(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6035018号
(P6035018)
(45)発行日　平成28年11月30日(2016.11.30)　(24)登録日　平成28年11月4日(2016.11.4)

(51)Int.Cl.　　F I
G02B 21/00 (2006.01)　　G02B 21/00
G01N 21/64 (2006.01)　　G01N 21/64　E

請求項の数 28　外国語出願　(全 19 頁)

(21)出願番号　特願2011-231660(P2011-231660)
(22)出願日　平成23年10月21日(2011.10.21)
(65)公開番号　特開2012-108491(P2012-108491A)
(43)公開日　平成24年6月7日(2012.6.7)
審査請求日　平成26年10月6日(2014.10.6)
(31)優先権主張番号　10 2010 060 121.7
(32)優先日　平成22年10月22日(2010.10.22)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(73)特許権者　500178876
ライカ　マイクロシステムス　ツェーエムエス　ゲーエムベーハー
ドイツ連邦共和国　デー・３５５７８　ヴェツラー　エルンスト・ライツ・シュトラーセ　１７－３７
(74)代理人　100091867
弁理士　藤田　アキラ
(74)代理人　100154612
弁理士　今井　秀樹
(72)発明者　ヴェルナー　クネーベル
ドイツ連邦共和国　７６７０９　クローンアウ　ヘーベルシュトラーセ　１７／１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】連続的な光シートを用いるＳＰＩＭ顕微鏡

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｙ方向から画像化対象の物体（２）へ照明光線（５、４１）を送る光源（４）と、
前記ｙ方向に対して略垂直に延び第一の検出方向としてのｚ方向に、蛍光および／または反射光として前記物体（２）から発せられる光を検出するカメラ（１６）と、
を備えて構成されるＳＰＩＭ顕微鏡において、
前記ｙ方向と前記ｚ方向に対して略垂直に延びるｘ方向に前記照明光線（５、４１）を走査することによって連続的な光シートを生成するｘスキャナ（１２）であって、前記光シート（１）が前記ｘ方向と前記ｙ方向によって画定される平面内で連続的に形成される、ｘスキャナ（１２）と、
前記照明光線（５、４１）の光線経路内に設置されたズーム光学系を備え、このズーム光学系が前記照明光線（５、４１）の焦点距離を、および／または前記ｙ方向と前記ｚ方向での前記光シートの大きさを変更するように構成されている照明光学系と、
を有し、
ｙ方向に沿って連続的に画像を検出することにより、ｚ方向に沿って解像度が高められた連続画像を検出するように構成される、
ＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項２】
前記物体（２）から送られ蛍光および／または反射光である検出光を、第二の検出方向として前記ｙ方向と反対方向に検出する光検出器（１９）を特徴とする、請求項１に記載

のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項３】
ＳＰＩＭ法により生成される二次元広視野画像と平行して、前記ｘ方向に延びる直線を含む、前記物体（２）の共焦点一次元画像も生成されることを特徴とする、請求項２に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項４】
前記物体（２）を前記ｚ方向に移動させて、相互にｚ方向に離間された複数の光シート（１）がそれぞれの照明面にて連続的に生成されるようにする第一のｚスキャナであって、前記各光シート（１）と前記カメラ（１６）との間の距離（Ｌ）が一定のままである第一のｚスキャナを特徴とする、請求項１～３のいずれか一項に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項５】
相互に距離に置いて前記ｚ方向に離間された前記複数の光シート（１）の各々と相関する、前記連続的に生成される画像を合成して三次元画像とする画像処理ユニット（２８）を特徴とする、請求項４に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項６】
前記物体（２）から送られ蛍光および／または反射光である検出光を第二の検出方向として前記ｙ方向と反対方向に検出する光検出器（１９）を有し、ＳＰＩＭ法により生成される前記三次元画像と平行して、前記ｘ方向と前記ｚ方向により画定される平面内で、前記物体（２）の共焦点二次元画像も生成されることを特徴とする、請求項５に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項７】
前記物体（２）に関して前記ｚ方向に前記照明光線（５、４１）を移動させて、相互に前記ｚ方向に離間された複数の光シート（１）を連続的に生成する第二のｚスキャナと、
前記光シート（１）と前記カメラ（１６）との間の距離が一定のままであるように、前記第二のｚスキャナによるｚ方向への前記照明光線（５、４１）の偏向に応じて前記検出光線の経路（１１）を追跡する第三のｚスキャナと、
を特徴とする、請求項１または請求項２に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項８】
相互に距離に置いて前記ｚ方向に離間された前記複数の光シート（１）の各々と相関する、前記連続的に生成される画像を合成して三次元画像とする画像処理ユニット（２８）を特徴とする、請求項７に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項９】
前記物体（２）から送られ蛍光および／または反射光である検出光を第二の検出方向として前記ｙ方向と反対方向に検出する光検出器（１９）を有し、ＳＰＩＭ法により生成される前記三次元画像と平行して、前記ｘ方向と前記ｚ方向により画定される平面内で、前記物体（２）の共焦点二次元画像も生成されることを特徴とする、請求項８に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項１０】
前記照明光線（５、４１）の焦点距離を変更するように構成された前記ズーム光学系（１３）が、相互に機械的に移動されるレンズ集合を有する光学ズームであることを特徴とする、請求項１～９のいずれか一項に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項１１】
前記ズーム光学系（１３）が、開口数を変化させることによって前記照明光線（５、４１）の焦点距離を拡張または短縮させ、したがって前記光シート（１）により照明される前記ｙ照明方向の視野の長さを拡張または短縮させるように構成されていることを特徴とする、請求項１０に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項１２】
前記ｘ方向の走査長さを変更するように構成された電子ズームを更に有す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ＳＰＩＭ顕微鏡。
【請求項１３】

前記ｘ方向の画素数は、選択されたｘ方向の走査長さとは関係なく、前記電子ズームによって一定に保たれることを特徴とする、請求項１２に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項１４】

複数の相互に離間された光シート（１）が連続的に生成される前記ｚ方向の走査長さを変更できる電子ズームを特徴とする、請求項４～１３のいずれか一項に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項１５】

前記ｚ方向に相互に離間された前記光シート（１）の数が、選択された前記ｚ方向の走査長さとは関係なく、前記電子ズームによって一定に保たれることを特徴とする、請求項１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項１６】

前記ｘ方向に走査される前記照明光線（５、４１）は、ｘ方向への最大走査長さに到達した折り返し地点で、またはその付近でオフにされることを特徴とする、請求項１～１５のいずれか一項に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項１７】

前記カメラ（１６）は、ＣＭＯＳカメラ、ＣＣＤカメラおよびアレイ検出器からなる群から選択される面検出器であることを特徴とする、請求項１～１６のいずれか一項に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項１８】

前記ｙ照明方向と反対の検出光の共焦点検出、前記ｚ方向の広視野検出光のＳＰＩＭ検出、前記共焦点検出と前記ＳＰＩＭ検出の同時検出、の動作モードの間で切り替えるように構成されたスイッチを特徴とする、請求項１～１７のいずれか一項に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項１９】

前記ｙ方向から失活光線（４０）を前記物体（２）に送り、前記ｚ方向に前記連続的に生成される光シート（１）をより薄くする失活光源であって、前記失活光線（４０）は、前記照明光線（４１）に関して前記ｚ方向にずらされた位置で前記物体（２）へと送られ、前記ｘ方向に走査されるその照明光線と平行に延びる失活光源を特徴とする、請求項１～１８のいずれか一項に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２０】

励起光線をベッセルビームに変調するように構成された励起光線変調器を特徴とする、請求項１９に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２１】

