

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4372996号
(P4372996)

(45) 発行日 平成21年11月25日 (2009.11.25)

(24) 登録日 平成21年9月11日 (2009.9.11)

(51) Int. Cl.

F I

G O 2 B 21/06 (2006.01)

G O 2 B 21/06

G O 1 N 21/27 (2006.01)

G O 1 N 21/27

E

G O 1 N 21/64 (2006.01)

G O 1 N 21/64

E

G O 2 B 21/00 (2006.01)

G O 2 B 21/00

G O 2 B 21/10 (2006.01)

G O 2 B 21/10

請求項の数 32 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-518300 (P2000-518300)
 (86) (22) 出願日 平成10年10月27日 (1998.10.27)
 (65) 公表番号 特表2001-521205 (P2001-521205A)
 (43) 公表日 平成13年11月6日 (2001.11.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA1998/000993
 (87) 国際公開番号 W01999/022262
 (87) 国際公開日 平成11年5月6日 (1999.5.6)
 審査請求日 平成17年10月11日 (2005.10.11)
 (31) 優先権主張番号 60/063,893
 (32) 優先日 平成9年10月29日 (1997.10.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 300047921
 デジタル オプティカル イメージング
 コーポレーション
 アメリカ合衆国 98225 ワシントン
 州 ベリンガム コーンウォール アヴェ
 ニュー 1201 スウィート 201
 (74) 代理人 100070024
 弁理士 松永 宣行
 (72) 発明者 マコーレー、 カラム イー
 カナダ ヴィー5ダブリュー 1イー7
 ブリティッシュ コロンビア ヴァンクー
 ヴァー サーティーセブンス ストリート
 イースト 338

審査官 瀬川 勝久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 空間的に光変調された顕微鏡法に関する装置及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対物レンズの開口絞りの共役画像面にある照明光路内に配置された、空間的光変調のための第1の画素化手段と、サンプルの共役画像面にある前記照明光路内に配置された、空間的光変調のための第2の画素化手段とを含む、顕微鏡。

【請求項 2】

前記顕微鏡は検出光路の下流端部に配置された光を検出する手段を含む、請求項1に記載の顕微鏡。

【請求項 3】

前記顕微鏡は前記光路の下流側端部に配置された、光を検出する手段を含む、請求項1に記載の顕微鏡。

【請求項 4】

空間的光変調のための前記第1、第2、第3及び第4の手段及び前記光の検出手段は前記少なくとも1つの空間的光変調のための手段及び前記光を検出する手段の前記光透過又は検出特性を制御する少なくとも1つのコンピュータ手段に作動的に接続されている、請求項3に記載の顕微鏡。

【請求項 5】

前記顕微鏡は共焦点顕微鏡である、請求項4に記載の顕微鏡。

【請求項 6】

個々の光透過画素の照明列を有する空間的光変調器であって対物レンズの開口絞りの共

10

20

役画像面にある顕微鏡の照明光路内に配置されて上流側の空間的光変調器となる空間的光変調器を含み、共焦点顕微鏡である、顕微鏡。

【請求項 7】

個々の光透過画素の照明列を有する空間的光変調器であって対物レンズの開口絞りの共役画像面にある顕微鏡の照明光路内に配置されて上流側の空間的光変調器となる空間的光変調器と、

検出光路内に配置され、前記対物レンズの開口絞りの下流側の共役画像面に配置された第 2 の空間的光変調器であって第 2 の空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する第 2 の変調器コントローラに作動的に接続される第 2 の空間的光変調器とを含み、

10

前記上流側の空間的光変調器は、サンプルの所望の検出及び照明角度を選択すべく、空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを含む変調器コントローラに作動可能に接続され、前記所望の照明角度に対応する前記個々の光透過画素の選択された部分はオンになり、

サンプルの照明角度と前記サンプルから出る光の検出角度を選択的に制御し、共焦点顕微鏡である、顕微鏡。

【請求項 8】

個々の光透過画素の照明列を有する空間的光変調器であって対物レンズの開口絞りの共役画像面にある顕微鏡の照明光路内に配置されて上流側の空間的光変調器となる空間的光変調器と、

20

検出光路内に配置され、前記対物レンズの開口絞りの下流側の共役画像面に配置された第 2 の空間的光変調器であって第 2 の空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する第 2 の変調器コントローラに作動的に接続される第 2 の空間的光変調器とを含み、

前記上流側の空間的光変調器は、サンプルの所望の検出及び照明角度を選択すべく、空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを含む変調器コントローラに作動可能に接続され、前記所望の照明角度に対応する前記個々の光透過画素の選択された部分はオンになり、

前記第 1 の変調器コントローラは前記第 2 の変調器コントローラに作動的に接続され、前記第 2 光変調器は、前記第 1 の変調器コントローラで選択された前記所望の角度に対応させるように、前記検出光路内における光を選択的に制御し、

30

サンプルの照明角度と前記サンプルから出る光の検出角度を選択的に制御し、共焦点顕微鏡である、顕微鏡。

【請求項 9】

個々の光透過画素の照明列を有する空間的光変調器であって対物レンズの開口絞りの共役画像面にある顕微鏡の照明光路内に配置されて上流側の空間的光変調器となる空間的光変調器と、

検出光路の下流側端部に配置された光検出器とを含み、

前記光検出器は個々の検出画素の検出列を有し、

共焦点顕微鏡である、顕微鏡。

40

【請求項 10】

個々の光透過画素の第 1 の照明列を有する第 1 の空間的光変調器であって対物レンズの開口絞りの共役画像面にある照明光路に配置されて第 1 の上流側空間的光変調器となる第 1 の空間的光変調器と、個々の光透過画素の第 2 の照明列を有する第 2 の空間的光変調器であってサンプルの共役画像面にある前記照明光路に配置されて第 2 の上流側空間的光変調器となる第 2 の空間的光変調器とを含む、顕微鏡。

【請求項 11】

前記顕微鏡は、更に、検出光路内に配置された第 3 の空間的光変調器であって前記対物レンズの開口絞りの下流側共役画像面とサンプルの下流側共役画像面との内の一方に配置された第 3 の空間的光変調器を含む、請求項 10 に記載の顕微鏡。

50

【請求項 1 2】

前記顕微鏡は、更に、前記検出光路内に配置された第 4 の空間的光変調器を含み、前記第 3 の空間的光変調器は前記対物レンズの開口絞りの前記下流側共役画像面に配置され、第 4 の空間的光変調器はサンプルの前記下流側の共役画像面に配置される、請求項 1 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 1 3】

前記顕微鏡は、更に、前記検出光路の下流側端部に配置された光検出器を含み、前記光検出器は個々の検出画素の検出列を含む、請求項 1 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 1 4】

前記空間的光変調器と光検出器とは、前記全て空間的光変調器と前記光検出器の光透過又は検出特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも一つのコントローラに作動的に接続されている、請求項 1 3 に記載の顕微鏡。

10

【請求項 1 5】

前記顕微鏡は共焦点特性を提供し且つサンプルの照明角度と前記サンプルから出る光の検出角度を選択的に制御し、前記第 1 の空間的光変調器の透過特性を制御する前記コンピュータ実行型プログラミングは所望の照明角度と前記サンプルの検出角度を選択し、前記所望の照明角度と検出角度に対応する前記第 1 の空間的光変調器の前記個々の光透過画素の選択された部分はオン状態であり、前記第 2 の空間的光変調器の透過特性を制御する前記コンピュータ実行型プログラミングは、隣接画素がオフ状態で前記検出列の前記検出画素が前記照明スポットを選択的に検出するような位置にある間に、前記第 2 の空間的光変調器の少なくとも 1 つの個々の光透過画素をオン状態にすることにより、少なくとも 1 つの照明スポットを前記サンプルに提供する、請求項 1 4 に記載の顕微鏡。

20

【請求項 1 6】

前記コンピュータ実行型プログラミングは、第 2 の空間的光変調器により複数の照明スポットを同時に形成させ、前記スポットの連続的相補的パターンを提供する、請求項 1 5 に記載の顕微鏡。

【請求項 1 7】

前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記第 1 の空間的光変調器内の前記個々の光透過画素の照明列により前記サンプルの複数の所望の照明角度を提供し、前記個々の検出画素の検出列により前記複数の所望の照明角度に対応する前記個々の検出画素の検出列における強度変化を検出し、該強度変化で前記サンプルの 3 次元画像を決定する、請求項 1 6 に記載の顕微鏡。

30

【請求項 1 8】

前記コンピュータ実行型プログラミングは、また前記第 1 の空間的光変調器内の前記個々の光透過画素の照明列によりサンプルの複数の所望の照明角度を提供して前記サンプル内の対応する複数の異なる深さにおいて前記サンプルの複数の画像を提供し、次いで異なる画像をトモグラフィ的に再生して前記サンプルの 3 次元画像を提供する、請求項 1 6 に記載の顕微鏡。

【請求項 1 9】

前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記第 1 の空間的光変調器内の前記個々の光透過画素の照明列により前記サンプルに到達する光量を選択的に制御し、該量は前記照明光路の始点に配置された光源から出射される全ての光以下であり、所望の照明量に対応する前記個々の光透過画素の選択された部分はオンになる、請求項 1 6 に記載の顕微鏡。

40

【請求項 2 0】

前記コンピュータ実行型プログラミングは、第 1 の空間的光変調器内の前記個々の光透過画素の照明列により暗視野顕微鏡法用の所望のパターンを提供することにより、暗視野顕微鏡法を選択的に提供し、暗視野顕微鏡法用の所望のパターンに対応する前記個々の光透過画素の選択された部分はオンになり、前記第 3 の空間的光変調器の前記個々の光透過の相補的パターンはオンになる、請求項 1 6 に記載の顕微鏡。

【請求項 2 1】

50

前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記光検出器によりオン状態になる前記第2空間的光変調器の個々の光透過画素に位置合わせされてその画素に対応する中央検出画素に当たる光のみを検出させる、請求項16に記載の顕微鏡。

【請求項22】

前記コンピュータ実行型プログラミングは、オン状態にある前記第2の空間的光変調器の個々の光透過画素と位置合わせされた中央検出画素に当たる光を前記光検出器により検出させ、前記中央検出画素に隣接する少なくとも1つの検出画素上に当たる光を前記光検出器により検出させ、更にコンピュータ実行型プログラミングは、前記少なくとも1つの隣接する検出画素で提供されるデータを編集し、それを前記中央検出画素で提供されるデータと結合する、請求項16に記載の顕微鏡。

10

【請求項23】

前記顕微鏡の前記焦点が前記隣接する検出画素からのデータを伴わない焦点と比較して改善されるように、前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記隣接する検出画素で提供されるデータを編集し、そのデータを前記中央検出画素で提供されるデータと結合する、請求項22に記載の顕微鏡。

【請求項24】

前記顕微鏡は時間遅延型蛍光検出を提供し、前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記空間的光変調器の少なくとも1つによりサンプル内に蛍光を誘起させるのに適当な時間にわたり前記サンプルを照明し、次いで前記サンプルの照明を停止し、次いで前記検出器により前記サンプルから出る蛍光の検出を開始させる、請求項10に記載の顕微鏡。

20

【請求項25】

前記顕微鏡は共焦点顕微鏡である、請求項10～24のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項26】

顕微鏡内の照明光路であって対物レンズの開口絞りの共役画像面における個々の光透過画素の照明列を含む空間的光変調器を含む照明光路を変調する方法であって、前記空間的光変調器の光透過特性を選択することにより、前記照明光路を変調することを含む、共焦点顕微鏡の方法。

【請求項27】

更に、時間遅延蛍光検出と、前記サンプル内に蛍光を誘起させるのに適当な時間量にわたり前記サンプルを照明し、前記サンプルの照明を停止し、次いで前記サンプルから出る蛍光を検出することを含む、請求項26に記載の方法。

30

【請求項28】

個々の光透過画素の第1の照明列を含む第1の空間的光変調器であって対物レンズの開口絞りの共役画像面にある照明光路内に配置されて第1の上流側空間的光変調器となる第1の空間的光変調器と、個々の光透過画素の第2の照明列を含み、サンプルの共役画像面にある前記照明光路内に配置されて第2の上流側の空間的光変調器となる第2の空間的光変調器と、前記検出光路の下流側端部に配置された光検出器であって個々の検出画素の検出列から成る光検出器とを有する顕微鏡の使用を含む共焦点顕微鏡法であって、前記空間的光変調器と光検出器とは、前記空間的光変調器と前記光検出器の光透過又は検出特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続され、前記方法は、所望の照明角度と検出角度に対応する前記第1の照明列の個々の光透過画素の選択された部分をオンにすることにより、前記所望の照明角度と検出角度を選択し、隣接画素がオフの状態にある間に、前記第2の照明列の少なくとも1つの個々の光透過画素がオンとなり、前記検出列の検出画素が照明スポットを選択的に検出する目的で配置されるように、前記所望の照明スポットに対応する前記第2の照明列の個々の光透過画素の選択された部分をオンにすることにより、所望の照明を選択することを含む、方法。

40

【請求項29】

更に、複数の照明スポットを同時に提供し、次いで前記スポットの連続する相補的パターンを提供することを更に含む、請求項28に記載の方法。

50

【請求項 30】

更に、前記サンプルの複数の所望の照明角度を提供し、前記複数の所望の照明角度に対応する個々の検出画素の検出列内の強度変化を検出し、そこから前記サンプルの3次元画像を決定することを含む、請求項28又は29に記載の方法。

