

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6596001号  
(P6596001)

(45) 発行日 令和1年10月23日 (2019. 10. 23)

(24) 登録日 令和1年10月4日 (2019. 10. 4)

(51) Int. Cl. F I  
GO 1 N 21/64 (2006. 01) GO 1 N 21/64 Z

請求項の数 27 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2016-543202 (P2016-543202)	(73) 特許権者	516189154
(86) (22) 出願日	平成26年12月24日 (2014. 12. 24)		ティッシュヴィジョン、インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2017-502300 (P2017-502300A)		アメリカ合衆国、02143 マサチューセッツ、サマーヴィル サマーヴィル アヴェニュー 519 ナンバー311
(43) 公表日	平成29年1月19日 (2017. 1. 19)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/072368	(74) 代理人	110000877
(87) 国際公開番号	W02015/100421		龍華国際特許業務法人
(87) 国際公開日	平成27年7月2日 (2015. 7. 2)	(72) 発明者	レーガン、ティモシー
審査請求日	平成29年12月22日 (2017. 12. 22)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02143、サマーヴィル プロペルツィ ウェイ 29 ティッシュヴィジョン、インコーポレーテッド内
(31) 優先権主張番号	61/920, 654		
(32) 優先日	平成25年12月24日 (2013. 12. 24)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多焦点多光子イメージングシステム及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多焦点多光子イメージングシステムであって、

多光子励起ビームから複数の焦点を生成する焦点生成素子及び試料を横切って前記複数の焦点を走査する走査素子を含む光励起経路であって、前記焦点生成素子は前記光励起経路に沿って前記走査素子に光学的に結合され、複数の走査焦点をレンズを介して選択可能な深度にて前記試料に伝送する、光励起経路と、

前記レンズ、ダイクロイック素子、前記試料内の前記複数の走査焦点からの蛍光放射を検出する複数の光電子増倍管素子を有する検出システムを含む光収集経路であり、前記光収集経路は、さらに、前記蛍光放射を前記検出システムに光学的に結合する複数のライトガイド素子を含み、前記レンズからの前記蛍光放射は、前記ダイクロイック素子によって前記光収集経路上に分離され、少なくとも1つの収集レンズを用いて前記複数のライトガイド素子に結合される、光収集経路と、

を備える、

システム。

【請求項 2】

前記検出システムは、マルチアノード光電子増倍管 (M A - P M T) を有する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記複数のライトガイド素子は、放射された光を前記 M A - P M T に連結する光ファイ

バを有し、前記光ファイバは、複数のスペクトルチャネルを検出すべく、前記 M A - P M T の複数のチャネルに接続する、

請求項 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記複数のライトガイド素子は、液体ライトガイドを含む、

請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 5】

前記複数のライトガイド素子のそれぞれは、光ファイバを有する、

請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 6】

前記多光子励起ビームを生成する多光子光源をさらに備え、前記多光子光源はレーザを有する、

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 7】

前記複数のライトガイド素子は、光を前記試料から各光電子増倍管素子に連結する複数の光ファイバをさらに有する、

請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 8】

組織断面切断デバイスをさらに備える、

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 9】

複数の異なる波長を検出する前記複数の光電子増倍管素子から、スペクトルデータを受信するデータプロセッサをさらに備える、

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 10】

前記光励起経路に配置され、前記焦点生成素子から光を受信する光学素子をさらに備え、

前記光学素子は、前記焦点生成素子の色分散とは反対の色分散を導入し、  
各光電子増倍管素子は、前記複数の焦点の位置のそれぞれに関して散乱分布に対応する収集エリアを有し、前記試料の各焦点から蛍光放射信号を検出する、

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 11】

前記走査素子は、回転ミラー又は共振ミラーを有する、

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 12】

前記複数の光電子増倍管素子は、光電子増倍管素子のアレイを有し、

前記システムは、前記多光子励起ビームを生成するレーザを有する光源をさらに備える、

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 13】

前記光収集経路は、非デスキャン収集経路である、

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 14】

多焦点多光子イメージングのための方法であって、

試料内の深度の関心領域を横切って複数の焦点を走査すべく走査素子を用いる段階であって、前記複数の焦点は、レンズを介して前記試料に結合される多光子の光励起経路に沿って焦点生成素子を使用して生成される、走査素子を用いる段階と、

複数の光電子増倍管素子を用いて前記関心領域の複数の焦点の位置からの光を検出して画像データを生成する段階であり、前記複数の焦点の位置は、前記関心領域を横切って走査されて、前記レンズを介して集光され、ダイクロイック素子を用いて光収集経路上に結

10

20

30

40

50

合される蛍光放射を生成し、前記光収集経路は、前記複数の焦点からの前記蛍光放射を前記複数の光電子増倍管素子に結合された複数のライトガイド素子に結合する少なくとも1つの収集レンズを含む、画像データを生成する段階と、

を備える、

方法。

【請求項15】

前記蛍光放射を前記複数の光電子増倍管素子に連結する光ファイバを有する前記複数のライトガイド素子を用いる段階をさらに備える、

請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記光ファイバのそれぞれは、各光電子増倍管素子と連結される、

請求項15に記載の方法。

【請求項17】

各ライトガイド素子は、放射された蛍光放射を各収集光学素子に連結する、

請求項14に記載の方法。

【請求項18】

前記試料の一部を断面に切るべく組織断面切断デバイスを用いる段階をさらに備える、

請求項14から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記複数の光電子増倍管素子からスペクトルデータを受信するデータプロセッサを用い

る段階をさらに備える、

請求項14から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

光電子増倍管素子のアレイを用いて検出する段階をさらに備え、

各素子は、複数の焦点の位置のそれぞれに関して蛍光放射の散乱分布に対応する収集エリアを有する、

請求項14から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記走査素子は、回転ミラー又は共振ミラーである、

請求項14から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

データプロセッサ及びメモリに接続される前記複数の光電子増倍管素子のアレイを用い

て検出する段階をさらに備える、

請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記焦点生成素子はマイクロレンズアレイ、回折光学素子、又は複数の照明用光ファイ

バである、

請求項14から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

第1アレイ及び第2アレイを含む前記アレイを用いて光を検出する段階をさらに備える

、

請求項20に記載の方法。

【請求項25】

光源からの光を光ファイバデバイスを用いて前記走査素子に連結する段階をさらに備え

る、

請求項14から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

イメージングシーケンスをシステムコントローラによって制御する段階と、

前記複数の光電子増倍管素子に接続されたデータ処理システムによってスペクトルデー

タを処理する段階と

10

20

30

40

50

をさらに備える、

請求項 1 4 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱プロセスによってスペクトルデータを検出する段階をさらに備える、又は、

誘導ラマン散乱プロセスによってスペクトルデータを検出する段階をさらに備える、又は、

第 2 高調波生成プロセスによってスペクトルデータを検出する段階をさらに備える、又は、

共焦点反射顕微鏡法システムによってスペクトルデータを検出する段階をさらに備える

10

、  
請求項 1 4 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔関連出願の相互参照〕本願は、「多焦点多光子イメージングシステム及び方法」と題された米国仮出願番号第 6 1 / 9 2 0 , 6 5 4 号（出願日：2 0 1 3 年 1 2 月 2 4 日）に対する優先権を主張し、これによりその全体は参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

20

生物学者が直面する基本的且つ進行中の課題は、複雑な生体系の機能を理解することである。この課題に取り組むとき、その系の全体的な構造を知ることの重要性が、極めて重大であることが繰り返し分かってきた。DNA から生物全体に至る範囲の複数の例。DNA の二重らせんが発見されたことで、その複製機構がすぐに提案され、ポリペプチド鎖内のアミノ酸の 2 次元直鎖状配列の 3 次元配置が、酵素特異性の基礎を明らかにするのに不可欠になった。臓器の場合、基本的な構造単位及び遺伝子単位は細胞であり、その構成を正確に表現するには、臓器全体にわたる個々の細胞の 3 次元位置、体型測定、及び生化学的狀態を解明することが必要である。残念ながら、全臓器の 3 次元細胞内画像を迅速に生成できるイメージングツールは存在しない。このことは、蛍光ベースの遺伝子導入モデルや標識プロトコルの急激な増加、並びに、ゲノムツール及びプロテオームツール全体の急速な発展が、次に表現型分類を必要とすることを特に考えると、生物医学の進歩に対する深刻な障害を表している。

30

【0003】

2 光子（又は多光子）励起イメージング、例えば、2 光子顕微鏡法（TPM）は、蛍光イメージング技術を利用しており、この技術によって比較的高いイメージング深度で生体組織を（生体内で）イメージングすることが有利に可能になる。概して、2 光子励起イメージングは赤方偏移した励起光を利用して、試料に蛍光発光を誘起する（特に、赤外光を用いることで、組織内の散乱を最小限に抑える）。励起光の 1 つより多くの光子が吸収されて、励起状態に到達する。励起プロセスの非線形の特質に起因して、2 光子励起イメージングは、固有の 3 次元断面切断、数百ミクロンの優れたイメージング深度、焦点領域外の最小の光退色、並びに、励起及び放射波長が広く分離していることから生じる優れた背景放射除去を有利に提供する。したがって、2 光子励起イメージングは、そのより深い組織侵入、効率的な光検出、及び光毒性の減少によって共焦点顕微鏡法に対する優れた代替手段になり得る。2 光子励起イメージングは生体外イメージングにとって重要な利点も提供する。光シート手法と異なり、2 光子励起イメージングは不透明又は部分的に透明な試料でうまく働き、焦点領域外の光退色がほとんどない。さらに、対物レンズの光学系によってのみ制約される、小焦点深度を伴った広視野が用いられ得る。それに対して、光シートの共焦点パラメータは、視野を 5 0 0 ミクロン未満に制限することが多く、この領域内でも、z 方向の照度プロファイルは 2 0 ミクロン又はそれより大きくなり得る。