前記照明光源（４）はパルスレーザであり、

前記照明光線は多光子レーザ光線であり、

多光子信号は前記ｚ方向に検出されることを特徴とする、請求項１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２２】

前記カメラ（１６）は、前記ＳＰＩＭ信号に加えて、前記多光子信号を検出するように構成された高速カメラであることを特徴とする、請求項２１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２３】

前記ｚ方向からの前記多光子信号を抽出し、これを光検出器（４５）に向けることのできる調光ミラー（４３）を特徴とする、請求項２１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２４】

物体の大きな領域が、連続的に画像化された隣接の物体領域を合成することによって画像化される、請求項１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２５】

前記光シートの使用可能な大きさが、ズーム光学系の開口数を大きくすることによって小さくされる、請求項１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２６】

前記照明光線の焦点距離が、前記ズーム光学系を前記照明光学系と組み合わせて開口数を変化させることによって拡張または短縮させて、ｙ照明方向に前記光シートによって証明される視野の長さを拡張または短縮する、請求項１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２７】

前記物体がｘ方向またはｙ方向に移動させられ、前記物体の新しい領域が照明されて、画像が前記カメラによって検出される、請求項１に記載のＳＰＩＭ顕微鏡。

【請求項２８】

光源（４）とカメラ（１６）とＸスキャナ（１２）と照明光学系を有するＳＰＩＭ顕微鏡にして、ｙ方向に沿って連続的に画像を検出することにより、ｚ方向に沿って解像度が高められた連続画像を検出するように構成されたＳＰＩ顕微鏡であって、前記照明光学系が、照明光線（５、４１）の焦点距離および／またはｙ方向とｚ方向での光シートの大きさを変更するように構成されたズーム光学系を、照明光線の光線経路内に有する、ＳＰＩＭ顕微鏡を操作する方法であって、

前記光源（４）によって、ｙ方向から画像化対象の物体（２）へ照明光線（５、４１）を送るステップと、

前記カメラ（１６）によって、前記ｙ方向に対して略垂直に延び第一の検出方向としてのｚ方向に、蛍光および／または反射光として前記物体（２）から発せられる光を検出するステップと、

前記ｘスキャナ（１２）によって、前記ｙ方向と前記ｚ方向に対して略垂直に延びるｘ方向に前記照明光線（５、４１）を走査することによって、前記ｘ方向と前記ｙ方向によって画定される平面内で連続的に形成される光シートを生成するステップ、

の各方法ステップを有する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、照明光線をｙ方向から画像化対象の物体へと送る光源と、物体から発せられる蛍光および／または反射光として発せられる光を、第一の検出方向としてｚ方向に検出するカメラと、を備え、ｚ方向はｙ方向に対して略垂直に延びるＳＰＩＭ顕微鏡に関する。

【背景技術】

【０００２】

特に、生体試料の分析は、素早く、かつ試料を損傷せずに行うべきである。多くの用途において、三次元画像を生成することが有益である。特に照明光が蛍光を励起するための励起光の役割を果たす蛍光顕微鏡の分野においては、照明光と試料との相互作用による散乱アーチファクトと吸収アーチファクトを回避するべきである。

【０００３】

顕微鏡用試料を、高速で、損傷を与えずに、高い解像度で分析するためには、いわゆるＳＰＩＭ（選択的平面照明顕微鏡若しくは選択的面結像顕微鏡）法が特に適しており、この技術においては、照明光が光シートを生成し、その一方で、蛍光と反射によって生成される検出光が、カメラによって、照明方向と比較して垂直な方向に検出される。

【０００４】

光シートは、略長方形の断面を有する照明対象域（illumination volume）であり、この断面は、第一の断面方向（ここではｚ方向）には非常に薄く、第二の断面方向（ここではｘ方向）には、第一の断面方向と比較して有意に大きい。照明方向（ここではｙ方向）は、第一の断面方向（ここではｚ方向）に対して略垂直かつ、第二の断面方向（ここではｘ方向）に対して略垂直に延びる。光シートは、円柱レンズによって合焦され、光シートの焦点または焦点距離は、照明方向（ここではｙ方向）に延びる特定の範囲と理解するものとし、この範囲で光シートは特に薄く、それによって、照明される対象域がシートの形状を有し、すなわちｚ方向に非常に薄く、ｘ方向とｙ方向にははるかに大きい。

【０００５】

円柱レンズを用いる先行技術のＳＰＩＭ法による光シートの生成には、システムの柔軟性が非常に低いという欠点があり、たとえば焦点が固定され、したがって照明される対象域も予め決定される。高解像度とするためには、非常に薄くて長い焦点が有利である。この焦点を走査して、試料についての一方向の三次元画像を得ることができる。長さが長くなると幅も広くなるため、ｚ方向の解像度が低下する。これは、照明光学系の開口数が低く、長い焦点とすると、照明対象域の厚さも大きくなることを意味する。これは、検出方向への光学軸に沿った光学解像度が同様に低いことを意味する。

【０００６】

励起光と試料の相互作用によって、散乱アーチファクトと吸収アーチファクトが発生し、これらは画像の中で照明軸に沿った筋または陰影として目に見え、これはまた「カーテン効果」とも呼ばれる。

【０００７】

カーテン効果を低減させるための先行技術による１つの方法はｍＳＰＩＭ法であり、これによれば、テレセントリック構成においてさらに、共鳴ミラーによって、光シートが光軸に関して傾けられ、それによって照明光線がさまざまな角度から試料上に入射し、その結果、散乱アーチファクトと吸収アーチファクトが低減される。簡単に言えば、入射方向を変えることによって、試料内の吸収領域のための幾分かの背景照明が供給され、それによって画像の筋や陰影が減少する。この方式の欠点は、特に、三次元画像を生成するために光シートがｚ方向に走査されるべきである場合に、より複雑となる点である。それとは別に、これでは焦点が予め決定されることによる柔軟性の低さの問題が解決されない。

【０００８】

本発明の目的は、冒頭に記した顕微鏡の柔軟性を改善し、それと同時に、より高い解像度を実現して、より多くの画像データを検出することである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明によれば、上記の目的は、ｘ方向に照明光線を走査することによって連続的な光シートを生成するｘスキャナであって、ｘ方向がｙ方向とｚ方向に略垂直に延び、光シートがｘ方向とｙ方向により画定される平面内で連続的に形成されるｘスキャナと、照明光線の光線経路内に配置されたズーム光学系を備え、前記ズーム光学系が照明光線の焦点距離を変更するようになされた照明光学系とによって実現される。

【００１０】

本発明の好ましい実施形態によれば、光検出器が提供され、これは、物体から送られた検出光を、第二の検出方向としてｙ方向の反対方向に検出し、検出光は蛍光および／または反射光である。これは第二のデータストリームを生成し、このデータストームはこれに加えて、たとえば共焦点画像の生成に使用できる。この選択的な追加画像は、必要に応じてオンまたはオフに切り替えることができる。

【００１１】

多光子レーザを使用する場合、多光子検出によって画像を生成するために、共焦点検出のほか、デスキャンを行わない（non-descanning）光路を選択することができる。デスキャンを行わない検出経路は、特に厚い試料の場合、集光効率が高くなるという利点を有する。「デスキャンを行わない」という用語は、検出光を検出対物レンズにおいて直接分離することと理解するべきである。

【００１２】

ＳＰＩＭ検出光線の経路（ｚ方向）を蛍光の集光に使用し、光を光電子増倍管またはＡＰＤもしくはＡＰＤアレイへと向ける場合、蛍光の集光に照明光学系を使用する場合より効率がはるかに改善され、これは一般に、照明システムに使用される開口数がＳＰＩＭ構成の検出システムの開口数より低いからである。

