

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7236381号
(P7236381)

(45)発行日 令和5年3月9日(2023.3.9)

(24)登録日 令和5年3月1日(2023.3.1)

(51)国際特許分類 F I
 G 0 2 B 21/06 (2006.01) G 0 2 B 21/06
 G 0 1 N 21/64 (2006.01) G 0 1 N 21/64 E

請求項の数 12 (全25頁)

(21)出願番号	特願2019-522395(P2019-522395)	(73)特許権者	513072123 カール・ツァイス・マイクロコピー・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング Carl Zeiss Microscopy GmbH ドイツ連邦共和国、07745 イエーナ、カール・ツァイス・プロメナーデ 10 Carl - Zeiss - Promenade 10, 07745 Jena, Germany
(86)(22)出願日	平成29年10月20日(2017.10.20)	(74)代理人	100110423 弁理士 曾我 道治
(65)公表番号	特表2019-536086(P2019-536086 A)	(74)代理人	100111648
(43)公表日	令和1年12月12日(2019.12.12)		
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/076824		
(87)国際公開番号	WO2018/077738		
(87)国際公開日	平成30年5月3日(2018.5.3)		
審査請求日	令和2年9月28日(2020.9.28)		
(31)優先権主張番号	102016120683.0		
(32)優先日	平成28年10月28日(2016.10.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	ドイツ(DE)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シングルプレーンイルミネーション顕微鏡

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

光シート顕微鏡であって、

- 媒質内に入れて、平面の基準面(3)に平行な試料キャリア(2)の上に置かれた試料(1)を、照明ビーム経路を介して、光シートであって、前記基準面(3)の法線とゼロ以外の照明角度をなす光シート平面を有する光シートで照明するための照明用光学ユニットと、
 - 前記試料キャリア(2)の領域において前記基準面(3)の法線とゼロ以外の検出角度をなす光軸(5)を持つ検出ビーム経路を有する検出用光学ユニットと、
 - 特定の厚さの特定の材料から製作され、前記照明用及び検出用光学ユニットから前記媒質を分離する少なくとも1層を持つ分離層システムであって、少なくとも照明及び検出のために到達可能な領域において、前記基準面(3)に平行な底面によって前記媒質と接触する分離層システムと、
 - 検出されるべき光又は前記試料(1)を照明するための光が前記分離層システムの界面を通じて斜めに通過することにより生じる収差を軽減させるための、前記照明及び/又は前記検出ビーム経路内の少なくとも1つの補正素子と、
- を含む光シート顕微鏡において、
- 前記光シート顕微鏡は、前記試料(1)に、前記光シート平面内の実質的に点状の区域、又は前記光シート平面を少なくとも一時的に含む特定の体積において、少なくとも1つの操作ビーム経路を介して光を衝突させるための、前記光シートの生成とは独立した、

10

20

操作のための手段を含み、

前記照明用光学ユニットは、照明用対物レンズ（01）を含み、

前記検出用光学ユニットは、検出用対物レンズ（02）を含み、

前記操作のための手段は、特定の強度分布の光を前記試料に衝突させるための第1の空間光変調器（23、41）と、前記操作ビーム経路内の専用の操作用対物レンズ（03）とを含み、

前記操作用対物レンズ（03）は、その光軸が前記基準面（3）の法線と平行になるように配置される

ことを特徴とする光シート顕微鏡。

【請求項2】

前記照明用対物レンズ（01）と前記検出用対物レンズ（02）とは、同じ構成であることを特徴とする、請求項1に記載の光シート顕微鏡。

【請求項3】

前記照明用対物レンズ（01）又は前記検出用対物レンズ（02）のいずれか一方が、前記操作のための手段として操作を行うことを特徴とする、請求項1または2に記載の光シート顕微鏡。

【請求項4】

前記操作のための手段は、前記試料（1）の個別の実質的に点状の区域に時間的に連続して光を衝突させるためのポイントスキャナ又は、前記試料（1）の複数の実質的に点状の区域に時間的に連続して光を衝突させるためのマルチポイントスキャナを含み、そのそれぞれの点状の区域に光が同時に衝突することができることを特徴とする、請求項1～3のいずれか一項に記載の光シート顕微鏡。

【請求項5】

前記操作のための手段は、特定の振幅分布を前記特定の強度分布の光に付加するための第2の空間光変調器を含むことを特徴とする、請求項1に記載の光シート顕微鏡。

【請求項6】

前記操作のための手段は、特定の強度分布の光を生成するためのデジタルマイクロミラーアレイ（27）を含むことを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項に記載の光シート顕微鏡。

【請求項7】

前記第1の空間光変調器（23）、前記デジタルマイクロミラーアレイ（27）、又はその両者の組合せの間を切り換えるためのスイッチング手段を含む、請求項6に記載の光シート顕微鏡。

【請求項8】

前記検出用対物レンズ（02）が前記操作のための手段として操作を行い、

前記第1の空間光変調器（23）の第1の領域（29）は特定の強度又は振幅分布の光を前記試料に衝突させるために、及び補正素子として具現化され、

前記第1の空間光変調器（23）の第2の領域（30）は前記検出ビーム経路内の補正素子としてのみ具現化され、

前記検出されるべき光を前記第2の領域（30）へと、且つ前記操作に使用される前記光を前記第1の領域（29）へと案内するための偏向手段が提供される、請求項1～7のいずれか一項に記載の光シート顕微鏡。

【請求項9】

前記偏向手段は、相互に関して平行に配置される活性光学面を有するダイクロイック素子（31）を含み、前記検出ビーム経路は前記操作に使用され、検出されるべき前記光がそれぞれ前記ダイクロイック素子（31）へと2回案内され、前記それぞれの領域への偏向は前記ダイクロイック素子（31）の厚さにより実現されることを特徴とする、請求項8に記載の光シート顕微鏡。

【請求項10】

前記照明用対物レンズ（01）が前記操作のための手段として操作を行い、

10

20

30

40

50

前記照明用光学ユニットは前記第 1 の空間光変調器 (4 1) を含み、その上に前記光シートの生成のための位相パターンが光シート生成領域 (4 3) において転写され、特定の強度分布の光を前記試料に衝突させるための位相パターンが操作領域 (4 2) に転写されることと、前記照明用光学ユニットは、前記操作のための前記光を前記操作領域 (4 2) のみへと、且つ前記光シートの生成のための光を前記光シート生成領域 (4 3) のみへと偏向させるための手段を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の光シート顕微鏡。

【請求項 1 1】

操作の光の光源、波長、及び強度は二光子及び多光子遷移を励起するように設計されることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の光シート顕微鏡。

10

【請求項 1 2】

操作に使用される前記光の強度の、前記操作ビーム経路の軸に沿った軸方向の局在化のために、時間的フォーカシングのための機構が提供されることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の光シート顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料を照明する照明用光学ユニットを含む光シート顕微鏡に関する。試料は媒質、例えば液体内又はゲル内に入れて試料キャリア上に置かれる。試料キャリアはここで、平坦な基準面に平行であり、この基準面は例えば、試料キャリア、例えば特定の厚さの平行平面ガラス板又は、壁と、前記基準面に平行な透明の底部を有する相応の容器が置かれる試料ステージの平面とすることができる。容器は開放していても、透明なカバーガラスで閉じられてもよい。照明用光学ユニットは、照明ビーム経路を介して試料を照明する機能を果たし、照明は、基準面の法線とゼロ以外の照明角度をなす光シート平面を有する光シートを使って行われる。光シート顕微鏡は、試料キャリアの領域内で基準面の法線とゼロ以外の検出角度をなす光軸を持つ検出ビーム経路を有する検出用光学ユニットをさらに含む。検出及び照明角度間の角度は 90° であることが多いが、これは必須の仕様ではない。

20

【0002】

光シート顕微鏡はまた、分離層システムをさらに含み、これは特定の厚さの特定の材料から製作され、その中に試料が置かれる媒質を照明及び検出用光学ユニットから分離する少なくとも 1 層を有する。分離層システムはここで、少なくとも照明及び検出のために到達可能な領域において、基準面に平行なベース面によって媒質と接触している。倒立光シート顕微鏡の場合、照明及び検出が試料の下に配置され、試料容器又は試料キャリア板の透明な底部は、底部と光学ユニットとの間に配置された空気層又は浸漬媒質と共に分離層システムを形成する。上から観察すると、例えば試料容器の透明な蓋は、空気層又は浸漬媒質と共に蓋と照明及び検出用光学ユニットとの間に分離層システムを形成する。

30

【0003】

照明及び検出用光学ユニットは基準面の法線とゼロ以外の角度をなすため、少なくとも 1 つの補正素子が照明及び / 又は検出ビーム経路内に配置されて、検出されるべき光又は試料を照明するための光が分離層システムの界面を斜めに通過することにより生じるこのような収差が低減化される。

40

【背景技術】

【0004】

光シート顕微鏡は、特に生体試料を調べる際に使用され、試料は、検出の光軸とゼロ以外の角度で交差する平面を有する光シートで照明される。光シートはここで、典型的に検出方向と直角をなし、検出方向は例えば検出のためにのみ使用される検出用対物レンズの光軸に対応していてもよい。SPIM (セレクトティブ又はシングルプレーンイルミネーション顕微鏡) とも呼ばれるこの手法を使用することにより、比較的厚い試料の空間記録でも比較的短時間で生成できる。試料の空間的に広い視覚的表現が、光学切片と、試料と光

