

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-539074  
(P2013-539074A)

(43) 公表日 平成25年10月17日(2013.10.17)

(51) Int.Cl.

G02B 21/00 (2006.01)  
G01N 21/64 (2006.01)

F 1

G02B 21/00  
G01N 21/64  
G01N 21/64

テーマコード(参考)

2G043  
2H052

E

F

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2013-530109 (P2013-530109)  
 (86) (22) 出願日 平成23年9月26日 (2011.9.26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月24日 (2013.5.24)  
 (86) 國際出願番号 PCT/NZ2011/000200  
 (87) 國際公開番号 WO2012/039636  
 (87) 國際公開日 平成24年3月29日 (2012.3.29)  
 (31) 優先権主張番号 588199  
 (32) 優先日 平成22年9月24日 (2010.9.24)  
 (33) 優先権主張国 ニュージーランド (NZ)

(71) 出願人 513072123  
 カール・ツァイス・マイクロスコピー・ゲ  
 ゼルシャフト・ミット・ペシュレンクテル  
 ・ハフツング  
 Carl Zeiss Microsco  
 py GmbH  
 ドイツ連邦共和国、07745 イエーナ  
 、カールツァイスープロメナーデ 10  
 Carl-Zeiss-Promenad  
 e 10, 07745 Jena, G  
 ermany  
 (74) 代理人 100110423  
 弁理士 曽我 道治  
 (74) 代理人 100111648  
 弁理士 梶並 順

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3 D 局在顕微鏡法並びに 4 D 局在顕微鏡法及び追跡方法並びに追跡システム

## (57) 【要約】

3 D 局在顕微鏡法システム、及び 4 D 局在顕微鏡法システム又は放射体追跡システムが、対物レンズの一部分へ又は対物レンズの一部分から進む光と、対物レンズの別の部分へ又は対物レンズの別の部分から進む光との間の位相差を発生させて、2 つのロープを含む点放射体画像を生成するように構成される。2 つのロープ間の分離は、撮像システムの対物レンズに対する放射体の位置に関連し、4 D システムでは、画像の更なる特性、又は対物レンズへの若しくは対物レンズからの上記光の更なる特性は、放射体の別のロケーション非依存特性に関連する。

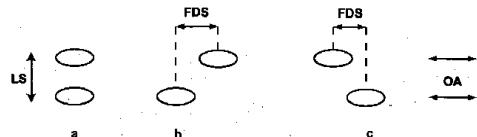


FIGURE 3

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

3 D 局在顕微鏡法システムであって、

前記 3 D 局在顕微鏡法システムは、対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の位相差を発生させて、2つの画像ロープを含む点放射体画像を生成するように構成され、

それによって、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、前記2つの画像ロープが、実質的に軸に沿った第1の互いに対向する方向に互いから分離され、

正の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、前記2つの画像ロープが、実質的に前記軸に沿った第2の互いに対向する方向に互いから分離される、3 D 局在顕微鏡法システム。

**【請求項 2】**

4 D 局在顕微鏡法システムまたは放射体追跡システムであって、

前記 4 D 局在顕微鏡法システムまたは前記放射体追跡システムは、対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の位相差を発生させて、2つのロープを含む点放射体画像を生成するように構成され、

前記2つのロープ間の分離は、撮像システムの前記対物レンズに対する放射体の位置に関連し、

前記画像の更なる特性、又は前記対物レンズへの若しくは前記対物レンズからの前記光の更なる特性は、前記放射体の別のロケーション非依存特性に関連する、

4 D 局在顕微鏡法システムまたは放射体追跡システム。

**【請求項 3】**

前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の前記位相差を発生させて、2つの画像ロープを含む点放射体画像を生成するように構成され、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、前記2つの画像ロープが、実質的に軸に沿った第1の互いに対向する方向に互いから分離され、

正の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、前記2つの画像ロープが、実質的に前記軸に沿った第2の互いに対向する方向に互いから分離される、請求項2に記載のシステム。

**【請求項 4】**

前記更なる特性は前記画像ロープ間の分離である、請求項2又は3に記載のシステム。

**【請求項 5】**

前記更なる特性は、前記放射体の前記位置に関連する前記画像ロープ間の前記分離の前記軸に対し或る角度を成す軸における前記画像ロープ間の分離である、請求項4に記載のシステム。

**【請求項 6】**

前記画像の前記更なる特性は、前記放射体の前記位置に関連する前記画像ロープ間の前記分離の前記軸に対し実質的に直交する軸における前記画像ロープ間の分離である、請求項4に記載のシステム。

**【請求項 7】**

前記更なる特性は、前記放射体からの光の輝度、スペクトル成分、寿命、又は偏光状態である、請求項2又は3に記載のシステム。

**【請求項 8】**

前記放射体の前記ロケーション非依存特性は、前記放射体からの光のスペクトル成分、寿命、又は偏光状態のうちの任意の1つ又は複数である、請求項2～7のいずれか1項に記載のシステム。

10

20

30

40

50

**【請求項 9】**

前記システムは、前記対物レンズに対する放射体の、焦点の合った位置において、前記2つの画像ロープが、前記放射体の前記位置に関連する前記画像ロープ間の分離の前記軸に沿って互いから実質的に分離されないように構成される、請求項1～8のいずれか1項に記載のシステム。

**【請求項 10】**

前記システムは、前記対物レンズに対する放射体の、焦点の合った前記位置において、前記2つの画像ロープが、前記放射体の前記位置に関連する前記画像ロープ間の分離の前記軸に実質的に直交して互いから分離されるように構成される、請求項1～9のいずれか1項に記載のシステム。

10

**【請求項 11】**

屈折位相変更装置を備え、

前記屈折位相変更装置は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の前記位相差を発生させるように構成される、請求項1～10のいずれか1項に記載のシステム。

**【請求項 12】**

前記屈折位相変更装置は位相傾斜を備える、請求項11に記載のシステム。

**【請求項 13】**

前記位相傾斜は線形位相傾斜である、請求項12に記載のシステム。

20

**【請求項 14】**

前記位相変更装置は、単一の位相傾斜を備え、

前記単一の位相傾斜は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の前記位相差を発生させるように構成される、請求項12又は13に記載のシステム。

**【請求項 15】**

前記位相変更装置は、少なくとも2つの位相傾斜を備え、

少なくとも1つの位相傾斜は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光に対し位相変化を発生させるように構成され、

30

少なくとも1つの別の位相傾斜は、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光に対し位相変化を発生させるように構成される、請求項11に記載のシステム。

**【請求項 16】**

前記2つの位相傾斜は、互いに異なる位相変化勾配を有する、請求項15に記載のシステム。

**【請求項 17】**

前記2つの位相傾斜は、互いに反対向きの位相変化勾配を有する、請求項15又は16に記載のシステム。

**【請求項 18】**

前記2つの位相傾斜は、互いに等しいが反対向きの位相変化勾配を有する、請求項15に記載のシステム。

40

**【請求項 19】**

前記位相変更装置は、鋸歯構成の複数の線形傾斜を備える、請求項11に記載のシステム。

**【請求項 20】**

前記システムは反射性位相変更装置を備え、

前記反射性位相変更装置は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の前記位相差を発生させるように構成される、請求項1～10のいずれか1項

50

に記載のシステム。

【請求項 2 1】

前記反射性位相変更装置は、少なくとも 2 つの反射性位相傾斜を備え、  
少なくとも 1 つの反射性位相傾斜は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの  
前記一部分から進む光に対し位相変化を発生させるように構成され、

少なくとも 1 つの別の反射性位相傾斜は、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの  
前記別の部分から進む光に対し位相変化を発生させるように構成される、請求項 2  
0 に記載のシステム。

【請求項 2 2】

前記反射性位相変更装置は、固定の相対角度での反射面を備える、請求項 2 1 に記載の  
システム。 10

【請求項 2 3】

前記反射性位相変更装置は、調整可能な相対角度での反射面を備える、請求項 2 1 に記  
載のシステム。

【請求項 2 4】

前記反射性位相変更装置は、線形に変動する位相差を発生させるように構成される、請  
求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 2 5】

前記反射性位相変更装置は、鋸歯構成の複数の線形反射性位相傾斜を備える、請求項 2  
1 に記載のシステム。 20

【請求項 2 6】

前記反射性位相変更装置は変形可能なミラーを備える、請求項 1 9 に記載のシステム。

【請求項 2 7】

前記システムは分散性位相変更装置を備え、

前記分散性位相変更装置は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分  
から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進  
む光との間の前記位相差を発生させるように構成される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項  
に記載のシステム。

【請求項 2 8】

前記分散性位相変更装置は、2 つの分散性位相変更装置を備え、 30

前記 2 つの分散性位相変更装置は、高分散位相変更装置と、低分散位相変更装置とを含  
む、請求項 2 7 に記載のシステム。

【請求項 2 9】

前記システムは位相変更装置を備え、

前記位相変更装置は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から  
進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光と  
の間の前記位相差を発生させるように構成され、

前記位相変更装置は回折格子を備える、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のシステム。  
40

【請求項 3 0】

前記位相変更装置は回折格子と及び平面鏡とを備える、請求項 2 9 に記載のシステム。

【請求項 3 1】

各前記画像ロープの各相対位置から前記放射体の z 軸位置を評価するように構成された  
画像処理システムを備える、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 3 2】