【請求項 31】

更に、前記サンプル内の対応する複数の異なる深さにおいて複数のサンプル画像を提供し、次いで異なる画像をトモグラフィー的に再生して、サンプルの3次元画像を提供することを含む、請求項28又は29に記載の方法。

【請求項 32】

更に、時間遅延蛍光検出と、前記サンプル内に蛍光を誘起させるのに適当な時間量にわたり前記サンプルを照明し、前記サンプルの照明を停止し、次いで前記サンプルから出る蛍光を検出することを含む、請求項28又は29に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明の分野は対象物の画像の拡大化に関し、更に詳細には顕微鏡及び顕微鏡法の分野に関する。

【0002】

【発明の経緯】

顕微鏡法は、動的物体と静的物体の両者すなわちサンプルの拡大表示を作成するため使用される。顕微鏡法には、明視野顕微鏡法、暗視野顕微鏡法、位相差顕微鏡法、蛍光顕微鏡法、反射顕微鏡法及び共焦点顕微鏡法といった多くの異なる態様が存在している。これら顕微鏡法の全ての形態では、照明光を或る制御された様式でサンプルに送り、そのサンプルに関する所望の情報を含む光をできるだけ多く集める。典型的には、これは反射顕微鏡法、透過型顕微鏡法又は蛍光外顕微鏡法のいずれにおいても、ケーラー照明を使用して達成される。これら両方の方法では、開口数（照明コーン）の大きさとそのサンプルの照明領域の大きさの両者を制御する目的で、適切に配置された絞りとレンズとを使用している。ケーラー照明においては、絞りは少なくとも2箇所に配置される。第1の個所では、絞りはサンプルの共役画像面即ちサンプルの照明領域の大きさの制御を可能にする位置に配置される。第2の個所では、絞りは対物レンズの開口絞りの共役画像面（この個所はまた、コンデンサ・レンズの開口絞りの共役画像面でもある）、即ちサンプルを照明する光の角度制御を可能にする個所である。典型的には、いずれの絞りも（例えば明視野顕微鏡法と照明外蛍光顕微鏡法の場合）単純な虹彩にすることができるが、これらの絞りはまた（例えば暗明視野顕微鏡法において、この絞りが直径の異なる切り欠きリングから成る様な場合）一層複雑になり得る。

【0003】

ケーラー照明を使用している顕微鏡の例を図1に示す。図1において、顕微鏡2は光源4を含み、この光源は複数本の光線を出し、これらの光線は第1の光線6、第2の光線8及び第3の光線10に分割されている。これらの光線は、照明光経路3に沿って光源4から光源レンズ12、調節可能な虹彩絞り14及びコンデンサ・レンズ16を介して送られる。上流側のコンデンサ・レンズ16と下流側のコンデンサ・レンズ16の間に調節可能な虹彩絞り（コンデンサ）18を配置することができる。したがって、光線はサンプル20に接触するか又はサンプル20に商社されて、次に対物レンズ22を通過して進む。これらの対物レンズは、対物レンズ22の間に隔置された開口絞り（対物）24を含むことができ、したがって光線は光検出器26へ進む。先に注記したように、サンプルの照明角度は、光が対物レンズの開口絞りの共役画像面を通過する際、光を変調することにより制御することができる。これらの共役画像面は、例えば図1における光源4と上流側の開口絞り18に見い出すことができる。一方、そのサンプルの照明個所及び/又は照明領域は、サンプルの共役画像面を光が通過する際に、その光を変調することにより制御することができる。この共役画像面は図1における調節可能な虹彩絞り14に対応している。

10

20

30

40

50

【0004】

顕微鏡法の1つの好ましい形態は共焦点顕微鏡法であり、その場合別々の開口スポットが顕微鏡の対象物面内で照明され、次いでその対象物面からの送りにより反射された光又は蛍光光線が観察のため画像面内の共役開口を介してリレーされる。いくつかの実施態様において、共焦点顕微鏡法は結果的に従来の光学式顕微鏡法で得られる最適解像度より約1.3倍の空間的解像度が得られる（例えば米国特許第5,587,832号を参照）。更に、共焦点顕微鏡法は焦点面上下における観察された試料からの迷走する焦点はずれの光の干渉を低減することができ、組織の高解像3D再生と合わせてその組織の光学的切り取りを可能にすることができる。この技術は個々の細胞と生きている組織を汚さずに効果的に解像処理することができる。共焦点顕微鏡法は、固定光学系による試料の機械的変換を使用するか、又は固定試料を使用し且つ特別に回転する開口ディスクで操作される光線を走査することで行うことができる（例えば、米国特許第4,802,748号、同第5,067,805号、同第5,099,363号、同第5,162,941号を参照）。こうしたディスクは典型的には複数の開口を含むが、共焦点走査の場合は1回に1つの開口のみが使用される。更に他の公知の共焦点走査システムでは、試料を走査する回転鏡でラスターが付けられるレーザー・ビーム、又はスポットよりむしろスリットを走査するレーザー・ビームを使用しており、こうしたスリット走査は画像化速度を速めるが、僅かに解像度を落とす（米国特許第5,587,832号を参照）。

10

【0005】

従来の共焦点顕微鏡は、一部の適用例に対して画像を得るにはスピードが遅く、また走査線密度が増加して開口分離が減少することから更に遅くなる。その上、実際商業的なシステムにおいて共焦点顕微鏡のパラメータを実際に調節することは困難であり、画像化速度を速めるには信号対雑音の比（S/N比）が犠牲にされる。その上、従来の共焦点システムの適切な位置合わせはクリティカルなものであり、そのため維持が困難である。その上、レーザーを基にしたシステムは白色光のシステムより高価であるが、こうしたレーザー・システムは照明波長の選択を提供せず、また、写真の劣化性と写真の急速な白色化ももたらし得る。

20

【0006】

したがって、サンプルの照明角度を容易且つ迅速に制御することができるような共焦点顕微鏡システムを含めた、光の絶対量を変えることと、その光量が当たるサンプル上での位置とを含めて、そのサンプルに到達する光量を容易且つ迅速に制御することができるような顕微鏡の必要性も存在しなかった。本発明はこれらの諸利点と他の諸利点をもたらし得るものである。

30

【0007】

【発明の要約】

本発明は、サンプルに接触し及び/又は検出される、サンプルから出る光を制御するのに著しく有利な顕微鏡を提供する。この高度化された制御は、照明角度、光量並びにサンプル及び/又は検出器に到達する光の位置のそれぞれを強化された選択的制御を含む。本発明は、1以上の空間的光変調器を対物レンズの開口絞りの共役画像面とサンプルの共役画像面との内の一方又は両者における顕微鏡の照明光路及び/又は検出光路に配置することにより、これらの諸利点を提供する。

40

【0008】

したがって、一つの実施の形態において、本発明は個々の光透過画素の照明列（照明アレイ）を有する空間的光変調器であって対物レンズの開口絞りの共役画像面にある顕微鏡の照明光路内に配設されて上流側の空間的光変調器となる空間的光変調器を含む顕微鏡を提供する。

【0009】

いくつかの実施形態において、前記顕微鏡はサンプルの照明角度と前記サンプルから出る光の検出角度とを選択的に制御し、前記上流側の空間的光変調器はサンプルの所望の照明角度と検出を選択すべく、空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プロ

50

グラミングを含む変調器コントローラに作動可能に接続されて、前記所望の照明角度と検出に対応する前記各光透過画素の選択された部分がオンにされる。他の実施形態において、前記顕微鏡はサンプルに到達する光量を選択的に制御し、この量は前記照明光路の開始部分に配置された光源から出射される全ての光以下になっており、前記上流側の空間的光変調器は照明の所望の量を選択すべく、前記空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する変調器コントローラに作動的に接続されて、前記所望の照明量に対応する個々の光透過画素の選択された部分がオンにされる。

【0010】

他の実施形態において、前記顕微鏡は透過型顕微鏡又は反射型顕微鏡である。前記顕微鏡は光源と前記空間的光変調器との間の照明光路内に配設されたレンズを含み、該光源は前記上流側の空間的光変調器から上流側に配置された前記対物レンズの開口絞りの共役画像面に配設することができる。前記顕微鏡は、更に、検出光路内に配設され、前記対物レンズの開口絞りの下流側の共役画像面に配置され、且つ第2の空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する第2の変調器コントローラに作動的に接続される第2の空間的光変調器を含むことができる。好ましくは、前記第1の変調器コントローラは、第2の変調器コントローラに作動的に接続され、前記検出光路内における光を前記第2光変調器が選択的に制御することにより、前記第1の変調器コントローラで選択された前記所望の角度に対応する。本明細書で説明する各種コントローラは、別々のコントローラにするか又は単一（共通）のコントローラにすることができる。

【0011】

更に他の実施形態において、前記顕微鏡は暗視野顕微鏡法を提供し、前記上流側の空間的光変調器は暗視野顕微鏡法の所望パターンの選択のために、前記空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する第1の変調器コントローラに作動的に接続されて、暗視野顕微鏡法用の所望のパターンに対応する前記個々の光透過画素の選択された部分がオンになり、第2の空間的光変調器は検出光路内に配設され、前記対物レンズの開口絞りの下流側の共役画像面に配置され、且つオンになっている前記第1の空間的光変調器の前記個々の光透過画素のパターンを相補する前記第2の空間的光変調器の個々の光透過画素の相補的模式パターンを選択すべく、前記第2の空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する第2の変調器コントローラに作動的に接続され、かくしてオンになっている前記第2の空間的光変調器の前記個々の光透過画素の相補的模式パターンを提供する。

【0012】

多くの実施形態において、顕微鏡は暗視野顕微鏡法と明視野顕微鏡法とを交互に変更する。これは、例えば、前記第1の変調器コントローラと前記第2の変調器コントローラとが前記第1及び第2の空間的光変調器の透過特性を制御し、明視野顕微鏡法と少なくとも暗明視野顕微鏡法用の1つの所望のパターンとに切り替えることによって達成することができる。周期的方法又はある方法から成るこの実施形態と他の実施形態の場合、顕微鏡は、例えば、約0.3秒以下で画像を入手する目的で、人間の目又はビデオ・カメラ等の検出器に対して必要とされる時間以下のサイクル又は処理時間で暗視野顕微鏡法と明視野顕微鏡法とを前後に変更する方法又はサイクルを実施することが好ましく、これにより所望ならばリアルタイム観察を提供する。他の好ましい実施形態において、前記顕微鏡は、再焦点合わせを伴わずに、暗視野顕微鏡法と明視野顕微鏡法とを交互に変更する。

【0013】

他に別段の説明がある場合を除き、又は文脈から明らかである場合を除き、本発明の実施形態の全てを組み合わせる一致させることができる。本発明のこの他の実施形態に対する更に多くの実施形態において、前記顕微鏡は更に検出光路の下流側端部に配置された光検出器を含み、該光検出器は個々の検出画素の検出列を含む。いくつかの実施形態において、前記個々の検出画素の検出列は前記上流側空間光変調器内の前記個々の光透過画素の照明列に対応し、その照明列と位置合わせをされており、前記個々の検出画素の検出列は検出器コントローラに作動的に接続され、前記空間的光変調器内の前記個々の光透過画素の

照明列は前記変調器コントローラに接続され、これにより前記変調器コントローラはサンプルの複数の所望の照明角度を選択するコンピュータ実行型プログラミングを含み、前記検出器コントローラは前記複数の所望の照明角度及び検出に対応する前記個々の検出画素の検出列内の強度変化を検出し、その状態から前記サンプルの3次元画像を決定するコンピュータ実行型プログラミングを内包する。前の諸実施形態と結合可能な他の実施形態において、前記変調器コントローラはサンプル内の対応する複数の異なる深さにおいて前記サンプルの複数の画像を提供するため、前記サンプルの照明の複数の所望の照明角度を選択し、再生コントローラは前記サンプルの3次元画像を提供すべく、前記異なる画像をトモグラフィ的に再生するコンピュータ実行型プログラミングを内包する。

【0014】

10

多くの実施形態において、前記変調器コントローラは、対応する複数の異なる深さにおけるサンプルの前記複数の画像が前記サンプル、コンデンサ・レンズ又は対物レンズを移動させずに得られるように、前記サンプルの前記複数の所望の照明角度を選択する。

【0015】

他の実施形態において、前記光検出器は、電荷結合デバイス、電荷注入デバイス、ビデオ・カメラであり、前記顕微鏡は、1以上の光増倍管及び/又は検出光路の下流側端部に配置された接眼アイピースを含む。前記空間的光変調器は、例えば、デジタル・マイクロミラー装置、マイクロシャッター、液晶装置であることができる。

【0016】

他の実施形態において、本発明は、可変視野虹彩を含む顕微鏡であって、個々の光透過画素の照明列を有し、且つサンプルの共役画像面にある照明光路に配設されて上流側空間光変調器をとり、更に複数の所望の視野虹彩設定を選択すべく、前記上流側空間光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する変調器コントローラに作動的に接続される空間的光変調器を含む顕微鏡を提供する。本発明のこの実施形態と他の諸実施形態に対する多くの実施形態において、前記照明列の個々の光透過画素は前記所望の視野虹彩設定に対応してオン/オフになる。

