

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第 6 部門第 2 区分  
 【発行日】平成24年12月13日 (2012.12.13)

【公表番号】特表2012-507756(P2012-507756A)  
 【公表日】平成24年3月29日 (2012.3.29)  
 【年通号数】公開・登録公報2012-013  
 【出願番号】特願2011-535029(P2011-535029)  
 【国際特許分類】

G 0 2 B 21/00 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

【 F I 】

G 0 2 B 21/00

G 0 1 N 21/64 F

G 0 1 N 21/64 E

【手続補正書】  
 【提出日】平成24年10月10日 (2012.10.10)  
 【手続補正 1】  
 【補正対象書類名】特許請求の範囲  
 【補正対象項目名】全文  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【特許請求の範囲】  
 【請求項 1】

異なる空間解像度を与える顕微鏡検査法によってサンプルの像を生成するための方法であって、以下の顕微鏡検査法のうちの少なくとも 2 つ、すなわち、

第 1 の顕微鏡検査法であって、

構造化されたラインタイプ照明又は広視野照明によって、ルミネセンスを生じるように前記サンプルが励起され、

該構造化は、回転されるとともに、回転位置毎に何度かシフトされ、

少なくとも 3 つの回転位置、及び該回転位置毎に少なくとも 3 つのシフト位置が実現され、それぞれの場合に、ルミネセンスを生じるサンプルが、所定の光学解像度を有する 2 D 検出器上に結像され、こうして得られた像から、該所定の光学解像度よりも高い空間解像度を有する第 1 の顕微鏡像が、フーリエ解析を含む計算処理によって生成される、第 1 の顕微鏡検査法、

第 2 の顕微鏡検査法であって、

前記サンプルはラベル分子を含み、該ラベル分子は、切替信号によって活性化された後にのみ、特定のルミネセンス放射を放出するように励起することができ、

前記切替信号は、前記サンプル内に存在する前記ラベル分子の一部のみが活性化されるように前記サンプル内に加えられ、

前記サンプル内に部分空間が存在し、該部分空間では、活性化されたラベル分子が、その最も近い隣接する活性化されたラベル分子まで、所定の光学解像度以上の距離を有し、

該活性化された分子が励起されてルミネセンス放射を放出し、

ルミネセンス放射を放出する前記サンプルは、所定の光学解像度を有する 2 D 検出器上に結像され、該像は解析され、そこから像データが生成され、該像データは、前記光学解像度より高い局所解像度で、ルミネセンス放射を放出する該ラベル分子の幾何学的な場所を与え、該像データから第 2 の顕微鏡像が生成される、第 2 の顕微鏡検査法、及び

レーザー走査型顕微鏡検査法によって第 3 の顕微鏡像を生成するための第 3 の顕微鏡検査法

査法、

のうちの少なくとも2つが組み合わせられ、

得られた前記少なくとも2つの顕微鏡像を組み合わせ、詳細には重ね合わせて、合成像が生成される、方法。

【請求項2】

前記第1～第3の顕微鏡検査法のすべてが組み合わせられ、得られた3つの顕微鏡像を組み合わせ、合成像が生成される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

第4の顕微鏡検査法であって、前記サンプルはSTED、ESA又はRESOLFT技法に適したラベル分子でラベル付けされ、STED、ESA又はRESOLFTによって第4の顕微鏡像が生成される、第4の顕微鏡検査法がさらに組み合わせられる、請求項1記載の方法。

【請求項4】

第1のステップにおいて、前記サンプルのメイン顕微鏡像を生成するために前記第1～第3の顕微鏡検査法のいずれかが行われ、

第2のステップにおいて、所定のパターンを得るために、このメイン顕微鏡像が走査され、

該所定のパターンが発見される場合には、第3のステップにおいて、さらなる顕微鏡像を生成するために、残りの顕微鏡検査法のうちの少なくとも1つが行われ、

好ましくは、前記第2のステップ後に、かつ前記第3のステップ前に、前記サンプルにおいて行なわれる処理に関して、前記サンプルが固定される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記第3のステップの前かつ前記第2のステップの後に、発見された前記パターンに基づいてサンプル表示を選択するためにサンプル表示選択ステップが行われ、

前記第3のステップにおいて、該サンプル表示のためにのみ、さらなる顕微鏡像が生成される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

第1のステップにおいて、前記サンプルのメイン顕微鏡像を生成するために前記第1～第3の顕微鏡検査法のいずれかが行われ、

第2のステップにおいて、このメイン顕微鏡像において像評価が実行され、他の顕微鏡像のうちの少なくとも1つを収集するための少なくとも1つの制御変数が求められ、

該制御変数は、

焦点位置、

サンプルステージ調整、

対物レンズの選択、

前記第4の顕微鏡検査法における照明放射の構造、及び

像表示の選択、

の少なくとも1つである、請求項1記載の方法。

【請求項7】

前記顕微鏡像を重ね合わせる前に、互いに対する該顕微鏡像の位置が求められ、該顕微鏡像は、位置を調整して重ね合わせられる、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

解像度が異なる少なくとも2つの顕微鏡検査法を用いてサンプル(2)を顕微鏡検査するように構成される組み合わせ顕微鏡であって、

該顕微鏡(1)は、

全ての顕微鏡検査法のために前記サンプル(2)を検知する対物レンズ(3)と、

検出ビーム経路(8)及び少なくとも1つの照明ビーム経路であって、少なくとも部分的に同一空間を占有するとともに、いずれも前記対物レンズ(3)を通り抜ける、検出ビーム経路及び少なくとも1つの照明ビーム経路と、