画像処理システムを備え、

前記画像処理システムは、各前記画像ロープの各相対位置を、数学的モデル若しくは数  
値モデル又はルックアップデータベースに合致させることによって前記放射体の z 軸位置  
を評価するように構成される、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 3 3】

50

画像処理システムを備え、  
前記画像処理システムは、  
未加工画像を捕捉するステップと、  
前記未加工画像の背景が減算された推定値及び前記未加工画像の信号対雑音比（S/N）推定値を得るステップと、  
前記未加工画像の前記背景が減算された推定値及び前記S/N推定値における対象物コントラストを最大にするステップと、  
しきい値処理された画像及び前記しきい値処理された画像上の開始位置のリストを得るステップと、  
前記リスト内の誤検出された開始位置を破棄するステップと、  
前記撮像システムの点拡がり関数、前記未加工画像のS/N推定値及び背景推定値を用いて、前記開始位置のリストに対し最適化あてはめプロセスを実行するステップと、  
あてはめられた開始位置を前記未加工画像の3D画像に組み立てるステップと、  
を含む複数のステップによって、少なくとも未加工放射体画像の3D放射体画像を生成する、請求項1～32のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項34】

画像処理システムを備え、  
前記画像処理システムは、  
前記未加工画像のオフセットを補正し、  
光電子数の観点から前記画像を較正し、

現在の未加工画像に系列内で先行する複数の画像の平均を減算することによって、前記背景が減算された推定値を捕捉するように構成される、請求項33に記載のシステム。

【請求項35】

前記画像処理システムは、前記未加工画像の各ピクセル内の光電子数の平方根を計算することによって前記S/N推定値を得るように構成される、請求項33又は34に記載のシステム。

【請求項36】

前記画像処理システムは、  
ウィナーフィルタリング、  
前記撮像システムの点拡がり関数を用いた相関、又は  
最尤デコンボリューション

のうちの任意の1つ又は複数によって、前記背景が減算された推定値における対象物コントラストを最大にするように構成される、請求項33～35のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項37】

前記しきい値処理された画像は、前記背景が減算されコントラストが強化された推定値が、前記S/N推定値に一定の係数を乗算したものよりも明るいエリアを示すマスクである、請求項33～36のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項38】

開始位置のリストは、  
前記画像内の連続エリアを取り出すために二値標識付けを実行するステップと、  
前記二値標識付けがなされた画像内の各標識付けられた領域の輝度中心を計算するとともに、これを前記標識付けられた領域の前記開始位置として用いるステップと、  
によって、前記しきい値処理された画像から計算される、請求項33～37のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項39】

前記画像処理システムは、  
開始位置の選択された範囲内の近傍点の情報を抽出するステップと、  
前記開始位置及び前記選択された近傍点の輝度を計算するステップと、

10

20

30

40

50

前記開始位置及び前記近傍点の前記輝度を比較するステップと、  
前記開始位置の輝度が近傍点の輝度よりも大きくなない場合、前記開始位置を破棄するステップと、  
を含む複数のステップによって、誤検出された開始位置を破棄するように構成される、請求項 33～38 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 40】

前記画像処理システムは、  
「データ ROI」及び「SNR ROI」を得るために、背景補正された画像内の各開始位置の周りの関心領域 (ROI) 及び SNR 推定値から情報を抽出するステップと、  
これらの領域からの前記データを用いて開始パラメータを計算するステップと、

前記撮像システムの前記点拡がり関数から導出された補間モデルと、  
開始パラメータと、  
前記 SNR ROI と

を用いて前記データ ROI をあてはめることによって、最適化プロセスを実行するステップと、

を含む複数のステップによって、背景補正された画像における関心領域に対する最適化あてはめプロセスを、各開始位置について実行するように構成される、請求項 33～39 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 41】

近傍点の前記選択された範囲は、前記撮像システムの前記点拡がり関数よりも大きなサイズである、請求項 39 に記載のシステム。

【請求項 42】

3D 局在顕微鏡法の一方法であって、  
前記方法は、対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の位相差を発生させて、2つの画像ロープを含む点放射体画像を生成することを含み、  
それによって、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、前記 2 つの画像ロープが、実質的に軸に沿った第 1 の互いに対向する方向に互いから分離され、

正の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、前記 2 つの画像ロープが、実質的に前記軸に沿った第 2 の互いに対向する方向及び各前記画像ロープの各相対位置からの前記放射体の z 軸位置において、互いから分離される、3D 局在顕微鏡法の一方法。

【請求項 43】

4D 局在顕微鏡法の一方法または放射体追跡方法であって、  
前記方法は、対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の位相差を発生させて、2つのロープを含む点放射体画像を生成することを含み、  
前記 2 つのロープ間の分離は、撮像システムの前記対物レンズに対する前記放射体の位置に関連し、

前記画像の更なる特性、又は前記対物レンズへの若しくは前記対物レンズからの前記光の更なる特性は、前記放射体の別のロケーション非依存特性及び各前記画像ロープの各相対位置からの前記放射体の z 軸位置に関連し、  
前記方法は、前記別のロケーション非依存特性を評価することを含む、

4D 局在顕微鏡法の一方法または放射体追跡方法。

【請求項 44】

前記方法は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の前記位相差を発生させて、2つの画像ロープを含む点放射体画像を生成することを含み、  
負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、前記 2 つの

10

20

30

40

50

画像ロープが、実質的に軸に沿った第1の互いに対向する方向に互いから分離され、

正の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、前記2つの画像ロープが、実質的に前記軸に沿った第2の互いに対向する方向に互いから分離される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記画像の更なる特性は、前記画像ロープ間の分離である、請求項43又は44に記載の方法。

【請求項46】

前記画像の前記更なる特性は、前記放射体の前記位置に関連する前記画像ロープ間の前記分離の前記軸に対し或る角度を成す軸における前記画像ロープ間の分離である、請求項45に記載の方法。

10

【請求項47】

前記画像の前記更なる特性は、前記放射体の前記位置に関連する前記画像ロープ間の前記分離の前記軸に対し実質的に直交する軸における前記画像ロープ間の分離である、請求項45に記載の方法。

【請求項48】

前記画像の前記更なる特性は、前記放射体からの光の輝度、スペクトル成分、寿命、又は偏光状態である、請求項43又は44に記載の方法。

【請求項49】

前記放射体の前記ロケーション非依存特性は、前記放射体からの光のスペクトル成分、寿命、又は偏光状態のうちの任意の1つ又は複数である、請求項43～48のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項50】

前記対物レンズに対する放射体の、焦点の合った位置において、前記2つの画像ロープが、前記放射体の前記位置に関連する前記画像ロープ間の分離の前記軸に沿って互いから実質的に分離されない、請求項43～49のいずれか1項に記載の方法。

【請求項51】

前記対物レンズに対する放射体の、前記焦点の合った前記位置において、前記2つの画像ロープが、前記放射体の前記位置に関連する前記画像ロープ間の分離の前記軸に実質的に直交して互いから分離される、請求項43～49のいずれか1項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、3D局在顕微鏡法並びに4D局在顕微鏡法及び追跡方法並びに追跡システムに関する。

【背景技術】

【0002】

3D局在顕微鏡法(PALM又はSTORM等)を用いて、撮像エリア内の分子等の有機標的又は無機標的の3次元構造情報が得られ、標的の相対的なロケーションが求められ、結果のロケーション情報を用いて、通常、30ナノメートルよりも良好な平面解像度まで、単一の3D画像又は3D表現が作成される。

40

【0003】

撮像エリアは、蛍光を発するように照明された多くの蛍光マーカーで満ちており、それぞれのロケーションが求められる。適切な照明プロトコルを用いると、所与の時点において幾つかのマーカーのみが蛍光を発し、単一の画像フレーム内に記録される。蛍光を発するこれらのマーカーのロケーションが求められ、様々なランダムのマーカー集合からなる複数のそのような画像のロケーション情報が単一の3D画像又は3D表現に組み立てられる。2D画像から、x軸及びy軸のロケーション情報のみでなく、z軸のロケーション情報も得るための様々な方法が知られている。

【0004】

50

顕微鏡の解像度は、その顕微鏡の光回折限界によって制限される。回折によって、顕微鏡の回折限界未満のサイズの単一点放射体がより大きなスポットとして撮像される。あてはめ(fitting)又は重心決定等のアルゴリズムを用い、顕微鏡の点拡がり関数(PSF)を得ると、 $x$ 軸及び $y$ 軸における回折限界を超えるスポットの中心を求めることが可能である。

#### 【0005】

現在の3D局在戦略は、概して2つのカテゴリーに分かれる。すなわち、二方向手法及びiPALM手法におけるような、分子の複数の同時観察値の取得と、非点収差法及び二重らせん法によって例示されるように、側方PSFプロファイルの焦点外れに依拠する形状において3D位置情報が符号化されるように点拡がり関数(PSF)を設計する方法である。二重らせん法では、撮像システムは、単一点放射体が2つの別個の画像スポットを生成するように設計されたPSFを有し、ここで、2つのスポット間の(概念上の)線の角度は、放射体と対象との間の距離に依存する。対象の $z$ 軸に沿って放射体の位置を変更することによって、2つの画像スポットがともに回転し、すなわちそれらの画像スポット間の角度が特徴的に変化する。較正されると、試料又は対象のいずれも移動させる必要なく、この回転拳動を用いて单一の2D画像から放射体の $z$ 位置を推定することができる。米国特許第7705970号及び米国特許出願公開第2009/0219549号はそのようなシステムを開示している。