50

シートとの間の相対移動、すなわち切断面に垂直な方向への移動との組合せに基づいて得ることができる。

【0005】

S P I Mは好ましくは蛍光顕微鏡で使用され、これはL S F M（光シート蛍光顕微鏡）としても知られる。共焦点レーザ走査型顕微鏡又は二光子励起顕微鏡等の他の確立された方法と比較して、L S F M方式及び装置には幾つかの利点がある：検出を広角で行うことができるため、比較的大きい試料領域を捕捉することがさらに可能である。分解能は共焦点レーザ走査型顕微鏡より低いものの、L S F Mではより厚い試料を分析することができ、これは、侵入深さがより大きいからである。さらに、この方法では試料の露光が最も低く、それによってとりわけ、試料の望ましくない褪色のリスクが軽減されるが、これは、試料が検出方向に関してゼロ以外の角度で薄い光シートによって照明されるだけであることによる。

10

【0006】

使用される光シートはここで、例えばシリンドリカルレンズを使用して生成される静的光シート、又は準静的光シートとすることができる。後者は、試料を光ビームで高速スキャンすることにより生成できる。光シート型の照明は、光ビームが観察対象試料に関してごく高速で相対移動すると行われ、それが時間的に連続して、何度も繰り返されて並べられる。最終的に試料が結像されるセンサを有するカメラの積分時間は、スキャンが積分時間内に終了するように選択される。検出用光学ユニットには、2次元センサフィールドを有するカメラの代わりに、ラインスキャンセンサと他のスキャン（再スキャン）との組合せを使用することもできる。それに加えて、検出はまた、共焦点検出とすることもできる。

20

【0007】

S P I Mはこれまでに確立されており、例えば前者に基づく（特許文献1）及び（特許文献2）、並びに、概論を記した記事である（非特許文献1）等の文献において何度も取り上げられている。

【0008】

S P I M方法にしたがって動作する光シート顕微鏡は、これまでほとんど、試料の観察にのみ使用されてきた。しかしながら、試料のより深部を調査するために、それに対して光学的操作を行うことが望ましい場合が多い。本発明に関する光学的操作という用語は、光刺激、すなわち、特定の位置及び時間に、試料内に事前設定可能な形状、大きさ、及び同時に操作する場合は数の、横方向及び軸方向に限定された領域内において光強度(light intensity)を当てることであり、操作光は試料内を貫通してはならず、光強度を当てることにより特定の位置で光学的に反応を起こさせることを意味すると理解される。このような反応は例えば、試料の褪色、光変換、アンケーシング等であり得る。操作光が操作対象領域のみで操作方向に沿って試料と相互作用する試料内の光学操作を以下、局所光学的操作という。

30

【0009】

先行技術では、この点に関して各種の方法が知られている。例えば、ポイントスキャナ、すなわち検出が共焦点式ではないレーザ走査型顕微鏡は、ある平面、例えば光シート平面内の所望の位置に素早く標的を絞るために使用できる。ここで、焦点において高強度を生成できる。欠点はここで、個別の位置に時間的に連続して標的を絞らなければならないことである。軸方向への位置決めは、フォーカシング、例えば対物レンズ内のインターナルフォーカシングを介して、又はそれに対応する試料の移動によって行わなければならない。他の欠点は、標的位置の下及び上の領域が軸方向に完全に侵入されることであり、すると、強度に応じて、試料との相互作用が実際に集光された領域以外でも発生する可能性がある。適当な光学ユニットを使用することによってマルチポイントスキャナも実現でき、この場合は、複数の点に同時に標的を絞ることができる。

40

【0010】

2次元強度パターンを生成するために、例えばデジタルマイクロミラーアレイ(DMDアレイ)を使用でき、これは照明用光学ユニット内の中間像面内に配置される。個々の画

50

素のオンとオフを切り換え、試料内の照明領域を直接画定できる。これは、例えば（非特許文献2）の記事に記載されている。DMDアレイの代わりに、透過部（transmission）にLCDアレイを使用することも可能であるが、この場合は入射光のパワーの損失が大きい。DMDの代わりにLEDアレイを使用することも可能であり、するとこれは照明のために直接使用され、照明の振幅はDMDのように画素ごとに変調される。DMDアレイと比較した利点は、MHz範囲という、より高い変調周波数であり、これに対してDMDアレイの変調周波数はkHz範囲である。照明光を構成するためのLEDアレイの使用は、例えば（非特許文献3）の記事に記載されている。

【0011】

空間光変調器（SLM）の使用により、空間的に広い区域における、換言すれば例えば検出又は照明方向に垂直な平面内だけでなく、その方向の軸方向への光刺激も可能となる。空間光変調器はそのために、操作ビーム経路の瞳面内に配置され、その上に位相パターンが転写され、それゆえこれが操作に使用される光の位相を変化させる。すると、結像では所望の強度分布が生成される。この手法は例えば、（非特許文献4）の記事に記載されている。ここで、強度分布が明示され、これは例えば過去に記録された概観画像からの、又は空間概観スキャンからの試料構造に基づいて特定できる。逆フーリエ変換に基づくアルゴリズムを使って、SLMに転写すべき必要な位相パターンが前記明示された強度分布から反復的に計算される。この手順は例えば、（非特許文献5）の記事に記載されている。しかしながら、この手順は複雑で、一般的には液晶素子に基づく空間光変調器のフレームレートが低いことから、パターンはここで、非常に低速な時間的連続、例えば数10Hzでしか変更できない。2次元構造と比較して、これらの方法はほぼ100倍遅い。

【0012】

空間内の実質的に点の形状の区域への光学操作の特に良好な局所限定はまた、多光子励起の概念でも実現できる。ここで、焦点においてのみきわめて高い強度を有するレーザーパルスがその区域で結像される。このようなパルスは、例えばフェムト秒レーザーで生成できる。このレーザーの波長は、試料中に存在するいずれの染料も蛍光発光のために励起されないように選択される。波長は一般に、近赤外領域内である。しかしながら、焦点における光の強度は非常に高いため、2つ以上の光子が同時に吸収され、対応する蛍光発光励起遷移をトリガする可能性が特に高い。このようにすると、1光子励起の場合のように焦点面の上又は下ではなく、焦点面のみを標的を絞った励起が可能となるが、それは焦点面の上下での強度が非常に低いからである。多光子励起のスキャンシステムを使用すると、結像中の侵入深度を深くすることもできる。さらに、近赤外範囲の波長が使用されるため、この手法は特に生体生物試料において有利である。多光子励起の方法は、点方式のスキャンと、また、試料が多数の地点で同時に照明されるマルチポイント照明とも組み合わせることができる。これは、反復的に計算される位相パターンが転写された、操作ビーム経路内の空間光変調器によって実現できる。2光子励起に関するこの手法は、例えば（非特許文献6）の記事に記載されている。

【0013】

多光子励起、特に2光子励起を用いるポイントスキャナの場合、励起の二次強度依存性と平面内の強力な集光との組合せによって深さ識別を行うことが容易に可能であるが、これは、広角イメージングではさらに補助的な手段を用いないかぎり不可能である。しかしながら、例えば格子等の回折光学素子を使用すれば、短いレーザーパルスを分光的に分割することができる。すると、前記回折光学素子は顕微鏡対物レンズを介して試料へと結像される。その後、照明光のパルスの異なるスペクトル要素が異なる光路をとり、焦点面でのみ再び収束し、ここでもとの超短レーザーパルスを形成する。それゆえ、パルスのピークパワーは焦点面においてのみ最大となり、それが2光子励起の上述の二次強度依存性と共に、広角照明であっても所望の深さ識別を可能にする。この方式は、「時間的フォーカシング」とも呼ばれ、例えば（非特許文献7）の記事に記載されている。

【0014】

非侵襲的な（gentle）光刺激のための上記の方法はすべて、ほとんどが光シート顕微鏡

10

20

30

40

50

には使用されていない。しかしながら、(特許文献3)は、光シート顕微鏡における試料のフォトマニピュレーションのための各種の装置を提案している。ここで、これらの装置はすべて、常に照明ビーム経路を通じた操作も含んでおり、この操作光も同様に光シートの形状とされ、光シートを生成するために使用される光源又は専用の操作光用光源を使用できる。この方法では、軸方向に局所的に制限された光刺激は不可能である。(特許文献3)にはさらに、光シートによる第1の操作照明に加えて、操作光が検出用光学ユニットを介して試料へと案内される第2の操作用光学ユニットの使用の選択についても記載されている。この点に関して、第2の操作用光学ユニットとしてのレーザ走査型顕微鏡の使用が提案されている。この第2の操作用光学ユニットを用いれば、原理上、光シート平面内の操作だけが可能であるが、第2の光源の操作光は、光シートの法線方向に沿って、より広い領域にわたり試料の中に侵入するか、又はより広い領域にわたりそこに入射する。操作光による操作又は照明はまた、光シート平面内の照明光における軸方向への光シートの範囲全体に沿って行われる。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【文献】独国特許出願公開第102 57 423 A1号明細書

国際公開第2004/053558 A1号パンフレット

米国特許第8,547,634 B2号明細書

【非特許文献】

20

【0016】

【文献】“Selective plane illumination microscopy technics in developmental biology”, J. Huisken et al. 著、2009年発行Development誌、vol. 136, p. 1963

“Probing the function of neuronal populations: combining micromirror-based optogenetic photo-stimulation with voltage-sensitive dye imaging”, S. Tsuda et al. 著、2013年発行“Neuroscience Reserach” 75(1), p. 76

30

“Multi-site optical excitation using ChR2 and micro-LED array”, N. Grossman et al. 著、2010年発行“Journal of Neural Engineering” 7(1), p. 016004

