

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5536650号  
(P5536650)

(45) 発行日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日(2014.5.9)

(51) Int.Cl.

F 1

G02B 21/00 (2006.01)  
G01N 21/64 (2006.01)G02B 21/00  
G01N 21/64

F

請求項の数 26 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2010-523165 (P2010-523165)  
 (86) (22) 出願日 平成20年8月29日 (2008.8.29)  
 (65) 公表番号 特表2010-538326 (P2010-538326A)  
 (43) 公表日 平成22年12月9日 (2010.12.9)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2008/074863  
 (87) 國際公開番号 WO2009/029843  
 (87) 國際公開日 平成21年3月5日 (2009.3.5)  
 審査請求日 平成23年8月26日 (2011.8.26)  
 (31) 優先権主張番号 60/969,396  
 (32) 優先日 平成19年8月31日 (2007.8.31)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 592017633  
 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021  
 14・ボストン・フルトストリート5  
 5・マサチューセッツ ジェネラル ホスピタル ディー ビー エー  
 (73) 特許権者 310018537  
 エバンス コナー リー  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
 ストン ジョイ ストリート 51 #1  
 エフ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】自己干渉螢光顕微鏡検査のためのシステムと方法、及び、それに関連するコンピュータがアクセス可能な媒体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

試料の少なくとも一つの部分から少なくとも一つの電磁放射を取得するように構成された装置であって、該装置は、

前記少なくとも一つの電磁放射を、互いに異なる断面を有する複数の第1の放射に分離するように構成された、少なくとも一つの第1の構成部であって、前記複数の第1の放射の他の一つ、の断面にわたる位相遅延とは異なる、前記複数の第1の放射の一つ、の断面にわたる位相遅延を与えるように構成された、少なくとも一つの第1の構成部と、

前記複数の第1の放射の少なくとも一つを受光し、前記受光した前記複数の第1の放射の少なくとも一つを、前記受光した前記複数の第1の放射の少なくとも一つ、の波長に従つて、第2の放射に分離するように構成された、少なくとも一つの第2の構成部と、

前記複数の第1の放射又は前記第2の放射の少なくとも一つに空間フィルタリングを行うように構成された、少なくとも一つの第3の構成部と、

前記第2の放射を検出し、前記試料の少なくとも一つの部分の位置に関する情報を、前記複数の第1の放射の自己干渉の少なくとも一つの特性の関数として生成するように構成された、少なくとも一つの第4の構成部と、を備えた装置。

## 【請求項2】

前記位置の情報は、前記少なくとも一つの部分の横方向の位置又は深さの少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項1記載の装置。

## 【請求項3】

10

20

前記少なくとも一つの特性は、前記自己干渉の位相又は前記自己干渉の強度の少なくとも一つを含み、

前記情報は、前記複数の第1の放射の前記自己干渉のスペクトル変調に基づいて生成されることを特徴とする、請求項1記載の装置。

【請求項4】

前記少なくとも一つの第1の構成部は少なくとも二つの光学的要素を有し、

前記少なくとも二つの光学的要素は、前記少なくとも二つの光学的要素の他方の第2の経路長の差違とは異なる、前記少なくとも二つの光学的要素の一方の第1の経路長の差違に影響を与える光学的厚さを有する、請求項1記載の装置。

【請求項5】

10

前記少なくとも二つの光学的要素のいずれかの間の光学的経路長の差違は、前記複数の第1の放射の自己干渉のスペクトルの変調の整数を生成する、請求項4記載の装置。

【請求項6】

前記整数は、前記少なくとも二つの光学的要素の間の経路長の差違の任意の組み合わせごとに異なる、請求項5記載の装置。

【請求項7】

前記少なくとも一つの電磁放射を生成するための励起放射を提供するように構成された少なくとも一つの第5の構成部をさらに備えた、請求項1記載の装置。

【請求項8】

20

前記励起放射を受光し、前記励起放射に基づいて前記試料の少なくとも一つの部分の異なる位置に関連する放射を提供するように構成された、少なくとも一つの第7の構成部をさらに備えた、請求項7記載の装置。

【請求項9】

前記少なくとも一つの第3の構成部は、ピンホール、ピンホールアレイ、光ファイバ、ファイバアレイの少なくとも一つを含む、請求項1記載の装置。

【請求項10】

前記光ファイバは、単一モードのファイバであり、前記ファイバアレイは、単一モードの複数のファイバである、請求項9記載の装置。

【請求項11】

30

前記試料の少なくとも一つの部分の異なる位置と関連する放射を提供するように構成された、少なくとも一つの第6の構成部をさらに備えた、請求項1記載の装置。

【請求項12】

前記少なくとも一つの第6の構成部は、走査ミラーを含む、請求項11記載の装置。

【請求項13】

前記少なくとも一つの電磁放射は、前記試料の複数の部分から提供される複数の放射を含む、請求項1記載の装置。

【請求項14】

前記少なくとも一つの第3の構成部は、ピンホールアレイを含み、

前記試料の複数の部分に関連する前記第2の放射の複数のスペクトルを検出するように構成された特定の二次元の構成部をさらに備える、請求項13記載の装置。

40

【請求項15】

試料の少なくとも一つの部分に関連する情報を生成するように構成された装置であって、該装置は、

第1の放射に関連するデータを取得し、前記データに基づいて前記試料の少なくとも一つの部分の位置に関する情報を生成するように構成された、少なくとも一つの処理構成部を備え、