40

【0004】

50

以前には、試料からの光が走査システムを通過した後に検出器に到達する「デスキャン」方法を、多光子イメージングが利用した。デスキャン手法は非デスキャン手法より大幅な改善を示したが、かなりの制約がまだ存在する。最初に、非近軸焦点において点広がり関数 (PSF) 収差によって、視野は制限される。次に、励起光学系を通るデスキャンから、かなりの放射信号がある (例えば、70%又はそれを超える損失)。また、高レーザ出力、及びこれによる高光子束が、MA-PMTの一般的なアノードに大電流をもたらし、その結果、PMTの飽和又は損傷を引き起こす。したがって、これらの制約及び他の制約に対処する、改善された多焦点多光子イメージングシステム及び方法の必要性が存在する。

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

本開示の複数のシステム及び方法が、連続断面切断と併せて高速イメージングを実装し、多焦点多光子励起を利用して、例えば、臓器全体をミクロン単位の解像度で1日もしないうちに有利にイメージングする。このシステム及び方法は、深部組織イメージングのための多焦点、多光子顕微鏡法(MMM)システムを用いて、長年にわたるいくつかの技術的課題を有利に克服し、生体外の全臓器イメージングに適している。全臓器を3次元(3D)で1ミクロンのXY試料採取及び2ミクロンのZ試料採取において1日もしないうちに蛍光的にイメージングする能力は、本明細書で説明される複数のシステム及び方法によって可能になるが、3Dの組織学に変革を起こすほどの影響を有し、神経科学及び他の分野において広範囲の用途を扱う研究者に重要なツールを提供する用意ができています。本開示の複数のシステム及び方法は、蛍光細胞内全臓器イメージングに利用可能な最高イメージング速度及び最高感度を提供します。さらに、本開示の複数のシステム及び方法は、とりわけ、中間光学系によって誘起される収差に起因して視野が制約される課題、及びデスキャン経路内の放射光子の損失に伴う課題を含む、既存の多焦点多光子イメージング技術に関連するいくつかの主要課題に対処する。

#### 【0006】

より具体的には、本開示の複数のシステム及び方法は、収差及び視野の制限を回避し、更に焦点間クロストークを最小限に抑える独自のインタレースキャン方法を用いた高効率のファイバ結合検出を採用する非デスキャン検出を使用する、複数の励起方法を有利に実装し得る。したがって、本開示の複数のシステム及び方法は、以前の構成よりも8~12倍増加したイメージング速度をもたらす。さらに、非デスキャン検出を用いることで、デスキャン検出を用いる以前の構成に対して、収集効率の向上がもたらされる。本開示の複数のシステム及び方法の他の利点には、PSF収差を最小にした広い視野、高い画像信号対ノイズ比(SNR)、散乱環境の存在下においても隣接焦点間のクロストークの最小化、多重チャンネル、例えば複数のスペクトルチャンネルに対応(いくつかの例では、4つ又はそれより多くのスペクトルチャンネルが存在し得る。また他の例では、最大16又はそれより多くのスペクトルチャンネルが存在し得る)、高画素滞留時間、焦点領域外の光退色の最小化、より大きい臓器に適合し易い、並びに、不透明な試料及び光学的に透明な試料の両方に対する適合性が含まれる。

#### 【0007】

複数の好ましい実施形態は、本明細書で説明される断面切断作業及びイメージング作業を実行するようプログラムされた自動制御及びデータ処理システムを利用する。複数のさらに好ましい実施形態は、コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱(CARS)、誘導ラマン散乱(SRS)、第2高調波イメージング(SHG)、及び共焦点反射顕微鏡法などのイメージング法を利用する。その結果として、多様なイメージング作業が、本明細書で説明される複数のシステム及び方法と併せて実行され得る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0008】

【図1】本開示に従って、連続断面切断処理を用いる多光子イメージングシステムの例を図示する。

10

20

30

40

50

【0009】

【図2】本開示に従って、(i)単一の焦点がイメージングプレーン内に生成される、及び(ii)複数の焦点がイメージングプレーン内に生成されるイメージングシステムの例を図示する。

【0010】

【図3】本開示に従って、非デスキャン及びデスキャン収集経路の両方を含む多焦点多光子イメージングシステム例を図示する。

【0011】

【図4A】本開示に従って、多焦点多光子イメージングシステムのレイアウト例を図示する。

10

【0012】

【図4B】本開示に従って、連続2光子断層顕微鏡のレイアウト例を図示する。

【0013】

【図4C】本開示に従って、多焦点多光子イメージングのための励起スキームの例を図示する。ここで焦点生成素子は走査素子の下流にある。

【0014】

【図5】本開示に従って、(i)図1の構成、及び(ii)図3の構成のそれぞれに対する収差のZEMAXシミュレーションを図示する。

【0015】

【図6】本開示に従って、液体ライトガイド(LLG)への蛍光信号の結合例を図示する。

20

【0016】

【図7】本開示に従って、隣接する領域が順次走査されるインタレーススキャン方法の例を図示する。

【0017】

【図8】本開示に従って、4チャンネル検出用のPMT構体の例を図示する。

【0018】

【図9A】本開示に従って、走査ミラーの配置を検出するためのレイアウト例を図示する。

【0019】

【図9B】本開示に従って、走査ミラーの配置を検出するためのレイアウト例を図示する。

30

【0020】

【図10A】本開示に従って、回折光学素子を用いことにより生じうる色収差の例を図示する。

【0021】

【図10B】本開示に従って、屈折率 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、及びアッペ数 $v_1$ 、 $v_2$ 、 $v_3$ を有し、色収差を補償するのに用いられ得る光学素子の例を図示する。

【0022】

【図11A】本開示に従って、様々な種類の検出構成のレイアウト例を図示する。

【図11B】本開示に従って、様々な種類の検出構成のレイアウト例を図示する。

40

【図11C】本開示に従って、様々な種類の検出構成のレイアウト例を図示する。

【図11D】本開示に従って、様々な種類の検出構成のレイアウト例を図示する。

【図11E】本開示に従って、様々な種類の検出構成のレイアウト例を図示する。

【0023】

【図12A】本開示に従って、さらなる種類の検出構成のレイアウト例を図示する。

【図12B】本開示に従って、さらなる種類の検出構成のレイアウト例を図示する。

【図12C】本開示に従って、さらなる種類の検出構成のレイアウト例を図示する。

【発明を実施するための形態】

【0024】

多焦点多光子イメージングシステム及び方法が本明細書に提供され、これらにより、既

50

存システムの収差及びさらに多くの視野制限を回避する励起システムが有利に実装される。本開示に従って、システム例は、焦点間クロストークを減少させるインタレースキャンを伴う高効率ファイバ結合検出を利用する非デスクャン検出システムを含み得る。

#### 【0024】

自動制御、及び全臓器などの組織のデータ処理のための多光子イメージング及びシステムに関するさらなる詳細が、PCT公開第2006/127967号（出願日：2006年5月25日）に説明され、「Multifocal Imaging Systems And Methods」に向けられている。本開示も、米国特許公開第2013/0142413号（出願日：2012年12月26日）に説明され、「Systems And Methods For Volumetric Tissue Scanning Microscopy」に向けられている、イメージング、プロセス制御、及びデータ処理作業を基礎にして、それらを関連させる。前述のPCT公開及び米国特許公開の内容全体は、これにより参照によって組み込まれる。これらのシステムは、組織の自動断面切断を分光イメージング及び分光検出と組み合わせて利用し、その後の処理及び画像解析のために組織アトラスを生成する。

#### 【0025】

2光子励起イメージングは、散乱組織の深さ数百ミクロンをイメージングすることができるが、不透明な臓器全体をイメージングすべく数センチメートルにわたってイメージングすることはできない。一連の断面をイメージングするために、寒天を埋め込んで固定されたマウスの臓器が、TPMシステムの対物レンズの下で統合X-Yステージ上に配置され、自動画像取得のためにイメージングパラメータが入力される。これらが一旦配置されると、器械は完全に自動的に有利に働き得る。図1に図示されるように、まず段階110において、x-y-zステージ20によって試料10が対物レンズ30の下に移動させられる。これにより、光学的断面（又は光学的zスタック）が、視野のモザイクとしてイメージングされる。次に、試料は移動させられ（段階120）、組み込みの振動刃ミクロームが、試料10の上面から試料断面を機械的に切断する（段階130）。試料中をくまなくステップングさせながら（段階120）試料の完全なデータセットが収集されるまで、光学的切断（段階110）及び機械的切断（段階130）を重ね合わせる段階が、その後連続的に繰り返される。したがって、共に記録される異なる複数の層からの画像のための隣接する複数の薄片の間に十分な重なりを有する状態で、臓器イメージングシーケンスは臓器中をくまなく進行する。特に、組織が切断される前に組織をイメージングすることで、大幅に向上した忠実度が提供され、組織が切断された（したがって歪められた）後に組織をイメージングする標準的な組織学的切断に関する複雑な状況が回避される。

