

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-522016

(P2022-522016A)

(43)公表日 令和4年4月13日(2022.4.13)

(51)国際特許分類

G 0 2 B 21/00 (2006.01)

F I

G 0 2 B 21/00

テーマコード(参考)

2 H 0 5 2

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全50頁)

(21)出願番号 特願2021-550252(P2021-550252)
 (86)(22)出願日 令和2年2月26日(2020.2.26)
 (85)翻訳文提出日 令和3年10月26日(2021.10.26)
 (86)国際出願番号 PCT/US2020/019847
 (87)国際公開番号 WO2020/176591
 (87)国際公開日 令和2年9月3日(2020.9.3)
 (31)優先権主張番号 62/859,516
 (32)優先日 令和1年6月10日(2019.6.10)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/888,016
 (32)優先日 令和1年8月16日(2019.8.16)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/811,174

最終頁に続く

(71)出願人 518390343
 カリコ ライフ サイエンス エル
 エルシー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
 8 0 , サウス サンフランシスコ , ベ
 テランズ ブールバード 1 1 7 0
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 斜面顕微鏡検査システムおよび方法

(57)【要約】

斜面顕微鏡検査のためのシステムおよび方法が、開示される。斜面顕微鏡検査システムは、屈折率 n_0 を有するサンプルを結像するように構成され、システムは、サンプルから放出される光を受光するように配列される第1の顕微鏡であって、第1の開口数 NA_1 、 n_0 および n_0 にほぼ等しい第1の屈折率 n_1 を伴う第1の浸漬媒体のうちの少なくとも1つを有する第1の対物レンズを含む、第1の顕微鏡と、第2の対物レンズを含む第2の顕微鏡であって、第1と第2の顕微鏡の組み合わせは、拡大率 M_{RR} を伴うサンプルの中間画像を生成するように構成され、第2の対物レンズは、第2の開口数 NA_2 を有する、第2の顕微鏡と、中間画像上に集束され、第3の開口数を有する第3の対物レンズを含む第3の顕微鏡とを備える。

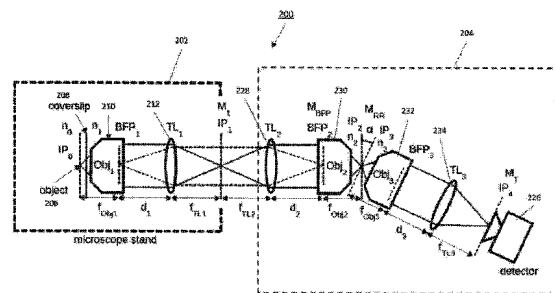


FIG. 2A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

屈折率 n_0 を有するサンプルを結像するように構成される斜面顕微鏡検査システムであって、

前記サンプルから放出される光を受光するように配列される第 1 の顕微鏡であって、前記第 1 の顕微鏡は、第 1 の開口数 NA_1 n_0 と、 n_0 にほぼ等しい第 1 の屈折率 n_1 を有する第 1 の浸漬媒体とのうちの少なくとも 1 つを有する第 1 の対物レンズを含む、第 1 の顕微鏡と、

第 2 の対物レンズを含む第 2 の顕微鏡であって、前記第 1 の顕微鏡と前記第 2 の顕微鏡との組み合わせは、拡大率 M_{RR} を有する前記サンプルの中間画像を生成するように構成され、前記第 2 の対物レンズは、第 2 の開口数 NA_2 を有し、前記中間画像は、第 2 の屈折率 n_2 を有する第 2 の浸漬媒体内に形成され、前記拡大率 M_{RR} は、前記第 1 の浸漬媒体の前記屈折率と前記第 2 の浸漬媒体の前記屈折率との比率 (n_1 / n_2) にほぼ等しい、第 2 の顕微鏡と、

前記中間画像上に集束される第 3 の顕微鏡であって、前記第 3 の顕微鏡は、第 3 の開口数を有する第 3 の対物レンズを含み、前記第 3 の対物レンズは、前記第 3 の顕微鏡が、前記サンプル中の斜面に対応する前記中間画像内の斜面を結像するような傾斜角度だけ、前記第 2 の対物レンズの光学軸に対して傾斜させられる光学軸を有し、前記第 3 の対物レンズは、前記第 2 の顕微鏡からの実質的に全ての光を収集するように構成および配列される、第 3 の対物レンズと

を備える、システム。

【請求項 2】

前記サンプルの前記屈折率は、 $1.33 \sim 1.41$ の範囲内である、請求項 1 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 3】

前記第 1 の対物レンズは、シリコン浸漬式のレンズである、請求項 2 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 4】

前記第 1 の開口数は、 $NA_1 = 1.35$ である、請求項 3 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 5】

前記第 1 の屈折率は、 $n_1 = 1.41$ である、請求項 4 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 6】

前記第 2 の浸漬媒体は、前記第 2 の屈折率が $n_2 = 1.0$ であるような空気である、請求項 3 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 7】

前記第 2 の開口数は、 $NA_2 = 0.95$ である、請求項 6 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 8】

前記第 2 の屈折率に対する前記第 2 の開口数の比率 (NA_2 / n_2) は、前記第 1 の屈折率に対する前記第 1 の開口数の比率 (NA_1 / n_1) 以上である、請求項 1 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 9】

前記傾斜角度は、前記顕微鏡検査システムの収集効率を最適化するように選択される、請求項 1 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 10】

前記第 1 の対物レンズは、グリセロール浸漬式のレンズである、請求項 1 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記第 3 の開口数は、 $NA_3 = n_2$ である、請求項 1 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 1 2】

前記第 3 の対物レンズは、中実ガラス錐台を含む、請求項 1 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 1 3】

前記第 3 の対物レンズは、空気中に $0 \sim 20 \mu\text{m}$ の範囲内の作動距離を伴って構成される、請求項 1 2 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 1 4】

光の入射ビームを提供し、前記サンプル中の斜面を照明するように配列される光源をさらに備え、前記照明される斜面は、前記結像されている斜面に対応する、請求項 1 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

10

【請求項 1 5】

前記光の入射ビームは、前記第 1 の対物レンズを通して指向される、請求項 1 4 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 1 6】

前記第 3 の顕微鏡は、前記傾斜角度を調節するために回転可能である、請求項 1 5 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 1 7】

前記傾斜角度は、部分的に、前記照明光ビームの発散角度に基づいて選択される、請求項 1 6 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

20

【請求項 1 8】

前記第 1 の顕微鏡はさらに、第 1 のレンズを含み、前記第 1 の顕微鏡は、第 1 の拡大率 M_1 を有し、前記第 2 の顕微鏡はさらに、 $M_{RR} = M_1 * M_2^{-1} = (n_1 / n_2)$ となるように前記第 2 の顕微鏡の拡大率 M_2 を設定するように選択される焦点距離 f_{TL2} を有する第 2 のレンズを含む、請求項 1 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 1 9】

屈折率 n_0 を有するサンプルを結像するように構成される、斜面顕微鏡検査システムであって、

前記サンプルから放出される光を受光するように配列される第 1 の顕微鏡であって、前記第 1 の顕微鏡は、第 1 の開口数 NA_1 と、第 1 の屈折率 n_1 を有する第 1 の浸漬媒体とを有する第 1 の対物レンズを含み、前記第 1 の対物レンズは、 $NA_1 = n_0$ の第 1 の理想的条件と、 n_1 が n_0 にほぼ等しいという第 2 の理想的条件との間の選択された妥協に基づいて構成される、第 1 の顕微鏡と、

30

第 2 の空気浸漬式の対物レンズを含む第 2 の顕微鏡であって、前記第 1 の顕微鏡と前記第 2 の顕微鏡との組み合わせは、拡大率 $M_{RR} = n_1$ を有する前記サンプルの中間画像を生成するように構成され、前記第 2 の空気浸漬式の対物レンズの第 2 の開口数 NA_2 は、 NA_2 が前記第 1 の屈折率に対する前記第 1 の開口数の比率 (NA_1 / n_1) 以上であるという第 3 の理想的条件に接近するように選択される、第 2 の顕微鏡と、

前記中間画像上に集束される第 3 の顕微鏡であって、前記第 3 の顕微鏡は、第 3 の開口数 $NA_3 = 1$ を有する第 3 の対物レンズを含み、前記第 3 の対物レンズは、前記第 3 の顕微鏡が、前記サンプル中の斜面に対応する前記中間画像内の斜面を結像するような傾斜角度だけ、前記第 2 の対物レンズの光学軸に対して傾斜させられる光学軸を有する、第 3 の顕微鏡と

40

を備える、システム。

【請求項 2 0】

前記第 1 の対物レンズは、シリコン浸漬式の対物レンズである、請求項 1 9 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 2 1】

前記傾斜角度は、前記顕微鏡検査システムの収集効率を最適化するように選択される、請求項 1 9 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

50

【請求項 2 2】

前記第 3 の対物レンズは、前記第 2 の空気浸漬式の対物レンズの視野と交差するように位置付けられる中実ガラス錐台を含む、請求項 1 9 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 2 3】

前記中実ガラス錐台は、面取りされた縁を有する、請求項 2 2 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 2 4】

前記中実ガラス錐台は、前記第 2 の空気浸漬式の対物レンズの前記視野に対応するサイズを有する端部領域が、前記視野の中に挿入され、前記第 2 の空気浸漬式の対物レンズからの利用可能な光を収集することを可能にするように成形される、請求項 2 2 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

10

【請求項 2 5】

前記第 3 の顕微鏡は、前記傾斜角度を調節するために回転可能である、請求項 2 2 に記載の斜面顕微鏡検査システム。

【請求項 2 6】

サンプル中の斜面を結像するための顕微鏡検査システムを構成する方法であって、前記顕微鏡検査システムは、第 1 の顕微鏡と、第 2 の顕微鏡と、第 3 の顕微鏡とを含み、前記方法は、

第 1 の対物レンズのための第 1 の理想的条件と第 2 の理想的条件との間で選定される妥協に基づいて、前記第 1 の顕微鏡のための第 1 の対物レンズを選択することであって、前記第 1 の理想的条件は、前記第 1 の対物レンズが第 1 の開口数 $NA_1 = n_0$ を有することであり、 n_0 は、前記サンプルの屈折率の推定値であり、前記第 2 の理想的条件は、前記第 1 の対物レンズが第 1 の屈折率

20

【化 3 0】

$$n_1 \approx n_0$$

を有する第 1 の浸漬媒体を有することであり、前記第 1 の対物レンズは、照明光シートを前記サンプルに指向し、前記サンプルからの放出光を収集するように構成される、ことと

、前記第 2 の顕微鏡のための第 2 の対物レンズを選択することであって、前記第 2 の対物レンズは、前記第 1 の対物レンズからの実質的に全ての放出光を収集するように構成される、ことと、

30

前記サンプル中の前記斜面を中間像面上に再結像するように前記第 2 の顕微鏡を構成することと、

前記第 3 の顕微鏡のための第 3 の対物レンズを選択することであって、前記第 3 の対物レンズは、前記第 2 の対物レンズに対して前記中間像面の反対側上に位置付けられ、傾斜角度に適応しながら、前記第 2 の対物レンズからの実質的に全ての放出光を収集するように構成される、ことと、

前記第 3 の対物レンズの一次光学軸が前記第 2 の対物レンズの一次光学軸に対して前記傾斜角度だけ回転させられるように、前記第 3 の対物レンズを位置付けることと

40

【請求項 2 7】

前記サンプル中の前記斜面を再結像するように前記第 2 の顕微鏡を構成することは、前記中間像面における前記サンプル中の前記斜面の画像の拡大率 M_{RR} が条件：

【化 3 1】

$$M_{RR} = M_1 M_2^{-1} = n_1 / n_2$$

を充足させるように、前記第 2 の顕微鏡の拡大率 M_2 を構成することを含み、式中、 M_1 は、前記第 1 の顕微鏡の拡大率であり、 n_1 は、前記第 1 の対物レンズの浸漬媒体の屈折

50

率であり、 n_2 は、前記第 2 の対物レンズの浸漬媒体の屈折率である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 2 の顕微鏡は、レンズを含み、前記第 2 の顕微鏡の前記拡大率を構成することは、前記レンズの焦点距離を選択することを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 2 の対物レンズを選択することは、空気浸漬式の第 2 の対物レンズを選択することを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 1 の対物レンズを選択することは、シリコン浸漬式の対物レンズを選択することを含む、請求項 29 に記載の方法。 10

【請求項 31】

前記第 1 の対物レンズを選択することは、グリセロール浸漬式の対物レンズを選択することを含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記第 3 の対物レンズを選択することは、中実ガラス錐台を有する第 3 の対物レンズを選択することを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 3 の対物レンズを位置付けることは、前記中実ガラス錐台の先端が前記第 2 の対物レンズの視野と交差するように、前記第 3 の対物レンズを位置付けることを含む、請求項 32 に記載の方法。 20

【請求項 34】

前記第 2 の対物レンズを選択することは、 n_2 を最小限にすることと、前記第 2 の対物レンズの第 2 の開口数 NA_2 が、条件：

【化 32】

$$NA_2/n_2 \geq NA_1/n_1$$

を満たすように選択することを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 35】

部分的に前記照明光シートの発散角度に基づいて、前記傾斜角度を調節することをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。 30

【請求項 36】

傾斜された像面の高開口数低収差結像のための顕微鏡検査システムであって、サンプルからの放出光を収集するように配列される第 1 の対物レンズであって、前記第 1 の対物レンズは、第 1 の開口数 NA_1 、および第 1 の屈折率 n_1 を有する第 1 の浸漬媒体を有し、前記第 1 の対物レンズは、第 1 の条件と第 2 の条件との間で選定される妥協に基づいて構成され、前記第 1 の条件は、

【化 33】

$$NA_1 \geq n_0$$

であり、前記第 2 の条件は、

【化 34】

$$n_1 \approx n_0$$

であり、 n_0 は、前記サンプルの屈折率の推定値である、第 1 の対物レンズと、第 2 の開口数 NA_2 を有する第 2 の対物レンズであって、前記第 2 の対物レンズは、前記第 1 の対物レンズからの実質的に全ての放出光を収集するように位置付けられ、構成され、前記第 1 の対物レンズと前記第 2 の対物レンズとの組み合わせは、前記サンプルの中間画像を生成するように構成される、第 2 の対物レンズと、 40

前記中間画像上に集束される第3の対物レンズであって、前記第3の対物レンズは、前記第3の対物レンズが前記中間画像内の傾斜された平面を結像するような傾斜角度だけ、前記第2の対物レンズの光学軸に対して傾斜させられる光学軸を有し、前記第3の対物レンズはさらに、前記第2の対物レンズの視野に対応するサイズを有する端部領域が、前記視野の中に挿入され、前記傾斜角度に適応しながら、前記第2の対物レンズからの実質的に全ての放出光を収集することを可能にするように成形される中実ガラス錐台を有する、第3の対物レンズと

を備える、顕微鏡検査システム。

【請求項37】

前記第1の対物レンズはさらに、照明光ビームを前記サンプルに送達するように構成および配列される、請求項36に記載の顕微鏡検査システム。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

従来の光学顕微鏡検査は、広範囲の用途のための高分解能結像を提供する。例えば、生物学的サンプルが結像されている、ある状況では、通常、サンプルを通した軸方向に薄いスライスに対応する、光学的に区分化された画像を取得することが望ましい。光学的に区分化された結像の利点は、焦点外平面からの寄与の低減を通した改良された画像コントラストおよび3次元(3D)画像を生成する能力を含む。いわゆる「光シート」顕微鏡検査は、薄い光の「シート」がサンプルを照明するために使用される、光学的に区分化された結像技法である。本アプローチは、照明ビーム線量が、種々の他の従来の光学的に区分化された結像技法におけるものより低く、本アプローチが、したがって、サンプルにとって光毒性が著しく少ないため、多くの用途において、特に、生きている生物学的サンプルを結像するために有益である。その利点にもかかわらず、光シート顕微鏡検査は、2つの直交して位置付けられるレンズ、すなわち、光シートを送達するため(サンプルを照明するため)の一方のレンズと、画像を収集するための他方のレンズとを使用する、大部分の実装の扱いにくい性質に起因して、歴史的には、広く採用されてなかった。結果として生じる幾何学的制約に起因して、これらの実装は、典型的には、ガラススライド、皿、およびマルチウェルプレートを含む、多くの生物学的サンプル調製技法と互換性がない。

20

【0002】

3つの対物レンズが、像面を傾斜させ、それによって、サンプル中の斜面の合焦結像を達成するために使用される、斜面顕微鏡検査と称される、光シート顕微鏡検査の形態が、開発された。斜面顕微鏡検査は、サンプル中の斜面が、同一対物レンズを用いて、照明および結像されることを可能にし、したがって、標準的ガラススライドおよび他のサンプル調製技法と互換性がある一方、また、光学的に区分化された結像と関連付けられる、最小限の光漂白および光毒性の利点も留保する。斜面顕微鏡検査およびその実装の概念は、2008年12月8日のC. Dunsbyによる「Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy」(OPTICS EXPRESS, Vol. 16, No. 25)(本明細書では、「Dunsby」と称される)に説明される。Dunsbyに提示される斜面顕微鏡検査システムは、従来の光学的に区分化された顕微鏡検査方法に優る利点を提供した。しかしながら、光学システムの性能指数、具体的には、開口数(NA)は、本技法が多くの用途において有用であるためには低すぎる。例えば、従来の高分解能顕微鏡検査は、水性サンプルに関して、1.33と同程度に高い開口数値を達成することができる一方、Dunsbyシステムは、水浸漬式の対物レンズに関して、わずか0.74の理論的開口数値を達成する。

30

40

【0003】

Dunsbyに説明される斜面顕微鏡検査システムの修正は、2018年2月28日にbioRxiv上で印刷前論文として公開されたYang et al.の「High Numerical Aperture Epi-illumination Selective Plane Illumination Microscopy」(本明細書

50

では、「Yang」と称される)によって提示されている。図1を参照すると、Yangシステムは、その中の水浸漬式の対物レンズ(O1)110がサンプル照明および蛍光収集の両方のために使用される、単一对物レンズの傾斜型落射照明式選択平面照明顕微鏡である。Yangによると、照明光シートは、O1の光学軸に対して60度(°)の入射角度を有し、遠隔結像モジュールは、O2によって生成される中間画像がO3によって合焦して再結像されるように、30°の角度に配列される、2つの対物レンズ(O2およびO3)120、130を含む。光140は、結像のために、検出器160上の光学系150によって集束される。Yangは、O2およびO3の傾斜された配列が、O2によって発生される光円錐の一部をO3の収集可能範囲から外に傾斜させるため、従来、開口数の損失を引き起こすことを開示している(例えば、Dunsbyシステムの場合のように)。O3がO2に対して傾斜される、高開口数システムに関して、O2の開口数が、O1の開口数の十分な被覆率を確実にするために十分に高いとき、以前の実装では、O3が、さらにより大きい収集円錐を有することは、非実践的であった。Yangは、遠隔結像モジュールのために不整合の対物レンズを選択し、O2のための空気対物レンズ(NA=0.9)と、O3のための水浸漬式の対物レンズ(NA=1.0)とを使用して、中間像面170に位置するカバーガラスを用いて、O2とO3との間の焦点空間を分離し、水を片側上に、空気を他側上に保つことによって、本問題に対処している。Yangによると、カバーガラスのz'位置は、球面収差を最小限にするように調節されることができ、O2の作業媒体(空気および水)とO3との間の屈折率差は、O2光円錐の角度を圧縮し、それによって、開口数損失を低減させる。