【００１３】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、ＳＰＩＭ技術により生成される二次元広視野

画像と平行して、選択的に多光子照明を使用することにより、物体の共焦点一次元画像も生成され、これはｘ方向に延びる直線を含む。この場合、二次元画像は、光シートによって照明され、前述のようにズーム光学系によって変更された照明層を画像化し、その一方で、平行して、いわゆるｘ－ｔ画像が生成され、これは、特に生体試料の場合に、物体内の特定の要素の移動速度に関する情報を提供しうる、たとえば分子またはその他の細胞部分（細胞小器官）の拡散に関する情報を提供しうる線画像を意味する。

【００１４】

好ましくは、三次元画像を生成するために、第一のｚスキャナが設置され、これは物体をｚ方向に移動させ、それによって相互に関してｚ方向に離間された複数の光シートが、それぞれの照明面において連続的に生成され、各光シートとカメラの間の距離は一定のままとされる。利点は、照明光学系全体のほか、これに加えて選択的にオンに切り替えることのできるＳＰＩＭ検出光学系と共焦点検出光学系を同じ位置にとどめておくことができ、これに加えて、照明光線をスキャナによってｚ方向に偏向させる必要がなく、したがって、照明光学系を単純化できるという点である。別の例においては、照明光学系を移動させること、または照明光線を、たとえば音響光学偏向器（ＡＯＤ）または検流計によって偏向させることも可能である。この場合、ＳＰＩＭ検出光学系で追跡することが好ましく、これは、ＳＰＩＭ検出光学系の対物レンズの位置を変えること、または別の例においては、カメラを含むＳＰＩＭ検出光学系全体を移動させることによって実現できる。

【００１５】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、画像処理ユニットが提供され、これは相互の距離においてｚ方向に離間されたそれぞれの複数の光シートに相関する、連続的に生成される画像を合成して三次元画像にする。

【００１６】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、ＳＰＩＭ法により生成される三次元画像と平行して、ｘ方向とｚ方向により画定される平面内で、物体の二次元共焦点画像もまた生成される。

【００１７】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、第二のｚスキャナが提供され、これは照明光線を物体に関してｚ方向に移動させて、相互に関してｚ方向に離間された複数の光シートを連続的に生成し、また、第三のｚスキャナが提供され、これは光シートとカメラとの間の距離が変化しないように、第二のｚスキャナによるｚ方向への照明光線の偏向に応じて検出光線を追跡する。このようにして生成されたデータストリームは、好ましくは画像処理ユニットによって処理され、この処理ユニットは、相互の距離においてｚ方向に離間されたそれぞれの複数の光シートに相関する、連続的に生成された画像を、各種の利用可能なレンダリング方法（投射、透過、シェーディング、光線追跡等）によって三次元画像に合成する。好ましくは、レンダリングにより生成される三次元画像に加えて、ＳＰＩＭ法により生成される三次元画像と平行して、ｘ方向とｚ方向により画定された平面において物体の二次元共焦点画像（多光子による）が生成される。

【００１８】

物体のより大きな領域を画像化する場合、これは、いわゆる「ステッチング」、すなわち連続的に画像化された隣接の物体領域を合成することによって実現することができる。この目的のために、物体はｘ方向に移動され、新しい領域が照明されて、画像がカメラによって検出される。ｘ方向への移動の回数は、物体の大きさ、対物レンズの視野の大きさおよびカメラのパラメータに依存する。また、物体をｙ方向に移動させて、物体のより大きな領域を検出することも可能である。これらの画像はすべて、１つの大きな全体画像に合成することができる。

【００１９】

柔軟性のある光学ズーム装置によって、光シートの大きさ（ｙ方向とｚ方向）を調整できる。

【００２０】

薄い層だけを照明したい場合、ズーム光学系の開口数を大きくすると、その結果、光シートの使用可能な大きさが小さくなる。

【００２１】

ｙ方向に沿って連続的に画像を検出することにより（ステッチング）、ｚ方向に沿って解像度が高められた連続画像を検出できる。

【００２２】

ズーム光学系の光学パラメータはわかっているため、適当な画像処理を選択することによって、これらの領域だけを使用して合成することができ、高い解像度が得られる。

【００２３】

照明光線の焦点距離を変化させることのできるズーム光学系は、本発明の好ましい実施形態による光学ズームとすることができ、これは複数のレンズ集合を有し、レンズ集合は相互に関して機械的に移動される。ズーム光学系と照明対物レンズとの組み合わせにより、照明光線の焦点距離は、開口数を変化させることによって拡張または短縮させることができ、それによって、ｙ照明方向に光シートによって照明される視野の長さを拡張または短縮できる。

【００２４】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、電子ズームが提供され、これはｘ方向への走査長さを変更するようになされている。好ましくは、ｘ方向への画素数は、電子ズームによって、選択されているｘ方向の走査長さに関係なく、一定に保持される。ｘ方向への走査長さが短縮され、しかしその短縮された走査長さにわたる走査画素数が一定のままであると、解像度は、共焦点検出の場合、ナイキストの定理による限界に到達するまで高めることができる。

【００２５】

同時に共焦点検出画像が生成される場合、この画像もまた、解像度がｘ方向にナイキストの定理による限界に到達するまで高いが、ｘ方向の画像の大きさは小さく、これは電子ズームの機能を有することがわかる。

【００２６】

本発明の好ましい実施形態によれば、追加として電子ズームが提供され、それによってｚ方向への走査長さを変化させることができ、それに沿って複数の離間された光シートが連続的に生成される。この場合、ｘ方向に作用する電子ズームと略同じことが当てはまる。好ましくは、ｚ方向に相互に関して離間される光シートの数は、電子ズームにより、選択されたｚ方向の走査長さに関係なく、一定に保持される。

【００２７】

他の好ましい実施形態によれば、ｘ方向に走査される照明光線は、ｘ方向への最大走査長さに到達した折り返し地点で、またはその付近でオフとされる。これによって、折り返し地点においては試料に送られる光が少ないため、試料の損傷を回避できる。これに加えて、これはまた、折り返し地点においては試料の他の領域と比較して、より長時間にわたって照明が維持されることから画像が折り返し地点において特に明るく見える、ということも回避できる。理想的な場合では、ｘ方向の走査速度は鋸歯状のグラフをたどる。しかしながら、走査速度が非常に速いと、これを実現することは難しいため、代わりに正弦グラフが選択され、その結果、折り返し地点において、走査経路の中央より走査速度が低下する。特に、正弦曲線の場合、照明光線が折り返し地点においてオフにされると有益である。

【００２８】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、カメラは、ＣＭＯＳカメラ、ＣＣＤカメラまたはアレイ検出器からなる集合から選択される面検出器である。ＳＰＩＭ法は広視野顕微鏡法であるため、カメラが検出光の位置推定を行うべきである。

【００２９】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、本発明による顕微鏡が提供され、これは次の動作モードの間で切り替えるようになされたスイッチを備える。すなわち、ｙ照明方向と

反対の検出光の共焦点検出、ｚ方向への広視野検出光のＳＰＩＭ検出および、上記の共焦点検出とＳＰＩＭ検出の同時検出、である。

【００３０】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、失活光源（deactivation light source）が提供され、この光源はｙ方向から失活光線（deactivation light beam）を物体に送り、ｚ方向に連続的に生成される光シートをより薄くし、失活光線は、照明光線に関してｚ方向にずらされて物体に送られ、ｘ方向に走査されるその照明光線に平行に延びる。好ましくは、失活光線の断面は変調されており、それがｚ方向に見たときに、励起光線の中央の前後に２つの最大値を有し、この中央では励起光線は最大値の間のゼロ地点を有している。しかしながら、別の例においては、２つの別々のレーザ光線を失活光線として送ること、または光シートを片側だけ薄くする、すなわちｚ方向に見たときに、励起光線の前または励起光線の後で１つの失活光線だけを供給することも可能である。

