

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5826494号
(P5826494)

(45) 発行日 平成27年12月2日(2015. 12. 2)

(24) 登録日 平成27年10月23日(2015. 10. 23)

(51) Int. Cl.

F 1

G O 2 B 21/06 (2006. 01)

G O 2 B 21/06

G O 1 N 21/64 (2006. 01)

G O 1 N 21/64

E

G O 1 N 21/64

F

請求項の数 33 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2010-546236 (P2010-546236)
 (86) (22) 出願日 平成21年2月3日(2009. 2. 3)
 (65) 公表番号 特表2011-511966 (P2011-511966A)
 (43) 公表日 平成23年4月14日(2011. 4. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/000677
 (87) 国際公開番号 W02009/100830
 (87) 国際公開日 平成21年8月20日(2009. 8. 20)
 審査請求日 平成24年1月20日(2012. 1. 20)
 (31) 優先権主張番号 102008009216. 9
 (32) 優先日 平成20年2月13日(2008. 2. 13)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

前置審査

(73) 特許権者 506151659
 カール ツァイス マイクロスコピー ゲ
 ーエムペーハー
 CARL ZEISS MICROSCO
 PY GMBH
 ドイツ連邦共和国 07745 イェナ
 カールツァイスプロメナーデ 10
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料の構造を空間的に高分解能で結像するための装置および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料内において異なる状態間で切替可能な複数の色素分子(UF)を検査する顕微鏡であって、前記状態の少なくとも1つが蛍光状態であり、各色素分子は、光活性化によって変化する蛍光特性を有し、

前記試料の上に配置され、蛍光を収集するように構成された対物レンズ(O)と、

位置分解能のある検出器上に前記蛍光を前記対物レンズによって結像するように構成された光学システムと、

前記試料内における第1の部分量のUFを切り替えるための切替ビームを放射し、該第1の部分量のUFを蛍光へ励起するための励起ビームを放射するための、1つまたは複数の光源であって、該切り替えが、色素分子の光活性化または光非活性化である、前記1つまたは複数の光源と

を備え、

切替用の光源および励起用の光源のうちの少なくとも1つが、前記対物レンズの光軸に対して少なくともほぼ垂直な方向に前記試料を透過するように放射するように配置されており、

少なくとも1つの方向へ照明方向に延在するライン状の照明領域を生成するために、前記光源のための集束装置が設けられ、

前記集束装置により生成された平坦なシート光が実質的に前記対物レンズの焦点面内にあり、

10

20

切替ビームの放射が前記シート光によって行なわれ、かつ蛍光励起が前記対物レンズによって前記焦点面内において行なわれるか、または

切替ビームの放射が前記対物レンズによって行なわれ、かつ蛍光励起が前記シート光によって前記焦点面内において行なわれることを特徴とする顕微鏡。

【請求項 2】

蛍光状態にある前記色素分子の分布密度が、前記装置の回折の制限された分解能体積の逆数よりも小さいことを保証するために、前記切替ビームをコントロールするための制御ユニットが設けられている、請求項 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 3】

切替用の光源および励起用の光源の少なくとも一方に対して、照明領域を生じさせる集束装置が設けられており、該照明領域は、照明方向に延びており、対物レンズの光軸に対して少なくとも近似的に垂直な少なくとも 1 つの方向で線形である、請求項 1 または 2 に記載の顕微鏡。

10

【請求項 4】

平坦なシート光が集束装置により生成され、該シート光は試料を透過し、対物レンズの光軸に対して少なくとも近似的に垂直である、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 5】

前記集束装置が、非点収差光学系および非球形光学系の少なくとも一方である、請求項 4 に記載の顕微鏡。

20

【請求項 6】

切替および励起のために使用される光源が、波長が切替可能な 1 つの光源にまとめられている、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 7】

切替および励起のために使用される光源が、同じ波長を有する、請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 8】

1 つの波長を有する異なる光源が、切替および励起のために設けられている、請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 9】

異なる方向から励起すること、および切り替えることの少なくとも一方のために複数の光源が設けられている、請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

30

【請求項 10】

互いに対向する 2 つの光源が設けられている、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 11】

異なる方向から入射する少なくとも 3 つの光源が設けられている、請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 12】

複数の光源が、1 つの光源の光を分割することによって形成される、請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

40

【請求項 13】

干渉を生じさせるための複数の光源が、同じ波長を有する、請求項 1 乃至 12 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの光源が側方から入射され、検出方向でパターン化を生じさせる適切な光学的手段が設けられている、請求項 1 乃至 13 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡。