前記第1の放射は、前記試料の少なくとも一つの部分に関連する第2の放射を、前記第2の放射の少なくとも一つの波長に従って分離することによって、生成され、

前記第2の放射は、前記試料から提供される放射を、(i)互いに異なる断面と、(ii)前記第2の放射の他の一つ、の断面にわたる位相遅延とは異なる、前記第2の放射の

50

一つ、の断面にわたる位相遅延と、を有するように分割することによって生成され、

前記第2の放射は自己干渉し、

前記第1の放射又は前記第2の放射の少なくとも一つに空間フィルタリングを行うよう  
に構成された、少なくとも一つのさらなる構成部を備えた、装置。

**【請求項16】**

前記少なくとも一つの処理構成部は、前記データのフーリエ変換を実行することによっ  
て、前記情報を生成するように構成された、請求項15記載の装置。

**【請求項17】**

前記少なくとも一つの処理構成部は、前記第2の放射の少なくとも一つの干渉の位相を  
生成するためにフーリエ変換を実行するように構成され、

前記位相は、前記試料の少なくとも一つの位置に関連する、請求項16記載の装置。

**【請求項18】**

前記情報は、前記第2の放射の前記少なくとも一つの干渉の前記位相又は前記振幅の少  
なくとも一つに基づいて生成される、請求項17記載の装置。

**【請求項19】**

前記情報は、前記少なくとも一つの部分の位置情報を含む、請求項18記載の装置。

**【請求項20】**

試料の少なくとも一つの部分に関連する情報を提供する方法であって、該方法は、

前記試料の少なくとも一つの部分から受光した少なくとも一つの電磁放射を、互いに異  
なる断面を有する複数の第1の放射に分離し、前記複数の第1の放射の他の一つ、の断面  
にわたる位相遅延とは異なる、前記複数の第1の放射の一つ、の断面にわたる位相遅延を  
与えるステップと、

前記複数の第1の放射の少なくとも一つを受光し、前記受光した前記複数の第1の放射  
の少なくとも一つを、前記受光した前記複数の第1の放射の少なくとも一つ、の波長に従  
って、第2の放射に分離するステップと、

前記複数の第1の放射又は前記第2の放射の少なくとも一つを空間フィルタリングする  
ステップと、

前記第2の放射を検出し、前記試料の少なくとも一つの部分の位置に関する情報を、前  
記複数の第1の放射の自己干渉の少なくとも一つの特性の関数として生成するステップと  
、を含む、方法。

**【請求項21】**

試料の少なくとも一つの部分に関連する情報を提供する方法であって、該方法は、

第1の放射に関連するデータを取得するステップと、

前記第2の放射の少なくとも一つ、の波長に従って前記試料の少なくとも一つの部分に  
関連する第2の放射を分離することによって、前記データに基づいた前記試料の少なくとも  
一つの部分の位置に関する情報を生成するステップを含み、

前記生成するステップでは、前記第2の放射は、前記試料から提供される放射を、(i)  
(ii)互いに異なる断面と、(i)前記第2の放射の他の一つ、の断面にわたる位相遅延と  
は異なる、前記第2の放射の一つ、の断面にわたる位相遅延と、を有するように分割する  
ことによって生成され、前記第2の放射は、自己干渉し、前記第1の放射又は前記第2の  
放射の少なくとも一つは、空間フィルタリングが行われる、方法。

**【請求項22】**

試料の少なくとも一つの部分に関連する情報を提供するソフトウェアのプログラムを含  
む、コンピュータがアクセス可能な媒体であって、

前記ソフトウェアが、処理構成部によって実行されるとき、

前記処理構成部は、

第1の放射に関連するデータを取得する工程と、

前記第2の放射の少なくとも一つ、の波長に従って前記試料の少なくとも一つの部分に  
関連する第2の放射を分離することによって、前記データに基づいた前記試料の少なくとも  
一つの部分の位置に関する情報を生成する工程を含む手順を実行し、

10

20

30

40

50

前記生成する工程では、前記第2の放射は、前記試料から提供される放射を、(i)互いに異なる断面と、(ii)前記第2の放射の他の一つ、の断面にわたる位相遅延とは異なる、前記第2の放射の一つ、の断面にわたる位相遅延と、を有するように分割することによって生成され、前記第2の放射は、自己干渉し、前記第1の放射又は前記第2の放射の少なくとも一つは、空間フィルタリングが行われる、コンピュータがアクセス可能な媒体。

【請求項23】

前記少なくとも一つの第1の構成部はさらに、前記複数の第1の放射を略同一の方向に沿って伝播するように構成される、請求項1記載の装置。

【請求項24】

前記少なくとも一つの処理構成部はさらに、前記第2の放射を略同一の方向に沿って伝播するように構成される、請求項15記載の装置。

【請求項25】

前記複数の第1の放射は、前記少なくとも一つの電磁放射のそれぞれの幾何学的部分に対応する、請求項1記載の装置。

【請求項26】

前記複数の第1の放射は、前記少なくとも一つの電磁放射のそれぞれの幾何学的部分に対応する、請求項20記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、光学イメージングのためのシステムと方法、及び、それに関連するコンピュータがアクセス可能な媒体に関する。具体的には、試料から放射される光ビームを用いて、放射された光を、空間位相遅延光学部を通過させて、ビームに自己干渉を起こさせ、自己干渉によって高分解能の顕微鏡イメージングを行うことができる。

【背景技術】

【0002】

<関連出願の相互参照>

本発明は、参照により全ての開示内容が本明細書の一部として援用される、2007年8月31日に出願の米国仮出願第60/969,396号に関連する。

【0003】

複数の光学的方法が、回折限界を超えた顕微鏡分解能を実現している。どれもが蛍光標識化を必要とする、これらの方法は、SNOM(Scanning Near-field Optical Microscopy(走査型近接場光顕微鏡))(Horsh et al.「A stand-alone scanning near-field optical microscope」、Photons and Local Probes, NATO ASI Series E:300:139(1995)を参照)、STED(Stimulated Emission Depletion(誘導放出制御))(S. Hell et al.「Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission - stimulated-emission depletion fluorescence microscopy」, Optics Letters. 19:495(1995)を参照)、及びGSD(Ground State Depletion(空乏化))(S. Hell et al.「Ground-State-Depletion fluorescence microscopy - a concept for breaking the diffraction resolution limit」, Applied Physics B. 60:780(1994)を参照)、fluorescence microscopy(蛍光顕微鏡), photo-activated localization microscopy(PALM(光活性化局在性顕微鏡法))(E. Betzig et al.「Imaging in