【００３１】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、励起光線変調器が提供され、これは励起光線をベッセルビームに変調するようになされている。ベッセルビームは、光線の断面にわたって均一でない強度分布を有し、比較的鮮鋭な主要最強部といくつかの重要なサイドローブがある。特に、ＳＴＥＰ失活光線を追加した場合、サイドローブは失活によって抑制することができ、それによって、励起光線の中央に狭い主要最強部だけが残る。ベッセルビームはさらに、比較的不透明な部分の背後で少なくとも部分的に再形成される（reform）ため、カーテン効果をさらに減少させるという利点を有する。

【００３２】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、照明光源はパルスレーザであり、照明光線は多光子レーザ光線であり、多光子信号がｚ方向に検出される。特定の利点は、ＳＰＩＭ検出光学系の開口数はより大きく、したがって、多光子信号検出のために、より高い信号強度の検出が可能となる点である。

【００３３】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、カメラは、ＳＰＩＭ信号に加えて多光子信号を検出するようになされた高速カメラである。高速カメラは、たとえば、５１２×５１２のフォーマットで毎秒最大１０００枚の画像を検出できる。

【００３４】

本発明の他の好ましい実施形態によれば、調光ミラーが提供され、これによってｚ方向から多光子信号を抽出し、これを光検出器に向けることができる。光検出器は一般にカメラより高速であるが、位置推定は行わないものの、位置推定が多光子照明光線を介して提供できれば、それは絶対的に必要なものではなく、この位置推定は多光子照明の場合、特に容易に行われ、これは、この種の照明の場合、ある時点で物体の中のどの小さな対象域が照明されているかがわかるため、信号検出には、全方向からの光を検出できるからである。

【００３５】

以下に、本発明を、図面を参照しながら説明する。

【図面の簡単な説明】

【００３６】

【図１】先行技術によるＳＰＩＭ法の基本原理を示す概略斜視図である。

【図２】先行技術によるＳＰＩＭ法による照明光線の経路と検出光線の経路の概略図である。

【図３】本発明による顕微鏡の概略図である。

【図４】図３に示される本発明による顕微鏡をｘ走査方向に見た概略図であり、照明光線の経路と検出光線の経路が含まれる。

【図５】図４に示される顕微鏡をｙ照明方向から見た概略図である。

【図６】先行技術によるＳＴＥＤ原理もまた示す概略図である。

【図７】位相板によるＳＴＥＤ失活光線の変調を示す概略図である。

【図８ａ】座標ｘ、ｙ、ｚとした、励起光線の断面のほか、これに関係する強度分布である。
【図８ｂ】座標ｘ、ｙ、ｚとした、励起光線と失活光線との比較のほか、ｘ方向への走査によって生成される連続光シートおよび強度分布である。
【図９】多光子信号を検出するためにＳＰＩＭ検出光学系を追加で使用する、本発明の他の実施形態の概略図である。
【発明を実施するための形態】
【００３７】
図１は、先行技術によるＳＰＩＭ顕微鏡の原理を簡潔に示しており、この顕微鏡は「選択的面結像（Selective Plane Imaging）」法の原理に基づいて動作する。照明はｙ方向に、物体の特定の物体面を照明する光シートによって行われる。検出方向は、光シート１に対して略垂直に、すなわちｚ方向に延び、検出光の検出は対物レンズ３によって行われる。図１に示されるように、光シート１は、ｚ方向に高い解像度を得るために、内側部分の範囲にわたり特に薄くあるべきである。高い解像度は、光シート１が物体内で狭い焦点を有する場合に得られる。
【００３８】
以下により詳しく説明するように、この焦点距離は変更することができ、画像化される視野はより大きくなるが、焦点の鮮鋭さが低下し、したがって光シート１の狭さが低下し、したがってｚ方向への画像の解像度が低下する。具体的な用途によっては、ｚ方向への解像度は低いが、同時に、より厚い光シートに基づく、より大きな視野とより大きな画像化対象域を得ることが有益かもしれない。より大きな画像化対象域はまた、生成された画像でも画像の中の関心対象物をよく見ることができれば有益かもしれないが、同時に、より大きな画像化対象域とすることは、画像化された対象域の中に関心対象物が確かに含まれていることを確認しやすいという利点を有する。その後、関心対象物について、はるかに高解像度の画像を生成するべきであれば、ズーム光学系によって連続的な光シート１の焦点を操作して、焦点をより小さく、しかしより鮮鋭にすることが可能である。
【００３９】
共焦点走査顕微鏡と異なり、ＳＰＩＭ法によりｚ方向の検出光を検出するには、ＳＰＩＭ法が広視野顕微鏡法であることから、検出された光の位置推定が必要である。位置推定は一般に、カメラ、たとえばＣＣＤカメラまたはＣＭＯＳカメラによって行われる。物体の三次元画像をＳＰＩＭ法で生成すべき場合、光シート１をｚ方向に走査でき、さまざまな照明面で得られた画像を合成して、三次元画像を生成することができる。この画像処理はまた、この場合はｚ方向の「レンダリング」と呼ばれる。
【００４０】
図２は、ＳＰＩＭ顕微鏡の先行技術による照明光線の経路を概略的に示す。レーザ４は照明光線５を生成し、これがビームエキスパンダを通じてコリメートレンズ６に送られ、その後円柱レンズ７によって引き継がれて、光シート１が物体に合焦される。対物レンズは検出光を集光し、これをカメラ９に向ける。光シートの焦点は、レンズ集合の中の要素を移動させることによって変更することができ、この図２による、ごく単純化された例においては、円柱レンズ７をコリメートレンズ６に関して移動させることによる。
【００４１】
図３は、本発明によるＳＰＩＭ顕微鏡の概略的構造を示しており、照明光線の経路は参照番号１０で示され、ＳＰＩＭ検出光線の経路は参照番号１１で示される。照明光学系の光線経路１０は、これに加えて共焦点検出光線の経路の機能も有するが、これは照明方向と比較して反対方向に延びる。
【００４２】
まず、照明光学系の光線経路について説明する。レーザ４が発生する照明光はスキャナ１２を介してズーム光学系１３に送られる。スキャナ１２は、物体２を照明するための連続的な光シート１を生成する。光シート１を連続的に生成するために、照明レーザ光線はｘ方向、すなわち図３によれば、それぞれ図の平面から出る、または図の平面に入る方向

に走査される。レーザ光線は、たとえば、円形の断面を有するが、別の例においては、その断面形状が変調されてもよく、たとえば、楕円の断面にして、楕円の断面の長軸がｘ方向に延びるようにしてもよい。同様に、照明光線の経路は、たとえば長方形とすることができ、あるいはその他どのような形状にしてもよい。

【００４３】

ＳＰＩＭ検出光線の経路１１はｚ方向、すなわち照明光線の経路１０が延びるｙ方向に対して略垂直に延びる。照明ビーム光線の経路と検出光線の経路との垂直の関係を若干ずらすことが有利かもしれず、たとえば、２つの経路の間で９０°より小さい、または大きい角度を、たとえば物体内の部分または粒子のための背景照明を提供するため等に選択することができる。たとえばｍＳＰＩＭ法として知られているように、異なる角度から画像を検出して、その後、これらを合成することが可能である。以下に、説明を簡単にするために、長方形の関係について説明するが、理解するべき点として、ずれた角度も包含され、これはしかしながら、多かれ少なかれ９０°に近いと理解されるべきである。反射または蛍光発生のいずれかによって物体２から発せられた検出光は、対物レンズ３によって集光される。特に、マルチカラー検出の場合、カラーフィルタ１４が対物レンズの下流に設置され、特定の波長の検出光がフィルタにかけられ、この光は次に、管状レンズ１５を介して、カメラ１６、たとえばＣＣＤカメラ１６に向けられる。