【請求項 15】

試料の構造を空間的に高分解能で結像する方法であって、試料は、光活性化によって変化する蛍光特性を有する分子を含み、

50

切替信号により、第 1 の状態から第 2 の状態へ少なくとも一度移行可能である、試料における一部の分子を選択するステップと、

該切替信号により該一部の分子を第 2 の状態へ移行させるステップであって、該切替が、切り替えられた分子間の間隔が顕微鏡の回折制限された光学的分解能以上になるように行われ、前記第 2 の状態への移行が、光活性化によって行われる、前記移行させるステップと、

第 2 の状態に移行した該一部の分子を蛍光励起し、分子を位置分解能のある検出器により位置特定するステップと、

第 2 の状態にある分子から発する光学的測定信号を、対物レンズを介して検出器により空間的に分解して記録するステップとを含み、

少なくとも該第 2 の状態への移行および該蛍光励起の少なくとも一方が、検出方向および対物レンズの光軸の少なくとも一方に対して少なくとも近似的に垂直であり、

前記第 2 の状態への移行がシート光によって行なわれ、かつ蛍光励起が前記対物レンズによって前記対物レンズの焦点面内において行なわれるか、または

前記第 2 の状態への移行が前記対物レンズによって行なわれ、かつ蛍光励起が前記シート光によって前記対物レンズの焦点面内において行なわれる方法。

【請求項 1 6】

第 2 の状態から第 1 の状態への分子の非活性化が行われる、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

第 2 の状態に移行させるための光源および蛍光励起するための光源の少なくとも一方について、照明方向に、少なくとも 1 つの方向で線形に延びる照明領域を集束することによって

行われる、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

照明領域が、対物レンズの視野内に線形の光分布を表す、請求項 1 5 乃至 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

照明領域が、対物レンズの視野内での平坦なシート光である、請求項 1 5 乃至 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

少なくとも、光活性化および蛍光励起の少なくとも一方が、蛍光検出方向に対して垂直に行われる、請求項 1 5 乃至 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

1 . 分子の蛍光特性を変化させることによって個別の分子が光活性化され、ここで該活性化は、活性化された分子間の間隔が顕微鏡の光学的分解能以上になるように行われ、

2 . 活性化された分子が励起され、位置分解能のある検出器により分子の位置が特定され、

3 . 活性化された分子が非活性化され、

4 . 該ステップ 1 から 3 が繰り返され、ここで検出画像の重畳によって 1 つの高分解能画像に統合する、請求項 1 5 乃至 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

1 . 少なくとも 1 つのシート光を介して、分子の蛍光特性を変化させることによって個別の分子が光活性化され、

2 . 活性化された分子の層が、z 方向では、検出光学系のアップの分解能または照明光学系の開口数に相当するよりも小さくなるように z 方向にパターン化されたシート光を用いて分子が非活性化され、

3 . 活性化された分子が励起され、位置分解能のある検出器により分子の位置が特定され、

4 . 活性化された分子が非活性化され、

5 . 該ステップ 1 から 4 が繰り返され、ここで検出画像の重畳によって 1 つの高分解能画

10

20

30

40

50

像に統合する、請求項 1 5 乃至 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

試料領域の活性化および励起の少なくとも一方が、片側から行われる、請求項 1 5 乃至 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

試料領域の活性化および励起の少なくとも一方が、両側から行われる、請求項 1 5 乃至 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

試料領域の活性化および励起の少なくとも一方が、2 つを超える側、好ましくは 3 つの側から行われる、請求項 1 5 乃至 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 2 6】

干渉を生じさせるための複数の光源が、同じ波長を有する、請求項 1 5 乃至 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

2 つの光源および干渉によって、縞パターンが試料中に生成される、請求項 1 5 乃至 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

少なくとも 3 つの光源および干渉によって、点パターンが試料中に生成される、請求項 1 5 乃至 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

20

複数の光源が、1 つの光源の光を分割することにより形成される、請求項 1 5 乃至 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

励起光がパターン化されている、請求項 1 5 乃至 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

励起ビーム路中に配置された格子によって前記パターン化がもたらされる、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

励起光が点分布（マルチスポット）を有する、請求項 1 5 乃至 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

活性化光が、変調された走査運動または格子結像により点分布を示す、請求項 1 5 乃至 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、試料の構造を空間的に高分解能で結像するための装置および方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

いわゆる S P I M 技法 (S e l e c t i v e - P l a n e - I l l u m i n a t i o n - M i c r o s c o p y : 選択的平面照明顕微鏡) は、例えばステルツァーら (非特許文献 1、2、特許文献 1、2 参照) に顕微鏡法として記載されている。

40

【0 0 0 3】

共焦点レーザ走査顕微鏡と同じように、S P I M は、広視野技術として、3 D 対象物を光学的断面の形で記録することができる。その利点はとりわけ、速度、試料の退色の少ないこと、ならびに浸透深度の拡大に見られる。通常はそのために、試料中の蛍光体を、シート光の形のレーザ光によって励起させる。このシート光を、試料を通して走査することができる。