#### 【0026】

TPMを用いた連続断面切断はロバストであることが分かったが、単一点スキャンの速度制約によって、高スループット用途ではイメージング速度がネックになり得る。取得速度を増大させるべく、様々な方法が導入されてきた。1つの解決手段は、多角スキャナ又は共鳴スキャナを用いて、単一の焦点を迅速に走査することである。しかしながら、この解決手段は、少数の光子/画素によって短画素滞留時間をもたらし、これにより不十分なコントラストにつながる。MMM手法では、小型レンズアレイ又は回折光学素子が用いられ、イメージングプレーン内に複数の焦点を生成する。例えば、図2を参照されたい。左側にはフルオレセイン溶液に単一の焦点があり、右側には4×4の焦点のアレイが図示されている。有利なことに、複数の焦点は並列に走査されて、フレームレートを増大させ得る。

#### 【0027】

図3を参照すると、小型レンズアレイ310又は回折光学素子が用いられ、イメージングプレーン内に複数の焦点320を生成する。複数の例において、これらの焦点は（走査ミラー330を用いて）並列に走査され得て、非デスクャン経路350に沿って蛍光光子を検出すべくCCDカメラ340又は他の検出手段が用いられ得る。しかしながら、この方法はいくつかの制約を生じさせ得る。不透明な試料をイメージングするとき、放射光子

は隣接する複数のCCD画素に散乱し得て、イメージング深度は非常に制限されるようになり得て、50ミクロン未満になることが多い。

#### 【0028】

さらに図3を参照すると、散乱の問題に取り組む1つのやり方は、デスキャン検出構成を用いることであり、これは、例えばマルチアノード光電子増倍管(MA-PMT)検出器360又は他の検出器をデスキャン経路370に沿って利用する。複数の走査焦点320は、その複数の焦点と同じ構成を表し得るMA-PMT検出器360の方へ戻るように方向付けられた(例えば、4×4マルチアノードMA-PMTアレイの方へ方向付けられた4×4焦点のアレイ)。図3はデスキャン構造を例示する。ここでは、放射光子が入射レーザ光と同じ経路370に沿って戻り、走査ミラー330を通過した後にダイクロイック素子380で分割され、MA-PMT検出器360の方へ方向付けられる。各アノードの広い面積で、散乱した放射光子は指定されたチャンネルに収集されるため、散乱の影響は抑制され、高い信号対ノイズ比(SNR)がもたらされる。

#### 【0029】

本明細書で説明されるように、図3に示されるデスキャンMMMシステムの考えられる制約は、低いF値の中間光学系 $L_1$ 、 $L_2$ 、 $L_3$ 、及び $L_4$ により誘起される収差によって、イメージング視野が制限されることである。特に、励起ビームが小型レンズアレイ310を通過した後、そのビーム径は小さい走査ミラーに適合すべく縮小させられ、その後、対物レンズの後方開口部をはみ出して満たすように再拡大させられる。したがって、図3の光学系 $L_2$ 及び $L_3$ は特にF値が劣るけれども、特に端の焦点では大きな収差を生成する。このことが、最終的な有効視野を制限し得る。縮小及び拡大による収差を軽減すべく、より大きいサイズの走査ミラーが利用可能であるが、これらのミラーは概して高速走査に十分な帯域幅が無い。さらに、複数の走査ミラーの間がより広く分離していると、走査面積全体にわたり不均一な励起レーザ出力を生成し得る。

#### 【0030】

図4Aは、多光子、CARS、及びSHG顕微鏡法などの非線形光学顕微鏡法に用いられ得る、高速連続断層顕微鏡のブロック図を示す。本開示に従って、好ましい一実施形態は、多焦点多光子イメージングシステム400に関する。本明細書で説明されるように、多焦点多光子イメージングシステム400の一例は、高速連続2光子断層顕微鏡として構成され得る。多焦点多光子イメージングシステム400は、電磁放射の光源410、走査素子420、及び焦点生成素子430を含む。光源410から試料450までの光励起経路440は、励起ビームから複数の焦点を生成する焦点生成素子430と、試料450を横切って焦点を走査する走査素子とを含む。多焦点多光子イメージングシステム400のこの例では、焦点生成素子430は光励起経路440に沿って走査素子420から光を受信する。1又は複数の光学素子460は、光励起経路440に沿って配置され得る。また、図4Aに図示されるように、光収集経路470は、試料450からの蛍光放射を検出する検出器480を含む。図4Aのこの例において、多焦点多光子イメージングシステム400のレイアウトは、複数の作業ユニットに分割され、顕微鏡のモジュール式の特質を反映している。本明細書で説明される原則に従って、システムの個々の作業ユニットにカスタマイズされた複数の変更が行われ、残りの光学系には最小の調整が成され得る。イメージングシステム400は、組織のイメージングをより効率的に行うべく、光源、スキャナ、検出器、移動ステージ、及び他の可動又は動的な作業ユニットの自動化されたコンピュータ制御の作業を含み得る。本明細書で概して説明されるように、画像データを処理すべく、データプロセッサが検出器に接続される。制御システム及びデータプロセッサは、メモリに格納されたソフトウェアに応答して動作可能であり、複数のイメージングパラメータを自動的に選択し、本明細書で説明される選択された事前設定処理動作に従って画像処理を実行する。

#### 【0031】

図4Bは、本開示に従って、連続2光子断層顕微鏡として構成された多焦点多光子イメージングシステム800の一例のブロック図を示す。多焦点多光子イメージングシステム



800は、電磁放射の光源810、走査素子820、及び焦点生成素子830を含む。光源810から試料850までの光励起経路840は、励起ビームから複数の焦点を生成する焦点生成素子830と、試料850を横切って焦点を走査する走査素子とを含む。多焦点多光子イメージングシステム800において、焦点生成素子830は光励起経路840に沿って走査素子820から光を受信する。1又は複数の光学素子860は、光励起経路840に沿って配置され得る。また、図4Bに図示されるように、光収集経路870は、試料850からの蛍光放射を検出する1又は複数の検出器880を含む。図4Bのこの例において、多焦点多光子イメージングシステム800のレイアウトは、複数の作業ユニットに分割され、顕微鏡のモジュール式の特質を反映している。

#### 【0032】

図4Bに示されるように、光源810からの励起光は適切に配置された走査素子820に入射し、これにより、走査素子820はビームを偏向させて、水平方向(X-Y)の平面内を試料850を横切って走査させる。図4Bの非限定的な例は、単一の次元に沿って光を走査するよう実装され得る単一の走査素子820を示す。別の例では、少なくとも2つのそのような走査素子820が、多次元走査に用いられ得る。試料850も、走査素子820の例に関するミラーの走査と併せて走査され得る。

#### 【0033】

また、図4Bに示されるように、多焦点多光子イメージングシステム800の例は光リレー890を含む。励起光は、走査素子820から光リレー890まで続き得て、光リレー890は励起光ビームを拡大又は縮小するよう構成される。励起光は、入射光ビームを複数のビームに分割する焦点生成素子830(ビーム分割デバイスとして構成される)を通過する。各ビームは、ユーザによって前もって又はリアルタイムに決定され得る角度で広がる。このビーム分割デバイスは、広がり角度、焦点の数、各焦点をオンにするか(すなわち、試料において蛍光放射をもたらす)オフにするか、のうち1又は複数の制御を容易にすべく、パッシブ又はアクティブであるよう構成され得る。様々な例において、焦点生成素子830は、限定されないが、回折光学素子、ホログラフィック素子、又は空間光変調器など、多くの異なる種類のビーム分割要素であり得る。励起光の複数のビームは、対物レンズL3の後方開口部上にビーム分割デバイスをイメージングする光学トレイン(L1及びL2)として形成される1又は複数の光学素子860通って続く。励起光の複数のビームは、励起光を信号光から分離するダイクロイック900を通過し得る。この場合、ダイクロイックは励起光を対物レンズ(L3)の方へ反射し、様々なビームが試料上に焦点を合わせる。複数の焦点が走査素子820を用いて試料850に沿って走査されるとき、信号は複数の焦点から生成される。信号は伝搬し対物レンズL3を通過して戻り、ダイクロイック900及び検出光学系910を通過してから、1又は複数の検出器880上に投射される。

#### 【0034】

複数のスポットを有する利点は、これによりシステムのスループットが上がるということである。この並列化は、画素当たりの滞留時間が長い、時間がかかる処理の場合に大きな利点になる。そのような複数の例は、緩和がミリ秒のオーダーにであるリン光寿命イメージング又は蛍光寿命イメージングを含み、広い面積を点走査するには時間がかかりすぎる。このことは、所望のタンパク質の発現、従って蛍光信号が弱い状況では特に重要である。

#### 【0035】

図4Cを参照すると、励起システム1000の例が、図4A及び図4Bのシステム例と同様に図示される。この励起システム1000は、F値が劣る課題を有利に回避するが、小さく高速なミラー並びに非デスキャン構成をまだ可能にする。励起システム1000は、回折光学素子(DOE)として図示される焦点生成素子1010の前に走査素子1030を有利に配置するが、ビームスプリッタ又は小型レンズアレイを代替的に含み得る。ダイクロイック素子1080は、光学系L4と対物レンズ1090との間に位置し、これにより、放射光子は比較的短い経路長を介して検出器1060(MA-PMTとして図示さ

10

20

30

40

50

れる)に到達し得る。

#### 【0036】

走査素子1030が励起経路において焦点生成素子1010の前にあるので、レーザービーム径(およそ2.5mm)は最小化されたままにすることができ、したがって高速で小さい(4mm未満、好ましくは約3mm又はそれより小さい)走査ミラーを用いることが可能となる。走査ミラーを通過した後に初めてレーザービームは、レンズペア $L_1$ 及び $L_2$ を用いて(図示された例では、4つのFレンズシステムを形成する)、焦点生成素子1010全体を満たすように拡大される(図示された例では、23mmの最大DOE径)。図示されるように、焦点生成素子1010は走査素子1030の共役面にあり、したがって入射角が異なるだけであることに留意されたい。焦点生成素子1010の後に、レーザービームは対物レンズ1090の後方開口部を僅かにはみ出して満たすように(第2のレンズペア $L_3$ 及び $L_4$ を用いて)再度拡大される。この段階的なビーム拡大により、問題の対物レンズ1090に関する全てのF値は許容可能な範囲を保っている。

