(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)公開番号
特開2023-138481
(P2023-138481A)
(43)公開日　令和5年10月2日(2023.10.2)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
G01N 21/64	*(2006.01)*	G01N	21/64	E	2G043
G02B 21/00	*(2006.01)*	G02B	21/00		2H052
G06T 7/70	*(2017.01)*	G06T	7/70	A	5L096
G06V 10/141	*(2022.01)*	G06V	10/141		

審査請求　未請求　請求項の数　8　ＯＬ　外国語出願　（全16頁）

(21)出願番号　特願2023-42713(P2023-42713)
(22)出願日　令和5年3月17日(2023.3.17)
(31)優先権主張番号　63/321,152
(32)優先日　令和4年3月18日(2022.3.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71)出願人　520493902
ミルテニイ ビオテック ベー．ファー．ウント コー．カーゲー
ドイツ連邦共和国，５１４２９ ベルギッシュ グラドバッハ，フリードリッヒ―エベルト―シュトラーセ ６８
(74)代理人　230104019
弁護士　大野 聖二
(74)代理人　100119183
弁理士　松任谷 優子
(74)代理人　100149076
弁理士　梅田 慎介
(74)代理人　100173185
弁理士　森田 裕
(74)代理人　100162503

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　単一分子局在化顕微鏡法のための方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ナノスケールトポグラフィにおける点蓄積（ＰＡＩＮＴ）の技術に基づく光学超解像イメージングのための単一分子局在化顕微鏡法（ＳＭＬＭ）を提供する。
【解決手段】視野にわたる空間的および時間的に制御された照明パターンからなるパターン化照明で試料を照明し、視野を連続してモニタリングすることにより、パターン化照明を迅速に適応可能なエミッタの近似位置の識別が可能になり、この方法を「動的マスキング」と呼ぶ。動的マスキングにより、ＰＡＩＮＴのための単一エミッタのより正確で効率的な局在化のために、単一蛍光分子エミッタの近似位置に関連付けられた焦点面にわたる複数の領域の、並行した（in parallel）増強照明（enhanced illumination）が可能になる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
単一分子局在化顕微鏡法の目的で、解像限界のある対物レンズ（００５）を有する光顕微鏡を使用して、一連の生体試料の画像を形成する方法であって、
少なくとも１つの第１の光源（０２９）からの励起光により、前記対物レンズの視野内でエミッタ（００２）を並行して励起すること、
前記励起光の結果として前記エミッタから並行して放射された光を、少なくとも１つの第１の検出器（０３０）により検出して、画像を取得すること、
前記取得した画像に基づいて、前記エミッタの近似位置（０２２）を決定することと、
前記エミッタの前記近似位置に対応する領域であって、各領域（０２３）が、サブセット内の各エミッタに局在化され、かつ、各領域が、前記顕微鏡の前記解像限界に匹敵する特徴的な寸法を有する、領域を生成すること、
前記領域に基づいて、少なくとも１つの光源からの第１のパターン化照明（０２４）を適応させ、次の画像において複数のエミッタを並行して照明すること、及び
「動的マスキング」プロセス（０１３）を構成する上記のステップを連続して繰り返し、前記取得した画像の視野内の前記個々のエミッタの出現および消失に基づいて、前記パターン化照明を更新すること
を含む方法。
【請求項２】
前記エミッタの前記近似位置に対応する前記領域内に増強照明からなるパターン化照明を作り出すことをさらに含み、増強照明の前記領域が、前記視野の残りの部分よりも多くの励起光を受け取り、前記領域が、複数のエミッタを並行して照明するように配置される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記第１の光源に個々の光源のアレイを使用することと、
前記個々の光源の強度を変化させることによってパターン化照明を作り出すこと
をさらに含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
空間光変調器（ＳＬＭ、０３１）を使用して前記第１の光源からの光を変調して、前記パターン化照明を確立することをさらに含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項５】
前記エミッタから前記ＳＬＭ上への前記放射光を撮像し、次に、前記第１の検出器を使用して、その後に変調された放射光を検出することと、それにより、
前記第１の光源から前記試料上への光を変調する前記ＳＬＭの画素の同じサブセットにより、前記エミッタからの前記検出光を変調し、検出画像からの前記ＳＬＭの残りの画素による非合焦光の排斥によって、前記エミッタの共焦点検出を可能にすること
をさらに含む、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記ＳＬＭにより排斥された前記非合焦光を、前記第１の検出器および第２の検出器の表面の未使用の領域のうちの少なくとも１つの上に前記光を撮像することによって、検出することと、
前記検出された非合焦光のスケーリングされたサブトラクションによって、残存非合焦光を共焦点画像から除去すること
をさらに含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記エミッタにわたる前記パターン化照明の時間変調および空間変調のうちの少なくとも一方により、各エミッタの点拡がり関数を並行してサンプリングすることをさらに含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項８】
前記顕微鏡の前記対物レンズの後焦点面（０４０）を、中心を外れて（０４１）照明す

ることによって、前記エミッタの各々の上に光軸に対する傾斜光円錐（０３９）を作り出すことをさらに含む、請求項３または４に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ナノスケールトポグラフィにおける点蓄積（ＰＡＩＮＴ）の技術に基づく光学超解像イメージングのための単一分子局在化顕微鏡法（ＳＭＬＭ）に関する。

【背景技術】

【０００２】

ＰＡＩＮＴでは、蛍光色素分子標識プローブを含む溶液が、生体試料に塗布される。その後、ＰＡＩＮＴを用いるＳＭＬＭが、試料の一連の顕微鏡画像を記録することによって実現される。遊離プローブの濃度が十分に低い場合、プローブの一時的な結合事象は、迅速に拡散する遊離プローブから生じる、バックグラウンド上に個別の回折限界スポットとして検出することができる。ＰＡＩＮＴは、遊離プローブバックグラウンドと、焦点が大きく外れたエピトープに一時的に結合するプローブにより生成されるさらなるバックグラウンドとによって基本的に制限される。

【発明の概要】

【０００３】

本発明の目的は、現況技術の広視野顕微鏡法または共焦点顕微鏡法と比較して、より高いシグナル対バックグラウンド比および／または取得速度で、従来の方法で載置された試料内の相当な深さにおいて、ＰＡＩＮＴを使用して単一分子局在化を実現することである。