【００４４】

三次元画像を生成するために、物体キャリア１７をｚ方向に走査して、物体２の中の連続的に異なる照明面を照明することができ、照明面の各々は、ｘ方向に走査される走査レーザ光線によって走査され、したがって各々の照明面において連続的に形成される、連続的に形成される光シート１によって照明される。ｚ方向に隣接する複数の連続的に形成される光シート１は、ｚ方向に「レンダリング」によって合成することができる。

【００４５】

三次元画像をｚ駆動の「レンダリング」で生成するべきである場合、物体２を移動させることは、物体内のそれぞれの隣接する照明面と対物レンズとの間の距離が一定であるという点で有利であり、これは、照明光線の位置も変化しなければ、カメラ１６の位置も変化しないからである。別の例において、光シート１をたとえば検流計によってｚ方向に走査することも可能である。これには、しかしながら、対物レンズ３もまた移動させて、それぞれの照明面と物体との間の距離が同じになるようにする必要がある。別の例においては、もちろん、対物レンズ３、フィルタ１４、管状レンズ１５およびカメラ１６を含むＳＰＩＭ検出光学系の全体を移動させることも可能である。

【００４６】

照明検出光学系の光線経路１０は、前述のように、共焦点検出光線の経路の機能をさらに有していてもよく、その目的のために、物体から反射された光をｙ方向に検出し、および／または発せられた蛍光を検出するために、検出器１８を設置することができる。検出光線の経路１１を通じてＳＰＩＭ法により画像を検出するのと同時に、平行して共焦点画像検出を実行することも可能であり、これは、光シート１がｘ方向への走査によって連続的に生成されるからである。生成される共焦点画像は、ＳＰＩＭ検出によって検出される画像と比較して、一次元低い。たとえば、ＳＰＩＭ検出によって二次元画像だけが生成される場合、すなわち１つの画像面だけの画像の場合、いわゆるｘ－ｔ画像、すなわち１次元直線画像を検出することも可能である。これは、たとえば、蛍光を発生するためにマーカによりマークされるか、染色される特定の分子の拡散速度を測定するために使用でき、その一方で、同時に画像化される二次元ＳＰＩＭ画像からは、異なる情報、たとえば物体の画像化された画像面内のどの分子が他のどの分子と結合するかという情報が提供されるかもしれない。

【００４７】

ＳＰＩＭ検出によって、ｚ駆動で三次元画像が生成される場合も同じことが言え、すなわち共焦点二次元画像が生成される。このように、たとえば、三次元形状の物体の中のどの分子が他のどの分子と結合するかを判定することが可能であり、その一方で、平行して

、特定の面を通じて拡散する分子の拡散速度も測定できる。“ｎ”次元のＳＰＩＭ画像と平行して“ｎ－１”次元の共焦点生成画像を同時に検出することにより、その組み合わせで、追加の判断が可能となり、たとえば追加の速度情報から、物体２の中でどの個体の要素、たとえば分子またはその他の要素が移動しているかを判断することができる。特に、顕微鏡の分野において、これによって生体内での新たな用途が見出される。

【００４８】

図４は、本発明の別の実施形態を示す。同様の要素には、それ以前の図面と同じ参照番号が付与されている。また、この図において、ＳＰＩＭ検出光線の経路は参照番号１１で示されており、その一方で、照明光線の経路は参照番号１０で示されている。また、図４によるこの実施形態において、照明光線の経路１０は、追加の検出光線の経路の機能を有し、開口２０を通じて共焦点検出光２１を受けるフォトダイオード１９によって信号検出が行われ、それぞれの信号は画像処理ユニット２２を介してモニタ２３に送られる。検出光は、ダイクロイックミラー２４によってフォトダイオード１９へと偏向される。フォトダイオード１９の代わりに、その他の光センサ、たとえばアバランシェダイオード、光電子増倍管またはカメラを設置することができる。これは共焦点画像検出に関するものであるため、位置推定は不要であり、これは、位置に関する情報は走査された照明光線から得られ、すなわち、ある時点で物体のどの画像点が照明されているかがわかり、したがって、その特定の画像点から受け取った信号が、信号を受信する直前に照明されていた画像点からのものであるという情報がわかるからである。したがって、共焦点検出にはカメラのためのコストが不要となる。

【００４９】

連続的に生成される光シート１の焦点を変更するために、ズームレンズ２５を、別のレンズ２６に関してｙ方向に移動させてもよい。実際の用途においては、レンズ集合がこの目的のために設置されるが、簡素化のために、説明する実施形態では、ズームレンズ２５を１枚だけ示す。したがって、ズーム光学系１３は、照明対物レンズ（マクロ対物レンズ）との組み合わせにより、焦点距離の範囲２７を変更する光学ズームとなる。簡素化のために、ＳＰＩＭ検出光学系の詳細は、図４では省略されており、これらの光学系はすでに、対物レンズ３、フィルタ１４および管状レンズ１５を含むものとして図３に示されているからである。概略的に示されているＣＣＤカメラ１６は、ｚ方向に受け取る検出光のためのｘ－ｙ面における位置推定ステーションとなる。ＳＰＩＭ画像処理ユニット２８を介して、ＣＣＤカメラにより受け取られた信号は処理され、ＳＰＩＭモニタ２９に送られる。物体２内の多数の面を照明するべきである場合、物体キャリア１７をｚ方向に移動することができる。図４の例から明確にわかるように、照明面とＣＣＤカメラとの間の距離Ｌは常に一定である。図３に関してすでに説明したように、照明光線をｚ方向に移動させ、その一方で、物体２を同じ位置に保持することも可能であり、また、代わりにＣＣＤカメラを移動させることによって、あるいは実行しやすい方法として、対物レンズ３のＣＣＤカメラ１６に関する位置を変えることもできる。

【００５０】

図５は、図４に示される実施形態を異なる視点から、すなわち照明光線の方向に見た、すなわちｙ方向に見た図である。ここには、特に、連続的に形成される光シート１を生成するために、ｘ方向に走査される個々の画像点３０が示されている。ダイクロイックミラー２４は、検出光をフォトダイオード１９の方向に偏向させる。物体キャリア１７は、ｚ方向に走査することができ、すなわちＣＣＤカメラ１６の方向に移動することができ、またＣＣＤカメラから遠ざかるように移動させることができ、物体内の異なる照明面が照明される。

【００５１】

別の好ましい実施形態において、光シート１は、ＳＴＥＤ（Stimulated Emission Depletion（誘導放出抑制））を適用することによってさらに狭めることができ、すなわち、より薄くして、ｚ方向により高い解像度とすることができる。先行技術から知られているＳＴＥＤ顕微鏡の基本構造を図６に示す。励起光線３１と失活光線３２がビームコンバイ