“Three-dimensional imaging and photo-stimulation by remote-focusing and holographic light patterning”, F. Anselmi et al. 著、2011年発行“Proceedings of the National Academy of Sciences” 108(49), p. 19504ff

“Experimental demonstration of holographic three-dimensional light shaping using a Gerchberg-Saxton algorithm”, G. Whyte et al. 著、2005年発行“New Journal of Physics” 7, p. 117

40

“SLM microscopy: scanless two-photon imaging and photo-stimulation with spatial light modulators”, V. Nikolenko et al. 著、2008年12月19日発行“Frontiers in Neural Circuits” 誌、vol. 2(5). p. 1

“Scanningless depth-resolved microscopy”, D. Oron et al. 著、2005年発行“Optics Express” 誌、13(

50

5), p. 14687

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

したがって、本発明の目的は、導入部で述べた種類の光シート顕微鏡を、試料の試料非破壊観察を可能にするように開発することである。

【課題を解決するための手段】

【0018】

この目的は、特に試料の倒立観察用に設計された、導入部で述べた種類の光シート顕微鏡において、光シート顕微鏡が、光強度を少なくとも1つの操作ビーム経路を介して、試料上に光シート平面内の実質的に点状の区域において、又は光シート平面を少なくとも一時的に含む特定の体積において衝突させるための、光シート生成とは独立した手段のみを含むことにおいて実現される。

10

【0019】

実質的に点状の区域、すなわち例えば、これに限定されないが、平面内の操作の場合に特に横方向にだけでなく、好ましくは試料の体積全体に関して軸方向にも限定される、その大きさが当然、横方向及び軸方向の集光、使用される励起機構、操作手段そのもの等、様々な要素に依存する区域に限定することにより、特に試料非破壊的操作を達成することができる。実質的に点状の区域はここで、それ自体、2次元及び3次元空間のどちらにおいても「注目領域」(ROI: region of interest)の意味でより大きい区域を画定でき、すると、そこから今度は、操作対象体積の中で複数の相互に独立した不連続のROIを画定できる。「点」という用語はここで、数学的意味で理解すべきではなく、選択し、操作すべき区域ができるだけ小さい必要があることを明瞭にすることが意図されている。

20

【0020】

操作及び観察/照明はここで、原理上、相互に独立している。例えば、光シートは、体積のある領域又はROIを、別の領域で操作が行われている間に観察するために使用できる。この、別の領域は、後でのみ光シートにより照明される。操作が行われる体積又は、したがって実質的に点状の区域は、その中に強度が当てられている間に光シート平面内になくてもよい。これらは後でのみ、おそらくは所定の時間が経過した後に光シートにより捕捉される。

30

【0021】

光シート顕微鏡の照明用光学ユニットは一般に、好都合な方法で(expediently)照明用対物レンズを含み、検出用光学ユニットは検出用対物レンズを含み、照明及び検出はまた、同じ対物レンズでも行うことができ、すなわち、照明用対物レンズは検出用対物レンズと同じとすることができる。また、照明と検出がビーム経路内の個々の光学素子、例えば補正素子を共有することも可能である。操作のための手段は、操作ビーム経路内の別の操作用対物レンズを含むことができるが、操作はまた、照明用対物レンズにより、又は検出用対物レンズにより行うこともでき、これらの場合、操作用対物レンズは照明用対物レンズと、又は検出用対物レンズと同じである。これら2つの変形型には、追加の対物レンズが不要であるという利点があるが、その構成は専用の操作用対物レンズを使用する場合と比較して、幾分自由度が低下する。特に好ましくは、操作は検出用対物レンズにより行われ、それはこれが光シートに対して垂直に配置されることが多く、それによって光シート平面内の、又は光シート平面周辺の体積内の区域を対象とする(area-covering)操作がより容易になるからである。

40

【0022】

操作はそれゆえ、上述の3つの対物レンズの各々によって行うことができ、操作のための手段を補足する素子(詳しくは後述する)は一般に、3つの対物レンズの各々において使用でき、すなわち、照明ビーム経路の中、検出ビーム経路の中、又は専用の操作ビーム経路の中のいずれにも連結できる。照明ビーム経路を使用する場合、操作及び照明は光学

50

素子を共有するが、これは相互に独立して行われ、相互に影響を与え合うことはない。特に、操作に使用される光は、光シートに成形されない。

【 0 0 2 3 】

実現しやすい実施形態において、操作のための手段は、光強度を試料の個別の実質的に点状の区域に時間的に連続して衝突させるポイントスキャナ又は、試料の実質的に点状の複数の区域に時間的に連続して衝突させるマルチポイントスキャナを含み、そのそれぞれの数 (a respective quantity) に光強度を同時に衝突させることができる。マルチポイントスキャナはポイントスキャナと同様に構成され、例えばマルチポイントの生成のためにマイクロレンズアレイを使用できる。

【 0 0 2 4 】

第 1 の空間光変調器を使用して、特定の強度分布を試料に衝突させることもでき、これは実質的に一定の振幅で行われる。特定の振幅分布も特定の強度分布上に転写するために、操作のための手段は第 2 の空間光変調器を含むことができる。

【 0 0 2 5 】

別の構成では、操作のための手段は、好ましくは光シート平面に平行な平面内、特に好ましくは光シート平面内に特定の強度分布を生成するためにデジタルマイクロミラーアレイ (D M D) を含む。光シート平面に平行な向きの場合、操作は、好都合な方法で、検出用対物レンズ又は別の操作用対物レンズによって行われる。

【 0 0 2 6 】

上述の操作のための手段は、特に好ましい構成において、相互に組み合わせて操作速度を高めることができ、これは、D M D が空間光変調器より高速で切り換え可能であるからである。したがって、好ましい構成では、光シート顕微鏡は、第 1 の空間光変調器、デジタルマイクロミラーアレイ、又はこれらの組合せの間で切り換えを行うためのスイッチング手段、好ましくはスイッチングミラーも含む。第 2 の空間光変調器も、第 1 の空間光変調器に加えて使用できる。このようにして、例えば、空間光変調器を、相応の位相パターンと共に、複数の空間区域を画定するために使用でき、その後これは、D M D により個別にオンとオフに高速で切り換えることができる。

【 0 0 2 7 】

操作用対物レンズが検出用対物レンズと同じである場合、第 1 又は第 2 の空間光変調器は、特に好ましい構成では、試料の操作と収差の補正のどちらのためにも使用できる。このために、空間光変調器のうちの一方の第 1 の領域は、特定の強度又は振幅分布を試料に衝突させために、且つ補正素子として具現化され、空間光変調器の第 2 の領域は、検出ビーム経路内の補正要素としてのみ具現化される。これは、S L M を適切に制御することによって実現できる。ここで、偏向手段が提供され、これは検出されるべき光を第 2 の領域へと、また操作に使用される光を第 1 の領域へと偏向させる。これはまた、操作が照明用対物レンズを介して行われる場合、すなわちそれが操作用対物レンズと同じである場合は、照明用対物レンズと同様に、又は、必要であれば、操作用対物レンズでも実現できる。

【 0 0 2 8 】

このようにして、検出ビーム経路又は照明ビーム経路のために別の補正素子を提供する必要がないため、コストを削減できる。それに加えて、又はその代わりに、先行技術から知られているような補正素子を使用することももちろん可能であり、これは例えばアルバレスプレートと呼ばれるものであり、それは 2 つの移動可能な実質的にプレート状の素子で、その上に収差を補正するための対応する表面構造が転写され、これらは相互に関して横方向に移動可能である。表面構造はフリーフォーム表面とすることができ、プレートは波面変調器の機能を有する。例えば、このような補正素子は独国特許出願公開第 1 0 2 0 1 4 1 0 4 9 7 7 A 1 号明細書に記載されている。補正素子はそれに加えて、又はその代わりに、光伝送システムとしても構成でき、これは仮想レイとして知られ、例えば独国特許出願公開第 1 0 2 0 1 3 1 1 2 6 0 0 A 1 号明細書に記載されている。前記補正素子は、それを照明用対物レンズと検出用対物レンズ両方に使用できるような寸法とすることができ、これらの対物レンズと分離層システムとの間に設置される。その他

10

20

30

40

50

の補正素子は、これも同様に個別にも前述のものと組み合わせても使用でき、変形可能なミラー又は、前述のように、空間光変調器を含む。

【0029】

偏向手段は好ましくはダイクロイック素子を含み、これは相互に関して平行に、好ましくは空間光変調器の活性光学面に垂直に配置された活性光学面を有し、ビーム経路は、操作に使用され、検出されるべき光がそれぞれダイクロイック素子へと2回案内され、それぞれの領域への偏向が、ダイクロイック素子の厚さにより実現される。ダイクロイック素子はこの場合、必ずしも上述のように垂直に配置されなければならないわけではないが、相応に傾斜される場合は、はるかにより厚くする必要のある可能性がある。

【0030】

S L Mを異なる照明が行われる2つの領域に分割する構成は、照明ビーム経路にも同様に当てはまり、ここで、1つの領域は光シート生成のため、他方の領域は操作の照明 (manipulation illumination) のためである。それに加えて、S L Mは、両方の領域において、補正素子の機能も果たすことができる。

【0031】

特に有利なこととして、操作光の光源、波長、及び強度は、2つ以上の光子遷移を励起するために設計され、その結果、局所的に空間的にきわめて限定された区域において、特に試料非破壊操作を実現できる。操作に使用される光の強度を操作ビーム経路の、すなわち例えば検出用対物レンズの軸に沿って軸方向に局在化させるために、好ましくは、時間的フォーカシング機構が提供され、これは好ましくは、フェムト秒パルスレーザと、群速度分散を制御するためのコントローラとを含む。