【0 0 0 4】

種々異なる角度から記録された画像を (コンピュータで) 組み合わせることによって、

50

ボール状の P S F を形成することができる。通常、その拡がり、使用される検出対物レンズの横方向分解能によって決まるが、この横方向分解能が全体として、従来の S P I M 法では、達成可能な光学的分解能を制限する。

【 0 0 0 5 】

非特許文献 3 には、周期的な構造をもたせたシート光による S P I M 法が記載されている。周期的な構造をもたせたシート光によって、強度の高い個所で蛍光励起が行われる。この構造化は、焦点のずれた平面からの散乱光を抑制し、構造化された照明により分解能を向上させるために使用される（後の非特許文献 8 を参照のこと）。

【 0 0 0 6 】

特許文献 3 には、いわゆる P A L M 法 (p h o t o a c t i v a t e d l i g h t m i c r o s c o p y : 光活性化光学顕微鏡法) が記載されている。この方法は、検出 P S F の拡がりにしたがって互いに分離された個々の分子の光活性化と、蛍光検出によるその分子の高精度の位置特定に基づくものである。

【 0 0 0 7 】

P A L M 法は、特許文献 3 に記載のように、従来の顕微鏡と比べて高い光学的分解能をもつ顕微鏡画像を形成するために、実質的に以下の基本ステップを使用する。

- 1 .) 個々の分子の光活性化：活性化によって分子の蛍光特性が変化する（オン / オフ、発光スペクトルの変化）。その際、活性化は、活性化された分子間の間隔が、基準顕微鏡の（アップの分解能限界によって与えられる）光学的分解能以上になるように行われる。
- 2 .) 活性化された分子の励起と、位置分解能のある検出器による分子の位置特定。
- 3 .) 活性化された分子の非活性化。
- 4 .) ステップ 1 ~ 3 を繰り返し、異なる反復ステップから得られた、ステップ 2 .) からの位置特定された点を重畳して 1 つの高分解能画像にする。

【 0 0 0 8 】

活性化は好ましくは広視野照明で、ランダムに分散させて行う。活性化エネルギーを選択することにより、重なったエアリーディスク (2) を有する分子 (1) が、カメラ上にできるだけ少数しか / まったく発生しないように試みる（図 1 a 参照）。しかし重なったエアリーディスクは甘んじて受け入れるしかないが、評価することができない（図 1 b の (3) ）。これによって、活性化された分子の間隔が、カメラ上のエアリーディスクより大きい、または非常に大きい領域が発生する (4) 。分子をランダムに活性化することにより、分子の位置を特定するために高分解能の画像を生成するには約 1 0 0 0 0 の個別画像を評価しなければならない。そのため大きなデータ量を処理しなければならない、測定が遅くなる（高分解能画像 1 つ当たり約 1 分）。個別画像を計算処理して 1 つの高分解能画像にするには、約 4 時間が必要である。

【 0 0 0 9 】

P A L M 法を 3 D 画像に適用するのは困難である。なぜなら焦点面の外側の分子も活性化され、したがって退色するが、その蛍光が画像形成の際に使用できないからである。とりわけ生体試料の場合は、集束コーン全体内で自己蛍光が励起され、この自己蛍光はノイズ信号として評価され、コントラストを極端に低下させる。これにより z 方向走査の記録が妨げられ、そのため試料の 3 D 画像を獲得することができない。

【 0 0 1 0 】

焦点面の外での光活性化と、障害となる自己蛍光を回避するために、特許文献 3 には多光子励起を使用することが記載されている。しかしこの構成は技術的に面倒である。例えば色素 (P A - G F P) が非線形に活性化可能でなければならず、また色素の損傷または試料の損傷を引き起こしかねないほどの高い強度を使用しなければならない。

【 0 0 1 1 】

自己蛍光の問題を回避するために使用される別の方法は、P A L M 法と T I R F 技法との組合せである。ここでは z 方向の励起体積が、エバネッセント波のみに制限することで非常に小さく維持される。ただし T I R F を用いると、3 D 画像を形成することはできない。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

基本的に P A L M は、位置分解能のある検出によって、さしあたり横方向分解能の改善しか提供しない。軸方向分解能は、まず第 1 に使用される検出 P S F の拡がりによって決まる。これが、P A L M と T I R F 技法を組み合わせるさらに別の理由であり、この組合せは高い軸方向分解能を提供する（特許文献 3 も参照）。

【 0 0 1 3 】

P A L M の他にも、アッペの回折限界に相当するよりも小さい、蛍光によって検出可能な領域が発生するように試料を照明する、分解能を高める別の方法が公知である。

このことは、種々の方法による非線形の相互作用によって達成される。

・前もって励起された分子を誘導発光により脱励起する（S T E D、非特許文献 4 参照）
 ・前もって励起された分子をさらなる励起によってより高い蛍光不能状態に脱励起する（励起状態吸収（Excited State Absorption））、非特許文献 5 参照）。