ナによって、この実施形態ではたとえばダイクロイックフィルタによって合成されて、統合光線経路３４として対物レンズ３を通って物体２へと向けられる。それらの間には、いくつかのその他の光学素子、たとえばレンズ、光伝導ファイバまたはカラーフィルタ等を設置できる。失活光線は一般に、その強度分布において変調され、これはたとえば位相板によって実現できるが、その目的のために特に構成されたレンズによっても実現可能である。変調は、失活光線がその中心においてゼロ地点を有するように実行することができ、これは、強度がゼロ地点においてゼロであるか、または非常に低く、このゼロ地点の周囲に、均一の環状の強度最大値が得られることを意味する。蛍光顕微鏡で使用される染料は、特定の励起波長と失活波長で反応して、特によく蛍光を励起し、または蛍光を失活させる。一般に、励起波長と失活波長は相互に異なり、励起光線と失活光線は相互に関して時間的に遅延されて物体に送られる。励起により、特定の大きさの画像点を励起して、蛍光を発生させることができ、その一方で、その直後に、励起の中心の周囲で失活を適用することができ、それによって物体２のこの画像点から発せられた蛍光を狭めて小さな画像点とし、したがって解像度を改善することができる。マルチカラー蛍光顕微鏡では、さまざまな異なる染料を使用でき、これらは異なる励起波長によって相互に区別され、すなわちさまざまな波長の励起光によって、蛍光を発生するために特に強力な励起を行うことができる。

【００５２】

好ましくは、染料は、これらが共通の同じ失活波長で失活でき、さまざまな失活波長を供給する必要がなくなるような組み合わせで選択することができる。

【００５３】

対物レンズ３を通って物体から送り戻される検出光３５は、ビームスプリッタ、この場合は同様にダイクロイックミラー３７によって、レンズと適当な開口３８を通って送られ、光検出器３６への散乱光を除去することができる。

【００５４】

位相板３９による失活光線４０の変調を図７に示す。位相と強度分布はどちらも、このような位相板３９によって変調可能である。この目的のために、位相板は、失活光線４０は変調されるが、励起光線４１は変調されないように設計され、すなわち、変調は、励起光線４１と比較して失活光線４０については異なる波長に依存する。

【００５５】

理解するべき点とし、ＳＴＥＤ原理はまた、図４に示されるように、照明光線の経路１０にも実装できる。この場合においては励起光と等しい照明光のためのレーザ４に加えて、失活光を生成するために他のレーザを設置することができる。励起光線と失活光線は、いずれも、図６に示されるように、１つの光線経路に合成することができ、また、失活光線を別の光線の経路に沿って送ることもできる。また、励起光線と失活光線を、１つのレーザ４（白色光レーザ）だけで生成することも可能であろう。この目的のために、光線を分割し、光線の一部が音響光学素子、たとえば音響光学可変フィルタ（ＡＯＴＦ）を通過するようにし、ここで所望の波長を選択できる。パルスレーザの使用により、励起光線と失活光線との間で、いわゆる遅延ステージによって時間遅延を発生させることができる。

【００５６】

本発明の１つの実施形態を図８ａと図８ｂに示す。図８ａは、円形の励起光線４１の断面を示す。方向ｘ、ｙおよびｚは、図４と図５に示されているように、図８ａと図８ｂにも示されている。励起光線の強度分布プロファイルが右側に示されており、これは一般に、回折による比較的小さいサイドローブを除いて、ガウス分布に従っている。図８ｂは失活光線４０を示しており、これは、励起光線４１の両側に最大強度があり、それらの間に、強度がゼロであるか、または少なくとも非常に低いゼロ地点があるように変調されている。図８ｂからわかるように、失活光線４０の、ゼロ地点の両側に配置された最大強度は、断面が円形ではなく、その断面は、励起中心から遠い方面する側と比較すると、中心に向かって平坦化された曲率を有する。図８ｂにおいて破線で示されている、連続的に生成される光シート１として、中心領域の小さな帯状部分だけが残り、この部分においては、

失活光は蛍光を失活させない。励起光線４１、失活光線４０および連続的に生成される光シート１の断面の右側に、励起光線４１と失活光線４０の強度分布が、図８ｂに示されている。

【００５７】

ＳＴＥＤ失活光線は、選択的に、これに加えてオンにすることができ、またはオフにすることができ、これもまた、ｘ方向に線ごと、または画素ごとに実行できる。失活光線がいつオンにされたか、またはオフにされたかの情報はわかるため、それぞれのデータストリームを分割でき、すなわち、より厚い光シートに基づき、それぞれより大きな照明面積（照明焦点の断面と比較）とより大きな照明対象域をカバーする画像を生成するための第一のデータストリームと、より薄い光シートに基づき、より小さな照明面積（照明焦点の断面に関して）とより小さな照明対象域での画像を生成するための第二のデータストリームに分割できる。これによって、同時に、ＳＴＥＤ光線を追加することによって、ｚ方向に、高解像度の画像と、ＳＴＥＤ光線を追加せずに、ｚ方向に、より低い解像度であるが、物体内のより大きな対象域を照明する利点を有する画像を生成することができる。

【００５８】

ＳＴＥＤ光線を追加し、またはオフにすることとは無関係に、この顕微鏡によって、平行して、同時に、ｎ次元のＳＰＩＭ顕微鏡画像とｎ－１次元の共焦点生成画像を生成することができ、その一方で、これらの画像はまた、平行して、それぞれＳＴＥＤ光線を追加でオンにし、またはオフにすることによって、高い解像度で、または低い解像度でｚ方向に生成することができる。全体として、以下のデータセットを生成する４つの別々のデータストリームを同時に生成することが可能である。

ｉ）高解像度であるが、物体の中の、より小さな対象域を画像化する三次元データセット（ＳＰＩＭ）、

ｉｉ）低解像度であるが、物体の中の、より大きな対象域を画像化する三次元データセット（ＳＰＩＭ）、

ｉｉｉ）高解像度でのｚ方向の二次元共焦点画像、

ｉｖ）より低解像度でのｚ方向の二次元共焦点画像。

【００５９】

１つの平面だけを光シートで照明するべきである場合、以下の画像を同時に生成できる。

ｉ）高解像度であるが、物体の中の、より小さい対象域を画像化する二次元画像（ＳＰＩＭ）、

ｉｉ）低解像度であるが、物体の中の、より大きい対象域を画像化する二次元画像（ＳＰＩＭ）、

ｉｉｉ）高解像度でのｚ方向の一次元共焦点画像ｘ－ｔ、

ｉｖ）より低解像度でのｚ方向の一次元共焦点画像ｘ－ｔ。

【００６０】

ｚ方向への光シートの数はｘの寸法に依存せず、すなわち、異なる画像フォーマットから選択でき、たとえばｘ方向の画素数を５１２とし、その一方でｚ方向の画素数をより多く、またはより少なくすることができる。ｚ方向へのギャップのない連続データセットを取得するために、ｚ方向への供給動作は、常に確実にある程度重複するように選択しなければならない（ナイキストの定理）。

【００６１】

図９は本発明の別の実施形態を示しており、図３による実施形態と同じ構成部品には同じ参照番号が付与されている。これに加えて、照明対物レンズ４２が設置され、これはズーム光学系１３に追加して設置することができる。照明対物レンズはまた、光学ズームの一部とすることができ、たとえば図４に示される実施形態による例のとおりである。

【００６２】

連続レーザ（連続波、ＣＷ）による照明とは異なり、多光子蛍光顕微鏡にはパルスレーザも使用でき、これは、長い波長で比較的低いエネルギーの励起光子を送るため、試料へ

の損傷を回避するのに特に適しており、これは生体試料の場合に特に重要となりうる。ＳＰＩＭ信号の検出のように、調光ミラー４３によって、ｚ方向に延びる検出光線の経路４４から多光子信号も抽出することができ、これは光電子増倍器またはアバランシェフォトダイオード４５によって検出できる。それ以外に、ＳＰＩＭ信号は、図３に関してすでに説明したように、カメラ１６によって検出することができる。