【0032】

言うまでもなく、上述の特徴及び以下に説明するものは、明示された組合せだけでなく、その他の組合せでも、又はそれら自体でも使用でき、その場合も本発明の範囲から逸脱しない。

【0033】

本発明は、例えば、本発明に不可欠な特徴も開示している添付の図面に基づいて、以下により詳しく説明されている。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】試料非破壊光シート顕微鏡のための一般的な構成を示す。

【図2】検出用対物レンズによる操作の第1の構成を示す。

【図3a)】検出用対物レンズによる操作の、また別の2つの構成を示す。

【図3b)】検出用対物レンズによる操作の、また別の2つの構成を示す。

【図4】検出用対物レンズによる操作の第3の構成を示す。

【図5】検出用対物レンズによる操作の第5の構成を示す。

【図6a)】別の操作用対物レンズによる操作の構成を示す。

【図6b)】別の操作用対物レンズによる操作の構成を示す。

【図6c)】別の操作用対物レンズによる操作の構成を示す。

【図7a)】照明用対物レンズによる操作の2つの考えられる例を示す。

【図7b)】照明用対物レンズによる操作の2つの考えられる例を示す。

【図8】照明用対物レンズにより操作を行う光シート顕微鏡の第1の構成を示す。

【図9】照明用対物レンズによる操作の第2の構成を示す。

【図10】照明用対物レンズによる操作の第3の構成を示す。

【図11】光シートの時間的フォーカシングの利用を示す。

【図12】2方向からの操作の原理図を示す。

【図13】多光子操作のための装置を示す。

【図14】操作及び結像のための手順を示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

10

20

30

40

50

図面の詳細な説明

まず、図 1 は、操作が同時に行われる試料非破壊光シート顕微鏡法に使用できる一般的なセットアップを示す。試料 1 は試料キャリア 2 の上に配置される。光シート顕微鏡法を用いた検査はここで、倒立型で行われ、照明用対物レンズ 0 1 及び検出用対物レンズ 0 2 は、分離層システムの一部である試料キャリア 2 の下に配置される。試料キャリア 2 は、例えば試料キャリア 2 の底面に対応することが可能な平坦な基準面 3 に平行である。試料 1 は、ここでは特に示されていない媒質の中に埋め込むことができる。照明用対物レンズ 0 1 を使用して、試料 1 は光シートで照明ビーム経路を介して照明され、光シートは光シート面を有し、これはここで、照明用対物レンズ 0 1 の光軸 4 に対応し、これは基準面の法線とゼロ以外の照明角度をなす。検出用対物レンズ 0 2 は、検出ビーム経路を有する検出用光学ユニットの一部であり、その光軸 5 は試料キャリア 2 の領域内で基準面 3 の法線とゼロ以外の検出角度をなす。光軸 5 はここで、検出用対物レンズ 0 2 の光軸に対応する。検出されるべき光の、又は分離層システム（試料キャリア 2 とその下にある空気層を含む）を通じて試料 1 を照明するための光が斜めに通過することにより発生する収差を補正又は低減するために、光シート顕微鏡は少なくとも 1 つの補正素子、この場合は複数の補正素子を含む。第一に、照明用対物レンズ 0 1 は波面マニピュレータ 6 の形態の補正素子を含み、検出用対物レンズ 0 2 は別の波面マニピュレータ 7 の形態の補正素子を含み、波面マニピュレータ 6 及び 7 は、光軸 4 及び 5 に関して相互に横方向に相対移動可能なフリーフォーム面を有するプレートにより形成され、これらのプレートはまた、アルバレスプレートとも呼ばれる。それに加えて、対物レンズ 0 1 及び 0 2 に共通の、仮想レイの形態のまた別の補正素子、いわば光伝送システム 8 は、これらの対物レンズと試料キャリア 2 の底面との間に配置される。例えば、別の操作用対物レンズ 0 3 がここで、例として操作のために使用される。この対物レンズを使用して、又は他の 2 つの対物レンズを使用して、少なくとも 1 つの操作ビーム経路を介して、光強度を、好ましくは光シート平面の実質的に点状の区域内又は光シート平面を少なくとも一時的に含む特定の体積内のみにおいて試料に衝突させるための、光シートの生成とは独立した手段を、好ましくは排他的に実現することが可能である。図 1 の右側において、破線の四角により示される部分に、2 つの操作光線 9 が示されており、それらの端は光シート内、及びそれゆえ検出用対物レンズ 0 2 の焦点面の中にあり、そこに特定の強度が衝突することになる。

【 0 0 3 6 】

光強度を試料 1 に衝突させるための手段について、各種の例示的实施形態を参照しながら以下により詳しく説明する。

【 0 0 3 7 】

図 2 は、操作が検出用対物レンズ 0 2 により行われる、すなわち操作用対物レンズが検出用対物レンズ 0 2 と同じである光シート顕微鏡のある実施形態を示している。試料キャリア 2 を有する試料ステージにはここで、3 つすべての空間方向へと試料 1 を空間的に位置決めするための試料ステージコントローラ 1 0 が設けられている。照明は、光シート顕微鏡にとって典型的な手段により行われる。照明レーザ 1 1 は、照明波長を有する光を発する。ビーム整形ユニット 1 2 の中で、ビームが整形され、それが光シートスキャナ 1 3 へと案内され、これは準静的光シート生成及び光シートの位置決めを果たす。光シートは、チューブレンズ 1 4 及び対物レンズ 0 1 を介して試料 1 に結像される。ビーム整形ユニット 1 2 は、所望の強度プロファイルを光ビーム上に、例えばガウス分布又はベッセルビームにしたがって転写する役割を果たし、これはすると、スキャニングにより、光シート平面に垂直な断面において光シートにも転写される。

【 0 0 3 8 】

検出される光は検出用対物レンズ 0 2 を通過し、第クロックビームスプリッタ 1 5 を通過し、チューブレンズ 1 6 を介してエリアスキャン検出器、例えばカメラ 1 7 の一部へと結像される。検出された信号はその後さらに処理され、及び / 又は表示される。

【 0 0 3 9 】

操作のために、刺激レーザ 1 8 が使用され、その光は刺激スキャナ 1 9 へと案内され、

これはここで、ポイントスキャナの形態で具現化されており、単に装置の構成をコンパクトにする役割を果たすミラー 20 の形態の偏向素子が相互接続されている。また別のレンズ 21 と、レンズ 16 に対応するチューブレンズ 22 とを介して、操作光はダイクロイックビームスプリッタ 15 を介して検出ビーム経路へと結合される。

【0040】

図 2 に示される光シート顕微鏡の実施形態では、試料の点状操作が行われ、焦点は光シート平面に、又は光シート平面の上下の領域に設定でき、それによって事実上の空間操作が可能であるが、原理上、個々の点について連続的にしか行われぬ。このように焦点を光シート平面の外側領域に移動させるために、また別の調節可能な光学ユニット、例えばコリメータをビーム経路内の刺激レーザ 18 と刺激スキャナ 19 との間に挿入でき、それによって操作焦点は検出焦点とは独立して調節可能となる。刺激レーザ 18 及び操作用光学ユニットを相応に構成することにより、図 2 に示される実施形態は多光子励起にも使用できる。1 つ又は複数の別の光学素子、例えばマイクロレンズアレイを刺激レーザ 18 と刺激スキャナ 19 との間に組み入れて、レーザビームが各マイクロレンズアレイの前で拡張され、その後再びコリメートされるようにすることにより、図 2 に関連して使用されるポイントスキャナをマルチポイントスキャナへと変換できる。これはここでは図示されていない。

10

【0041】

図 3 は、図面 a) 及び b) において、検出用対物レンズによって操作が行われる光シート顕微鏡の 2 つのまた別の実施形態を示している。図 3 b) に示されるモジュールは、図 3 a) に示されるモジュールと取り換えることができ、どちらも同じ位置でビーム経路に結合され、ダイクロイックビームスプリッタ 15 により特徴付けられる。ここで、構成は必ずしもモジュール式でなくてもよく、むしろ、2 つの独立した光シート顕微鏡を製作でき、これらを相互に融合させることはできない。図 2 に示される装置では、ポイントスキャナの場合、試料の実質的に点状の区域に光強度が時間的に連続して衝突し、又はマルチポイントスキャナの場合、複数のそのような点状区域に光強度が時間的に連続して衝突し、いずれの場合も、多数のそれらに同時に光強度が衝突するが、図 3 a)、b) に示される装置では、試料内の強度パターンの空間生成が可能であり、すなわち、これらは多数の実質的に点状の区域への光強度の同時衝突が可能で、各点は他の点とは独立して衝突され、点は平面だけでなく、ある体積内で空間的にも分散させることができる。

20

30

【0042】

図 3 a) に示される実施形態において、操作手段は、特定の強度分布を試料に衝突させるための第 1 の空間光変調器 23 を含む。使用される光源はここでも刺激レーザ 18 である。光の位相は空間光変調器 23 を使って変更されるため、空間光変調器 (SLM) 23 は瞳面内に配置しなければならず、したがって、結像のためにはワイドレンズ 24 が必要となる。それに加えて、この装置はまた、テレスコープ 25 を含み、それによって SLM 23 の瞳の照明を利用できる。偏光を利用するために、任意選択的に、偏光素子 26、例えば偏光器又は 1/2 波長板をビーム経路内に配置できる。図 3 b) の場合、SLM 23 の代わりに、デジタルマイクロミラーアレイ (DMD) 27 が使用され、この場合、レンズ 24 をなくすことができ、それは、強度の操作が、その目的のために操作ビーム経路の中間像面内に配置された DMD 27 によって直接行われるからである。この場合に使用される光源はここでも刺激レーザ 18 とすることができるが、原理上、インコヒーレント光源 28 も使用でき、例えばこれは、特に UV 範囲の典型的なランプ、又は LED である。DMD 27 は、強度パターン、すなわち平面内、好ましくは光シート平面に平行な平面又は光シート平面内の特定の強度分布を生成するために使用される。

