

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-537472
(P2005-537472A)

(43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
GO 1 N 21/64	GO 1 N 21/64	Z	2 GO 4 3
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	P	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	Y	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)

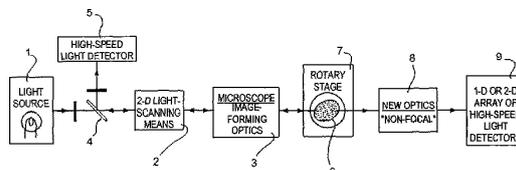
(21) 出願番号	特願2004-532300 (P2004-532300)	(71) 出願人	597166578 メディカル リサーチ カウンシル イギリス国 ダブリュ1エヌ 4エイエル ロンドン, パーク クレセント 20
(86) (22) 出願日	平成15年8月29日 (2003. 8. 29)	(74) 代理人	100064746 弁理士 深見 久郎
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月18日 (2005. 2. 18)	(74) 代理人	100085132 弁理士 森田 俊雄
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/003726	(74) 代理人	100083703 弁理士 仲村 義平
(87) 国際公開番号	W02004/020996	(74) 代理人	100096781 弁理士 堀井 豊
(87) 国際公開日	平成16年3月11日 (2004. 3. 11)	(74) 代理人	100098316 弁理士 野田 久登
(31) 優先権主張番号	0220157. 2		
(32) 優先日	平成14年8月30日 (2002. 8. 30)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	0227649. 1		
(32) 優先日	平成14年11月27日 (2002. 11. 27)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学投影断層撮影

(57) 【要約】

光学投影断層撮影により試料(6)の画像を入手するための装置は、上記試料(6)を入射光の走査動きに晒すための共焦点光走査顕微鏡(1, 2, 3)といった光スキャナを備える。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光学投影断層撮影により試料の画像を入手するための装置であって、前記装置は、光走査手段と、索引付けされた位置であってその各々において前記試料が使用中に前記走査手段による入射光の走査動きに晒される位置へと前記試料を回転させるための回転ステージとを備える、装置。

【請求項 2】

前記入射光は、前記装置の中を通過する光の従う光軸に対し垂直の方向で走査される、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記入射光はラスタパターンで走査され、前記試料における索引付けされた各位置で 1 回の完全な走査が行なわれる、請求項 1 または 2 に記載の装置。

10

【請求項 4】

前記光走査手段は共焦点走査顕微鏡の一部を形成する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の装置。

【請求項 5】

光学投影断層撮影により試料の画像を入手する方法であって、前記試料を光ビームで走査するステップと、前記画像を導き出すために前記試料から発した光を検出するステップとを備える、方法。

【請求項 6】

前記光は検出される前に前記試料の中を通過する、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記光は前記試料の一方側から入り、前記試料をその同じ側から離れる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料は索引付けされた位置へと回転され、前記試料における索引付けされた各位置で 1 回の完全な走査が行なわれる、請求項 5 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記検出器は、前記試料に入射する前記ビームと平行に前記試料から出射または前記試料を迂回する光を検出する、請求項 5 から 7 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 10】

前記光はレーザ光である、請求項 5 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法または装置の使用を含む、以下に列挙の分析または手順のうち任意の 1 つ以上を実行する方法、すなわち、

- 生物組織の構造の分析；
- 生物組織の機能の分析；
- 生物組織の形状の分析；
- 生物組織内の細胞の種類分布の分析；
- 生物組織内の遺伝子活動の分布の分析、これは