20

【0017】

他の実施形態において、本発明は選択された画像を顕微鏡のサンプルの画像面内に投影する顕微鏡であって、個々の光透過画素の照明列を有し、且つサンプルの共役画像面にある第1の照明光路内に配設されて第1の上流側空間的光変調器となる空間的光変調器と、照明光を前記サンプルに対して提供する第2の照明光路とを含み、前記上流側空間的光変調器が選択された画像に対応するように前記照明列の個々の光透過画素のオン/オフ状態を変更するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続されて成る顕微鏡を提供する。その選択された画像はサンプル上又はサンプルに隣接して又は所望ならば他の場所に投影できる。

30

【0018】

他の実施形態において、前記上流側の空間的光変調器は前記第1の照明光路と前記第2の照明光路とに配設され、前記照明列の個々の光透過画素の第1の部分はサンプルに対して照明光を提供し、前記照明列の個々の光透過画素の第2の部分は選択された画像に対応してオン/オフ状態になる。

40

【0019】

別の実施形態において、前記顕微鏡は更に、前記サンプルの共役画像面にある検出光路内の前記サンプルから下流側に配設された光検出器を含み、前記空間的光変調器と前記光検出器とは上流側の空間的光変調器の透過特性を制御し、且つ前記光検出器で提供される光強度検出データを編集するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続され、前記コントローラは前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を選択的に変更し、前記サンプルの選択されたスポットに当たる光強度を変更し、かくして前記サンプルの前記選択されたスポットから出て且つ前記光検出器の少なくとも1つの画素に当たる光強度を変更する。

【0020】

50

別の実施形態において、本発明は、サンプルから光検出器に至る光強度を変更する顕微鏡であって、個々の光透過画素の照明列を有し、且つ前記サンプルの共役画像面にある照明光路に配設されて上流側の空間的光変調器となる空間的光変調器を含み、前記光検出器は個々の検出画素の検出列を含み、且つ前記サンプルの共役画像面にある検出光路内の前記サンプルから下流側に配設され、前記空間的光変調器と前記光検出器とは前記上流側の空間的光変調器の透過特性を制御し且つ前記光検出器で提供される光強度検出データを編集するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続され、前記コントローラが前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を選択的に変更して前記サンプルの選択されたスポット上に当たる光強度を変更し、かくして前記サンプルの前記選択されたスポットから出て前記光検出器の少なくとも1つの画素上に当たる光強度を変更する顕微鏡を提供する。

10

【0021】

更に他の実施形態において、本発明は、サンプルから光検出器に至る光強度を変更する顕微鏡であって、個々の光透過画素の照明列を有し、且つ前記サンプルの共役画像面にある照明光路に配設されて上流側の空間的光変調器となる空間的光変調器を含み、前記光検出器は個々の検出画素の検出列を含み、且つ前記サンプルの共役画像面にある検出光路内の前記サンプルから下流側に配設され、前記空間的光変調器と前記光検出器とは前記上流側の空間的光変調器の透過特性を制御し且つ前記光検出器で提供される光強度検出データを編集するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続され、前記コントローラが前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/

20

【0022】

各種実施形態において、前記光検出器の画素上に当たる光強度が著しくその隣接画素に悪影響を与えることを示す閾値レベル以上になった場合、前記上流側の空間的光変調器内の少なくとも1つの対応する画素が前記光検出器の画素上に当たる光強度を前記閾値レベル以下に低減させるのに十分な時間にわたりオフ状態にされるように、前記コントローラが前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を選択的に変更する。別の実施形態において、前記コントローラは、前記光検出器の画素の前記検出列に当たる光強度が

30

【0023】

更に他の実施形態において、前記顕微鏡は、更に、前記検出光経路内に配設され、サンプルの下流側共役画像面に配置され、且つ前記第2の空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する第2の変調器コントローラに作動的に接続されている第2の空間的光変調器を含む。他の実施形態において、前記顕微鏡は共焦点型顕微鏡であり、個々の検出画素の前記検出列は前記上流側の空間的光変調器内の個々の光透過画素の前記照明列に対応し、その照明列と位置合わせされている。前記少なくとも1つのコントローラは、隣接する画素がオフ状態であって前記検出列が選択的に照明スポットを検出する間に、前記上流側の空間的光変調器の少なくとも1つの個々の光透過画素をオン状態にすることにより、前記サンプルに対して少なくとも1つの照明スポットを提供すべく、前記上流側の空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを包む。好ましい実施形態において、前記少なくとも1つのコントローラは、前記上流側の空間的光変調器により複数の照明スポットを同時に形成すると共に前記スポットの連続的な相補的パターンを提供する。

40

【0024】

更に他の実施形態において、前記少なくとも1つのコントローラは、オン状態になってい

50

る前記上流側の空間的光変調器の個々の光透過画素と位置合わせされてその画素に対応する中央検出画素に当たる光のみを前記光検出器に検出させる。前記少なくとも1つのコントローラは、オン状態にある前記上流側の空間的光変調器の個々の光透過画素と位置合わせされた中央検出画素に当たる光を前記光検出器に検出させると共に、前記中央検出画素に隣接する少なくとも1つの検出画素に当たる光を検出させることができ、前記コントローラは少なくとも1つの隣接する検出画素で提供されるデータを編集して、それを前記中央検出画素で提供されるデータと結合するコンピュータ実行型プログラミングを包む。一部の好ましい実施形態において、前記コンピュータ実行型プログラミングは前記隣接する検出画素で提供されるデータを編集し、それを前記隣接する検出画素からのデータを伴わない焦点と比較して顕微鏡の焦点ずれ情報を改善し、及び/又は前記隣接する検出画素で提供されるデータを編集し、当該データを前記中央検出画素で提供されるデータと結合して前記サンプルの光吸収特性を決定する。

10

【0025】

更に他の実施形態において、本発明は個々の光透過画素の第1の照明列を有し、対物レンズの開口絞りの共役画像面にある照明光路に配設されて第1の上流側空間的光変調器となる第1の空間的光変調器と、個々の光透過画素の第2の照明列を有し、サンプルの共役画像面にある前記照明光路に配設されて第2の上流側の空間的光変調器となる第2の空間的光変調器とを含む顕微鏡を提供する。他の実施形態において、前記顕微鏡は、更に、前記対物レンズの開口絞りの前記下流側共役画像面において配設された第3の空間的光変調器を含み、及び/又は第4の空間的光変調器は検出光路内に配設され、所望の検出器及び/又はコントローラと同様サンプルの前記下流側の共役画像面に配置されている。

20

【0026】

多くの実施形態において、前記顕微鏡は共焦点特性を提供し、サンプルの照明角度と前記サンプルから出る光の検出角度を選択的に制御し、前記第1の空間的光変調器の透過特性を制御する前記コンピュータ実行型プログラミングは所望の照明角度と前記サンプルの検出角度を選択し、前記所望の照明角度と検出角度に対応する前記第1の空間的光変調器の前記個々の光透過画素の選択された部分はオン状態であり、前記第2の空間的光変調器の透過特性を制御する前記コンピュータ実行型プログラミングは、隣接画素がオフ状態で前記検出列の前記検出画素が前記照明スポットを選択的に検出するような位置にある間に、前記第2の空間的光変調器の少なくとも1つの個々の光透過画素をオン状態にすることにより、少なくとも1つの照明スポットを前記サンプルに提供する。

30

【0027】

他の実施形態において、前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記第1の空間的光変調器内の前記個々の光透過画素の照明列により前記サンプルの複数の所望の照明角度を提供し、前記個々の検出画素の検出列により前記複数の所望の照明角度に対応する前記個々の検出画素の検出列における強度変化を検出し、該強度変化で前記サンプルの3次元画像を決定する。前記コンピュータ実行型プログラミングは、また前記第1の空間的光変調器内の前記個々の光透過画素の照明列によりサンプルの複数の所望の照明角度を提供し、前記サンプル内の対応する複数の異なる深さにおいて前記サンプルの複数の画像を提供し、次いで異なる画像をトモグラフィー的に再生して前記サンプルの3次元画像を提供することができる。

40

【0028】

これらの実施形態は、好ましくはサンプル、コンデンサ・レンズ又は対物レンズを移動させずに実行され、また前記第1の空間的光変調器内の個々の光透過画素の照明列により暗視野顕微鏡法用の所望のパターンを提供し、暗視野顕微鏡法用の所望のパターンに対応する前記個々の光透過画素の選択された部分がオンであり、前記第3の空間的光変調器の個々の光透過画素の相補的パターンがオンになっている。この顕微鏡は再焦点合わせ無しに暗視野顕微鏡法と明視野顕微鏡法を交互に変更することができる。

【0029】

更に他の実施形態において、前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記光検出器に

50

よりオン状態になる前記第2空間的光変調器の個々の光透過画素と位置合わせされてその画素に対応する中央検出画素に当たる光のみを検出させ、前記少なくとも1つの隣接する検出画素で提供されるデータを編集し、それを前記中央検出画素で提供されるデータと結合することができる。したがって、顕微鏡の焦点が前記隣接する検出画素からのデータを伴わない焦点と比較して改善されるように、前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記隣接する検出画素により提供されるデータを編集し、そのデータを前記中央検出画素により提供されるデータと結合することができる。

【0030】

更に他の実施形態において、前記顕微鏡は時間遅延型蛍光検出を提供し、前記コンピュータ実行型プログラミングは、前記空間的光変調器の少なくとも1つによりサンプル内に蛍光を誘起させるのに適当な時間にわたり前記サンプルを照明し、次いで前記サンプルの照明を停止し、次いで前記検出器により前記サンプルから出る蛍光の検出を開始させる。

10

【0031】

更に他の実施形態において、本発明は、対物レンズの開口絞りの共役画像面にある照明光路内に配設された空間的光変調手段を含む顕微鏡を提供し、前記空間的光変調手段はサンプルの所望の照明角度を選択的に制御する手段を含み、前記空間的光変調手段は前記サンプルの前記所望の照明角度を選択すべく、前記空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ手段に作動的に接続される。前記顕微鏡は可変視野虹彩を含むことができ、前記顕微鏡はサンプルの共役画像面にある照明光路内に配設される空間的光変調手段を含み、前記空間的光変調手段が、前記空間的光変調の透過特性を制御すると共に複数の所望の視野虹彩設定を選択するコンピュータ手段に作動的に接続される。

20

【0032】

更に他の実施形態において、本発明は、選択された画像をサンプルの画像面内に投影する顕微鏡であって、サンプルの共役画像面にある照明光路内に配設される空間的光変調手段と照明光を前記サンプルに提供する第2の照明光路とを含み、前記空間的光変調手段が、前記空間的光変調手段の透過特性を制御すると共に前記サンプルの前記画像面内に前記選択された画像を投影する少なくとも1つのコンピュータ手段に作動的に接続される顕微鏡を提供する。

【0033】

更に他の実施形態において、本発明は、照明光の均一強度をサンプルに提供する顕微鏡であって、前記サンプルの共役画像面にある照明光内に配設される空間的光変調手段と、前記サンプルの共役画像面にある前記空間的光変調手段から下流側に配設され、前記空間的光変調手段から直接光を受光する光検出手段とを含み、前記空間的光変調手段と前記光検出手段とは前記空間的光変調手段の透過特性を制御すると共に前記光検出手段で提供される光強度検出データを編集する少なくとも1つのコンピュータ手段に作動的に接続され、前記コンピュータ手段は前記空間的光変調手段の透過特性を選択的に制御して、前記光検出器で検出される不均一な光強度を補償し、かくして前記サンプルに透過される照明光の均一強度を提供する顕微鏡を提供する。

30

【0034】

更に他の実施形態において、本発明は、サンプルから光検出手段に至る光強度を変更する顕微鏡であって、前記サンプルの共役画像面にある照明光路内に配設される空間的光変調手段と、前記サンプルの共役画像面にある検出光路内の前記サンプルから下流側に配設される光検出手段とを含み、前記空間的光変調手段と前記光検出手段とは前記空間的光変調手段の透過特性を制御すると共に前記光検出手段で提供される光強度検出データを編集する少なくとも1つのコンピュータ手段に作動的に接続され、前記コンピュータ手段は前記空間的光変調手段の透過特性を選択的に制御して、前記サンプルの前記選択されたスポット上に当たる光強度を変更し、前記サンプルの前記選択されたスポットから出て且つ前記光検出器の少なくとも1つの画素上に当たる光強度を変更する顕微鏡を提供する。

40

【0035】

いくつかの実施形態において、前記コンピュータ手段は、前記光検出手段の画素上に当た

50

る光強度が著しく隣接画素に対して悪影響を与えることを示す閾値レベル以上の場合、前記空間的光変調手段の透過特性を前記光検出手段の画素に当たる光強度を閾値レベル以下に低減させるのに十分な時間にわたって変更させる。他の実施形態において、前記コンピュータ手段は、前記光検出手段に当たる光強度が、前記光検出手段の前後で均一となるように、前記空間的光変調手段の透過特性を選択的に変更し、前記空間的光変調手段の透過特性の変更を決定することにより、前記サンプルの光強度特性を決定する。前記顕微鏡は更に、サンプルの下流側共役画像面にある検出光路内に配設された第2の空間的光変調手段であって第2の空間的光変調手段の透過特性を制御する第2のコンピュータ手段に作動的に接続される第2の空間的光変調手段を含むことができる。

