(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4712923号
(P4712923)

(45)発行日　平成23年6月29日(2011.6.29)　(24)登録日　平成23年4月1日(2011.4.1)

(51)Int.Cl.		F I		
G02B 21/00	(2006.01)	G02B	21/00	
G01J 3/28	(2006.01)	G01J	3/28	
G01N 21/27	(2006.01)	G01N	21/27	E
G01N 21/64	(2006.01)	G01N	21/64	E
G01N 21/65	(2006.01)	G01N	21/65	

請求項の数 18　(全 15 頁)

(21)出願番号　特願平10-327190
(22)出願日　平成10年11月17日(1998.11.17)
(65)公開番号　特開平11-249023
(43)公開日　平成11年9月17日(1999.9.17)
審査請求日　平成17年10月18日(2005.10.18)
審判番号　不服2008-24261(P2008-24261/J1)
審判請求日　平成20年9月22日(2008.9.22)
(31)優先権主張番号　97120101.7
(32)優先日　平成9年11月17日(1997.11.17)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(73)特許権者　594056568
マツクス－プランク－ゲゼルシャフト　ツール　フエルデルング　デル　ヴイツセンシャフテン　エー　フアウ
ドイツ連邦共和国、デー　－　８０５３９　ミュンヘン、ホーフガルテンシュトラーセ　８
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊
(74)代理人　100091351
弁理士　河野　哲
(74)代理人　100088683
弁理士　中村　誠
(74)代理人　100109830
弁理士　福原　淑弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】共焦点分光システムおよび分光方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

光源手段と、

照明開口を形成し検査している対象物の共役位置に予め定められた照明パターンを導くように構成されている光変調手段と、

検出開口と分光分散素子と検出器カメラとを備えている解析手段とを具備し、照明および検出開口は共役光学平面に配置されている共焦点分光映像システムにおいて、

光変調手段は光変調素子の２次元アレイから構成され、それら２次元アレイを構成する光変調素子のグループは、予め定められた照明パターンにしたがって配置され、

前記照明パターンにしたがって配置された光変調素子のグループは照明開口を同時に形成しており、

その照明パターンが対象物の共役位置を時間に依存して変化するように光変調手段が制御可能に構成されており、

光変調手段は、予め定められた変化する照明パターンシーケンスに基づいて前記光変調素子のグループを変更することによって形成された照明パターンにしたがって対象物の少なくとも一部を走査するように構成されており、

前記解析手段は、光変調素子の制御と同期してカメラの信号を集めるように構成されている制御装置を含んでいることを特徴とする共焦点分光映像システム。

【請求項２】

光変調素子は、その反射率、透過率、回折特性が変化されるように個々に制御可能であ

る請求項１記載のシステム。
【請求項３】
前記照明パターンシーケンスは、有限長の疑似ランダムシーケンスまたはＳマトリックス型のアダマールシーケンスのいずれかにしたがった規則的な間隔またはランダムな間隔の系統的にシフトとされたライン、例えば三角形、正方形、長方形、六角形等の規則的なドット格子、いわゆるウォルシュ、シリベスター、アダマールまたはゴリーシーケンスに基づいた有限長のランダムパターンまたは疑似ランダムパターン、交差するラインパターンから形成された正方形または長方形の格子、ＳＬＭ上の順次生成された整数回数のＳＬＭ素子上における回転に適している平面充填パターンまたは上記パターンシーケンスの組合わせのいずれかであるように選択されている請求項１項記載のシステム。
【請求項４】
検出開口は光変調素子のパターン成形されたグループにより形成されて照明および検出のための共役光学平面が一致している請求項１乃至３のいずれか１項記載のシステム。
【請求項５】
分光分散素子および２次元検出器カメラの入口が共役光学平面に配置されている請求項１乃至４のいずれか１項記載のシステム。
【請求項６】
分光分散素子の入口平面が光変調素子の２次元アレイによって定められている請求項１乃至５のいずれか１項記載の電磁ヘッドを具備しているシステム。
【請求項７】
システムは共焦点のプログラム可能なアレイ顕微鏡の一部として構成され、対象物の共役および非共役顕微鏡映像の少なくとも一方を収集するための２次元カメラを備えたフルフィールド検出手段をさらに具備している請求項１乃至６のいずれか１項記載のシステム。
【請求項８】
光源手段が
白色または広帯域光源と、
光源からの光の波長選択のための分散手段と、
個々の時間依存性の制御可能な光変調素子の２次元アレイを有する空間的光変調手段とを具備し、
前記制御可能な光変調素子は分散光で照明されて位置選択的な透過または反射を行って予め定められた波長分布の光出力が空間的光変調手段を通過するように構成されている、請求項１乃至７のいずれか１項記載のシステム。
【請求項９】
さらに、分散された波長を再結合する装置を具備し、その装置は積分球体、並列モードの照明に適応するレンズシステム、整合された１組の分散光学系、光ファイバ、液体光導管、または材料の散乱表面である請求項８記載のシステム。
【請求項１０】
光変調素子は、Ｓ型アダマールコードマトリックスの行または列に対応する透過または反射時間依存パターンにより、或るいは予め定められた時間掃引により制御可能である請求項８または９記載のシステム。
【請求項１１】
検出光は蛍光、燐光、対象物からの反射光、または対象物から放射されたラーマン散乱光である請求項１乃至１０のいずれか１項記載のシステム。
【請求項１２】
照明開口を形成し予め定められた照明パターンを成形する光変調手段を介して光源手段からの照明光の焦点を検査する対象物の共役位置に結ばせ、
検出開口と、分光分散素子と、検出カメラとを有する解析手段により対象物から放射された光を収集し、照明開口および検出開口は共役光学平面に配置されている共焦点分光映像方法において、

光変調手段は光変調素子の２次元アレイから構成され、それら２次元アレイを構成する光変調素子のグループは、予め定められた照明パターンにしたがって配置され、
前記照明パターンにしたがって配置された光変調素子のグループは照明開口を同時に形成しており、
その照明パターンが対象物の共役位置を時間に依存して変化するように光変調手段が制御可能に構成されており、
光変調手段は、予め定められた変化する照明パターンシーケンスに基づいて前記光変調素子のグループを変更することによって形成された照明パターンにしたがって対象物の少なくとも一部を走査するように構成されており、
前記解析手段は、光変調素子の制御と同期してカメラの信号を集める制御装置を含んでいることを特徴とする共焦点分光映像方法。