【０００４】

従来の方法で載置された試料の、ある深さにおけるＳＭＬＭが、広視野検出を使用するＰＡＩＮＴを用いて可能であるが、バックグラウンド光からの汚染を制限するために、非常に疎らな検出が必要であり、それにより取得の速度が制限される。回転円板またはプログラム可能なアレイ顕微鏡（ＰＡＭ）を使用する共焦点光学セクショニングにより、非合焦背景光を大幅に除去して、より高速な取得を可能にすることができる。しかしながら、これらの手法によるバックグラウンドの低減またはシグナルの増強のさらなる改善により、局在化のためのシグナル対バックグラウンドをさらに高くすることができ、ＰＡＩＮＴのための、従来の方法で載置された試料内のある深さにおけるより高速な取得が可能になる。

【０００５】

この改善は、視野にわたる空間的および時間的に制御された照明パターンからなるパターン化照明で試料を照明することによって実現することができる。視野を連続してモニタリングすることにより、パターン化照明を迅速に適応可能なエミッタの近似位置の識別が可能になり、この方法を「動的マスキング」と呼ぶ。動的マスキングにより、ＰＡＩＮＴのための単一エミッタのより正確で効率的な局在化のために、単一蛍光分子エミッタの近似位置に関連付けられた焦点面にわたる複数の領域の、並行した（in parallel）増強照明（enhanced illumination）が可能になる。

【０００６】

パターン化照明は、視野にわたる高い空間分解能を必要とするため、現在の現況技術の解決策は、パターン化照明を生成するための空間光変調器（ＳＬＭ）に相当する。

【０００７】

加えて、ＳＬＭが共役像面の励起経路および放射経路の両方に位置する場合、領域に対応する画素が共焦点ピンホール（回転円板共焦点に類似）として機能することができるため、共焦点セクショニングを実現することができ、シグナル対バックグラウンド比をさらに増加させる。

【０００８】

さらに、これらの領域の外側からの放射光が集められて、別の非共役像を生成する場合

、共役像からの適切にスケーリングされた非共役像のサブトラクションを使用して、ノイズ制限に合わせて非合焦バックグラウンドを除去し（ＰＡＭに類似）、シグナル対バックグラウンド比をさらに増加させることができる。

【０００９】

例えば、エミッタのエアリ円板を動的にサンプリングして、追加の局在化情報を生成することにより、増強照明の領域を、重心推定を超える他の局在化モダリティについて、さらに最適化することができ、それにより、全体的な精度が向上する。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】異なる量の軸方向セクショニングに基づくＳＭＬＭの一般的な構成を示す図である。

【図２】軸方向セクショニング、動的マスキング、および共役像からの非共役像のサブトラクションによる、ノイズ制限に合わせたバックグラウンドの低減を可能にする、ＰＡＭにより可能なシグナル対バックグラウンドの増加を示す図である。

【図３】動的マスキングプロセスの概略図である。

【図４】その後に取得した画像、エミッタ位置の決定、ならびにエミッタの出現および消失により変化する、照射される照明パターンを示すことにより、動的マスキングプロセスを示す図である。

【図５】広視野顕微鏡法およびＴＩＲＦ顕微鏡法の一般的な単一分子局在化画像と、所与の画像からの増強照明の領域の構成とを示す図である。

【図６】広視野顕微鏡の励起経路にあるＳＬＭ（０３１）に基づく、動的マスキングのための装置を示す図である。

【図７】ＳＬＭ（０３１）が蛍光顕微鏡の励起経路および検出経路の両方に位置することにより共焦点顕微鏡を作り出す、動的マスキングのための装置を示す図である。

【図８】ＳＬＭ（０３１）が蛍光顕微鏡の励起経路および検出経路の両方に位置することにより共焦点顕微鏡を作り出し、加えて、非合焦光が単に捨てられるのではなく、第２のカメラによって記録され、再構成された光学セクショニング画像から非合焦バックグラウンドをさらに良好に除去することができる、動的マスキングのための装置を示す図である。

【図９】ＳＬＭ（０３１）によって作り出された増強照明パターンとモニタリング励起光（０３２）とが別個に生成され、ビームスプリッタ／コンバイナ（０３３）を使用して励起経路で結合される、動的マスキングのための装置を示す図である。

【図１０】ホログラフィックＳＬＭが使用される、動的マスキングのための装置を示す図である。

【図１１】局所傾斜マイクロシートの概念を示す図であり、（Ａ）は対物レンズから出る傾斜光円錐、（Ｂ）は対物レンズの後焦点面の中心を外れた照明を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００１１】

本明細書において、動的パターン化照明を使用する、一時的プローブを含む対応する領域の迅速な増強励起と組み合わせた、視野にわたる蛍光プローブの動的出現のモニタリングに基づいて、ＰＡＩＮＴのためのシグナル対バックグラウンドを向上させる方法について説明する。本発明は、少なくとも、ＰＡＩＮＴに関する従来の広視野手法または共焦点手法と比較して、シグナル対バックグラウンド、したがって取得速度を数倍向上させる。

【００１２】

方法の説明において、以下の用語が使用される。

ＳＭＬＭ：単一分子局在化顕微鏡法；超解像顕微鏡法の一形態であり、個々の蛍光分子が、非常に疎らに分散されていることにより個別に撮像され、非常に高い精度および正確度の局在化を可能にする。複数のフレームにわたる多くのそのような分子のその後のイメージングは、従来の光学顕微鏡法によって可能なものよりも高い解像度を持つ画像の構築を可能にする。異なる形態のＳＭＬＭは、取得シーケンス全体の間に視野全体のサンプリ

ングを可能にしながら、各フレーム内で十分な稀薄性／分離性（sparsity/isolation）を実現する別の方法に依拠する。

ＰＡＩＮＴ：ナノスケールトポグラフィにおける点蓄積；ＳＭＬＭの一形態であり、蛍光分子エミッタの分離および密集が、エミッタを試料に一時的に化学結合することによって実現される。

ＰＡＭ：プログラム可能なアレイ顕微鏡；光学セクショニング顕微鏡法の一形態であり、プログラム可能なアレイ、すなわち空間光変調器を使用して、パターン化された光を試料上に投影することによって、光学セクショニングが実現される。

ＴＩＲＦ：全内部反射顕微鏡法；顕微鏡法の一形態であり、顕微鏡スライドの境界層の非透過エバネッセント波領域においてのみ蛍光が励起されることにより、すべての蛍光をこの小さい領域に制限する。