10

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】C. Dunsby, "Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy", OPTICS EXPRESS, Vol. 16, No. 25

【非特許文献2】Yang et al., "High Numerical Aperture Epi-illumination Selective Plane Illumination Microscopy"

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

Yangシステムは、Dunsbyシステムのものよりはるかに高いが、依然として、従来の高分解能光学顕微鏡検査を使用して理論的に達成され得る、 $NA = n_0$ (=水性サンプルに関して、1.33)未満である、1.06の開口数値を達成する。側面および実施形態は、従来の高分解能顕微鏡を用いて達成可能な理論的 $NA = n_0$ 限界に接近する開口数値を達成する一方、また、ガラスカバースリップおよびマルチウェルプレートを含む、標準的ベンチ顕微鏡および一般的サンプル調製技法と併用され得る、光学的に区分化された結像ならびに便宜的かつ実践的実装配列と関連付けられる、利点(例えば、低減させられた光漂白および光毒性、改良された画像コントラスト、ならびに3D画像を生成する能力)を提供する、斜面顕微鏡検査システムを対象とする。故に、側面および実施形態は、広範囲の用途のために好適なほぼ妥協のない単一对物レンズ斜面顕微鏡検査のための解決策を提供し得る。

40

【0006】

一実施形態によると、斜面顕微鏡検査システムは、屈折率 n_0 を有する、サンプルを結像するように構成され、本システムは、サンプルから放出される光を受光するように配列される、第1の顕微鏡であって、第1の開口数 $NA_1 = n_0$ および n_0 にほぼ等しい第1の屈折率 n_1 を伴う第1の浸漬媒体のうち少なくとも1つを有する、第1の対物レンズを含む、第1の顕微鏡と、第2の対物レンズを含む、第2の顕微鏡であって、第1と第2の顕微鏡の組み合わせは、拡大率 M_{RR} を伴うサンプルの中間画像を生成するように構成さ

50

れ、第2の対物レンズは、第2の開口数 NA_2 を有し、中間画像は、第2の屈折率 n_2 を有する、第2の浸漬媒体内に形成され、拡大率 M_{RR} は、第1および第2の浸漬媒体の屈折率の比率(n_1/n_2)にほぼ等しい、第2の顕微鏡と、中間画像上に集束され、第3の開口数を有する、第3の対物レンズを含む、第3の顕微鏡であって、第3の対物レンズは、第3の顕微鏡が、サンプル中の斜面に対応する、中間画像内の斜面を結像するような傾斜角度だけ、第2の対物レンズの光学軸に対して傾斜される、光学軸を有し、第2の顕微鏡からの実質的に全ての光を収集するように構成および配列される、第3の対物レンズとを備える。

【0007】

一実施例では、サンプルの屈折率は、 $1.33 \sim 1.41$ の範囲内である。一実施例では、第1の対物レンズは、シリコン浸漬式のレンズである。別の実施例では、第1の開口数は、 $NA_1 = 1.35$ である。別の実施例では、第1の屈折率は、 $n_1 = 1.41$ である。別の実施例では、第2の浸漬媒体は、第2の屈折率が $n_2 = 1.0$ であるような空気である。一実施例では、第2の開口数は、 $NA_2 = 0.95$ である。

10

【0008】

別の実施例では、第2の開口数と第2の屈折率の比率(NA_2/n_2)は、第1の開口数と第1の屈折率の比率(NA_1/n_1)を上回るまたはそれに等しい。

【0009】

一実施例では、傾斜角度は、顕微鏡検査システムの収集効率を最適化するように選択される。

20

【0010】

別の実施例では、第1の対物レンズは、グリセロール浸漬式のレンズである。

【0011】

別の実施例では、第3の開口数は、 $NA_3 = n_2$ である。

【0012】

一実施例では、第3の対物レンズは、中実ガラス錐台を含む。別の実施例では、第3の対物レンズは、空気中に $0 \sim 20 \mu m$ の範囲内の作動距離を伴って構成される。

【0013】

一実施例では、斜面顕微鏡検査システムはさらに、光の入射ビームを提供し、サンプル中の斜面を照明するように配列される、光源を備え、照明される斜面は、結像されている斜面に対応する。一実施例では、光の入射ビームは、第1の対物レンズを通して指向される。別の実施例では、第3の顕微鏡は、傾斜角度を調節するために回転可能である。一実施例では、傾斜角度は、部分的に、照明光ビームの発散角度に基づいて選択される。

30

【0014】

第1の顕微鏡はさらに、第1のレンズを含んでもよく、第1の顕微鏡は、第1の拡大率 M_1 を有し、第2の顕微鏡はさらに、 f_{TL2} 、 $M_{RR} = M_1 * M_2 - 1 = (n_1/n_2)$ となるように第2の顕微鏡の拡大率 M_2 を設定するように選択される、焦点距離を有する、第2のレンズを含む。

【0015】

別の実施形態によると、屈折率 n_0 を有する、サンプルを結像するように構成される、斜面顕微鏡検査システムは、サンプルから放出される光を受光するように配列される、第1の顕微鏡であって、第1の顕微鏡は、第1の開口数 NA_1 および第1の屈折率 n_1 を伴う第1の浸漬媒体を有する、第1の対物レンズを含み、第1の対物レンズは、 $NA_1 = n_0$ の第1の理想的条件と n_0 にほぼ等しい n_1 の第2の理想的条件との間の選択された妥協に基づいて構成される、第1の顕微鏡と、第2の空気浸漬式の対物レンズを含む、第2の顕微鏡であって、第1と第2の顕微鏡の組み合わせは、拡大率 $M_{RR} = n_1$ を伴うサンプルの中間画像を生成するように構成され、第2の空気浸漬式の対物レンズの第2の開口数 NA_2 は、第1の開口数と第1の屈折率の比率(NA_1/n_1)を上回るまたはそれに等しい NA_2 の第3の理想的条件に接近するように選択される、第2の顕微鏡と、中間画像上に集束され、第3の開口数 $NA_3 = 1$ を有する、第3の対物レンズを含む、第3の顕微

40

50

鏡であって、第3の対物レンズは、第3の顕微鏡が、サンプル中の斜面に対応する、中間画像内の斜面を結像するような傾斜角度だけ、第2の対物レンズの光学軸に対して傾斜される、光学軸を有する、第3の顕微鏡とを備える。

【0016】

一実施例では、第1の対物レンズは、シリコン浸漬式の対物レンズである。

【0017】

別の実施例では、傾斜角度は、顕微鏡検査システムの収集効率を最適化するように選択される。

【0018】

一実施例では、第3の対物レンズは、第2の空気浸漬式の対物レンズの視野と交差するように位置付けられる、中実ガラス錐台を含む。一実施例では、中実ガラス錐台は、面取りされた縁を有する。別の実施例では、中実ガラス錐台は、第2の空気浸漬式の対物レンズの視野に対応するサイズを有する、端部領域が、視野の中に挿入され、第2の空気浸漬式の対物レンズからの利用可能な光を収集することを可能にするように成形される。別の実施例では、第3の顕微鏡は、傾斜角度を調節するために回転可能である。

10

【0019】

別の実施形態は、サンプル中の斜面を結像するための顕微鏡検査システムを構成する方法を対象とし、顕微鏡検査システムは、第1の顕微鏡と、第2の顕微鏡と、第3の顕微鏡とを含む。本方法は、第1の対物レンズのための第1の理想的条件と第2の理想的条件との間で選定される妥協に基づいて、第1の顕微鏡のための第1の対物レンズを選択することであって、第1の理想的条件は、第1の対物レンズが第1の開口数 NA_1 n_0 を有することであって、 n_0 は、サンプルの屈折率の推定値であって、第2の理想的条件は、第1の対物レンズが第1の屈折率

20

【化1】

$$n_1 \approx n_0$$

を有する第1の浸漬媒体を有することであって、第1の対物レンズは、照明光シートをサンプルに指向し、サンプルからの放出光を収集するように構成される、ことと、第2の顕微鏡のための第2の対物レンズを選択することであって、第2の対物レンズは、第1の対物レンズからの実質的に全ての放出光を収集するように構成される、ことと、サンプル中の斜面を中間像面上に再結像するように第2の顕微鏡を構成することと、第3の顕微鏡のための第3の対物レンズを選択することであって、第3の対物レンズは、第2の対物レンズに対して中間像面の反対側上に位置付けられ、傾斜角度に適應しながら、第2の対物レンズからの実質的に全ての放出光を収集するように構成される、ことと、第3の対物レンズの一次光学軸が第2の対物レンズの一次光学軸に対して傾斜角度だけ回転されるように、第3の対物レンズを位置付けることとを含む。

30

【0020】

一実施例では、サンプル中の斜面を再結像するように第2の顕微鏡を構成することは、中間像面におけるサンプル中の斜面の画像の拡大率 M_{RR} が、条件：

【化2】

40

$$M_{RR} = M_1 M_2^{-1} = n_1 / n_2$$

を充足させるように、第2の顕微鏡の拡大率 M_2 を構成することを含み、式中、 M_1 は、第1の顕微鏡の拡大率であって、 n_1 は、第1の対物レンズの浸漬媒体の屈折率であって、 n_2 は、第2の対物レンズの浸漬媒体の屈折率である。別の実施例では、第2の顕微鏡は、レンズを含み、第2の顕微鏡の拡大率を構成することは、レンズの焦点距離を選択することを含む。一実施例では、第2の対物レンズを選択することは、空気浸漬式の第2の対物レンズを選択することを含む。別の実施例では、第1の対物レンズを選択することは、シリコン浸漬式の対物レンズを選択することを含む。別の実施例では、第1の対物レ

50

レンズを選択することは、グリセロール浸漬式の対物レンズを選択することを含む。一実施例では、第3の対物レンズを選択することは、中実ガラス錐台を有する、第3の対物レンズを選択することを含む。別の実施例では、第3の対物レンズを位置付けることは、中実ガラス錐台の先端が第2の対物レンズの視野と交差するように、第3の対物レンズを位置付けることを含む。別の実施例では、第2の対物レンズを選択することは、 n_2 を最小限にすることと、第2の対物レンズの第2の開口数 NA_2 が、条件：

【化3】

$$NA_2/n_2 \geq NA_1/n_1$$

を満たすように選択することを含む。

【0021】

一実施例では、本方法はさらに、部分的に、照明光シートの発散角度に基づいて、傾斜角度を調節することを含む。

【0022】

別の実施形態によると、傾斜された像面の高開口数低収差結像のための顕微鏡検査システムは、サンプルからの放出光を収集するように配列され、第1の開口数 NA_1 および第1の屈折率 n_1 を伴う第1の浸漬媒体を有する、第1の対物レンズであって、第1の条件と第2の条件との間で選定される妥協に基づいて構成され、第1の条件は、

【化4】

$$NA_1 \geq n_0$$

であって、第2の条件は、

【化5】

$$n_1 \approx n_0$$

であって、式中、 n_0 は、サンプルの屈折率の推定値である、第1の対物レンズと、第2の開口数 NA_2 を有し、第1の対物レンズからの実質的に全ての放出光を収集するように位置付けられ、構成される、第2の対物レンズであって、第1と第2の対物レンズの組み合わせは、サンプルの中間画像を生成するように構成される、第2の対物レンズと、中間画像上に集束される第3の対物レンズであって、第3の対物レンズは、第3の対物レンズが中間画像内の傾斜された平面を結像するような傾斜角度だけ、第2の対物レンズの光学軸に対して傾斜される、光学軸を有し、さらに、第2の対物レンズの視野に対応するサイズを有する、端部領域が、視野の中に挿入され、傾斜角度に適応しながら、第2の対物レンズからの実質的に全ての放出光を収集することを可能にするように成形される、中実ガラス錐台を有する、第3の対物レンズとを備える。

【0023】

一実施例では、第1の対物レンズはさらに、照明光ビームをサンプルに送達するように構成および配列される。

【0024】

これらの例示的側面および実施形態のさらに他の側面、実施形態、ならびに利点は、下記に詳細に議論される。本明細書に開示される実施形態は、本明細書に開示される原理のうち少なくとも一つと一貫した任意の様式において、他の実施形態と組み合わせられてもよく、「ある実施形態」、「いくつかの実施形態」、「ある代替実施形態」、「種々の実施形態」、「一実施形態」、または同等物の言及は、必ずしも、相互に排他的ではなく、説明される特定の特徴、構造、または特性が、少なくとも一実施形態では含まれてもよいことを示すように意図される。本明細書のそのような用語の表出は、必ずしも、全て同一実施形態を参照するわけではない。本明細書に説明される種々の側面および実施形態は、説明される方法または機能のいずれかを実施するための手段を含んでもよい。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

少なくとも一実施形態の種々の側面が、付随の図を参照して下記に議論され、これは、正確な縮尺で描かれることを意図するものではない。図は、種々の側面および実施形態の例証ならびにさらなる理解を提供するために含まれ、本明細書内に組み込まれ、その一部を構成するが、本開示の限定の定義として意図するものではない。図中では、種々の図に図示される、各同じまたはほぼ同じ構成要素は、同様の番号によって表される。明確性の目的のために、全ての構成要素が、全ての図において標識されていない。

【図 1】図 1 は、斜面顕微鏡検査システムの一実施例の略図である。

【図 2 A】図 2 A は、本発明の側面による、斜面光シート顕微鏡検査システムの一実施例のための光収集経路を示す、機能ブロック図である。

10

【図 2 B】図 2 B は、照明光経路の実施例を示す、斜面光シート顕微鏡検査システムの一部の一実施例の機能ブロック図である。

【図 3】図 3 は、本発明の側面による、斜面光シート顕微鏡検査システム内の種々の顕微鏡の理論的収集角度と結果として生じる収集 / 放出経路開口数との間の関係を示す、略図である。

【図 4】図 4 は、本発明の側面による、斜面光シート顕微鏡検査システムのための設計方法論の実施例を図示する、プロセスフロー図である。

【図 5】図 5 は、照明光シートの実施例のパラメータを図示する、略図である。

【図 6 A】図 6 A - C は、本発明の側面による、図 2 A の顕微鏡検査システムの実施形態において使用され得る、第 3 の対物レンズの実施例の略図である。

20

【図 6 B】図 6 A - C は、本発明の側面による、図 2 A の顕微鏡検査システムの実施形態において使用され得る、第 3 の対物レンズの実施例の略図である。

【図 6 C】図 6 A - C は、本発明の側面による、図 2 A の顕微鏡検査システムの実施形態において使用され得る、第 3 の対物レンズの実施例の略図である。

【図 7】図 7 は、本発明の側面による、顕微鏡検査システムを構成するための方法の一実施例のフロー図である。

【図 8】図 8 は、本発明の側面による、図 2 A のシステムの一実施例の放出経路を示す、略図である。

【図 9】図 9 A および 9 B は、図 8 のシステムの実施例の理論的モデルの角度光線伝送経路を示す、略図である。

30

【図 10】図 10 は、本発明の側面による、図 8 のシステムの実施例の放出経路を示す、略図である。

【図 11】図 11 は、本発明の側面による、図 2 A、8、および 10 のシステム内で使用され得る、第 3 の対物レンズの実施例を示す、略図である。

【図 12 A】図 12 A - C は、本発明の側面による、図 11 の第 3 の対物レンズの実施例を示す、略図である。

【図 12 B】図 12 A - C は、本発明の側面による、図 11 の第 3 の対物レンズの実施例を示す、略図である。

【図 12 C】図 12 A - C は、本発明の側面による、図 11 の第 3 の対物レンズの実施例を示す、略図である。

40

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 6 】

側面および実施形態は、開口数または光学効率における最小限の収差および損失を伴って、高開口数において傾斜された平面を結像するための解決策を提供し、これは、様々な結像用途に適用されてもよい。ある側面および実施形態は、2つの付加的対物レンズを含み、サンプルの高分解能画像を生成する、結像モジュールとともに、単一对物レンズを使用して、サンプルを照明し、サンプルからの光を収集する、斜面顕微鏡検査システムを対象とする。本明細書で使用されるように、用語「対物レンズ (o b j e c t i v e)」は、レンズまたはミラー等の1つまたはそれを上回る光学要素を含む、光学モジュールを指し、本明細書では、用語「対物レンズ (o b j e c t i v e l e n s)」と同義的に使用

50

される。下記にさらに議論されるように、本明細書に開示される顕微鏡検査システムの実施形態は、従来の非光学的に区分化された（但し、高分解能である）顕微鏡によって設定される、 $NA = n_0$ （＝水性サンプル中 1.33）限界値に接近する 1.2～1.3 の範囲内の開口数（NA）値を達成し、Dunsby（わずか 0.74 の理論的 NA）および Yang（1.06 の実現された NA）に開示されるシステムに優る有意な分解能改良を提供し得る。

【0027】

図 2 A を参照すると、ある実施形態による、顕微鏡検査システムの一実施例の機能ブロック図が図示される。示されるように、顕微鏡検査システム 200 は、顕微鏡モジュール 202 と、サンプル 206 を結像するように構成される、結像モジュール 204 とを含む。顕微鏡モジュール 202 は、第 1 の対物レンズ 210（Obj₁）と、第 1 のレンズ 212（TL₁）とを含み、これは、本明細書には、組み合わせて、「第 1 の顕微鏡」とも称される。図 2 A に示される実施例では、サンプル 206 は、第 1 の対物レンズ 210 の正面焦点面または物体像面（IP₀）に設置される、カバースリップ 208 上に調製される。しかしながら、他の実施例では、例えば、皿およびマルチウェルプレート等の他のサンプル調製技法も、使用されることができ、顕微鏡モジュール 202 は、ある実施例では、下記に議論されるように、結像モジュール 204 の含有および配列を通して斜面光シート顕微鏡検査システム 200 に変換される、標準的顕微鏡であってもよい。第 1 の対物レンズ 210 は、照明ビーム 216 をサンプル 206 に指向することと、放出される光 220 をサンプル 206 から収集することとの両方のために使用される。図 2 A は、顕微鏡検査システム 200 の光収集または結像経路のみを示す。完全性のために、図 2 B は、照明経路を含む、顕微鏡モジュール 202 の配列の実施例を示す。