【0036】

10

更に他の実施形態において、本発明は、対物レンズの開口絞りの共役画像面にある照明光路内に配設される第1の空間的光変調手段と、サンプルの共役画像面にある前記照明光路内に配設される第2の空間的光変調手段とを含む顕微鏡を提供する。この顕微鏡は更に、前記対物レンズの開口絞りの前記下流側共役画像面に配設される第3の空間的光変調手段を含むことができ、第4の空間的光変調手段は、前記サンプルの前記下流側共役画像面に配置される前記検出光路内に配設され、又は前記検出光路の下流側端部に配置された光検出手段を含む。前記空間的光変調手段と前記光検出手段とは全て空間的光変調手段と前記光検出手段との少なくとも一方の光透過又は検出特性を制御する少なくとも1つのコンピュータ手段に作動的に接続される。

【0037】

20

更に他の実施形態において、本発明は、顕微鏡内の照明光路を変調する方法であって、前記照明光路が対物レンズの開口絞りの共役画像面における個々の光透過画素の照明列を含む空間的光変調器を含み、前記空間的光変調器の光透過特性を選択することにより、前記照明光路を変調することを含む方法を提供する。この方法は光が前記空間的光変調器を通過して前記空間的光変調器により光を変調させるように、前記照明光路に沿って光を透過することを含むことができる。

【0038】

いくつかの実施形態において、この方法は、所望の照明角度と検出に対応する個々の光透過画素の選択された部分をオンにすることにより、サンプルの照明角度と前記サンプルから出る光の検出角度を選択的に制御することをむ。他の実施形態において、この方法は、更に、サンプルに到達する、照明光路の開始個所に配置された光源から出射される全ての光以下である光量を選択的に制御することを含み、所望の照明量に対応して前記個々の光透過画素の選択された部分をオンにすることにより、前記所望の照明量を選択することを含む。他の実施形態において、この方法は、更に暗視野顕微鏡法を含み、また更に、暗視野顕微鏡法用の所望のパターンに対応する前記照明列の個々の光透過画素の選択された部分に設定を行うことと、前記照明列の所望のパターンを相補する相補的模式パターンに対応する前記第2の列の選択された部分に設定を行うことを含む。この方法は、更に、再焦点化を伴う又は伴わずに暗視野顕微鏡法と明視野顕微鏡法を交互に変更することを含むことができる。

30

【0039】

40

更に他の実施形態において、前記空間的光変調器は該空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する変調器コントローラに接続され、更に前記顕微鏡は個々の検出画素の検出列を含み、検出光路下流側端部に配置される光検出器を含み、前記光検出器は前記検出列の検出特性を制御するコンピュータ実行型プログラムを含む検出器コントローラに作動的に接続されて、更に前記サンプルの複数の所望の照明角度を選択することと、前記複数の所望の照明角度に対応する前記検出列内の強度変化を検出し、そこから前記サンプルの3次元画像を決定することとを含む。代替的に、この方法は、サンプルの複数の所望の照明角度を選択して、前記サンプル内の対応する複数の異なる深さにおいて前記サンプルの複数の画像を提供することと、異なる画像をトモグラフィ的に再生して、前記サンプルの3次元画像を提供することとを含むことができる。好ま

50

しくは、前記選択及び再生は前記サンプル、コンデンサ・レンズ又は対物レンズを移動させずに実施される。

【0040】

更に他の実施形態において、本発明は、個々の光透過画素の照明列を含み、且つサンプルの共役画像面にある照明光路内に配設された空間的光変調器を有し、前記空間的光変調器が、該空間的光変調器の透過特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する変調器コントローラに作動的に接続されるようにした顕微鏡内の視野虹彩を変更する方法であって、前記照明の個々の光透過画素を所望の視野虹彩設定に対応するオン/オフ状態に設定することにより、前記所望の視野虹彩セットを選択し、次いで前記照明列の個々の光透過画素を所望の異なる視野虹彩セットに対応する異なるオン/オフ状態に変更することにより、前記視野虹彩を変更することを含む方法を提供する。

10

【0041】

更に、多くの実施形態において、本発明は、個々の光透過画素の照明列を含み、且つサンプルの共役画像面において第1の照明光路内に配設されて第1の空間的光変調器とする空間的光変調器とサンプルに照明光を与える第2の照明光路とを有し、前記第1の空間的光変調器は選択された画像に対応するように前記照明列の個々の光透過画素のオン/オフ状態を変更するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続されるようにした顕微鏡のサンプルの画像面内に選択された画像を投影する方法であって、前記個々の光透過画素を前記選択された画像に対応するオン/オフ状態に設定し、前記サンプルの画像面迄の前記照明光路に沿って前記空間的光変調器を通過した光が前記選択された画像を搬送するように、光を前記空間的光変調器上へ投影することを含む方法を提供する。この方法は、更に、前記選択された画素を前記サンプルに又は前記サンプルに隣接して投影することを含むことができる。

20

【0042】

他の実施形態において、この顕微鏡は、更に、検出列を含み、前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を選択的に変更して、前記サンプルの選択されたスポット上に当たる光強度を変更することにより、前記サンプルの前記選択されたスポットから出て前記光検出器の少なくとも1つの画素に当たる光強度を変更することを含む。

【0043】

更に他の実施形態において、本発明は、照明光の均一な強度を顕微鏡内のサンプルに提供する方法であって、前記顕微鏡が個々の光透過画素の照明列を含み、且つサンプルの共役画像面にある照明光路内に配設される空間的光変調器と、個々の検出器画素の検出器列を含み、且つ前記サンプルの共役画像面における前記上流側の空間的光変調器から下流側に配設され、直接前記上流側の空間的光変調器から光を受光する光検出器とを有し、前記空間的光変調器と前記光検出器とが、前記上流側の空間的光変調器の透過特性を制御し且つ前記光検出器で提供される光強度検出データを編集するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続される方法において、前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を変更して、前記光検出器で検出される不均一な光強度を補償し、かくして前記サンプルに透過される照明光の均一強度を提供することを含む方法を提供する。

30

40

【0044】

更に他の実施形態において、本発明はサンプルから顕微鏡内の光検出器に至る光強度を変更する方法であって、前記顕微鏡が個々の光透過画素の照明列を含み、且つ前記サンプルの共役画像面にある照明光路内に配設される空間的光変調器と、個々の検出画素の検出列を含み、且つ前記サンプルの共役画像面にある検出光路内で前記サンプルから下流側に配設された光検出器とを有し、前記空間的光変調器と光検出器とが、前記空間的光変調器の透過特性を制御し且つ前記光検出器で検出される光強度検出データを編集するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続される方法において、前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を変更して、前記サンプルの選択されたスポットから出て前記光検出器の少なくとも1つの画素上に当た

50

る光強度を変更するように、前記サンプルの前記選択されたスポット上に当たる光強度を変更することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を選択的に変更して、前記光検出器の画素に当たる光強度が隣接する画素に著しく悪影響を与えることを示す閾値レベル以上の場合、前記光検出器の画素上に当たる光強度を前記閾値レベル以下に低減するのに十分な時間にわたり空間的光変調器内の少なくとも1つの対応する画素をオフにすることを含むことができる。この本方法は前記空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を選択的に変更して、前記光検出器の画素の検出列に当たる光強度が検出列前後で均一となるようにし、前記上流側の空間的光変調器の照明列内の個々の画素がオン又はオフになる時間の量を決定することにより、前記サンプルの光強度特性を決定することを含むことができる。

10

【0045】

更に他のいくつかの実施形態において、前記顕微鏡は共焦点顕微鏡であり、隣接する画素がオフの状態中に前記空間的光変調器の少なくとも1つの個々の光透過画素をオン状態にすることにより、少なくとも1つの照明スポットを前記サンプルに提供し、次いで前記検出列が前記照明スポットを選択的に検出することを含む。好ましくは、前記空間的光変調器は同時に複数の照明スポットを形成し、前記スポットの連続する相補的パターンを提供する。他の実施形態において、本方法は更にオンしている空間的光変調器の個々の光透過画素と位置合わせされた中央検出画素に当たる光を検出することと、前記中央検出画素に隣接する少なくとも1つの検出画素に当たる光を検出することと、前記少なくとも1つの隣接する検出画素により提供されるデータを編集し、そのデータを前記中央検出画素で提供されるデータと結合することを含む。この方法は、更に、前記顕微鏡の焦点ずれ情報が前記隣接検出画素からのデータを伴わない焦点と比較されて改善されるように、前記隣接する検出画素で提供されるデータを編集し、そのデータを前記中央検出画素で提供されるデータと結合することを含み、又は、前記隣接する検出画素で提供されるデータを編集し、そのデータを中央検出画素で提供されるデータと結合し、更にそこから前記サンプルの光吸収特性を決定することを含むことができる。

20

【0046】

いくつかの実施形態において、本方法はリアル・タイムで直接見ることができる共焦点顕微鏡法を提供する。

【0047】

他の実施形態において、本発明は、個々の光透過画素の第1の照明列を含み、対物レンズの開口絞りの共役画像面にある照明光路内に配設されて第1の上流側空間的光変調器となる第1の空間的光変調器と、個々の光透過画素の第2の照明列を含み、サンプルの共役画像面にある前記照明光路内に配設されて第2の上流側の空間的光変調器となる第2の空間的光変調器と、前記検出光路の下流側端部に配置された光検出器であって個々の検出画素の検出列から成る光検出器とを有する顕微鏡の使用を含む共焦点顕微鏡法であって、前記空間的光変調器と光検出器とが、前記空間的光変調器と前記光検出器の光透過又は検出特性を制御するコンピュータ実行型プログラミングを内包する少なくとも1つのコントローラに作動的に接続されるようにした方法において、所望の照明角度と検出角度に対応する前記第1の照明列の個々の光透過画素の選択された部分をオンにすることにより、前記所望の照明角度と検出角度を選択し、隣接画素がオフの状態にある間に、前記第2の照明列の少なくとも1つの個々の光透過画素がオンとなり、前記検出列の検出画素が照明スポットを選択的に検出する目的で配置されるように、前記所望の照明スポットに対応する前記第2の照明列の個々の光透過画素の選択された部分をオンにすることにより、所望の照明を選択することを含む方法を提供する。こうした方法は、更に、サンプル、コンデンサ・レンズ又は対物レンズを移動させるか移動させずに3次元画像化を提供することができる。

30

40

【0048】

多くの実施形態において、本発明は、時間遅延蛍光検出を含み、前記サンプル内に蛍光を誘起させるのに適当な時間量にわたり前記サンプルを照明し、前記サンプルの照明を停止

50

し、次いで前記サンプルから出る蛍光を検出することを含む。

【0049】

本発明のこれらの実施形態と他の実施形態については以下の詳細な説明と添付図面を参照することで明らかとなろう。その上、一部の装置と方法について（例えば空間的光変調器等を）一層詳細に述べている各種資料を本明細書に記載している。かかる資料は全てその全体が参考として本明細書に含まれるものとする。

【0050】

【発明の実施の形態】

本発明は、サンプルと接触する光を制御するのに著しく有利な顕微鏡を提供する。この顕微鏡は、使用者の目やビデオ・カメラ等の光検出器に接触する光を制御することに関して10
も利点を備えている。この高度化された制御装置には、サンプルに到達する光が1以上の所望の特性を有するように、照明角度、光量、サンプル及び/又は検出器に達する光の位置について増強された選択的制御が含まれている。本発明は、対物レンズの開口絞りの共役画像面とサンプルの共役画像面の一方もしくは両者において顕微鏡の照明における1以上の空間的光変調及び/又は顕微鏡の検出光路を配置することによりこれらの諸利点を提供する。

【0051】

【用語の定義】

「空間的光変調器」（SLM）は、光を選択的に変調することができる装置である。本発明において空間的光変調器は、顕微鏡の光路内に配設される。典型的には、空間的光変調器は個々の光透過画素の列を含み、これら光透過画素は光路に沿って光を透過もしくは通過させ又は光をブロックし且つ（例えば、光を吸収するか又はその光を光路外に反射させることにより）光路に沿って続行することを防止するように透過特性を有する複数のスポットとなっている。こうした画素化された列は、多重パターン合計列としても参照する当技術で公知のものであり、電磁液晶デバイスの列により、デジタル・マイクロ・ミラー装置により又は静電マイクロシャッターにより、形成可能である。米国特許第5、587、832号；R.ビュロイミア（Vuellemier）、新規な電気機械的マイクロシャッター表示装置、Proc.ユーロディスプレイ（Eurodisplay）'84、表示研究会議、1984年9月参照のこと。デジタル・マイクロ・ミラー装置は、米国テキサス州ダラスのテキサス・インスツルメンツ社から入手可能である。20

【0052】

「照明光路」は光源からサンプルまでの光路であり、「検出光路」はサンプルから出て検出器に至る光に対しての光路である。サンプルから出る光には、サンプルから反射しサンプルを透過し又はサンプル内で作成される光、例えば光の適当な波長（典型的にはUV又は青色光線）による励起にしたがってサンプル内で発生される蛍光光線が含まれる。30

【0053】

「対物レンズの開口絞りの共役画像面」は、対物レンズの開口絞りの画像が再び作り出される照明又は検出光路のいずれかにおける面である。典型的には、この画像面は、本発明では、白色光、アーク灯又はレーザー等の任意な光源にすることができる光源の画像再生が含まれている。対物レンズの開口絞りの共役画像面は、サンプルから出る検出光の角度と同様究極的にサンプルに照射される照明光の角度を制御する位置を定める。（「照明角度」と「検出角度」は、サンプルに当たるか又はサンプルから出る光の角度を参照している。）40