40

【0043】

図 3 a) に加えて、操作手段は特定の強度分布に特定の振幅分布を付与するための第 2 の空間光変調器 (ここでは図示せず) を含むことができる。

【0044】

図 4 は、操作が検出ビーム経路によって行われる光シート顕微鏡のまた別の構成を示す

50

。この実施形態において、空間光変調器 23 は、所定の強度又は振幅分布を試料上に衝突させるため、且つ補正素子として具現化される第 1 の領域 29 と、検出ビーム経路内の補正素子として具現化される第 2 の領域 30 とを含む。検出されるべき光を第 2 の領域 30 へと、また操作に使用される光を第 1 の領域 29 へと偏向させるための偏向手段がここで提供される。この場合、検出用対物レンズ 02 内の波面マニピュレータ 7 はなくすることができる。光が試料キャリア 2 を有する分離層システムを斜めに通過することに起因する収差の補正のみの役割を果たす位相パターンは、この場合、第 2 の領域 30 内の SLM 23 に転写され、操作に使用される光はこの第 2 の領域 30 には入射せず、それを通り過ぎるように偏向される。試料内に設置されるべき空間強度分布の位相パターンは、SLM 29 の第 1 の領域 29 に転写され、さらに、斜めの光の通過の補正のための位相パターンも同様である。ビームの進み方が図 4 に示されている。検出されるべき光は、破線で示されており、刺激レーザー 18 の操作光は実線で示される。偏向手段はここで、ダイクロイック素子 31 を含み、その活性光学面は、相互に関して平行で、好ましくは空間光変調器 23 の活性光学面に垂直に配置される。同様にダイクロイック素子 31 の活性光学面に平行に配置された鏡面を有する 2 つの平面ミラー 32、33 は、操作に使用される、及び検出されるべき光がそれぞれダイクロイック素子 31 に 2 回向けられるようにビーム経路を案内するために使用される。ダイクロイック素子 31 を使って（その厚さは、SLM 上の部分ビーム経路の必要なビームオフセットに基づいて決定され、ビームオフセット自体は SLM の活性面の大きさに依存する）、第 1 の領域 29 への、及び第 2 の領域 30 への偏向が実現される。それに加えて、2 つのまた別のレンズ 34 及び 35 は、検出ビーム経路内に配置され、これは 4 f 結像系を実現し、追加の構成要素、すなわち偏向手段を収容するためのスペースが創出される。

【0045】

操作が検出用光学ユニットにより行われる、光シート顕微鏡の特に好ましい構成が図 5 に示されている。操作手段はここで、刺激レーザー 18 を用いる SLM 23 と 2 つの光源 28、28a を用いる DMD 27 の両方を含み、2 つの光源は、光源切り換えミラー 36 を介して、DMD 27 を照明するためのビーム経路に任意選択的に結合できる。DMD ビーム経路の場合、テレスコープシステム 25 はレンズのみで記号化され、これはコンデンサも表すことが意図される。DMD 27 とチューブレンズ 22 との間に、また別のレンズ 37 が配置され、これは DMD 27 をレンズ 37 とチューブレンズ 22 との間に位置する中間像面に結像する。図 5 による実施形態において、光シート顕微鏡はそれに加えて、切り換え手段、スイッチングミラー 38 を含み、これは操作手段を選択するためのビーム経路内の対応する調節/回転により中心要素としての役割を果たす。DMD 27 のみか SLM 23 のみのいずれかが操作手段として接続され、又は両方組み合わせで接続される。特に、SLM 23 及び DMD 27 がビームコンバイナ 38a を使って同時にビーム経路に結合される後者の場合は操作速度を高めることができるが、これは約 1 kHz の周波数の DMD は、約 60 Hz での切り換えが可能な効率的な LCOS SLM より高速であるからである。相応の位相パターンを使用すると、SLM 23 は例えば、ROI（注目領域）としての複数の空間的に範囲が限定された区域を画定でき、するとこれは、DMD 27 によって素早く個別にオンとオフを切り換えることができる。

【0046】

他の可能性（図示せず）も、SLM 若しくは DMD 又は複数の SLM 及び DMD による所望のパターンの生成と、パターン間的高速切り換えのためのスキャニングシステムの使用とにある。

【0047】

図 5 に示される例において、光源スイッチングミラー 36 は、ここで DMD 27 を照明することのできる 2 つの光源の一方を選択するために使用される。2 つの光源、例えばレーザー及び従来のランプのみから選択しようとする場合、強度分布を生成するために DMD 27 を使用するケースでは、光源と DMD 27 が特定の位置に相互に関して配置されていれば、このような光源スイッチングミラー 36 をなくすることが可能である：DMD

27はマイクロミラーのアレイを有し、これらは、それぞれマイクロミラーがその上に配置されるDMD 27の底部の法線から測定した場合の2つの固定角度、例えば第1の「オン」状態の -12° の角度と第2の「オフ」状態の $+12^\circ$ との間で切り換えられる。光源又はそのビームステアリングが、DMD 27が「オン」状態の一方の光源によって、及び「オフ」状態の他方の光源によって照明され、また別の操作ビーム経路が当初はDMD 27の底部の法線方向に従うように配置されていれば、光源スイッチングミラー36は不要である。しかしながら、図5に示される変形型のケースのように、使用可能な光源の選択肢を増やすために1つ又は複数の光源スイッチングミラーと組み合わせることができる。

【0048】

操作手段はまた、専用の操作対物レンズを含むこともでき、これはすると、試料の上に、すなわち試料キャリア2の反対側に配置される。この例は図6a)~c)の原理図に示されている。操作対物レンズ03はここで、その光軸が基準面3の法線と平行になるように配置される。しかしながら、これは必須ではなく、操作対物レンズ03は前記法線に関していずれの所望の角度でも配置でき、特に、その光軸が照明用対物レンズ01の光軸4又は検出用対物レンズ02の光軸5に平行となるような向きにすることができ、操作対物レンズ03の光軸はまた、照明用対物レンズ01の、又は検出用対物レンズ02の光軸のうち的一方と一致させることもできる。図6a)は、図2と同様にポイントスキャナと共に専用の操作対物レンズ03を使用した場合を示しており、その中に示される構成に関して行われた記述は、実質的にこの構成にも当てはめることができる。同様に、図6b)に示される、SLM 23を備える実施形態は図3a)の実施形態に対応し、図6c)に示される、DMD 27を備える実施形態は図3b)に対応する。ここで、検出用対物レンズについて図5に関連して説明した組合せと同様に、複数の操作の可能性の組合せも可能である。上記の操作の場合、カバーガラスで閉じられる試料容器が使用されず、操作対物レンズが基準面の法線に関してゼロ以外の角度に向けられていないかぎり、上述の操作の場合、補正素子をなくすことができる。

【0049】

操作に関して、原理上、2つの場合を区別しなければならず、これについて専用の操作対物レンズ03による上からの操作に基づいて以下に説明するが、これは検出又は照明用対物レンズによる操作にも同様に当てはまる。操作強度(manipulation intensity)が光シートシステムによって実質的に点状の区域に衝突する、体積の高速結像の場合、操作及び結像のシーケンスを体積によって規定することができる。この場合、試料体積内で操作デバイスにより生成される光分布の効果はまた、前記体積の結像のタイムスケールでも観察できる。すると、操作は光シート平面内でも体積領域でも、検出用対物レンズ02による操作に関して説明した操作と同様に行うことができる。しかしながら、操作放射の効果を観察する際のタイムスケールが短すぎて、操作をカメラフレーム内で、すなわち照明用対物レンズ01により生成され、検出用対物レンズ02により検出される光シート内で直接観察しなければならない場合、図6a)の破線の四角で示されているように操作対物レンズ03により試料上に転写される強度分布が確実に光シート平面内にあるようにしなければならない。図6a)の場合、これはポイントスキャナの高速フォーカシングによって、例えば操作対物レンズ03のインターナルフォーカシングによって、チューブレンズ22の変位によって、素早く変形できるレンズ、例えばOptotune社のレンズEL-10-30の使用によって、又は変形可能ミラー等の適応型光学素子によって実行できる。SLMの場合、光シートの平面内にある、対応する空間強度分布を特定できる。

【0050】

操作はまた、照明用対物レンズ01によっても行うことができ、この場合、照明用対物レンズの開口数は一般に、検出用対物レンズ02のそれより低い。しかしながら、例えばFRAP(光褪色後蛍光回復法)等の幾つかの方法では、より高いNAが必要ではなく、操作のために照明用対物レンズ01を使用できる。専用の操作対物レンズ03を使用する操作の場合と全く同様に、ここでも2つの場合を区別しなければならない。第1の場合、

10

20

30

40

50

光シートシステムによる体積の結像は非常に速いため、操作と結像のシーケンスを体積によって規定することができる。試料体積内で操作デバイスにより生成される光分布の効果はまた、前記体積の結像のタイムスケールでも観察できる。この場合は図7 a)に示されている。選択された試料体積39において、特定の時点で、光強度は試料の空間的に分散された実質的に点状の区域に衝突し、例えばこれは、逆フーリエ変換アルゴリズムを使って空間光変調器に転写される位相パターンへと変換される特定の強度分布である。これは、図8に関して説明するように、例えば光シート顕微鏡を使って実現できる。