・三重項占有により基底状態を空にする（基底状態の空乏化（Ground State Depletion）、非特許文献 6 参照）

・色素を、蛍光状態と、非蛍光状態、さほど蛍光しない状態、または他の特徴付けられた蛍光状態（別の発光波長、偏光）との間で切り替える（非特許文献 7 参照）

この場合、通例、高速のデータ記録には欠点がある点走査法が問題になる。加えて、焦点外の領域にある試料に不必要な負荷がかかる。

【 0 0 1 4 】

非特許文献 8 には、分解能向上のための別のコンセプトとして、蛍光遷移を直接飽和させる形の非線形プロセスが提案されている。この場合、分解能の向上は、周期的な格子状の構造の照明により試料を照明することに基づくものである。これにより高い物体空間周波数が、顕微鏡の光学的伝達関数の範囲内に変換される。この変換は、データの理論的後処理によって間接的に後付けることができる。この方法でも、構造化された照明が試料空間全体を通過するので、焦点外の領域にある試料に不必要な負荷がかかることが欠点と見なすべきである。さらにこの方法は現在のところ、厚い試料に使用することができない。なぜなら、焦点外で励起された蛍光がバックグランド信号としてともに検出器に達し、したがってダイナミックレンジを低下させるからである。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 5 】

【特許文献 1】ドイツ特許出願公開第 1 0 2 5 7 4 2 3 号明細書

【特許文献 2】国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 3 0 5 5 8 号パンフレット

【特許文献 3】国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 7 6 9 2 号パンフレット

【特許文献 4】ドイツ特許第 1 0 2 0 0 6 0 1 7 8 4 1 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 1 6 】

【非特許文献 1】ステルツァーら（S t e l z e r e t a l . ）、O p t i c s L e t t e r s 3 1、1 4 7 7（2 0 0 6）

【非特許文献 2】ステルツァーら（S t e l z e r e t a l . ）、S c i e n c e 3 0 5、1 0 0 7（2 0 0 4）

【非特許文献 3】ブロイニンガーら（B r e u n i n g e r e t a l . ）、O p t i c s L e t t e r s V o l . 3 2、N o . 1 3、2 0 0 7

【非特許文献 4】クラールおよびヘル（K l a r a n d H e l l ）、O p t . L e t t . 2 4（1 9 9 9）9 5 4 ~ 9 5 6

【非特許文献 5】ワタナベら（W a t a n a b e e t a l . ）、O p t i c s E x p r e s s 1 1（2 0 0 3）3 2 7 1

【非特許文献 6】ヘルおよびクロウグ（H e l l a n d K r o u g ）、A p p l . P h y s . B 6 0（1 9 9 5）、4 9 5 ~ 4 9 7

【非特許文献7】ヘル、ジャコブスおよびカストルップ (H e l l、J a k o b s a n d K a s t r u p)、A p p l . P h y s . A 7 7 (2 0 0 3) 8 5 9 ~ 8 6 0

【非特許文献8】ハインツマンら (R . H e i n t z m a n n、T . M . J o v i n a n d C . C r e m e r)、J O S A A 1 9、1 5 9 9 - 1 6 0 9 (2 0 0 2)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の課題は、上記方法の欠点を回避することである。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明は、高い画像速度を実現するために最適化された光活性化を用いてPALM顕微鏡法を実現する方法および装置を記述する。PALMと比較して、3D画像形成による高分解能が、非線形の光活性化なしで達成される。焦点外の自己蛍光を低減するためのPALM-TIRFの組合せは、必要ない。

【0019】

比較的高い浸透深度と、x、y、zでの等方性の光学的分解能を達成するために、マルチビュー法（試料上での複数の照明角度）を有利に使用することができる。

できるだけ多数の分子が「隙間」（図1bの（4））なく、分子のエアリーディスクがカメラ上で重なることなく（図1bの（3））図2に対応して活性化される。個別分子のエアリーディスクを互いに接して配置すると、有利には球の密な充填が得られる。

【0020】

これによってPALM法の速度が上昇し、個別画像の数の低減が達成される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】従来のPALM法における分子活性化を示す図である。

【図2】本願発明の分子活性化を示す図である。

【図3】z方向における局在化された活性化のための構成を示す図である。

【図4】x、z方向における局在化された活性化のための構造化された活性化を示す図である。

【図5】x、y、z方向における局在化された活性化のための球の最密充填における活性化を示す図である。

【図6】z方向における局在化された活性化とゼロ位置を有する非活性化のための構成を示す図である。

【図7】本願発明の光学的実施形態を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明の装置、その作用、ならびに利点を、図3～7に基づいてより詳しく説明する。