40

- RNA 転写
- タンパク質

の分布を含む；

生物組織内の形質転換の遺伝子活動の分布の分析；

生物組織内の細胞活動の分布の分析、これは

- 停止を含む細胞周期状態
- 細胞死
- 細胞増殖
- 細胞移動

を含む；

50

- 生物組織内の生理状態の分布の分析；
 免疫組織化学染色技術の結果の分析；
 原位置交雑染色技術の結果の分析；
 生物組織内の分子マーカの分布の分析、これは
 あらゆる有色または光吸収物質を含み、これにはたとえば
 5, 5 - ジプロモ - 4, 4 - ジクロロ - インジゴ (またはその他のハロゲン化インジゴ化合物) ホルマザン
 または、b - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼを含む酵素の触媒作用により生成された他の有色沈殿物もしくは染色基質の触媒変換で形成された他の有色沈殿物などがあり、これは 10
 ファストレッド (Fast Red)、ベクターレッド (Vector Red) を含み、
 かつあらゆる発光物質を含み、
 したがって、たとえばアレクサ (Alexa) 色素、FITC、ローダミンなどあらゆる蛍光物質を含み、
 そして、たとえば緑色蛍光タンパク質 (GFP) または類似のタンパク質などあらゆるルミネセントの物質を含み、
 そしてあらゆる燐光物質を含む；
 あらゆる植物種からの組織の分析；
 農学研究におけるあらゆる組織の分析、これは
 植物生物学のあらゆる局面 (遺伝、発生、生理、病理など) の基本研究 20
 遺伝子に変更を加えられた組織の分析
 を含む；
 あらゆる動物種からの組織の分析、これは
 無脊椎動物
 線虫
 脊椎動物
 あらゆる種類の魚類 (ゼブラフィッシュといった硬骨類およびサメを含めた軟骨魚類を含む)
 両生類 (ツメガエル属およびアホロートルを含む)
 爬虫類 30
 鳥類 (ニワトリおよびウズラを含む)
 あらゆる哺乳類 (あらゆるげっ歯類、イヌ、ネコおよび、ヒトを含めたあらゆる霊長類を含む)
 を含む；
 あらゆる目的のための胚組織の分析、これは
 あらゆる幹細胞集団の研究
 発生生物学の研究
 ヒトの症候群を含めた異常胚発生の原因の研究
 ヒトの妊娠中絶 (自然中絶および誘発中絶の両方) についての解剖 40
 を含む；
 ゲノム研究の目的のためのあらゆる組織の分析、これは
 ゲノム研究の目的のためのあらゆる組織の分析を含み、これは
 形質転換、ノックイン、ノックダウンまたはノックアウト有機体の分析
 遺伝子の空間分布を含めた遺伝子の表現 (または活動) およびその表現レベルの分析または発見
 作為的な実験 (たとえば、化学的または生化学的ゲノム手法を含む遺伝子的または物理的修飾) による干渉および/または自発的な異常 (たとえば自然に生じる突然変異)、の結果としての組織の構造または形態における異常の発見の分析
 を含む；
 神経生物学研究の目的のためのあらゆる組織の分析、これは 50

- 神経の形態の分析
 神経の経路および接続の分析
 動物の脳の一部または全体の分析
 を含む；
 薬学研究におけるあらゆる組織の分析、これは
 薬学的物質（たとえば薬品、分子、タンパク質、抗体など）の組織内の空間分布およびその濃度を含めた薬学的物質の分析
 組織の構造または形態における異常の分析または発見
 を含む；
 医学的研究における組織の分析、これは 10
 動物組織の遺伝、発生、生理、構造および機能の研究
 あらゆる種類の疾患についての我々の理解を深めるための病的組織の分析
 を含み、これは
 先天性疾患
 後天性疾患
 を含み、これは
 感染性疾患
 腫瘍性疾患
 血管疾患
 炎症性疾患 20
 外傷性疾患
 代謝性疾患
 内分泌疾患
 消耗疾患
 薬物関連疾患
 医原性疾患または
 特発性疾患
 を含む；
 医学的診断、処置または監視のための組織の分析、これは 30
 生検内の癌細胞および癌組織の探索
 生検内の組織における異常な構造または形態の探索
 を含む癌患者の診断
 リンパ節
 ポリープ
 肝臓生検
 腎臓生検
 前立腺生検
 筋肉生検
 脳組織
 の分析を含めたあらゆる生検の分析 40
 腫瘍がすべて除去されたかどうかの判断
 腫瘍の種類および癌の種類
 の判断
 を含めた、患者からの腫瘍の抽出過程で除去された組織の分析
 を含む。
- 【請求項 1 2】
- 以下に列挙の分析または手順のうち任意の 1 つ以上における、請求項 1 から 1 0 のいずれかに記載の方法および装置の使用、すなわち
 生物組織の構造の分析；
 生物組織の機能の分析；
 生物組織の形状の分析；