10

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

20

#### 【0006】

本発明の幾つかの実施の形態の目的は、3D局在顕微鏡法の改善された方法又は少なくとも代替的な方法を提供することである。

#### 【0007】

本発明の他の実施の形態の目的はまた、3D局在顕微鏡法に追加の次元を導入して、発光体の追加の特性が符号化されることを可能にすること(本明細書では「4D局在顕微鏡法」の方法と呼ばれる)である。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

1つの態様において、広義では、本発明は、3D局在顕微鏡法の一方法(本明細書において、本発明の3D方法とも呼ばれる)であって、

30

前記方法は、対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の位相差を発生させて、2つの画像ロープを含む点放射体画像を生成することを含み、

それによって、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、実質的に軸に沿った第1の互いに対向する方向に前記2つの画像ロープが互いから分離され、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、実質的に前記軸に沿った第2の互いに対向する方向及び各前記画像ロープの各相対位置からの前記放射体の $z$ 軸位置において前記2つの画像ロープが互いから分離される、方法を含む。

40

#### 【0009】

通常、本方法は、試料内で順番に1つ又は複数の放射体をオンにし、1つ又は複数の放射体のロケーションを求め、その後、複数の画像からロケーションデータを組み立てて3D画像又は3D表現にすることを含む。他の実施の形態では、本方法は、单一の画像からロケーションデータを求めて組み立て、3D画像又は3D表現にすることを含む。

#### 【0010】

別の態様において、広義では、本発明は、3D局在顕微鏡法システム(本明細書において、本発明の3Dシステムと呼ばれる)であって、

前記システムは、対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の位

50

相差を発生させて、2つの画像ロープを含む点放射体画像を生成するように構成され、  
それによって、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、実質的に軸に沿った第1の互いに対向する方向に前記2つの画像ロープが互いから分離され、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、実質的に前記軸に沿った第2の互いに対向する方向に前記2つの画像ロープが互いから分離される、3D局在顕微鏡法システムを含む。

【0011】

別の態様において、広義では、本発明は、局在顕微鏡法の一方法または単一放射体追跡方法（本明細書において、本発明の4D方法と呼ばれる）であって、

前記方法は、対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の位相差を発生させて、2つのロープを含む点放射体画像を生成することを含み、

前記2つのロープ間の分離は、撮像システムの前記対物レンズに対する前記放射体の位置に関連し、

前記画像の更なる特性、又は前記対物レンズへの若しくは前記対物レンズからの前記光の更なる特性は、前記放射体の別のロケーション非依存特性及び各前記画像ロープの各相対位置からの前記放射体のz軸位置に関連し、

前記方法は、前記別のロケーション非依存特性を評価することを含む、方法を含む。

【0012】

4D方法は、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の前記位相差を発生させて、2つの画像ロープを含む点放射体画像を生成することを含むことができ、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、実質的に軸に沿った第1の互いに対向する方向に前記2つの画像ロープが互いから分離され、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、実質的に前記軸に沿った第2の互いに対向する方向に前記2つの画像ロープが互いから分離される。

【0013】

別の態様において、広義では、本発明は、局在顕微鏡法システムまたは単一放射体追跡システム（本明細書において、本発明の4Dシステムと呼ばれる）であって、

前記システムは、対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の位相差を発生させて、2つのロープを含む点放射体画像を生成するように構成され、

前記2つのロープ間の分離は、撮像システムの前記対物レンズに対する前記放射体の位置に関連し、

前記画像の更なる特性、又は前記対物レンズへの若しくは前記対物レンズからの前記光の更なる特性は、前記放射体の別のロケーション非依存特性に関連する、システムを含む。

【0014】

4Dシステムは、前記対物レンズの一部分へ又は前記対物レンズの前記一部分から進む光と、前記対物レンズの別の部分へ又は前記対物レンズの前記別の部分から進む光との間の前記位相差を発生させて、2つの画像ロープを含む点放射体画像を生成するように構成することができ、

負の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、実質的に軸に沿った第1の互いに対向する方向に前記2つの画像ロープが互いから分離され、

正の焦点外れを発生させる前記対物レンズに対する放射体の位置において、実質的に前記軸に沿った第2の互いに対向する方向に前記2つの画像ロープが互いから分離される。

【0015】

更なる特性は、放射体の位置に関連する画像ロープ間の分離の軸に対し、或る角度（た

10

20

30

40

50

とえば実質的に直交)を成す軸における画像ロープ間の分離等の画像ロープ間の分離とすることができる。代替的に、更なる特性は、放射体からの光のスペクトル成分、寿命、又は偏光状態のうちの任意の1つ又は複数とすることができる。

【0016】

前記放射体の前記ロケーション非依存特性は、前記放射体からの光のスペクトル成分、寿命、又は偏光状態のうちの任意の1つ又は複数とすることができる。

【0017】

3D方法及び3Dシステム並びに4D方法及び4Dシステムのいずれにおいても、前記対物レンズに対する放射体の、焦点の合った位置において、前記2つの画像ロープは、前記軸に沿って互いから実質的に分離しないことができる。また、前記対物レンズに対する放射体の焦点の合った位置において、前記2つの画像ロープは、前記軸に実質的に直交して互いから分離することができる。

10

【0018】

3D方法及び3Dシステム並びに4D方法及び4Dシステムのいずれにおいても、撮像システム内の位相変更装置は、一方の側に線形位相傾斜等の位相傾斜(phase ramp)を備えるか、又は複数の位相傾斜を備えることができ、これらの位相傾斜は他方の側の位相に影響を与えないこともできるし、他方の側に正負符号若しくは大きさが変動する位相変更効果を有することもできる。撮像システム内の位相変更装置は、瞳面の両半分間に線形に変動する位相差が存在するように構成することができる。位相変更装置は、瞳面の一方の半分を覆う単一の位相傾斜の形態を取ることもできるし、両半分間に線形に変動する位相差が存在するように両半分を覆う、互いに異なる勾配の2つの位相傾斜の形態を取ることもできる。位相変更装置は、等しいが反対向きの勾配の2つの位相傾斜を含むことができる。なぜなら、これによって、挿入時に画像の変位が生じないためである。位相傾斜は連続している必要がなく、各セグメントが2Piの位相角を覆うように、鋸歯パターンの幾つかの線形セグメントからなることができる。瞳面の両半分は、追加の固定(すなわち空間的に変動しない)位相差を有することもでき、これは、双方の半分からの光の相互作用がコヒーレントであるか又は非コヒーレントであるようにすることができる。幾つかの実施の形態では、位相変更装置は、単一点発光体の画像が2つの画像ロープを含むようになっている。これらの2つの画像ロープは、(少なくとも焦点が合っているときに)単一の(伸長)画像を形成するのに十分近接しており、その形状又は分離は、対物レンズに対する放射体距離の変化(正の焦点外れ又は負の焦点外れ)とともに変動する。他の実施の形態では、単一点放射体の画像は、(少なくとも焦点に近いときに)2つの分離した画像ロープを含み、それらの画像ロープ間の分離は、対物レンズに対する放射体の距離の変化とともに変動する。

20

【0019】

4D方法では、上記で参照したような放射体の第2のロケーション非依存特性を符号化するようにPSFの一方又は双方のロープを変更する追加の光学素子を含めることができる。光学系は、直交方向におけるロープ分離が、放射体の他のロケーション非依存特性に依存するように設計される。代替的に、光学系は、2つのロープの相対的な明るさが、放射体の他方の特性に依存するように設計することができる。

30

【0020】

本発明の4D方法及び4Dシステムの幾つかの実施の形態では、位相勾配の峻度によって、2つのロープを含む点放射体画像を生成することができ、ロープ間の分離は、1つの方向において、撮像システムの対物レンズに対する放射体の位置に関連し、他方の直交方向において、例えばスペクトル成分、蛍光寿命、又は偏光状態等の放射体の他の符号化される特性に関連する。

40

【0021】

本明細書において、「蛍光」はリン光、ルミネッセンス、又はマーカー物体からの同様のモードの発光も含む。

【0022】

50

「...を含む」または「...を備える」(comprising)という語は、本明細書では「少なくとも部分的に...からなる」を意味する。本明細書において「...を含む」または「...を備える」という語を含む各記載を解釈するとき、この語の前に置かれる単数又は複数の特徴以外の特徴も存在することができる。

【0023】

3D局在顕微鏡法は、複数の分子又は放射体のロケーションの画像を構築することを含み、ここで所与のマーカーのロケーション情報は通常、空間的に静止した試料について得られる。粒子追跡顕微鏡法又は分子追跡顕微鏡法は、単数又は複数のマーカーに蛍光を発生させ、その運動を経時的に追跡することを含む。

【0024】

添付の図面を参照して本発明を更に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】本発明による、対物レンズとカメラ又は撮像平面との間の位相傾斜を備える顕微鏡を概略的に示す図である。