10

20

30

40

50

trace cellular fluorescent proteins at nanometer resolution」*Science* 313:1642 (2006)を参照)、stochastic optical reconstruction microscopy (STORM(推計光学再構成顕微鏡法))(M. Rust et al. 「Sub-diffraction-limited imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)」*Nature Methods* 3:783 (2006)を参照)、structured illumination microscopy (SIM(構造化照明))(B. Bailey et al. 「Enhancement of Axial Resolution in fluorescence Microscopy by Standing-Wave Excitation」*Nature* 366:44 (1993)、M. Gustafsson 「Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy」*Journal of Microscopy* 198:82 (2000)、及びM. Gustafsson 「Nonlinear structured illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution」*PNAS* 102:13081 (2005)を参照)を含む。さらに、線形蛍光顕微鏡法及び二光子顕微鏡法(W. Denk et al. 「2-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy」*Science* 248:73 (1990)を参照)において、点広がり関数(R. Thompson et al. 「Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes」, *Biophysical Journal* 82:2775 (2002)を参照)を適合させることによって、回折限界を超えて、位置精度向上することも可能である。 10 20

#### 【0004】

光コヒーレンストモグラフィー、スペクトル領域OCT、及び、光周波数領域イメージングは、基準の光ビームと、試料から反射されて戻り、検出されたビームとの間の干渉を計測する特定のイメージング技術を含む。従来の時間領域OCTのシステムの詳細については、D. Huang et al. による「Optical Coherence Tomography」*Science* 254:1178 (1991)に記載されている。スペクトル領域OCT及び光周波数領域干渉分光システムの典型的な詳細については、米国特許出願第10/501,276号及び第10/577,562号にそれぞれ記載されている。 30

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

回折限界を超えた分解能を得ることができる他の代表的な技術として、いわゆる自己干渉蛍光顕微鏡法(SIFM)をあげることができる。この代表的な技術は、K. Drab et al. 「Localization of Spontaneous Emission in front of a mirror」, *Optics Communications* 73:91 (1989)及び、Swan et al. 「Toward nanometer-scale resolution in fluorescence microscopy using spectral self-interference」, *IEEE Quantum Electronics* 9:294 (2003)に記載のものに関連する。反射表面の前方に局在する蛍光色素分子の位置を、放射された蛍光光と表面からの反射との自己干渉を分析することによって、ナノメートルの分解能で決定することができる事が実演されている。代表的な技術は、OCPM 40 50

(Optical Coherence Phase Microscopy) に関連し、他の技術は、OCTから導かれる (C. Joo, et al. 「Spectral-domain optical coherence phase microscopy for quantitative phase-contrast imaging」, Optics Letters 30: 2131 (2005); and see C. Joo, et al. 「Spectral Domain optical coherence phase and multiphoton microscopy」, Optics Letters 32: 623 (2007) を参照)。ここでは、試料と基準アームとの間の干渉の位相を用いて、(サブ)ナノメートルの長さのスケールの動きを決定している。

10

#### 【0006】

OCPMでは、外部光源を用いて、この光を細胞の内部で、又は組織の構造体によって散乱させる。OCPMは、25ピコメートルに相当する位相感度を実演した。SIFMでは、光源は、励起光源によって励起された、蛍光色素分子自体である。異なる方向から放射された蛍光光を捕獲し、空間位相遅延光学的部を透過させた後に、それ自身と干渉させる。干渉は、分光計でスペクトル分解することによって、位相遅延部を透過した光が通過した経路長の差違に相当する周期性で干渉パターンを生成することができる。スペクトル分解された干渉をフーリエ変換することによって、蛍光帯域幅によって決定される点広がり関数を用いたSD-OCT (Spectral Domain Optical Coherence Tomography) におけるもののようなプロフィールを生成してもよい。変換式の位相の項を用いることによって、蛍光色素分子を、回折限界より大幅に優れた分解能で位置を特定 (localize: 局在化) することができる。この代表的な手法は、一般的に、放射された光をエピ方向 (epi-direction) に高い開口数をもって受光し、ビームを、三次元三角測量のために、各々が異なる遅延を有する4つの部分に分割する、単一の顕微鏡レンズと特別に設計された波長板とを用いて行うことができる。

20

#### 【0007】

上述の従来の構成部及び方法に関する特定の課題を解決する必要が存在する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

30

かかる課題に対処、及び／又は、解決するため、本発明の代表的な実施の形態を提供することができる。

#### 【0009】

一般的に、本発明に係る代表的な実施の形態のシステム及び方法は、レンズによって蛍光色素分子の放射を集光し、光を平行化してビームとし、ビームの波面にわたって、複数の、区別可能な波長依存の位相遅延を与える位相素子を透過させることによって、高分解能イメージングを容易とすることができます。このビームは、続いて、プリズム、回折格子、又はその他の分散素子によって波長分散され、分光計に合焦される。例えば、ビームの個々の波長成分が分光計のある点に合焦されると、それらの波面の位相遅延された成分がお互いに干渉し合い、波長依存の、蛍光自己インターフェログラムを生成しやすくなる。この自己インターフェログラムを、フーリエ変化によって分析して、サブ回折の分解能情報を抽出することができる。サブ回折の限界情報は相対位相に含まれており、干渉の複素フーリエ成分から決定してもよい。

40

#### 【0010】

本発明の一代表的な実施の形態によると、完全三次元局在性は、無限遠に平行な対物レンズを用いて実現することができる。かかる光学系では、焦点軸中心に局在する蛍光色素分子が、対物レンズ背面開口に平行ビームを生じさせることができる。蛍光色素分子が軸中心の上方又は下方に局在する場合、出力ビームは、それぞれに対応して僅かに収束又は分散することができる。本発明の代表的な実施の形態に基づくと、位相板は、分散の変化によって生じる経路長の変化を、軸方向の蛍光色素分子の局在性に変換するための、追加