10

#### 【0037】

例示するように表1は、図3の光学系と、20倍対物レンズ(Wプランアポクロマート、NA:1.0、Zeiss、ソーニウッド、ニューヨーク州)の全視野(試料面において1mm径)を実現するのに用いられ得る図4Cの光学系とにおいてF値を比較している。図4Cの光学系は、約800 $\mu$ m $\times$ 800 $\mu$ mの走査面積を提供する。概して、シングレットレンズには少なくとも10のF値、ダブレットレンズには5より大きいF値が推奨される。図3の構成では、光学系は2つの非常に低いF値(レンズ素子 $L_2$ 及び $L_3$ )を必要とし、これにより、より大きい収差がもたらされる。それに対して、図3の構成に対する最も低いF値は5.9である。ここで $L_1$ は、5.9のF値を容易に提供できるシートレンズであり、 $L_3$ はダブレットである。

20

#### 【表1】

表1	F値			
レンズ素子	L1	L2	L3	L4
Figure 3P	7.0	2.3	2.0	5.7
Figure 1	5.9	7.9	5.9	7.6

30

#### 【0038】

図5に最初のZEMAXシミュレーションが示され、ここには、図4Cの構成が図3の構成よりもかなり低い収差を提供することが示されている。有利なことに、図4Cの構成は低いF値を回避し、わずかな収差しか発生させない。収差係数は計算され、スポット図がエミュレートされた。収差係数が改善されると、二乗平均平方根(RMS)半径は3倍以上小さくなり、はるかに効果的な2光子励起をもたらす。このシミュレーションは、8 $\times$ 8アレイの角の焦点という最悪ケースに関して行われたことに留意されたい。非球面光学素子を使うと、さらなる改善が実現され得る。

#### 【0039】

放射経路を参照すると、本明細書に示されるように、非デスキャン検出の1つの難点は、イメージングプレーンにおいて蛍光信号がもはや定常ではないということである。CCD又はCMOSイメージングデバイスを用いるとき、イメージングプレーン上の信号の移動(焦点の移動に起因)は容易に説明されるが、さらに大きい課題がPMT検出及びMA-PMT検出に示される。MA-PMTの各アノードが比較的広い面積を有していても、複数の焦点が対物レンズのオブジェクトプレーン内を走査されるとき、イメージングプレーン内の隣接する複数のPMT画素に放射光子が散乱することがあり、特にPMT画素の端に近いところではそうなる可能性がある。さらに、MA-PMTには各画素を取り囲む不感領域があり、これにより、未補正の場合には画像内に空白領域がもたらされる。これに関しては、原理上は、蛍光がPMT画素の中央部に焦点を合わされたままにさせるための小型レンズアレイ又は非結像コレクタのアレイを配置することで対処し得る。しかしな

40

50

がら、この対処によって光学的クロストークが光子を散乱させるのを防ぐことができず、 $MA - PMT$ による電子的クロストークの発生も防ぐことができないので、まだ理想的とは言えない。生体外の全臓器イメージングにとってさらに厄介なのは、高光子束が予想される場合、 $MA - PMT$ デバイスは、シングル $PMT$ と同じ電流制限を有することだが、この電流制限はいくつかの焦点の間にすぐに広がるはずである。したがって、検出器の飽和は現実の問題になる。

#### 【0040】

これらの全ての問題を解決すべく、複数のシステム及び方法の例が、(i)区域ごとのインタレースキャンを利用して光学的クロストークを除去することを可能にする、(ii)検出光の光ファイバ結合を焦点1つ当たりを利用して焦点ごとに1つのシングル $PMT$ を用いることを可能にする、検出を実装する。有利なことに、光ファイバは立体的な制約を克服する。さらに、この検出システムは、光学的クロストークの大幅な減少、並びに、検出器の電子的クロストーク及びデッドスペースの除去をもたらす。収集効率も増加し（実際に、収集効率は通常の空気結合検出より優れる）、ライトガイドを通過した後に光をランダム化することによって、より良好なスペクトル識別が実現される。光ファイバを用いることで、高いモジュール性、及びイメージングユニット自体から離れた検出器の使いやすい配置も可能になる。最後に、この検出システムによって、焦点ごとに、スペクトルチャンネルごとに、シングル $PMT$ を用いることが可能になるので、 $MA - PMT$ の電流飽和はもはや問題ではない。

#### 【0041】

$TPM$ システムで蛍光信号を結合するファイバは、空気結合検出と比較して、これまで非効率的だとみなされていた。しかしながら、高開口数( $NA$ )、低倍率の対物レンズを有する大口径コア光ファイバ蛍光検出は、収集効率に関して、従来の空気結合検出スキームに勝る大幅な改善を示す。例えば、Mathieu Ducros 他による次の論文を参照されたい。「Efficient Large Core Fiber-based Detection for Multi-channel Two-photon Fluorescence Microscopy and Spectral Unmixing」、Journal of Neuroscience Methods 198, no. 2 (June 15, 2011): 172-180, doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.03.015. 具体的には、光ファイバを対物レンズの近くに配置し、ARコーティング及び液浸油結合を活用して、インデックスの不整合を減少させることにより、標準的な空気結合経路の7倍の改善となる高い収集効率が達成可能である。さらに、ファイバ内のモードスクランブルによって、空間不均質性の検出感度はそれ自体を相殺して、スペクトル識別の改善をもたらす。ARコーティング及び液浸油結合を利用するファイバは、本明細書では液体ライトガイド( $LLG$ )とも称される。

#### 【0042】

図6は、蛍光信号を液体ライトガイド( $LLG$ )に結合した例を図示する。具体的には、光学レイアウト2000の放射経路例が左側に図示され、レンズ2010は液体ライトガイド(2020)上に放射光の焦点を合わせる。液体ライトガイド接続部2500の詳細な描写が右側に図示される。具体的には、接続部はARコーティングされたウィンドウ2510を含み、ウィンドウ2510は、インデックスが $LLG$ 2020の入力部に適合する油2520に連結される。損失は0.4%未満であることが示された。

#### 【0043】

本開示の複数のシステム及び方法は、 $1 \times N$ 配置の焦点を、 $1 \times N$ アレイのファイバ、例えば $LLG$ に結合することを可能にするインタレースキャン方法を有利に実装し得る。図7はインタレースキャン方法の例を説明する。ここでは、 $LLG$ の焦点上に放射光子を再配置すべく放射経路内に追加の可動ミラーを用いることにより、又は試料を対物レンズの下に物理的に移動させることにより、隣接する領域が順次走査される。1つ1つのインタレースキャンには、半分の時間がかかるので、インタレースキャンを行う際の

性能低下はほとんどない。この方法は、光子散乱クロストークを減少させ、LLGを配置する立体空間を提供する。図示されるように、領域Sは対物レンズのオブジェクトプレーン内の現在走査されている領域を表し、領域NSは前に走査された、又は次に走査される領域を表す。複数のファイバFは、散乱光子をさらに良くキャプチャすべく、選択された走査領域Sより意図的に大きくしていることに留意されたい。

#### 【0044】

図7から分かるように、複数のファイバFは水平、つまり遅軸Y走査方向の走査領域を扱うが、速軸X走査方向は扱わない。一手法は、画像をX方向に縮小するノ焦点を合わせる。これは、放射経路に円柱レンズを用いることで行われ得る。例えば、オリンパスのNAが1.0の20倍レンズ、これは9mmの前面焦点距離を有し200mmのチューブレンズを伴うが、これを結合するとき、システムは高さ17.6mmの画像を生成する。例えば、1つ1つの走査は2.5mmの高さを有する。4mmのコア中央部を持つファイバが、各走査領域上で利用され得る。X走査を縮小すべく、80mmの焦点距離(40mmの有効焦点距離)を持つダブレットの2つの円柱レンズが、5倍の縮小率を得るのに用いられ得て、x軸に17.6mm/5=3.5mmの縦方向の広がりを与える。これは4mmのライトガイド入力部に適合し得る。図示された例では、全ての焦点を一度に単一の光ファイバ構体上に集めるのに単一のレンズ(円柱ダブレット)が用いられるが、矩形円柱レンズ又は斜めのミラーを用いることも可能であり、これにより、各焦点からの蛍光は各ファイバ上に個別に集められ、例えば、ファイバ及び下流側の光学系の倍率及び配置に広い柔軟性を持たせることが可能になることに留意されたい。

#### 【0045】

図8は、単一のファイバFからの4チャンネル検出(C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、及びC<sub>4</sub>)用のPMT構体例を例示する。ファイバF内のモースクランブルによって、ファイバFの出力は入力入射角と無関係であり、スペクトル的に4つのPMTに分割される。例えば、光は620、580、540、及び500nmにおいて分割され、これらの波長で4チャンネル検出を提供した。