【0028】

図 2 B を参照すると、例えば、レーザ等の光源 214 が、照明ビーム 216 を生成する。照明ビーム 216 は、ビーム結合デバイス 218 を使用して、第 1 の対物レンズ 210 の光学経路の中に結合され、第 1 の対物レンズ 210 によってサンプル 206 上に集束される。ある実施例では、ビーム結合デバイス 218 は、照明ビーム 216 を第 1 の対物レンズ 210 に向かって反射させ、サンプル 206 からの放出光 220 が通過することを可能にする、ビームスプリッタであってもよい。しかしながら、他の実施例では、本開示の利点を前提として、当業者によって理解されるであろうように、他の配列またはビーム結合デバイス 218 が、使用されてもよい。同様に、図 2 B に示される実施例では、照明経路は、光源 214 からの照明ビーム 216 をビーム結合デバイス 218 に指向するように構成および配列される、レンズ 222 と、折畳するミラー 224 とを含む。しかしながら、他の実施例では、本開示の利点を前提として、当業者によって理解されるであろうように、任意の数および配列の光学要素（レンズまたはミラー）が、照明ビームを第 1 の対物レンズ 210 に指向するために使用されてもよい。ある実施例では、照明ビームを第 1 の対物レンズ 210 に指向する、光源 214 および光学要素（例えば、218、222、224）は、顕微鏡モジュール 202 の一部であってもよい。他の実施例では、これらの構成要素のうちの 1 つまたはそれを上回るものは、顕微鏡モジュール 202 と別個であってもよい、結像モジュール 204 内に含まれてもよい、もしくは結像モジュール 204 および / または顕微鏡モジュール 202 に結合され得る、別個のモジュールの一部であってもよい。

【0029】

再び図 2 A を参照すると、一実施形態では、結像モジュール 204 は、レンズ 228（TL₂）と第 2 の対物レンズ 230（Obj₂）の組み合わせを含む、第 2 の顕微鏡と、第 3 の対物レンズ 232（Obj₃）と第 3 のレンズ 234（TL₃）の組み合わせを含む、第 3 の顕微鏡とを含む。第 1、第 2、および第 3 のレンズ 212、228、および 234 は、図 2 A では、単一レンズとして表されるが、それぞれ、実践では、1 つまたはそれを上回る光学要素（レンズまたはミラー）を使用して実装されてもよいことを理解されたい。結像モジュール 204 はさらに、検出器 226 を含む。第 1 のレンズ 212 と第 2 の

10

20

30

40

50

レンズ 228 の組み合わせは、サンプル 206 から放出される光 220 (また、放出または放出光とも称される) を第 1 の対物レンズ 210 の背面焦点面 (BFP₁) から第 2 の対物レンズ 230 の背面焦点面 (BFP₂) に指向する。図 2A に示される実施例では、第 1 および第 2 のレンズ 212、228 は、中継構成にあって、顕微鏡モジュール 202 は、第 1 の中間像面 (IP₁) を第 1 および第 2 のレンズ 212、228 間に形成し、第 2 のレンズ 228 は、その像面からの光 220 を第 2 の対物レンズ 230 の背面焦点面 (BFP₂) に中継する。第 3 のレンズ 234 は、第 3 の対物レンズ 232 の背面焦点面 (BFP₃) からの光 220 を最終像面 (IP₄) 上に集束させ、そこで、検出器 226 によって受光され得る。図 2A に示されるように、第 2 および第 3 の対物レンズ 230、232 は、第 2 の対物レンズ 230 の焦点面に形成される第 2 の中間像面 (IP₂) が、第 3 の対物レンズ 232 の焦点面に形成される第 3 の中間像面 (IP₃) に対して角度 だけ傾斜されるように、相互に対して傾斜されるように配列される。角度 は、本明細書では、第 3 の対物レンズ 232 の傾斜角度と称される。

10

【0030】

無収差顕微鏡検査システムの結像分解能は、開口数 (NA) に比例する。したがって、達成される全体的開口数が高いほど、システムの結像分解能もより良好となる。側面および実施形態は、結像されているサンプル 206 およびサンプル 206 を照明するために使用される光シート (照明ビーム) 216 の種々の性質およびパラメータ、ならびに顕微鏡検査システム 200 の実践的実装に関するある光学原理および機械的制約を考慮した、放出経路の非常に高い全体的開口数 NA_{em} (Dunsby または Yang のいずれかのシステムに関して達成可能なものより有意に高い) を達成するように顕微鏡検査システム 200 を設計および構成するステップを対象とする。生きている生物学的サンプル 206 を結像するためのある具体的実施例は、下記に提示される。しかしながら、本明細書に開示される設計プロセスおよび原理は、結像されるべき任意のタイプのサンプルに適用されてもよい。

20

【0031】

顕微鏡検査システム 200 の種々の重要なパラメータ間の関係およびそれに関する制約は、図 3 を参照して、かつ図 2A の参照を継続して理解され得る。図 3 は、顕微鏡検査システム 200 内の種々の顕微鏡の理論的収集角度と結果として生じる収集 / 放出経路開口数との間の関係を示す、略図である。図 3 では、軸 302 は、顕微鏡検査システム 200 の一次光学軸に対応し、これはまた、第 1 および第 2 の対物レンズ 210、230 の一次光学軸である。軸 304 は、第 3 の対物レンズ 232 の傾斜された光学軸に対応し、これは、上記に議論されるように、一次光学軸 302 に対して角度 だけ傾斜される。個別の対物レンズ毎のサンプル / カバースリップ界面の開口数は、方程式 (1) によって与えられ、式中、 $x = 0, 1, 2, 3$ である。

30

【数 1】

$$NA_x = n_x \sin \theta_x \quad (1)$$

方程式 (1) では、 n_x は、サンプルまたは個別の対物レンズの浸漬媒体の屈折率であって、 θ_x は、対応する界面または対物レンズによって定められる半角である。

40

【0032】

照明光シート 216 は、発散角度、 e_x を有する。単一对物レンズ (第 1 の対物レンズ 210) は、サンプル 206 を照明することと、サンプル 206 から放出される光 220 を収集することとの両方のために使用されるため、第 1 の対物レンズ 210 の収集角度 θ_1 の一部は、図 3 に示されるように、光シート e_x によって占有または「使い切られる」。図 3 は、光シートの縁が第 1 の対物レンズ 210 の収集円錐の縁と一致する、「最良の場合」を図示する (図 3 における同一縁線 306 から測定された e_x および θ_1)。光シートが第 1 の対物レンズ 210 の収集円錐の内側に偏移される (すなわち、 e_x によって定義された円錐の左縁が、図 3 では、右または時計回り方向に移動されるであろう

50

ことが、可能性として考えられるが、本配列は、 NA_{em} （放出を収集するために使用される第1の対物レンズ210の達成可能開口数 NA_1 の一部）に損失を引き起こす。

【0033】

Dunsbyによると、Dunsby顕微鏡検査システムの放出経路の結果として生じる全体的開口数のために達成可能な最大の潜在的開口数は、以下によって与えられる。

【数2】

$$NA_{pot} = n_1 \sin \Phi_{em} \quad (2)$$

照明および収集光ビーム216、220が、 90° 分離される（相互に直交する）という仮定に基づいて、収集される放出の半角 Φ_{em} は、図3から導出可能であって、Dunsbyによると、方程式(3)によって与えられる。

【数3】

$$\Phi_{em} = 2\theta_1 - \Phi_{ex} - \pi/2 \quad (3)$$

しかしながら、下記にさらに解説されるように、ある側面および実施形態によると、顕微鏡検査システム200は、 Φ_{em} だけではなく、 β も同様に収集するように構成されることができる。 β は、Dunsbyシステム内で収集されなかったが、本発明の側面に基づく本明細書に開示される顕微鏡検査システム200の実施形態では「回収される」、付加的放出される光を表す、収集角度である。したがって、ある側面によると、顕微鏡検査システム200の実施形態では、以下となる。

【数4】

$$NA_{em} = n_1 \sin \left(\Phi'_{em} + \beta/2 \right) \quad (4)$$

これは、第3の対物レンズ232が、ある実施形態では、第2の対物レンズ230からのほぼ全ての光を捕捉するように構成されることができるという認識に基づく。具体的には、下記にさらに議論されるように、第3の対物レンズ232は、第3の対物レンズ232の開口数 NA_3 が、第2の対物レンズ230の浸漬媒体の屈折率 n_2 を超える（ $NA_3 > n_2$ ）ように構成されることができる。これは、放出/収集経路のための最大の潜在的全体的開口数 NA_{em} を方程式(4)に与えられる形態に修正し、これは、回収された放出半角 $\beta/2$ を含み、Dunsbyによって以前に検討された NA_{pot} 値より実質的に高い。図3から、以下が導出されることができる。

【数5】

$$\beta = \pi/2 - \Phi_{em} \quad (5)$$

【0034】

方程式(4)において使用されるパラメータ Φ'_{em} は、以下によって与えられる。

【数6】

$$\Phi'_{em} = 2\theta_{min} - \Phi_{ex} - \pi/2 \quad (6)$$

方程式(6)では、 $\theta_{min} = \min(\theta_1, \theta_2)$ であって、これは、本発明のある側面による、 NA_{em} に関する関連パラメータが、第1および第2の対物レンズ210、230からの2つの収集角度のより小さい方であるという認識を反映させる。前述から、方程式(4)は、以下のように書き直される。

【数7】

10

20

30

40

50

$$NA_{em} = n_1 \sin\left(\Phi'_{em}/2 + \pi/4\right) \quad (7)$$

反射性損失を無視すると、顕微鏡検査システム 204 の収集効率 C は、少なくとも、実際の / 結果として生じる放出経路開口数と第 1 の対物レンズ 210 の開口数の比率の二乗の大きさである。

【数 8】

$$C \geq \left(NA_{em}/NA_1\right)^2 \quad (8)$$

10

【0035】

上記に議論される原理に基づいて、顕微鏡検査システム 200 の実施形態は、以下のプロセスおよび考慮点に従って、設計ならびに構成されることができる。図 4 は、ある側面による、斜面光シート結像顕微鏡検査システムを設計する方法内に含まれ得る、ステップおよび考慮点の実施例を図示する、プロセスフロー図である。当業者によって、本開示の利点を前提として、ステップは、図 4 に図示される順序で実施される必要はないことが理解されるであろう。図 4 の略図は、説明の明確性および利便性のために提供され、限定することを意図するものではない。本明細書に説明されるプロセスは、3 つの顕微鏡がそれぞれ、全体的システムの文脈において検討されるとき、かつ任意の所与の実装において使用される光シート 216 およびサンプル 206 の性質に照らして、顕微鏡検査システム 200 に、以前は達成不能であった結像性能および有用性を提供するように賢明に選択ならびに構成され得る、ある性質およびパラメータを有するという認識を活用する。

20

【0036】

ステップ 402 は、第 1 の対物レンズ 210 を選択または構成するステップを含む。

【0037】

平坦カバーリップを通した蛍光顕微鏡検査等のある用途では、サンプル 206 は、光 220 を全ての方向に放出し得、したがって、以下の条件： $\sin \theta = 1$ 、が該当し、したがって、方程式 (1) から、 $NA_0 = n_0$ となり、式中、 n_0 は、サンプル 206 の屈折率である。結果として、ある側面によると、第 1 の対物レンズ 210 は、 $NA_1 = n_0$ を設定することによって、サンプル 206 から放出される光の全てを捕捉するように構成され得ることが認識される。加えて、高品質結像のために、第 1 の対物レンズは、サンプル媒体の屈折率 (n_0) と第 1 の対物レンズの浸漬媒体の屈折率 (n_1) との間に良好な整合が存在するように構成されるべきである。屈折率における不整合は、深度依存収差をサンプル 206 の結果として生じる画像内に引き起こす。したがって、ある側面によると、第 1 の対物レンズ 210 は、良好な屈折率整合と良好な収集円錐角度の両方を提供し、サンプル 206 から収集される光ならびに結像分解能および品質を最大限にするように構成されることができる。理想的には、第 1 の対物レンズ 210 は、 $NA_1 = n_0$ および $n_1 = n_0$ を伴って構成され得る。しかしながら、当業者は、本開示の利点を前提として、実践では、特に、複数の異なるサンプルに関して、これらの理想的条件の両方を同時に達成することが不可能であり得ることを理解するであろう。故に、ステップ 402 は、最大の実践的開口数が取得される一方、また、サンプルの予期される範囲のために屈折率における良好な整合を達成するように、これらの 2 つの条件の妥協に基づいて、第 1 の対物レンズ 210 のための構成を選択するステップを含んでもよい。したがって、ある実施例では、第 1 の対物レンズ 210 は、

30

40

【化 6】

$$NA_1 \geq n_0$$

および

50

【化 7】

$$n_1 \approx n_0$$

を伴って構成され得る。

【0038】

さらに、ある実施形態によると、顕微鏡モジュール 202 は、第 1 のレンズ 212 および第 1 の対物レンズ 210 が、理想的レンズ挙動に近似する、完全無限遠補正レンズであるように構成されることができる。本配列は、最適遠隔再焦点化性能を提供する。

【0039】

最小限の収差を伴って、サンプル 206 中の限定されたボリューム内の任意の平面を再結像するために、サンプル 206 と第 2 の対物レンズ 230 の焦点面に形成される第 2 の中間像面 (IP₂) との間の側方および軸方向拡大率は、等しくされる必要がある。本条件は、拡大率 M_{RR} が n₁ / n₂ に等しいときに達成され、式中、n₂ は、第 2 の対物レンズ 232 の浸漬媒体の屈折率である。本原理は、再焦点化ルールと称される。M_{RR} は、下記の方程式 (9) によって与えられる。

【数 9】

$$M_{RR} = M_1 M_2^{-1} \quad (9)$$

方程式 9 では、M₁ は、顕微鏡モジュール 202 (第 1 の対物レンズ 210 と第 1 のレンズ 212 の組み合わせによって生成され、本明細書には、「第 1 の顕微鏡」とも称される) の拡大率であって、M₂ は、第 2 のレンズ 228 と第 2 の対物レンズ 230 の組み合わせ (本明細書には、「第 2 の顕微鏡」とも称される) の拡大率である。上記に記載のように、第 3 の対物レンズ 232 と第 3 のレンズ 234 の組み合わせは、本明細書では、「第 3 の顕微鏡」と称され得る。第 1、第 2、および第 3 の顕微鏡毎に、個別の顕微鏡の拡大率 M_x は、下記の方程式 (10) によって与えられ、式中、x = 1、2、3 である。

【数 10】

$$M_x = f_{TLx} / f_{Objx} \quad (10)$$

方程式 (10) では、f_{TLx} は、個別のレンズの焦点距離であって、f_{Objx} は、個別の対物レンズの焦点距離である。

【0040】

したがって、上記の方程式 (9) から、再焦点化ルールは、以下のように規定されることができる。

【数 11】

$$M_{RR} = M_1 M_2^{-1} = n_1 / n_2 \quad (11)$$

加えて、図 2A を参照すると、ある側面および実施形態によると、さらなる条件が、適用されてもよい、すなわち、第 2 の対物レンズの背面焦点面 (BFP₂) は、方程式 (12) に従って定寸される。

【数 12】

$$BFP_2 \geq M_{BFP} BFP_1 \quad (12)$$

第 1 の背面焦点面から第 2 の背面焦点面への拡大率 M_{BFP} は、第 2 のレンズ 228 および第 1 のレンズ 212 の焦点距離の比率によって与えられる。

【数 13】

10

20

30

40

50

$$M_{BFP} = f_{TL2} / f_{TL1} \quad (13)$$

対物レンズのいずれかの背面焦点面の直径 (B F P _x ; x = 1, 2, 3) は、以下に従って、対物レンズの対応する開口数および焦点距離に関連する。

【数 1 4】

$$BFP_x = 2f_{objx} NA_x \quad (14)$$

第 1 の顕微鏡のパラメータが、既知 (例えば、 f_{obj1} 、 d_1 、 f_{TL1}) である場合、第 2 の顕微鏡の構成要素およびパラメータは、BFP₂ を適切に位置付けるように選択または構成されることができる。したがって、ステップ 404 は、方程式 (11) に規定される再焦点化条件と方程式 (12) に記載される付加的条件の組み合わせを適用することによって、第 2 の対物レンズ 230 を選択または構成するステップを含んでもよい。これらの 2 つの条件をとともに適用し、上記の方程式 (1) を検討することは、以下の条件を与える。

【数 1 5】

$$\sin \theta_2 \geq \sin \theta_1 \quad (15)$$

上記の方程式 (1) から、方程式 (15) の条件は、同等に、以下のように記載されることができる。

【数 1 6】

$$NA_2/n_2 \geq NA_1/n_1 \quad (16)$$

方程式 (16) に記載された条件は、第 2 の対物レンズ 230 が、第 1 の対物レンズ 210 からの全ての光の光線を捕捉し、それによって、顕微鏡検査システム 200 の全体的開口数における任意の損失ならびに結像分解能および光学効率の関連付けられる損失を回避するための選好を表す。

【0041】

図 4 を参照すると、顕微鏡検査システム 200 のための設計プロセスは、顕微鏡モジュール 202 を選択するステップ 406 を含んでもよい。上記に議論されるように、標準的 / 既存の顕微鏡スタンドが、選択されてもよく、好ましくは、理想的レンズ挙動に近似する完全に無限遠補正されたレンズである、第 1 のレンズ 212 および第 1 の対物レンズ 210 を有する。さらに、上記に議論されるように、顕微鏡モジュール 202 は、ステップ 402 において、第 1 の対物レンズ 210 が、結像されることが予期される典型的サンプルのための条件

【化 8】

$$NA_1 \geq n_0$$

および

【化 9】

$$n_1 \approx n_0$$

を満たすように選択または構成されることができる。したがって、第 1 の対物レンズの焦点距離 f_{obj1} および第 1 のレンズの焦点距離 f_{TL1} は、一次拡大率 M_1 を設定する。上記に議論されるように、ステップ 404 では、第 2 の対物レンズ 230 のパラメータは、再焦点化条件を課し、収差を最小限にするように構成されることができる。例えば、第 2 の対物レンズの焦点距離 f_{obj2} および第 2 のレンズの焦点距離 f_{TL2} は、 M_B

10

20

30

40

50

F P のための固定された値を達成するために、方程式 (1 0)、(1 1)、および (1 5) によって制約され得る。距離 d_1 は、特に、顕微鏡モジュール 2 0 2 が既存の顕微鏡スタンドである場合、容易に構成可能ではあり得ないが、他のパラメータが既知の距離 d_1 に基づいて選択され得るように、正確に測定され得る。例えば、距離 d_2 は、以下の関係を使用することによって、B F P ₁ から B F P ₂ を結像するように調節されることができ

【数 1 7】

$$d_2 = f_{TL2} + (f_{TL1} - d_1)M_{BFP}^2 \quad (17)$$

本アプローチは、斜面光シート顕微鏡検査システム 2 0 0 の実施形態を様々な市販の顕微鏡モジュール 2 0 2 と互換性を持たせる。

【0 0 4 2】

上記に議論されるように、ある実施形態によると、第 3 の対物レンズ 2 3 2 は、上記の方程式 (7) に表される放出 / 収集経路のための最高の潜在的全体的開口数 NA_{em} を維持するように、その開口数 NA_3 が第 2 の対物レンズ 2 3 0 の浸漬媒体の屈折率 n_2 に等しいまたは超える ($NA_3 \geq n_2$) ように構成される。本条件は、第 3 の対物レンズ 2 3 2 の収集効率を最大限にし、第 3 の対物レンズ 2 3 2 が第 2 の対物レンズ 2 3 0 からの全ての光を捕捉することが可能であることを確実にする (図 4 におけるステップ 4 0 8)。しかしながら、大開口数は、概して、大きい関連付けられる円錐角度に起因して、顕微鏡のための短作動距離をもたらし、これは、実践的実装を非常に困難にし得る。ある実施例では、 θ_1 および θ_2 は、例えば、 70° を超え得る。したがって、ある側面によると、第 3 の対物レンズ 2 3 2 の開口数に関する要件は、 n_2 を最小限にする一方、また、方程式 (1 5) に規定される条件を満たすことによって、低減させられることができる (図 4 におけるステップ 4 1 0)。