50

の位相遅延領域を備えることができる。

【0011】

このように、それを用いて、試料の少なくとも一つの部分に関連する情報を提供することができる代表的な装置、及び／又は、方法を提供することができる。例えば、試料の少なくとも一つの部分から受けた少なくとも一つの電磁放射を、複数の第1の放射に、複数の第1の放射の一つが有する位相遅延が、複数の第1の放射の他が有する位相遅延と異なるように、分離することができる。さらに、複数の第1の放射の少なくとも一つを受けて、受けた複数の第1の放射の少なくとも一つの波長に従って、複数の第2の放射に分離することができる。さらに、複数の第2の放射を検出し、試料の少なくとも一つの部分の位置に関する情報を、複数の第1の放射の少なくとも一つの干渉の少なくとも一つの特徴の関数として生成することができる。

10

【0012】

本発明の他の代表的な実施の形態によると、複数の第1の放射は、自己干渉することができる。さらに、複数の第2の放射を検出し、試料の少なくとも一つの部分の位置に関する情報を、複数の第1の放射の自己干渉の少なくとも一つの特徴の関数として生成することができる。位置の情報は、少なくとも一つの部分の横方向の位置、及び／又は、深さの少なくとも一つを含むことができる。少なくとも一つの特徴は、自己干渉の位相、及び／又は、自己干渉の強度の少なくとも一つを含むことができ、情報は、複数の第1の放射の自己干渉のスペクトル変調に基づいて生成してもよい。

【0013】

20

本発明のさらなる代表的な実施の形態によると、少なくとも二つの光学的要素であって、

少なくとも二つの光学的要素は、少なくとも二つの光学的要素の他方の第2の経路長の差違とは異なる、少なくとも二つの光学的要素の一方の第1の経路長の差違に影響を与える光学的厚さを有する、少なくとも二つの光学的要素を用いることができる。少なくとも二つの光学的要素のいずれかの間の光学的経路長の差違は、複数の第1の放射の自己干渉のスペクトルの変調の概略の整数を生成することができる。整数は、光学的要素の間の経路長の差違の任意の組み合わせとは異なることができる。少なくとも一つの電磁放射を生成するための励起放射を提供することもできる。励起放射を受けて、励起放射に基づいて試料の少なくとも一つの部分の異なる位置に関連する放射を提供することができる。

30

【0014】

本発明のさらなる代表的な実施の形態によると、空間フィルタは、ピンホール、ピンホールアレイ、光ファイバ、及び／又は、ファイバアレイを含むことができる。光ファイバは、単一モードのファイバであってもよく、ファイバアレイは、単一モードの複数のファイバを含むことができる。試料の少なくとも一つの部分の異なる位置と関連する放射を提供することもできる。かかる放射は、走査ミラーを用いて提供することができる。少なくとも一つの電磁放射は、試料の複数の部分から提供される複数の放射を含むことができる。さらに、試料の複数の部分に関連する複数の第2の放射の複数のスペクトルを検出することができる。さらに、複数の第1の放射は干渉をすることができる。

【0015】

40

他の代表的な実施の形態によると、複数の第1の放射に関連するデータを取得して、データに基づいて試料の少なくとも一つの部分の位置に関する情報を生成する、システム、方法、及びコンピュータがアクセス可能な媒体を提供することができる。かかる情報は、試料の少なくとも一つの部分に関連する複数の第2の放射を、複数の第2の放射の少なくとも一つの波長に従って、分離することによって、データに基づいて生成することができる。例えば、複数の第2の放射の一つは、複数の第2の放射の他の一つの位相遅延とは異なる位相遅延を有することができ、複数の第2の放射は干渉してもよい。

【0016】

さらに代表的な実施の形態によると、複数の第2の放射は自己干渉することができる。情報は、データのフーリエ変換を実行することによって生成することができる。フーリエ

50

変換は、複数の第2の放射の少なくとも一つの干渉の位相又は振幅の少なくとも一つを生成するために実行してもよい。例えば、情報は、複数の第2の放射の少なくとも一つの干渉の位相、及び/又は、振幅に基づいて生成してもよい。さらに、情報は、少なくとも一つの部分の位置情報を含むことができる。

【0017】

本発明のこれらの目的及び他の目的、特徴及び利点は、添付の特許請求の範囲と併せて、以下の本発明の実施の形態の詳細な説明を読むに従って明らかになる。

【0018】

本発明のさらなる他の目的、特徴及び利点は、本発明の例示的な実施の形態を示した添付の図面を参照して、以下の本発明の実施の形態の詳細な説明から明らかになる。

10

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】分光計の構成を有する、本発明の第1の代表的な実施の形態のシステムの図である。

【図2】本発明の代表的な実施の形態の二次元イメージングのための位相板(30)の図である。

【図3】(a)～(d)は、図2に示す代表的な実施の形態の位相板からの干渉プロファイルの一例の図であり、領域間の干渉から生じるインターフェログラムパターンを示す。

【図4】(a)は、図1に示す代表的な実施の形態の代表的な適用と図2に示す代表的な実施の形態の位相板による、図3(a)～3(d)に図示したインターフェログラムのフーリエ変換から得られる、代表的な実施の形態のパワースペクトルのプロファイルの図であり、(b)は、図1に示す代表的な実施の形態の代表的な適用と図2に示す代表的な実施の形態の位相板による、図3(a)～3(d)に図示したインターフェログラムのフーリエ変換から得られる、代表的な実施の形態の位相のプロファイルの図である。

20

【図5】(a)は、第4の位相板要素を用いて、4部の位相板によって焦点外の光を識別する、本発明の代表的な実施の形態のシステムの図であり、(b)は、第4の位相板を用いて焦点外の光を識別して、三次元イメージングを実行する、第4の位相板要素を用いた、本発明の代表的な実施の形態のシステムの図である。

【図6】(a)は、図5に示す代表的な実施の形態からの代表的なインターフェログラムのグラフであり、(b)は、図6(a)に示すインターフェログラムのフーリエ変換から得られる、代表的なパワースペクトルのグラフであり、(c)は、図6(a)に示すインターフェログラムのフーリエ変換から得られる、代表的な位相プロファイルのグラフである。