【００６３】

カメラ１６が十分な速度で作動すれば、図９に示す実施形態をさらに変形したものとして、調光ミラー４３がなくてもよく、その代わりに、カメラ１６を使って多光子信号を検出することができる。多光子照明とｚ方向、すなわち照明方向に対して垂直の方向への信号検出の場合、物体上の各照明点に関して、カメラ１６には直線が画像化されるため、物体上のｘ方向に延びる走査線を連続的にｘ方向に走査することによって、カメラ１６ではある領域が連続的に照明され、これは、データを整理して線に戻すソフトウェアによって整理する必要がある。ｚ方向に連続して走査することによって、物体上のいくつかの線を検出して、さらに処理し、物体のある領域の画像とすることができる。

【００６４】

簡単に言えば、ＳＰＩＭ信号検出構造の上記のような変形版は、多光子信号検出に使用され、これは高速カメラ、たとえばフォーマット５１２×５１２で毎秒最高１０００枚の画像を検出できるカメラを使えば可能である。

【００６５】

多光子信号検出のためのＳＰＩＭ信号検出構造の特定の利点は、信号の強度が有意に増強されることであり、そのいくつかの理由の１つは次のものである。光シートを生成するためには、一般に、低い開口数の照明対物レンズ、たとえば０．０４ＮＡの範囲の開口数の対物レンズが使用される。ここで、多光子照明から生成された信号の検出にＳＰＩＭ検出経路を使用する場合、使われる対物レンズの開口数（ＮＡ）がはるかに高い（たとえば、１．０ＮＡ）ため、有意に高い信号の強度を得ることができる。これは、信号強度が２０倍超、改善されることを意味する。

【００６６】

ＳＰＩＭ検出光線の経路（ｚ方向）が蛍光の検出に使用され、光が光電子増倍器またはＡＰＤもしくはＡＰＤアレイに送られ、あるいは上述の変形版によれば、高速カメラに直接送られる場合、ｙ方向の信号検出のための照明光学系を使用する場合より、効率がはるかに改善され、これは一般に、使用される照明システムの開口数がＳＰＩＭ構成の検出システムの開口数より低いからである。

【００６７】

多光子検出を使用することにはいくつかの利点がある。ほとんど排他的に焦点の合った蛍光色素だけが励起され、これは、励起には、いくつかの光子が多かれ少なかれ同時に到達することが必要となるからであり、この同時の到達はほとんど排他的に焦点の中で発生し、換言すれば、焦点の外の励起の可能性は非常に低い。他の利点は、ＩＲ範囲の（散乱が低い）波長を使用すると、浸透深度がより深くなることである。他の利点はピンホールが不要であることであり、これは、発生された光の全体を照明焦点に割り当てることができるからである。これによってまた、全方向からの光を集光することが可能である。これに対して、共焦点顕微鏡は、散乱および反射光を抑制する必要があり、これによって信号の強度が弱められる。信号強度を高めることにおける上記のすべての利点とは別に、照明強度は低く、したがって試料への損傷が回避され、その一方で、このソリューションはさらに、構造的な利点を提供し、これは、ＳＰＩＭ顕微鏡にすでに備わっている検出光学系を多光子信号検出に使用できる点であり、それによって、構造面でのコストを追加せずに、比較的安価なソフトウェアのコストだけで、上記の利点のすべてを得ることができる。

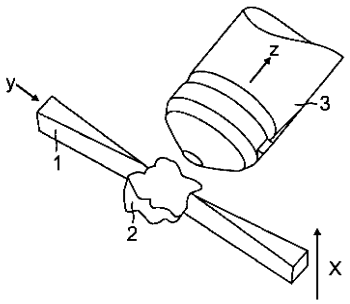
【００６８】

ＳＴＥＤ技術はさらに、多光子照明にも使用することができ、多光子モードで約３００ｎｍの解像度を多光子プラスＳＴＥＤモードではわずか数ｎｍの解像度まで下げることができる。

【００６９】
ソフトウェアの観点から、カメラ１６によって検出されたデータを線と画素に分離して、同時に、ＳＰＩＭ画像と多光子画像を生成することもまた可能である。これによって、ＳＰＩＭモードと多光子モードとを切り替える必要がなくなり、あるいは、別の例において、ＳＰＩＭモードと多光子モードでの同時動作を切り替えの選択肢として追加することができる。
【００７０】
要約すれば、本発明による顕微鏡では、共焦点顕微鏡の部分的態様、すなわち照明光学系の部分的態様がＳＰＩＭ法に基づく画像生成に適用され、照明光学系がさらにズーム光学系へと改造される。本発明によれば、さらに、ＳＰＩＭ法によって生成される画像より一次元低い共焦点画像を生成することができ、あるいは、別の例において、共焦点画像に追加して、またＳＰＩＭ法により生成された画像の代わりに、多光子画像を生成することができる。これは、ＳＰＩＭ法により生成される画像をはるかに高い柔軟性で変更できるだけでなく、共焦点検出または多光子検出によって追加の画像情報が得られ、また、特定の用途に応じて、得られた画像をオーバーレイとしてＳＰＩＭおよび／または多光子画像と合成することもできる。ＳＴＥＤ光線を追加し、またはオフにすることによって、画像にさらに変更を加えることができ、さまざまな画像についてさらに追加のデータストリームを生成することが可能であり、これらは同時に生成されるという利点がある。これによって、顕微鏡に多種多様な有益さを持たせることができ、これには、画像変調の可能性および、それと同時に、分析可能な画像情報の数における相乗効果が伴う。
【符号の説明】
【００７１】
１　光シート
２　物体
３　対物レンズ
４　レーザ
５　照明光線
６　コリメートレンズ
７　円柱レンズ
９　カメラ
１０　照明光線の経路
１１　検出光線の経路
１２　スキャナ
１３　ズーム光学系
１４　カラーフィルタ
１５　管状レンズ
１６　カメラ
１７　物体キャリア
１８　検出器
１９　フォトダイオード
２０　開口
２１　検出光
２２　画像処理ユニット
２３　モニタ
２４　ダイクロイックミラー
２５　ズームレンズ
２６　レンズ
２７　焦点距離の範囲
２８　ＳＰＩＭ画像処理ユニット
２９　ＳＰＩＭモニタ

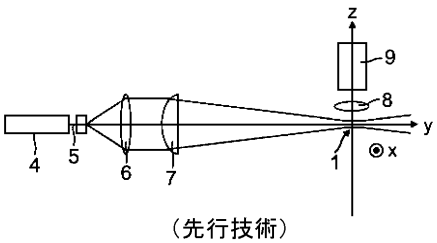
３０　照明点
３１　励起光線
３２　失活光線
３４　統合光線経路
３５　検出光
３６　光検出器
３７　ダイクロイックミラー
３８　開口
３９　位相板
４０　失活光線
４１　励起光線
４２　照明対物レンズ
４３　調光ミラー
４４　検出光線の経路
４５　光電子倍増器またはアバランシェフォトダイオード