ＳＬＭ：空間光変調器；入射光の透過または反射の空間変調を可能にするデバイス、例えば、ＬＣＤスクリーンの液晶アレイ。

ＤＭＤ：デジタルマイクロミラーデバイス；２つの別個の方向に反射することができる小さいミラーから画素が構成される、空間光変調器デバイス。

ＬＣｏＳ：液晶オンシリコン；画素が入射光の偏光状態を２つの向きに回転させることができる空間光変調器デバイス。

ＰＳＦ：点拡がり関数；点光源に対する撮像システムの機械応答関数。

【００１３】

図面において、以下の参照番号を使用して、下記の特徴を示す。様々な図面において同様の参照番号を使用して、同様または同一の機能を果たす部品を指す。

【００１４】

００１　生体試料
００２　蛍光分子エミッタ
００３　遊離拡散蛍光分子エミッタ
００４　合焦蛍光分子エミッタ
００５　対物レンズ
００６　試料チャンバ
００７　通常容積の試料チャンバ
００８　小容積の試料チャンバ
００９　ＴＩＲＦによりキャプチャされた試料チャンバ容積
０１０　光学セクショニング顕微鏡法によりキャプチャされた試料チャンバ容積
０１１　光円錐
０１２　共焦点光学セクション
０１３　動的マスキングプロセス
０１４　エミッタ位置の決定
０１５　領域の生成
０１６　照明の制御
０１７　画像取得
０１８　パターン化照明
０１９　モニタリング照明により観察された、新しく出現したエミッタ
０２０　増強照明により撮像されたエミッタ
０２１　消失したエミッタ
０２２　エミッタの近似位置
０２３　エミッタの近似位置の周囲の領域
０２４　視野に照射されるパターン化照明
０２５　カバーガラス
０２６　主ダイクロイック
０２７　チューブレンズ
０２８　レンズ

０２９　光源
０３０　カメラ
０３１　空間光変調器（例えば、デジタルマイクロミラーデバイス）
０３２　照明ユニット
０３３　ビームコンバイナ
０３４　共役光学経路
０３５　非共役光学経路
０３６　中間像面
０３７　光活性化のための光源
０３８　ホログラフィック波面整形ＳＬＭ
０３９　局所傾斜マイクロシート
０４０　後焦点面／入射瞳
０４１　照明断面

【００１５】

図１は、ＰＡＩＮＴのための一般的なＳＭＬＭの構成を示す図であり、顕微鏡の対物レンズ（００５）と、蛍光エミッタ（００２）が一時的に結合された検査中の試料（００１）と、遊離蛍光分子エミッタ（００３）を含むバッファー容積（００７）を有する試料チャンバ（００６）を示す。バックグラウンド低減の方法は、バッファの高さ（００８）の低減、および全内部反射蛍光（ＴＩＲＦ）顕微鏡法または光シート顕微鏡法を使用した軸方向の照明の低減を含む。ＴＩＲＦ顕微鏡法では、カバースリップガラス（００９）の約１００ｎｍ以内に検出が制限される。光シート顕微鏡法では、試料深部での検出および励起光（０１０）の波長の約半分のオーダーでのセクショニングが可能であるが、２つの直交する近接並置された対物レンズからなるより複雑な光学構成の焦点に試料を配置する、非標準的で簡単ではない試料載置を必要とする。

【００１６】

試料の均一な照明により、視野全体にわたって出現する一時的な蛍光分子エミッタの認識が可能になる。しかしながら、蛍光分子エミッタを含む領域外で得られる情報がないとしても、均一な照明は、バックグラウンドの励起および退光の原因にもなる。本明細書に記載の新規な方法は、増強照明を照射して、一時的な合焦蛍光分子エミッタを含む領域のみを照明することにより、遊離拡散プローブと非合焦エピトープに結合したプローブとからなる非合焦蛍光分子エミッタの不要な励起を防ぐことからなる。

【００１７】

ＳＭＬＭのためのシグナル対バックグラウンド比の向上は、視野にわたって空間的および時間的に制御可能なパターン化照明で試料を照明可能な顕微鏡装置を使用して実現することができる。図２は、本明細書に開示された方法のための試料の照明を示す。空間的に制御されたパターン化照明は、生体試料（００１）の光学セクション（０１２）内にある合焦エミッタ（００４）のセットに焦点が合わせられる。結果として得られるパターン化照明は、対応するエミッタを中心とする光円錐（０１１）のセットからなる。このパターン化照明により、単一蛍光分子エミッタの位置に関連した焦点面にわたる複数の領域の並行した増強照明が、適応的および非常に動的な方法で可能になる。パターン化照明を、本明細書で導入された「動的マスキング」と呼ばれる方法に基づいて使用することができ、これにより、合焦蛍光分子エミッタを含まない領域がマスクされて、試料の全体的な照明を低減させ、バックグラウンドを低減させる。このようにして、ＳＭＬＭに有用な情報を含む領域が優先的に照明されるように、試料は非常に効率的な方法で照明される。結果として、個々の蛍光エミッタを含む一連の画像が、最適な単一分子局在化のために、より高いシグナル対バックグラウンドで検出されると共に、全体的な退光も最小限に抑えられる。

【００１８】

図３は、動的マスキング方法（０１３）の概略を示す。動的マスキングは、照明された視野の連続的な（またはストロボの）ビデオレートモニタリング（０１７）を使用して、

蛍光分子エミッタの位置を見つけ（０１４）、続いて、オンザフライ画像処理を行って、エミッタの近似位置の周囲の領域を迅速に生成する（０１５）。次に、領域は、照明の空間制御および時間制御（０１６）に適用されて、一時的な蛍光分子エミッタの励起を局所的に増強する増強照明の領域からなるパターン化照明（０１８）を構築し、それにより、生体試料（００１）内の単一分子局在化のための検出のシグナル対バックグラウンドを増加させる。パターン化照明は、迅速に連続して更新されて、視野全体にわたる単一分子の出現および消失の両方を考慮する。

【００１９】

図４は、動的マスキング処理ステップを詳細に示す。実験の開始時に、規定レベルの均一な照明を使用して、視野がモニタリングされる。その後の画像が解析され、現況技術の画像処理アルゴリズムを使用して、推定蛍光分子エミッタ（０１９）の近似位置（０２２）を決定する。次に、顕微鏡の解像限界によって決定されるサイズの領域（０２３）が、蛍光分子エミッタの近似位置においてパターン化照明（０２４）内に作り出され、試料の全照明を最小限に抑えながら、増強励起を可能にする。