【0 0 4 3】

再び図 2 A を参照すると、サンプル 2 0 6 の斜面は、第 3 の対物レンズ 2 3 2 と第 3 のレンズ 2 3 4 の組み合わせによって再結像され、サンプル 2 0 6 の画像を最終像面 I P ₄ に形成する。ステップ 4 2 0 では、全体的システム拡大率 M_T は、下記の方程式 (1 8) によって与えられ、そうでなければ、自由パラメータである、第 3 のレンズの焦点距離 f_{TL3} の適切な選択を通して、所望の値に設定されることができ

【数 1 8】

$$M_T = M_{RR} \cdot M_3 \quad (18)$$

【0 0 4 4】

光シート顕微鏡検査は、概して、典型的には、約 $1.35 \sim 1.40$ の範囲内の n_0 の値を有し、約 1.37 の平均屈折率を有し得る、生きている生物学的サンプル 2 0 6 を結像するために有用である。故に、典型的生きている生物学的サンプル 2 0 6 内で放出される、あらゆる可能性として考えられる光を捕捉するために、

【化 1 0】

$$NA_1 \geq 1.40.$$

に設定する。これは、 $1.40 < NA_{oi1} < 1.45$ の範囲内の典型的開口数であるように構成され得る、油浸漬式の対物レンズを使用することによって達成されることができ

る。しかしながら、第 1 の対物レンズ 2 1 0 のための油浸漬式の対物レンズを選択することは、レンズの浸漬媒体とサンプル 2 0 6 との間の屈折率不整合 ($n_1 \neq n_0$) をもたら

し、これは、画像分解能を著しく劣化させる、深度 (z) 依存球面収差を生成する。上記

10

20

30

40

50

に議論されるように、第1の対物レンズ210は、最大の有用な開口数を得ることと、良好な屈折率整合を維持することとの間の良好な妥協を達成することに基づいて、選択および構成されることができる。故に、ある実施形態では、シリコン対物レンズが、第1の対物レンズ210のために選択される。この場合、 $NA_1 = NA_{\text{silicone}}$ （例えば、 $NA_{\text{silicone}} = 1.35$ ）であって、 $n_1 = n_{\text{silicone}} = 1.41$ である。平均 $n_0 = 1.37$ を伴う、典型的に生きている生物学的サンプル206に関して、第1の対物レンズ210のための本選択は、約0.02の開口数におけるデルタ（ NA ）（上記に記載のように、好ましくは、 $NA_1 = n_0$ であって、ここでは、本条件は、あまり満たされないが、デルタは、非常に小さく、サンプル206からのほぼ全ての利用可能な光が第1の対物レンズ210によって収集され得ることを意味する）と、最小限の深度依存収差を引き起こす、わずかに0.04の屈折率（ n ）におけるデルタまたは不整合とを提供する。したがって、本選択は、上記に従って、良好またはさらに最適な妥協を表し得る。比較のために、良好な水浸漬式の対物レンズは、 $NA_{\text{water}} = 1.27$ および $n_{\text{water}} = 1.33$ の値を有し、類似深度依存収差であるが、有意に低い収集能力（より低い開口数に起因して）をもたらす。さらに、上記に議論されるように、匹敵する油浸漬式の対物レンズは、開口数（例えば、 $NA_{\text{oil}} = 1.45$ を伴う）を最大限にするが、屈折率における不整合に起因して、サンプル206中の深度における結像性能および関連付けられる立体情報を著しく劣化する、深度依存収差（典型的には、 $n_{\text{oil}} = 1.52$ であって、したがって、屈折率デルタは、約0.15である）を引き起こす。したがって、ある実施形態による、第1の対物レンズ210のためのシリコン対物レンズまたは類似中間浸漬屈折率レンズの選択は、水および油対物レンズに優る有意な利点を提供し得る。

【0045】

例えば、ある事例では、サンプル（生きている生物学的サンプル等）は、 $1.33 < n_0 < 1.41$ の範囲内の屈折率を有し得る。したがって、 $NA_1 = 1.35$ および $n_1 = 1.41$ を伴う、シリコン対物レンズを選択することは、 $0.02 < NA - n_0 < 0.08$ の「誤差」または公差範囲を提供する。故に、この場合、

【化11】

$$NA_1 \geq n_0$$

（ NA の公差範囲内）および

【化12】

$$n_1 \approx n_0$$

（ n の公差範囲内）であって、これらの公差範囲は、ある用途では、好ましい限界である。別の実施例では、第1の対物レンズ210は、 $NA_1 = 1.3$ および $n_1 = 1.46$ を伴う、グリセロール浸漬式のレンズであってもよい。同一サンプル範囲に関して、本実施例は、 $0.03 < NA - n_0 < 0.11$ および $0.05 < n_1 - n_0 < 0.13$ の誤差範囲を提供する。シリコン実施例ほど最適ではないが、第1の対物レンズのための本選択肢（グリセロールまたは類似材料）は、それにもかかわらず、

【化13】

$$NA_1 \geq n_0$$

および

【化14】

$$n_1 \approx n_0$$

の所望の条件のために容認可能な妥協または容認可能な公差範囲を表し得る。対照的に、上記の公差範囲実施例からさらに逸脱する、第1の対物レンズ210のための選択肢は、依然として、生きている生物学的サンプルを結像するために動作し得るが、性能はさらに

、低減させられ、多くの用途において、そのような選択肢を望ましくないものにする。

【0046】

いったん対物レンズ（例えば、シリコン対物レンズ）が、第1の対物レンズ210のために選定されると、パラメータ NA_1 および n_1 （例えば、 $NA_1 = 1.35$ および $n_1 = 1.41$ ）が、把握される。したがって、本実施例に関して、方程式(16)の条件を適用することは、第2の対物レンズの開口数と第2の対物レンズの屈折率の比率 $NA_2 / n_2 = 0.96$ を設定する。上記に議論されるように、収集効率を最大限にするために $NA_3 = n_2$ であることが好ましいため、 n_2 を最小限にし、第3の対物レンズ232の開口数に関する要件を緩和することが望ましい。故に、第2の対物レンズ230は、 $NA_2 = 0.95$ を伴う、空気対物レンズ（ $n_2 = 1.0$ ）であることができ、これは、第1の（シリコン）対物レンズ210の角度範囲の99%を再結像することが可能である（ $\sin(0.95) / \sin(0.96)$ ）。

10

【0047】

上記のプロセスおよび原理に従って設計ならびに構成される、顕微鏡検査システム200の実施例は、収集効率において、DunsbyおよびYangによって開示されるシステムによって達成され得るものに優る有意な改良を達成する。以下の実施例では、照明光ビーム216は、 $\theta_x = 5^\circ$ の発散角度を有すると仮定される。例えば、サンプル206が $n_0 = 1.37$ を有すると仮定すると、その中の第1の対物レンズ210が、 $NA_1 = 1.35$ および $n_1 = 1.41$ を伴う、シリコン浸漬式のレンズであって、第2の対物レンズが、 $NA_2 = 0.95$ および $n_2 = 1.0$ を伴う、空気対物レンズである、顕微鏡検査システム200の実施形態は、従来の高分解能顕微鏡検査を用いて達成可能な1.37限界に非常に近い、 $NA_{em} = 1.32$ （上記の方程式(7)を適用する）を達成し、（反射性損失を無視して）収集効率は、95%である。対照的に、Dunsbyは、はるかに低い全体的開口数および非常に低い収集効率を達成する、システムを開示する。例えば、Dunsbyは、その中の第1および第2の対物レンズが両方とも、理論的には、わずか0.75の全体的開口数 NA_{pot} と、わずか63%の収集効率とを有する、 $NA_1 = NA_2 = 0.95$ を伴う空気対物レンズである、システムを開示する。Dunsbyに開示される別の実施例は、第1の対物レンズのために水対物レンズ（ $NA_1 = 1.2$ ； $NA_2 = 0.95$ ）を使用するが、理論的には、わずか0.74の全体的開口数 NA_{pot} を達成し、わずか38%の非常に不良な収集効率を有する。同様に、Yangに開示される実施例も、本明細書に開示される顕微鏡検査システム200の実施形態の性能に近いものを達成するものではない。例えば、Yangは、その中の第1の対物レンズが、 $NA_1 = 1.27$ を伴う、水対物レンズであって、第2の対物レンズが、 $NA_2 = 0.9$ を伴う、空気対物レンズである、実施例を開示する。本実施例は、理論的には、1.17の全体的システム開口数と、85%の収集効率とを提供するが、上記に議論される顕微鏡検査システム200の実施例より有意に低い。さらに、Yangは、実践では、本実施例は、実際には、わずか約1.06の全体的システム開口数と、わずか約70%の収集効率とを達成したことを開示している。本実施例によって実証されるように、Yangが、第2の対物レンズが第1の対物レンズからの本質的に全ての光を収集するように構成されることを確実にする利点を達成しなかったことは、着目に値する。

20

30

40

【0048】

第1および第2の対物レンズを選択ならびに構成するときに適用され得る、上記に議論される考慮点に加え、ある側面はさらに、第3の対物レンズ232の傾斜角度 θ_3 が、最適化され得ることを認識する。方程式(11)および(15)の条件を適用することは、高い所望の開口数 NA_2 によって設定される、大円錐角度 θ_2 に起因して、短作動距離を有する、第2の対物レンズ230をもたらし得る。第3の対物レンズ232の光学軸が、第2の対物レンズ230の光学軸と平行（ $\theta_3 = 0$ ）であった場合、短作動距離は、問題を提示しないであろう。しかしながら、上記に議論されるように、第3の対物レンズ232の光学軸は、照明光シート216を含有する、平面を効果的に結像するように、第1および第2の対物レンズ210、230の光学軸に対して角度 θ_3 （概して、非ゼロ）だけ傾斜され

50

る。故に、本発明のある側面は、これらの考慮点および NA_{em} を最大限にする目標に照らして、傾斜角度 および第 3 の対物レンズ 2 3 2 の性質を適切に選択することを対象とする（図 4 におけるステップ 4 1 2、4 1 4、4 1 6）。

【0049】

図 3 を参照して上記に議論されるように、光シート 2 1 6 は、 e_x の発散角度を有する。傾斜角度 は、光シート発散角度および第 1 の対物レンズ 2 1 0 の収集円錐の両方に関連し、方程式（19）に従って計算されることができる。

【数 19】

$$\alpha = \pi/2 + \Phi_{ex} - \theta_1 \quad (19)$$

10

発散角度 e_x 、したがって、傾斜角度 は、照明ビーム（光シート）2 1 6 の種々の性質に関連する。図 5 は、光シート 2 1 6 の実施例のパラメータを図示する、略図である。本実施例では、光シートは、ガウスビームである。光シート 2 1 6 は、 ω_0 のビームウェストを有する。レイリー範囲 Z_R は、それにわたってビームが ω_0 の幅まで発散する、距離である。ビームウェスト ω_0 は、光シート 2 1 6 の波長 e_x およびレイリー範囲の関数として表されることができる。

【数 20】

$$\omega_0 = \sqrt{(Z_R \lambda_{ex}) / \pi} \quad (20)$$

20

さらに、

【数 21】

$$\Phi_{ex} = \text{asin}\left(\lambda_{ex} / (n_0 \pi \omega_0)\right) \quad (21)$$

【0050】

生物学的結像に関して、光シート 2 1 6 の波長のための典型的値は、0.5 マイクロメートル（ μm ）であって、レーザ光源 2 1 4 を仮定すると、レイリー範囲 Z_R は、典型的には、約 5 ~ 50 μm の範囲内である。したがって、ビームウェスト ω_0 は、概して、約 1 ~ 3 μm の範囲内であり得、発散角度 e_x は、したがって、

30

【化 15】

$n_0 \approx 1.37$

（実施例として、上記に議論される）と仮定すると、約 $2^\circ \sim 8^\circ$ の範囲内であり得る。これらのパラメータならびに上記に議論される考慮点および実施例から判定された θ_1 ならびに θ_2 の値を前提として、これらの実施例に関して、方程式（19）は、傾斜角度が約 $20^\circ \sim 26^\circ$ の範囲内であり得ることを示す。例証として、その中のサンプル 2 0 6 が、 $n_0 = 1.37$ 、 $e_x = 5^\circ$ を伴う、生きている生物学的サンプルであって、第 1 の対物レンズ 2 1 0 が、 $NA_1 = 1.35$ および $n_1 = 1.41$ を伴う、シリコン対物レンズである、以下の実施例を検討する。本実施例では、方程式（3）は、

40

【化 16】

$\theta_1 \approx 73^\circ$

を与える。したがって、方程式（18）を適用すると、本実施例は、

【化 17】

$\alpha \approx 22^\circ$

50

を規定する。

【0051】

方程式(19)に基づいて、光シート216が使用されることを前提として、予期される最大発散角度 e_x は、傾斜角度 θ のための最大値を設定する。より高い傾斜角度を使用することは、放出経路収集角度 e_{em} 、したがって、また、 NA_{em} を低減させ、明白な利点を伴わない。したがって、ある側面によると、使用されている光シート216の性質および第1の対物レンズ210の収集円錐角度 θ_1 を把握すると、傾斜角度 θ が、収集効率を最適化するように選定されることができる(ステップ412)。本側面は、DunskyまたはYangのいずれによっても利用されていない、光シート216ならびに第1および第2の対物レンズ210、230のパラメータに依存する(ひいては、上記に議論されるように、結像されるべきサンプル206に基づいて、最適化され得る)、傾斜角度のための最適範囲または値 θ が存在するという重要な認識を活用する。例えば、上記に記載のように、Yangは、第3の対物レンズの傾斜角度が 30° であることを開示している。しかしながら、本明細書に開示される原理および側面に照らして、傾斜角度のためのYangの推奨される値が高すぎるということが理解され得る。上記の方程式を適用すると、Yangに開示される他のパラメータ(例えば、 $Z_R = 35 \mu m$; $e_x = 3^\circ$)を前提として、傾斜角度のための最適値が、約 21° であって、Yangによって開示される値より有意に低いことが示され得る。

【0052】

上記に議論されるように、第2の対物レンズ230に関する制約は、高角度範囲(例えば、 $\theta_2 > 70^\circ$)、したがって、(所与の既存のレンズ)短作動距離をもたらす。例えば、

【化18】

$$\theta_2 \approx 72^\circ$$

である場合、作動距離は、約 $200 \mu m$ であり得る。第3の対物レンズ232がまた、高開口数を伴うレンズに典型的である、短作動距離を有する場合、これは、傾斜角度 θ に関する扱いにくい機械的制約を生成する。例えば、第3の対物レンズ232が、第2の対物レンズ230と同一パラメータ(例えば、

【化19】

$$NA_2 = NA_3 \approx 0.95$$

および $n_2 = n_3 = 1.0$) を伴う、空気対物レンズであることになる場合、2つの対物レンズは、

【化20】

$$\alpha \approx 6^\circ$$

において衝突し、これは、顕微鏡の動作を無効にするであろう。故に、ある側面および実施形態は、本問題を回避するように第3の対物レンズ232を構成するステップを対象とする。

【0053】

ある側面によると、第3の対物レンズ232の浸漬媒体は、角度範囲 θ_3 を低減させるために、比較的至高屈折率を有するように選択される。例えば、第3の対物レンズ232の浸漬媒体は、油状であってもよく、これは、典型的には、空気より有意に高い、 $1.45 \sim 1.65$ の範囲内の屈折率を有する。方程式(1)から、任意の所与の開口数に関して、対物レンズの屈折率が高いほど、角度範囲は、低くなる。角度範囲を低減させることは、ひいては、作動距離を増加させ、システムに関する機械的制約を緩和させ得る(図4におけるステップ414)。例えば、上記に議論される空気の第2の対物レンズより若干高い開口数($NA_3 = 1$ および $NA_2 = 0.95$) と、所与の上記に与えられる範囲のより低い部分における屈折率とを有する、油状対物レンズを検討すると、最大角度範囲は、次

いで、

【化 2 1】

$$\theta_3 \approx \text{asin}(1/1.45) \approx 44^\circ$$

となる。本実施例に関して、作動距離は、典型的には、約 4 mm ~ 8 mm の範囲内であり得る。

【0054】

ある実施形態によると、第 3 の対物レンズ 232 は、ガラス等のより高い屈折率を伴う材料を使用することと、非常に短またはさらにゼロ（「接触」）もしくはさらに負の作動距離を可能にする、機械的配列を有することとの両方であるように構成される（図 4 におけるステップ 416）。一実施例では、第 3 の対物レンズ 232 は、適用可能な視野に合致し、上記に議論される NA_3 n_2 の条件に基づいて要求される開口数に合致する受光角を伴って成形される、中実ガラス正面「錐台」とともに構成される。したがって、一実施例では、 $f_{\text{r u s t u m}} > \text{max}$ であって、 max は、第 3 の対物レンズ 232 の開口数 NA_3 および第 3 の対物レンズの浸漬媒体の屈折率 n_3 に基づいて規定される（方程式（1）に従って）、 θ_3 の値（ある実施例では、

【化 2 2】

$$\approx 44^\circ$$

）である。これは、第 3 の対物レンズ 232 が、第 2 の対物レンズ 230 からの本質的に全ての光を収集することを可能にする一方、また、対物レンズ 2 と 3 との間の機械的衝突を伴わずに、斜面光シート顕微鏡検査システム 200 のための最高の全体的放出経路開口数 NA_{em} を達成するために、傾斜角度 θ の有意な範囲の調節、例えば、ガラス錐台のための最大 45° を可能にする。中実ガラス錐台または他の形状を含む、第 3 の対物レンズ 232 の種々の構成の実施例は、図 6A - 6C に示される。ガラス錐台は、円錐形形状である、または、例えば、二重に面取りされたノミ形状を有することができる。図 6A は、中実半径方向錐台を伴う、第 3 の対物レンズ 232 の実施例を図示する。図 6B は、面取りを伴う中実半径方向錐台を伴う、第 3 の対物レンズ 232 の実施例を図示する。図 6C は、中実正方形錐台を伴う、第 3 の対物レンズ 232 の実施例を図示する。これらの実施例はそれぞれ、さらに下記に議論されるように、高開口数にわたって効率的な光結合を可能にする。

【0055】

したがって、ある実施例では、第 3 の対物レンズ 232 は、ゼロまたはゼロに近い（例えば、空気中で約 $20 \mu\text{m}$ ）作動距離を可能にするように成形される、中実ガラス錐台を含むことができる。ある実施例では、錐台は、約 $200 \mu\text{m}$ 視野と、類似寸法を有する、ガラス先端とを有する。 $20 \mu\text{m}$ 作動距離は、最大約 8° の発散角度 θ_{ex} を伴う光シート 216 が、空気中で第 3 の対物レンズ 232 の錐台の正面を交差し、したがって、直接、高開口数における第 2 の対物レンズ 230 の中に結合されることを可能にする。