「サンプルの共役画像面」は、サンプルの画像が再生される照明光路か又は検出光路のいずれかにおける面である。光検出器は、典型的には、検出光路内のこうした1つの回路に配置される。サンプルの共役画像面は、（共役面が照明光路又は検出光路内にあるか否かに応じて）照明され及び/又は検出されるサンプル上でのスポットの大きさと位置を制御することができる個所を定義付けしている。サンプルの画像面はサンプルが設置される面であるが、サンプルの画像面は複数の光路が提供されるか又は照明領域がサンプルの大きさより大きいか又は小さい場合実際のサンプルの大きさより大きいか又は小さくすること50

ができる。

【0054】

「コントローラ」は、本発明の装置と方法における空間的光変調器、検出器又は他の素子を制御することができる装置である。例えば、コントローラは、空間的光変調器内の画素の透過特性を制御することができ、（荷電結合型デバイス（CCD）、放電デバイス（CID）等の）画素化された光検出器の画素のオン/オフ状態を制御することができ及び/又は上流側空間光変調器を制御するフィードバックといった画像の作成もしくは再生のためこうしたデータを使用することを含む検出器から得られたデータを編集することができる。典型的には、コントローラは中央処理装置（CPU）を含むコンピュータ又は他の装置である。コントローラは当技術において公知であり、本発明の特定の実施例に対する望ましいコントローラの選択は本発明の開示内容に鑑み当技術の範囲内に入るものである。

10

【0055】

「上流側」及び「下流側」はその慣用的な意味で使用されており、その場合上流側は与えられた装置が光源に一層近いことを示し、下流側は与えられた装置が光源から一層離れていることを示している。

【0056】

本願において記載されている用語は「手段（means）」という単語が特にクレーム中に記載されていない場合は「手段（means）＋機能（function）」の関係を示すものとしてクレーム中で解釈すべきではない。これは過程又は方法クレームに対する「工程(step)」という用語の場合も該当する。

20

【0057】

本出願における他の用語と語句については前掲の定義付けにしたがって且つ本出願の他の部分において定義付けされる。

【0058】

【図面に示す実施例の説明】

ここで図面に移ると、図1は先に説明した従来技術としてのケーラー照明型顕微鏡を示す。

【0059】

図2Aは、この実施例においては本発明にしたがって顕微鏡内で使用されるデジタル・マイクロ・ミラー装置である空間的光検出器の概略図を示す。図2Aにおいて、光源4は光をデジタル・マイクロ・ミラー装置の複数のマイクロ・ミラー42に指向させる。マイクロ・ミラー42は側面図と平面図の両者で示されている。マイクロ・ミラー42が「オン」位置にあるとき、光源4からの光は照明光3に沿って反射されて、投影レンズ30を通過して画像面40に達する。個々の光透過画素である特定のマイクロ・ミラーが「オフ」位置にあると、光源4からの光はビーム停止体37に反射される。したがって、個々の光透過画素のオン/オフ状態は、画素が所望の光路に沿って光を伝達しているか否かにより、確立される。画素のオン/オフ状態は、極めて迅速に変更又は変えることができる。例えば、デジタル・マイクロ・ミラー装置において、ミラーは、例えば約0.3秒以下、更には約20 μ 秒の速さ等、人間の眼で観察できる値より短い時間でオンからオフ、そしてオン（又はその逆に）にと、サイクルを繰り返す。

30

40

【0060】

図2Bは、デジタル・マイクロ・ミラー装置34の詳細な平面概略図である。個々のマイクロ・ミラー46は、ミラー・ポスト48上部に配設されている。図示の実施例においては、ミラー同士の間には大略1 μm のギャップがあり、ミラー同士は約16 μm 約16 μm になっている。ミラーは、他の形状と大きさであってもよい。

【0061】

図2Cは使用状態にある本発明の空間的光変調器を概略的に表す。特に、デジタル・マイクロ・ミラー装置34は、複数本の光線を照明路3に沿って投影レンズ30に反射し、画像面40に至らしめる。デジタル・マイクロ・ミラー装置34の中央カラムにおいて、各デジタル・マイクロ・ミラーは、ミラーがオフの代わりにオン状態になっている時間の割

50

合が異なっている。例えば、図 2 C における最上方のマイクロ・ミラーは時間の 100% がオン状態にあり、図 2 C のカラムの最下方マイクロ・ミラーは時間の 100% がオフの状態にあり、両方のマイクロ・ミラーの間にある 4 つのミラーは 100% オンと 100% オフの間のオン/オフ状態になっている。したがって、中央カラムからの各光線は異なるビデオ視野時間 50 を有し、このビデオ視野時間は特定のマイクロ・ミラーに対するオン時間とオフ時間の量に対応している。

【0062】

図 3 は、サンプルの上流側共役画像面内における空間的光変調器を備えた本発明に係る顕微鏡の一実施例の概略図を示す。この顕微鏡は、動的照明制御を可能にする本明細書における諸実施例の 1 つである。光源 4 は、照明光路 3 に沿ってサンプル 20 に向かう第 1 の光線 6、第 2 の光線 8 及び第 3 の光線 10 を発生する。第 1 の光線は、最初にフィルター 36 を通過し、次にダイクロイックミラー 38 で反射され（ダイクロイックミラー 38 とフィルター 36 はダイクロイックミラー及びフィルター・ブロックのセット 28 内に維持されている）、また投影レンズ 30 を経て単一ミラー 32 で反射されて、これに続くデジタル・マイクロ・ミラー装置 34 である空間的光変調器に指向される。図 3 に示すように、この光透過画素は全て（即ち図面におけるマイクロ・ミラー）はオンになっており、したがって光線 6、8 及び 10 は全て対物レンズ・セット 22 及びサンプル 20 に向けて指向される。次に、この光は、サンプル 20 で反射され、対物レンズ 22 を経てデジタル・マイクロ・ミラー装置 34 及び単一のミラー 32 で更に反射されて、投影レンズ 30 を透過する。次に、この光は、2 色ミラー 38 及びフィルター 36 を通過し、最終的に光検出器 26 に至る。このように光は、検出光路 5 に沿ってサンプルから光検出器 26 に送られる。図 3 において、デジタル・マイクロ・ミラー装置 34 は、照明光路 3 及び検出光路 5 の各光路内でサンプルの共役画像面内に設置される。したがって、単一のデジタル・マイクロ・ミラー装置は、サンプルから上流側にあるかサンプルから下流側にあるそれぞれ第 1 の空間的光変調器及び第 2 の空間的光変調器の両者として機能する。光検出器 26 は、当技術で公知のように任意の光検出器にすることができ、例えば電荷結合装置（CCD）、放電装置（CID）、ビデオ・カメラ、光増倍管又は人間の目（この場合、光検出器は好ましくは目に対する義眼）を含む。所望ならば、複数の異なる光検出器を直列状態又は隣接する関係又は任意の所望関係にて使用することが可能である。好ましい実施例において、光検出器は、CCD 又は CID 若しくは空間的光変調器内の画素と典型的には同じ側に同じ値の複数のスポットを示す個々の検出画素の列（アレイ）として含む他の光検出器である。

【0063】

好ましい実施例において、光検出器 26 内における個々の検出画素の検出列（検出アレイ）は、空間的光変調器内における個々の光透過画素の照明列（照明アレイ）に対応し、その照明列と位置合わせされている。したがって、この検出列は同等数の画素を備えており、各画素は空間的光変調器列の画素と位置合わせされているか、又は当該画素のグループは相互に位置合わせされている。一部の実施例において、例えば図 3 に示すように、この位置合わせは、照明光路と検出光路との両者において所望の共役画像面に単一のデジタル・マイクロ・ミラー装置を使用することにより、実施することができる。

【0064】

デジタル・マイクロ・ミラー装置 34 は、これがサンプルの共役画像面に設置されるので、サンプルに到達する光量とその光の位置との両者を制御することができる。したがって、所望ならばデジタル・マイクロ・ミラー装置の単一画素を照明することができ、これは逆にサンプルの単一の対応する画素を照明し、したがって同時にそのサンプルの同じ画素を検出すると共に、その画素から光検出器 26 に情報を流すことが可能である。

【0065】

図 3 は反射型顕微鏡を表しており、これは光がサンプルから反射するが透過顕微鏡も表すことができることを意味している。これは、別々の第 2 の空間的光変調器が検出光路内で使用される場合は（又は適切なミラー又は他の装置が単一のデジタル・マイクロ・ミラー装置に戻る検出光路に向ける場合）、光がサンプルを透過することを意味している。図 5

は、空間的光変調器が単に照明光路内だけに配設されるが、検出光路内には配設されないことを除き、図3と同様の顕微鏡の概略図を示している。

【0066】

好ましくは、空間的光変調器内のパターンは、列内における個々の光透過画素の各透過画素を個別に制御する好ましくはPCコンピュータ等のコントローラに空間的光変調器を作動的に接続することにより行なわれる。更に好ましくは、コントローラは、単一ミラーを単一画素として制御するが、所望ならばコントローラは複数のミラーを単一画素として制御することができる。例えば、各個々の光透過画素は、図7A及び図7Bに示すように直ぐ近くに隣接するミラーのグループとすることができる。特に、図7は単一画素として隣接ミラーの使用を含む照明用の2つの異なる実施例を概略的に示す。図7Aにおいて、空間的光変調器における複数の個々のマイクロ・ミラーは、グループとしてオフにされる。図7Bは、異なるマイクロ・ミラー（又はマイクロシャッター又は他の選択された画素構成要素）が異なるオン/オフ状態を有し、したがってガウシアン照明プロファイル(Gaussian illumination profile)を提供する点を除いて同様の照明スポットを表しており、他の照明プロファイルも可能であることを示している。好ましい一実施例においては、空間的光変調器における個々の光画素の活性化したオンとオフとに関係する本発明の特徴と他の諸特徴とに対して、所定の事象のサイクル時間は、その変化を検出する人間の目に対して必要とされる時間以下、典型的には約0.3秒以下である。

【0067】

サンプルの上流側にあるサンプルの共役画像面内の空間的光変調器を含む図3及び図5に示す顕微鏡等の顕微鏡は、また、可変視野虹彩を提供することができる。可変視野虹彩は、照明スポットが共焦点顕微鏡法に対して使用される大きさに適した大きさより大きい虹彩を示している。視野虹彩は、異なる視野虹彩設定に対応する空間的光変調器の列におけるパターンを変えることにより、変えることができる。その上、特に顕微鏡が個々の検出画素の検出列を含む光検出器を含む場合、この顕微鏡はサンプルの選択されたスポット上に当たる光強度を変えるべく空間的光変調器における個々の光透過画素のオン/オフ状態を選択的に且つ制御可能に変えることができる。したがって、可変視野虹彩に対して100%オン又は100%オフの状態を達成可能なだけでなく、個々の画素の光強度は図2Cと図7Bに表された画素変動と同様に、所望に低減又は増加させることができる。

【0068】

サンプルの前後に光の均一な強度を提供する選択されたスポット上に当たる光強度を変える一実施例においては、デジタル・マイクロ・ミラー装置34等の空間的光変調器における列内の「オフ」画素と接触する光源4からの光が光検出器、好ましくは例えば図3のビーム停止体37の個所に設置された画素化された光検出器に指向される。光検出器は直接空間的光変調器から光を受光することが好ましいが、これは光がサンプルを通過せずに又はサンプルから離れるように反射することを意味している。好適性は劣るが、この光は空間的光変調器と光検出器との間に介在するレンズ、フィルタ等を通すことができる。ビーム停止体37は、好ましくはサンプルの画像面に設置され、光を直接空間的光変調器から受光し、空間的光変調器は全ての画素を「オフ」にすることができる。したがって、光源からの光は、全てビーム停止体37に設置された検出器に伝達されることになる。次に、検出器は、光源4から出る光内の強度を異なるレベルに微分化（微細化）することができ、したがって均一な光をサンプル20に提供すべくオン状態とオフ状態とを迅速に切り替えることにより、変動する強度を変えることができる（ビーム停止体37に配設された光検出器は、また所望ならばサンプルの共役画像面にも配設可能であろう）。こうした迅速な交代は、光検出器により検出された対応する画素の不均一な光強度を相補（補間）するように、空間的光変調器の個々の光透過画素のオン/オフ状態を選択的に変えるコントローラにより実行可能である。

【0069】

同様に、サンプルから出る光強度とサンプル上に当たる光強度との間に一般に比例関係（典型的には、約1：1の関係）が存在するので、顕微鏡はサンプルに指向される光強度を

10

20

30

40

50

変えることにより、サンプルから光検出器へ出る光強度を変えることができる。光検出器の特定の画素に照射する光強度が、この光強度が隣接する画素に著しく悪影響を与える（例えば、光の漏洩を介して又はこうした光の過剰強度を調整すべく人間の目等といった光検出器の無能力性により）ことを示す閾値レベルより高いか又はその閾値レベルと等しい場合、こうした顕微鏡は特に役立つ。検出器、典型的には検出器に作動的に接続されたコントローラが光検出器の特定の画素に当たる光が閾値レベルを超えたことを一旦決定すると、検出器とコントローラは検出器列の画素に到達する光強度が閾値レベルを下回る値に低減されるまで、検出器列の明る過ぎる画素に対応するサンプルの画素に透過されている光強度を低減させるべく照明列内の対応する画素のオン・オフ状態を変える。