【００２０】

分子エミッタの位置がその後に取得した画像の各々について決定されるため、検出された画像シーケンスにおけるエミッタ（０１９）の出現は、視野（０２４）にわたるパターン化照明の適応につながり、そのエミッタの位置（０２２）に対応する増強照明（０２３）の新しい領域を追加し、そのエミッタ（０２０）からの蛍光放射を増強する。一方、蛍光分子エミッタ（０２１）の消失は、増強照明の対応する領域の除去につながる。エミッタの近似位置の決定は、画像シーケンスの複数の画像を使用して、動的マスキングプロセスの応答時間を最適化し、分子点滅および検出のシグナル対ノイズを含む様々な効果を考慮することができる。したがって、動的マスキングプロセスにより決定されたパターン化照明は、非合焦局在化および遊離拡散蛍光分子エミッタから生じる上記のバックグラウンドを低減させる。加えて、試料照明の最小化は、蛍光分子エミッタの全プールの全体的な退光率を低下させる。

【００２１】

パターン化照明は、蛍光分子エミッタの近似位置の外側の連続モニタリングを使用して、または蛍光分子エミッタを含む領域上で増強照明と交互に生じる短いモニタリングスナップショットにより、一時的な蛍光分子エミッタの出現および消失を考慮して動的に更新される。

【００２２】

視野にわたるモニタリングおよびパターン化照明の更新は、一時的な結合、点滅、および／または光退色などの要因によって制限され得る蛍光プローブの視認性の時間スケールに合わせた速度で動的に行うことができる。

【００２３】

図５は、ＰＡＩＮＴを使用するＳＭＬＭ実験の一般的な例を示す。パネルＡには、ホルムアルデヒド固定血球に結合された個々のＣＤ４４ｆａｂ－Ｖｉｏ６６７（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）プローブの広視野画像を示す（連続取得からの単一の代表的なフレーム）。パネルＢには、ＴＩＲＦ顕微鏡法を使用した、同じ試料の代表的なフレームを示す。パネルＣには、単純な閾値に続いて拡張（dilation）をパネルＢに適用して、ＳＭＬＭにより局在化される蛍光分子エミッタを含む、視野にわたる領域を作り出した。この一般的な例においてこれらの領域により覆われる領域は、視野の１．８％のみに相当する。その後の画像において増強照明をこれらの領域に制限することによって、単一分子局在化のために、より高いシグナル対バックグラウンドイメージングを実現することができる。

【００２４】

［実施形態１］

本発明の一実施形態において、広視野蛍光顕微鏡の励起経路にＳＬＭを追加することにより、動的マスキングが実施される。

【００２５】
図６は、顕微鏡の励起経路においてデジタルマイクロミラーデバイス（ＤＭＤ）をＳＬＭとして使用する本実施形態の例を示し、一方の向きのマイクロミラーが励起光を試料上で反射し、他方の向きのマイクロミラーが励起光をビームダンプに廃棄する。ＬＣｏＳなどの異なるＳＬＭをＤＭＤの代わりに使用してもよく、この場合、機能性は同じままであるが、光学経路の全体的な配置が異なる。簡単のために、ＤＭＤを使用する例を図面に示す。
【００２６】
励起光源（０２９）は、顕微鏡の対物レンズ（００５）およびチューブレンズ（０２７）により規定された共役像面に位置するＤＭＤ（０３１）を照明する。ＤＭＤからのパターン化された励起光が、主ダイクロイック（０２６）を使用して対物レンズ内に標準落射蛍光配置で結合され、顕微鏡の対物レンズ（００５）を通して、カバースリップガラス（０２５）に載置された生体試料（００１）上に投影される。蛍光は、カメラ（０３０）により、標準広視野放射経路で撮像される。
【００２７】
本実施形態において、ＤＭＤを使用して、モニタリング照明および増強照明の領域の両方を確立する。所与のＤＭＤ画素が光を試料に反射している時間の割合を、その画素のデューティサイクルと呼ぶ。試料のモニタリングは、ＤＭＤの対応する画素にわたって、低デューティサイクルパターンを実行することにより実現され、増強照明は、高デューティサイクルパターンを実行することにより実現される。
【００２８】
増強照明の平均面積は、視野の約１％であると予想される。新しい分子の出現のための視野のモニタリングに必要な励起を含めると、広視野励起B_Wと動的マスキングB_{DM}とから予想されるバックグラウンド光の量について以下の関係が得られる。
【００２９】
【数１】

$$\frac{B_W}{B_{DM}} = \frac{1}{f + m*(1-f)} \approx \frac{1}{f+m}$$

【００３０】
ここで、ｆは、増強照明が照射される視野の面積の割合であり、ｍは、増強された領域の強度と比較したモニタリング照明強度の相対励起線量である。ｆ＝０．０１およびｍ＝０．０４の一般的な値について、バックグラウンド励起の２０分の１への低減が実現される。
【００３１】
［実施形態２］
本発明の一実施形態において、独立して強度が変調され得る個々の光源のアレイからなる光源によって、パターン化照明が直接作り出される。このような光源は、ＳＬＭを不要にする。図６に示す前述した実施形態において、このような光源のアレイは、顕微鏡の像面においてＤＭＤ（０３１）の位置に配置される。
【００３２】
［実施形態３］
第１の実施形態の改良版において、ＳＬＭは、励起経路の共役像面に位置するだけでなく、放射経路の共役像面にも位置する。このような光学配置は、回転円板共焦点顕微鏡に類似して、ＳＬＭの画素が共焦点ピンホールとして機能することにより、試料からの非合焦バックグラウンド蛍光のかなりの部分を排斥（ｒｅｊｅｃｔ）することを可能にする、共焦点イメージングデバイスを作り出す。共役像面に位置し動的マスキングを使用するＳＬＭにより、検出のシグナル対バックグラウンド比が、回転円板により得られるものよりも
【数２】

$$\approx \frac{1}{f+m}$$

だけ増加する。

【００３３】

図７は、ＤＭＤをＳＬＭとして使用する本実施形態の例を示す。ここでは、ＤＭＤ（０３１）は、励起経路および放射経路の両方に位置し、励起光と放射光とを分離するダイクロイックミラー（０２６）が、ＤＭＤとカメラ（０３０）との間に配置されている。顕微鏡の対物レンズ（００５）からの放射光が、最初にチューブレンズ（０２７）を使用してＤＭＤ上に撮像され、次に、リレーレンズ（０２８）のセットを使用してカメラに撮像される。