本発明によれば有利には、驚くほど有利にSPIM法をPALM法と結び付けることが提案される。

【0023】

図3は、平坦なシート光LB（円盤光とも称される）を概略的に側面から（照射方向と観察方向が等しい）示す。このシート光は、例えば円柱レンズ（O2-ZL）によって生成され、試料（P）を通過する。

【0024】

試料の上方には、顕微鏡、例えばCCDカメラを備える広視野顕微鏡、レーザ走査顕微鏡、または構造化された照明を用いる顕微鏡の対物レンズOがある。

試料に側方からSPIMシート光の形で入射するシート光LBによって、図3において、蛍光励起および蛍光検出の光軸に対して垂直に光活性化が行われる。このシート光は、実質的にちょうど対物レンズOの焦点面（F）内にある。ここで蛍光励起は、焦点面（F）内だけで起こり得る。蛍光励起および蛍光検出は、（特許文献3参照）によれば、顕微

10

20

30

40

50

鏡対物レンズOを介して行われる。したがって、局在化された励起がz方向で行われ、非線形の光活性化がなくても、試料を3次元でPALM法により探查することができる。

【0025】

光活性化のための光ビームの幅、すなわちそのz方向の拡がり、有利には、対物レンズOの開口数によって規定されるPSFの軸方向拡がり以下となるように適合されている。これによって有利には、焦点面の外で蛍光分子が活性化され退色するのが回避される。加えて、活性化ビームによって規定されるこの平面からしか、蛍光が出現し得ない。したがってこの装置は、内在的に3D分解能がよい。

【0026】

検出は、従来の手段により、例えば従来からの広視野顕微鏡、共焦点顕微鏡、または構造化された照明(ZEISS APO TOM)によって行われる。

ただしこの場合は、励起ビームが試料空間全体にわたり自己蛍光を励起してしまうという問題がある。このことは、図3において蛍光を励起するための光ビームに加えて(光活性化の後に)、シート光(LB)を検出方向に対して垂直に、O2-ZLを介して入射することにより防止される。これによって、画像形成を妨げる作用をする、焦点外の自己蛍光信号が発生しないことが保証される。加えて、励起光から特に効率的に分離して蛍光を検出することができる。なぜならダイクロイックビームスプリッタを用いたスペクトル分離が必要ないからである。いくつかの切替可能な色素、例えばDENTRAの場合、光活性化と蛍光励起が同じ波長により行われる。これは、この方法で特に簡単に実現できる。

【0027】

さらに、光活性化が対物レンズOを介して行われ、蛍光励起が側方から入射されるシート光O2を介して行われる装置も考えられる。やはり対物レンズOが検出に用いられる。この場合も、焦点外の自己蛍光が回避される。活性化ビームにより発生する焦点外の自己蛍光は、スペクトルの、それも特に時間的に(蛍光励起は活性化の後に行われる)、本来の対象となる蛍光信号から分離される。

【0028】

この方法の問題は、焦点外で活性化された分子が発生することである。したがってこの方法では有利には、一画像面を記録した後で、試料領域全体にわたり例えば広帯域照明によって非活性化できる、分子が使用される。

【0029】

高分解能画像の記録は、本発明の装置においては、(特許文献3参照)に記載のように上記のステップ1~4により行われる。活性化可能な蛍光色素として、有利には、従来技術から公知の蛍光性タンパク質、例えばPA-GFPまたはDRONPAも使用される。この際、光活性化は405nmで、蛍光励起は488nmで、領域中の検出は490nm超より上で行われる。さらに、可逆的に切替可能な合成色素、例えばAlexa/Cyan構造体を使用することもできる。

【0030】

図4aには、2つのシート光LB1とLB2によって照明を行う本発明による別の装置が概略的に示されている。シート光を複数の方向から(ただし検出によって規定される焦点面内で)干渉計で重畳することによって、図示のx方向に沿って焦点面内に干渉パターンが発生する。シート光はまた、光活性化および蛍光励起の少なくとも一方のためのレーザ光を含むことができる。重畳によっていわゆる定在波場(Stehwellenfeld: SW)が生成され、これが図4bに縞パターンとして概略的に示されている。例えば2つのシート光を光活性化のために使用する場合、活性化すべき蛍光発光体の間隔が、検出のPSFの幅(図4aのO)以上となることを達成することができる。これによって有利には、x方向に沿って空間的に重畳され、さらにz方向で焦点面Fの個所に局在する蛍光発光体が発生しなくなる。検出は、図3による装置と同様に行われる。強度の最小点にある試料を照明するために定在波場を焦点面内でずらすことは、2つのシート光間の相対位相を、例えば位相変調器(Phasenmodulator: PH)により調整することによって行われる。