- 生物組織内の細胞の種類分布の分析；
 生物組織内の遺伝子活動の分布の分析、これは
- RNA 転写
 - タンパク質
- の分布を含む；
 生物組織内の形質転換の遺伝子活動の分布の分析；
 生物組織内の細胞活動の分布の分析、これは
- 停止を含む細胞周期状態
 - 細胞死
 - 細胞増殖
 - 細胞移動
- を含む；
 生物組織内の生理状態の分布の分析；
 免疫組織化学染色技術の結果の分析；
 原位置交雑染色技術の結果の分析；
 生物組織内の分子マーカの分布の分析、これは
 あらゆる有色または光吸収物質を含み、これにはたとえば
 5, 5 - ジプロモ - 4, 4 - ジクロロ - インジゴ (またはその他のハロゲン化インジゴ化合物) ホルマザン
 または、b - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼを含む酵素の触媒作用により生成された他の有色沈殿物もしくは染色基質の触媒変換で形成された他の有色沈殿物などがあり、これは
- ファストレッド (Fast Red)、ベクターレッド (Vector Red) を含み、
 - かつあらゆる発光物質を含み、
 - したがって、たとえばアレクサ (Alexa) 色素、FITC、ローダミンなどあらゆる蛍光物質を含み、
 - そして、たとえば緑色蛍光タンパク質 (GFP) または類似のタンパク質などあらゆるルミネセントの物質を含み、
 - そしてあらゆる燐光物質を含む；
- あらゆる植物種からの組織の分析；
 農学研究におけるあらゆる組織の分析、これは
 植物生物学のあらゆる局面 (遺伝、発生、生理、病理など) の基本研究
 遺伝子に変更を加えられた組織の分析
 を含む；
 あらゆる動物種からの組織の分析、これは
- 無脊椎動物
 - 線虫
 - 脊椎動物
 - あらゆる種類の魚類 (ゼブラフィッシュといった硬骨類およびサメを含めた軟骨魚類を含む)
 - 両生類 (ツメガエル属およびアホロートルを含む)
 - 爬虫類
 - 鳥類 (ニワトリおよびウズラを含む)
 - あらゆる哺乳類 (あらゆるげっ歯類、イヌ、ネコおよび、ヒトを含めたあらゆる霊長類を含む)
- を含む；
 あらゆる目的のための胚組織の分析、これは
 あらゆる幹細胞集団の研究
 発生生物学の研究
 ヒトの症候群を含めた異常胚発生の原因の研究

10

20

30

40

50

ヒトの妊娠中絶（自然中絶および誘発中絶の両方）についての解剖を含む；	
ゲノム研究の目的のためのあらゆる組織の分析、これは	
ゲノム研究の目的のためのあらゆる組織の分析を含み、これは	
形質転換、ノックイン、ノックダウンまたはノックアウト有機体の分析	
遺伝子の空間分布を含めた遺伝子の表現（または活動）およびその表現レベルの分析または発見	
作為的な実験（たとえば、化学的または生化学的ゲノム手法を含む遺伝子的または物理的修飾）による干渉および/または自発的な異常（たとえば自然に生じる突然変異）	
、の結果としての組織の構造または形態における異常の発見の分析	10
を含む；	
神経生物学研究の目的のためのあらゆる組織の分析、これは	
神経の形態の分析	
神経の経路および接続の分析	
動物の脳の一部または全体の分析	
を含む；	
薬学研究におけるあらゆる組織の分析、これは	
薬学的物質（たとえば薬品、分子、タンパク質、抗体など）の組織内の空間分布およびその濃度を含めた薬学的物質の分析	
組織の構造または形態における異常の分析または発見	20
を含む；	
医学的研究における組織の分析、これは	
動物組織の遺伝、発生、生理、構造および機能の研究	
あらゆる種類の疾患についての我々の理解を深めるための病的組織の分析	
を含み、これは	
先天性疾患	
後天性疾患	
を含み、これは	
感染性疾患	
腫瘍性疾患	30
血管疾患	
炎症性疾患	
外傷性疾患	
代謝性疾患	
内分泌疾患	
消耗疾患	
薬物関連疾患	
医原性疾患または	
特発性疾患	
を含む；	40
医学的診断、処置または監視のための組織の分析、これは	
生検内の癌細胞および癌組織の探索	
生検内の組織における異常な構造または形態の探索	
を含む癌患者の診断	
リンパ節	
ポリープ	
肝臓生検	
腎臓生検	
前立腺生検	
筋肉生検	50