30

【図7】本発明の第3の代表的な実施の形態のシステムの図である。

【図8】本発明の第4の代表的な実施の形態のシステムの図である。

【図9】本発明の第5の代表的な実施の形態のシステムの図である。

【図10】本発明の第6の代表的な実施の形態のシステムの図である。

【図11】本発明の第7の代表的な実施の形態のシステムの図である。

【図12】本発明の第8の代表的な実施の形態のシステムの図である。

【図13】相対的光学的厚さを有する代表的な実施の形態の第4要素位相板を示す図である。

40

【図14】図13に示す代表的な実施の形態の位相板を用いた、代表的な自己干渉スペクトルのシミュレーションを示す図である。

【図15】図14に示すスペクトルの代表的なパワースペクトル(例えば、複素フーリエ変換)のグラフである。

【図16】図15に示すパワースペクトルのピークで決定された代表的な位相のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

図面全般において、特に断りのない限りにおいて、同一の参照番号及び記号は、図示の

50

実施の形態の同様の特徴、要素、成分又は部分を示す。本発明を、以下、図面を参照して例示的な実施の形態とともににより詳細に説明する。本書に記載の実施の形態は、本発明の範囲及び趣旨から逸脱しない限りにおいて、変更及び修正を行うことが可能である。

#### 【0021】

本発明の代表的な実施の形態は、試料から放射された光を用いて、サブ回折限界の情報にアクセスすることができる、イメージングシステム、方法を提供することができる。さらに、本発明の代表的な実施の形態のシステムは、かかるデバイスで取得された信号の異なる走査及び検出方式、及び、かかるデータを処理する代表的な方法を提供する。

#### 【0022】

図1に示す本発明の第1の代表的な実施の形態は、試料(10)から放射された光を、位相素子PE(30)と分散素子DE(40)を介して、光学的に処理し、高分解能イメージングを実現する。具体的には、光源(10)からの蛍光放射は対物レンズ(objective)(20)によって集光され、位相素子(30)を透過した後、分散素子(40)によって波長分散され、レンズ(50)によって、オプションの空間マスク(60)を透過した後、分光計(70)に合焦される。

10

#### 【0023】

位相素子の代表的な配置が、自己インターフェログラムの性質、及び、その分析から抽出可能な情報を決定する。例えば、検出器配列(70)の前の空間マスク(60)は、位相感度を向上させることができる。二次元で局在化(localization:位置を特定)するためには、図2の例に示すように、例えば、3つの要素を有する位相板(例えば、位相素子PE(30))が好ましい。図2に示すように、位相板の領域の各々は固有の厚さを有し、位相ランプ(phase ramp)を波長の関数として促進することができる。インターフェログラムは、異なる領域を透過した光から実現することができる。

20

#### 【0024】

ビームがこの位相板を透過する際、例えば、波面の各部分は異なる板領域を透過する。これらの位相板の領域により、生成される経路長の差異が、図3(a)~(d)に示すように、干渉によるスペクトルの変調を生成する。具体的には、図3(a)は、領域1と領域2との間の、図3(b)は、領域2と領域3との間の、図3(c)は、領域1と領域3との間の干渉によって生じたインターフェログラムパターンを示す。図(d)は、分光計に集光された、図3(a)~3(c)の代表的な合計インターフェログラムを表す。例えば、放射スペクトラムは、図3(a)~3(c)に示すようにガウス分布とすることができます。これらの代表的な図では、領域1は遅延がなく、領域2はLの厚さを有するため、波長範囲にわたって、単一の2の位相ランプを生じ、領域3は3Lの厚さを有するため、波長範囲にわたって、6の位相ランプを生じる。

30

#### 【0025】

図3(a)~3(d)の一以上に示すインターフェログラムから重要な位相情報を得るために、代表的な実施の形態によると、領域の各々の厚さを、好ましくは、直交する干渉パターンを生成するように設定することができる。干渉変調の周期は、蛍光色素分子の放射スペクトラムにわたり、整数分だけ異なることができる。直交性が好ましく、例えば、多変量解析によるなどして、異なる位相板領域からの寄与が相互に異なるようにしてよい。インターフェログラムの複素フーリエ変換は、図4に示すように、強度(intensity)情報と相対位相情報の両方を含むことができる。

40

#### 【0026】

例えば、図4は、それぞれ、図1に示す代表的な実施の形態、及び、図2に示す代表的な実施の形態の位相板(30)の代表的な適用に従って、図3(a)~3(d)に示すインターフェログラムのフーリエ変換から得られた、代表的な実施の形態のパワースペクトルのプロフィール及び位相のプロフィールのグラフを示す。3つの干渉ピークの相対位相と対物レンズの開口数及び倍率(magnification)を知ることによって、空間的局在化(localization)情報を得ることができる。図5に示す4要素板を使用することによって、局在化の3次元を得ることができる。

50

## 【0027】

具体的には、図5は、4部の位相板(30)を用いて焦点外の光を識別して(図5(a)参照)、の三次元イメージングを実行する(図5(b)参照)、例えば、第4の位相板要素を用いた、代表的な実施の形態のシステムを示す図である。対物レンズ(20)の正確な軸焦点中心に局在する代表的な蛍光色素分子(10)は、例えば、完全に平行な出力を生成することができる。蛍光色素分子が、焦点の上方又は下方に局在する場合、出力分散は変化する可能性がある。例えば、位相板に第4の領域を、図5(b)に示す軸の位置に設けることができる。

## 【0028】

位相板要素の間の追加的な干渉を、図6(a)～(c)に示す、軸方向高分解能イメージングの相対位相情報を生成することができる。具体的には、図6(a)は、図5(a)及び(b)に示す代表的な実施の形態からの代表的なインターフェログラムのグラフである。図6(b)は、図6(a)に示すインターフェログラムのフーリエ変換から得られた代表的なパワースペクトルプロフィールのグラフである。図6(c)は、図6(a)に示すインターフェログラムのフーリエ変換から得られた代表的な位相プロフィールのグラフである。