【００３４】

［実施形態４］

上記の実施形態のさらなる改良において、非共役非合焦光が、単に廃棄されるのではなく、検出器によってキャプチャされる。

【００３５】

図８は、ＤＭＤをＳＬＭとして使用する本実施形態の例を示す。ここでは、ＤＭＤ（０３１）によって反射された非共役非合焦光が、ＰＡＭの光学配置に類似して、既存の共役経路（０３４）に対して追加の非共役経路（０３５）で、第２のカメラによって撮像される。

【００３６】

視野にわたる並列化した共焦点検出は、非合焦バックグラウンドを増加させる共焦点画素間の相当なクロストークにつながることがある。これは、回転円板共焦点顕微鏡に共通する制限であり、厚みのある試料または高密度に標識された試料を撮像するときに特に顕著である。排斥された非共役光のカメラによる検出は、非合焦バックグラウンド蛍光の空間画像をもたらし、共役像の残存バックグラウンドの指標として機能し得る。共役像からの非共役像の重み付けサブトラクションにより、光学セクションニング画像の残存バックグラウンドをノイズ限界まで除去することが可能になる。

【００３７】

動的マスキング方法をＰＡＭに適用すると、増強照明の領域を形成するＤＭＤの画素は、非合焦バックグラウンドの適切なサブトラクションを可能にするために、５０％のデューティサイクルを使用することが好ましい。しかしながら、最大強度のために、増強照明の領域について１００％のデューティサイクルを使用することができる。この場合でも、周囲の領域において正確な光学セクショニングが保証される。しかしながら、１００％のデューティサイクルを有する増強照明の領域の場合、これらの領域について光が非共役検出器に投影されないため、非合焦バックグラウンドの直接の局所的な測定値が非共役像から得られない。それでも、いくつかの追加の画像処理により、非共役像の隣接する画素に基づいて、局所的な非共役推定値を導き出すことができ、増強照明の領域からの非合焦バックグラウンドの近似寄与率のサブトラクションが可能になる。

【００３８】

従来のＰＡＭ構成を使用するＳＭＬＭ取得と比較すると、ＰＡＭにおける動的マスキングの使用は、

【数３】

$$\approx \frac{1}{f+m}$$

の、上記の比較と同様のバックグラウンド励起の低減を生じさせるだろう。

【００３９】

［実施形態５］
別の実施形態において、モニタリング照明は、ＳＬＭとは異なる位置で生成され、ＳＬＭは、増強照明の領域を生成するためだけに使用される。
【００４０】
図９は、ＤＭＤをＳＬＭとして使用する本実施形態の例を示す。この例は、図６に示す広視野顕微鏡構成と同様であるが、２つのさらなる要素（０３２）および（０３３）が追加されている。モニタリング照明（０３２）が、ＤＭＤ（０３１）およびその対応する光源（０２９）とは異なる位置で生成される。次に、両方の照明が、ビームコンバイナ（０３３）を使用して顕微鏡の励起経路で結合される。このビームコンバイナは、モニタリング照明とＤＭＤからの増強照明との特定の比を提供するように選択することができる。あるいは、結合されたビームは、偏光ビームコンバイナもしくはダイクロイックビームコンバイナを使用するように、異なる偏光を有していても、またはスペクトル的にシフトされていてもよい。
【００４１】
［実施形態６］
図９に示す上記実施形態の改良版において、モニタリング（０３２）は、回転円板共焦点、スリット走査共焦点、または構造化照明などの光学セクショニング方法を使用して実行されるが、増強照明は、ＳＬＭを使用して別個に生成され、適切なビームコンバイナを使用して励起経路内に結合される。
【００４２】
［実施形態７］
本発明の別の実施形態において、個々の蛍光分子エミッタの追加の軸方向情報を得るために、光学素子がＳＬＭと検出器との間の放射光経路に追加される。このような軸方向情報は、例えば、円筒形レンズまたは回折素子を追加して、粒子のＰＳＦを予測可能な方法で歪ませることにより、焦点面の上または下の位置の情報をもたらすことによって生成することができる。増強照明を使用する動的マスキングは、原則として、これらの方法によって生じる歪みに適合する。これは、粒子を囲む領域が、個々のエミッタからのシグナルを増加させるだけで、軸方向決定の基になる歪み自体を著しく変化させることがないほど、十分に大きいからである。別の選択肢は、画像スプリッタ素子を使用して、複数の画像を検出器の異なる焦点面に形成することであろう。
【００４３】
これらの光学素子を、実施形態４のバックグラウンドサブトラクション能と組み合わせてもよい。軸方向情報光学素子が、共役光路および非共役光路の両方に含まれて、共役像と同様に非共役像において、非合焦光に同等の歪みを生じさせることが好ましい。非共役検出器の前に軸方向情報光学素子を配置することは、それほど正確である必要はない。これは、非共役像が非合焦光のみを記録し、わずかにずれた軸方向情報光学素子による非合焦光の正確な歪みは重要ではないからである。
【００４４】
［実施形態８］
本発明の別の実施形態において、増強照明の対応する各領域のサイズ、形状、および位置を調節することによる、蛍光分子エミッタの個々のＰＳＦの動的サブサンプリングによって、パターン化照明内の増強照明の領域が、重心推定を超える他のＳＭＬＭ局在化様式に最適化される。
【００４５】
例えば、蛍光分子の中心に対して照明領域の中心をわずかに変位させることにより、分子のＰＳＦを動的にサンプリングすることができる。これにより、異なる照明位置の相対強度に基づく三角測量の形態で、追加の局在化情報が生成される。変位は、三角測量情報の増加がシグナルの減少よりも大きくなるように選択する必要があり、これにより、局在化の精度の向上が保証される。
【００４６】

同様に、試料内での焦点の変位により、または、個々の焦点スポットの深さが変化し得るデジタルホログラムを形成するＳＬＭを使用することにより、深さのわずかな変位を追加することによって、３次元（３Ｄ）の三角測量を実行してもよい。このような３Ｄ三角測量は、エミッタの軸方向位置の抽出をさらに可能にするだろう。

【００４７】

［実施形態９］

前述した実施形態のほとんどにおいて、ＳＬＭは、ホログラフィック位相ベースのＳＬＭであってもよい。この手法は、励起光をより効率的に使用することができ、それにより、増強照明の領域により高い強度を与えることができる。