【0056】

上記に議論されるように、傾斜角度 θ のための最適値または範囲は、部分的に、光シート 216 のパラメータに依存し得る。しかしながら、同一顕微鏡検査システム 200 を使用して、種々の異なるサンプル 206 を結像することが望ましくあり得、異なる光シートパラメータは、異なるタイプのサンプルを結像するために好ましくあり得る。例えば、大サンプルは、大視野および弱発散ガウス光シート 216 を使用して、より良好に結像され得る。換言すると、この場合、最小限の傾斜角度 θ_{min} を伴うシステム 200 を構成し、最小限の発散角度 θ_{ex_min} を伴う光シート 216 を使用することが好ましくあり得る。他方で、小サンプル 206 は、小視野および狭ビームウェスト（大傾斜角度 θ_{max} および大発散角度 θ_{ex_max} を意味する）を伴うガウス光シート 216 を使用して、より良好に結像され得る。また、非ガウス照明ビーム（例えば、ベッセルビームまたはさらに格子ビーム）を使用することが望ましくあり得る。故に、ある実施例では、結像モジ

10

20

30

40

50

ルール 204 の一部は、傾斜角度 が異なるサンプル 206 のために動的に調節および最適化され得るように、少なくとも第 3 の対物レンズ 232、第 3 のレンズ 234、ならびに検出器 226 が、剛性物体として、第 2 の中間像面 IP_2 と第 3 の中間像面 IP_3 の交点を中心として回転することを可能にする、機械的アセンブリとともに構成されることができる (図 4 におけるステップ 418)。

【0057】

図 7 は、上記に議論されるプロセスおよび考慮点に従って斜面顕微鏡検査システム 200 を構成するためのアプローチを要約する、フロー図である。ステップ 702 および 704 は、顕微鏡検査システム 200 内の第 1 の顕微鏡を選択 / 構成するステップを伴う。ステップ 702 は、ベース顕微鏡モジュール 202 が選択される、上記に議論されるステップ 406 に対応する。顕微鏡モジュール 202 は、埋設された第 1 のレンズ 212 を含み、したがって、パラメータ f_{TL1} および d_1 は、本選択によって固定され得る。ステップ 704 では、顕微鏡モジュール 202 のための第 1 の対物レンズ 210 は、顕微鏡検査システム 200 を使用して結像されることが予期されるサンプルのタイプに合致するように選択される。上記に議論されるように、サンプル 206 の屈折率は、変動し得るが、既知の用途 (例えば、生物学的結像) を前提として、第 1 の対物レンズ 210 は、予期されるサンプルタイプの平均または近似屈折率をほぼ上回るまたはそれに等しい、開口数とともに選択されることができ、したがって、上記に議論されるように、

【化 23】

$$NA_1 \geq n_0$$

を設定する。第 1 の対物レンズ 210 の選択は、パラメータ f_{obj1} を設定し、したがって、ステップ 702 と 704 の組み合わせは、第 1 の顕微鏡の拡大率 M_1 を固定する。

【0058】

ステップ 706 および 708 は、顕微鏡検査システム 200 内の第 2 の顕微鏡を選択 / 構成するステップを伴う。ステップ 706 は、第 2 の対物レンズ 230 を選択するステップを含む。上記に議論されるように、第 3 の対物レンズ 232 に関する要件は、 n_2 を最小限にすることによって緩和されることができる。パラメータ n_2 は、空気に関する 1.0 と油状材料に関する 1.4 超またはさらに高屈折率ガラス材料に関する最大 2.0 またはより高い値との間のいずれかで変動し得る。故に、第 2 の対物レンズのための空気対物レンズを選択するステップは、 n_2 を最小限にする一方、また、方程式 (15) または (16) に規定される条件を満たす。空気対物レンズは、1.0 未満の開口数を有する。実践では、最良の空気対物レンズは、

【化 24】

$$NA_2 \approx 0.95$$

(

【化 25】

$$\theta_2 \approx 72^\circ$$

に対応する) を有し得る。前述の制約内で第 2 の対物レンズ 230 を選択することは、パラメータ f_{obj2} を設定する。ステップ 708 は、上記の方程式 (11) に記載された遠隔再焦点化条件を達成するように第 2 の顕微鏡を構成するステップを含む。上記に議論されるように、 M_1 は、ステップ 702 および 704 において設定される。方程式 (10) から、 M_2 を設定するために使用され得る、唯一の自由パラメータは、 f_{obj2} がステップ 706 において検討される条件によって設定されるため、 f_{TL2} である。したがって、ステップ 708 では、 f_{TL2} は、方程式 (11) の遠隔再焦点化条件を満たすように選択されることができる。結果として、第 1 および第 2 の顕微鏡内の唯一の残りの自由パラメータは、ここでは、 d_2 となる。上記に議論されるように、ある実施例では、 d_2 は、方程式 (17) に従って、最良結像性能を達成するように選択されてもよい。

【 0 0 5 9 】

ステップ 7 1 0 および 7 1 2 は、顕微鏡検査システム 2 0 0 内の第 3 の顕微鏡を選択 / 構成するステップを伴う。ステップ 7 1 0 は、第 3 の対物レンズ 2 3 2 を選択し、第 2 の対物レンズ 2 3 0 からの全て（または可能な限り多く）の光を収集し、上記に議論されるように、随意に、動的に調節可能であり得る、傾斜 を可能にするステップを含む。これらの条件の両方を達成するために、これが第 3 の対物レンズ 2 3 2 が傾斜 を伴っても第 2 の対物レンズ 2 3 0 からの全てまたはほぼ全ての光を収集することが可能である（すなわち、第 3 の対物レンズ 2 3 2 が、第 2 の対物レンズ 2 3 0 からの全てまたはほぼ全ての円錐角度 + を捕捉することができる）ことを確実にするであろうため、 $NA_3 \quad n_2$ を設定する。ある実施例によると、傾斜を用いて光収集を達成することは、第 2 の対物レンズ 2 3 0 からの光円錐を捕捉する一方、また、 の回転 / 傾斜に適応するように位置付けられることを可能にするように機械的に構成される、対物レンズを使用することによって行われる。例えば、第 3 の対物レンズ 2 3 2 は、上記に議論されるように、面取りまたは他の成形された縁を伴う、中実ガラス錐台を含んでもよい。本構成は、第 3 の対物レンズ 2 3 2 が、第 2 の対物レンズの視野の中に延在することを可能にし（先鋭ガラス先端を使用して）、したがって、第 2 の対物レンズ 2 3 0 からの全てまたはほぼ全ての光を収集する一方、また、最大 45° の（または正確な設計に応じて、それを上回る）回転（ ）を可能にする。ステップ 7 1 0 は、少なくともある程度まで、パラメータ f_{obj3} を設定する。したがって、ステップ 7 1 2 は、 f_{TL3} を設定し、検出器 2 2 6 のための正しい値において全体的システム拡大率 M_T を規定する（例えば、マルチピクセル検出器を使用するとき、ナイキストサンプリングを達成することによって）ように第 3 の顕微鏡を構成するステップを含んでもよい。

10

20

【 0 0 6 0 】

ある実施形態によると、第 1 の中間像面 IP_1 は、図 2 B に示されるように、光シート 2 1 6 のための挿入点として使用されることができる。加えて、ある実施形態では、光シート 2 1 6 の $x - y$ 走査もまた、同期された立体結像を提供するために導入されることができる。第 2 の対物レンズ 2 3 0 はまた、画像を第 2 の中間像面 IP_2 に再集束させ、これが、次いで、第 3 の対物レンズ 2 3 2 によって第 3 の中間像面 IP_3 において収集されることによって、 z 方向におけるボリュームを走査するために使用されてもよい。本アプローチを適用すると、 $x - y - z$ 走査を伴う、柔軟なボリュームオプションが、達成されることができる。例えば、 $x - y$ 走査が、実施されることができ、 z 方向における調節が、次いで、サンプル 2 0 6 中の異なる深度における別のボリュームを結像するために使用されることができる。したがって、顕微鏡検査システム 2 0 0 の全体的立体容量または柔軟性は、増加されることができる。ある実施例では、傾斜角度 に起因して、サンプル 2 0 6 の画像の光学軸は、一次 x 、 y 、または z 軸のいずれにも該当し得ない。したがって、純 $x - y$ 走査または純 z 走査は、ボリュームがこれらの個々の軸を使用して収集されるにつれて、サンプル 2 0 6 に対する光シートビームウェスト θ_0 の偏移をもたらし得る。しかしながら、ある実施例では、 $x - y$ 走査は、ボリュームが、光シートビームウェストが、走査の間、視野上に心合されたままですべて結像され、ボリューム全体を通して最適区分化および分解能を与える得るように、正しい振幅の z 走査と組み合わせられてもよい。

30

40

【 0 0 6 1 】

上記に議論されるように、ある実施例では、第 3 の対物レンズ 2 3 2 は、光シート 2 1 6 が、直接、高開口数における第 2 の対物レンズ 2 3 0 の中に結合されることを可能にする、ガラス錐台および先端とともに構成されることができる。これは、無ダイクロイック動作を可能にする（すなわち、図 2 B におけるビーム結合要素 2 1 8 は、排除されることができる）。加えて、第 2 の対物レンズ 2 3 0 が、上記に議論されるように、遠隔再集束化 z 走査を介して立体画像を提供するために使用される、実施例では、本アプローチはまた、走査のための固有の同期を提供する。

【 実施例 1 】

【 0 0 6 2 】

50

以下は、標準的顕微鏡に結合され、顕微鏡を、サンプルにおいて1つのみの対物レンズを使用する、高開口数光シート顕微鏡に変換し得る、上記に議論される側面および実施形態に従って実装される、モジュールの実施例を提供する。

【0063】

図8は、本明細書に開示される側面および実施形態による、単一对物レンズ光シート顕微鏡の実施例の概念の例証である。一次対物レンズ/チューブレンズ対(赤色実線/円形は、対物レンズの背面焦点面(BFP)を示す)は、3D生物学的サンプルを中間空間に結像する。走査システムは、本3D画像を別の中間空間に中継し、そこで、第2のチューブレンズ/対物レンズ対(青色破線BFP)によって収集される。第2の対物レンズは、約1の拡大率において、サンプルの無収差3Dコピーを作成する。本仮想3Dサンプルは、次いで、一次像面に対して傾斜する、第3の傾斜された顕微鏡(緑色点線BFP)を介して再結像される。光シートは、本傾斜された像面内の一次対物レンズの中に結合され(赤色実線ビーム)、単一对物レンズ光シート顕微鏡をもたらす。単一走査ミラーを急速に移動させることは、3Dボリュームを入手する。3つの対物レンズBFPは、赤色実線、青色破線、および緑色点線円形によって示されるように、相互上に結像される。赤色実線円板は、BFPにおける光シート占有面積を示し、黄色実線領域は、システムの収集開口数を示す。本設計は、感知できるほどの量の黄色面積を犠牲にせず、ほぼ測定不能損失を分解能に伴う。

10

【0064】

図9Aおよび8Bは、図2Aのシステム内の対物レンズのための光線透過角度を示すことによって、本特徴をさらに図示する、略図である。具体的には、図9Aおよび9Bは、一次(第1の)対物レンズ210(赤色ドット)、第3の対物レンズ232(緑色ドット)、および第1、第2、ならびに第3の対物レンズ(黄色ドット)の組み合わせの角度通過帯域を示す、理論的モデルを図示する。第2の対物レンズ230の角度通過帯域は、図9Aおよび9Bでは不可視である。図9Aおよび9Bは、図8の上部中心部分に示される赤色、青色、緑色、ならびに黄色円形領域の3D均等物である。図示される球体の表面上の各黄色ドットは、サンプル中の点源から、3つの対物レンズを通して伝搬し、検出器に到達し得る、光線角度を表す。各赤色ドットは、第1の対物レンズ(本実施例では、1.35NAシリコン)によって収集されるが、第2の対物レンズ(本実施例では、0.95NA空気)によってクリッピングされる、光線を表す。各緑色ドットは、第3の対物レンズ(本実施例では、1.0NAガラス)が、第2の対物レンズが生成した場合に収集し得る、光線を示す。黄色領域は、赤色領域をほぼ完全に充填し、システムが第1の対物レンズによって収集されるほぼ全ての光線を透過させることを実証する。本実施例では、第1の対物レンズによって収集される光線の>95%が、第2の対物レンズに通過することができ、第2の対物レンズによって収集される光線の>99%は、第3の対物レンズに通過し、約1.33の開口数を提供することができる。

20

30

【0065】

全体的開口数に関する本数は、システム内の各対物レンズの設計によって影響されることに留意されたい。例えば、一次対物レンズが、1.35の代わりに、NA=1.33を伴って選択された場合、第1の対物レンズによって収集される光線の>99%は、第2および第3の対物レンズに通過し得る。実践では、一次対物レンズの開口数の縁すれすれにおける光線は、収差を受け得、改良された分解能に寄与し得ない。したがって、規定された開口数(収集される光線)と有用な開口数(改良された分解能に寄与する光線)との間で区別することが有益であり得る。本明細書に開示されるシステムの実施例は、一次対物レンズの有用な開口数の>99%を捕捉し得る。さらに、第2の対物レンズを0.96NA空気対物レンズと置換することによって、一次対物レンズの規定された1.35NA光線の>99%が、収集され得る。

40

【0066】

図10は、妥協されない時空間性能を伴う図8のシステムのための単純な低コスト設計の実施例を図示する。図10は、本システムの実施例の構成要素の分解図を示す。ボックス

50

Aは、単純対物レンズ/チューブレンズ対であって、標準的顕微鏡スタンドであってもよい。一次対物レンズは、生きている生物学的サンプルの深部まで高分解能において結像するために最適である、高開口数および中間屈折率を有するように選定される。ボックスBは、走査中継器であって、ポリウム画像を迅速に取り込み得る、単一ガルバノミラーを伴う。ボックスCは、ボックスBとともに、ボックスAの要件に完璧に合致する、別のチューブレンズ/対物レンズ対である。ボックスDは、そうでなければシステム内に存在し得る、光機械的難点を解決する、特別に構成された対物レンズ/チューブレンズ対である。

【0067】

図11は、ガラス先端を有する、ボックスDの特別に構成された対物レンズ/チューブレンズ対の実施例(また、上記に議論される第3の対物レンズの実施例でもある)の例証である。図12A-Cはさらに、0~45度の傾斜角度の範囲にわたって分解能における無視可能な損失および高透過率を伴って、約100μmに近い高分解能画像を平坦表面に抽出することを可能にする、光学性能および幾何学形状を有するように構成される、特別に構成されたガラス先端付き対物レンズの実施例の側面を図示する。図12Aは、0~45度の傾斜角度の範囲を伴う平坦表面からわずかに約100μmの傾斜された空気空間画像を収集するように特別に構成された対物レンズの本実施例の光機械的に結合される設計考慮点を示す、図面である。図12Bは、特別に構成された対物レンズの実施例の対応するCADレンダリングであって、図12Cは、レンズの実施例の写真である。下記の表1は、図12A-Cに対応するレンズの実施例に関する仕様を提供する。

表1

【表1】

Specification	Description
NA = 1.0	開口数
∞/0	無限遠補正/カバーリップ厚
WD = 0	作動距離
EFL = 5 mm	有効焦点距離(例えば、200mmチューブレンズを伴って40倍)
λ = 450-700 nm	色補正
FOV (DL) = ø150 μm	回折限定視野直径
FOV (bevel) = ø250 μm	機械的に限定された視野直径(1方向のみ)

【0068】

図10のシステムの放出経路の実施例が、構築、整合、および試験され、試験データは、本システムが、同一の一次対物レンズを伴う従来の顕微鏡と比較して、分解能における測定可能損失を伴わずに、30度傾斜された平面を結像することができることを示す。これらの結果を取得するために使用される図10のシステムの実施例は、下記の表2に記載される光学系仕様に従って構成された。光学要素は、物理的配列の順序で(サンプルからカメラまでの)表2に列挙される。本システムは、単純落射構成において、488nmレーザー励起を用いてArgonLight SIMスライドを結像するために使用された。レーザーからのコヒーレント干渉/スペckルは、許容された。付加的Chroma ET525/50放出フィルタが、クアッドバンドフィルタ(表2におけるアイテム12)の直前に追加され、そうでなければ非常に広い、放出帯域を狭めた。画像スタックが、第2の対物レンズにおける閉ループ圧電アクチュエータを使用することによって入手された。xy段、一次対物レンズ、ガルバノ、および第3の対物レンズは、入手の間、定常のままであって、カメラ露光時間およびレーザー電力は、全体を通して一定に保たれた。

表2

【表 2 - 1】

アイテム#	供給業者	部品	説明	数量
1	Biologist	サンプル	好ましくは、1.35~1.4(生きている細胞に関して典型的)の範囲内の屈折率を伴う、生物学的サンプル	1
2	Nikon	MRD73950	CFI60プランアポクロマトラムダ S100倍シリコーン浸漬式の対物レンズ、N. A. 1.35、W. D. 0.3 mm、F. O. V. 22mm、補正カラー0.15~0.19mm	1
3	Nikon	MXA22018	CFI第2のレンズユニット、チューブレンズ要素、EFL=200mm	3
4	Thorlabs	CLS-SL	大視野を伴う走査レンズ、400~750nm、EFL=70mm	1
5	Thorlabs	GVS201	1Dガルバノシステム、400~750nmのためのブロードバンドミラー(-E02)	1
6	Thorlabs	LSM03-VIS	走査レンズ、400~700nm、EFL=39mm	1
7	Nikon	MXA22018	(上記の3のセットからのもの)	0
8	Chroma	ZT405/488/561/640rpcv2	クアッドバンドダイクロイックUF 1(26×38×1)mm(励起結合)	1
9	Nikon	MRD00405	40倍対物レンズ、N. A. 0.95、W. D. 0.17~0.25mm、F. O. V. 25mm、補正カラー0.11~0.23mm	1
10	Mark Optics	該当せず	窓、NBK-7、OD:4mm+/-0.2mm、Thk:(0.170+/-0.05)mm、研磨された両面40/20、TWE1/4波、平行性<10μm、コーティングされた両面BBAR-VIS、T _{avg} >99%@400nm~700nm@0°AOI	1

10

20

30

【表 2 - 2】

11	ASI	AMS-AGY v1.0	特殊ガラス先端付き対物レンズ	1
12	Chroma	ZET405/488/561/640m	クアッドバンド放出フィルタ、25mm径搭載	1
13	Nikon	MXA22018	(上記の3のセットからのもの)	0
14	PCO	エッジ4.2	sCMOSカメラ、6.5×6.5μm ² サイズを伴う2,048×2,048ピクセル、100fps完全視野、TTLトリガ<50μs応答	1