【0051】

第2の場合、操作放射の効果を観察する際のタイムスケールが短すぎて、操作をカメラフレーム内で、すなわち照明用対物レンズ01により生成され、検出用対物レンズ02により検出される光シート内で直接観察しなければならない。これは図7 b)に示されており、図中、点状区域は光シートの線として見ることができ、これらは図7 a)の体積内で十字の形態で分散される。

【0052】

前述のように、図8は、操作用対物レンズが照明用対物レンズ01と同じである光シート顕微鏡を示す。操作手段はここでも、SLM 23と、それに関連する光生成及び結像用光学ユニットとを含む。照明ビーム経路内への入力結合は、ダイクロイックビームスプリッタ40を介して行われる。

【0053】

空間光変調器は、高価で技術的に複雑な構成要素である。この理由から、操作が照明用対物レンズ01により実行される場合に、光シートの生成と広角のホログラム方式による強度分布の特定の両方に1つの同じSLMを使用することが有利である。操作用対物レンズが照明用対物レンズ01と同じである、図9及び図10に示される好ましい構成では、照明用光学ユニットは空間光変調器41を含み、その上で特定の強度分布又は振幅分布を試料に転写させるための位相パターンが操作領域42に転写され、また、その上で光シート形成のための位相パターンが光シート生成領域43に転写される。どちらの領域も相互に独立して動作可能であり、すなわち、同じ要素が使用されていても、光シートの生成を操作とは独立して引き続き行うことができるが、このことは絶対的に必要というわけではない。図4に関連して説明した装置と同様に、SLM 41はここでも補正素子として機能し、すなわち、光が斜めに通過することにより生じる収差を補正するための相応の位相パターンをさらにその上に転写できる。操作のための光が操作領域(42)のみに向けられ、光シート生成のための光が光シート生成領域(43)のみに向けられるようにするために、照明用光学ユニットは、スペクトル分解も行うことのできる相応の偏向手段を含み、これは一般に、光シートの生成のためと操作のためにはそれぞれ異なる波長が使用されるからである。

【0054】

SLM 41が光シートの生成及び強度分布のために使用される光シート顕微鏡の2つの例が図9及び10に示されている。刺激レーザ18が照明レーザ11とは異なる波長を発生することが前提条件であり、それは、これがビーム分離に使用されるからである。まず、両方の光源の光はダイクロイックビームコンバイナ44により結合され、その後、図9のダイクロイックビームスプリッタ45により、又は図10のダイクロイックビームスプリッタ46により分割され、図9に示される構成では、図4に関連して説明した装置と同様に、ダイクロイックビームスプリッタ45の厚さは偏向の目的のために使用される。照明に使用される光は、光シート生成領域43へと向けられ、特定の強度分布を生成するために使用される刺激レーザ18の操作光は、SLM 41の操作領域42へと向けられる。次に、両方の光ビームは、図9に示されるように結合されるか、又は図10に示されるように、また別のダイクロイックビームスプリッタ47へと平行に案内される。SLM 41の照明の場合、レーザビームは相応のレンズの組合せ(図示せず)により拡張され、それによってこれらはSLM 41上のそれぞれの領域を均一に照明する。SLM 41の、光シート形成のための位相パターンを含む領域、すなわち光シート生成領域43は、さ

10

20

30

40

50

らに結像される場合、照明用対物レンズO1のイメージングの中間像面48内に位置付けられなければならない。他方で、操作領域42は、照明用対物レンズO1のイメージングの瞳面49の中に位置付けられなければならない。SLM41のどちらの領域もそれゆえ、異なる方法で具現化されなければならない。これは、操作光と照明光のためのビーム経路を再び分割するまた別のダイクロイックビームスプリッタ47により実現できる。第1の光学ユニット50を使用することにより、操作領域42は照明用対物レンズO1の瞳面49に結像される。光シート生成領域43は、それによって操作領域42もまた結像される第2の光学ユニット51によってのみ、光シートスキャナ13及びスキャニングレンズ52を介して照明用対物レンズO1の中間像面48に結像される。2つの波長は再び、ダイクロイックビームコンバイナ53を使って重ねられる。

10

【0055】

図9及び図10による実施形態は実質的に、色分離の方法においてのみ実質的に異なる。図9は、図4と同様の解決策を示しており、ビームは常に重ねられるが、空間光変調器41で十分に分離できるように、比較的厚い基板上的ダイクロイックビームスプリッタ45を必要とする。レーザーの異なる波長は、例えば共通の光ファイバ54によって案内することができ、操作及び/又は光シート生成のために複数の光波長を使用することも可能である。これに対して図10は、異なる波長の光学ビーム経路に沿った異なる経路への、別の典型的な分離を示している。

【0056】

操作領域42の瞳面49への結像をなくすることも可能であり、すなわち、操作のために、中間平面48内に結像されるSLM41を使用することも可能である。操作領域42は光シート生成領域43から分光的に分離されていることが前提条件である。他の可能性は、操作が高速で逐次的に進められるようにすることであり、この場合、特定の強度分布と光シート生成のためのパターンとを、それぞれのレーザー波長の切り替えと時刻同期的に切り換えるだけでよい。しかしながら、このようにして、試料内で生成可能な強度分布は、数の点で大きく限定される。

20

【0057】

また、原理上、検出用対物レンズO2による操作も、光シート生成領域43及び操作領域42の2つの領域に分割されるSLM41を使って行うことができるが、この場合、ビームの案内は照明用対物レンズO1による操作の場合より幾分複雑である。

30

【0058】

検出用対物レンズO2による操作の図2の場合又は専用の操作用対物レンズO3による操作の場合の図6a)の場合のように、操作手段は、たとえ照明用対物レンズが操作用対物レンズと同じ場合でも、試料の個別の実質的に点状の区域に光強度を時間的に連続して衝突させるためのポイントスキャナを含むことができる。しかしながら、このようなポイントスキャナは逐次的に動作し、非常に高速の光シートイメージングの場合、ある露光シーケンス内で光シートのきわめて限定的な数の位置しか対象にできず、これは特に、強度分布の位置決めを軸方向に、すなわち照明用対物レンズO1の光軸4に沿って、そしてその結果、リフォーカシングによって行わなければならないからである。したがって、試料の検査の場合に初めに逐次的に操作放射を当てる、すなわち光シートに沿って逐次的に、特定の点で光軸に沿って強度分布を当て、その後、光シートで試料1のこの実質的に平坦な体積を素早く結像させることが有利である。光シートスキャナ13及び刺激スキャナ19は相互に独立して動作するため、光シート結像中に、光シートの前又は後で所望の時間的及び/又は空間的インタバルにより操作を実行することも可能である。

40

【0059】

特に、ここで、操作光の光源、波長、及び強度が二光子及び多光子遷移を励起させるように設計されていれば有利であり、このようにして、試料への相応の強度(intensity)の衝突をそれぞれの焦点に限定させることが可能であり、なぜなら、線形励起の場合に、ポイントスキャナのガウシアンビームが照明用対物レンズO1の光軸4に沿って試料1の中に完全に、また特定の状況では相互作用的に侵入するからである。

50

【 0 0 6 0 】

多光子励起のポイントスキャナを使用する場合、操作軸に沿った軸方向の限定はまた、時間的フォーカシングによっても実現できる。これは、図 1 1 において、例えば光シート顕微鏡について示されている。時間的フォーカシングはここで、スキャニングにより生成される光シートにおいて実行される。操作のための強度が衝突する位置を介した制御は、光シートのスキャンにより横方向に行われ、これは図 1 1 において上から見た状態で示されている。光シート軸に沿った、すなわち照明用対物レンズ O 1 の光軸 4 に沿った焦点の位置は、S L M を使って、及び刺激レーザー 1 8 の群速度分散制御を用いた時間的フォーカシングによって特定される。このようにして、例えば図 1 1 において上から見た状態で示される光シート内の 3 つの焦点 5 5 に強度を逐次的に当てることが可能である。

10

【 0 0 6 1 】

もちろん、図 1 2 に示されるように、試料の区域に 1 方向からでなく複数の方向から強度を衝突させることも同様に可能であり、この場合、操作用対物レンズ O 3、検出用対物レンズ O 2、及び照明用対物レンズ O 1 の 3 つの対物レンズのすべてが試料への光強度の衝突に使用される。すると、異なる操作方法及び / 又は異なる波長を異なる方向から使用することが可能となる。例えば、検出用対物レンズ O 2 により D M D 及び第 1 の波長を使って 2 次元領域を同時に生成でき、操作用対物レンズ O 3 により S L M を使って空間的に分散された区域を逐次的に生成できる。D M D は、光シート平面内での高速スキャンを想定でき、これは、レーザー源としてはほとんど利用できない、例えば U V 範囲内の波長のインコヒーレント光源でも実現できる。すると、その位相パターンが試料に操作用対物レンズ O 3 により強度分布として衝突する S L M は、他の波長で空間的領域を逐次的に操作することが可能となる。