脳組織

の分析を含めたあらゆる生検の分析

腫瘍がすべて除去されたかどうかの判断

腫瘍の種類および癌の種類

を含めた、患者からの腫瘍の抽出過程で除去された組織の分析

を含む。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

この発明は光学投影断層撮影に関する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

光学投影断層撮影とは、試料の3次元画像を生成する技術の1つであり、その一例が本出願人のW002/095476明細書に開示されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

この発明は、特に蛍光画像化の場合において、一連の画像におけるノイズまたは干渉を抑制しかつ一連の画像での焦点深度を改良することを図りながら、試料に光を向ける異なる仕方を提供することを目的としてなされたものである。

20

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の概要

この発明の一局面に従うと、光学投影断層撮影により試料の画像を入手するための装置が提供され、この装置は、光走査手段と、索引付けられた位置であってその各々において上記試料が使用中に上記走査手段による入射光の走査動きに晒される位置へと上記試料を回転させるための回転ステージとを備える。

【0005】

上記入射光は、上記装置の中を通過する光により規定される光軸に対し垂直の方向で走査され得る。

30

【0006】

上記光走査手段は、共焦点走査顕微鏡の一部を形成し得る。

【0007】

この発明の別の局面に従うと、光学投影断層撮影により試料の画像を入手する方法が提供され、この方法は、上記試料を光ビームで走査するステップと、上記画像を導き出すために上記試料から発した光を検出するステップとを備える。

【0008】

好ましくは、上記検出器は、上記試料に入射する上記ビームと平行に上記試料から出射またはこれを迂回する光を検出する。

40

【0009】

好ましくは、上記入射光はラスタパターンで走査され、上記試料における索引付けされた各位置で1回の完全な走査が行なわれる。

【0010】

さらに、以下に列挙の分析または手順のうち任意の1つ以上における、上述の局面のいずれかに記載の方法または装置の使用が提供される。

【0011】

この発明に従うと、この発明の分析および手順は以下のものを含む。

【0012】

50

- 生物組織の構造の分析；
 生物組織の機能の分析；
 生物組織の形状の分析；
 生物組織内の細胞の種類分布の分析；
 生物組織内の遺伝子活動分布の分析、これは
 - R N A 転写
 - タンパク質
 の分布を含む；
 生物組織内の形質転換の遺伝子活動分布の分析；
 生物組織内の細胞活動分布の分析、これは 10
 - 停止を含む細胞周期状態
 - 細胞死
 - 細胞増殖
 - 細胞移動
 を含む；
 生物組織内の生理状態分布の分析；
 免疫組織化学染色技術の結果の分析；
 原位置交雑染色技術の結果の分析；
 生物組織内の分子マーカの分布の分析、これは
 あらゆる有色または光吸収物質を含み、これにはたとえば 20
 5, 5 - ジプロモ - 4, 4 - ジクロロ - インジゴ（またはその他のハロゲン化インジゴ化合物）ホルマザン
 または、b - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼを含む酵素の触媒作用により生成された他の有色沈殿物もしくは染色基質の触媒変換で形成された他の有色沈殿物などがあり、これは
 ファストレッド（Fast Red）、ベクターレッド（Vector Red）を含み、
 かつあらゆる発光物質を含み、
 したがって、たとえばアレクサ（Alexa）色素、F I T C、ローダミンなどあらゆる
 蛍光物質を含み、
 そして、たとえば緑色蛍光タンパク質（G F P）または類似のタンパク質などあらゆる 30
 ルミネセントの物質を含み、
 そしてあらゆる燐光物質を含む；
 あらゆる植物種からの組織の分析；
 農学研究におけるあらゆる組織の分析、これは
 植物生物学のあらゆる局面（遺伝、発生、生理、病理など）の基本研究
 遺伝子に変更を加えられた組織の分析
 を含む；
 あらゆる動物種からの組織の分析、これは
 無脊椎動物
 線虫 40
 脊椎動物
 あらゆる種類の魚類（ゼブラフィッシュといった硬骨類およびサメを含めた軟骨魚類を含む）
 両生類（ツメガエル属およびアホロートルを含む）
 爬虫類
 鳥類（ニワトリおよびウズラを含む）
 あらゆる哺乳類（あらゆるげっ歯類、イヌ、ネコおよび、ヒトを含めたあらゆる霊長類を含む）
 を含む；
 あらゆる目的のための胚組織の分析、これは 50