【００４８】

図１０は、励起光（０２９）が、対物レンズの後焦点面に共役する面にほぼ位置するホログラフィックＳＬＭ（０３８）によって変調される、本実施形態の例を示す。

【００４９】

ＳＬＭにより導入される位相マスクが、像面または像面に共役する面（０３６）で照明パターンを生成し、これはフーリエ変換または他のアルゴリズムを使用して計算することができる。ＳＬＭを共役面から除去して、０次光が焦点面に集束されないことを確認することも合理的であり得る。あるいは、ＳＬＭに拡散光を照明して、０次光を焦点面から除去してもよい。０次光をモニタリング光として使用して全視野を照明し、１次光を、分子を局在化するためのパターン化照明として使用することも想定できる。対物レンズの後焦点面に共役する位置にＳＬＭを置く利点は、解析すべき分子の位置に光のパワーを集中させることができることである。したがって、ＳＬＭを照明するのに必要な全強度は、対象の全視野が照明され、個々の位置のみにスイッチオンする場合に対して桁違いに低くなり得る。

【００５０】

［実施形態１０］

本発明の別の実施形態において、分子は傾斜光円錐で照明される。

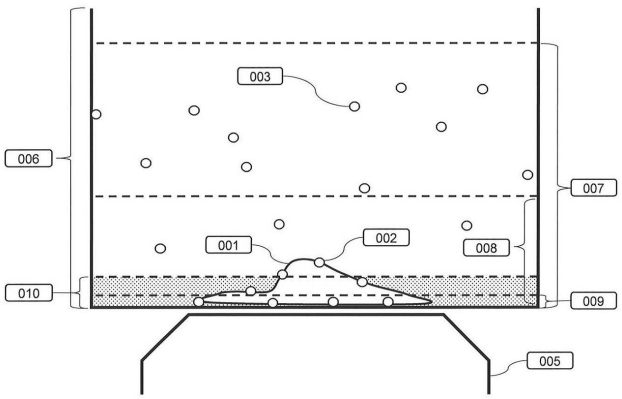
【００５１】

図１１は、試料上への傾斜光円錐（パネルＡ）と、対物レンズの後焦点面における必要な照明領域（パネルＢ）とを示す。これは、様々な方法で実現することができる。一例として、ＳＬＭ上で照明される領域は、後焦点面（０４０）の中心ではなく、中心を外れて（０４１）撮像される。その後、結果として得られるパターン化照明は、物体面に対して傾斜した光ビームから構成される。傾斜角度は、物体面法線に対して３０度から約９０度とすることができる。かくして、標的とする蛍光分子エミッタは、焦点面において傾斜光円錐（０３９）によって照明される。これにより、局所セクショニングおよびバックグラウンド強度の低減が既にもたらされる。物体面にない蛍光分子エミッタは、傾斜方向に沿って焦点から横方向に変位した場合にのみ励起されるため、認識することができる。

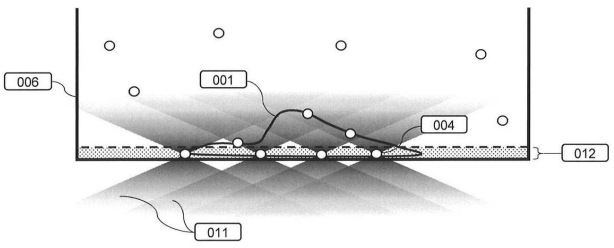
【００５２】

単一分子局在化顕微鏡法の目的で、解像限界のある対物レンズ（００５）を有する光顕微鏡を使用して、生体試料の一連の画像を形成する方法について説明する。この方法は、少なくとも１つの第１の光源（０２９）からの励起光により、対物レンズの視野内でエミッタ（００２）を並行して励起することと、次に、励起光の結果としてエミッタから並行して放射された光を、少なくとも１つの第１の検出器（０３０）により検出して、画像を取得することとを含むことができる。次に、取得した画像に基づいて、エミッタの近似位置（０２２）を決定することができる。エミッタの近似位置に対応する領域を生成することができ、各領域（０２３）は、サブセット内の各エミッタにおいて局在化され、顕微鏡の解像限界に匹敵する特徴的な寸法を有する。少なくとも１つの光源からの第１のパターン化照明（０２４）を領域に基づいて適応させ、その後の画像において複数のエミッタを並行して照明してもよい。上記のステップの連続した繰返しは、「動的マスキング」プロセス（０１３）を構成し、パターン化照明は、取得した画像の視野内の個々のエミッタの出現および消失を考慮して更新されてよい。

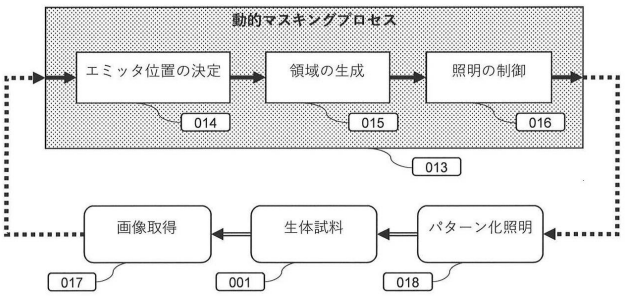
【００５３】
この方法は、エミッタの近似位置に対応する領域内に増強照明からなるパターン化照明を作り出すことをさらに含んでいてもよく、増強照明の領域は、視野の残りの部分よりも多くの励起光を受け取ってもよく、領域は、複数のエミッタを並行して照明するように配置されてもよい。
【００５４】
上記の方法について、個々の光源のアレイを第１の光源に使用してもよく、個々の光源の強度を変化させることによってパターン化照明を作り出すことができるだろう。
【００５５】
この方法は、空間光変調器（ＳＬＭ、０３１）を使用して第１の光源からの光を変調して、パターン化照明を確立することも含んでいてもよい。
【００５６】
この方法は、エミッタからＳＬＭ上への放射光を撮像し、次に、第１の検出器を使用して、その後に変調された放射光を検出することを含んでいてもよい。このようにして、第１の光源から試料上への光を変調するＳＬＭの画素の同じサブセットによりエミッタからの検出光を変調することは、検出画像からのＳＬＭの残りの画素による非合焦光の排斥によって、エミッタの共焦点検出を可能にするだろう。
【００５７】
共焦点検出を使用する上記の方法は、ＳＬＭにより排斥された非合焦光を、第１の検出器および第２の検出器の表面の未使用の領域のうちの少なくとも１つの上にその光を撮像することによって、検出することをさらに含んでいてもよい。この方法は、検出された非合焦光のスケーリングされたサブトラクションによって、残存非合焦光を共焦点画像から除去することをさらに含んでいてもよい。
【００５８】
上記の方法は、エミッタにわたるパターン化照明の時間変調および空間変調のうちの少なくとも一方により、各エミッタの点拡がり関数（ＰＳＦ）を並行してサンプリングすることも含んでいてもよい。
【００５９】
方法は、顕微鏡の対物レンズの後焦点面（０４０）を、中心を外れて（０４１）照明することによって、エミッタの各々の上に光軸に対する傾斜光円錐（０３９）を作り出すことも含んでいてもよい。
【００６０】
上記で概説した例示的な実施形態と併せて様々な詳細について説明したが、公知であるかまたは現在予測できない、様々な代替、修正、変形、改良、および／または実質的な均等物が、上記の開示を検討すると明らかになり得る。したがって、前述した例示的な実施形態は、説明のためのものであり、限定的なものではない。
【図面】
【図１】