【図１】



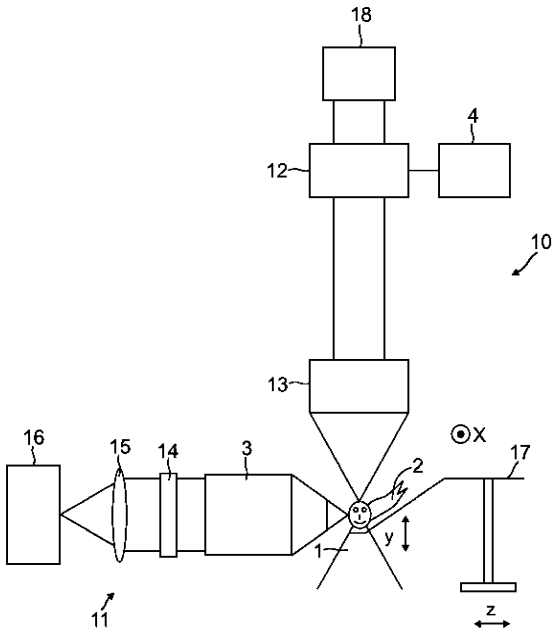
（先行技術）

【図２】

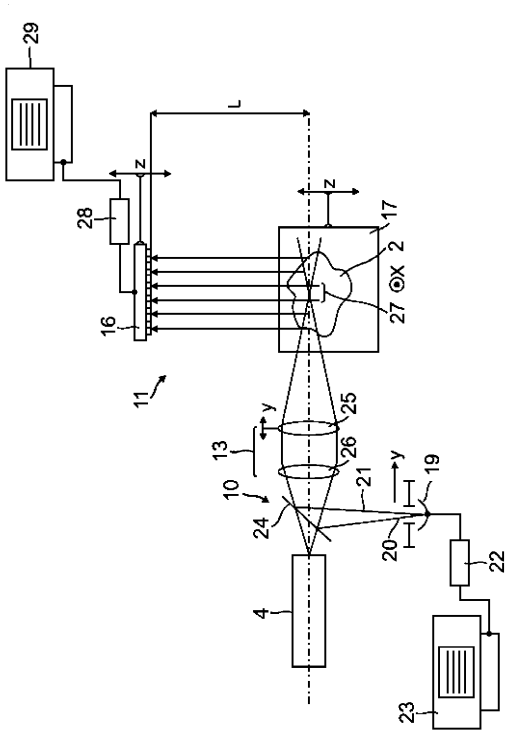


（先行技術）

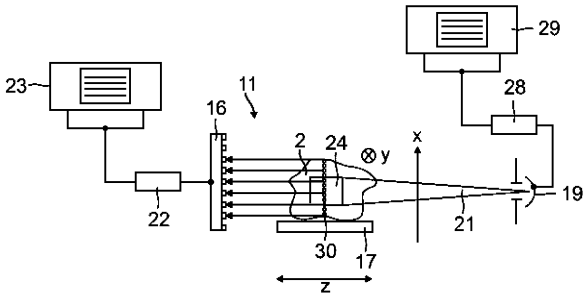
【図３】



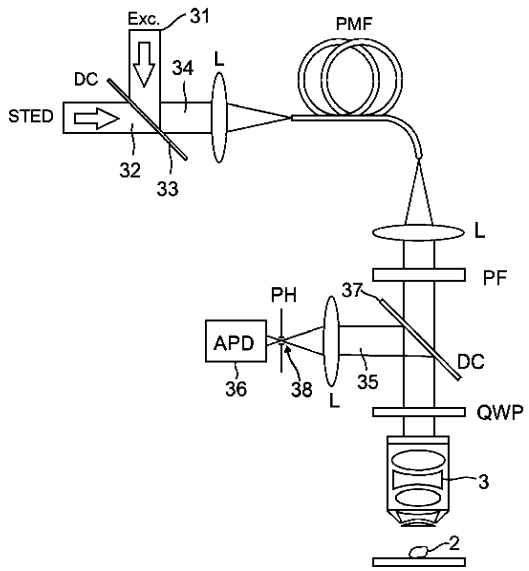
【図４】



【図５】

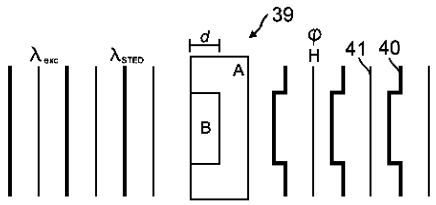


【図６】



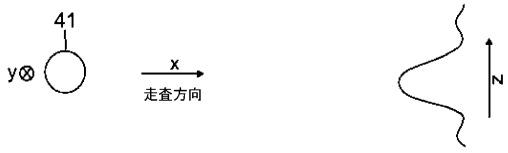
（先行技術）

【図７】

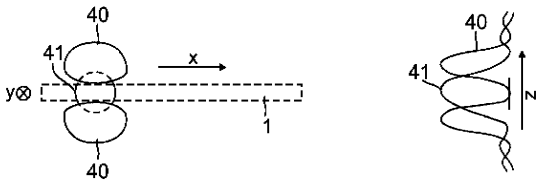


（先行技術）

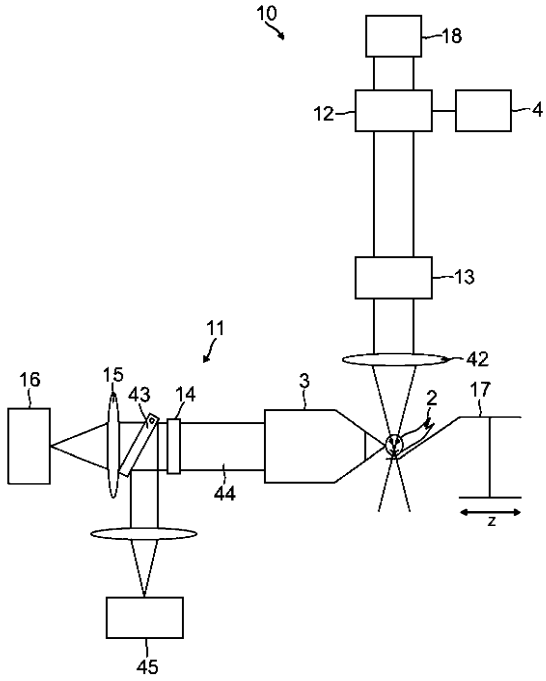
【図８ａ】



【図８ｂ】



【図９】



フロントページの続き

(72)発明者　ヴォルフガング　エストライヒヤー
ドイツ連邦共和国　６８１６３　マンハイム　エミール・ヘッケル・シュトラーセ　６

審査官　越河　勉

(56)参考文献　特開２０１０－１３９６７５（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－２９６５０８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００９／０４３４８５（WO，Ａ１）
国際公開第２００９／１００８３０（WO，Ａ１）
国際公開第２００９／０４３４７３（WO，Ａ１）
特開２００８－２５０３０３（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００９／０２３７７６５（ＵＳ，Ａ１）
特表２００６－５０９２４６（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００６／００３３９８７（ＵＳ，Ａ１）
特開２００６－０３１００４（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００６／００１２８７１（ＵＳ，Ａ１）
特表２００７－５０４４９８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／０２４４８６（WO，Ａ１）
特表２０１０－５４０９９５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５４０９９６（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１０／０３０９５４８（ＵＳ，Ａ１）
特開平０６－３００９７４（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０５６９１８３９（ＵＳ，Ａ）
特開２００８－１１６５２６（ＪＰ，Ａ）
特開２００７－１１４５４２（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００７／００９１４２５（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２００２／０１７６１６０（ＵＳ，Ａ１）
特開２００２－１７４７７２（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００２／００４１４３８（ＵＳ，Ａ１）
特表２０１１－５１１９６６（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１１／００３６９９６（ＵＳ，Ａ１）
特表２０１１－５０７０４０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００９／０８０２１０（WO，Ａ１）
特表２０１０－５４０９９４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００９／０４３４７２（WO，Ａ１）
特開２００４－０２９３４４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０２Ｂ　２１／００
Ｇ０１Ｎ　２１／６４