これは、点像分布関数の近似直交構造 (annähernd orthogonale Gestaltung) によって達成される。

10

【 0 0 9 3 】

より一般的規則として、割当関数が各色に与えられ、この割当関数は点像分布関数 r 内における検出位置を検出素子 25 の、

【 0 0 9 4 】

【 数 3 2 】

$$n: n = M_c(r)$$

20

によって与えられるべき番号と結びつける。ここで、検出素子の幾何学的形状は、重要ではなく、特に、上述のライン形状の検出素子も可能である。そうすると、

【 0 0 9 5 】

【 数 3 3 】

$$D(n, \omega) = \sum_c O_c(\omega) E H_c(M_c^{-1}(n), \omega) + b B(\omega).$$

(15)

30

が混合チャネルの信号として検出素子 n 上に現れる。ここで、割当関数はまだ特定されていない。割当関数

【 0 0 9 6 】

【 数 3 4 】

$$M_c(r)$$

又はその式 (15) 内に見られる形

【 0 0 9 7 】

【 数 3 5 】

$$M_c^{-1}(n)$$

40

を選出するために、行列

【 0 0 9 8 】

【 数 3 6 】

$$[X(\omega)]_{\hat{k}, \hat{\epsilon}}$$

の条件数が可能な限り少なくなるように、選択される。

これは、割当関数

【 0 0 9 9 】

50

【数 3 7】

$$M_{c_i}^{-1}(n), i=1, \dots$$

に関して、すべての検出素子 n にわたって、かつ、すべての周波数 ω にわたって、異なる色の寄与分の差が最大になる場合に、達成される。これは、以下の方程式になる。：

【0 1 0 0】

【数 3 8】

$$\max_{M_{c_i}^{-1}(n), i=1, \dots} \sum_n \sum_{\omega} \sum_{\substack{c_i, c_j \\ c_i \neq c_j}} |EH_{c_i}(M_{c_i}^{-1}(n), \omega) - EH_{c_j}(M_{c_j}^{-1}(n), \omega)|.$$

10

(16)

この式に基づいて、割当関数、即ち分離・混合装置 30 の作用を容易に特定することができる。例えば、図 5 の構造で、個々の光ファイバ 21 の交換、即ち、入射プラグ 31 における割当並びに個別分離素子 33 の作用は、式 (16) が最大化されるように選択される。

【0 1 0 1】

20

式 (16) によって与えられる尺度 (Mass) は、割当の選択に対する可能性のある 1 つの条件 (eine moegliche Bedingung) である。他の、代替的な割当基準は、同様に適切である。例えば、周波数 ω にわたる積分の代わりに、色分離が他の周波数帯に比べて高感度であるべき所定の周波数帯を定めることもできる。最終的に式 (16) 又は代替的方法是、分離・混合装置がスペクトル分離された空間チャンネルを混合チャンネルにどのようにまとめ、分離がどのように行われるべきか、当業者によって組み換えられるべき、明確な割当規則を提供する。

【0 1 0 2】

図 6 は、例えば図 1 の顕微鏡によって実行されることができ、顕微鏡方法についてのフローチャートを例示的に示す。ステップ S1 において、上述の E P 2 3 1 7 3 6 2 A 1 から当業者に既に知られているように、従来のエアリー走査顕微鏡法が実施される。すなわち、試料上の点は、回折限界照射され、焦点面に共役な平面上の走査位置の多数において回折限界結像される。

30

【0 1 0 3】

ステップ S2 において、回折像は、異なる空間チャンネルに分解される。このステップ S2 は、ピクセル化 (Pixelierung) として理解することもできる。従って、各空間チャンネルに対して固有のビーム路が生ずる。

【0 1 0 4】

ステップ S3 において、空間チャンネルのこれらの個別のビーム路は色分割され、分割の数は、スペクトルチャンネルの所望の数を決定する。

40

【0 1 0 5】

ステップ S4 において、スペクトルチャンネルは、予め定められた方法で再び混合チャンネルへと導かれ、まとめられる。

この混合プロセスを選択するための基準は、上記のとおり、式 (16) の導出に基づいて説明された。

【0 1 0 6】

その後、ステップ S5 において、混合チャンネルからのビームの検出、及び高解像度マルチスペクトル像の生成のための信号評価が行われる。

【0 1 0 7】

先に示された概念について、以下の変形又は発展が可能である：

50

【 0 1 0 8 】

ここまで、2つの色チャンネルR、Gだけがある場合を述べてきたが、これは純粹に例示的なものに過ぎない。当然に、より大きな数の色チャンネルが同様に適用され得る。

【 0 1 0 9 】

ステップS2における空間チャンネルへの分割、ステップS3における色分割、及びステップS4における所定の混合は、組み合わせてまとめられることもできるし、部分的に別の順序で行われることもできる。図5に基づいて、空間チャンネルの再分類が、光ファイバ束20の相応の構成によって、及びその、分離・混合装置30への割当によって、既にステップS4の所定の混合の一部であり得ることが述べられた。重要なことは、空間チャンネルに依存してビーム路が形成され、色分解され、かつ異なるように再び混合されることである。この混合プロセスは、図5の実施態様において、光ファイバ束20の協働により既に準備される。しかしながら、これは任意である。例えば、スペクトル分離後、例えばファイバ結合器の使用により、異なるスペクトルチャンネルを所望の混合に導きまとめる、さらなる光ファイバ束を連結することも可能である。