10

20

30

40

50

【0031】

2つのビームを使用する場合、干渉により、縞状の、 x および z 方向に局在する活性化が生じる。2つを超える、有利には3つのシート光 $L B 1 \sim L B 3$ （角度 120° ）が入射する場合、図5に示すような点パターン $P M$ 、すなわち x 、 z および y 方向に局在する活性化が生じ、したがって活性化された蛍光放射体の間隔（1）は、検出の $P S F$ の幅（図4aの O ）以上となる。蛍光励起は有利には、1つまたは複数のシート光を介しても行われ、これによりやはり焦点外の自己蛍光が回避される。

【0032】

図4aで方向 O からの蛍光励起も1つまたは複数の方向で構造化することができ、例えば1つのホールパターン（ x および y 方向での構造化）を有することもできる。これによって、蛍光発光体の間隔が検出の $P S F$ の幅以上になることを保証することができる。この種の構造化は、例えば格子構造（ドイツ特許出願公開第10257237号明細書）により、またはマルチスポット励起（特許文献4参照）により行うことができる。

10

【0033】

さらに光活性化は対物レンズ O を介して行うことができ、蛍光励起を複数の円盤光ビームにより実現することができる。これらの円盤光ビームは、上記の形式の干渉パターンを生じさせる。したがって、重なり合うエアリーディスクによって活性化された分子は、異なる強さで励起される。このようにしてカメラ画像中の隙間も回避される。活性化ビームにより発生した自己蛍光は、時間的および/または空間的に分離される。一平面を記録した後、3D記録のために、試料領域全体にわたり非活性化を行わなければならない。

20

【0034】

光活性化が対物レンズ O により行われる場合は、構造化された活性化を（例えば上に述べたような格子の）特別な結像によって、またはスキャンメカニズムによって実現することができる。そのために光ビームで例えば画像野を走査することができ、その強度を、運動中に例えば高速の $A O T F$ によって、活性化パターンが例えば図5に対応して焦点面内に発生するように変化させる。ただしこの方法では、焦点面の外の分子も活性化される。横方向のシート光蛍光励起によって、それでも焦点面からの蛍光だけが検出されることを保証することができる。ただし一平面を記録した後、3D記録のためには、試料領域全体にわたって非活性化を行わなければならない。活性化ビームの強度は理想的には、活性化スポット（ほぼ $P S F$ の大きさに相当する）当たり統計的平均で1つの分子だけが励起されるように選択される。このようにして、重なり合うエアリーディスクにより、2つの分子が同時に活性化される可能性が低減される。画像記録中に、すべての分子を均等に活性化するために、もちろん活性化パターンの位相をずらさなければならない。活性化ビームにより発生した自己蛍光は、時間的および/または空間的に分離される。しかし通常は、活性化強度は小さく、したがって自己蛍光は何の役割も果たさないはずである。

30

【0035】

ここで、光活性化ビームと蛍光励起ビームを交換することができる。そのことの利点は、焦点面の外で光活性化が生じないことである。そのために、活性化は、構造化せずにシート光を介して、励起は、 $P S F$ に同調して構造化して対物レンズを介して実行することができる。したがって、重なり合うエアリーディスクによって活性化された分子は、異なる強さで励起される。またこのようにしてカメラ画像中の隙間を回避することができる。ただしこの場合、焦点外での自己蛍光の問題が生じる。

40

【0036】

説明したすべての変形形態における1つの問題は、 $S P I M$ 法では一般に使用されるシート光の幅によって決定される軸方向分解能である。シート光を生成するために使用される $N A$ は、検出対物レンズの $N A$ よりも通常は格段に小さいため、システム $P S F$ が非常に細長くなるという問題が直接的に発生する（横方向の拡がりには $P A L M$ 法の分解能（ナノメートル範囲）によって決まり、軸方向の拡がりにはシート光の幅（マイクロメートル範囲）によって決まる）。このことは、3D結像の場合に欠点となる。従来技術から公知のマルチビュー技法（異なる角度から積層体を記録する）を用いることによってこの問題を

50

回避することができ、横方向のPALM分解能に対応する、効果的で十分に均等な空間的分解能を生じさせることができる。

【0037】

光活性化された分子が、活性化のために使用されるシート光の縁部領域で、別の構造化されたシート光によって非線形の相互作用という意味で、再び非活性化されて、より高いz方向分解能が達成されると特に有利であることが判明した。これは、上記の方法の1つ、好ましくは切替法により行うことができる。非活性化ビームとしては、観察される画像領域の範囲全体にわたって、焦点面にゼロ位置を有するように構造化されたシート光を使用することもできる。これは図6に示されている。ここでシート光ビームの瞳強度分布(I)は、適切な光学系により(例えばパウエル・レンズにより)前もって形成されたラインに相当する。瞳内には、ラインの半分にわたって位相跳躍を生じさせる領域(III)を有する、位相プレート(II)が取り付けられている。xy平面内に広がるシート光(V)が、適切な光学系(IV)によって生成される。照明光学系(IV)の被写界深度の範囲内に、検出光学系(VII)の焦点面に対して平行なゼロ位置平面(VI)が生じ、このゼロ位置平面内では分子が脱励起されない。STED様の方法に対応して、これにより、シート光の軸方向拡がり、光活性化された分子により非線形に強く制限することができ、軸方向分解能を改善することができる。