#### 【0046】

図9A及び図9B示されるように、走査素子420、820又は1030のうち任意の1又は複数を含む本開示による走査素子のいかなる例も、試料を横切る焦点の走査を容易にすべく、1又は複数の走査ミラー3010含み得る。走査ミラーの配置(位置又は方向を含む)は、走査ミラーが画像の再構成に影響を及ぼし得る機械的な誤差を受けやすいので、知られているものとする。一例では、1又は複数の走査ミラー3010の配置(位置及び/又は方向など)は、走査ミラーの背面に方向付けられるレーザのビーム3020を用いて決定され得る。1又は複数の走査ミラー3010の前面は、前述の部分において説明された励起光経路にある。ビーム3020の偏向はセンサ3030を用いて検出され得る。ビーム3020は1又は複数の走査ミラー3010から偏向されるので、センサ3030の検出器はビーム3020の移動に適合するのに十分な大きさである。検出器は、十分に高い解像度を有するようにも構成され(限定されないが、CCD又はリニアCCDなど)、ビームの位置を決定し得る。図9Aは、1又は複数の走査ミラー3010が走査を実行するときに起こり得るビーム3020の偏向を例示する。図9Bの例において、ビーム3020の焦点を絞り、1又は複数の走査ミラー3010の位置検出を改善するのに1つのレンズが用いられ得る。

#### 【0047】

本明細書のいかなるシステム実装例においても、焦点生成素子は回折光学素子であり得る。回折光学素子は、光を所望される次数に回折させることで働き、ビーム分割素子として用いられ得る。しかしながら、回折光学素子は、回折光学素子に入射する光の波長に敏感であり得る。概して、回折角は次の回折格子方程式に従う。

#### 【数1】

$$\sin \theta_d = m\lambda G - \sin \theta_i$$

10

20

30

40

50

## 【0048】

$\theta_i$ 、 $\theta_d$  はそれぞれ入射角及び回折角であり、 $m$  は回折次数であり、 $\lambda$  は入射光の波長であり、 $G$  は格子周波数の尺度となる格子定数である。図10Aは、色補正光学系を使わずに回折光学素子(DOE)例を用いた結果として起こり得る色収差を例示する。回折角の波長依存性は、色収差をもたらし得る。この収差を補正することで、システムの性能向上が促進され、より良い画像が提供され得る。それは、(i)画像の解像度は画像全体にわたって均一でないことがあるが、収差に起因して画像の端に向かって低下し得る、(ii)2光子励起の効率は焦点における分散の結果として低下する、(iii)複数の波長(限定されない、800nm及び1064nmなど)を用いるとき、又は複数の励起ビームの重なりが1つの要因となる状況において(例えばコヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱(CARS)、ポンププローブ分光法、SRF、及び/又は、和周波発生において)、共局在化分析を実行することが可能であることを確実にする、という理由からである。

10

## 【0049】

色収差を補償して解像度を最大化するよう構成された多焦点多光子イメージングシステムの例が本明細書に提供される。一例において、1又は複数の光学素子が励起光経路に沿って用いられ得る。1又は複数の光学素子は、回折光学素子により生成される色分散と等しく且つそれと反対の色分散を導入する。一例において、1又は複数の光学素子は、回折光学素子と対物レンズとの間の中間光学系において、光パワーとレンズの種類を慎重に選択することによって構成され得る。一例として、図10Bは、色収差を補償すべく、屈折率 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、アッペ数 $v_1$ 、 $v_2$ 、 $v_3$ を有する1又は複数の光学素子4010(限定されないが、異なるレンズの種類など)の使用例を図示する。1又は複数の光学素子4010の異なる分散及び光パワーにより、全ての色が焦点で重なり得るようにして色収差は減少する、又は除去される。

20

## 【0050】

共焦点反射顕微鏡法を実行するよう構成され得る多焦点多光子イメージングシステムの例が本明細書に提供される。追加構成要素が用いられ、システムが共焦点反射顕微鏡法を実行することを可能にし得る。共焦点反射顕微鏡法は、試料からの反射光を検出することで働く。これは、システムを通して戻ってくる反射光をピックアップすることで行われ得る。この変形を伴った多焦点多光子イメージングシステムが、共焦点反射顕微鏡法に用いられ得る、又は試料面を検出することに用いられ得る。

30

## 【0051】

本開示による実装例において、多焦点多光子イメージングシステムの例は複数の検出素子で構成され得る。例えば、図4Bの多焦点多光子イメージングシステム800の例では、1又は複数の検出器880は複数の検出素子であり得る。図4A～図4Cに関連して説明されるのと同様に、光励起経路は、励起ビームから複数の焦点を生成する焦点生成素子と、試料を横切って焦点を走査する走査素子とを含む。図4Bに図示されるように、焦点生成素子は走査素子から励起経路に沿って光を受信する。この実装例では、光収集経路は、試料からの蛍光放射を検出する複数の検出素子と、複数の収集光学素子とを含み得る。複数の収集光学素子の各収集光学素子は蛍光放射の光を複数の検出素子の各検出素子に連結する。非限定的な例示として、検出光学系910は、焦点からの信号を検出素子上に集める光学レンズを含み得る。検出素子は、限定されないが、画像を形成すべく信号を受信して出力を提供するマルチアノード光電子増倍管など、個々の検出器の1次元又は2次元アレイであってよい。非限定的な例示として、各焦点がそれぞれの検出素子にマッピングされるようにして、多焦点多光子イメージングシステムの例が構成され得る。

40

## 【0052】

図11A～図11Cは、多焦点多光子イメージングシステムの例が複数の検出素子と複数の収集光学素子とを含む、様々な構成例を図示する。

## 【0053】

図11A～図11Eは、様々な種類の検出モードの例を示す。図11Aの例では、検出

50

光学系 5 0 1 0 は様々な検出素子 5 0 2 0 上に信号の焦点を合わせるよう構成される。検出光学系 5 0 1 0 及び検出素子 5 0 2 0 は、各焦点が検出素子 5 0 2 0 のアクティブエリア内を走査するよう構成され、配置される。1 つ 1 つの焦点の走査範囲が検出器のアクティブエリアを越え得る場合（点線）、試料は、検出素子 5 0 2 0 の非アクティブ領域を占めるように走査され得る、又は検出素子 5 0 2 0 は移動させられ得る。

【 0 0 5 4 】

図 1 1 B は、検出素子 5 0 2 0 の前、約 1 焦点距離のところに配置される小型レンズアレイ 5 0 3 0 と、検出光学系 5 0 1 0 との中に複数の収集光学素子がある別の構成例を示す。これにより、焦点が走査するときに、信号は実質的に移動しない。

【 0 0 5 5 】

示される通り、図 1 1 C は、複数の収集光学素子が、検出光学系 5 0 1 0 の背後、且つ検出素子 5 0 2 0 の前面に配置された複数の光収集器 5 0 4 0 である、別の構成例を示す。図 1 1 D に示されるように、光が光収集器 5 0 4 0 の特定の受光角内に入る限り、入力角にかかわらず、光収集器 5 0 4 0 に入るいかなる光も（例示された光経路に示されるように）出口開口部に向かって、したがって、それぞれの検出素子 5 0 2 0 のアクティブ領域に向かって方向変更させられるように、光収集器 5 0 4 0 は構成され得る。所定の光収集器 5 0 4 0 では、光収集器 5 0 4 0 が散乱された信号光子を全て収集し、従って、多焦点多光子イメージングシステム例の信号対ノイズ比を改善させるように、この受光角は指定され得る。

【 0 0 5 6 】

図 1 1 E は、蛍光放射光のビームが収集光学系（この例では小型レンズアレイとして例示される）の接続部を横切って走査するときに起こり得ることの一例を示す。信号は隣接する検出器内に散乱され得て、これにより、検出器間のクロストーク及びゴーストイメージがもたらされ得る。一実装例において、ビームが接続部を横切って走査されず、そして試料の走査されていない領域に適合すべく試料が移動させられるように（すなわち、焦点が試料の走査されていないこれらの領域を照明するように、試料は移動させられる）、ステージ及びビーム走査の組み合わせが行われ得る。代替的に、ゴーストイメージは、様々な処理ソフトウェアを用いた後処理段階の間に、捕えられ除去され得る。

【 0 0 5 7 】

図 1 2 A ~ 図 1 2 C は、多焦点多光子イメージングシステム例が複数の検出素子及び複数の収集光学素子を含む他の構成例を図示する。

【 0 0 5 8 】

図 1 2 A は、ライトガイド 5 0 5 0 が検出光学系 5 0 1 0 の後、及び複数の光収集器 5 0 4 0 のそれぞれの後の光収集経路に配置され、ほとんど損失のない信号をある程度離れて配置されたそれぞれの検出素子 5 0 2 0 に送る、多焦点多光子イメージングシステム例を示す。図 1 2 A にも示されるように、1 又は複数の収集光学系 5 0 6 0 はそれぞれのライトガイド 5 0 5 0 の出口ポートに配置され得る。この構成例により、検出システムの改善又は置換に対するモジュール手法が可能となる。

【 0 0 5 9 】

図 1 2 B は、ライトガイド 5 0 5 0 が検出光学系 5 0 1 0 の後、及び複数の光収集器 5 0 4 0 のそれぞれの後の光収集経路に配置され、ほとんど損失のない信号をある程度離れて配置された検出素子 5 0 2 0 に送る、多焦点多光子イメージングシステム例を示す。1 又は複数の収集光学系 5 0 6 0 は、それぞれのライトガイド 5 0 5 0 の出口ポートに配置され得る。図 1 2 B にも示されるように、多重チャネルが異なる蛍光物質の検出に用いられ得るようにして、1 又は複数のダイクロイックフィルタ（5 0 7 0 a、5 0 7 0 b、及び 5 0 7 0 c）が配置され得る。

【 0 0 6 0 】

図 1 2 C は、ライトガイド 5 0 5 0 が検出光学系 5 0 1 0 の後、及び複数の光収集器 5 0 4 0 のそれぞれの後の光収集経路に配置され、ほとんど損失のない信号をある程度離れて配置された検出素子 5 0 2 0 に送る、多焦点多光子イメージングシステム例を示す。図