40

【0069】

放出経路をベンチマークし、特別に構成された第3の対物レンズ(下記では、AMS-AGY v1.0レンズと称される)の実施例を評価するために、データが、以下の3つの構成において入手された。

1. Nikon 40倍0.95NA、傾斜=0°:放出経路内の第3の対物レンズは、標準的遠隔再焦点化配列(傾斜を伴わずに軸方向に整合される)におけるNikon 40倍

50

0.95 NA 空気対物レンズであって、信頼性のあるシステムベンチマークを提供した。
2. AMS - AGY v1.0、傾斜 = 0°：構成1のNikonの第3の対物レンズは、構成1に直接匹敵するように、傾斜を伴わずに特別に構成された第3の対物レンズの実施例と置換された。

3. AMS - AGY v1.0、傾斜 = 30°：本システムの実施例が、構成1および2との比較のために、30°の傾斜を伴う第3の対物レンズとして、AMS - AGY v1.0レンズを使用して構成された。

【0070】

以下のArgoLight SIMスライド上の4つの異なるパターンが、結像のために使用された。

標的：10 μm間隔を伴う、同心リングの240 μm径セット。各リングは、750 nm分離された2つの線対から成る（最大視野において見るために良好）。

グリッド：10 μm間隔を伴う、110 × 110 μm²正方形グリッド。各線対は、750 nm分離される（視野の中心のより高い品質部分を見るため、かつ視野平坦性および歪曲をチェックするために良好）。

SIM線：範囲完全重複から30 nmずつの390 nmの分離に及ぶ、14本の線対（分解能を評価するために良好）。

3Dリング：X、Y、およびZにおいて5 μm分離された9 × 9 × 9の3D立方のアレイのサブミクロン径リング（3D視野を評価するために良好）。

【0071】

データは、上記のパターンおよび特徴を結像して、上記に識別された3つのシステム構成毎に収集された。

【0072】

上記で識別された3つのシステム構成毎の上記の4つのパターンを結像することによって生成される試験データは、Nikonベースの遠隔再焦点化が従来の顕微鏡と同一分解能を提供することを示した。全てNikon対物レンズを使用すると、放出経路の遠隔再焦点化部分は、少なくとも270 nm分解能を視野の中心において送達する。これは、標準的商業用ベースの一次対物レンズによって提供されるものと同一分解能である。第3の対物レンズとしてAMS - AGY v1.0レンズを用いて構成される、遠隔再焦点化もまた、従来の顕微鏡と同一分解能を提供する。AMS - AGY v1.0レンズを第3のNikon対物レンズに代用することは、傾斜されていない遠隔再焦点化において270 nm分解能を保存する。標的パターンの画像は、構成1および2の両方が、カメラセンサによって網羅される240 × 240 μm²視野を結像することが可能であって、線対が、約200 μmまで可視であって、システムが設計された100 μm径視野を優に超えることを実証した。グリッドパターン結像は、高品質110 × 110 μm²視野を示し、線対は、全体を通して可視であって、最小限の歪曲であった。SIM線結像は、視野の中心における270 nm分解能を実証した。3Dリングパターンの画像スタックは、3D視野にわたる構成1および2の結像性能において定質的に区別可能な差異がなかったことを示した。

【0073】

さらに、AMS - AGY v1.0レンズを用いて構成される、遠隔再焦点化は、依然として、第3の顕微鏡の30度傾斜を伴う従来の顕微鏡と同一分解能を与える。AMS - AGY v1.0レンズを使用して、第3の顕微鏡は、30度の角度まで傾斜され、入手された画像データは、システムが平行および垂直軸の両方上で270 nm分解能を留保したことを実証した。レイリー基準によって、270 nm分解能は、1.2の有効開口数に対応する。 $y \cos(\theta)$ （式中、 θ は傾斜角度である）の再スケーリングが、傾斜によって引き起こされる画像y軸に沿った「伸展」を補正するために適用された、標的およびグリッドパターンの入手された画像スタックは、視野にわたって、構成1および2を用いて達成されるものと本質的に同一品質の高品質画像を生成する能力を実証した。同様に、SIM線結像および3Dリングパターン結像性能は、y軸再スケーリングおよびzs

10

20

30

40

50

in () 切断補正を適用後、傾斜されない構成から定質的に区別不可能であった。

【 0 0 7 4 】

下記の表 3 - 5 は、表 1 に提供される仕様に基づく図 1 0 のシステムの一部のためのいくつかの代替光学構成のための仕様を提供する。例えば、下記の表 3 は、一次対物レンズのための代替の実施例を提供する。

表 3

【 表 3 】

アイテム#	供給業者	部品	説明	数量
2	Olympus	UPLSAPO 60xS2	スーパーアポクロマート、60倍シリコン油浸漬式の対物レンズ、N. A. 1. 3、W. D. O. 3mm、F. O. V. 22mm、DIC、補正カラー0. 15~0. 19mm	1
3	Thorlabs	TL300-A	レーザ走査チューブレンズ、f=300mm、ARC:400~700nm	1

10

【 0 0 7 5 】

ある実施例および用途では、ガルバノ走査は、必要とされない場合がある。下記の表 4 は、例えば、圧電を第 2 の対物レンズ上で使用して、ボリュームを取り込む、段階走査またはシステムを使用する、ハイコンテンツスクリーニングシステム（または両方の組み合わせ）のために使用され得る、実施例を提供する。下記の表 5 は、表 3 に説明される代替一次対物レンズを使用し、ガルバノ走査が除去される、別の実施例を提供する。

20

表 4

【 表 4 】

アイテム#	供給業者	部品	説明	数量
3	Thorlabs	TTL165-A	チューブレンズ、f=165mm、ARC:350~700nm、外部SM2ねじ山(注記:これは、Zeiss OEMチューブレンズではない)	1
4-6	該当せず	該当せず	ガルバノ走査中継器は除去される	0
7	Thorlabs	TL300-A	レーザ走査チューブレンズ、f=300mm、ARC:400~700nm	1

30

表 5

【 表 5 】

アイテム#	供給業者	部品	説明	数量
2	Olympus	UPLSAPO 60xS2	スーパーアポクロマート、60倍シリコン油浸漬式の対物レンズ、N. A. 1. 3、W. D. O. 3mm、F. O. V. 22mm、DIC、補正カラー0. 15~0. 19mm	1
3	Thorlabs	TTL165-A	チューブレンズ、f=165mm、ARC:350~700nm、外部SM2ねじ山 (Zeiss OEMチューブレンズではない)	1
4-6	該当せず	該当せず	ガルバノ走査中継器は除去される	0
7	Olympus	SWTLU-C	180mm焦点距離、チューブレンズユニット	1
9	Olympus	UPLSAPO 40x2	スーパーアポクロマート、40倍対物レンズ、N. A. 0. 95、W. D. O. 18mm、F. O. V. 26. 5mm、補正カラー0. 11~0. 23mm	1

40

50

【実施例 2】

【0076】

実施例 2：設計オプション

多くの用途は、拡大率、開口数、視野（FOV）、および浸漬媒体（例えば、水）の異なる選択肢から利点を享受するであろう。下記の表 6 は、一次対物レンズ選択肢の付加的実施例を提供する。種々の走査領域および視野もまた、実装されてもよい。

【0077】

ガルバノ走査を伴わない実施形態は、より少ない光学系、効率がより高く、保守の観点からより容易であることに起因して、コストがより低くあり得る。無ガルバノは、段階走査を使用する、ハイコンテンツスクリーニングシステムのために魅力的であり得る。サンプル走査は、広範囲にわたる探索、段階走査、または高スループットスクリーニング（すなわち、マルチウェルプレート）のための良好なオプションであり得る。z 範囲は、対物レンズ 1 の作動距離によって限定され得る。高速運動は、浸漬媒体を介して、サンプルに結合し得る。対物レンズ 1 走査は、一次対物レンズの作動距離を使用して、従来の集束のために良好であり得る。対物レンズ 2 走査は、遠隔空間を使用したサンプルから隔離された高速走査のために良好であり得る。z 範囲は、物体 2 および 3 の力学のいずれかによって、または遠隔再焦点化範囲によって光学的に限定され得る。対物レンズ 3 走査は、対物レンズ 2 走査に類似し得るが、傾斜された配列にある。

10

【0078】

1 つの「走査」ガルバノを伴う実施形態では、FOV は、1 つのみの軸上で対物レンズ 3 によって限定され得る。一次対物レンズは、走査軸上の視野を限定し得る。ガルバノ走査ユニットを追加することは、超高速走査を提供し、FOV を増加させる。典型的ガルバノステップおよび整定時間は、現代の sCMOS チップの回転時間より短く、したがって、立体結像率は、カメラのデータ率（または利用可能な光子）のみによって限定される。

20

【0079】

2 つの「XY」ガルバノを伴う実施形態では、FOV は、対物レンズ 3 によって限定され得ない。一次対物レンズが、視野を判定し得る。第 2 の（直交）ガルバノスキャナは、傾斜デバイスとして使用され、一次対物レンズの完全視野にアクセスすることができる。これは、単一フレーム内の完全視野を支援しない、光学列またはカメラチップを使用するとき、一次対物レンズの FOV にアクセスするための魅力的かつ迅速な方法である。

30

表 6

40

50

【表 6】

供給業者	拡大率(NA)	浸漬(用途)	W.D. (mm)	部品
Nikon	60x (1.4)	油(カバースリップ)	0.13	MRD01605
Nikon	100x (1.35)	シリコン(カバースリップ)	0.28-0.31	MRD73950
Nikon	40x (1.25)	シリコン(カバースリップ)	0.30	MRD73400
Nikon	25x (1.05)	シリコン(カバースリップ)	0.55	MRD73250
Nikon	60x (1.27)	水(カバースリップ)	0.16-0.18	MRD07650
Nikon	40x (1.15)	水(カバースリップ)	0.59-0.61	MRD77410
Nikon	25x (1.1)	水(液浸/カバースリップ)	2.00	MRD77220
Olympus	60x (1.42)	油(カバースリップ)	0.15	UPLXAPO60XO
Olympus	100x (1.35)	シリコン(カバースリップ)	0.20	UPLSAPO100XS
Olympus	60x (1.3)	シリコン(カバースリップ)	0.30	UPLSAPO60XS2
Olympus	40x (1.25)	シリコン(カバースリップ)	0.30	UPLSAPO40XS
Olympus	30x (1.05)	シリコン(カバースリップ)	0.80	UPLSAPO30XS
Olympus	60x (1.2)	水(カバースリップ)	0.28	UPLSAPO60XW
Olympus	40x (1.15)	水(カバースリップ)	0.25	UAPON40XW340
Olympus	25x (1.05)	水(液浸/カバースリップ)	2.00	XLPLN25XWMP2
Olympus	20x (1.0)	水(液浸)	2.00	XLUMPLFLN20XW

10

20

【実施例 3】

【0080】

実施例 3：良好な性能のための整合目標

以下の指針は、種々の光学構成に適用可能であり得る。

【0081】

X Y および先端 / 傾斜整合：一次対物レンズ (O1) は、システムの光学軸を設定する。各後続レンズは、次いで、その光学軸が一次軸と共線形であるように整合されなければならない。1 つまたはそれを上回るガルバノを含む、システムでは、各ガルバノミラーは、光学軸上に心合されるべきであって、各ガルバノの回転軸は、光学軸と一致かつ垂直であるべきである。これは、各要素の x y (平行移動) および先端 / 傾斜 (回転) を定義し、実践では、これは、適切なレーザビームを使用して達成されることができる。

30

【0082】

Z 整合：原理上レンズ対は、それらがコリメーションを保存するように、軸方向に分離されるべきである。すなわち、任意の対のレンズに関して、コリメートされたビーム入力は、コリメートされたビーム出力を与えるべきである。これは、いったん一次対物レンズ位置が固定されると、システムを整合させ、各レンズの z 位置を定義するための最も簡単な方法である。ガルバノミラーは、ミラーの回転が画像空間内に純平行移動をもたらす (小角度に関して当てはまる) ように、一次対物レンズ (BPF1) の背面焦点面に共役されるべきである。

40

【0083】

商業用ベース：商業用ベースを使用するとき、一次対物レンズ (O1) および第 1 のチューブレンズ (TL1) は、コリメーションを保存しない (通常、チューブレンズは、近すぎる) ことが典型的である。これは、第 1 の走査レンズ (SL1) 後の全体的光学列を分路させ、コリメーションを復元することによって、補正されることができる。ガルバノを伴わないシステムに関して、補正は、第 2 のチューブレンズ (TL2) 後に行われることができる。以下の方程式は、ケース毎に要求される変位を説明し、大きさの指標として使用されることができる (実践では、正しい変位は、適切なレーザビームと整させることに

50

よって見出されなければならない)。

・無ガルバノ：

【化 2 6】

$$d_2 = f_{TL2} + (f_{TL1} - d_1)M_{BFP1}^2$$

式中、

【化 2 7】

$$M_{BFP1} = f_{TL2}/f_{TL1}$$

・1つまたはそれを上回るガルバノ：

【化 2 8】

$$d_{SL1} = f_{SL1} + (f_{TL1} - d_1)M_{BFP1}^2$$

式中、

【化 2 9】

$$M_{BFP1} = f_{SL1}/f_{TL1}$$

注記：上記に加え、最良性能のために商業用ベースを使用するとき、O1は、その公称焦点位置にあって（意図されるサンプルのために）、良好な背面焦点面マッピングを確実にしなければならない。

【0084】

背面焦点面マッピング：前述の目標が、達成される場合、一次対物レンズの背面焦点面（BFP1）は、システム全体を通して、すなわち、BFP1からG1、G1からBFP2、およびBFP2からBFP3（ならびに同一概念は、無ガルバノまたは2つのガルバノシステムにも適用される）に効果的に結像されるであろう。これは、像面IP0からIP4に中継することに類似するが、十分に良好に行われない場合、よりわずかな（但し、依然として、有意な）結果を伴う。像面整合における誤差は、通常、結果として生じる焦点ずれから明白である。BFP中継器における誤差は、より気付きにくく、以下の徴候をもたらし得る。

【0085】

ガルバノからBFP1における誤差：像面の純平行移動であるべきものに結合される、角運動をもたらし得る。これは、走査の関数として光シートの傾斜を変調させ、画像処理およびデータの解釈を困惑させ得る。

【0086】

BFP1からBFP2における誤差：整合の間に注意を怠った場合の容易な誤りであって、BFP2におけるBFP1の画像のクリッピングをもたらし得る。結果は、低減させられた有効開口数および損なわれた遠隔再焦点化性能となる。点拡がり関数測定が、IP1において良好であって、IP2における遠隔空間において予想外である場合、本整合をチェックされたい。

【0087】

BFP2からBFP3における誤差：同様に、整合の間に注意を怠った場合の容易な誤りであって、また、システムの有効開口数を低減させる結果をもたらす。点拡がり関数測定が、IP2における遠隔空間において良好であって、IP4において予想外である場合、本整合をチェックされたい。

【0088】

注記：O1が、z範囲（例えば、商業用ベース約10mm）を有する場合、最良性能に関して、整合段階の間、（意図されるサンプルに関する）その公称焦点位置に設定されるべきである。

【0089】

光シート結合および傾斜角度「 」：任意の所与の光シートは、その周辺光線が対物レン

10

20

30

40

50

ズの周辺光線と一致するように、一次対物レンズ（O1）の中に結合されるべきである（すなわち、光シートの縁が対物レンズの最大収集円錐角度に触れるべきである）。光シートの所与の選択肢に関して、第3の顕微鏡システムは、次いで、光シートが均一に合焦されるように、傾斜されるべきである。ともに、結果として生じる傾斜角度を判定するであろう、一次対物レンズの多くの選択肢および多くの光シートオプションが存在し、したがって、正確な整合標的は、システムをさらに規定せずに、設定されることができない。しかしながら、本基本整合プロトコルに従うことで、分解能および効率における不必要な損失は、回避されることができる。

【0090】

ガルバノ平坦性：上記の整合目標が、達成されているが、見なれないPSF結果が、呈されている場合、ガルバノ平坦性をチェックされたい（例えば、剪断干渉計を使用して）。開口にわたって / 10 PV または / 14 RMS より良好に規定されたい（ガルバノにおけるBFP1の画像）。

10

【実施例4】

【0091】

実施例4：高NA単一对物レンズ光シートのための構成指標

以下の非限定的ガイドラインは、1つまたはそれを上回る実施形態による、単一对物レンズ光シート顕微鏡の構成を促進し得る。

【0092】

1. 一次対物レンズ（O1）を選ぶ：下記の表を使用して、意図されるサンプルタイプに基づいて、一次対物レンズを選択する。O1が選択された状態で、商業用ベースの互換性のために対応する製造業者のチューブレンズ（TL1）を使用する。ここで、推奨される二次対物レンズ（O2）および対応するチューブレンズ（TL2）を選定することによって、遠隔再焦点化モジュールを選択する。注記：本選択肢は、ベース顕微鏡から独立する、例えば、Nikonベース（O1+TL1）は、Olympus遠隔再焦点化（O2+TL2）と合致されることができる。

20

カバースリップを伴う油浸漬：

【表7】

一次対物レンズ(O1+TL1)	二次対物レンズ(O2+TL2)
Nikon 60x1.4 Oil (MRD01605 + MXA22018)	Nikon 40x0.95 (MRD00405 + MXA22018)
または	または
Olympus 60x1.42 Oil (UPLXAPO60XO + SWTLU-C)	Olympus 40x0.95 (UPLXAPO40X + SWTLU-C)

30

カバースリップを伴うシリコーン浸漬：

40

50

【表 8】

一次対物レンズ(O1+TL1)	二次対物レンズ(O2+TL2)
Nikon 100x1.35 Sil (MRD73950 + MXA22018)	Nikon 40x0.95 (MRD00405 + EFL357)
または Olympus 100x1.35 Sil (UPLSAPO100XS + SWTLU-C)	または Olympus 40x0.95 (UPLXAPO40X + EFL321)
Olympus 60x1.3 Sil (UPLSAPO60XS2) + (SWTLU-C)	Nikon 40x0.95 (MRD00405 + EFL214) または Olympus 40x0.95 (UPLXAPO40X + EFL193)
Nikon 40x1.25 Sil (MRD73400 + MXA22018) または Olympus 40x1.25 Sil (UPLSAPO40XSS + SWTLU-C)	Nikon 40x0.95 (MRD00405 + EFL143) または Olympus 40x0.95 (UPLXAPO40X + EFL129)
Olympus 30x1.05 Sil (UPLSAPO30XS + SWTLU-C)	Nikon 20x0.75 (MRD00205 + EFL214) または Olympus 20x0.8 (UPLXAPO20X + EFL193)
Nikon 25x1.05 Sil (MRD73250 + MXA22018)	Nikon 20x0.75 (MRD00205 + EFL179) または Olympus 20x0.8 (UPLXAPO20X + EFL161)