【図2】aおよびbは、異なる位相傾斜構成の結果として得られた顕微鏡システムの瞳位相分布及びその対応する位相プロファイルを示す図である。dおよびeは、顕微鏡システムの他の可能な瞳位相分布を示す図である。cは、焦点外れが発生したときの放射体画像の形状変化を示す図である。

【図3】aは、焦点が合った放射体画像の2つのロープを概略的に示す図である。bは、負の焦点外れを有して分離した2つの画像ロープを示す図である。cは、正の焦点外れを有して分離した2つの画像ロープを示す図である。

【図4】位相傾斜として反射面を含む顕微鏡システムを概略的に示す図である。

【図5】高分散及び低分散の材料を含む分散性位相マスクの実施態様を概略的に示す図である。

【図6】回折格子を用いる分散性位相マスクの実施態様を概略的に示す図である。

【図7】本発明の一実施形態の画像解析アルゴリズムのフローチャートである。

【図8】本発明の一実施形態の「デバウンス(debounce)」アルゴリズムのフローチャートである。

【図9】本発明の一実施形態の「あてはめ(fitting)」アルゴリズムのフローチャートである。

【図10】Aは位相傾斜及び顕微鏡システムのPSFに対する位相傾斜の影響を示す図である。Bは本発明の方法を用いたz射影再構成である。Cはz位置のヒストグラムである。DはBの点線領域に対応する再構成画像のエリアの等値面表現である。これらは実験的研究の以下の説明において参照される。

【図11】実際の焦点外れ、及び直径200nmの3つの暗赤色の蛍光ビーズの一連の画像に位相傾斜PSFをあてはめることによって得られる結果を示す。これは実験的研究の以下の説明において参照される。

【図12】(a)および(b)は、本発明の方法と非点収差検出との実験的な比較を示す図である。

【図13】本発明の方法と、非点収差検出及び二方向検出との比較を示す図である。

【図14】PSFロープの相対的な高さにおける波長に依存した変化を誘起するフィルターの使用を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

図1を参照すると、蛍光顕微鏡が、キセノンアーク燈若しくは水銀蒸気燈又はレーザー励起等の光源7と、励起フィルター8と、二色性ミラー6又は二色性ビームスプリッターと、放射フィルター(図示せず)とを含む。各フィルター及び二色性のものは、標本を標識付けるのに用いられる蛍光物質(複数の場合もある)のスペクトル励起特性及び放射特性に合致するように選択される。顕微鏡は対象物1を支持しており、励起後に、蛍光物質

10

20

30

40

50

からの光が対物レンズ2を通過して撮像平面(本明細書において代替的に瞳面とも呼ばれる)に達する。これは、例えば、カメラ3(又は他の撮像装置)において光の焦点を撮像平面3に合わせるチューブレンズ4を介してなされる。蛍光顕微鏡は、任意の既知の形態又は適した形態とすることができます。

【0027】

顕微鏡は、位相変更装置(この実施形態では、対物レンズと撮像平面3との間の屈折位相傾斜(phase ramp)5等)を含む。特に、示される実施形態では、この位相変更装置によって、ビーム経路の無限共役部分内において、対物レンズの1つの部分から進む放射体からの光と、別の部分から進む光との間の位相差が生じ、結果として撮像平面において各点放射体の画像が得られる。この画像は、連結しているか又は分離した2つのロープを含み、それらの分離度合いは、以下で更に参照されるように、対物レンズからの放射体の距離に依存する。この実施形態では、位相傾斜要素5は、光路内の、対物レンズの後方開口のレベルにある。位相傾斜は対物レンズの無限空間(この無限空間では焦点の合った光は概ね平行である)内で後方開口にあるか又は後方開口に近い。非無限の補正された顕微鏡では、位相傾斜は後焦点面/フーリエ平面の或る近似内に存在することができる。この実施形態では位相傾斜装置は屈折装置であるが、他の実施形態では位相傾斜装置(複数の場合もある)は反射装置又は分散装置とすることができます、これについてはより詳細に説明する。

10

【0028】

幾つかの実施形態では、追加のスペクトルフィルター素子9を位相傾斜5の前又は後に挿入することができる。こうすると、2つのロープの相対的な明るさは放射体のロケーション非依存特性に依存する。別の実施形態では、位相傾斜装置は付加的に薄膜コーティングするか、又は別の形で処置することができる。こうすると、2つのロープの相対的な明るさは、放射体のそのようなロケーション非依存特性に依存する。

20

【0029】

本発明の3D又は4Dの局在顕微鏡法の使用において、試料内の1つ又は複数の放射体が光活性化されるか又は光切替えされ、それによって蛍光を発し、特定の波長の光子を放出する。照明は幾つかのマーカーのみをランダムに励起し、各蛍光物質が(永久に又は可逆的に)退色した後、蛍光物質のうちの1つ又は複数のロケーションが求められる。各放射体のx軸位置及びy軸位置は、重心方程式によって直接、又は、コンピューター画像処理システムにおいて、PSFモデルをマーカー画像にあてはめることによって、マーカー画像の重心の測定値から得ることができる。1つの実施形態では、3Dモデルを画像にあてはめて、放射体のx軸位置、y軸位置、及びz軸位置の全てを同時に得ることができる。また、本発明によれば、z次元は、画像の伸長(image elongation)の度合い又は2つの画像ロープ間の分離の度合いから求められ、これは放射体と対物レンズとの間の距離に関係する。先行する較正中に、対象物面における1つ又は複数の放射体(蛍光ビーズ等)が撮像される。対物レンズは、それぞれ対象物面/放射体(複数の場合もある)から既知の距離にある位置間で移動され、それによって画像形状が変化し、画像形状と焦点距離との間の関係が展開される。相対的なz軸位置と画像形状とを相關付けるルックアップデータを展開することができる。このため、使用において、放射体画像の伸長の度合い、又は放射体画像のロープ間の分離の度合いが、その放射体の相対的なz軸位置を示し、放射体のz軸位置を求めることができる。使用において、上記のステップは、1組の複数の画像又は画像データ及び放射体ロケーション情報を取得するように繰り返され、この情報を用いて单一の3D画像又は3D表現を作成することができる。代替的に、ロケーション情報及び3D画像を、結果としての单一の画像から求めることができる。本発明の顕微鏡法システムはコンピューター画像処理システムを備えることができる。このコンピューター画像処理システムは、関係アルゴリズムを用いるか、又は相対的なz軸位置と画像形状とを相關付けるルックアップデータ若しくは上記で言及したようなモデルを記憶し、放射体画像形状から相対的なz軸放射体位置を求めるように構成される。1つの実施形態では、例えば、コンピューター画像処理システムは、画像形状を、画像のルックアップデータベース

30

40

50

からの最も適合する画像、又は焦点外れに依存する画像の数学的モデル若しくは数値モデルに合致させるように構成することができる。本発明の 4 D の粒子又は分子の追跡における使用において、放射体座標（幾つかの実施形態では x、y、及び z と、1 つ又は複数の他の放射体特性（放射体からの光のスペクトル成分、寿命、偏光状態（polarization）、等）を、画像の直接的なパラメータ化（画像重心、ロープ間の角度又は距離、及び関連する尺度）から推定することができる。

【 0 0 3 0 】

図 2 a は、1 つの側に瞳面の垂直方向の位相変化を有さず、別の側に線形位相傾斜を有する瞳面を表している。図 2 b は、これに類似した、1 つの側に複数の位相傾斜を有する瞳面を表している。図 2 d は、瞳面の 2 つの側において互いに等しく反対向きの位相変化を有する瞳面を表している。図 2 e は、1 つの側に瞳面の垂直方向に一定の非ゼロ位相変化を有し、別の側に線形位相変化を有する瞳面を示している。図 2 c は、放射体と顕微鏡対物レンズとの間の距離の変動が、本発明のシステムにおいて放射体画像の 2 つのロープの相対位置にどのように影響を及ぼし得るかを示している。対物レンズと放射体との間の距離が、撮像システムの焦点が合うようになっているとき、図 2 c 内の中央画像において示されるように、2 つのロープ間の軸（たとえば軸 N - P）に沿った 2 つのロープ間に存在する分離は、ゼロ又は最小となる。放射体が対物レンズにより近いか、又はより遠いとき、正又は負の焦点外れが生じ、この軸に沿った 2 つのロープ間の分離も変化し、示される実施形態では、それぞれ図 2 c の右側及び左側のそれぞれの 4 つの画像に示すように、分離は示されるような対物レンズからの放射体の距離に比例して増大する。図 3 は、これを更に説明する概略的な例である。図 3 a は、焦点の合った画像における 2 つの焦点の合ったロープを示している。これらのロープは、1 つの軸においてのみ（図では軸 L S において垂直に）分離している。分離の度合いは位相傾斜の峻度に依存し、正及び負の焦点外れを有して一定のままである。図 3 b 及び図 3 c は、それぞれ負及び正の焦点外れを有して、直交軸 O S において分離した 2 つの画像ロープを示しており、図 3 の例における分離の度合いは F D S で示され、焦点外れが正であるか又は負であるかに依存して、この軸に沿った方向に示される。このため、負の焦点外れを引き起こす対物レンズからの放射体距離により、一方の画像ロープは焦点の合った位置から軸に沿って 1 つの方向に位置決めされ、他方の画像ロープは焦点の合った位置から軸に沿って反対方向に位置決めされる。正の焦点外れを引き起こす対物レンズからの放射体距離により、画像ロープは、焦点の合った位置から軸に沿って、負の焦点外れの場合とは反対方向に分離される。焦点の変更を伴う軸に沿った画像ロープの「移動」は、ほぼ線形であるか、又は実質的に線形である。