20

【 0 0 6 2 】

2 つ以上の操作用対物レンズを有する光シート装置はまた、操作放射をコヒーレントに重ねる可能性、すなわち試料に光強度を実質的に点状の区域に 2 又は 3 方向から衝突させる放射も提供する。この場合、例えば検出用対物レンズ O 2 及び操作用対物レンズ O 3 が共通の光軸を有していれば有利である可能性があり、これは、その場合、対向する波面が干渉し得る光シート平面内の強度分布の範囲をできるだけ小さくできるからである。操作用対物レンズ O 3 は、そのためには、例えば試料がその中に配置される試料溶液 (図 1 2 では図示せず) の中に浸漬させることができる。コヒーレンス合成については、一緒に使用される刺激レーザー 1 8 は検出用対物レンズ O 2 及び操作用対物レンズ O 3 のための対応するビーム経路上で (over) 分割されなければならない。

30

【 0 0 6 3 】

共通の光軸を持たない対物レンズペアが使用される場合、C A R S 等のポンプ - サンプル方式を使用することも可能であり、ポンプ放射及びサンプル放射がここで、装置の異なる対物レンズを通して案内することができる。所望の相互作用はポンプ放射及びサンプル放射の重複領域でのみ発生するため、これによって区域をさらに限定することが可能となる。

【 0 0 6 4 】

前述のように、操作に使用される対物レンズの光軸の方向への強度分散の限定は、特に相応の光強度を試料に衝突させるためにポイントスキャナを使用するとき、多光子励起を使って非常に有利に設定でき、それはここで、集光されたビームが常に存在するからである。空間光変調器及び / 又は D M D の使用に基づく広角での顕微鏡法では、所望の操作パターンによっては、ポイントスキャナを使用する場合より存在する集光されたビームが少ないが、この場合、時間的フォーカシングを使用すると、広角での伝播方向への操作及び強度分散を限定することも可能となる。このようにして、ポイントスキャニング二光子顕微鏡法の場合に、励起の二次強度依存と強力な集光との組合せにより発生する深さ識別の効果は、広角イメージングでも実現できる。

40

【 0 0 6 5 】

図 1 3 は、検出用対物レンズ O 2 による操作のために多光子励起が使用される相応の装

50

置を示す。フェムト秒短パルスレーザ 5 6 はここで、操作光源として使用される。例えば、チタンサファイアレーザを使用できる。テレスコープ 2 5 を使用して、そのビームは、できるだけ完全に S L M 2 3 を照明するように相応に拡張される。試料内に特定の強度分布を生成するために、相応の空間位相パターンが S L M 2 3 に転写される。位相パターンの第 1 のフーリエ変換像がレンズ 5 7 を介して、相応に具現化された回折格子 5 8 に結像される。回折格子 5 8 は、検出ビーム経路内の中間像面内に配置され、チューブレンズ 2 2 及び検出用対物レンズ 0 2 により、補正素子、ここでは波面マニピュレータ 7 を使って試料に結像される。回折格子 5 8 でのパルスのスペクトル分解により、照明の軸方向の限定は、試料内の所望の点状区域に限定された、時間的フォーカシングにより行われる。

【 0 0 6 6 】

個々のレンズ 5 7 の代わりに、S L M 2 3 の位相パターンはまた、2 つのレンズ 6 0 及び 6 1 を用いる 4 f 装置 5 9 を介して格子に結像させることもできる。この 4 f 装置 5 9 の瞳面にある位相素子 6 2 により、回折した放射に関して のゼロ次回折の位相シフト又はその逆が生じる。このようにして、位相パターンは 4 f 結像系の後に回折格子 5 8 上の強度分布へと直接変換される。

【 0 0 6 7 】

上述の光シート顕微鏡の場合の結像は一般に、2 つの方法で行うことができる。

【 0 0 6 8 】

試料スキャンとして知られているものにおいては、照明用対物レンズ 0 1 及び検出用対物レンズ 0 2 が一定の位置に固定され、光シートが光シートスキャナ 1 3 を介して検出用対物レンズ 0 2 の焦点面に位置決めされる。すると、試料は試料ステージコントローラ 1 0 を介して、図 1 の破線の画像部分に示されている方向に案内される。

【 0 0 6 9 】

光シートスキャンとして知られているものにおいては、試料 1 は一定の位置に固定されたままで、光シートを結像のためにスキャンしなければならない。光シートを移動させたときに確実に焦点がずれないようにするために、光シートのビームウェストが結像領域の中央に留まるように検出用対物レンズ 0 2 を調節しなければならない。また照明用対物レンズ 0 1 も同様である。その代わりに、ビームウェストは、インターナルフォーカシング等、他の種類のフォーカシングによって調整することもできる。

【 0 0 7 0 】

図 1 4 は、操作及び結像の異なる時間及び空間シーケンスを示す。図 1 4 a) は、光シート平面内での同時の操作及び結像を示している。操作に使用される光強度はここで、ある時点 t で光シート平面内に当てられ、その効果をこの平面内ですぐに観察できる。この手順は、試料スキャンの場合及び光シートスキャンの場合に、検出用対物レンズ 0 2 により、平面操作(planar manipulation)を使って、例えば D M D を利用して、すなわち例えば図 3 又は図 4 に示される装置を使って、最もよく実現できる。

【 0 0 7 1 】

図 1 4 b) は、空間的及び時間的両方の操作及び結像の逐次的シーケンスを示す。まず、特定の空間強度分布が観察対象体積内の所望の実質的に点状の区域(十字で示される)に当てられ、その後、試料内の長方形の四角で示されるこの観察対象体積は、おそらく複数回結像され、操作の効果の時間的進展が観察される。この手順は、試料スキャンの場合と光シートスキャンの場合とのどちらにおいても、空間操作を可能にする、原理上、前述の変形型のすべてで使用でき、これは、逐次的シーケンスによる操作にいかなる制約もないからである。

【 0 0 7 2 】

図 1 4 c) に示される折衷的手順において、操作放射は結像用光シートのスキャン中に、所望の時点で、及び / 又は光シート内の、その前及び / 又はその背後の所望の位置に導入される。さらに、空間操作体積を、その体積を結像させながら連続的に適合させることにより、このような試料の非常に高速な形態変化を補償するか、又は操作強度を当てるための光シート位置のための 2 つの異なる体積を生成することも可能である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

光シート顕微鏡のための上述の装置により、操作と同時の特に非侵襲的な試料の観察が可能となる。

【符号の説明】

【 0 0 7 4 】

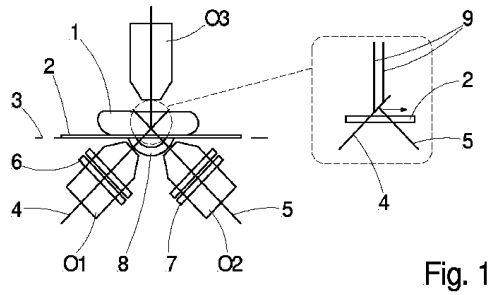
- | | | |
|---------|--------------------------|----|
| 1 | 試料 | |
| 2 | 試料キャリア | |
| 3 | 平面基準面 | |
| 4、5 | 光軸 | |
| 6、7 | 波面マニピュレータ | 10 |
| 8 | 光伝送システム | |
| 9 | 操作ビーム | |
| 10 | 試料ステージコントローラ | |
| 11 | 照明レーザ | |
| 12 | ビーム整形ユニット | |
| 13 | 光シートスキャナ | |
| 14 | チューブレンズ | |
| 15 | ダイクロイックビームスプリッタ | |
| 16 | チューブレンズ | |
| 17 | カメラ | 20 |
| 18 | 刺激レーザ | |
| 19 | 刺激スキャナ | |
| 20 | ミラー | |
| 21 | レーザ | |
| 22 | チューブレンズ | |
| 23 | 第1の空間光変調器 (S L M) | |
| 24 | レンズ | |
| 25 | テレスコープ | |
| 26 | 偏光素子 | |
| 27 | デジタルマイクロミラーアレイ (D M D) | 30 |
| 28、28 a | 光源 | |
| 29 | 第1の領域 | |
| 30 | 第2の領域 | |
| 31 | ダイクロイック素子 | |
| 32、33 | 平面ミラー | |
| 34、35 | レンズ | |
| 36 | 光源スイッチングミラー | |
| 37 | レンズ | |
| 38 | スイッチングミラー | |
| 38 a | ビームコンバイナ | 40 |
| 39 | 試料体積 | |
| 40 | ダイクロイックビームスプリッタ | |
| 41 | 空間光変調器 | |
| 42 | 操作領域 | |
| 43 | 光シート生成領域 | |
| 44 | ダイクロイックビームコンバイナ | |
| 45、46 | ダイクロイックビームスプリッタ | |
| 47 | また別のダイクロイックビームスプリッタ | |
| 48 | 中間像面 | |
| 49 | 瞳面 | 50 |

- 5 0 第 1 の光学ユニット
- 5 1 第 2 の光学ユニット
- 5 2 操作レンズ
- 5 3 ダイクロイックビームコンバイナ
- 5 4 光ファイバ
- 5 5 焦点
- 5 6 フェムト秒レーザ
- 5 7 レンズ
- 5 8 回折格子
- 5 9 4 f 装置
- 6 0、6 1 レンズ
- 6 2 位相素子
- O 1 照明用対物レンズ
- O 2 検出用対物レンズ
- O 3 操作用対物レンズ