あらゆる幹細胞集団の研究

発生生物学の研究

ヒトの症候群を含めた異常胚発生の原因の研究

ヒトの妊娠中絶（自然中絶および誘発中絶の両方）についての解剖

を含む；

ゲノム研究の目的のためのあらゆる組織の分析、これは

ゲノム研究の目的のためのあらゆる組織の分析を含み、これは

形質転換、ノックイン、ノックダウンまたはノックアウト有機体の分析

遺伝子の空間分布を含めた遺伝子の表現（または活動）およびその表現レベルの分

析または発見

10

作為的な実験（たとえば、化学的または生化学的ゲノム手法を含む遺伝子的または物理的修飾）による干渉および/または自発的な異常（たとえば自然に生じる突然変異）

、の結果としての組織の構造または形態における異常の発見の分析

を含む；

神経生物学研究の目的のためのあらゆる組織の分析、これは

神経の形態の分析

神経の経路および接続の分析

動物の脳の一部または全体の分析

を含む；

薬学研究におけるあらゆる組織の分析、これは

20

薬学的物質（たとえば薬品、分子、タンパク質、抗体など）の組織内の空間分布およびその濃度を含めた薬学的物質の分析

組織の構造または形態における異常の分析または発見

を含む；

医学的研究における組織の分析、これは

動物組織の遺伝、発生、生理、構造および機能の研究

あらゆる種類の疾患についての我々の理解を深めるための病的組織の分析

を含み、これは

先天性疾患

後天性疾患

30

を含み、これは

感染性疾患

腫瘍性疾患

血管疾患

炎症性疾患

外傷性疾患

代謝性疾患

内分泌疾患

消耗疾患

薬物関連疾患

40

医原性疾患または

特発性疾患

を含む；

医学的診断、処置または監視のための組織の分析、これは

生検内の癌細胞および癌組織の探索

生検内の組織における異常な構造または形態の探索

を含む癌患者の診断

リンパ節

ポリープ

肝臓生検

50

腎臓生検
前立腺生検
筋肉生検
脳組織

の分析を含めたあらゆる生検の分析

腫瘍がすべて除去されたかどうかの判断

腫瘍の種類および癌の種類判断

を含めた、患者からの腫瘍の抽出過程で除去された組織の分析を含む。

【0013】

この発明に従うと、この発明で用いられる標本は、先の特許出願に記載されたように、かつ/または当業者には周知である従来の病理学的および組織学的技術および手順を用い、調製され得る。

10

【0014】

たとえば、原位置交雑（特にRNAの検出に有用）については、ハモンド K・L、ハンソン I・M、ブラウン A・G、レティス L・A、ヒル R・E (Hammond K L, Hanson I M, Brown A G, Lettice L A, Hill R E)、「哺乳類およびショウジョウバエダックスフント遺伝子は、Ski原腫瘍遺伝子に関係し、目および肢において表現される (Mammalian and Drosophila dachshund genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb)」、発生機構 (Mech Dev.)、1998年6月、第74巻 (第1~2号)、121~31頁。

20

【0015】

免疫組織化学（特にタンパク質およびその他の分子の検出に有用）については、シャープ J、アールグレン U、ペリー P、ヒル B、ロス A、ヘックシャー・ゾーレンセン J、バルドック R、デービッドソン D (Sharpe J, Ahlgren U, Perry P, Hill B, Ross A, Hecksher-Sorensen J, Baldock R, Davidson D)、「3次元顕微鏡検査および遺伝子表現研究におけるツールとしての光学投影断層撮影 (Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies)」、サイエンス (Science)、2002年4月19日、第296巻 (第5567号)、541~5頁。