10

## 【0029】

図7に示す本発明の他の実施の形態のシステムでは、光が透過回折格子TG(40)を透過して、イメージングレンズ(50)によって検出器(70)に合焦される前に、リレーレンズ群(31/39)とピンホールPH(60)を用いて光に空間フィルタリングを行う。具体的には、図7の代表的なシステムは、空間フィルタリングを行うためのピンホール又は(单一モード)光ファイバ(60)と、リレーレンズシステム(31、39)と、光スペクトルを分散させる透過回折格子TG(40)と、合焦レンズ(50)と、電荷結合素子又は光電子増倍管アレイなどの分光計アレイ(70)と、を含む。さらに、システムは、ダイクロイックミラーと位相板PP(30)を含む。

20

## 【0030】

図8は、本発明の他の実施の形態のシステムを示す図である。この代表的なシステムは、図7に示す代表的なシステムと類似しているが、位相板(30)の前に、さらなるピンホール27と、空間フィルタリングを行うためのリレーレンズシステム(26、29)とを追加している。図8では、ダイクロイックミラーDM(25)と、ピンホールPH又は(单一モード)光ファイバ(27、60)と、位相板(30)と、透過解析格子TG(40)と、合焦レンズ(50)と、分光計アレイ(70)とが示されている。具体的には、図8に示すように、2つのリレーレンズ群(26、29)及び(31、39)を用いて、位相板(30)と透過回折格子(40)とを対物レンズ(20)背面開口の共役面に配置することができる。

30

## 【0031】

この代表的な構成は、焦点面の蛍光色素分子(10)の任意の動きを容易にし、例えば、位相板(30)と透過回折格子(40)における、ビーム変位の代わりに、ビーム角度のみを変更可能とすることができます。二光子又は紫外線ランプ励起のために蛍光ポンプ(fluorescence pumping)を用いることもできるが、この代表的な実施の形態では、蛍光色素分子を二光子励起させるためにパルスIR(pulsed IR)光源を用いてもよい。例えば、ダイクロイックミラー(25)を用いて、励起ビームから落射蛍光を分離することができる。ピンホール(27)は、対物レンズの焦点面と共に第1の面において、面外(out-of-plane)蛍光と散乱光の共焦点拒絶(confocal rejection)のために用いてもよい。分光計(70)は、電荷結合素子アレイ、及び/又は、マルチアノード光電子倍増管でもよい。

40

## 【0032】

図9に、本発明の他の代表的な実施の形態のシステムを示す。具体的には、図9の代表的なシステムは、ピンホール又は(单一モード)光ファイバ(27)を含み、組み合わせられた位相板と透過回折格子要素(30/40)と、オプションの空間マスク(60)を

50

用いることができる。例えば、検出アレイ(70)の前方にオプションの空間マスク(60)を設けると、位相感度を向上することができる。

【0033】

図10に、本発明の他の代表的な実施の形態のシステムを示す。例えば、図10の代表的なシステムは、試料にわたって励起ビームをラスタ走査して、蛍光放射を逆走査(descan)するための走査ミラー群SM(23)を含むことができる。図10に示す要素21、22、26、29は、リレーレンズであってもよい。具体的には、励起レーザビームは、例えば、検流ミラーなどの走査ミラー(23)を用いて、角度走査することができる。走査及び筒レンズ(21、22)は、ビームを対物レンズに導くことができ、角度走査は、焦点面にわたる位置走査に変換することができる。焦点で生成された光は、照明経路に沿って戻ることができ、走査ミラー(23)を通過することによって、固定ビームに逆走査されてもよい。ダイクロイックミラー(25)を用いて蛍光ビームを励起ビームから分離してもよい。ピンホール(27)を、散乱光又はその他の焦点外の光から焦点から蛍光を分離するため、又は、共焦点検出のために用いることができる。代表的なシステムは、位相板(30)及び透過回折格子(40)を用いて、自己インターフェログラム(self-interferogram)を生成することができる。

【0034】

図11に、本発明のさらなる代表的な実施の形態を示す。例えば、図11の代表的なシステムは、マルチレンズアレイ(81)と、試料にわたって、焦点線を走査する走査ミラーシステム(23)と、を含むことができる。この代表的なシステムは、空間フィルタとしてピンホールアレイ(90)と、検出のための二次元CCDカメラ(70)と、を有してもよい。具体的には、試料にわたって複数の励起焦点を走査して、イメージングレートを高めることができる。例えば、単一の点を走査する代わりに、点を結んだ線を一度に走査することによって、データ取得の速度を向上することができる。マルチレンズアレイ(81)によって生成されたビームレットの各々は、異なる試料の位置にわたって走査することができ、走査ミラー(23)を介して戻ることができる放射光のビームレットを生成する。

【0035】

位相板(30)と分散素子(40)は、対物レンズ(20)の背面開口(24)と共に役な面に配置することができ、例えば、全てのビームレットについて、共通の位相板と分散素子の組を使用することを容易にしている。位相板と分散素子の間では、ピンホールアレイ(又は、空間マスク)(90)が光の空間フィルタリングを行うことができる。ビームレットの各々は、この共役面で区別可能な角度を有し、透過回折格子の後部に配置されたレンズは、垂直軸に沿って離間したビームレットごとに個々のインターフェログラムを生成することができる。CCDチップ(100)などの二次元アレイを用いて、かかるインターフェログラムを集光して、高速な走査速度で複数ポイントSIFMを容易にすることができます。