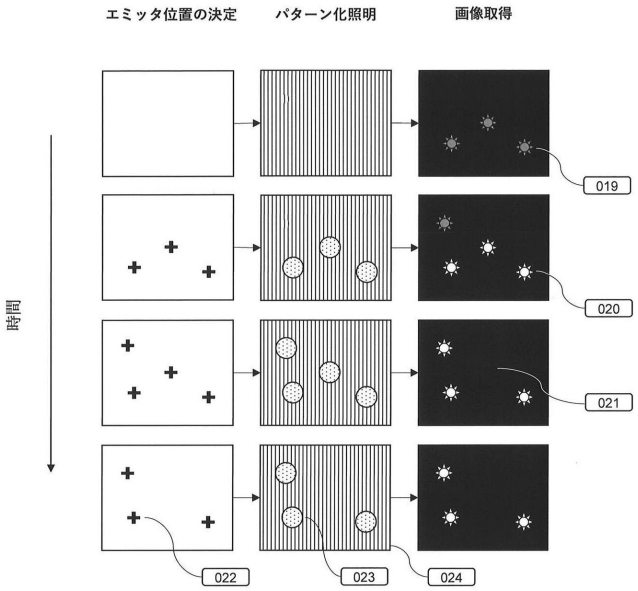
【図２】



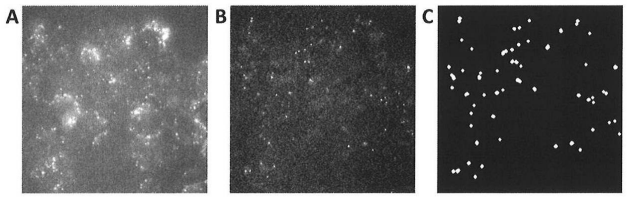
【図３】


動的マスキングプロセス
エミッタ位置の決定
領域の生成
照明の制御
014
015
016
013
画像取得
生体試料
パターン化照明
017
001
018

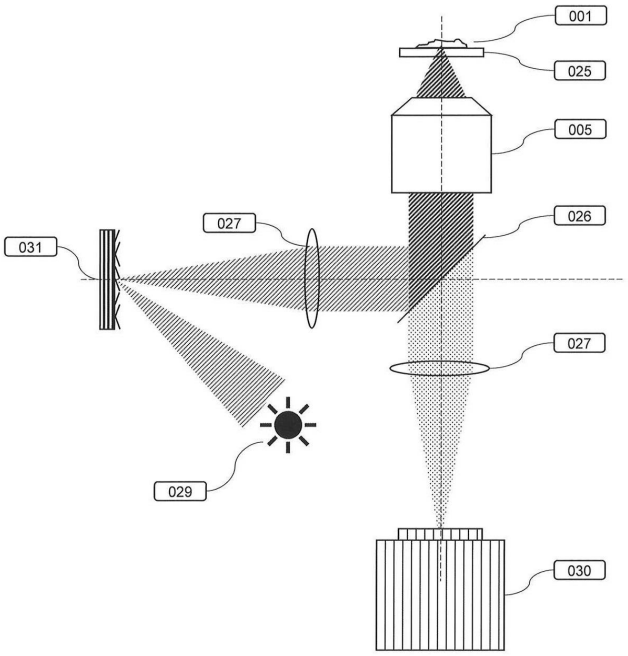
【図４】


エミッタ位置の決定
パターン化照明
画像取得
時間
019
020
021
022
023
024

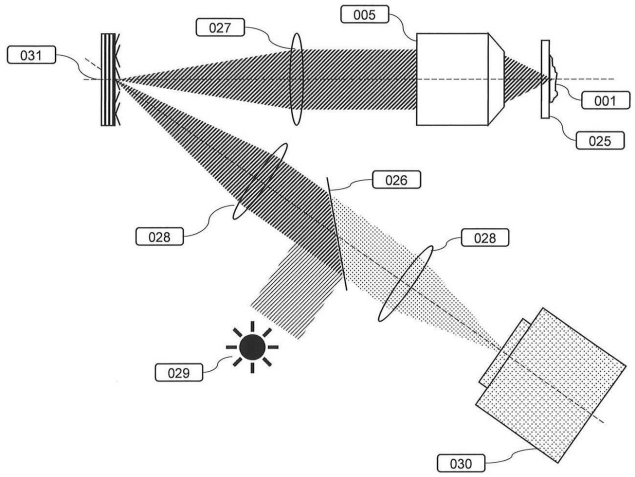
【図５】


A
B
C

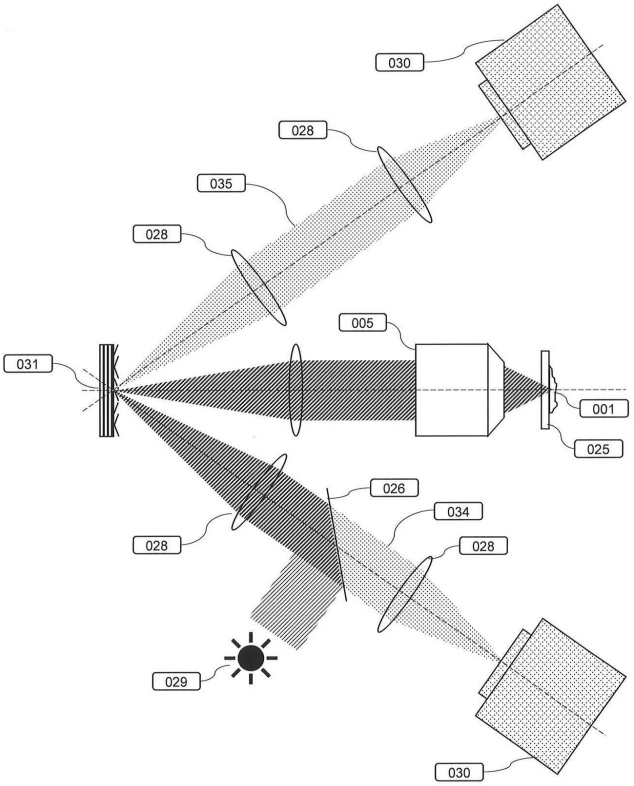
【図６】


001
025
005
026
027
031
027
029
030

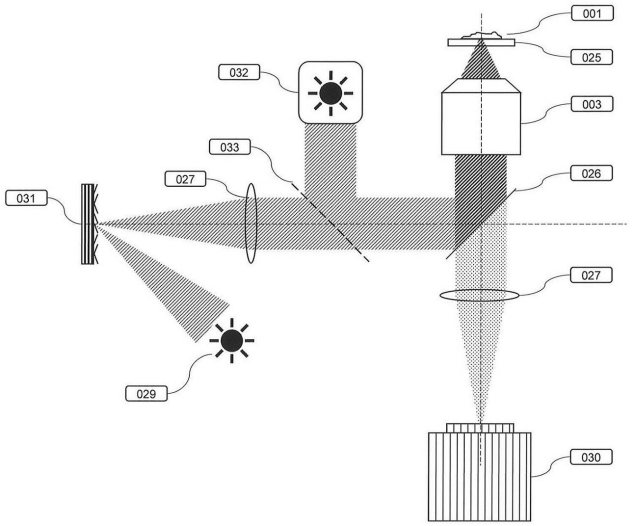
【図７】


031
027
005
001
025
026
028
028
029
030

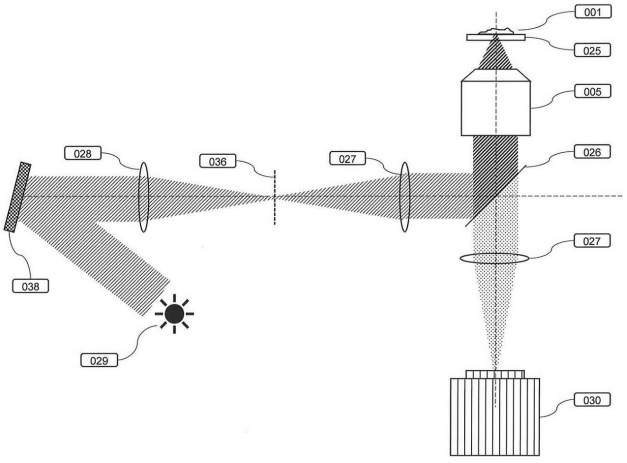
【図８】


030
028
035
028
005
031
001
025
026
034
028
028
029
030

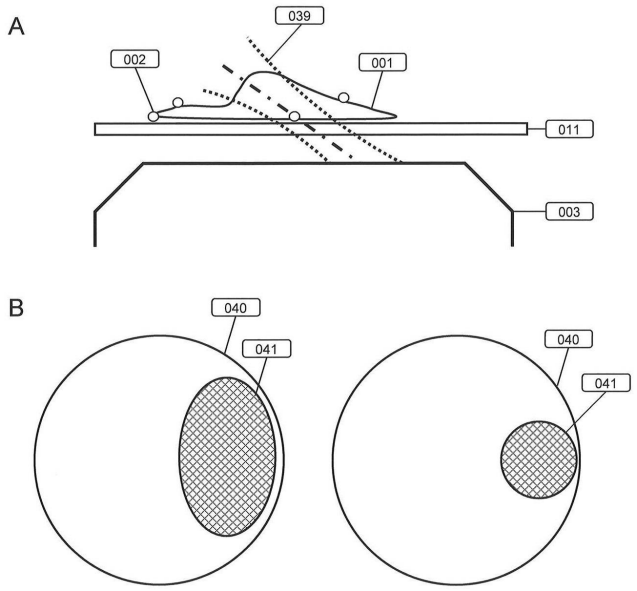
【図９】


001
025
032
003
033
027
026
031
027
029
030

【図１０】


001
025
005
028
036
027
026
027
038
029
030

【図１１】



【外国語明細書】