【請求項１３】
光変調素子は、予め定められた照明パターンシーケンスにしたがって対象物の少なくとも一部を走査するように制御され、その照明パターンは、有限長の疑似ランダムシーケンスまたはＳマトリックス型のアダマールシーケンスのいずれかにしたがった規則的な間隔またはランダムな間隔の系統的にシフトされたライン、例えば三角形、正方形、長方形、六角形等の規則的なドット格子、いわゆるウォルシュ、シリベスター、アダマールまたはゴリーシーケンスに基づいたランダムパターンまたは疑似ランダムパターン、交差するラインパターンから形成された正方形または長方形の格子、ＳＬＭ上の順次生成された整数回数のＳＬＭ素子上における回転に適している平面充填パターンまたは上記パターンシーケンスの組合わせのいずれかであるように選択される請求項１２項記載の方法。

【請求項１４】
対象物の同時に分光的に解像された共役（I_c）および、または非共役（I_{nc}）映像がフルフィールド検出手段により収集される請求項１２または１３記載の方法。

【請求項１５】
光の焦点を結ぶステップは波長選択を含んでいる請求項１２乃至１４のいずれか１項記載の方法。

【請求項１６】
さらに、デコンボリューションステップを含み、それにおいて、対象物は、分光的に解像されて共役（I_c）および、または非共役（I_{nc}）映像を組合わせるデコンボリューションアルゴリズムにより再構成される請求項１４または１５記載の方法。

【請求項１７】
さらに、基体上でフォトケミカル反応を同時位置選択開始および監視するステップを含み、それにおいて、開始は適切な波長を有する予め定められた物質の照射を含み、監視はその物質または反応生成物による蛍光測定を含んでいる請求項１２乃至１６のいずれか１項記載の方法。

【請求項１８】
生態の細胞および組織の検査、解剖またはバイオ技術の過程、遺伝解析における現場での交配、位置選択フォトケミカル反応のための光マスクの形成、１以上の固有または外部刺激蛍光の励起および放射スペクトル測定と、寿命時間測定と、偏極測定および、または反射モードにおける吸収測定を含む位置選択分光測定、チップ上のバイオケミカルアレイの読取り、半導体工業における大規模集積回路表面検査、光記録および読取りの１以上において使用される請求項１２乃至１７のいずれか１項記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、共焦点分光システム（ＣＳＳ）および、または波長プログラム可能な光源（ＰＬＳ）を使用する共焦点分光映像システム（ＣＳＩＳ）に関する。ＣＳＩＳの構成要素であるＣＳＳおよびＰＬＳはＣＳＩＳを構成するために別々にまたは一緒に使用されることができる。この発明は、とくに照明および検出パターンが自由にプログラム可能であるプ

ログラム可能なアレイ顕微鏡を有するＣＳＩＳの好ましい構成に関する。

【０００２】

【従来の技術】

共役対の照明および検出開口を有する点走査システムに基づいた共焦点顕微鏡は、直接光区分化によって調査される顕微鏡対象物の映像を形成する有効なツールである。ディスクリートな開口スポットは顕微鏡の対物平面において照明され、それから反射された光またはそれにより発生した蛍光は共役対の検出開孔を通って観察される。機械的変換開孔ディスク（複数の開孔を有するいわゆるニコーの円板）またはレーザビームにより対象物を走査するように構成された回転ミラー（共焦点レーザ走査顕微鏡：ＣＳＬＭ）を備えた走査システムに基づいた共焦点顕微鏡が通常使用されている。ディスクに基づいた走査システムは、照明フィールドの制限、コントラストの劣化、および高い強度損失等の欠点を有している。典型的に３％より小さい開孔率のディスクが使用され、それはピンホール間の間隔が共焦点効果を維持するために大きくなければならないからである。他方、ＣＳＬＭはデータ獲得のための順次の単一点を走査する動作モードのために低いデューティサイクルを使用しなければならない。

【０００３】

改良された空間的に光変調された顕微鏡が文献（Ｍ．Ｌiang他：“Optics Letters”,vol.22,1997,751～753 頁）および対応する米国特許第5,587,832 号明細書に記載されている。２次元の空間的な光変調器がデジタルマイクロミラー装置（以下ＤＭＤと言う）によって構成され、このＤＭＤは光源（レーザまたは他の白色光源）からの照明光をプローブに反射し、プローブからの検出光は２次元検出器に供給される。ＤＭＤの各マイクロミラーは照明および検出スポットを形成したり、形成しなかったのするように個別に制御される。

【０００４】

従来技術の共焦点顕微鏡の一般的な欠点は、分光的に解像された映像の検出に関するものである。デューティサイクルと照明および検出強度は限定され、そのため分光映像は実用的な時間内には可能ではない。さらに、ｋＨｚの程度の周波数で分光素子を多重倍にする大きい数（＞５０）の迅速な選択を有する励起ソースは得られない。

【０００５】

アダマール(Hadamard)変換分光計が知られており、それはいわゆるアダマールコード化マスクを通した検出に基づいて位置およびスペクトル選択を行う。そのような分光計は例えば文献（例えばＲ．Ｍ．Hammaker他、“Journal of Molecular Structure”vol.348,1995,135～138 頁またはＰ．Ｊ．Tread 他、“Applied Spectroscopy”vol.44,1990, 1～5 頁およびvol.44,1990,1270～1275頁）に記載されている。

【０００６】

Ｐ．Ｊ．Tread 外によるアダマール(Hadamard)変換ラーマン顕微鏡は図７のＡおよびＢにＨＴＳ70として示されている。図７のＡは顕微鏡71の検出路中のアダマールマスク72の配置を示している。アダマールマスク72は線形符号化マスクであり、分光測定の空間的多重化が変換ステージ73によりマスクを分割することによって得られる。スペクトルグラフ74により得られる映像は制御コンピュータ75によりデコードされる。ＨＴＳ70中で使用される通常の顕微鏡71の詳細は図７のＢに示されている。

【０００７】

Ｐ．Ｊ．Tread 等によるＨＴＳは次のような欠点を有している。すなわち、照明はある励起波長に限定され、制御可能ではない。その装置はラーマン測定を可能にするだけである。通常の顕微鏡の使用のためには、映像処理なしに検査している対象物の光学的セクションを発生することは不可能である。マスクはプログラム可能でない光変調装置のみである。