10

20

30

40

50

1 2 C は、複数のライトガイド及び複数の光収集器を使用して可能となるスペクトル検出システム例を示す。ライトガイド 5 0 5 0 を用いて信号が収集され、検出器に送られる。光学構成要素 5 0 8 0 (これは、コリメートレンズ及びミラーのうち少なくとも 1 つであり得る) が、ライトガイドの出口ポートに配置され、信号ビームをコリメートして信号光を分散素子 5 0 9 0 (限定されないが、回折格子又はプリズムなど) 上に誘導し得る。これにより、信号はスペクトル的に分散され、限定されないが、マルチアノード P M T 又はライン C C D などの検出素子で信号は検出され得る。図 1 2 B の例に関連して説明されたように、ダイクロイックミラーが、各チャンネルのスペクトル検出を作り出すのに用いられ得る。概して、非デスキャン検出システムは、関係している経路長がより短いことから、効果的である。散乱された光信号は、より大きい収集光学系及び検出器を用いてより効率的に収集される。このことは、生体試料が概して非常に散乱を起こしやすいので、生体試料のイメージングには重要である。それは、第 2 高調波発生信号を検出する際にも有用であり、S H G は主に前方へ方向付けられるが、検出信号はほとんど後方散乱 S H G 信号によるものである。

10

#### 【 0 0 6 1 】

本開示の複数のシステム及び方法が、本明細書に明記される複数の実施形態例及び複数の図を参照して詳細に示され説明されたが、その趣旨及び範囲から逸脱することなく、形状及び詳細における様々な変更がその中で行われ得ることが、当業者によって理解されるであろう。したがって、本開示の複数のシステム及び方法は複数の実施形態例及び図に限定されない。

20

#### ( 項目 1 )

多焦点多光子イメージングシステムであって、

励起ビームから複数の焦点を生成する焦点生成素子及び試料を横切って上記複数の焦点を走査する走査素子を含む光励起経路であって、上記焦点生成素子は上記励起経路に沿って上記走査素子から光を受信する、光励起経路と、

上記試料からの蛍光放射を検出する検出器を含み、走査素子を含まない光収集経路と、  
を備える、

システム。

#### ( 項目 2 )

上記検出器は、マルチアノード光電子増倍管 ( M A - P M T ) である、

項目 1 に記載のシステム。

30

#### ( 項目 3 )

1 又は複数のファイバを含む光ファイバデバイスが、放射された上記光を上記 M A - P M T に連結するのに用いられる、

項目 2 に記載のシステム。

#### ( 項目 4 )

上記 1 又は複数のファイバは、1 又は複数の液体ライトガイドを含む、

項目 3 に記載のシステム。

#### ( 項目 5 )

上記 1 又は複数のファイバのそれぞれは、複数のスペクトルチャンネルを検出すべく、上記 M A - P M T の複数のチャンネルに連結される、

項目 3 に記載のシステム。

40

#### ( 項目 6 )

上記 1 又は複数のファイバのそれぞれは、上記試料のインタレーススキャンを形成すべく、複数の隣接する領域を走査する、

項目 3 に記載のシステム。

#### ( 項目 7 )

上記試料の上記インタレーススキャンは、複数の M A - P M T チャンネル間のクロストークを減少させる、

項目 6 に記載のシステム。

50

## (項目 8)

多光子光源をさらに備える、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 9)

上記多光子光源はレーザを有する、  
項目 8 に記載のシステム。

## (項目 10)

光を上記試料から上記検出器に連結する複数の光ファイバをさらに備える、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 11)

組織断面切断デバイスをさらに備える、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 12)

上記検出器からスペクトルデータを受信するデータプロセッサをさらに備える、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 13)

上記検出器は、複数の異なる波長を検出する複数の検出素子を含む検出システムを有する、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 14)

上記走査素子に結合され、上記走査素子の位置及び上記走査素子の方向のうち少なくとも 1 つを検出するための配置検出システムをさらに備える、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 15)

上記光励起経路に配置され、上記焦点生成素子から光を受信する光学素子をさらに備える、  
上記光学素子は、上記焦点生成素子の色分散とは反対の色分散を導入する、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 16)

上記光収集経路は小型レンズアレイをさらに含み、上記検出器は上記小型レンズアレイから蛍光放射を受信する、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 17)

上記走査素子は、回転ミラー又は共振ミラーを有する、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 18)

各検出素子は、上記複数の焦点の位置のそれぞれに関して散乱分布に対応する収集エリアを有する、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 19)

上記検出器のアレイは、上記試料の各焦点から蛍光信号を検出する、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 20)

上記検出器は、複数の光電子増倍管素子のアレイを有する、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 21)

光源をさらに備える、  
項目 1 に記載のシステム。

## (項目 22)

上記光源はレーザを有する、

10

20

30

40

50



項目 2 1 に記載のシステム。

( 項目 2 3 )

多焦点多光子イメージングシステムであって、

励起ビームから複数の焦点を生成する焦点生成素子及び試料を横切って上記複数の焦点を走査する走査素子を含む光励起経路であって、上記焦点生成素子は上記励起経路に沿って上記走査素子から光を受信する、光励起経路と、

上記試料からの蛍光放射を検出する検出器を含む光収集経路と、

を備える、

システム。

( 項目 2 4 )

上記光収集経路は、非デスキャン収集経路である、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 2 5 )

上記検出器は、マルチアノード光電子増倍管 ( M A - P M T ) である、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 2 6 )

1 又は複数のファイバを含む光ファイバデバイスが、放射された上記光を上記 M A - P M T に連結するのに用いられる、

項目 2 5 に記載のシステム。

( 項目 2 7 )

上記 1 又は複数のファイバは、1 又は複数の液体ライトガイドを含む、

項目 2 6 に記載のシステム。

( 項目 2 8 )

上記 1 又は複数のファイバのそれぞれは、複数のスペクトルチャネルを検出すべく、上記 M A - P M T の複数のチャネルに連結される、

項目 2 7 に記載のシステム。

( 項目 2 9 )

上記 1 又は複数のファイバのそれぞれは、上記試料のインタレースキャンを形成すべく、複数の隣接する領域を走査する、

項目 2 7 に記載のシステム。

( 項目 3 0 )

上記試料の上記インタレースキャンは、複数の M A - P M T チャネル間のクロストークを減少させる、

項目 2 9 に記載のシステム。

( 項目 3 1 )

多光子光源をさらに備える、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 3 2 )

上記多光子光源はレーザを有する、

項目 3 1 に記載のシステム。

( 項目 3 3 )

光を上記試料から上記検出器に連結する複数の光ファイバをさらに備える、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 3 4 )

組織断面切断デバイスをさらに備える、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 3 5 )

上記検出器からスペクトルデータを受信するデータプロセッサをさらに備える、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 3 6 )

10

20

30

40

50

上記検出器は、複数の異なる波長を検出する複数の検出素子を含む検出システムを有する、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 3 7 )

上記走査素子に結合され、上記走査素子の位置及び上記走査素子の方向のうち少なくとも 1 つを検出するための配置検出システムをさらに備える、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 3 8 )

上記光励起経路に配置され、上記焦点生成素子から光を受信する光学素子をさらに備える、

10

上記光学素子は、上記焦点生成素子の色分散とは反対の色分散を導入する、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 3 9 )

上記光収集経路は小型レンズアレイをさらに含み、上記検出器は上記小型レンズアレイから蛍光放射を受信する、

項目 2 3 に記載のシステム。

( 項目 4 0 )

多焦点多光子イメージングシステムであって、

励起ビームから複数の焦点を生成する焦点生成素子及び試料を横切って上記複数の焦点を走査する走査素子を含む光励起経路であって、上記焦点生成素子は上記励起経路に沿って上記走査素子から光を受信する、光励起経路と、

20

上記試料からの蛍光放射を検出する複数の検出素子及び複数の収集光学素子を含む光収集経路であって、上記複数の収集光学素子の各収集光学素子は、上記蛍光放射の光を上記複数の検出素子の各検出素子に連結する、光収集経路と、

を備える、

システム。

( 項目 4 1 )

上記複数の収集光学素子の各収集光学素子は、上記複数の焦点のそれぞれの焦点により生成された蛍光放射を受信する、

項目 4 0 に記載のシステム。

30

( 項目 4 2 )

1 又は複数のファイバを含む光ファイバデバイスが、上記蛍光放射の光を上記複数の収集光学素子から上記複数の検出素子に連結するのに用いられる、

項目 4 0 に記載のシステム。

( 項目 4 3 )

上記 1 又は複数のファイバのそれぞれは、上記複数の検出素子のそれぞれの検出素子と連結される、

項目 4 2 に記載のシステム。

( 項目 4 4 )

複数のライトガイドをさらに備え、

40

上記複数のライトガイドの各ライトガイドは、蛍光放射の光を上記複数の収集光学素子のそれぞれの収集光学素子から上記複数の検出素子のそれぞれの検出素子に連結する、

項目 4 3 に記載のシステム。

( 項目 4 5 )

多光子光源をさらに備える、

項目 4 0 に記載のシステム。

( 項目 4 6 )

上記多光子光源はレーザを有する、

項目 4 5 に記載のシステム。

( 項目 4 7 )

50

組織断面切断デバイスをさらに備える、  
項目 4 0 に記載のシステム。

( 項目 4 8 )

検出器からスペクトルデータを受信するデータプロセッサをさらに備える、  
項目 4 0 に記載のシステム。

( 項目 4 9 )

上記走査素子に結合され、上記走査素子の位置及び上記走査素子の方向のうち少なくとも 1 つを検出するための配置検出システムをさらに備える、  
項目 4 0 に記載のシステム。