2023138481000015.pdf

フロントページの続き

弁理士　今野 智介
(74)代理人　100144794
弁理士　大木 信人
(74)代理人　100204582
弁理士　大栗 由美
(72)発明者　シュピーカー，ハインリッヒ
ドイツ連邦共和国 ５１４２９ ベルギッシュ グラドバッハ，フリードリッヒ－エベルト－シュトラーセ ６８，ミルテニイ ビオテック ベー．ファー． ウント コー．カーゲー内
(72)発明者　ディークマン，ロビン
ドイツ連邦共和国 ５１４２９ ベルギッシュ グラドバッハ，フリードリッヒ－エベルト－シュトラーセ ６８，ミルテニイ ビオテック ベー．ファー． ウント コー．カーゲー内
(72)発明者　キンカブワラ，アリ
ドイツ連邦共和国 ５１４２９ ベルギッシュ グラドバッハ，フリードリッヒ－エベルト－シュトラーセ ６８，ミルテニイ ビオテック ベー．ファー． ウント コー．カーゲー内
(72)発明者　ミルテニイ，ステファン
ドイツ連邦共和国 ５１４２９ ベルギッシュ グラドバッハ，フリードリッヒ－エベルト－シュトラーセ ６８，ミルテニイ ビオテック ベー．ファー． ウント コー．カーゲー内
(72)発明者　デブリーズ，アンソニー
ドイツ連邦共和国 ５１４２９ ベルギッシュ グラドバッハ，フリードリッヒ－エベルト－シュトラーセ ６８，ミルテニイ ビオテック ベー．ファー． ウント コー．カーゲー内

Ｆターム（参考）　2G043　AA04 BA16 CA04 EA01 FA02 HA01 HA09 LA03 MA01 NA01
2H052　AA08 AA09 AF21 AF25
5L096　AA06 CA04 CA17 EA05 FA23 FA59 FA60 FA62 FA69 GA10 GA51