【 0 0 3 1 】

図 4 は、反射性位相変更装置を利用する、本発明の代替的な実施態様を示している。図 4 において、類似した参照番号は、図 1 と類似した要素を示す。反射面 6 は、対物レンズ共役面に、若しくはその近くに配置され、後焦点面の半分が、他方に対し線形位相勾配（linear phase gradient）を受けるような形状にされる。別の実施形態では、位相傾斜は、後焦点面の半分が、互いに対し線形位相勾配を受けるよう、互いに対し傾くように構成された複数の平面鏡からなることができる。別の実施形態では、位相傾斜は、後焦点面の半分が、互いに対し線形位相勾配を受けるように駆動された変形可能なミラーからなることができる。変形可能なミラー（又は同様の位相制御装置）は、位相パターンの重ね合わせを用いて（光学系及び / 又は試料の）収差、及び後焦点面の 2 つの上記半分間の位相勾配を補正することができる。反射性位相傾斜を備えるシステムの利点は、各鏡面の相対角度を変動させることによって、初期ロープ分離を容易に調整又は設定することができる。そのような調整は、いくつかの方法で達成することができる（調整可能なミラーマウント用いて手動で、又は、圧電起動式マウント（piezo-activated mount）、デジタルマイクロミラー装置、又は同様の装置を用いて電子的に）。このように初期ロープ分離を調整又は設定することができることは、十分に大きなロープ分離（したがってロバストな軸識別）と、同時にアクティブである様々な放射体画像間の分離との任意のトレードオフを最適化するのに有用とすることができます（ロープ分離を増大することによって、

10

20

30

40

50

単一の分子信号の「足あと」が増大し、このため、単一放射体を確実に分離することができるようとするための、それらの単一放射体間の距離が増大する）。変形可能なミラーを用いることによって、位相傾斜を、適応制御光学を通じた撮像収差の補正と組み合わせることが可能になる。

#### 【0032】

図5aは、分散性位相変更装置（特に、2つの分散性位相傾斜を備える位相マスク）を利用する代替的な実施形態を示している。2つの分散性位相傾斜は、対物レンズ2とチューブレンズ4との間に位置決めすることができ、一方は高分散性位相傾斜9であり、一方は、高分散位相マスク9によって生じる過度な勾配の影響を低減する低分散位相マスク10である（図5cに示す）。位相傾斜は分散性の材料(dispersive materials)から作製されるので、生じる位相勾配の峻度は、位相傾斜を通って進む光の波長に依存する。この結果、初期ロープ分離において波長に依存した変化が生じる。初期ロープ分離は、焦点外れとともに生じるロープ位置の変化に直交するので、点放射体画像のスペクトル成分及び空間成分の双方を独立して求めることができ、したがって撮像対象物の色及びz軸における放射体の相対位置を求めることが可能である。幾つかの実施形態では、光は比較的小さな偏向角度でこれらの分散性位相マスクを通って進むことができ、他の実施形態では、分散性要素は（例えばプリズムを用いるとき）、より大きな偏向角度を発生させることができる。z軸における相対的な放射体位置と、ロープ分離における直交変化からの別の放射体特性（スペクトル成分、偏光、又は寿命等）との間の分離の原理は、任意の特性（ただし、位相勾配の峻度を、その放射体特性に特徴的に依存させることができる、そのような特性）に拡張することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0033】

図6は、分散面、例えば回折格子11からの反射を用いる位相変更装置を備える代替的な実施形態を示している。十分な波長依存性を提供するのに必要とされ得るような、任意の過度の位相勾配を、追加の平面鏡面12を用いて巻き戻す(unwind)ことができる。対物レンズ後焦点面の両半分に回折格子及び平面鏡を配置することによって、より単純な構成を達成することができる。

#### 【0034】

図7は、本発明の3D又は4D局在顕微鏡法の一実施形態の画像解析アルゴリズムのフローチャートである。未加工画像を取得した後、最初に測定されたカメラ特性を用いて未加工画像内のオフセットが取り除かれ、画像の較正が光電子の観点から実行される。次に、較正された画像から背景画像を減算することによって、較正された画像に対し背景除去プロセスが実行される。背景画像は、現在較正されている画像に画像系列内で先行する、較正済みのN個の画像の平均を計算することによって推定することができる。較正プロセスの後に、較正された画像の各ピクセル内の光電子数の平方根を計算することによって、信号対雑音(SNR)推定値も得られる。単一点放射体の回折の効果を除去するために、用いられている撮像システムの測定されたPSFに関するデコンボリューション(deconvolution)が、較正された画像のSNR推定値および背景補正された画像のために必要とされる。デコンボリューションプロセスは、ウィナーフィルター、又はPSFを用いた相関、又は最尤(ML)デコンボリューションのうちの任意のものによって複数ロープPSF収差を除去する。次に、デコンボリューションされたSNR推定値は、しきい値係数(threshold factor)を乗算される。これによって、使用において検出をロバストにし、ユーザーによって異なる画像状態にわたってしきい値を変更する必要をなくすことができる。次に、SNRベースのしきい値が画像をフィルタリングするのに用いられ、しきい値よりも大きな値のみが画像内で選択される。その後、画像の二値マスキング及び標識付けが実行され、画像上の連続領域が特定され、各連続領域の中央の輝度が計算され、その結果、開始位置のリストが得られることになる。一方、開始位置のリストは、PSFのロープ特性の結果生じる残余誤検出も含む場合があり、誤検出を除去し、図8に示される「デバウンス」手順によって開始位置のクリーンなリスト(clean list)を生成する必要がある。次に、開始位置のクリーンなリストは、図9によって表される「あてはめ」プロセスを

受ける。ここで、リスト内の各開始位置は、用いられている顕微鏡の測定されたPSFから導出された補間モデルを用いて補間される。次に、あてはめられた位置のリストを用いて3D画像を生成することができ、これはユーザーに表示することができる。

#### 【0035】

図8は、開始位置のリスト内に含まれる誤検出を破棄するデバウンス手順を示している。まず、リスト内の全ての開始位置、及び或る特定の範囲内にあるそれらの近傍点の情報が得られる。この範囲はPSFサイズよりも僅かに大きいことが好ましい。以前のステップからのデコンボリューションされた画像も背景を除去され較正されており、各開始位置及びその近傍点の輝度情報を抽出するのに用いられる。開始位置の輝度がその近傍点の輝度よりも大きい場合、選択された開始位置が誤検出でないと結論付けることができる。開始位置の輝度がその近傍点の輝度未満である場合、開始位置は誤検出である場合があり、リストから破棄されることになる。次に、リスト内の次の開始位置が同じ方法を用いて処理される。これは、リスト内の全ての開始位置が検査され、誤検出のない開始位置のクリーンなリストが得られるまで行われる。

10

#### 【0036】

図9は、あてはめプロセスの表現であり、このあてはめプロセスの間、顕微鏡の測定されたPSFから導出された補間モデルが、各開始位置のロケーションにおいて画像データにあてはめられる。補間モデルは、線形補間、三次スプライン補間、又はフーリエ領域シフトのうちの1つ又は複数によって実施することができる。あてはめされる開始位置ごとに、較正され背景補正された画像からデータROI情報が、較正された画像のSNR推定値からSNR ROI情報が、それぞれ抽出される。SNR ROIは、あてはめ手順の開始パラメータを推定するにも用いられる。PRIの場合、ROIの角度モーメントを用いて開始z値を得ることができる。次に、各開始位置のあてはめプロセスが、補間モデル、データROI(データ)、SNR ROI(重み)、及び開始パラメータを用いて実行される。あてはめプロセスは、重み付き最小二乗問題を解いて適合する位置を特定するレーベンバーグ-マルカートソルバ(Levenberg-Marquadt solver)によって実施することができる。あてはめプロセスは、最良適合位置のリストが推定されるまで、各開始位置において実行される。

20

#### 【0037】

##### [実験(Experimental)]

30

実験的な研究の以下の説明によって本発明を更に説明する。

##### 【実施例】

#### 【0038】

##### 【実施例】

##### 材料及び方法

##### [細胞単離及び標識付け]

成体ラットから心室筋細胞を酵素によって単離し、2%のパラホルムアルデヒドで10分間にわたって固定した。次に、心室筋細胞は、標準的な免疫蛍光プロトコルに従って、マウス内で生じた一次抗体(T4026, Sigma-Aldrich, ニュージーランド)を用いてチューブリンについて標識付けられ、A1exa680が二次的に標識付けた(A21058, Molecular Probes/Invitrogen, ニュージーランド)。標識付けられた細胞を、グリセリン及びPBSの80:20の混合物における0.5mg mL<sup>-1</sup>グルコースオキシダーゼ、40μg mL<sup>-1</sup>カタラーゼ、10% (w/v)グルコース、及び50mMのメルカプトエチルアミンからなる「スイッチングバッファ(switching buffer)」(全てSigma-Aldrich, ニュージーランド、から得られる)にマウントした。