10

【0038】

図7は、(x方向に構造化された)シート光によって光活性化/光非活性化を行い、CCD広視野検出を行う、前述の有利な方法および適用例を使用するための、一般的な光学的实施形態を示す。

20

【0039】

試料は例えばDronpaでマーキングされており、405nmでスイッチオン(活性化)し、488nmで励起または再スイッチオフすることができる。

405nm(光活性化)および488nm(蛍光励起および光非活性化)用のレーザー(1)が設けられており、ビーム結合器(2)とダイクロイックミラーによって1つにまとめられる。光非活性化と蛍光励起用に、上にDENTRAの例で説明したように1つの同じ波長を使用することもできる。これにより1つのレーザー(この場合は405nm)とビーム結合器(2)を省略することができる。

【0040】

30

AOTF(3)が、波長選択と、レーザー波長の高速の切替/減衰のために用いられる。AOTFの照明方向で下流側に、好ましくは、回転可能な/2プレート(4)と、2チャンネルのためのファイバ結合部を備えるポルスプリッタ(PBS)(5)とが配置されている。/2プレートを回転することにより、両方のチャンネルにおける出力を調整することができる。

【0041】

シングルモードファイバ(6)を経由して、光は、シート光を生成するための円筒光学系(7)と結像光学系(8)を通り、光活性化(または非活性化または励起)のためのビーム路(10)またはビーム路(11)を経て、試料(12)に入射する。図4による焦点面(x構造化)にゼロ位置を生じさせるために、光波長が相応に適合される。強度の最小点にある試料を照明するために定在波場を焦点面内でずらすことは、2つのシート光間の相対位相を、例えば位相変調器(PH)により調整することによって行われる。

40

【0042】

試料(12)内で生成された光は、検出光学系(13)(顕微鏡対物レンズ)を通り、検出ビーム路(14)内を鏡筒レンズ(15)と放射フィルタ(16)を経由して、CCDカメラによって検出される。検出ビーム路内には、蛍光励起が検出光学系によって行われる場合にレーザー(22)または広視野光源(23)を入力反射するための、オプションとしての(旋回可能な)カラープリッタ(18)が破線で示されている。レーザーと広視野光源の間の選択は、オプションとして旋回可能なミラー(20)を用いて行うことができる。レーザー(22)または広視野光源(23)は活性化のためにも使用することができ

50

る。この場合、D R O N P A が色素として使用されるなら、4 8 8 n m の波長の代わりに 4 0 5 n m の波長を用意すべきである。とりわけレーザビーム路 (2 2) には、画像野を点で走査することのできるスキャナユニット (2 1) が設けられている。スキャナユニット (2 1) とカラースプリッタ (1 8) との間に、このために適合された結像光学系 (1 9) が設けられている。

【 0 0 4 3 】

図 6 に関して上記で述べたシート光の z 構造化のために、位相プレート (9) を照明ビーム路内に取り付けることができる。

【 図 1 】

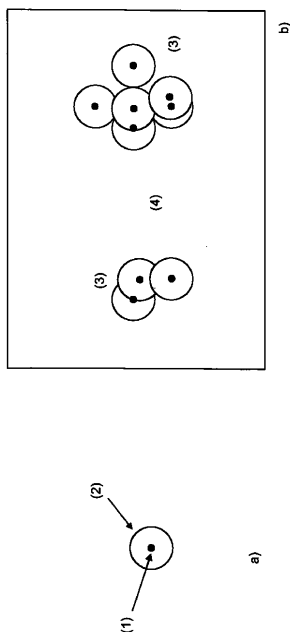
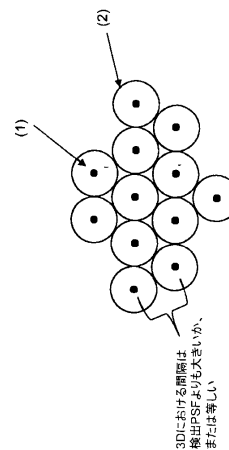
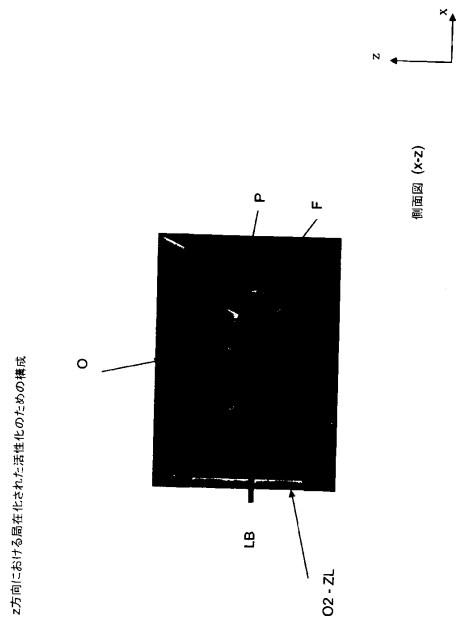


Fig.