( 項目 5 0 )

上記光励起経路に配置され、上記焦点生成素子から光を受信する光学素子をさらに備え  
、

上記光学素子は、上記焦点生成素子の色分散とは反対の色分散を導入する、  
項目 4 0 に記載のシステム。

( 項目 5 1 )

多焦点多光子イメージングのための方法であって、

試料の関心領域を横切って複数の焦点を走査すべく走査素子を用いる段階であって、上  
記複数の焦点は、上記走査素子により光励起経路に沿って焦点生成素子に方向付けられた  
光から生成される、走査素子を用いる段階と、

複数の焦点の位置と上記関心領域との間を相対移動することなく画像データを生成すべ  
く、上記関心領域の上記複数の焦点の位置からの光を検出する段階と、  
を備える、

方法。

( 項目 5 2 )

蛍光放射の光を複数の収集光学素子から複数の検出素子に連結すべく、1 又は複数のフ  
ァイバを含む光ファイバデバイスを用いる段階をさらに備える、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 5 3 )

上記 1 又は複数のファイバのそれぞれは、上記複数の検出素子のそれぞれの検出素子と  
連結される、

項目 5 2 に記載の方法。

( 項目 5 4 )

複数のライトガイドをさらに備え、

上記複数のライトガイドの各ライトガイドは、蛍光放射の光を上記複数の収集光学素子  
のそれぞれの収集光学素子から上記複数の検出素子のそれぞれの検出素子に連結する、

項目 5 3 に記載の方法。

( 項目 5 5 )

上記試料の一部を断面に切るべく組織断面切断デバイスを用いる段階をさらに備える、  
項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 5 6 )

検出器からスペクトルデータを受信するデータプロセッサを用いる段階をさらに備える  
、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 5 7 )

複数の検出素子を有する検出器のアレイを用いて検出する段階をさらに備え、

各検出素子は、複数の焦点の位置のそれぞれに関して蛍光放射の散乱分布に対応する収  
集エリアを有する、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 5 8 )

上記走査素子は、回転ミラー又は共振ミラーである、

10

20

30

40

50

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 5 9 )

複数の光電子増倍管素子のアレイを用いて検出する段階をさらに備える、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 0 )

上記焦点生成素子はマイクロレンズアレイ、回折光学素子、又は複数の光ファイバである、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 1 )

第 1 検出器のアレイ及び第 2 検出器のアレイを有する検出器のアレイを提供する段階をさらに備える、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 2 )

上記関心領域と上記検出器のアレイとの間の光学経路に沿って光を伝送する光ファイバデバイスを提供する段階をさらに備える、

項目 6 1 に記載の方法。

( 項目 6 3 )

光源を上記走査素子に連結する光ファイバデバイスを提供する段階をさらに備える、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 4 )

イメージングシーケンスをシステムコントローラによって制御する段階をさらに備える

、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 5 )

検出器に接続されたデータ処理システムによってスペクトルデータ进行处理する段階をさらに備える、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 6 )

コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱プロセスによってスペクトルデータを検出する段階をさらに備える、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 7 )

誘導ラマン散乱プロセスによってスペクトルデータを検出する段階をさらに備える、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 8 )

第 2 高調波生成プロセスによってスペクトルデータを検出する段階をさらに備える、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 6 9 )

共焦点反射顕微鏡法システムによってスペクトルデータを検出する段階をさらに備える

、

項目 5 1 に記載の方法。

( 項目 7 0 )