40

#### 【0039】

##### [撮像]

蛍光検出のために、60倍の1.47NA TIRF対物レンズを有する変更されたNikon TE2000顕微鏡、及びAndor Ixon DV887DCS-BV EMCCDカメラを用いて撮像を実行した。急傾斜の平面照明を、671nmのレーザー光源とともに用い、約10<sup>9</sup>W/m<sup>2</sup>の焦点面輝度を得

50

た。フレームあたり 40 ms の積分時間を用いて再構成ごとに約 20000 個のフレームを撮影した。圧電焦点合わせ装置 (piezo focuser) (Physik Instrumente、ドイツ) を用いて焦点合わせを実行し、200 nm の軸ステップサイズを有する z スタックを取得した。z スタックは、1.2 μm の範囲にわたる 7 個の軸位置を含んでいた。試料退色が異なる平面内で観察される信号量に影響を及ぼさないことを確実にするために、焦点が前後に (z レベルあたり 100 フレームの、退色レートと比較して) 迅速に動かされる z サンプリング戦略を用い、各軸位置に対応する面を画像捕捉の完了後に照合した。試料内の PSF ロープ分離  $s$  を達成するのに必要な角度を、光線光学から、 $= s M / (f_T (n - 1))$  として推定した。ここで、M は対物レンズの倍率であり、 $f_T$  は対物レンズ設計チューブ長 (objective design tube length) (ここでは Nikon CF160 対物レンズの場合 200 mm) であり、n はスライドガラス (glass slide) の屈折率 (1.51) である。このため、小さいが 60 倍の対物レンズで良好に分解可能な約 400 nm のスポット分離を、スライド面間の約 50 秒角の角度で達成することができる。顕微鏡スライドガラスの 2 つの表面が非常に平坦であるが完全に平行ではないことを利用して位相マスクが作成される。小さいが 60 倍の対物レンズで良好に分解可能な約 400 nm のスポット分離を達成するには、2 分角 ~ 3 分角の通常のスライド平行度公差内に十分入る 50 秒角の角度で十分である。スライドのボックスを検査することによって、スライドがフィルター交換器の下に挿入されて対物レンズの後方開口の半分を占め、それによって瞳面の半分を占め、分岐した PSF が生じるときに適切な位相勾配を引き起こす幾つかのスライドを得た。位相傾斜が厳密に瞳面内ではなく、現代の無限補正対物レンズ (modern infinity-corrected objective) の裏の「無限空間」 (試料内の点光源からの光が本質的にコリメートされる) 内のいずれかの場所にあるとき、依然として効果が観察された。これによって、瞳面を再撮像する必要がなくなり、使用されていない DIC 解析器スロット内のフィルター交換器の後の好都合なロケーションに位相傾斜を位置決めすることが可能になった。

#### 【0040】

非点収差撮像について、軸が 500 mm の組み合わされた焦点距離 (combined focal length) を与えるように位置合わせされた 2 つの 1 ジオプター ( $f = 1 \text{ m}$ ) 検眼士非点収差検眼レンズ (optometrists astigmatic trial lenses) を、カメラピクセルサイズを顕微鏡の倍率に合致させるのに用いられる望遠鏡内のビーム経路内に挿入した。

#### 【0041】

双方の場合に、直径 200 nm の複数の暗赤色の蛍光ビーズ (F-8807, Invitrogen, ニュージーランド) の画像を位置合わせし、平均をとることによって、実験的な PSF を得た。ビーズサイズは、一見してあてはめプロセスに悪影響を及ぼさなかった。

#### 【0042】

##### [データ解析]

単一分子の位置を、補間された測定された PSF の、撮像データへのレーベンバーグ - マルカート重み付き最小二乗あてはめを実行することによって抽出した。3 つの異なる補間戦略 (すなわち、フーリエ領域シフト、三次スプライン補間、及び単純線形補間) を調査した。フーリエ領域シフトを用いて得られた結果と三次スプライン補間法を用いて得られた結果との間で大きな差は観察されなかった。線形補間がはるかに最も高速であった。あてはめアルゴリズムにおいて用いられる重み付けは、任意の所与のピクセルにおける計算された雑音 (ポアソン過程、電子倍増過程、及び読出し雑音過程を考慮に入れる) に対応し、収束時の共分散行列の解析から、あてはめ誤差の推定値が得られることを可能にする。

#### 【0043】

##### [画像再構成]

各局在事象をガウス分布としてレンダリングすることによって、図 10 b に示すような深度が符号化された射影画像を得た。ここで、色はそのあてはめられた z 位置に対応し、標準偏差は平均横方向局在精度に等しい。次に、結果としての画像を、GIMP 画像編集

10

20

30

40

50

プログラムを用いて穏やかに輝度飽和させ、弱い構造の視認性を向上させた。3Dガウス分布として各事象をレンダリングすることによって、3Dボリュームデータを得た。ここで、横方向及び軸方向の標準偏差は、横方向及び軸方向の事象の推定局在誤差に対応する。定位位置の位相プレートを用いて得られた広視野画像は劣化し、ゴーストを発生させるアーチファクトを示す。通常の広視野PSFの横方向及び軸方向の標準偏差に対応する横方向及び軸方向の標準偏差を用いて、同じ励起波長で各事象をレンダリングすることによって、局在事象から、従来の回折制限された解像度のボリュームデータを再構成した。OpenDX([www.opendx.org](http://www.opendx.org))を用いてボリュームデータの等値面レンダリングを実行した。

## 【0044】

10

図10aは、位相傾斜と、PSFに対するその影響とを示している。先行する較正中、PSFは200nmの蛍光ビーズを撮像することによって記録された。様々な焦点外れ値でかつ3DレンダリングされたPSF画像内に見られるような2つのロープの焦点に依存した動きに留意されたい。図10cは、スライドガラス上に固定化されたAllexa680標識付け抗体から得られたz位置のヒストグラムである。これらの点の最大値の半分の拡がりにおける幅全体は、軸方向解像度に約82nmの上限を課す。図10bは、本発明の方法を用いて捕捉された、ラット心筋細胞におけるチューブリンのz射影再構成である。深度は、パネルDに示すルックアップテーブルに従って符号化された色である。スケールバー1μm(Scale bar 1μm)。図10dは、図10bの点線領域に対応する再構成画像のエリアの等値面図である。従来の回折制限された解像度の再構成が比較のために示される。本発明の方法の3次元全てにおいて大幅に改善した解像度が明確に示される。

20

## 【0045】

図11は、位相傾斜PSFを、直径200nmの3つの暗赤色の蛍光ビーズの一連の画像にあてはめることによって得られた実際の焦点外れ及び結果を示している。1つのビーズからの位置データを用いて残留ドリフトを補正し、10フレームトップハットフィルターを通してフィルタリングした。ゼロ焦点外れにおけるビーズごとのz局在の測定スプレッド(標準偏差(std.dev.))は約9nmであり、あてはめ残余に基づく推定平均局在誤差と良好に合致した。

## 【0046】

30

図12a及び図12bを参照すると、本発明の方法を非点収差検出と比較するために、心筋細胞におけるチューブリンの取得からの焦点外れの関数として、推定局在誤差、及び適合事象数がプロットされている。それぞれの平均輝度を中心とした狭い(10%)輝度窓内に入る事象のみが選択される。これによって、検出の輝度依存性に起因した影響が複雑になることが回避される。「局在可能な」事象数及び関連する局在誤差数の双方が、非点収差よりも位相傾斜撮像について、より大きい軸方向範囲にわたって妥当な範囲内にとどまった。

## 【0047】

## [実施例2]

図13は、本方法(PR1)の軸方向局在精度と、2つの既存の3D局在法、すなわち非点収差検出及び二方向検出の軸方向局在精度との理論的比較を示している。精度を比較するために、3つの方法の点拡がり関数をシミュレートし、クラメリ-ラオ下限を計算するのに用いた。これは、点拡がり関数形状に含まれる情報に基づき、所与の雑音条件下の可能な限り最小の局在誤差(完全な解析アルゴリズムを用いて得られるもの)を表す。雑音計算のために、雑音がポワソン統計に従い、各蛍光分子から合計2000個の光子が検出されると仮定した。本発明の方法は、他の方法と比較して、より優れた軸方向精度および全体にわたる3D精度を有するものとして示されることを見てとることができ、横方向精度がより広い軸範囲にわたって維持されることを見てとることができる。