10

20

30

カバースリップを伴う水浸漬：

40

50

【表 9】

一次対物レンズ(O1+TL1)	二次対物レンズ(O2+TL2)
Nikon 60x1.27 W (MRD07650 + MXA22018) または Olympus 60x1.2 W (UPLSAPO60XW + SWTLU-C)	Nikon 40x0.95 (MRD00405 + EFL226) または Olympus 40x0.95 (UPLXAPO40X + EFL203)
Nikon 40x1.15 W (MRD77410 + MXA22018) または Olympus 40x1.15 W (UAPON40XW340 + SWTLU-C)	Nikon 40x0.95 (MRD00405 + EFL150) または Olympus 40x0.95 (UPLXAPO40X + EFL135)

10

水浸：

【表 10】

一次対物レンズ(O1+TL1)	二次対物レンズ(O2+TL2)
Nikon 25x1.1 W (MRD77220 + MXA22018) または Olympus 25x1.05 W (XLPLN25XWMP2 + SWTLU-C)	Nikon 20x0.75 (MRD00205 + EFL188) または Olympus 20x0.8 (UPLXAPO20X + EFL169)
Olympus 20x1.0 W (XLUMPLFLN20XW + SWTLU-C)	Nikon 20x0.75 (MRD00205 + EFL150)
	または Olympus 20x0.8 (UPLXAPO20X + EFL135)

20

【0093】

2.0、1、または2 ガルバノスキャナを選ぶ：ガルバノスキャナは、一次対物レンズの完全視野にわたって超高速走査を提供するが、それらは、それらが余剰光学系等を追加するため、全てのシステムに最適ではない場合がある。以下の(1の拡大率)中継器は、良好な開始点である。

30

【表 11】

走査レンズ1(SL1)	ガルバノ1(G1)	走査レンズ2(SL2)
Thorlabs 70 mm (CLS-SL)	Thorlabs Ø5 mm (GVS201) または Thorlabs Ø10 mm (GVS211)	Thorlabs 70 mm (CLS-SL)

40

ガルバノスキャナ考慮点：

【0094】

拡大率：ガルバノスキャナは、1の拡大率中継器でなければならない。

$$f_{SL2} / f_{SL1} = 1$$

【0095】

走査レンズ性能：走査レンズが、適応させることを所望する、瞳サイズ、視野、および色範囲を取り扱うことが可能であることを確認されたい。例えば、上記のCLS-SLスキ

50

ャナは、所与の瞳サイズを伴って、(400 ~ 700) nmにわたる以下の(回折限界)視野径を送達することができる。

2.6 mm 視野、 2.5 mm 瞳

2.2 mm 視野、 3 mm 瞳

1.6 mm 視野、 4 mm 瞳

1.3 mm 視野、 5 mm 瞳

1.1 mm 視野、 6 mm 瞳

9 mm 視野、 7 mm 瞳

注記：瞳径は、一次対物レンズの背面焦点面の画像を超えなければならない。

走査瞳 BFP₁ (f_{SL1} / f_{TL1})、式中、BFP₁ = 2f_{TL1} (NA₁ / M₁) 10

(およびNA₁ならびにM₁は、O₁の開口数および拡大率である)

【0096】

ガルバノサイズ：一次対物レンズの背面焦点面の画像のクリッピングを回避するために、ガルバノ径が十分に大きいことを確認されたい。

【数22】

$d_{G1} \geq \sqrt{2}$ 走査瞳

注記：ガルバノミラーは、典型的には、薄く、したがって、それらは、軽量かつ回転が高速である。ミラー径が増加するにつれて、平坦性を維持することがより困難になり、これは、光学性能を著しく劣化させ得る。本潜在的問題からの独自の方法を取り入れることを所望する場合は、ミラーに関して / 10 PVまたは / 14 RMSより良好に規定されたい。 20

【0097】

3. カメラを選ぶ：高量子効率(QE)かつ低読取雑音のsCMOSチップが、推奨され得る。例えば、PCOエッジ4.2は、大部分の構成のための良好な選択肢である。カメラを選択するとき、以下を考慮されたい。

【0098】

ピクセル数：AMS - AGY v 1.0 対物レンズは、より低いNAにおいて、150 μmの回折限界視野および最大250 μmを送達することができる。ave約0.55 μmにおけるナイキストサンプリングに関して、これは、約900ピクセルの最高品質および最大約1,500ピクセルに匹敵し、結像は、依然として、非常に良好である。 30

【数23】

ピクセル数 ≈ 2 視野 NA₃ / (0.61λ)

(AMS - AGY 対物レンズに関して NA₃ = 1.0)

【0099】

ピクセルサイズ：AMS - AGY v 1.0 対物レンズは、5 mm 有効焦点距離を有する。最後のチューブレンズTL3は、ナイキストのための拡大率を調整するための自由パラメータとして使用されることができる。 40

【数24】

$f_{TL3} \approx 2f_{O3}$ ピクセルサイズ NA₃ / (0.61λ)

したがって、6.5 μmピクセルを伴うPCOエッジ4.2に関して、ave約0.55 μmにおいてf_{TL3}約200 mmとなる(方程式から194 mm)。

【実施例5】

【0100】

実施例 5：高分解能での比較的到大（水性）サンプル上における拡張顕微鏡検査

以下は、弱蛍光性であるサンプルに関する高分解能画像を表すように標準的顕微鏡に結合され得る、上記に議論される側面および実施形態に従って実装される、モジュールの実施例を提供する。本システムは、最小限の光学系を放出経路上に伴う、光シートを使用する。NikonベースおよびOlympus対物レンズが、使用される。

【0101】

本実施例における大サンプルに関して、ガルバノ中継器は、使用されないであろう。代わりに、サンプルは、より低率であるが、一次対物レンズの比較的到大作動距離（この場合、約600 μ m）を除き、サイズに関する限界を伴わずに走査されるであろう。ARコーティングされた窓が、最大透過率のために、第2の対物レンズにおいて使用されるであろう。サンプル走査が問題である場合、ガルバノスキャナが、後に追加されることができ

10

【0102】

下記の表7は、これらの基準に留意した上で、例示的設定のための光学列および結像部品を提供する。

表7

【表12-1】

アイテムID	供給業者	部品	説明	数量
S	Biologist	サンプル	拡張されたサンプル、屈折率： ~ 1.33	1
O1	Nikon	MRD77410	カバースリップを通した40倍(1.15)水、W. D. 0.59-0.61mm, 22mm視野	1
TL1	Nikon	MXA22018	チューブレンズ、EFL=200mm	1
TL2	Thorlabs	EFL135	チューブレンズアセンブリ、EFL=135mm	1
D	Chroma	ZT405/488/561/640rpcv2	クアッドバンドダイクロイック(励起結合)	1
O2	Olympus	UPLXAPO40X	40 \times 0.95CFIプランアポクロマトラムダ	1

20

30

【表12-2】

O2*	Various	該当せず	NBK-7窓、OD:(10+/-0.2)mm、Thk:(0.170+/-0.05)mm、TWE:1/4波、平行性:<10 μ m、研磨:40/20およびコーティング:T _{avg} >99%、(400-700)nm@0° AOI両面	1
O3	ASI	AMS-AGY v1.0	特殊ガラス先端付き対物レンズ	1
E	Chroma	ZET405/488/561/640m	クアッドバンド放出フィルタ、 ϕ 25mm搭載	1
TL3	Nikon	MXA22018	チューブレンズ、EFL=200mm	1
C	PCO	エッジ4.2	sCMOSカメラ、6.5 \times 6.5 μ m ² サイズを伴う2,048 \times 2,048ピクセル	1

40

【実施例6】

【0103】

大視野および長作動距離を伴うゼブラフィッシュ水浸システム。

以下は、視野および速度を最適化するように標準的顕微鏡に結合され得る、上記に議論される側面および実施形態に従って実装される、モジュールの実施例を提供する。したがって、2つのガルバノシステムが、光学性能を犠牲にして、sCMOSカメラ上のデータ率を最大限にするように選定されるであろう。

50

【 0 1 0 4 】

システムに関して、以下に留意されたい。

- ・ $BFP_1 = 2 * 180 * (1 / 20) = 18 \text{ mm}$
- ・ 走査瞳 = $18 * (70 / 180) = 7 \text{ mm}$
- ・ $dG_1 = 2 * \text{走査瞳} = 9.9 \text{ mm}$
- ・ 7 mm 走査瞳は、CLS-SL 走査中継器のために大きく、したがって、回折限界視野は、IP1において約 9 mm (またはサンプル中約 450 μm) であろうが、依然として、より低い開口数において最大 22 mm (一次対物レンズの視野数である) を結像するであろう。10 mm ガルバノは、瞳のために十分に大きい、これは、非常に大きなミラーであって、したがって、平坦性が、チェックされるべきである。ここでは、標準的 25 mm カバースリップが、コストを節約するために、O2 を補正するために使用される。全ての基準に留意した上で、光学列システム設定が、下記の表 8 に見出される。

10

表 8

【 表 1 3 - 1 】

アイテム ID	供給業者	部品	説明	数量
S	Biologist	サンプル	水中ゼブラフィッシュ、屈折率:約1.33	1
O1	Olympus	XLUMPLFLN20XW	20倍(1.0)水浸、W. D. =2mm、22mm視野	1
TL1	Olympus	SWTLU-C	チューブレンズ、EFL=180mm	1
SL1	Thorlabs	CLS-SL	走査レンズ、EFL=70mm	1
G1	Thorlabs	GVS211	1D走査ガルバノ、 $\phi 10\text{mm}$	1
SL2	Thorlabs	CLS-SL	走査レンズ、EFL=70mm	1
SL3	Thorlabs	CLS-SL	走査レンズ、EFL=70mm	1
G2	Thorlabs	GVS211	1Dタイルガルバノ、 $\phi 10\text{mm}$	1

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

SL4	Thorlabs	CLS-SL	走査レンズ、EFL=70mm	1
TL2	Thorlabs	EFL150	チューブレンズアセンブリ、EFL=150mm	1
D	Chroma	ZT405/488/561/640rpcv2	クアッドバンドダイクロイック(励起結合)	1
O2	Nikon	MRD00205	20倍0.75CFIプランアポクロマートラムダ	1
O2*	Various	該当せず	カバースリップ、OD:~25mm、Thk:(0.170+/-0.05)mm	1
O3	ASI	AMS-AGY v1.0	特殊ガラス先端付き対物レンズ	1
E	Chroma	ZET405/488/561/640m	クアッドバンド放出フィルタ、φ25mm搭載	1
TL3	Nikon	MXA22018	チューブレンズ、EFL=200mm	1
C	PCO	エッジ4.2	sCMOSカメラ、6.5×6.5μm ² サイズを伴う2,048×2,048ピクセル	1

10

20

【実施例 7】

【0105】

実施例 7：チューブレンズアセンブリ

単一对物レンズ光シートを設計する課題のうちの1つは、良好な遠隔再焦点を作製することである。空気ベースの遠隔再焦点化に関して、重要な要件は、遠隔画像の拡大率を一次対物レンズの屈折率に整合させることである。一次対物レンズが変化するにつれて、多くの場合、拡大率および屈折率もまた、変化し、これは、光学系の正しいセットを見つけにくくし得る。下記の表 9 は、種々のチューブレンズアセンブリの実施例を提供する。

表 9

30

40

50

【表 1 4】

TL2アセンブリ	光学構成要素 (部品番号)
EFL129	Thorlabs (TTL200MP) + 2x (AC508-500-A)
EFL135	Thorlabs (TTL200MP) + (AC508-750-A) + (AC508-500-A)
EFL143	Thorlabs (TTL200MP) + (AC508-750-A) + (AC508-500-A)
EFL150	Thorlabs (TTL200MP) + 2x (AC508-750-A)
EFL161	Thorlabs (TTL200MP) + 2x (AC508-1000-A)
EFL169	Thorlabs (TTL200MP) + (AC508-750-A)
EFL179	Thorlabs (TTL200MP) + (AC508-1000-A) or Olympus (SWTLU-C)
EFL186	Thorlabs (TTL200MP) + (AC508-1000-A)
EFL193	Thorlabs (TTL200MP) + (AC508-1000-A)
EFL203	Thorlabs (TTL200MP) + (LF-1141-A) or Nikon (MXA22013)
EFL214	Thorlabs 3x (AC508-750-A) + (AC508-1000-A)
EFL226	Thorlabs 3x (AC508-750-A) + (AC508-1000-A)
EFL321	Thorlabs (AC508-750-A) + (AC508-500-A)
EFL357	Thorlabs (AC508-750-A) + (AC508-500-A)

10

20

【0106】

少なくとも一実施形態のいくつかの側面が上記に説明されたが、種々の改変、修正、および改良が、当業者に容易に想起されるであろうことを理解されたい。そのような改変、修正、および改良は、本開示の一部であることが意図され、かつ本発明の範囲内であることが意図される。本明細書で議論される方法および装置の実施形態は、本願では、前述の説明に記載される、または付随の図面に図示される、構成要素の構造および配列の詳細に限定されないことを理解されたい。本方法および装置は、他の実施形態にも実装可能であって、種々の方法において実践または実施されることが可能である。具体的実装の実施例は、例証目的のためだけに本明細書に提供され、限定することを意図するものではない。

30

【0107】

また、本明細書で使用される語法および専門用語は、説明の目的のためのものであって、限定と見なされるべきではない。本明細書では、「including (～を含む)」、「comprising (～を備える)」、「having (～を有する)」、「containing (～を含有する)」、「involving (～を伴う)」、およびその変形例の使用は、その後列挙されたアイテムおよびその均等物ならびに付加的アイテムを包含するように意味される。「or (または)」の言及は、「or (または)」を使用して説明される任意の用語が、説明される用語の単一のもの、1つを上回るもの、全てのもののいずれかを示し得るように、包含的であるものとして解釈され得る。正面および背面、左および右、上部および底部、上側および下側、ならびに垂直および水平の任意の言及は、説明の便宜上のためのものであって、本システムおよび方法またはその構成要素を任意の1つの位置または空間配向に限定することを意図するものではない。用語「光」、「光信号」、および「光学信号」は、本明細書では、同義的に使用され得、概して、空の空間、例えば、真空であり得る、または大気、例えば、空気から成り得る、もしくはファ

40

50

イバまたは他の光学系構成要素等の他の媒体である、所与の媒体を通して伝搬する、電磁信号を指す。用語「光」、「光信号」、および「光学信号」は、周波数または波長、帯域、コヒーレンシ、スペクトル密度、品質要因等の光の任意の特定の特性を含意するように意味されず、赤外線、可視、および/または紫外線電磁放射線、または光学系の分野で従来处理される他の非イオン化電磁放射線を含んでもよい。

【0108】

故に、前述の説明および図面は、実施例にすぎない。

【図面】

【図1】

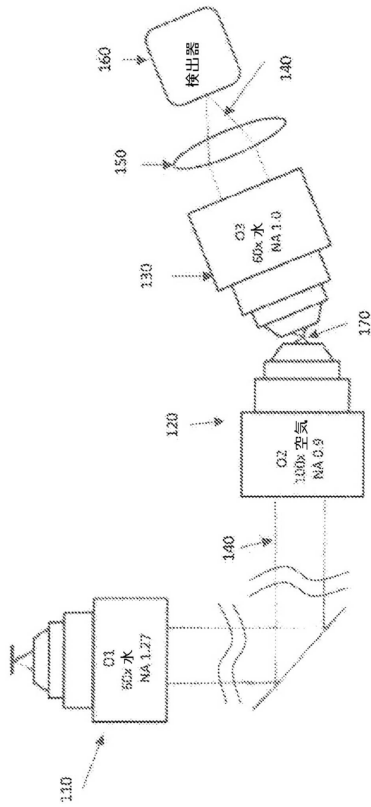


FIG. 1
(関連技術)