項目 1 から 5 0 の何れか一項に記載のシステムによって試料をイメージングする段階をさらに備える、

項目 5 1 から 6 9 の何れか一項に記載の方法。

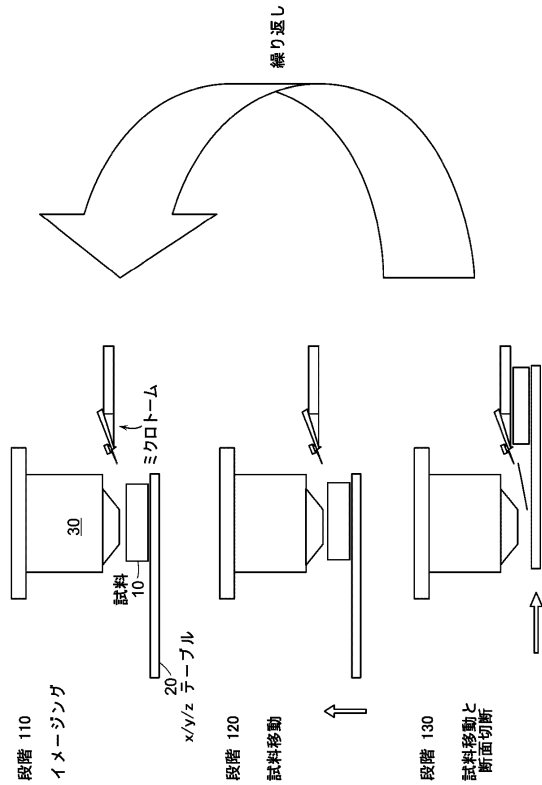
10

20

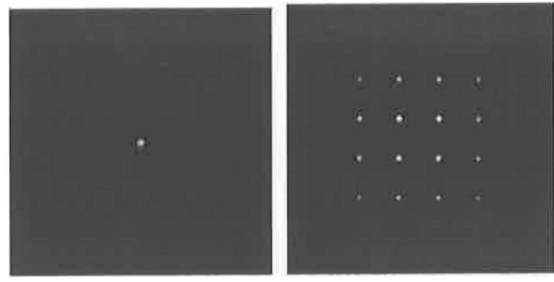
30

40

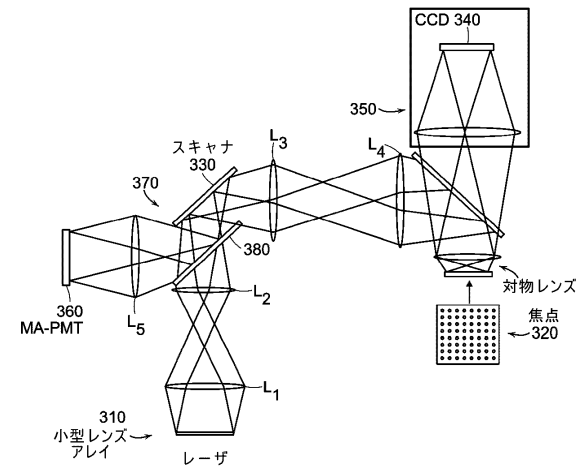
【図 1】



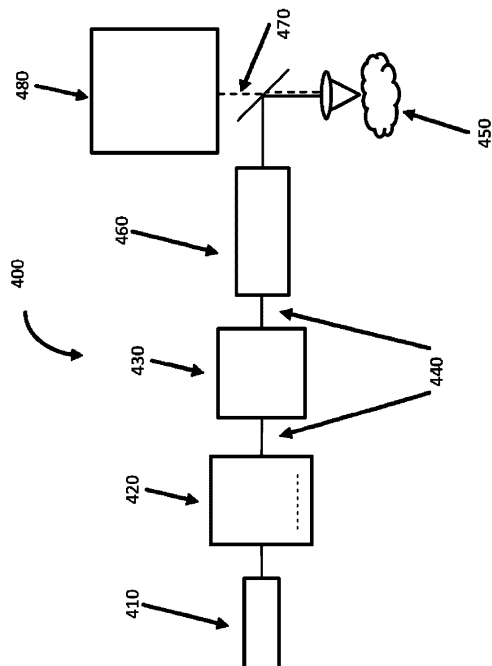
【図 2】



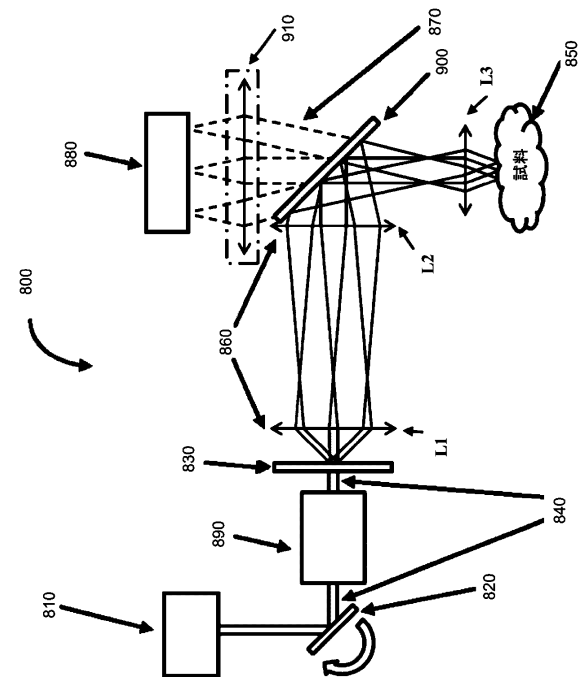
【図 3】



【図 4 A】

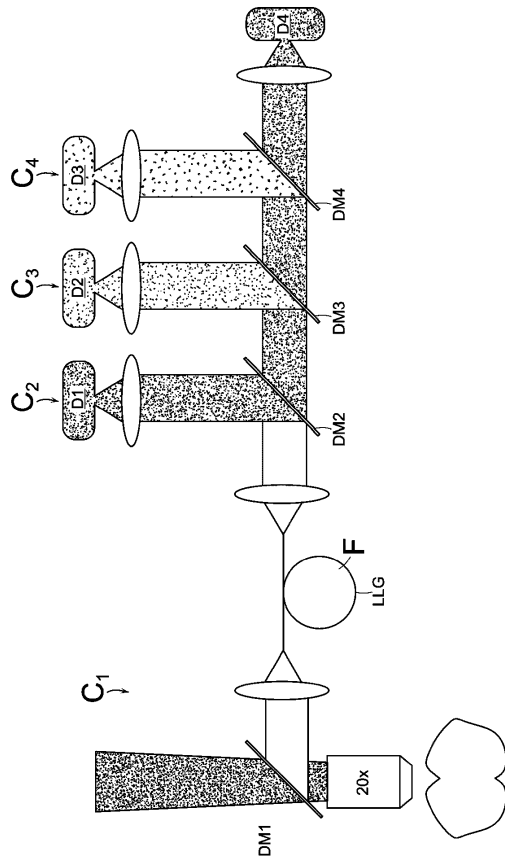


【図 4 B】

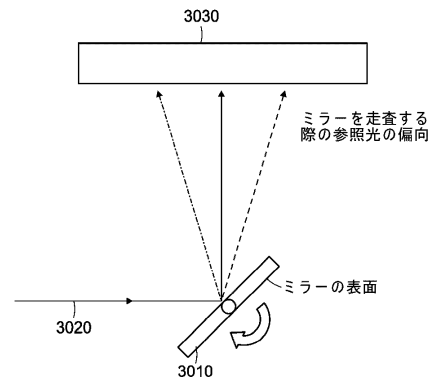




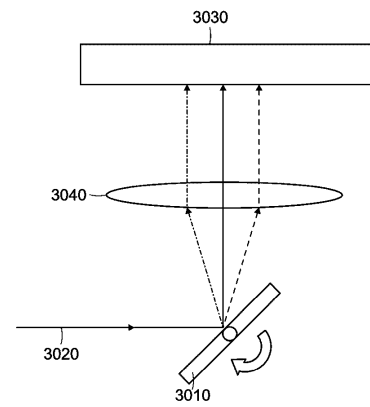
【図 8】



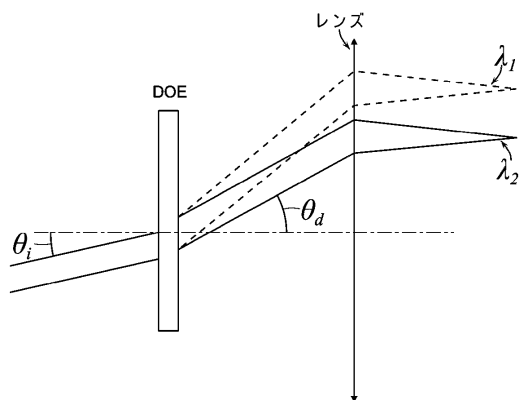
【図 9 A】



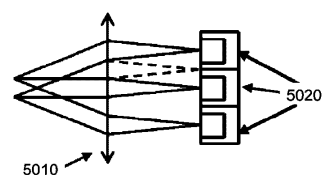
【図 9 B】



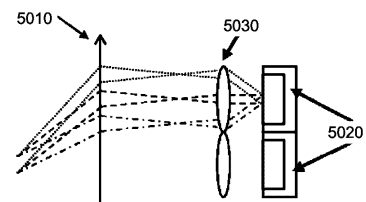
【図 10 A】



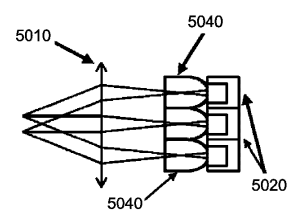
【図 11 A】



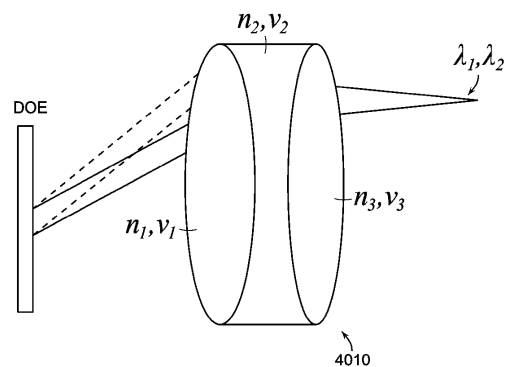
【図 11 B】



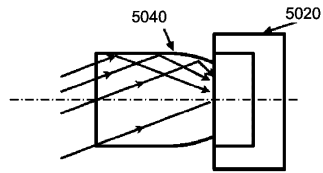
【図 11 C】



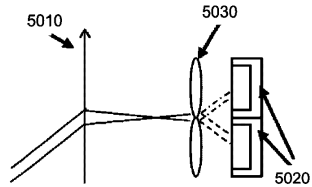
【図 10 B】



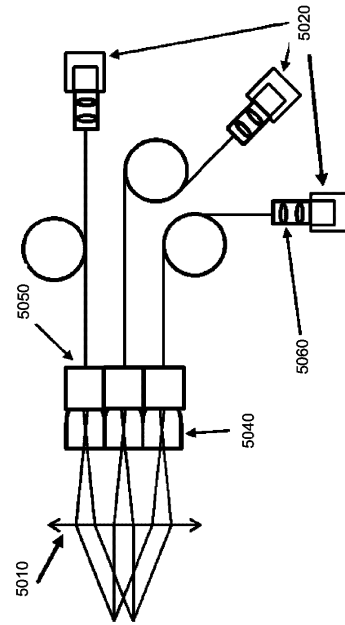
【図 1 1 D】



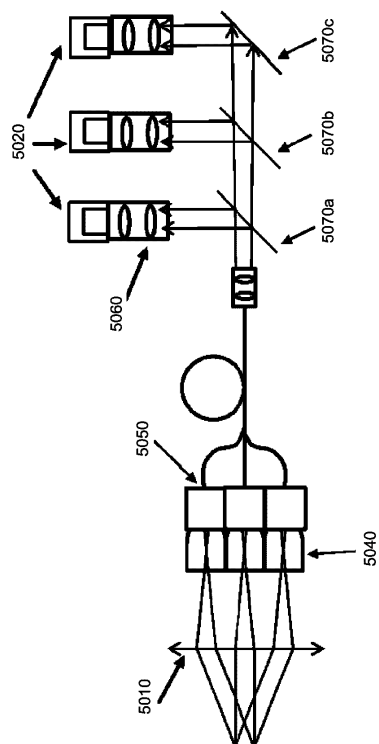
【図 1 1 E】



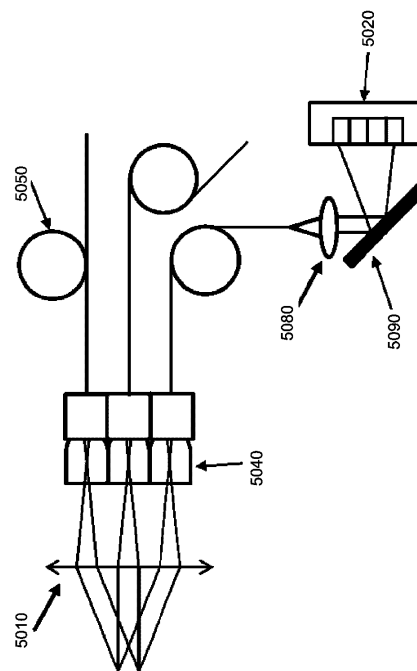
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】





## フロントページの続き

(72)発明者 イェウ、エリヤー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02143、サマーヴィル プロペルツィ ウェイ 29  
ティシュヴィジョン、インコーポレーテッド内

審査官 嶋田 行志

(56)参考文献 特開2010-271569(JP, A)

米国特許出願公開第2009/0225399(US, A1)

特開2005-017127(JP, A)

特開2006-178472(JP, A)

特開2005-275206(JP, A)

特開2006-031004(JP, A)

特開2000-193889(JP, A)

特開2013-113689(JP, A)

国際公開第2013/045078(WO, A1)

特表2005-508489(JP, A)

米国特許出願公開第2008/0192231(US, A1)

米国特許出願公開第2007/0057211(US, A1)

特開2010-008989(JP, A)

特表2009-517662(JP, A)

特開2008-197127(JP, A)

特表2010-532878(JP, A)

特表2011-527218(JP, A)

国際公開第2013/126762(WO, A1)

特開2010-250191(JP, A)

Multifocal multiphoton microscopy based on a spatial light modulator, Appl Physics B, Springer-Verlag, 2013年 5月12日, Volume 107, Issue 3, pp. 653-657, doi:10.1007/s00340-012-5027-4

1D-Scanning Addressable Multiregional Multifocal Multiphoton Microscopy, Ultrafast Imaging and Spectroscopy, Proceedings of SPIE, SPIE, 2013年 9月28日, Volume 8845, 884517, doi:10.1117/12.2024325

Efficient large core fiber-based detection for multi-channel two-photon fluorescence microscopy and spectral unmixing, Journal of Neuroscience Methods, Elsevier B.V., 2011年 6月15日, Volume 198, Issue 2, pp. 172-180, doi:10.1016/j.jneumeth.2011.03.015

Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging, Nature Method, 米国, Nature America, Inc., 2012年, Vol.9 No.3, 255-258

High-Throughput Nonlinear Optical Microscopy, Biophysical Journal, 2013年12月17日, Volume 105, Issue 12, pp. 2641-2654, doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.051

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00 - 21/958

G02B 19/00

G02B 21/00 - 21/36

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

JSTChina(JDreamIII)

ScienceDirect

nature.com

Science  
Scitation  
ACS PUBLICATIONS  
APS Journals  
JJAP  
APEX  
OSA Publishing  
IEEE Xplore  
SPIE