10

【 0 1 1 0 】

焦点面29に共役な平面におけるファイバカップラの使用は、空間チャンネルをクロストーク・フリーで並列化(parallelisieren)できるようにする。まず、空間チャンネルが形成され、その後スペクトル分離・混合が実行されるべきであり、そのために、大きい多数のスペクトルチャンネル(eine grose Vielzahl von Spektralkanaelen)への分離をより容易にするという利点を有する。スペクトル分離及び空間チャンネルの形成の順序、即ち、ステップS3及びS2の順序を入れ替えることもできる。そこで、ビームは色チャンネル29に共役な平面の前に、色スプリッタを介して多数のスペクトル帯に分解される。これらは、マイクロレンズによってファイバ束内に結像され、空間的に新たに混合される。

20

【 0 1 1 1 】

上記では、全ての空間チャンネル、即ち回折像17の主なビームが、スペクトル分離・混合のプロセスに組み込まれた実施形態が述べられた。しかしながら、分離・混合装置30を全く介さないことにより、又は、分離・混合装置30が1つ若しくは複数の空間チャンネルのスペクトル情報を再び1つの混合チャンネルにまとめることにより、個別の又は複数の空間チャンネルが変更されずにそのままにされることも可能である。このことは、例えば強度参照を実行するために有利である。

30

【 0 1 1 2 】

上記では、各混合チャンネルが異なるスペクトルチャンネルのビームを含むことがさらに述べられた。これは分離に関して有利であり、各混合チャンネルが異なるスペクトルチャンネルからのビームしか含まない場合に、特に好適である。しかしながら、個別の混合チャンネルに、異なる空間チャンネルに由来するビームを有する複数の同じスペクトルチャンネルがまとめられる場合も、参照又は信号の規格化のために有利であり得る。

【 0 1 1 3 】

高解像度像が生成される既述の運転モードに加えて、顕微鏡1は、高解像度像を生成せず、最終的にスペクトルだけを生成する方法でも運転することができる。このために、走査位置に対して、検出素子25の強度が読み取られ、各検出素子25に割り当てられたスペクトルチャンネルを考慮して試料のスペクトルが得られる。

40

【図 1】

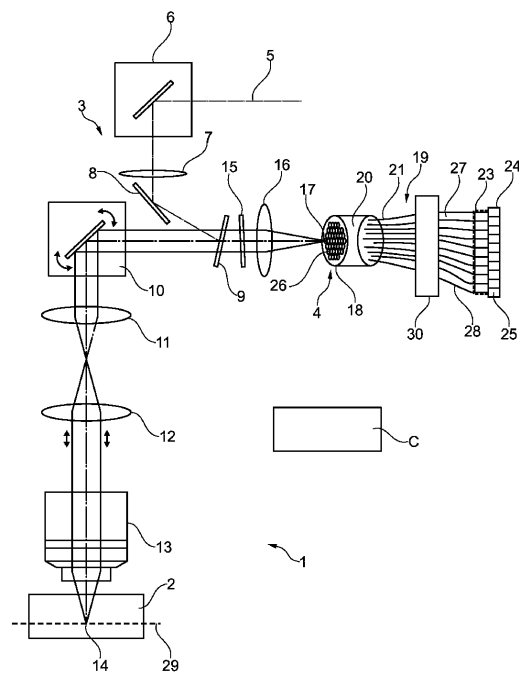


Fig. 1

【図 2】

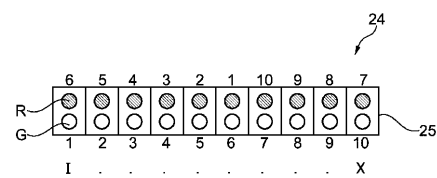


Fig. 2

【図 3】

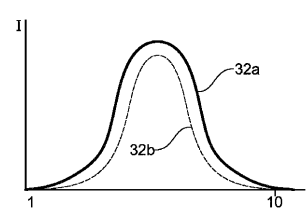


Fig. 3

【図 4】

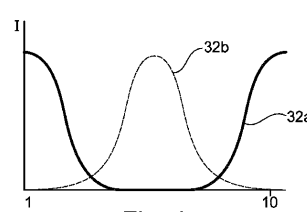


Fig. 4

【図 5】

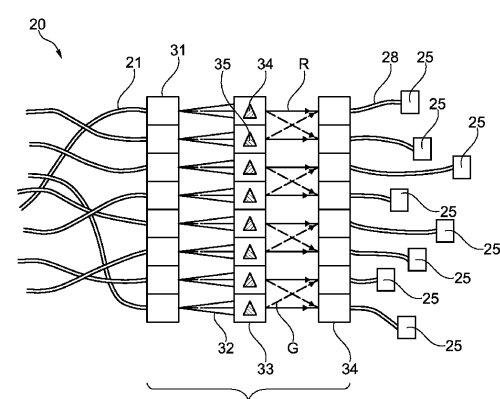


Fig. 5

【図 6】

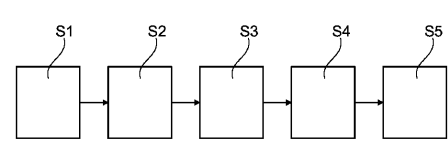


Fig. 6

フロントページの続き

- (72)発明者 クレップ, イング
ドイツ連邦共和国 07749 イェーナ, カニンヘンヴェーク 31
- (72)発明者 ヴォレスチェンスキー, ラルフ
ドイツ連邦共和国 07743 イェーナ, リカルダ - フッフ - ヴェーク 26
- (72)発明者 ノウィカウ, ヤウヘン
ドイツ連邦共和国 07743 イェーナ, コスペダーグルント 7

審査官 岡田 弘

- (56)参考文献 特表2016-532154(JP, A)
特表2015-515018(JP, A)
特開2011-095745(JP, A)
米国特許出願公開第2015/0185454(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 19/00 - 21/00
G02B 21/06 - 21/36
G01N 21/64
G01J 3/00 - 4/04
G01J 7/00 - 9/04