【0036】

以下、自己干渉測定の例示的な数値シミュレーションについて説明する。ここで引用する光学的構成要素は、図12に示す本発明の他の代表的な実施の形態のシステムに関するものである。例えば、図12の代表的なシステムは、背面開口(24)を有する対物レンズ(20)と、空間フィルタリングのためのピンホールPH又は(单一モード)光ファイバ(60)と、リレーレンズシステム(31、39)と、光スペクトルを分散するための透過回折格子(40)と、合焦レンズ(50)と、分光計アレイ(70)、例えば、電荷結合素子又は光電子倍増管アレイと、を含むことができる。この代表的なシステムのダイクロイックミラーDM(25)、位相板PP(30)、透過回折格子TG(40)も、図12に示されている。具体的には、図12に示す対物レンズ瞳(24)における複素電場分布 $E_p(x, y, \theta) = I(x, y, \theta) e^{i \phi(x, y, \theta)}$ を定義することができる。顕微鏡対物レンズ(20)の焦点の点光源(10)について、強度関数と位相関数の両方は、

10

20

30

40

50

$$E_p(x, y, \dots) = I_0(\dots) e^{i \phi_0(\dots)}$$

とフラット(flat)とすることができます。位相板(30)は場(field)を遅延させて、位相の異なる複数の部分にすることができる。

### 【0037】

図13に、異なる部分の光学的厚さを表す数字(0、1、3、7)を付した、模擬的な4要素位相板の代表的な実施の形態を示す。例えば、遅延された場、すなわち、

$$E_r(x, y, \dots) = E_p e^{i \phi_0(x, y, \dots)}$$

を位置(x, y)及び波長における波長板の光学的厚さから決定することができる。図12の代表的な実施の形態のシステムに示すように、レンズ(31)は、場を受け入れるファイバの先端/空間フィルタ(60)に合焦する。受け入れるファイバの先端/空間フィルタ(60)における場 $E_f(x, y, \dots)$ の分布は、 $E_s$ のフーリエ変換によって決定することができる。遅延されていない場 $E_{r0}$ のこの代表的な場の分散 $E_{f0}$ は、受け入れるファイバのモードとして定義することができる。剪断された場とファイバモードパターンとの間の場カップリング効率は、重なり積分として定義してもよい。

### 【数1】

$$C(\lambda) = \int E_f(x, y, \lambda) E_{f0}(x, y, \lambda) dx dy$$

10

パワーカップリングは、場カップリングの絶対値の二乗とすることができます。

20

### 【数2】

$$|C|^2$$

### 【0038】

波長ごとにパワーカップリングを決定することにより、図14に示す、模擬自己干渉スペクトルを導くことができる。このスペクトルをフーリエ変換することによって、自己干渉変調のパワースペクトルと位相を導くことができる(それぞれ、図15、16に示す)。点光源の位置は、これらの代表的な変調の位相から得ることができる。(x, y)面において光源(10)が対物レンズ(20)の焦点から離れる動きは、線形位相ランプを場 $E_p$ に追加することによってシミュレーションを行うことができる。光源(10)が対物レンズ(20)の焦点からz軸に沿って離れる動きについて、球面位相の頂を場 $E_p$ に追加することによるシミュレーションを行うことができる。本書で説明した代表的なシミュレーションでは、例えば、約64度の受光角度、例えば、約0.18mmの焦点距離を有する対物レンズ(例えば、薄いレンズとしてモデル化)の使用を想定することができる。蛍光色素分子の変位は、例えば、x方向及びy方向の両方に約60nmとすることができます。この代表的な変位は、図16のグラフで示される明確な位相シフトを提供することができる。焦点の蛍光色素分子については、例えば、全ての位相をゼロとすることができます。

30

### 【0039】

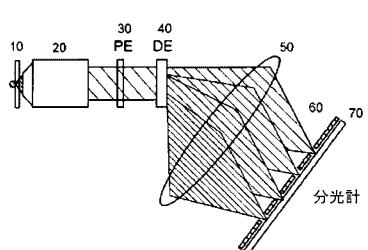
上述の説明は本発明の原理を例示するものにすぎない。本書の教示を鑑みれば、当業者であれば、本書で説明した実施の形態に様々な修正及び変形が想起される。事実、本発明の代表的な実施の形態の構成、システム及び方法は、イメージングシステムとともに使用することができ、例えば、引用により本書に援用される、2004年9月8日出願の国際特許出願第PCT/US2004/029148号、2005年11月2日出願の米国特許出願第11/266779号、及び、2004年7月9日出願の米国特許出願第10/501276号に記載のものとともに使用することができる。当業者であれば、本書に明示的に提示、又は記載されていなくとも、本発明の原理を具現化する、すなわち、本発明の趣旨と範囲に属する、様々なシステム、構成及び方法を考案できることは明らかである

40

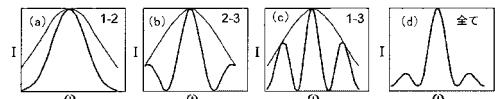
50

。さらに、上述の記載において従来技術の知識が参照により明示的に援用されていない範囲まで、その全体が本書に含まれる。本書が引用するオーストラリア公報も、参照によりその全体が含まれる。

【図1】



【図3】



【図2】

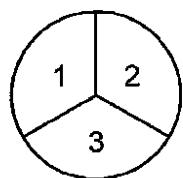
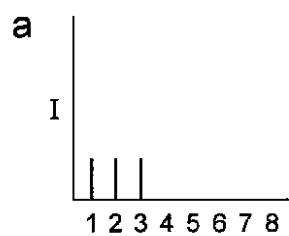
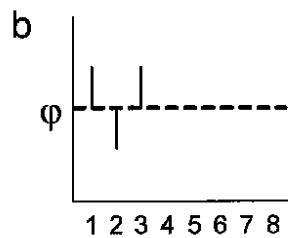