【０００８】

したがって、既知のＨＴＳの適用は一般に光検出路または音響・光測定、ラーマン顕微鏡および通常の顕微鏡に限定される。

【０００９】
共焦点ラーマン顕微鏡システムは文献（Ｇ．Ｊ．Ruppel等による“Nature”vol.347,1990,301～303 頁）に記載されている。検査している対象物により散乱された光は、対物レンズによって収集され、ピンホールを通って共焦点検出のために分光計に結合される。ピンホールを通しての検出は測定された光強度の本質的な制限を示すものであり、それ故、既知の顕微鏡システムの応用は制限される。
【００１０】
共焦点ライン走査システムは一般に知られている。Ｐ．Ａ．Benedetti 等の文献（“Journal of Microscopy ”vol.165,1992,119～129 頁）には共焦点ライン（ＣＬ）法による分光計システムの使用が開示されている。このＣＬ技術は次のような欠点を有している。第１に、ライン成形された照明の形成は余分な光学部品（スリット、レンズ、ミラー）を必要とし、また調整の要求が制限される。第２に、光学部品は位置が固定され、そのため、ライン検出に垂直な方向走査は機械的な対象物走査テーブルによって行わなければならない。したがって、走査速度は著しく制限され、とくにスペクトル映像形成には時間がかかる。第３にこのＣＬシステムにおける照明はただ１個のスリットのみを使用するために制限される。空間的ドメインの多重化は不可能である。
【００１１】
【発明が解決しようとする課題】
実時間共焦点顕微鏡または映像装置、特に細胞またはその一部分のような生物対象物の映像技術の分野では、高いコントラスト、感度、検出速度、および分光映像技術の適用の拡大のためのさらに改良された技術が求められている。
【００１２】
本発明の目的は、迅速なデータ獲得が可能な共焦点分光映像のための装置および方法を提供することであり、特に、効率的な光学的区分化、高い空間的解像度、高い光学的効率およびスペクトル分解能を有する共焦点分光映像のための装置および方法を提供することである。
本発明の特別の目的は、生物学的または化学的物質（例えば生きている細胞、反応生成物等）の迅速な映像を提供し、一方、分光計測定の能力を開発し、分子構造および機能に関する情報を提供することである。その固有の感度および選択性によって、分子蛍光はこの新しい装置および方法を実行するために好ましい分光計現象である。
本発明のさらに別の目的は、予め定められたシーケンスにしたがって迅速に選択可能な１または複数の波長を有する光出力を発生するように構成されたプログラム可能な光源を提供することである。
【００１３】
【課題を解決するための手段】
この目的は、請求項１，１１または１８に記載された本発明の共焦点映像装置または方法ならびに光源によって達成される。本発明の有効な実施形態はその他の請求項に記載されている。
【００１４】
本発明の基本的なアイディアは、空間的光変調手段（以下ＳＬＭと言う）を備えた分光解析手段を有する共焦点光学的映像システムの動作にある。ＳＬＭ手段は光変調素子のアレイを備えている。１つのアレイは光変調素子から構成されたマスクであり、それらの光変調素子は個々に制御可能である。その制御性は、透過、反射、または回折のような素子の光学的特徴に関係している。光変調素子のグループまたは全てを変更することによって照明および、または検出開口としてコード化された照明パターンを形成する。相互に整合された照明または検出のためのパターンは別々の、または共通の変調器によって発生される。実際の開口を表している光変調素子は予め定められたパターンシーケンスにしたがって選択可能であり、そのため照明パターンシーケンスは共役対象物平面に形成され、変化する位置が照明される。照明パターンシーケンスは時間符号化された照明を可能にする。したがって、ＳＬＭ手段は照明および／または検出符号化手段を形成する。変形形態では、

アレイは可動マスクであり、シーケンスはマスクの移動によって得られる。この場合には、映像のスペクトルグラフは顕微鏡の共役映像平面に位置され、マスクの多重開口が光を収集するために使用される。このシステムは、さらに以下説明するように、スペクトルがプログラム可能な照明光源のマスクである光変調素子のさらに別のアレイを含むことができる。

【００１５】

照明パターンシーケンスは、有限長の疑似ランダムシーケンスとＳマトリックスタイプのアダマールシーケンスのいずれかにしたがった規則的な、またはランダムな間隔でシフトした系統的なライン、三角形、正方形、長方形、六角形のようなドットの規則的な格子状配置、いわゆるウォルシュ、シルベスター、アダマールまたはゴーレー(Golay) シーケンスに基づいた有限長のランダム或いは疑似ランダムパターン、交差したラインパターンから形成された正方形または長方形格子、またはＳＬＭ上に順次生成されたとき整数倍のＳＬＭ素子上のターンに適合している平面充填パターン、または論理的ブール(Boolean) 、アンド、オア、ナンド、或いは排他的オア動作に基づいた上記パターンシーケンスの組合わせを含んでいる。

【００１６】

本発明の好ましい実施形態によれば、検出開口は照明開口と一致し、および、または解析手段のスペクトル分散素子の入口を形成している。スペクトル分散素子の入口および２次元検出カメラが共役平面に位置されるとき、入口スリットの設備は省略することができる。

【００１７】

本発明の共焦点分光計システムは、本明細書において参考文献とする1997年10月22日出願のヨーロッパ特許出願No.97118354.6 号に記載されたようなＰＡＭとして構成される。

【００１８】

システムの光源手段は固定または調整可能な波長フィルタを備えた白色光ランプまたはレーザを含む。調整可能な波長フィルタを備えた白色光ランプは本発明の特徴とは関係ないが、スペクトルのプログラム可能な照明光源から得ることができる。この場合、波長フィルタはスペクトル分散素子から構成され、光変調素子の２次元アレイはその分散素子を通過する予め定められた波長の少なくとも１つを選択するように構成されている。

【００１９】

本発明の好ましい実施形態によれば、検出光は蛍光、燐光、対象物から反射または放射されてラーマン散乱された光である。

【００２０】

本発明の共焦点分光映像方法は、検査する対象物に対して共役位置に照明パターンを形成する光変調素子のアレイにより光変調手段を介して光源からの照明光の焦点を結ばせ、検出開口、スペクトル分散素子、および２次元検出カメラを有する解析手段により対象物から放射された光を収集するステップを有し、照明開口および検出開口は共役光学平面に位置され、光変調手段は、予め定められた開口またはパターンにしたがって形成された光変調素子のグループが照明パターンシーケンスを成形するような時間依存性の態様で制御される。２次元の光学的に区分された映像を収集するために、上述の特徴のようなパターンシーケンスが使用される。時間依存性の制御は、光学的に区分された２次元映像を収集するために、対象物平面の走査を行うように構成されている。

【００２１】

好ましくは分光映像は、前述のヨーロッパ特許出願No.97118354.6 号に記載されたプログラム可能なアレイ顕微鏡を使用して照明および検出開口の共焦点配置を生成することによって構成される。この好ましい構成では、２個の完全なスペクトル映像が上記参考文献のヨーロッパ特許出願明細書に記載されたように共役I_n 映像および非共役I_{nc}映像に対応して記録される。それからデコンボリューションステップが得られた映像に適用されて１以上の光セクションのぼけを減少させる。ぼけのマトリックスの構成は別のスペクトルまたは時間ディメンションにより与えられる。