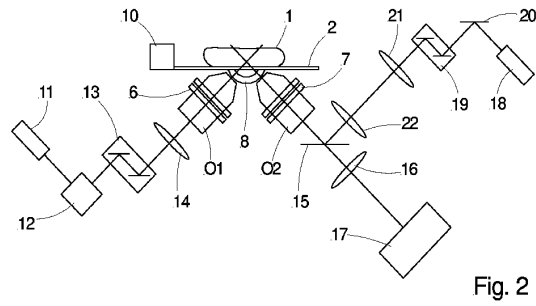
10

【図面】

【図 1】



【図 2】



20

30

40

50

【 図 3 】

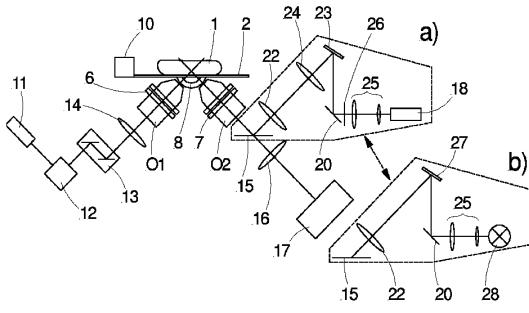


Fig. 3

【 図 4 】

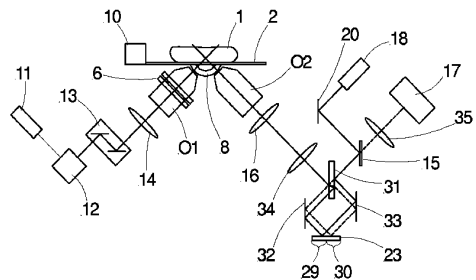


Fig. 4

10

【 図 5 】

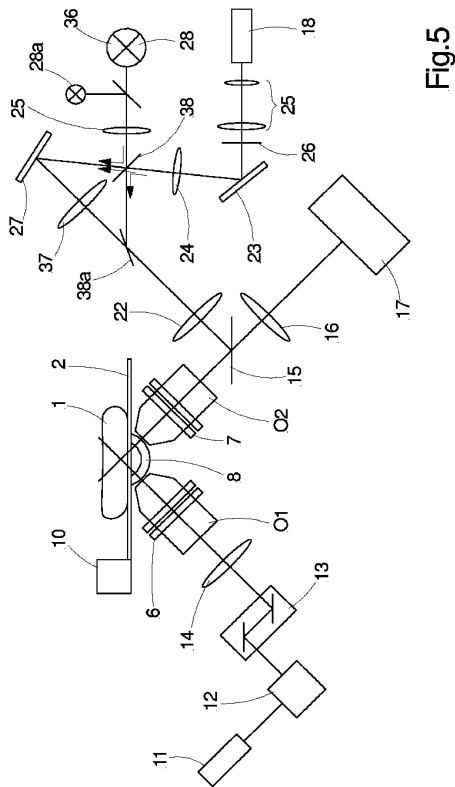
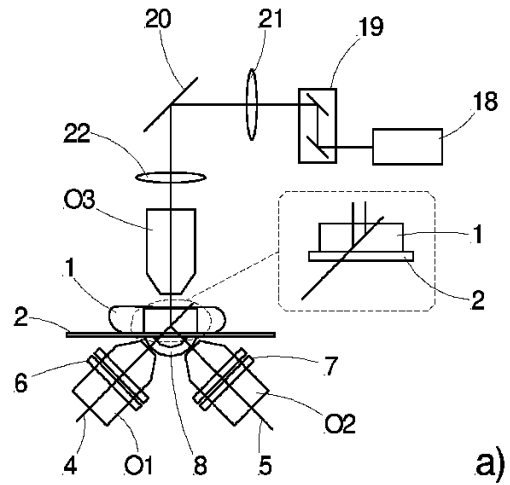


Fig.5

【 図 6 a) 】



a)

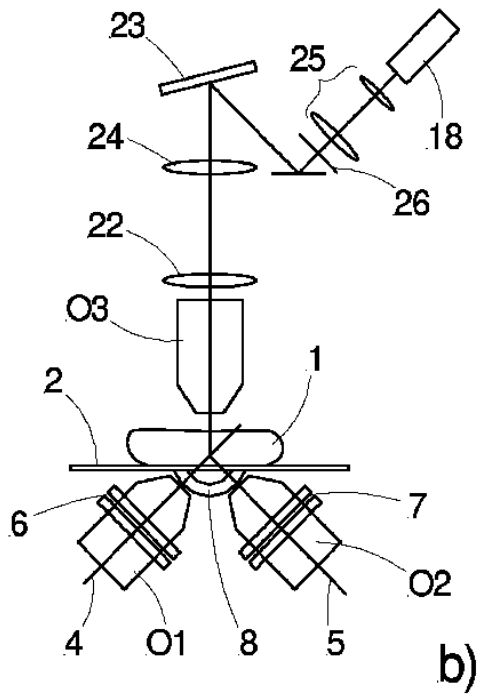
20

30

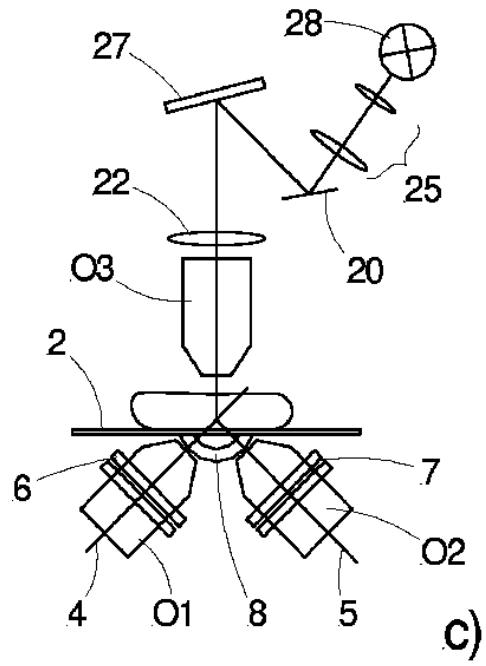
40

50

【図 6 b)】



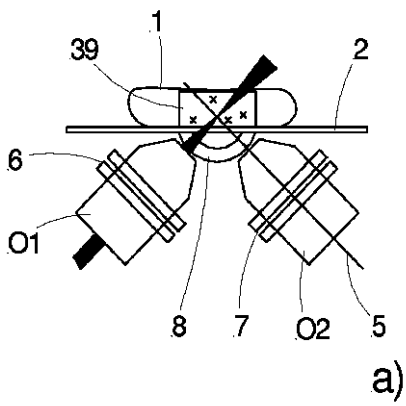
【図 6 c)】



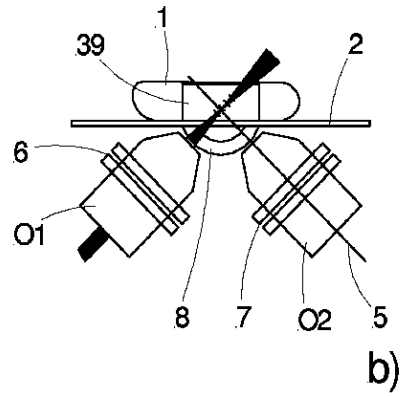
10

20

【図 7 a)】



【図 7 b)】



30

40

50

【 図 1 2 】

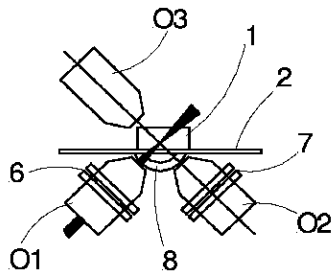


Fig. 12

【 図 1 3 】

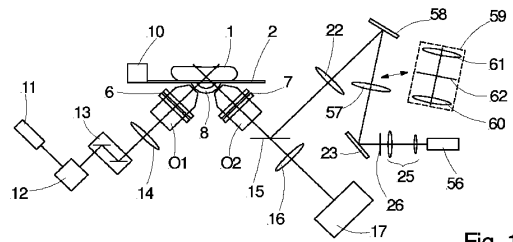
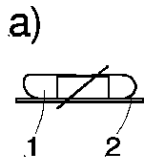


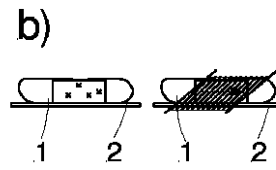
Fig. 13

10

【 図 1 4 a) 】



【 図 1 4 b) 】



20

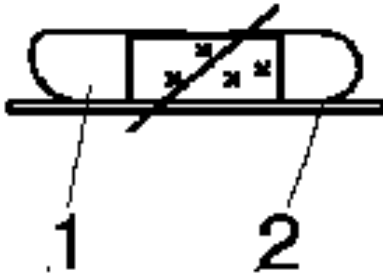
30

40

50

【 1 4 c)】

c)



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 梶並 順
 (74)代理人 100195006
 弁理士 加藤 勇蔵
 (74)代理人 100212657
 弁理士 塚原 一久
 (72)発明者 カルクブレナー、トーマス
 ドイツ連邦共和国、07745 イーナ、フォルストヴェーク 35
 (72)発明者 リッペルト、ヘルムート
 ドイツ連邦共和国、07745 イーナ、フォルストヴェーク 58
 (72)発明者 ジーベンモルゲン、イェルク
 ドイツ連邦共和国、07743 イーナ、ヘルデルストラーセ 35
 (72)発明者 ネット、ラルフ
 ドイツ連邦共和国、07745 イーナ、アメルバッヘル・シュトラーセ 107ツェー
- 審査官 森内 正明
- (56)参考文献 国際公開第2016/146503(WO, A1)
 特表2010-540995(JP, A)
 国際公開第2011/155628(WO, A1)
 国際公開第2015/130651(WO, A1)
 国際公開第2015/109323(WO, A2)
 国際公開第2016/105934(WO, A2)
 中国特許出願公開第105300941(CN, A)
 国際公開第2012/110488(WO, A2)
 国際公開第2015/017245(WO, A1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
 G01N 21/62 - 21/74
 G02B 21/00 - 21/36