【0070】

関連する実施例において、光検出器とコントローラとは、検出器に照射する光強度を検出し、次にその光の均一な強度が検出器列の画素に到達するまで、照明列内の対応する画素のオン・オフ状態を修正し、次に空間的光変調器内における照明光列内の個々の画素がオン又はオフになる時間の長さを決定してサンプルの光強度特性を決定することにより、サンプルの光強度特性を決定することができる。

【0071】

先に述べたように別の実施例において、顕微鏡は、更に、共焦点顕微鏡として機能することができる。この場合、空間的光変調器内における個々の光透過画素の照明列は、隣接画素がオフの状態にある間に空間的光変調器の少なくとも1つの個々の光透過画素をオン状態にすることにより、共焦点顕微鏡法に対して大きさを合わせられた少なくとも1つの照明スポットを提供するようにサンプルの共役画像面内にサンプルから上流側に配設されている。したがって、検出器列は照明スポットを選択的に検出する。好ましい実施例において、空間的光変調器は、同時に複数の照明スポットを形成し、次に図4に示すようにスポットの連続的な相補的パターンを提供する。特に、この図4に示すように、「オン」状態のミラー52は列内の黒色四画形として表され、「オフ」状態のミラー54は列内の白色四画形として表されている。一連の相補的パターンを連続的に提供し、本質的に同じパターンが繰り返されるが、時間経過に合わせて一方の画素から右側へ移動することにより全体のサンプルの共焦点画像を約18のオン/オフ・サイクルにより提供することができる。こうした共焦点顕微鏡法は、CCD又はCID等の画素化された検出器を使用して検出することができ、又は単一画素がビデオ・カメラ又は人間の眼における画像入手時間（又は他の検出器の画像入手時間）より早く照明され、次に再照明されるのに十分な迅速であればリアル・タイムの共焦点顕微鏡法を観察することができる。

【0072】

図6は、中央検出画素56が隣接画素又は包囲する画素58より一層強烈に照明される実施例を模式的に示しているが、サンプルの特性が原因でその包囲する画素は、実際には、中央の画素56のみが空間的光変調器における照明列内の照明オン状態の画素と直接位置合わせされているとしても、照明を受ける。共焦点顕微鏡法に特に有用であるが、他の実施例でも使用可能な実施例において、この顕微鏡は、オン状態にある照明光路内における空間的光変調器の個々の光透過画素と位置合わせされた中央検出画素に当たる光を検出し、また中央検出画素に隣接する少なくとも1つの画素に当たる光、好ましくは全ての隣接画素を検出するように光検出器を作動させるコンピュータ実行型プログラミングを含むコントローラを備えている。このコントローラには、また、隣接する検出画素で提供されるデータを編集し、そのデータを中央検出画素で提供されるデータと結合して顕微鏡で提供される情報を高度化するコンピュータ実行型プログラミングが備えられている。例えば、データのこうした結合は、顕微鏡の焦点ずれ情報の拒絶が隣接する検出器からのデータを伴わずに得られる焦点と対比されるとき、この拒絶を改善することができる。これの代りに、隣接画素からの情報は、光拡散及び/又はサンプルの吸収又は他の特性に関するデータを提供することができる。さらに代替的に、所望ならば、検出器は、検出器及び/又はコントローラがオン状態の照明画素に直接対応はするが、むしろ隣接画素から情報を収集するのみになっている中央検出器画素からの情報は検出しないようにセットすることがで

10

20

30

40

50

きる。

【0073】

更に他の実施例において、空間的光変調器はサンプルの上流側にあるサンプルの共役画像面内に配設することができ、照明列における個々の光透過画素のオン/オフ状態は選択された画像を画像面内（したがって顕微鏡のサンプルの共役画像面内）に投影するようにセットすることができる。好ましくは、空間的光変調器は、コントローラに対して別々に伝送されるか又はコントローラのメモリー内に予めセットされて記憶される画像に対応するように、個々の光透過画素のオン/オフ状態をセットし及び/又は変える少なくとも1つのコントローラに作動的に接続されている。

【0074】

選択された画像は直接サンプル上に投影することができ、又は選択された画像はサンプルに隣接して投影することができる。例えば、或る与えられたサンプルが所望の所定の状態に一致するか否かを決定するために顕微鏡が使用されている場合、こうした所定の状態を表す画像は、サンプル上へ又はサンプルに隣接して投影することができる。画像をサンプル上へ直接投影することは、極めて正確に予め決定された形状に対してはサンプル内の形状がその所定の形状に一致するか又は一致しないかを比較的容易に決定することができるようなステンシル的效果を提供することができる。こうした或る選択された画像を投影する顕微鏡は、空間的光変調器を使用せずにサンプルが照明される間にその選択された画像を投影する単一の空間的光変調器を含むか、又は一方の空間的光変調器がその選択された画像に対して適用され、他方の空間的光変調器が直接光をサンプルに対して伝送する目的に使用されるような2つの空間的光変調器を含み、若しくは本明細書で説明したような異なる機能に向けられた空間的光変調器の異なる部分を有する単一の空間的光変調器（例えば、サンプル照明用の一部と選択された画像投影器に対する一部分）を含むことができる。

【0075】

図8は、共焦点顕微鏡法に適している顕微鏡の一例を示す。図8における顕微鏡がサンプルから上流側にあるサンプルの共役画像面内にある第1のデジタル・マイクロ・ミラー装置及びサンプルから下流側に配設されているサンプルの共役画像面内に設置されている第2の別々のデジタル・マイクロ・ミラー装置34bを含む点を除き、この顕微鏡は図3及び図5に表された顕微鏡（これらの顕微鏡はまた共焦点顕微鏡法に対しても使用可能）と同様である。したがって、図8においては、光は、投影レンズ30aを通り、単一ミラー32aで反射されて、空間的光変調器34aで更に反射されるように、光源4から出射される。次に、空間的光変調器34aにより照明光路に沿って指向される光は、ダイクロイックミラー38で反射されて、対物レンズ22を通り、サンプル20に照射される。そこで光は、対物レンズ22を通る元の光路に向けて反射され、ダイクロイックミラー38を通過して、下流側の空間的光変調器34bに反射される。空間的光変調器34bを経る光は、検出光路に沿って単一ミラー32bに指向され、投影レンズ30bを通過して、光検出器26に至る。図8に示す顕微鏡の1つの利点は、2つの別々の空間的光変調器が存在しているので、この2つの空間的光変調器は内部での光透過画素に対して同様のオン・オフ状態を有する必要がない、という点にある。図8における実施例は、また、検出器が義眼、光増倍管（PMT）、ビデオ・カメラ又は他の非画素化装置である場合にも好ましい。その上検出光路内の下流側の空間的光変調器内における検出開口は、照明光路内に配設された空間的光変調器に対する先に述べたものと同じ様式で動的に変えることができる。

【0076】

図9に移ると、この図9は、第1の空間的光変調器が対物レンズの開口絞りの共役画像面内及びサンプルの上流側に配設され第2の空間的光変調器がサンプルの下流側でまた対物レンズの開口絞りの共役画像面内に配設されている顕微鏡を示している。簡単に述べると、光源4は、照明光路3に沿って指向され、光源レンズ12及び投影レンズ30Aを通過して、デジタル・マイクロ・ミラー装置34Aに達する光を出射する。デジタル・マイクロ・ミラー装置34Aは、光が、単一ミラー32Aで反射し、コンデンサ・レンズ16を通過

し、サンプル 20 を通過するように、光の所望部分を照明光路に沿って選択的に指向させる。サンプル 20 から出る光は、対物レンズ 22 を通過し、単一のミラー 32B で反射し、デジタル・マイクロ・ミラー装置 34B に伝送される。デジタル・マイクロ・ミラー装置 34B は、光の或る選択された部分を、投影レンズ 30B を経て検出光路 5 に沿って指向させて、光検出器 26 に到達させる。対物レンズの開口絞りの共役画像面内でサンプルから上流側に空間的光変調器を設けることにより、サンプルの照明角度、したがって同時にサンプルから出る光の検出角度を制御する能力が提供される。その上、こうした顕微鏡はサンプルに到達する光量を選択的に制御することができ、(サンプルの共役画像面内に配設された空間的光変調器の場合のように) 光量は、単にレンズ、フィルター等を介しての伝送が原因で、加工品の際は光量以下となる。幾つかの実施例において、光量は 1 % から 99 % の任意の値にまで低減させることができる。この光量の低減が所望の照明量を選択して、次に個々の光透過画素の対応する選択された部分をオン又はオフに切り替えることで達成可能である。こうした選択された部分は、少なくとも実質的には全体の照明光に対する相対的な照明の測定可能減少を達成するのに十分な全ての照明光以下になっている。

【0077】

図 9 に示すような対物レンズの開口絞りにおける共役画像面での空間的光変調器を備えている顕微鏡は、空間的光変調器の異なる領域がオン及びオフにされるのに伴い暗視野顕微鏡法、明視野顕微鏡法及びこれら 2 つの間の交互の変更並びに各種暗視野顕微鏡法の間の交互の変更を提供する。

【0078】

これは上流側における空間的光変調器における個々の光透過画素内の暗視野顕微鏡法に対する所望のパターンを選択することで行うことができる。こうした所望のパターンは個々の光透過画素の選択された部分を含み、当該部分は実質的にこうした画素全てを下回るものであり、これは明視野(明視野は広い面積の照明であり且つその同じ面積の検出である)に対して相対的に測定可能の暗視野効果が達成されるのに十分な程度に低減される。多くの実施例において、顕微鏡は元来又は単独でも暗視野効果をもたらす。次に相補的模式が好ましくは画素化された列内に相補的模式を含む第 2 のデジタル・マイクロ・ミラー装置の使用を介して検出光路内に設置される。相補的模式は、照明光路内の空間的光変調器内にセットされた所望のパターンに対する相補的模式である。例えば、所望のパターンが複数の同心円である場合、相補的模式はその相補的模式が所望のパターンにおいて光透過となっている同心円内でブロックする光となる場合を除きその同心円の対応するパターンとなろう。

【0079】

更に、こうした顕微鏡によって可能とされた照明角度における変更により、サンプルの 3 次元画像を決定することができる。例えば、サンプルは複数の異なる角度から照明することができ、したがって検出列内の個々の画素に当たる光強度変化を検出して結合し、コントローラにより編集及び/又は再生することにより、サンプルの 3 次元画像を提供できる。その上又はその代りに光の角度は、異なる深さにおいてサンプルの探りを入れる照明の複数の異なる角度を選択すべく変調することができる。したがって、異なる深さから得られた情報を得ることができ、典型的にはコントローラによりトモグラフィー的に再成が可能とされ、1 回に 1 つの層でサンプルの 3 次元画像を提供することができる。サンプル、コンデンサ・レンズ又は対物レンズ若しくは空間的光変調器以外の顕微鏡の他の部分を移動させずに、こうした 3 次元画像化を達成できる点が本発明の著しい利点である。

【0080】

これは、サンプル、コンデンサ・レンズ、対物レンズ、又は空間的光変調器の光透過画素以外の顕微鏡の他の部分を移動させずに、暗視野と明視野の間の交代と同様各種暗視野検査を実行する対物レンズ開口絞りの共役画像面において空間的光変調器を有する顕微鏡の能力と類似している。したがって、こうした交互の変更は、再焦点化無しに実行することができる。特に、対物レンズの開口絞りの共役画像面において空間的光変調器を有する顕微鏡の場合、暗視野顕微鏡法と明視野顕微鏡法との間の迅速な切り替えを行う他の利点は

、量的な明視野顕微鏡法における量的な測定過程中に通常は不正確に計算される、サンプルにより拡散及び/又は屈折される光をサンプル内の各個所において測定できる点にある。これは、吸収による光の損失量の一層正確な数量化を可能にする。これは、サンプルの与えられた領域上で吸収される光の全体量を数量化しようと試みる際に特に重要なものとなり得るものであり、サンプルの一層正確な空間的吸収を表す。

【0081】

本明細書で先に述べたように、3次元画像を作成する際は、典型的には、異なる照明角度に対して要求される画像の信号対雑音の比は、再生が不安定にならず、収束しない程度に十分高くなっている。分析されている3次元サンプルの厚さに応じて、多かれ少なかれ各画像には焦点外の情報が含まれる。使用する対物レンズの大略の焦点深さに関連してサンプルが厚過ぎると、この焦点ずれ情報は、焦点合わせ情報を圧倒することができ、再生を困難にするか又は不可能にもする。

10

【0082】

図10は、この問題点を解決する顕微鏡の一実施例を概略的に示す。要約すると、図10は4つの空間的光変調器を含み、その中の2つは照明光路内にあり、残り2つは検出光路内にある。各光路内の1つはサンプルの共役画像面内に設置され、残り1つは対物レンズの開口絞りの共役画像面内に設置される。したがって、図10において、光源4は、単一ミラー32aに向かって発光し、対物レンズの開口絞りの上流側にある共役画像面内に位置付けられた第1の空間的光変調器34aに光を反射する。空間的光変調器34aは、光の所望部分を、照明光路3に沿って投影レンズ30aにしこうさせる。その後この光は、単一ミラー32bで反射されて、サンプルの上流側共役画像面内に位置付けられた第2の空間的光変調器34bに指向される。第2の空間的光変調器34bは所望の光をコンデンサ・レンズ16を介してサンプル20に指向させ、その光は、サンプル20及び対物レンズ22を通り、サンプルの下流側共役画像面に位置付けられた第3の空間的光変調器34cに指向される。光検出器26に到達させることが望ましい光は、次に第3の空間的光変調器34cにより単一ミラー32cに指向され、投影レンズ30bを通り、さらに対物レンズの開口絞りの下流側共役画像面内に位置付けられた第4の空間的光変調器34dに指向される。次に第4の空間的光変調器34bで反射された光は、単一ミラー32dに指向され、このミラー32dにより光検出器26に反射される。