【００２２】
本発明の有効な適用は基体上のフォトケミカル反応の同時位置選択開始および監視の方法を含み、それにおいて開始は適切な波長による予め定められた物体の照射（例えば以下説明するプログラム可能な光源による）を含み、監視は物質または反応生成物による蛍光測定、細胞または生物組織の検査、解析たまは生物学的手順、遺伝解析におけるその位置における交配、位置選択的フォトケミカル反応のための光学マスクの形成、１以上の固有または外部蛍光の励起および放射スペクトルを含む位置選択的な蛍光測定、寿命時間測定、および、または偏極測定、チップ上のバイオケミカルアレイの読取、半導体工業における大規模集積回路の表面検査、および、または光学的記録および読取り等を含んでいる。
【００２３】
本発明は、以下のような効果を有する。第１に、分光分析と組合わせたサンプルの区分（セクション）化はサンプル中の特定位置に存在するスペクトルのより良好な指示を与える。生物学ではこれは一緒の位置にある構造の良好な弁別を可能にする。第２に、本発明は、選択的フォトケミカル技術において共焦点モードにおける生成物の検出を可能にする。第３に、本発明は、位相変調または時間相関技術と組合わせた場合にスペクトル分解された寿命時間測定を行う能力が与えられる。映像は自己蛍光および他の妨害信号源に対してスペクトル的に弁別することを可能にする。本発明は、蛍光測定における２またはそれ以上の光子の励起とステレオスコープ映像技術との組合わせを可能にする。
【００２４】
【発明の実施の形態】
本発明の詳細および利点は、添付図面を参照にした以下の実施形態の詳細な説明によって容易に理解されることができる。
【００２５】
以下本発明の特徴とする分光映像技術およびプログラム可能な光源の２つについて説明する。本発明のシステムの適用については対象物の処理、映像処理、および表示のステップは通常の共焦点走査装置ではよく知られているものであるから詳細な説明は省略する。
【００２６】
［スペクトル映像形成］
本発明の分光映像技術による共焦点スペクトルスコープ（分光計）システム　（ＣＳＳ）は、透過（例えば液晶またはマイクロ機械スイッチに基づいたプログラム可能な開口マスク）、反射（例えばＤＭＤ）、回折またはリソグラフエッチングされた光変調器において構成されることができる。ＣＳＳは空間的光変調器を含み、それは顕微鏡の映像平面に位置している。顕微鏡対物レンズの焦点平面の異なった点に対してそれぞれ共役である空間的光変調器の素子の１つのグループまたは全部の素子は、照明開口を表しており、照明および検出の少なくとも一方に対して使用されることができるプログラム可能なアレイを定めている。照明路の光軸に関するプログラム可能なアレイの位置は、各光変調素子の個々の制御にしたがって、或いは固定されたパターンを有する光変調器の物理的な移動にしたがって変化される。本発明の特定の実施形態によれば、ＣＳＳは別の空間的光変調器を含んでおり、それは以下説明するように光源の一部として上記第１の光変調器を照明するように構成された波長選択装置である。
【００２７】
図１を参照すると、ＣＳＩＳ100 は空間的光変調器120 を使用する顕微鏡における本発明の１実施形態を示している。それはＰＡＭ中にそれを一体化する任意の２次元カメラシステム160 を含んでいる。このＣＳＩＳは二重通路の単一反射構造である。“二重通路”とは照明と検出が２つの分離した通路を通って行われることを意味している。さらに、ＳＬＭの反射は単一方向である。別の構成では、図４に示されるように共通路二重反射構造である。ＣＳＩＳ100 は基本的に光源手段110 を備え、それは図示のように白色光ランプ（励起波長選択手段を有する）であるが、以下説明するようにレーザ光源またはプログラム可能な照明光源のような固定または同調可能な波長を有する光源であってもよい。ＤＭＤ120 は顕微鏡の映像平面に配置されたＳＬＭとして動作し、映像光学系130 、プローブ部

分140 、解析手段150 、および全フィールド検出手段160 を備えている。

【００２８】

ＤＭＤ120 は正方形のミラーのアレイから構成され、そのアレイの各ミラーは垂線に対して±αの予め定められた傾斜角度の２つの安定した静止位置に別々に傾斜することができる。傾斜角度αの値は実際に使用されるＤＭＤに依存している。各ミラー素子は予め定められた面積を有し、それもまたＤＭＤに依存している。好ましいパラメータは２０μｍ以下の正方形のミラーの場合に例えばα＝±１０度である。各ミラー素子は予め定められた変調パターンにしたがってｋＨｚ範囲の特性周波数で２つの静止状態間で切替えられることができる。静止状態は各パターン（例えばライン）の形状にしたがって“オン”、“オフ”位置と呼ばれ、“オン”位置は対象物の共役位置に焦点を合わせる位置であり、“オフ”位置は残りの照明光の位置である。

【００２９】

ＤＭＤ120 はレンズ111 を介して光源手段110 により照明される。励起フィルタ131 は問題にする予め定められた波長範囲に対してバンドパス濾波することができる。励起スペクトルの検出のためにバンドパスフィルタは可変分散素子により構成されることができる。“オン”素子からの反射は第１のビーム分割器（半透明ミラー）132 および対物レンズ141 を介して対象物142 の対物平面に焦点を整合される。ビーム分割器132 はダイクロイックミラーを含むことができる。対物平面で刺激された蛍光または散乱光は対物レンズ141 を通って第１のビーム分割器132 に戻り、そこで光軸に沿ってフィルタ153 、チューブレンズ152 および第２のビーム分割器151 を通って解析手段150 に到達する。共焦点構造は対象物の非共役位置からの光を排除することを可能にする。フィルタ53は、蛍光、燐光、またはラーマン散乱測定（$\lambda_{em} > \lambda_0$）に適合して構成されている長波長を通過させるフィルタであることが好ましい。解析手段150 において、検出光は収集され、得られた映像信号は処理されて映像または光セクションを再構成する。