40

## 【0048】

## [実施例3]

図14は、2つのロープの相対振幅に対する波長依存を、光学フィルターを用いて生成

50

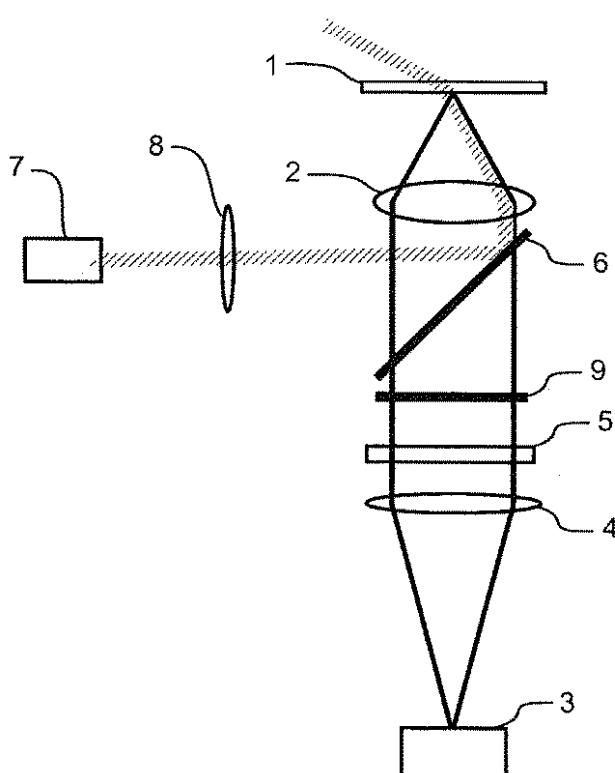
することができる事を示している。実験的な撮像システム（これ以外では実施例1において概略が示されたようなもの）において、位相傾斜が瞳面の半分に挿入され、ロングパス干渉フィルターが残る半分に挿入された。この構成は、3つの異なる色において蛍光ビーズを撮像するのに用いられ、これらのビーズタイプのそれぞれに対応する点拡がり関数を通じた焦点の合った部分が図14a～図14cに示されている。各PSFの中心を通る線プロファイルが図14dとしてプロットされ、異なるビーズタイプがそれらの相対的なローブ高さによって明確に区別可能であることを示している。

## 【0049】

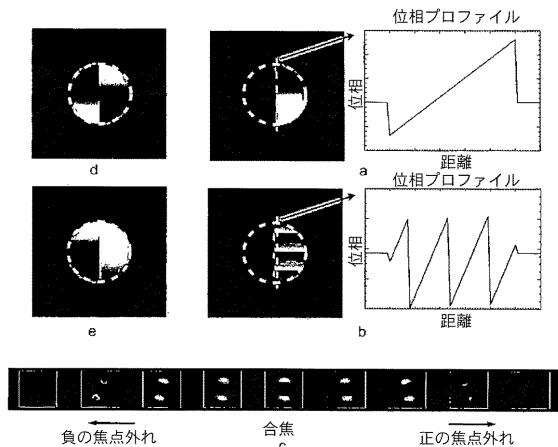
上記は、本発明の好ましい実施形態を含めて本発明を説明している。当業者に明らかとなる代替形態及び変更形態は、添付の特許請求の範囲において規定されるような本発明の範囲内に組み込まれることが意図される。