前記検出ビーム経路(8)に接続される顕微鏡モジュールであって、チューブレンズ(

5) 及び 2D 検出器 (6) を有し、前記対物レンズ (3) と共に、該 2D 検出器 (6) 上に前記サンプル (2) を結像する、顕微鏡モジュールと、

前記照明ビーム経路に接続されるとともに、前記対物レンズ (3) を通して前記サンプル (2) を広視野照明するように構成されている広視野照明モジュール (17) であって、少なくとも 2 つの異なる波長範囲において照明放射を選択的に放出するように構成されている、広視野照明モジュールと、

照明放射変調器 (23、24) であって、照明方向において前記広視野照明モジュール (17) の下流の前記照明ビーム経路内に配置され、前記照明ビーム経路内で起動状態と停止状態との間で制御可能に切替えられることができ、その起動状態において、前記照明放射にストライプ変調をかけるとともに、該ストライプ変調を前記照明ビーム経路の光学軸に対して垂直にシフトさせるように構成されている照明放射変調器と、

制御可能な回転デバイス (25) であって、前記ストライプ変調、又は、前記起動された照明放射変調器 (23、24) を通り抜けた前記ストライプ変調されたビーム線を、前記照明ビーム経路の前記光学軸を中心にして前記照明ビーム経路内で回転されるように構成されている制御可能な回転デバイスと、

前記顕微鏡モジュール、前記広視野照明モジュール (17)、前記照明放射変調器 (23、24) 及び前記回転デバイス (25) に接続され、前記顕微鏡を種々の動作モードに追い込む制御デバイス (28) であって、請求項 1 に記載の前記第 1 の顕微鏡検査法を実行するために、第 1 の動作モードにおいて前記照明放射変調器 (23、24) を起動するとともに、前記照明放射変調器を前記回転デバイス (25) と共に駆動し、かつ前記 2D 検出器 (6) を読み取り、該 2D 検出器によって供給されるデータを処理するように構成され、さらに、請求項 1 に記載の第 2 の顕微鏡検査法を実行するために、第 2 の動作モードにおいて前記照明放射変調器 (23、24) を停止し、前記広視野照明モジュール (17) を連続して駆動して、前記少なくとも 2 つの異なる波長範囲において前記照明放射を放出し、かつ前記 2D 検出器 (6) を読み取り、該 2D 検出器によって供給されるデータを処理するように構成される、制御デバイスと、  
を備える、顕微鏡。

【請求項 9】

前記制御デバイス (28) によって駆動されるとともに、レーザー走査顕微鏡検査法によって前記サンプル (2) の共焦点像を形成するために、前記検出ビーム経路 (8) 及び前記照明ビーム経路内に設けられたレーザー走査モジュール (9) を備え、

前記制御デバイス (28) は、請求項 1 に記載の前記第 3 の顕微鏡検査法を実行するために、前記レーザー走査モジュール (9) を第 3 の動作モードに追い込むように構成される、請求項 8 に記載の顕微鏡。

【請求項 10】

前記制御デバイス (28) によって駆動されるとともに、前記サンプル (2) の蛍光特性を操作するために操作照明放射を用いてスポットタイプ走査又はラインタイプ走査で前記サンプル (2) を照明するために、前記照明ビーム経路内に設けられた操作照明放射モジュール (22) を備え、

該操作照明放射モジュール (22) によって放出される操作照明放射は、前記照明放射変調器 (23、24) が起動されるときに、その中でも通り抜けることが好ましい、請求項 8 に記載の顕微鏡。

【請求項 11】

前記制御デバイス (28) によって駆動されるとともに、全反射角度の下で前記対物レンズ (3) を通して前記サンプル (2) を照明するために、前記照明ビーム経路内に設けられた TIRF 照明モジュール (19) を備える、請求項 8 に記載の顕微鏡。

【請求項 12】

前記制御デバイス (28) によって駆動されるとともに、関連する前記ビーム経路を有するそれぞれのモジュール (複数可) を接続及び切断するために設けられた切替デバイスを備える、請求項 10 に記載の顕微鏡。

## 【請求項 13】

前記切替デバイスは、少なくとも 1 つの折りたたみ又は旋回ミラー（18）を有する、請求項 12 に記載の顕微鏡。

## 【請求項 14】

前記制御デバイス（28）によって駆動されるとともに、関連する前記ビーム経路を有するそれぞれのモジュール（複数可）を接続及び切断するために設けられた切替デバイスを備える、請求項 10 に記載の顕微鏡。

## 【請求項 15】

前記切替デバイスは、少なくとも 1 つの折りたたみ又は旋回ミラー（18）を有する、請求項 12 に記載の顕微鏡。

## 【請求項 16】

前記検出ビーム経路（8）内に設けられるとともに、前記サンプル（2）において励起された蛍光放射を前記 2D 検出器（6）に誘導するビームスプリッター（4）を備える、請求項 8 に記載の顕微鏡。

## 【請求項 17】

前記回転デバイス（25）は、像域回転子、詳細にはアップベ - ケーニッヒプリズムを含む、請求項 8 に記載の顕微鏡。

## 【請求項 18】

前記制御デバイス（28）によって駆動される DMD（48）が中間像平面内に設けられ、該 DMD（48）はオフ位置とオン位置との間で各々切替え可能なミラーのアレイを含んでおり、前記ミラーは、照明放射を、前記オフ位置にあるときにはビームトラップに、前記オン位置にあるときには前記対物レンズ（3）に誘導する、請求項 8 に記載の顕微鏡。

## 【請求項 19】

位相変調器（46）が、前記照明ビーム経路内に、かつ前記 DMD の前方に配置される、請求項 18 に記載の顕微鏡。