【００３０】

ＣＳＩＳ100 は側面照明ポートを有する顕微鏡（ツァイスのAxioplan）およびＣＣＤカメラを有するカメラモジュール（コダックのKAF1400 ＣＣＤセンサを備えた米国のTucsonのフォトメトリック社のCH220 カメラ）と組合わせる光源としてデジタル光処理キット（例えばテキサスインスツルーメント社のもの）により構成される。解析手段150 のスペクトルグラフは任意の通常のスペクトルグラフである（例えば米国アクトンのアクトンリサーチ社の30本／ｍｍｂ４ｄを有するSpectraPro-150映像スペクトルグラフおよび米国サンタバーバラのサンタバーバラリサーチインスツルメント社）。入口スリットは、上記の例にしたがって例えば２５μｍに設定され、ＤＭＤにより発生されたライン幅に適応する。プローブ部分140 はコンピュータ化された焦点制御と類似したｚ方向変位（焦点平面に垂直）のためのを駆動装置含む（例えば米国ホーソンのLudl Electronic Product 社製）。対物レンズは例えば４０×１．３ＮＡのオイル浸漬対物レンズである。本発明の各システム（例えばＣＳＩＳ100 ）は付加的に光変調素子または可動マスクを制御するための駆動装置、制御装置、計算、デコードおよび、またはデコンボリューション回路および表示装置（図示せず）を含んでいる。照明光路は斜線で示されている。制御装置は光変調素子の制御と同期してカメラの信号を集めるように構成されている。

【００３１】

共焦点スペクトル映像に対して移動するパターンシーケンスは対応するミラーからの光がレンズ133 により集められてフィルタ131 を通って導くようにさせる。対象物の完全な２次元映像を得るためにパターンは走査されるべきであり、例えば各光変調素子は別々に制御され、パターンの位置は予め定められたシーケンスにしたがって変化する。ＤＭＤ120 は上述のように制御され、例えばＳＬＭ素子のラインパターンにより検査されるべき対象物が照明される。この状態はライン共焦点動作と呼ばれ、それにおいてスペクトログラフの入口スリットに共役のＳＬＭ中の画素のラインは“オン”に切替えられる。約１６μｍのＤＭＤミラー素子の幅と４０×の対物レンズによって対象物に対して映像が形成された映像ラインは約４００ｎｍの幅を有する。このラインは解析手段の入口スリットに対して

共役に配置される。

【００３２】

映像パターンシーケンスは一般に固定されたライン、または有限長の疑似ランダムシーケンスとＳマトリックスタイプのアダマールシーケンスのいずれかにしたがった規則的な間隔、またはランダムな間隔でシフトした系統的なライン、または、三角形、正方形、長方形、六角形のようなドットの規則的な格子状配置、またはいわゆるウォルシュ、シルベスター、アダマールまたはゴーレー(Golay) シーケンスに基づいた有限長のランダムパターン或いは疑似ランダムパターンを含むことができる。シルベスターマトリックスは２次元の検出器で３次元のデータを記録することを可能にする１つの空間的ドメインを多重化する能力により好ましいコード化シーケンスである。これは多くの場合に測定の信号対雑音比（ＳＮＲ）を改善する。ライン映像（共焦点スリット照明）は通常使用されるスペクトログラフの入口開口の形状に適応するので好ましい。

【００３３】

例としてラインの縮小された映像が対物平面に対物レンズ141 によって形成され、その対物平面で蛍光が刺激され、或るいは光が散乱される。放射された光は映像スペクトログラフの入口スリット155 を通過し、１次元または２次元カメラ156 により記録される。集められた映像のその後の処理は既知のデコードおよび再構成の手順に対応している。

【００３４】

フルフィールド映像形成のために、全ＤＭＤ120 は“オン”位置に切替えられる。分光映像のための光路は、入口スリット155 を通過する光が対物平面の上および下の構造からの焦点を外れた多量の光を含んでいることを除いて前に説明したものに類似している。非分光映像に対しては、フルフィールドは付加的に２次元カメラ161 を含む検出手段160 により記録される。第２の２次元カメラ161 は第２のビーム分割器151 を介してフルフィールド映像を集める。これは同一プローブ位置における共焦点動作モードと通常の動作モードとの直接比較を可能にする。カメラ161 は特に前記ヨーロッパ特許出願明細書に記載されたような、いわゆる単一カメラモードで使用されることができ、それ故、通常の映像および共焦点映像が交互に得られる。

【００３５】

さらに、励起スペクトルは光源とＳＬＭの間の光路中に波長選択器を配置することによって得られる。別の応用によれば、反射モードにおける吸収スペクトルが集められる。ＳＬＭは上述のようにアダマールシーケンスにしたがったコード化シーケンスにより制御されることが好ましい。したがって、アダマールシーケンスが照明と検出の両者に同時に最初に使用される。

【００３６】

図２の（ａ）～（ｆ）は図１による装置により得られたスペクトル映像の零時である。印刷技術上の理由から、カラー写真は概略的に示されている。

図２の（ａ）は蛍光でラベルを付けられた生物試料の１例である。高い空間的周波数構造を有するコンバラリア（Convaiiaria ）の地下茎の１５μｍセクションはアクリジンオレンジで着色される。４５０～４９０ｎｍでの励起において蛍光は黄および赤の２つのスペクトル領域で放射され、それは図では異なったグレイ色で示されている。図２の（ａ）の矢印は入口スリットの位置を示している。水平のラインは図２の（ｂ）および（ｃ）の対応するスペクトルを参照するものである。図２の（ｂ）は図２の（ａ）のスリットの位置からのフルフィールドの（通常の）スペクトルライン映像を示している。概略図は赤色領域中における蛍光の最大を示しており、それはプローブ中の対応する構造にしたがって図の下部で著しい。図の中間部および上部において赤の蛍光は図２の（ａ）に基づいて変化したスペクトル特性が予期される幾何学的範囲にオーバーラップしている。このオーバーラップは通常の映像の減少した解像度を表している。

【００３７】

図２の（ｃ）は図２の（ｂ）と同じスリット位置の共焦点分光映像を示している。図の上部の部分では、図２の（ａ）の水平のラインが横切っている赤放射構造にしたがった赤の

蛍光を有する領域が図２の（ａ）の低い放射の“陰”から明瞭に分離されている。図２の（ｂ）のようなオーバーラップは完全に避けらる。これは映像のコントラストを改善しスペクトルの純度を高める本発明の本質的な効果を示している。

【００３８】

図２の（ｄ）は、共焦点（上）およびフルフィールド映像（下）に対する（集められた全部の光に対して正規化された）５４０ｎｍにおけるスリット軸に沿った強度分布の比較を示している。図２の（ａ）の構造によれば、より強い蛍光成分が強度曲線の最大を生成している。図２の（ｄ）の共焦点映像ではフルフィールド映像と比較された改良された背景排除を示している。