20

【0083】

サンプルの共役画像面と対物レンズの開口絞りの共役画像面との両者に空間的光変調器の組み合わせが存在するので、これら両面の一方又は他方における空間的光変調器に対して先に説明した特徴の全てを選択的に結合することが可能である。例えば、共焦点顕微鏡法の各種角度における照明と組み合わせることにより、3次元共焦点伝送と反射顕微鏡法とが提供される。更に、空間的光変調器を使用することが可能となる迅速なスイッチング時間があるので、こうした3次元共焦点画像をリアル・タイムで見ることが出来る。更に、先に説明したように、演算、勘定、焦点ずれ情報の能力が原因で、こうした情報は制限と制御が可能とされ、かくして3次元画像の作成における再生作業を簡単にすることができる。

30

【0084】

適切なフィルターの追加も、この過程を制御された共焦点蛍光画像化の目的で使用可能にする（実際、本発明の全ての実施例は蛍光顕微鏡法に対して使用可能である）。両方の面内での空間的光変調器を組み合わせる他の利点は、図11に示すように、サンプルの選択されたZ位置から選択された照明と検出の向きを使用してサンプルの画像を入手することにより、多くの球面収差効果を修正することができる点にある。図11において、この図の上方部分は3つの異なる深さにおけるサンプルの3つの画像を得ることを示しており、それに続き図面の中間部分では特定の所望の深さ（図面の上方部分における第2のサンプル深さと等しい）に収束する各部分の構成を選択することが続き、次に図11の下方部分に模式的に表されているように3つの全てのサンプル深さにおいて所望の照明角度を結合させることが続く。

40

50

【0085】

本発明の他の利点は、容易に達成される時間遅延型蛍光顕微鏡法を可能にする点にある。これは、照明光路内の空間的光変調器における所望の照明画素をオンにし、次に検出光路における空間的光変調器（又は検出器）における対応する画素をオフにすることで達成可能である。サンプルに添加される顔料等の材料が原因で蛍光を自動蛍光又は蛍光にすることができる蛍光をサンプル内に導入するに十分な時間が経過した後、照明光路における空間的光変調器はオフにされ、その後、間もなく検出器の検出画素、又は検出光路内に配設された空間的光変調器の光透過画素がオンにされる。こうした状態に対するタイミングの一例を図12に示す。要約すると、照明の空間的光変調器34bは短い定められた時間 $t_0 - t_1$ にわたりオンになり、次にその後、間もなく、検出の空間的光変調器が定められた時間 $t_2 - t_3$ にわたりオンになり、その時間後、照明の空間的光変調器34bが再びオンにされる。こうした顕微鏡法は共焦点モード及び広視野モード両方で実行可能である。

10

【0086】

図13は、透過顕微鏡法の代わりに反射顕微鏡法に適している点を除き、図10に示す顕微鏡と同様の顕微鏡のレンズ、ミラー及び空間的光変調器の配列を概略的に示す。図13において、光源4は光を、ビーム・スプリッター60を介してデジタル・マイクロ・ミラー装置34aに指向させる。ビーム・スプリッター60は、ダイクロイックミラー又は他の形式のビーム・スプリッターにすることができる。ダイクロイックミラー以外のビーム・スプリッターも、本発明の他の諸実施例と併用可能である。所望の光は、デジタル・マイクロ・ミラー装置34aにより投影レンズ30aを通る照明光路3に沿って反射され、単一ミラー32bに達し、更に単一ミラー32bで反射されて第2のデジタル・マイクロ・ミラー装置34bに指向され、第2のデジタル・マイクロ・ミラー装置34bにより対物レンズ22を通してサンプル20に照射される。次に所望の光は、サンプル20で対物レンズ22に向けて反射され、デジタル・マイクロ・ミラー装置34b及び単一ミラー32で更に反射されて、投影レンズ30aを通り、第1のデジタル・マイクロ・ミラー装置34aで反射される。このように所望の光は、これを光検出器26に反射させるダイクロイックミラー38に到達するまで、光路に沿って元の方向に指向される。したがって、図13に示す顕微鏡は、先に説明したように、単一スポット又はスポットのパターンを照明し且つ各スポット又はスポットのパターンに対しては各種照明角度を連続的に実行することができ、各角度に対しては画像又は測定が収集される。したがって、サンプル面の全ての領域を収集することができる。したがって、データは顕微鏡の光学軸に沿ってサンプルの位置を変え、サンプルの新しいレベルに対してこの過程を繰り返すことができる。したがって、関連ある全体の表面からの情報を収集することができ、トモグラフィ的に再生可能であり、サンプルの表面の3次元表示を発生させる。本明細書における顕微鏡は、サンプルの各位置における表面の向きが比較的直線的な様式で決定できることから、従来の反射型顕微鏡に対し有利である。

20

30

【0087】

図14は、図10及び図13における顕微鏡と同様に、照明光路に2つ、検出光路内に2つの計4つの空間的光変調器を含み、検出光路内の2つの空間的光変調器の1つはサンプルの共役画像面内に設置された各光路内にあり、他方の光変調器は対物レンズの開口絞りの共役画像面内に設置された各光路内にある顕微鏡のもう1つの別の実施例を示す概略図である。図10における顕微鏡は、反射顕微鏡法に対して使用され、デジタル・ミラー装置34b、34cと対物レンズ22の間に配設されたビーム・スプリッター60を含む。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 ケーラー照明を使用している従来の伝送光型顕微鏡の概略図及び拡大概略図

【図2A】 本発明の装置及び方法において空間的光変調器として使用するデジタル・マイクロ・ミラー装置の概略図

【図2B】 デジタル・マイクロ・ミラー装置である空間的光変調器の詳細な平面概略図

【図2C】 時間の異なる関数として光を伝送するデジタル・マイクロ・ミラー装置の概略図

50

【図 3】 視野絞りの代わりに空間的光変調器を含む本発明の一実施例による顕微鏡の概略図及び拡大概略図

【図 4 A～図 4 I】 複数の照明スポットの連続的相補的パターンをもつ空間的光変調器を使用する物体の部分的走査シーケンスを示す図

【図 5】 ダイクロイックミラーの上流側又は前に空間的光変調器が設置されている本発明による顕微鏡の別の実施例を示す概略図及び拡大概略図

【図 6】 空間的光変調器のミラーの 1 つにより照明される検出器の領域の例を示している本発明で使用する画素化された光検出器の領域の概略図

【図 7 A】 所望寸法の照明スポットを画定すべく多数の隣接画素が「オン」にされる空間的光変調器の概略図

10

【図 7 B】 平均時間時にガウシアン・プロファイル照明スポットを定めるべく部分的にミラーがオン状態にされるか又は部分的にオフ状態にされるように多数の隣接画素が迅速にオン又はオフにされる空間的光変調器の概略図

【図 8】 2 つの空間的光変調器を使用している本発明の他の実施例による顕微鏡の概略図

【図 9】 空間的光変調器がサンプルの共役画像面内におけるコンデンサー開口と対物開口絞りと置換するケーラー照明に対してセット・アップされた更に別の実施例による顕微鏡の概略図

【図 10】 サンプルの共役画像面及び対物レンズの開口絞りにおける共役画像面の光透過特性を制御する 4 つのデジタル・マイクロ・ミラー装置を含む本発明の更に他の実施例による顕微鏡の概略図及び拡大概略図

20

【図 11】 サンプルが選択された照明を使用しており検出の向きが選択された Z 位置からのものであり、その画像を複合画像に結合する状態で複数の異なる深さにおいてサンプルの画像によりレンズの球面収差効果を修正する目的で本発明の顕微鏡を使用することができる 1 つの様式を示す図

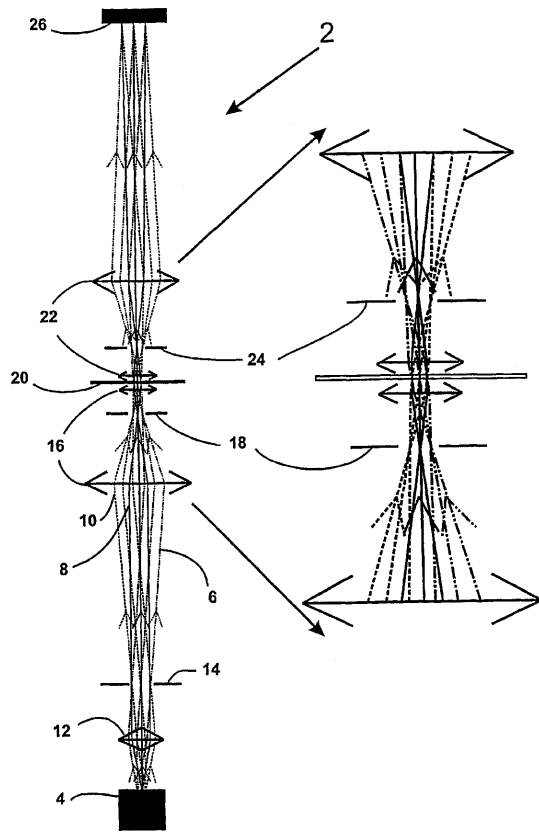
【図 12】 一对の空間的光変調器のオン/オフ状態が時間遅延された蛍光検査法を実施すべく調整可能とされるような方法を示すタイミング図

【図 13】 顕微鏡が反射型顕微鏡法に対して使用され、2 つの空間的光変調器が照明光と検出光路の各光路における空間的光変調器をもたらし、かくして光路内に空間的光変調器を 4 つの機能的に設けるようにした点を除き、顕微鏡が図 10 の顕微鏡と同様になっている本発明の別の実施例による顕微鏡の概略図及び拡大概略図

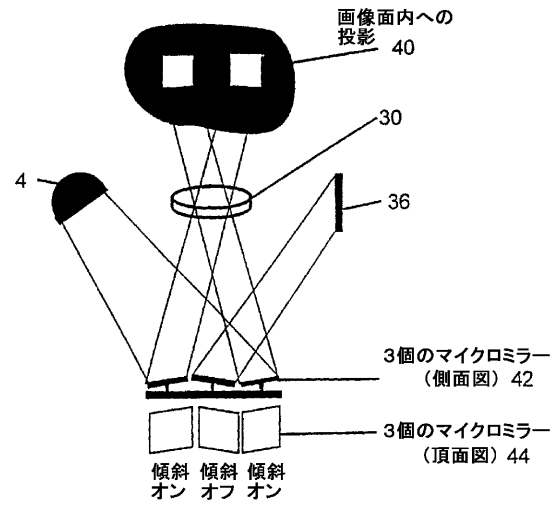
30

【図 14】 図 10 及び図 13 に示す顕微鏡と同様に顕微鏡が反射顕微鏡法に対して使用され、全体で 4 つの空間的光変調器を照明光路と検出光路とに散在させた本発明の他の実施例による顕微鏡の概略図