FIG. 2

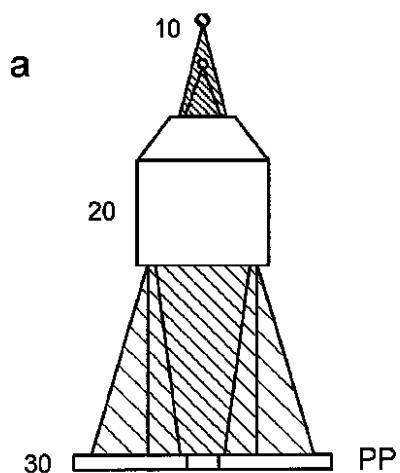
【図4 a】



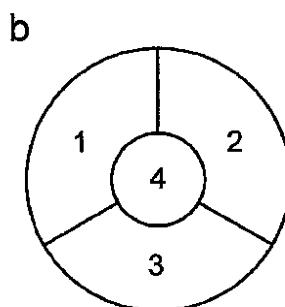
【図 4 b】



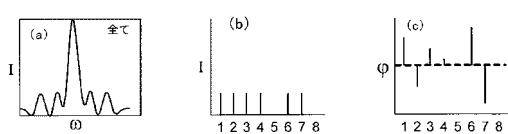
【図 5 a】



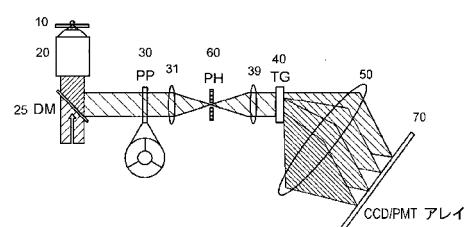
【図 5 b】



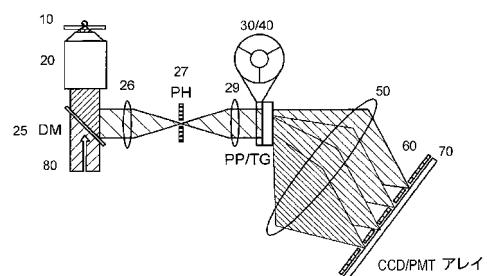
【図 6】



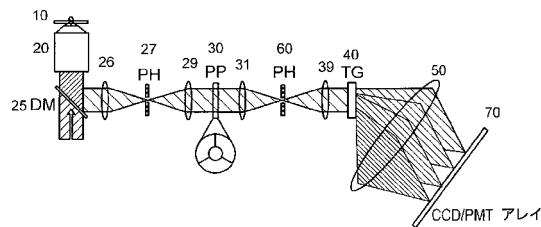
【図 7】



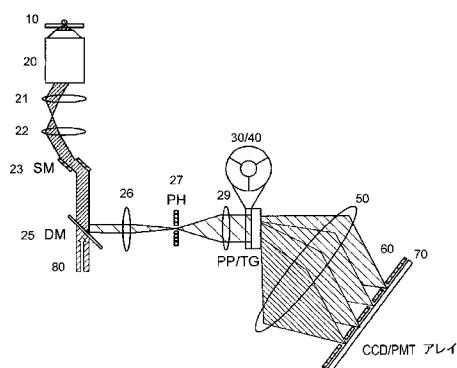
【図 9】



【図 8】



【図 1 0】



【図 1 1】

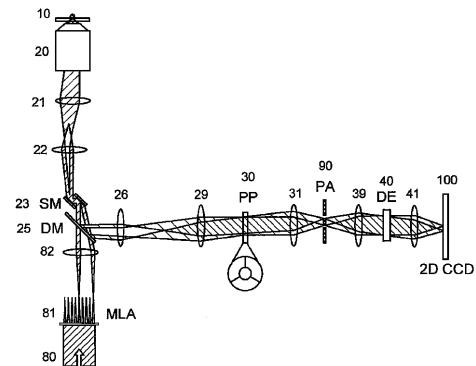
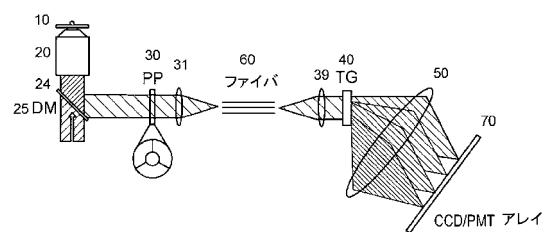
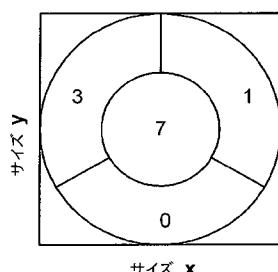


FIG. 11

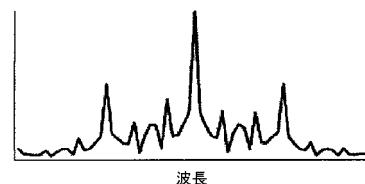
【図 1 2】



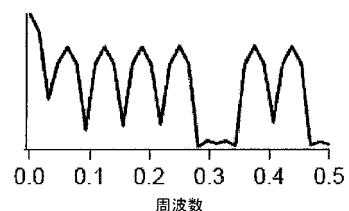
【図 1 3】



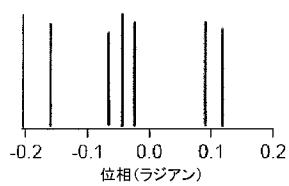
【図 1 4】



【図 1 5】



【図16】



---

フロントページの続き

(73)特許権者 310018548

デ ボアー ヨハネス エフ .  
オランダ国 ディーシー アムステルフェーン バーケン 24

(73)特許権者 310018559

デ グルート マタイス  
オランダ国 エスアール , ハールレム ロランドストラット 60

(74)代理人 100106002

弁理士 正林 真之

(74)代理人 100120891

弁理士 林 一好

(72)発明者 エバンス コナー リー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ジョイ ストリート 51 #1エフ

(72)発明者 デ ボアー ヨハネス エフ .

オランダ国 ディーシー アムステルフェーン バーケン 24

(72)発明者 デ グルート マタイス

オランダ国 エスアール , ハールレム ロolandストラット 60

審査官 殿岡 雅仁

(56)参考文献 特開2007-086735 (JP, A)

特開平06-331441 (JP, A)

特表2002-541471 (JP, A)

特開平01-316619 (JP, A)

特開2007-151622 (JP, A)

特開平04-254815 (JP, A)

米国特許第05910839 (US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 02 B 21/00

G 02 B 21/06 - 21/36