【００３９】

図２の（ｅ）および（ｆ）は、図２の（ａ）に示された各位置ｅ、ｆにおける蛍光スペクトルである。スペクトルは検出器の量子効率に関して正しくない。図２の（ｅ）（図２のｄと同様に正規化されている）は図２の（ａ）の“暗い”構造ｅに対応している。通常のスペクトルは構造ｅの周囲の放射により生じた比較的強い蛍光を示している。他方、共焦点スペクトルは、妨害放射が避けられるので抑制される。この結果、ほぼ３倍の背景抑制が得られる。図２の（ｆ）は、５４６ｎｍの強度に対して正規化されており、図２の（ａ）の構造ｆに対応するスペクトルを示している。スペクトルは隣接する黄色構造からの妨害が少ないことによって共焦点の場合には赤色の方向にシフトされる。

【００４０】

図３は、一体化された共焦点照明およびスペクトログラフを有する顕微鏡の別の実施形態を示している。ＣＳＩＳ300 は一体化された共焦点照明装置およびスペクトログラフを表している。

ＣＳＩＳ300 の光軸上において、プローブ34部分、光学系330aおよび330b、および映像スペクトログラフ354 を有する解析手段350 が配置されている。光学系330bはスペクトログラフの入口に光を結合するための歪像システムである。この歪像システムは単一光軸を選択的に縮小（圧縮）するための例えば円筒レンズのような部品を具備している。図１の実施形態と対照的にＳＬＭ320 はまた照明パターン（照明開口）および解析手段350 の入口スリット（検出開口）を同時に定めるように軸方向に配置されている。伝統的な映像スペクトログラフ354 のスリットは除去され、その代りに十分に開口されて、ＳＬＭの垂直イメージが図中でＶＳＬＭ（ＳＬＭのバーチャルイメージ）により示された入口平面355 において生成されることを可能にする。

【００４１】

光源手段310 からの照明光は励起フィルタ311 および照明レンズ331 を通り、顕微鏡の側部ポートおよびビーム分割器332 （例えば半鍍銀ミラー）を通ってＳＬＭ320 へ導かれる。ＳＬＭ320 は透過型の装置であり、それにおいて各素子は照明光を通過させるために透過度を変化させるように制御可能であり、プローブの励起後、検出光は映像光学系330 （チューブレンズおよび放射フィルタを含む）を通過し、検出カメラ356 を有するスペクトログラフ354 の入口平面355 に到達する。スペクトログラフ354 は焦点ミラーＦ１，Ｆ２および格子Ｇ1 を有するファスティ・エバート(Fastie-Ebert)設計のものとして示されているが、プリズム、ホログラフ格子、または音響・光可同調フィルタ（ＡＯＴＦ）を含む広い範囲の他の分散装置が使用可能である。

【００４２】

映像形成の手順は第１の実施形態について上述したように行われる。特に、ＳＬＭ320 は、例えば検査されるべき対象物がＳＬＭ素子のラインパターンまたは他の適切な照明パターンにより照明されるように制御される。

【００４３】

図３の装置は、図１のようにフルフィールド映像レグを形成するために第２のカメラを設けるように変更することができる。さらに、フィルタはＡＯＴＦに置換されてもよい。ＳＬＭパターンは上述のように任意の形態で選択されることができる。ビーム分割器332 はダイクロイックミラーを含むことができる。

【００４４】
ＳＬＭ320 はフォトリソグラフエッチングまたは写真フィルムにより生成された固定されたパターンを有するマスクであってもよい。照明および検出の両者に使用される符号化マスクは物理的移動またはマスク変換に適した支持体と組合わせてスペクトル映像形成のために必要な一連のパターンを発生させる。最も簡単な場合には、パターンは上方の挿入図の“フィールド１”で示されるようなラインパターンでありそれが順次シフトされてもよい。その代りに、１組の符号化パターン（例えばラインまたは穴またはさらに複雑なパターン）が下方の挿入図の“フィールド２”で示されるようにマスク上に形成されてもよい。“フィールド２”はアダマールパターンを近似した“様式化された”パターンを示している。この場合にデータが収集された後、アダマール変換がデータに適用されて映像が再生される。
【００４５】
図４に示される顕微鏡400 は、上記実施形態と類似した部品で構成されているが共通路二重反射構造を有している。光源手段410 からの照明光はビーム分割器432 およびミラー421 を介して上述のように制御されるＤＭＤ420 に向けられる。ＤＭＤ420 は対象物を照明し、放射された検出光は反射されて戻り解析手段450 に導かれる。付加的に、ＣＳＩＳ400 の分光計レグ、いわゆる映像レグ460 は検査される対象物の通常の映像および共焦点映像の少なくとも一方に対する部品を配置されることができる。映像形成は前記ヨーロッパ特許出願明細書に記載されたように実行される。
【００４６】
［スペクトルのプログラム可能な光源（ＰＬＳ）］
本発明の別の特徴である入射光の迅速なプログラム可能な成形に適しているスペクトルのプログラム可能な光源（ＰＬＳ）について説明する。このＰＬＳは、測定または表示のために照明の全範囲において上述の共焦点スペクトル映像技術および一般的な応用と組合わせる利点を有する。好ましい応用は、アダマールシーケンスにしたがったＰＬＳを残すスペクトルを変調することによる高いスループットの励起スペクトルの測定である。別の好ましい応用は、上述のような共焦点分光計システム（図６参照）中の部品（光源手段）としてのＰＬＳの使用である。
【００４７】
ＰＬＳは白色光または広い波長帯域の光源と、焦点を結ぶ光学系と、分散素子と、空間的光変調器と、分散波長を再結合する装置とを備えている。そのようなシステムの概略図が図５に示されている。光源510 は上述の空間的光変調器の表面上の分散素子（プリズムまたは格子装置または類似の分光計装置）515 により分散される。プリズム光学系は光効率を増加させるので好ましい。
【００４８】
空間的光変調器（上述のように構成される）は個々に制御可能な光変調素子を備えている透過型光変調器である。しかしながら、対応する反射型または回折型装置もまた可能である。透過型光変調器（ある外部形状を有する“窓”の形成）の位置選択的透過性、特に波長は光変調器を通過して例えば伝送された光線を再結合する装置に送られ、或いは直接プローブへ供給される。光変調器の選択透過性の外部形状は分散素子（例えばスリット）からの光出力の形状に適応されることができる。光変調素子は、光変調素子のグループが透過または反射され、および、または同時に吸収されて光出力の形状に対応する外部形状を形成する。この形状が例えばスリットまたはライン形状である場合には、光変調素子はラインとしてパターン化される。光変調器はダイナミックに制御され、波長特定光変調器出力は高速度で予め定められた時間パターンにしたがってその波長特性を変化する。
【００４９】
図示の場合に、再結合のための装置530 は積分球である。他の代りの装置はレンズ系により光を集めてそれを使用して並列モードで照明する（Kohler型照明）。それはTillota 等の文献（Applied spectroscopy,vol.41,1987,727～734 頁）に記載されているような１組の整合分散光学系を使用する。それは光ファイバまたは液体光導管を使用し、或いは散乱