【図2A】

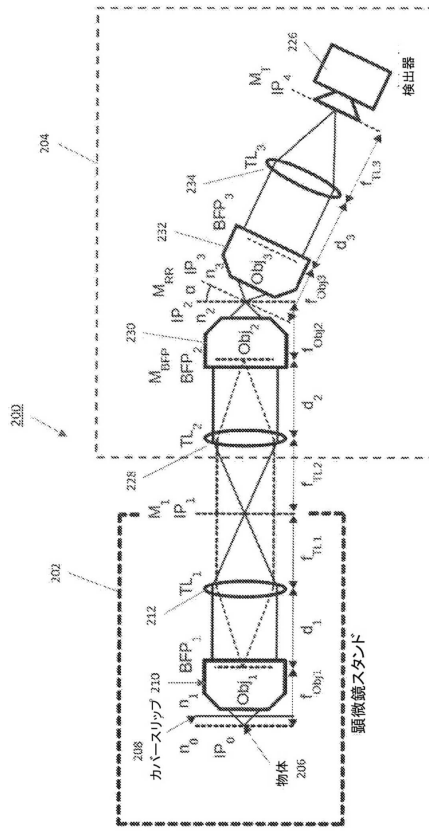


FIG. 2A

10

20

30

40

50

【 図 2 B 】

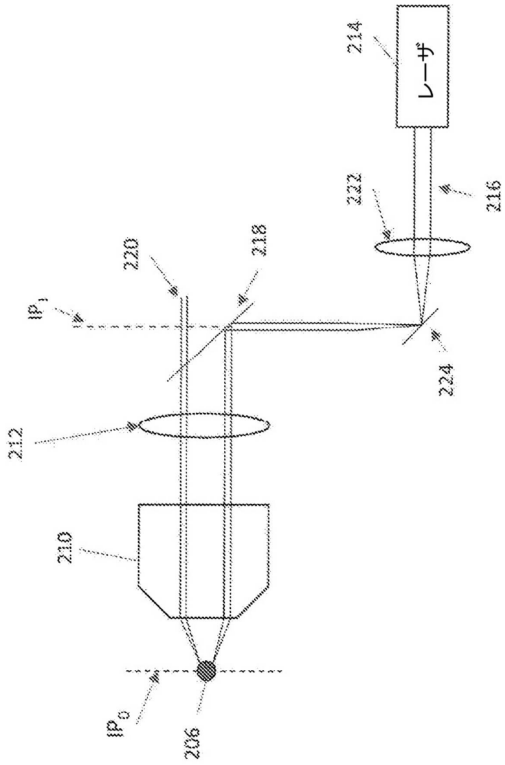


FIG. 2B

【 図 3 】

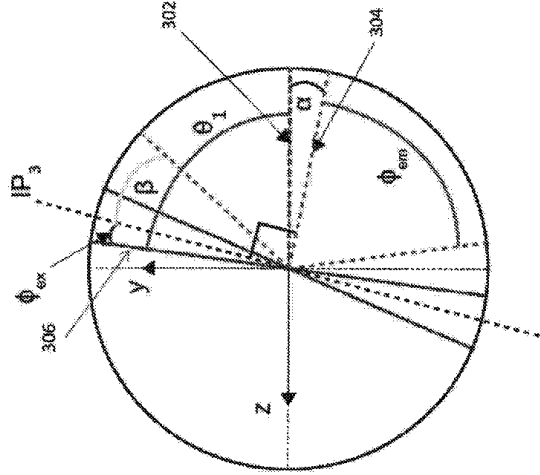


FIG. 3

10

20

【 図 4 】

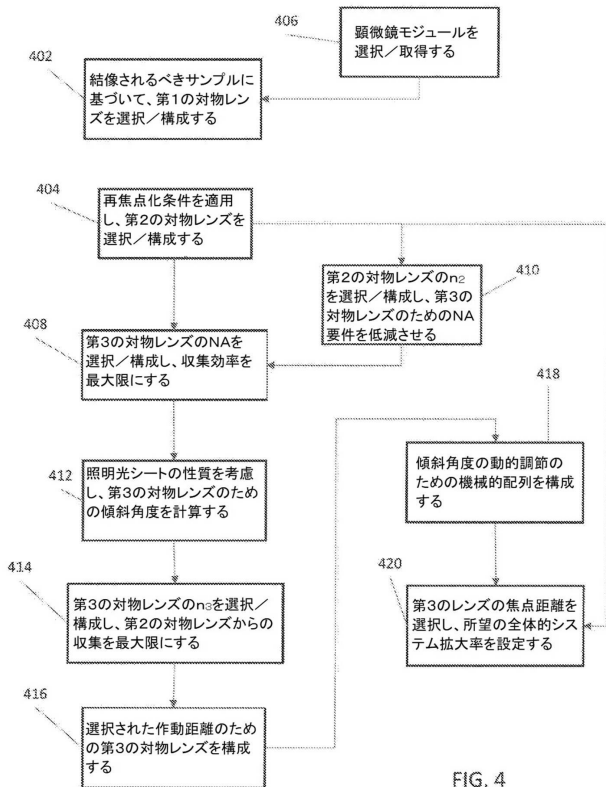


FIG. 4

【 図 5 】

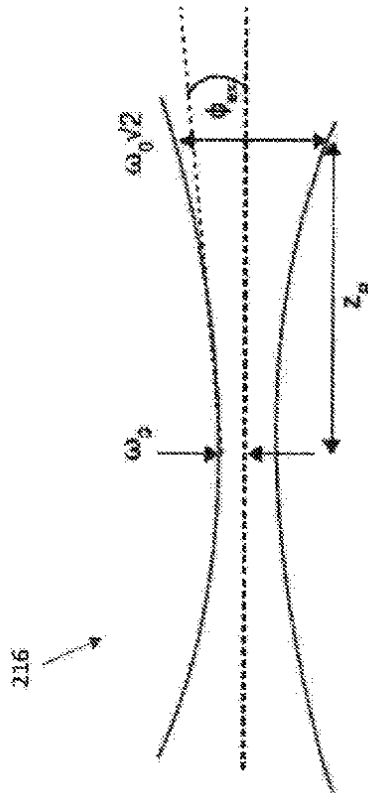


FIG. 5

30

40

50

【図 6 A】

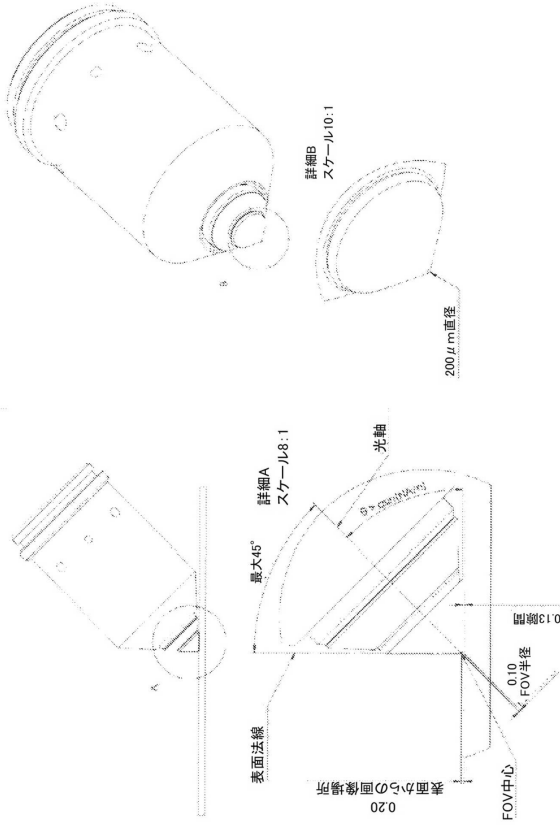


FIG. 6A

【図 6 B】

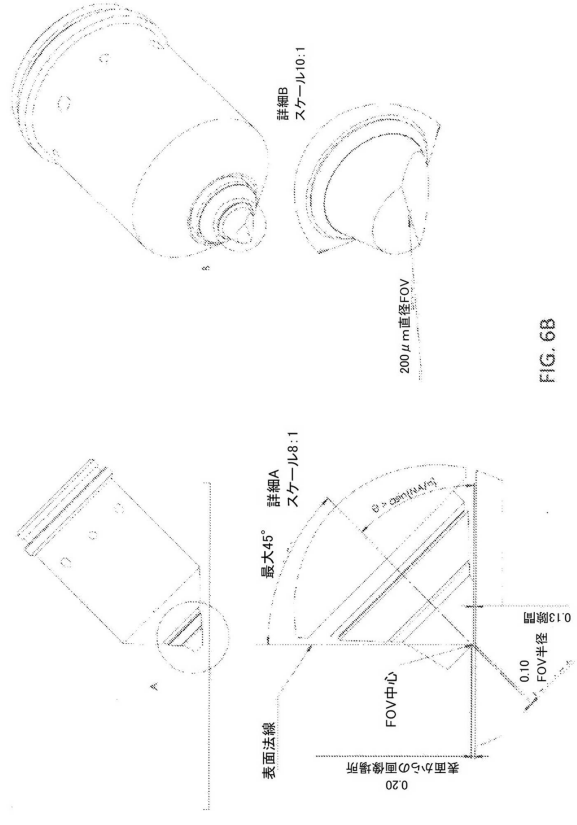


FIG. 6B

【図 6 C】

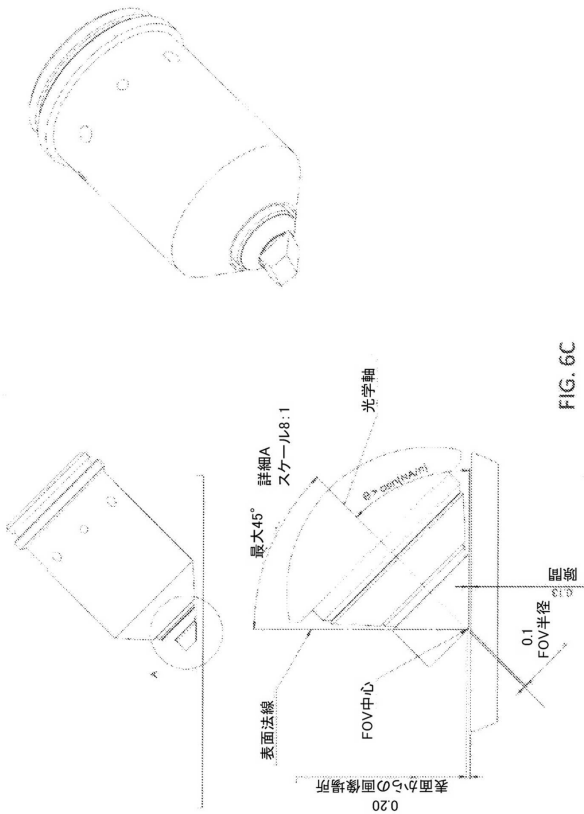


FIG. 6C

【図 7】

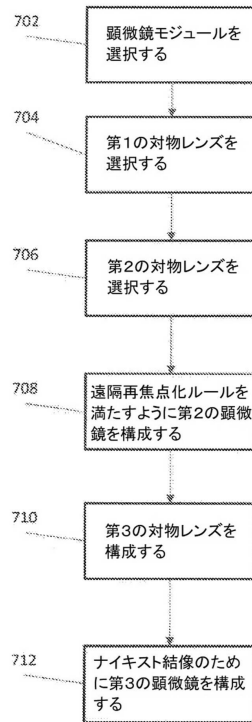


FIG. 7

10

20

30

40

50

【 図 8 】

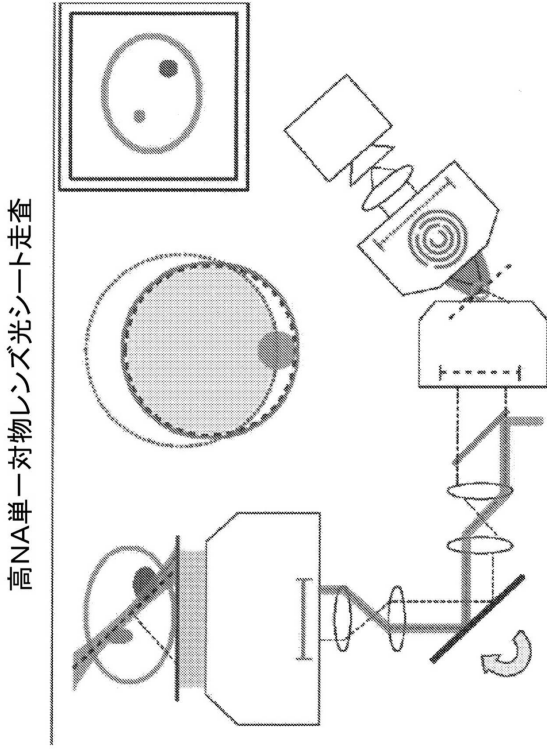


FIG. 8

【 図 9 A 】

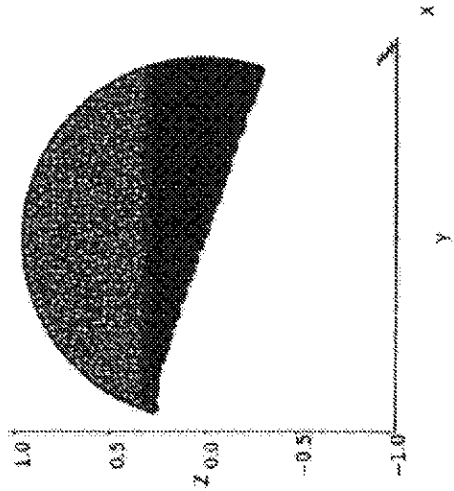


FIG. 9A

10

20

【 図 9 B 】

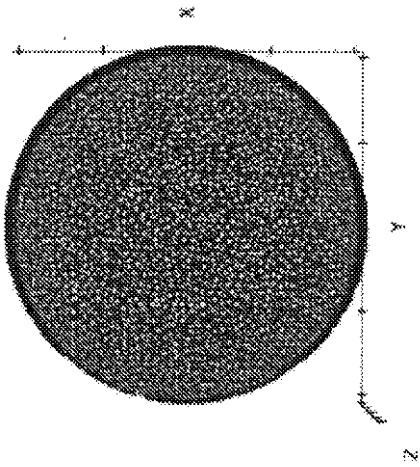


FIG. 9B

【 図 10 】

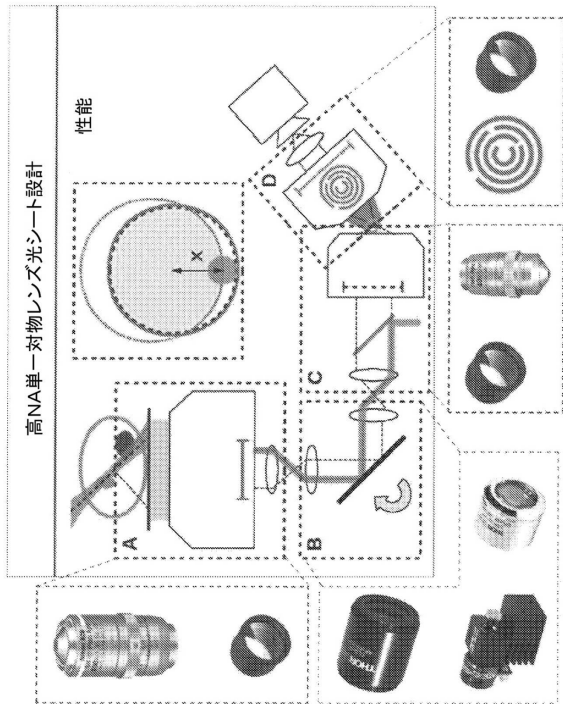


FIG. 10

30

40

50

【図 1 1】

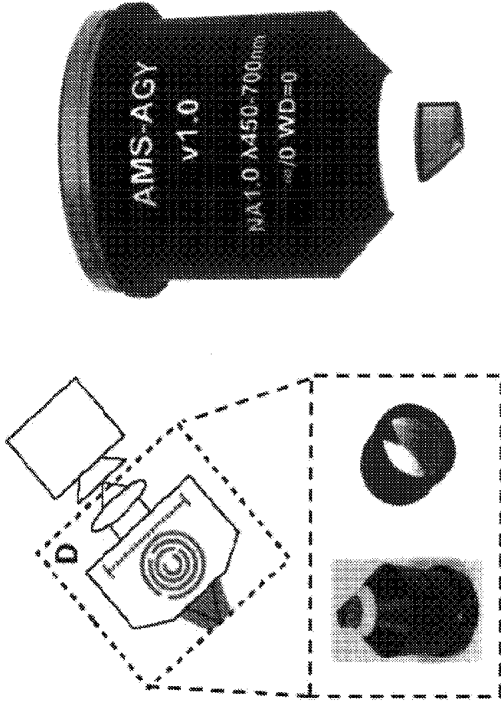


FIG. 11

【図 1 2 A】

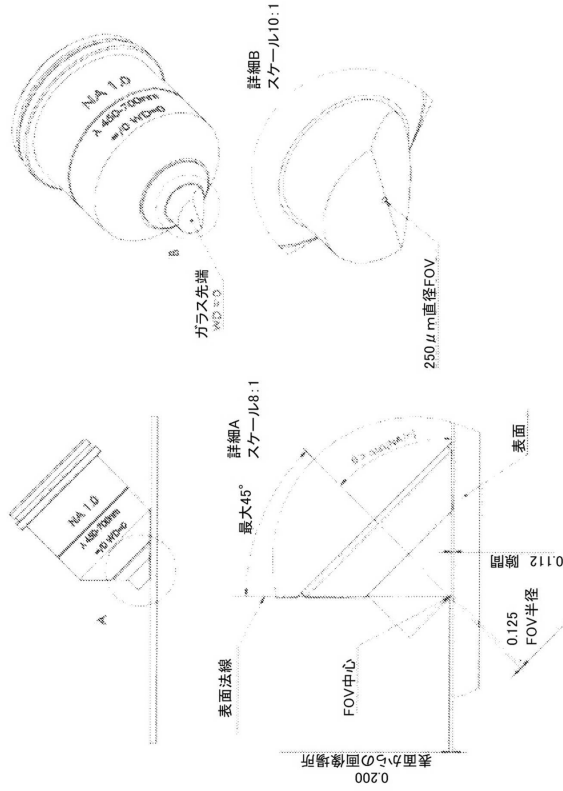


FIG. 12A

10

20

【図 1 2 B】

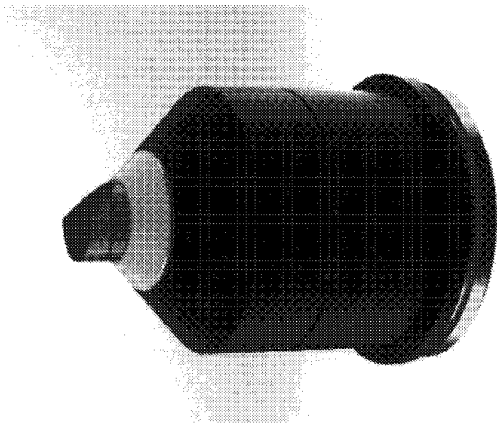


FIG. 12B

【図 1 2 C】

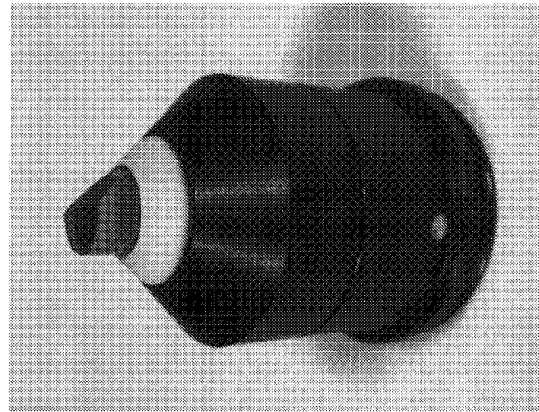


FIG. 12C

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/019847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G02B21/00 G02B21/16 G02B21/36 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G02B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bin Yang ET AL: "High Numerical Aperture Epi-illumination Selective Plane Illumination Microscopy", bioRxiv, 28 February 2018 (2018-02-28), XP055628439, DOI: 10.1101/273359 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/02/28/273359.full.pdf [retrieved on 2019-10-03] cited in the application page 3 ----- -/--	1-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 May 2020		Date of mailing of the international search report 08/06/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Serbin, Jesper

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2020/019847

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bin Yang: "High Numerical Aperture Epi-illumination Selective Plane Illumination Microscopy - Supplementary Figures", bioRxiv, 28 February 2018 (2018-02-28), XP055695811, Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/suppl/2018/02/28/273359.DC1/273359-1.pdf [retrieved on 2020-05-15] figure S3	1-37
A	----- US 2011/261446 A1 (DUNSBY CHRISTOPHER WILLIAM [GB]) 27 October 2011 (2011-10-27) figure 3	1-37
A	----- US 9 030 734 B2 (KNEBEL WERNER [DE]; GISKE ARNOLD [DE]; LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 12 May 2015 (2015-05-12) figure 1	1-37
A	----- EP 3 440 491 A2 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 13 February 2019 (2019-02-13) figure 1	1-37
A	----- WO 2018/089865 A1 (UNIV COLUMBIA [US]) 17 May 2018 (2018-05-17) figure 2 -----	1-37

10

20

30

40

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/019847

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011261446 A1	27-10-2011	EP 2316048 A1	04-05-2011
		US 2011261446 A1	27-10-2011
		WO 2010012980 A1	04-02-2010

US 9030734 B2	12-05-2015	CN 103339547 A	02-10-2013
		DE 102011000835 A1	23-08-2012
		JP 5642301 B2	17-12-2014
		JP 2014508326 A	03-04-2014
		US 2013335818 A1	19-12-2013
		WO 2012113752 A1	30-08-2012

EP 3440491 A2	13-02-2019	EP 3440491 A2	13-02-2019
		JP 2019511013 A	18-04-2019
		LU 93021 B1	08-11-2017
		US 2019129153 A1	02-05-2019
		WO 2017174795 A2	12-10-2017

WO 2018089865 A1	17-05-2018	CN 110178069 A	27-08-2019
		EP 3538940 A1	18-09-2019
		US 2019302437 A1	03-10-2019
		WO 2018089865 A1	17-05-2018

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(32)優先日 平成31年2月27日(2019.2.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ヨーク , アンドリュー グレゴリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ベテランズ ブール
バード 1170

(72)発明者 ミレット - シッキング , アルフレッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サンフランシスコ , ベテランズ ブール
バード 1170

F ターム (参考) 2H052 AA07 AA09 AB02 AC04 AC09 AC15 AC27 AC34 AF02 AF14
AF25