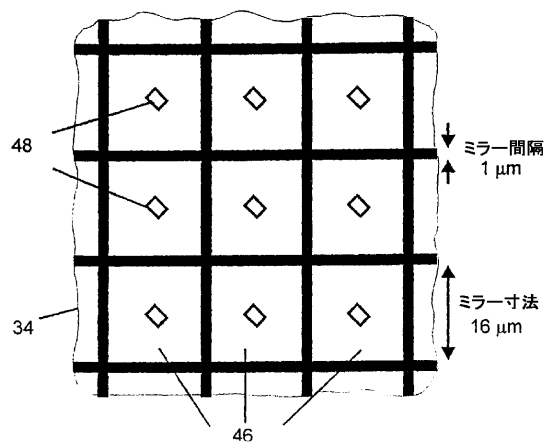
【図 1】



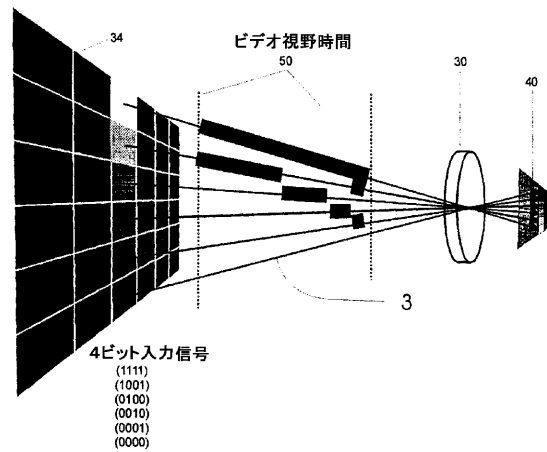
【図 2 A】



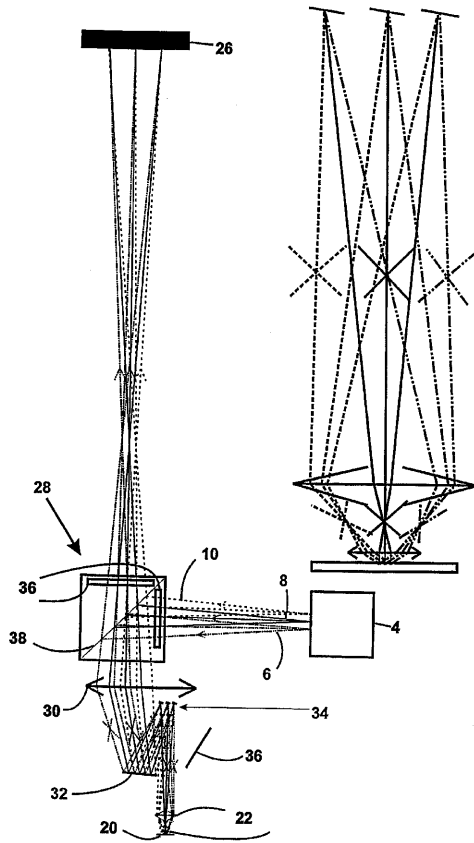
【図 2 B】



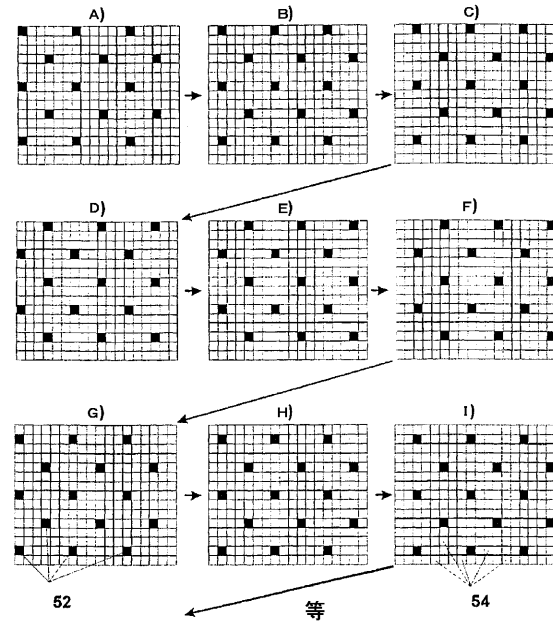
【図 2 C】



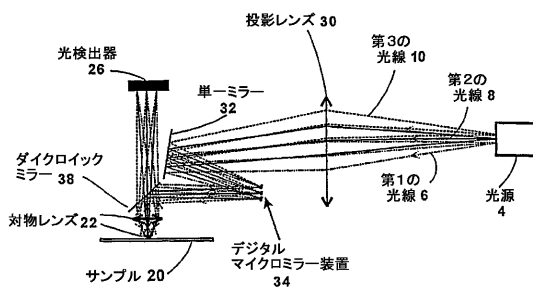
【図 3】



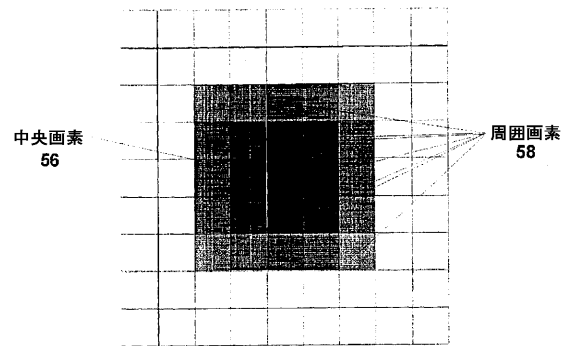
【図 4】



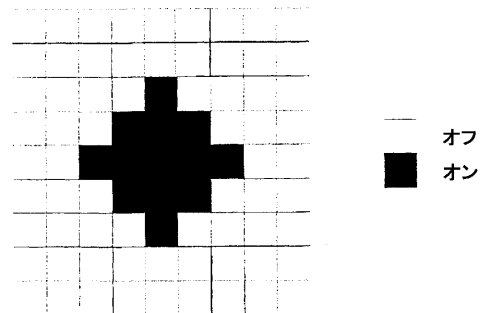
【図 5】



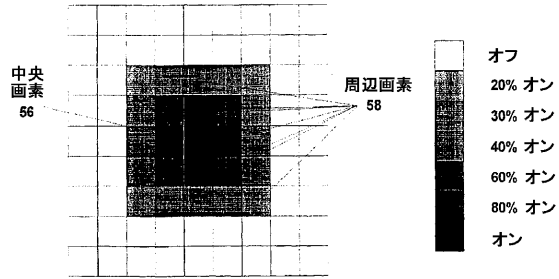
【図 6】



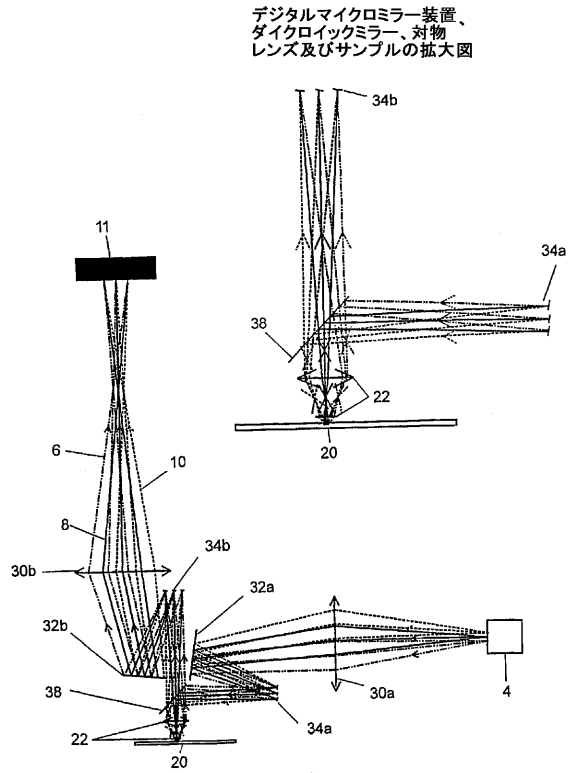
【図 7 A】



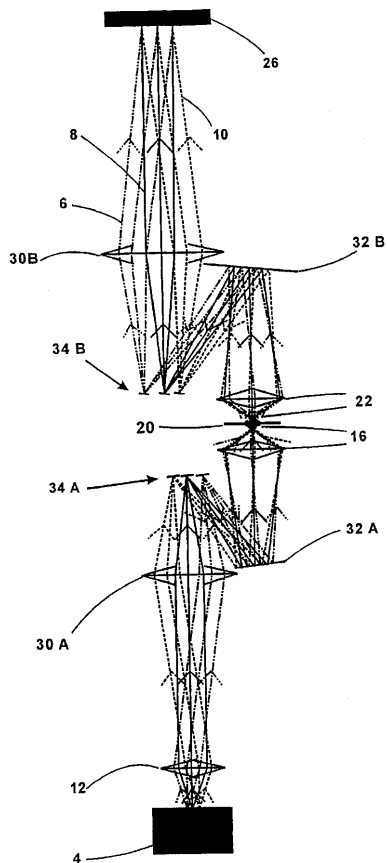
【図 7 B】



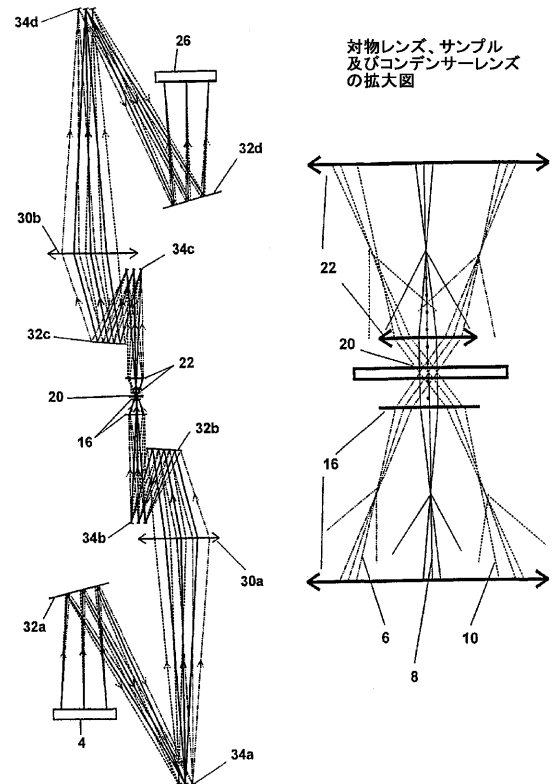
【図 8】



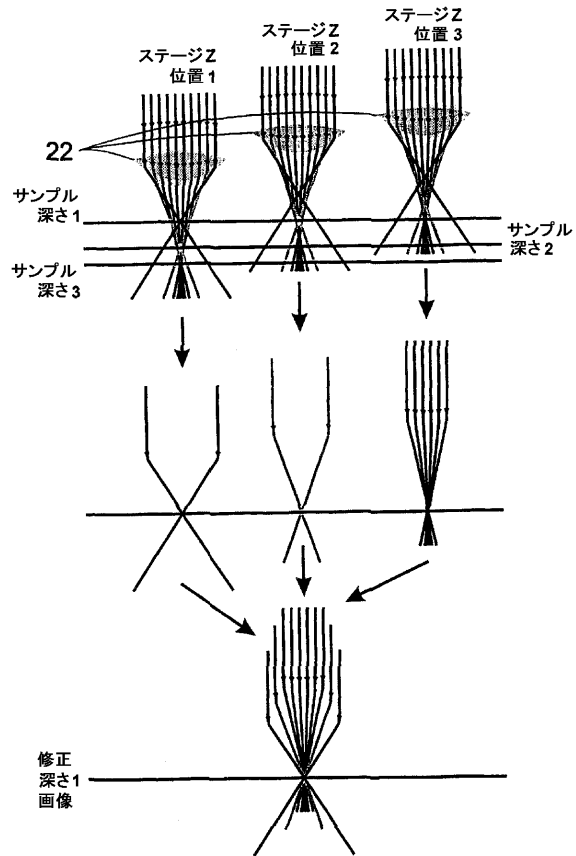
【図 9】



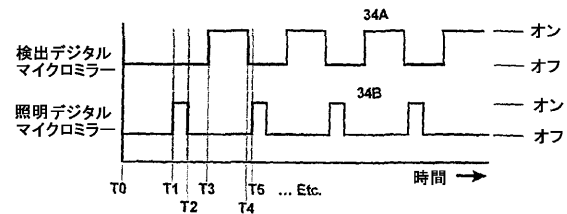
【図 10】



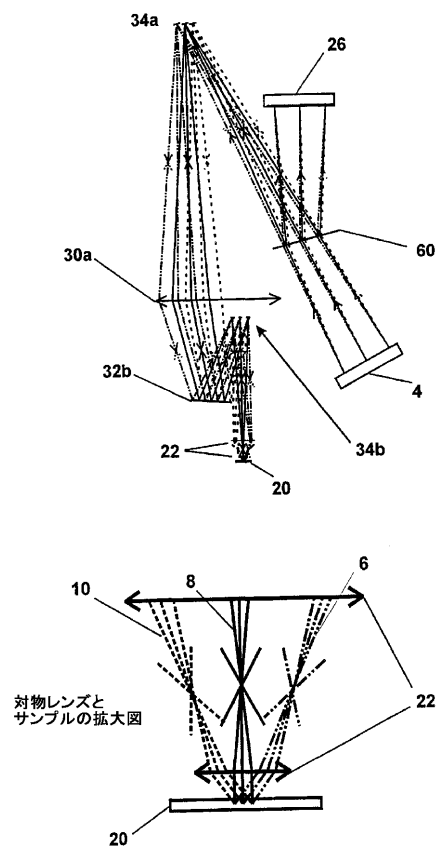
【図 1 1】



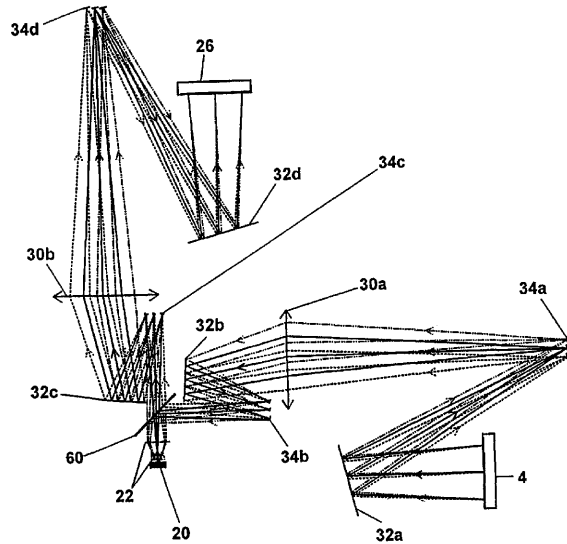
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
G 0 2 B 21/12	(2006.01)	G 0 2 B 21/12
G 0 2 B 21/16	(2006.01)	G 0 2 B 21/16
G 0 2 B 21/36	(2006.01)	G 0 2 B 21/36

(56)参考文献 特開平 0 9－2 1 8 3 5 7 (J P, A)
米国特許第 0 5 5 8 7 8 3 2 (U S, A)
特開平 0 5－2 1 0 0 5 1 (J P, A)
特開平 0 3－1 3 4 6 0 8 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
G02B 21/00
G02B 21/06-21/36