表面（研磨ガラス）を使用している。

【００５０】

再結合のための装置を省略して、光変調器を通過した光が異なった波長を有する複雑なシフトパターンでプローブを照射するようにすることもできる。光変調素子は、透過または反射パターンがＳ型アダマールマトリックスの行および列に対応するように制御されることが好ましい。その代りに光変調素子は出力波長が予め定められた、例えば線形その他の関数にしたがった時間掃引にしたがうように制御される。

【００５１】

図５の下方部分は光変調器の効果を示している。入力スペクトル（下部左側）は本質的な“白色光”分布を示している。それに対して出力光（下部右側）は予め定められた形状を有している。形状は分散素子中の改造素子の数および分散の量によって制限される。

【００５２】

図６は、図１，３，４を参照に説明された共焦点分光計システムおよび図５を参照に説明された波長プログラム可能な光源（ＰＬＳ）の両者を組合わせたＣＳＩＳ600 を示している。対象物は複数のコード化マスク変調器611，620を通して照明されている。ＣＳＩＳ600 は固定された励起波長を選択するように、或いは励起波長を変調するように構成された第１の空間的光変調器611 を有するＰＬＳを光源として備えている。後者の励起波長を変調する場合には、励起波長は位置および例えばアダマールシーケンスにしたがったスペクトル解像された励起スペクトルを得るための適当なコードにしたがって変調される。ＣＳＳは上述のような照明パターンを形成するため第２の空間的光変調器を有している。

【図面の簡単な説明】

【図１】ＣＳＳを構成している本発明によるスペクトル映像ＣＳＩＳの第１の実施形態の概略図。

【図２】図１の装置により得られたスペクトル解像度測定の説明図。

【図３】本発明によるスペクトル映像ＣＳＩＳの第２の実施形態の概略図。

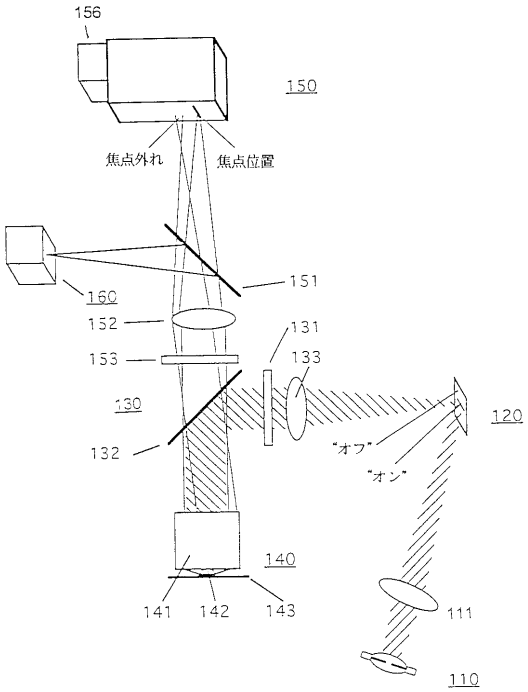
【図４】本発明によるスペクトル映像ＣＳＩＳの第３の実施形態の概略図。

【図５】本発明によるプログラム可能な光源の概略図。

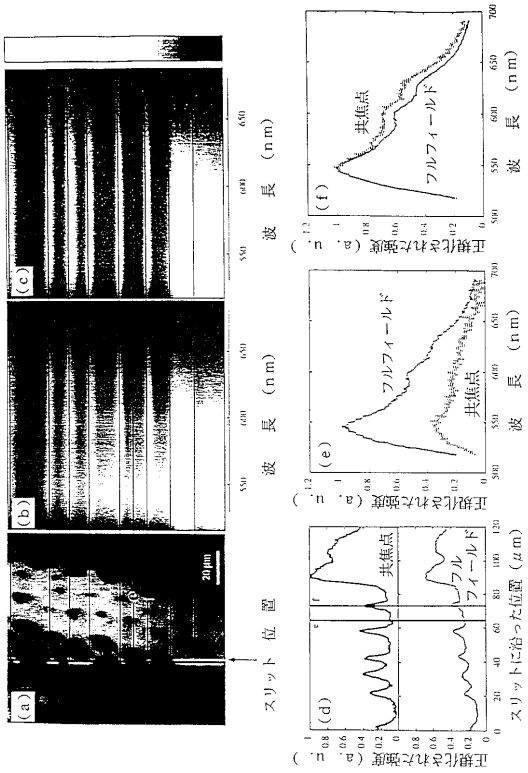
【図６】共焦点分光計システムおよびプログラム可能な光源の両者を備えた本発明によるＣＳＩＳの概略図。

【図７】従来技術による検出路中のプログラム可能でない光変調器マスクを使用するアダマール変換ラーマン顕微鏡の概略図。

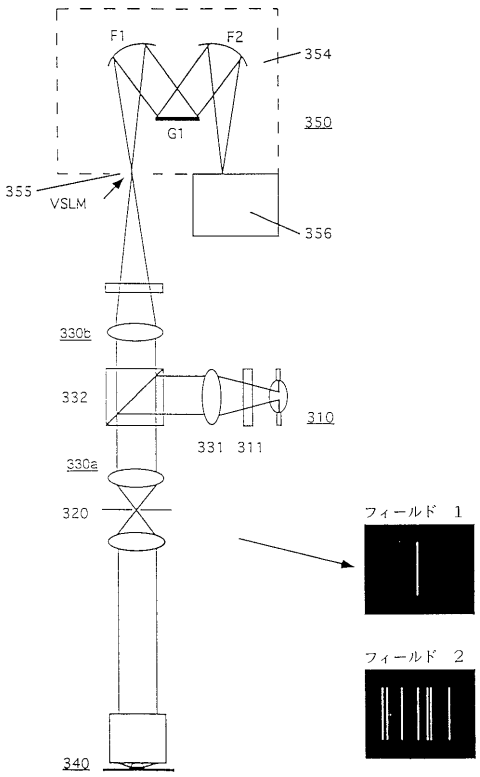
【図１】


156
150
焦点外れ
焦点位置
151
160
152
131
153
133
130
120
132
"オフ"
"オン"
140
141
142
143
111
110