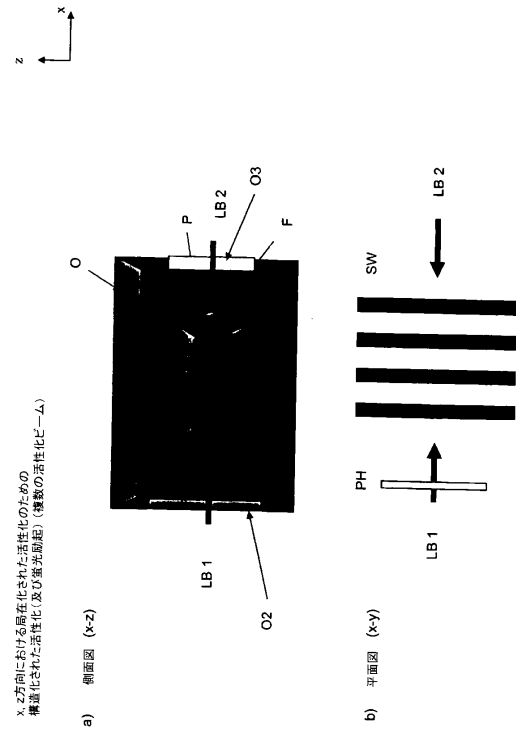
【 図 2 】



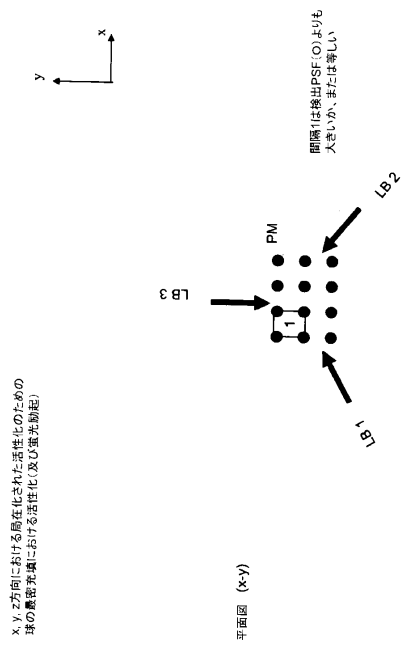
【図 3】



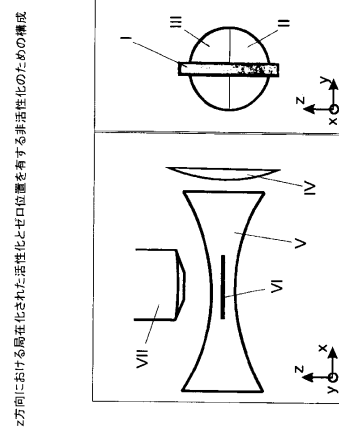
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【 図 7 】

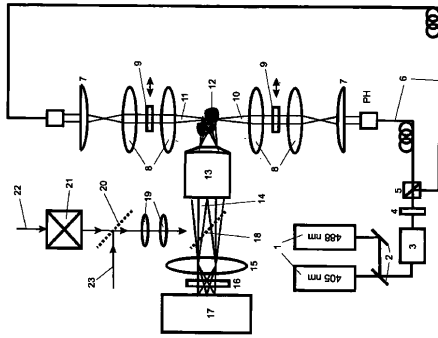


Fig.

フロントページの続き

- (72)発明者 ヴォレシェンスキー、ラルフ
ドイツ連邦共和国 07743 イェナ リヒャルダ - フーフ - ヴェーク 26
- (72)発明者 リッペルト、ヘルムート
ドイツ連邦共和国 07743 イェナ メランヒトンシュトラッセ 4
- (72)発明者 パワー、クリストファー
ドイツ連邦共和国 07743 イェナ ザールバーンホーフシュトラッセ 18
- (72)発明者 ラット、ベンノ
ドイツ連邦共和国 07743 イェナ アルヴィット - ハルナック - シュトラッセ 26

審査官 井亀 諭

- (56)参考文献 特開2007-114542(JP, A)
国際公開第2007/135804(WO, A1)
国際公開第2004/036284(WO, A1)
特表2008-542826(JP, A)
特表2006-509246(JP, A)
国際公開第2006/127692(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G02B 19/00 - 21/36
G01N 21/62 - 21/74