10

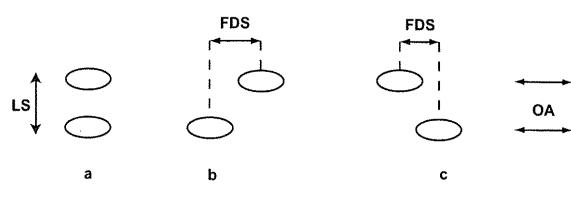
【図1】



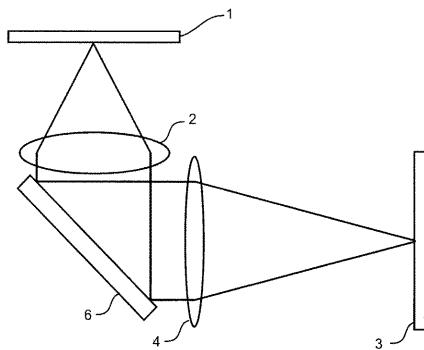
【図2】



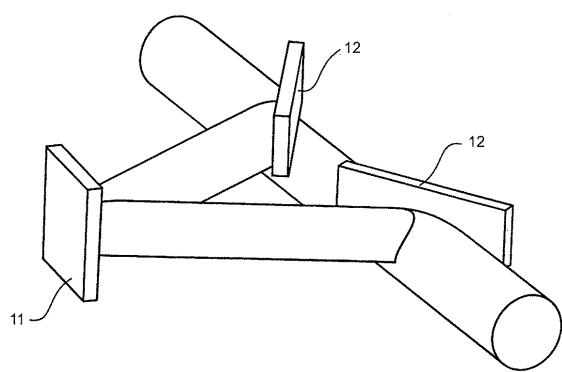
【図3】



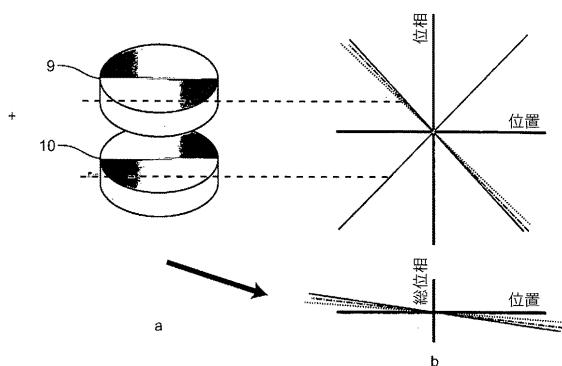
【図4】



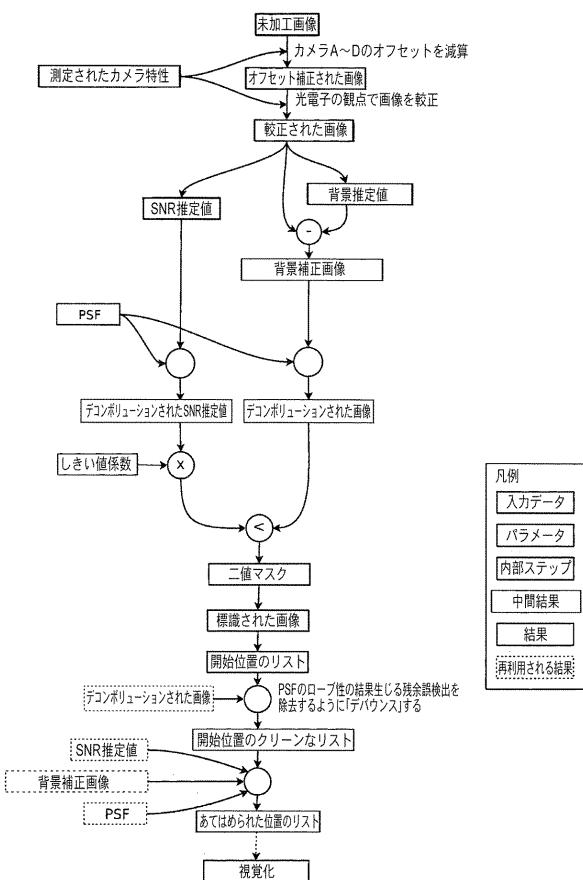
【図6】



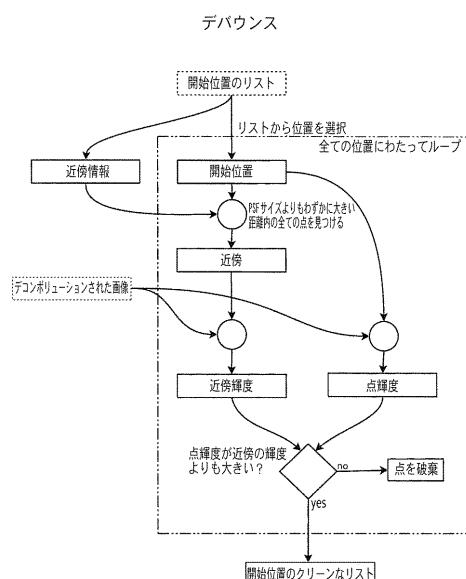
【図5】



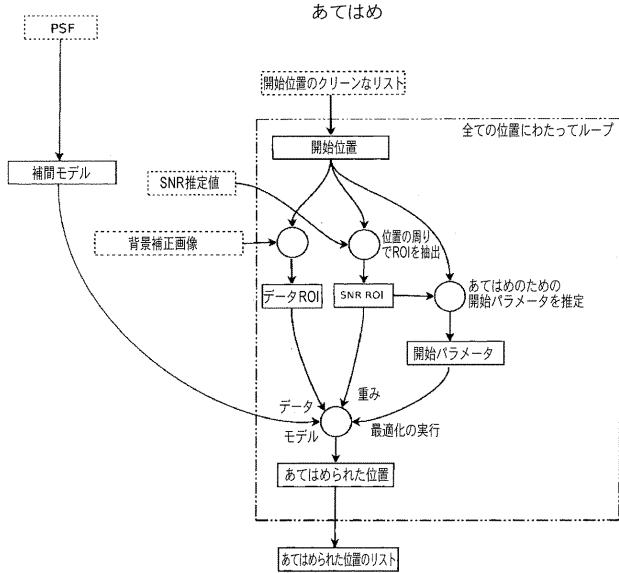
【図7】



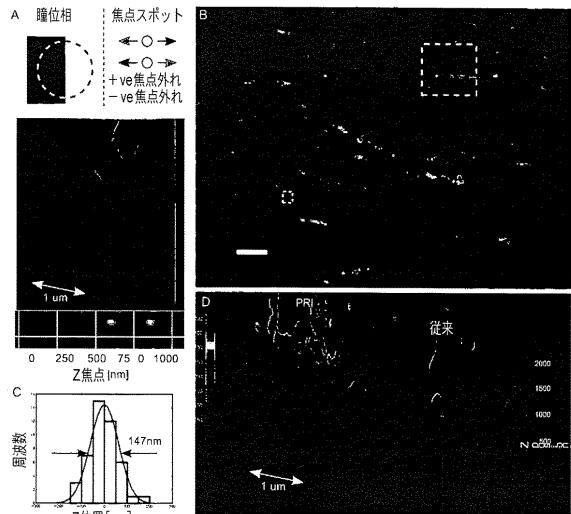
【図8】



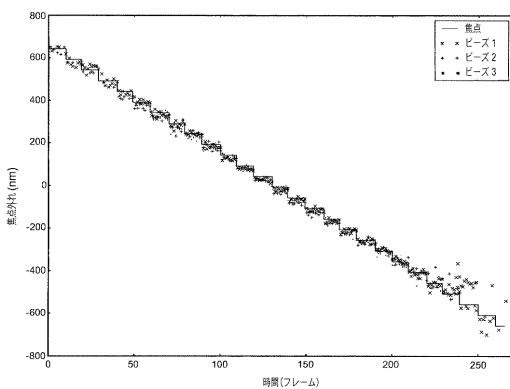
〔 図 9 〕



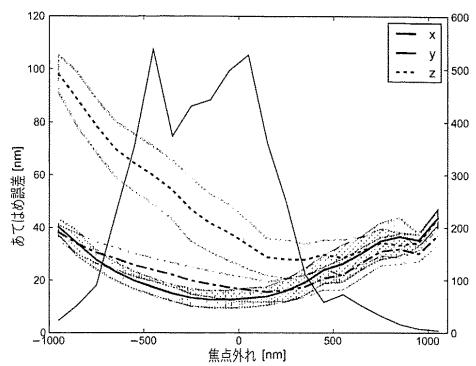
【 図 1 0 】



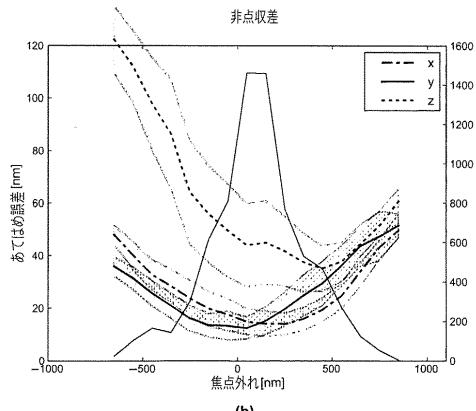
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

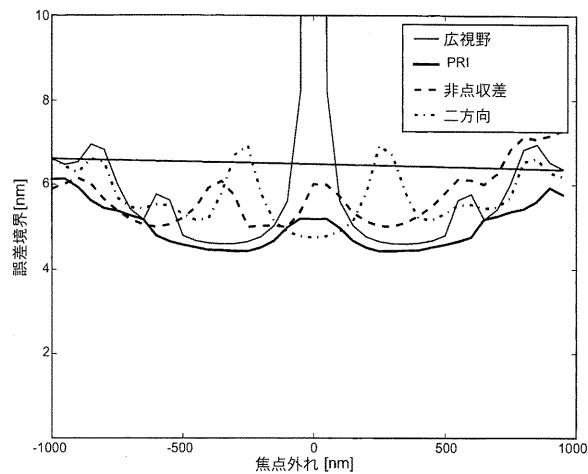


(a)

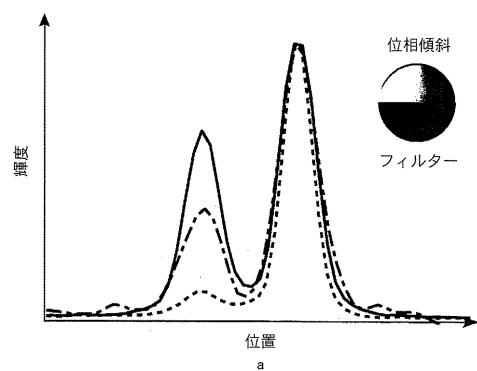
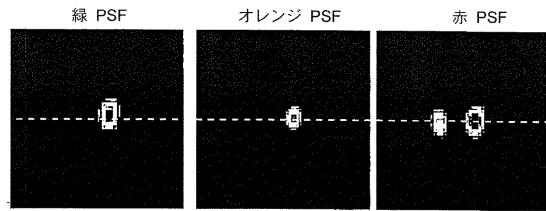


(b)

【図 1 3】



【図 1 4】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/NZ2011/000200

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. G02B21/16 G02B21/36 G01N21/64  
ADD.

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)  
G02B 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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/137059 A1 (PIESTUN RAFAEL [US] ET AL) 12 June 2008 (2008-06-12) cited in the application  the whole document & US 7 705 970 B2 (PIESTUN RAFAEL [US] ET AL) 27 April 2010 (2010-04-27) ----- A WO 2006/127692 A2 (HESS HARALD F [US]; BETZIG ROBERT E [US]) 30 November 2006 (2006-11-30)  abstract figures 1-4 ----- ----- -/-	1,9-14, 20,26, 27, 29-32,42
A	----- ----- ----- ----- -----	1,9-14, 20,26, 27, 29-32,42

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

Date of mailing of the international search report

10 May 2012

23/05/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Windecker, Robert

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/NZ2011/000200

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims No.:

1-14, 20, 26, 27, 29-32, 42-51

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims No.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NZ2011/000200

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/085218 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; ZHUANG XIAOWEI [US]; HUANG BO [US]; BATES WILFRE) 9 July 2009 (2009-07-09) abstract; figures 1A-1C -----	1,42
A	US 2009/242798 A1 (BEWERSDORF JOERG [US] ET AL) 1 October 2009 (2009-10-01) abstract; figures 1,2 -----	1,42
X	SRI RAMA PRASANNA PAVANI ET AL: "Polarization sensitive, three-dimensional, single-molecule imaging of cells with a ?double-helix system", OPTICS EXPRESS, vol. 17, no. 22, 26 October 2009 (2009-10-26), page 19644, XP55026662, ISSN: 1094-4087, DOI: 10.1364/OE.17.019644 the whole document -----	1-8, 42-51
X	SRI RAMA PRASANNA PAVANI ET AL: "Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system", OPTICS EXPRESS, vol. 16, no. 26, 22 December 2008 (2008-12-22), page 22048, XP55026789, ISSN: 1094-4087, DOI: 10.1364/OE.16.022048 the whole document -----	1-3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/NZ2011/000200

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 2008137059	A1	12-06-2008	NONE		
WO 2006127692	A2	30-11-2006	CA	2609653 A1	30-11-2006
			EP	1894010 A2	05-03-2008
			EP	2453237 A1	16-05-2012
			EP	2453238 A1	16-05-2012
			EP	2453239 A1	16-05-2012
			EP	2453240 A1	16-05-2012
			EP	2453241 A1	16-05-2012
			JP	4709278 B2	22-06-2011
			JP	2008542826 A	27-11-2008
			JP	2011039065 A	24-02-2011
			US	2008068588 A1	20-03-2008
			US	2008068589 A1	20-03-2008
			US	2008070322 A1	20-03-2008
			US	2008070323 A1	20-03-2008
			US	2008111086 A1	15-05-2008
			US	2009206251 A1	20-08-2009
			US	2010181497 A1	22-07-2010
			US	2011102787 A1	05-05-2011
			WO	2006127692 A2	30-11-2006
WO 2009085218	A1	09-07-2009	CN	101918816 A	15-12-2010
			EP	2232244 A1	29-09-2010
			JP	2011508214 A	10-03-2011
			US	2011002530 A1	06-01-2011
			WO	2009085218 A1	09-07-2009
US 2009242798	A1	01-10-2009	EP	2265932 A1	29-12-2010
			US	2009242798 A1	01-10-2009
			US	2010265318 A1	21-10-2010
			US	2011025831 A1	03-02-2011
			WO	2009146016 A1	03-12-2009

International Application No. PCT/ NZ2011/ 000200

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 9-14, 20, 26, 27, 29-32, 42

A 3D localisation microscopy system with a rotating PSF.

---

2. claims: 2-8, 43-51

A 4D localisation microscopy system which acquires 3D spatial coordinates and an additional location independent property of the emitter.

---

3. claims: 15-19, 21-25

A 3D or 4D localisation microscopy system with an optimised phase ramp.

---

4. claim: 28

3D or 4D localisation microscopy system with a phase ramp that allows an independent determination of spectral and spatial components.

---

5. claims: 33-41

A 3D or 4D localisation microscopy system with an improved image processing system.

---

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人 100147500

弁理士 田口 雅啓

(74)代理人 100166235

弁理士 大井 一郎

(74)代理人 100179914

弁理士 光永 和宏

(72)発明者 ゾエラー、クリスティアン

ニュージーランド国、1071 オークランド、ミッション・ベイ、コミニズ・クレセント 44

(72)発明者 バデリー、ダーヴィト・ミヒヤエル

ニュージーランド国、1005 オークランド、オラケイ、ンガイオ・ストリート 10

(72)発明者 キャネル、マルク・ブライデン

ニュージーランド国、1050 オークランド、レムエラ、ベル・ロード 19

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA05 DA01 EA01 FA02 HA01 HA09 JA02 KA09

LA03

2H052 AA03 AA09 AB24 AC04 AC10 AC27 AC34 AF14 AF21 AF25