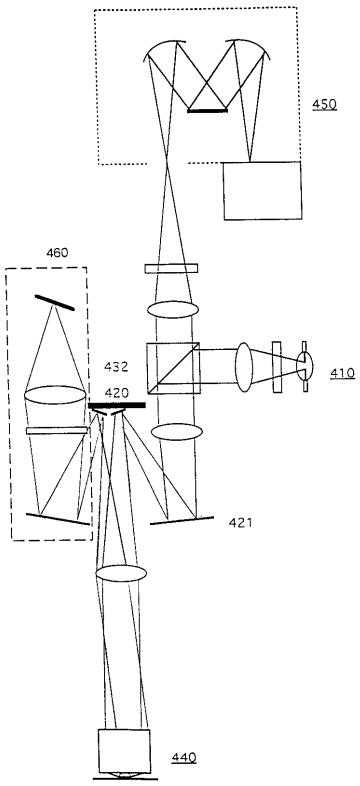
【図２】


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
20μm
スリット位置
波長（nm）
正規化された強度（a. u.）
スリットに沿った位置（μm）
共焦点
フルフィールド

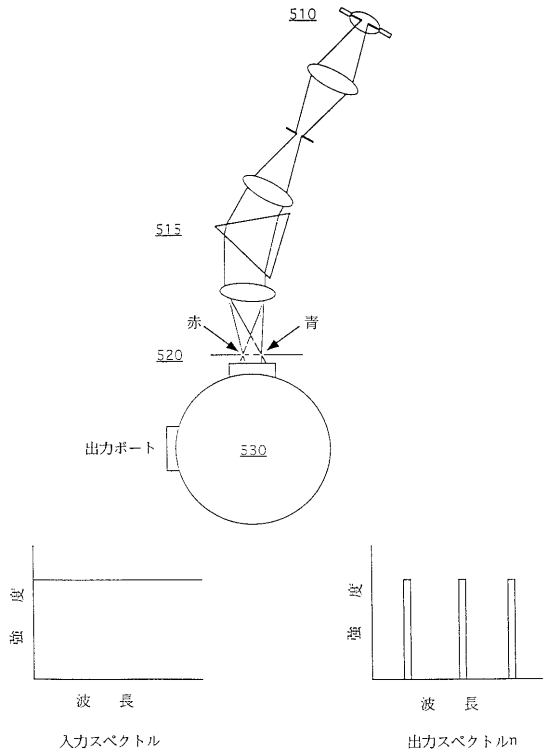
【図３】


F1
F2
354
350
G1
355
VSLM
356
330b
332
310
331
311
330a
320
フィールド 1
フィールド 2
340

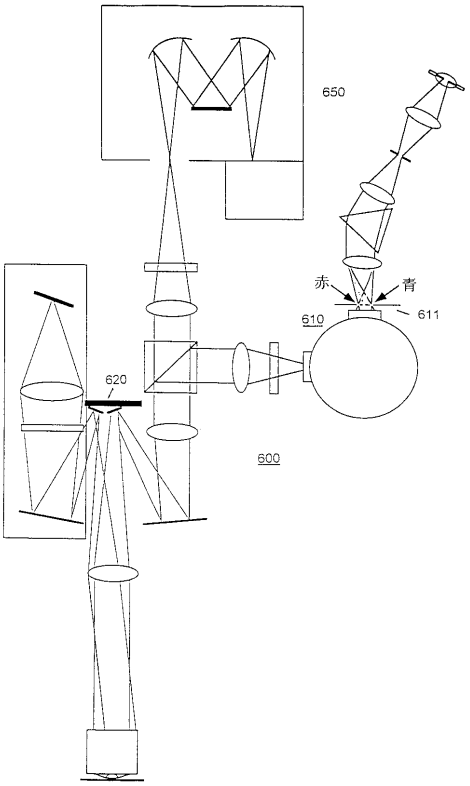
【図４】


450
460
432
420
410
421
440

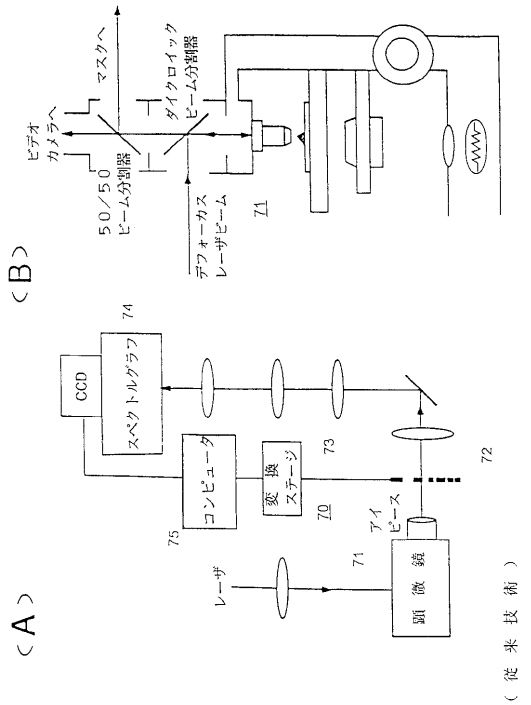
【図５】


510
515
赤
青
520
出力ポート
530
強度
波長
入力スペクトル
強度
波長
出力スペクトルn

【図６】


650
赤
青
610
611
620
600

【図７】


(B)
マスクへ
ダイクロイック
ビーム分割器
ビデオ
カメラへ
50/50
ビーム分割器
デフォーカス
レーザビーム
71
(A)
74
CCD
スペクトルグラフ
コンピュータ
変換
ステージ
73
72
70
アイ
ピース
75
レーザ
71
顕微鏡
(従来技術)

フロントページの続き

(74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎
(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
(74)代理人 100100952
弁理士 風間 鉄也
(72)発明者 トーマス・エム・ヨフィン
ドイツ連邦共和国、３７０７７ ゲッチンゲン、ツア・アケライ １７
(72)発明者 クアンティン・ハンレー
ドイツ連邦共和国、３７０７３ ゲッチンゲン、シュトゥンプフェビール ６
(72)発明者 ペーター・フェアフィール
ドイツ連邦共和国、３７０７３ ゲッチンゲン、ランゲ・ガイズマーシュトラーセ ４０

合議体
審判長 北川 清伸
審判官 伊藤 幸仙
審判官 村田 尚英

(56)参考文献 米国特許第５５８７８３２（ＵＳ，Ａ）
特開平５－１４２１４４（ＪＰ，Ａ）
特表２０００－５０４８５８（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５２１２０５（ＪＰ，Ａ）
特開平３－１３４６０８（ＪＰ，Ａ）
特開平５－２１００５１（ＪＰ，Ａ）
特開平４－２６５９１８（ＪＰ，Ａ）
特開平５－１４２１４４（ＪＰ，Ａ）
特開平８－１６０３０６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G02B 21/00