30

【0016】

この発明はこの発明の範囲を逸脱することなく変形可能であることが認められるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下、この発明について添付の図面を参照して例により説明する。

【0018】

図面の詳細な説明

図1を参照して、この装置は光源1（レーザの形態をとる）を備える。光源1は光を2次元光走査手段2に供給する。光走査手段2の走査機構は二重鏡の系を有する。走査運動での光は像形成光学部品3を通して送り込まれる。光源1と走査手段2との間に置かれたダイクロニックミラー4は、返された光を高速光検出器5に向ける。構成要素1~5は共焦点光走査顕微鏡とすることができる。

40

【0019】

光学部品3からの光は試料6の中を通過する。試料6は回転ステージ7の中で回転させられ、上記ステージにより支持される。回転ステージ7の構造は、本出願人の同時係属の国際特許出願番号PCT/GB02/02373に開示された回転ステージに対応したものである。回転ステージ7は、索引付けされた連続的な位置であってその各々において試料の静止中に励起光での1回の完全な走査が行なわれる位置へと試料6を回転させる。光は試料6の中を通過した後、光学系8によって処理される。光学系8は、高速光検出器9からなる1次元または2次元アレイに光を向ける。

50

【0020】

蛍光モードにおいては、試料6からの光は、光学部品3および走査手段2を通り、そこから鏡4を介して高速光検出器5へ返される。この蛍光画像化方法においては、励起光は試料の一方側から入射し、これの同じ側で試料から出射して検出されることになる。図1のステージ7の右方に示す各構成要素が用いられるのは、下に記載の透過モードにおいてである。

【0021】

顕微鏡光学部品3は、高開口数(図2a)を有していても、または低開口数(図2b)を有するよう適合されていてもよい。このうち後者は、画像化されるべき試料のいくつかにおいて有用である。

【0022】

図3は公知の像形成システムを例示する。(試料内の)焦平面12上の任意の点からの光はレンズ13によって集光されて像平面14上の単一の点へと屈折される。ここでは対称性が存在するため、像平面14上のいずれの点も焦平面12上の或る点へと写像し、逆もまた当てはまる。

【0023】

これとは対照的に、図4、図5のこの発明の「非焦点」光学部品においては、像形成用の光学機構の必要性がなく、この光学部品は上記の例のような対称性を呈しない。非焦点光学系8の代表例として凸レンズ15を示す。焦平面12上の単一の点からの光は単一の光検出器に対して焦点合わせされず、光は発散されるため、入射ビームと平行に試料6から出射またはこれを迂回する光のみが、光軸上に位置付けられた単一の光検出器9aに到達する。図4、図5のレンズ15の目的は図3と異なっており、光走査状況下で機能するものである。光ビームは試料全体にわたって多数の異なる位置(そのうち5つを図5の黒い矢印で示す)を通じて(たとえばラスタパターンで)走査される。非焦点光学系8(すなわちレンズ15)の目的は、光ビームの走査位置にかかわらず、入射光と平行に試料から出射またはこれを迂回する光を単一の光検出器9aに向けることである。このシステムによれば、顕著な光散乱を引起す試料の場合に、散乱光の検出を制限することによってより高い信号対雑音比を得ることが可能となる。

【0024】

図6a~6dは元のビーム位置からの逸脱を示す例としての散乱を示し、(レーザビームから導き出された)光線が試料6から発せられて非焦点光学系の中を通過する間の光経路の或る代表例を示す。左方から試料に近づくビームは試料に入射するビームである。

【0025】

図6aにおいては、試料6の中心における1点から散乱した光線は光検出器9aから離れるように発散される。検出される散乱光線の割合は、検出器の有効サイズを変えることで調整され得る。この制御は調整可能な絞りによって可能となる(これは共焦点走査顕微鏡におけるピンホールと極めて類似する)。これに代えて、レンズの位置を調整して散乱光線の発散をより大きくまたはより小さくしてもよい。光学像形成システムにおいては、エアリの円盤は、当該試料内の単一の点から発せられた光により生じる干渉パターンである。生じるエアリの円盤がより大きい光学システムほどその分解能は低くなるが、それは試料内の隣り合う点からのエアリの円盤同士が重なり合うからである。エアリの円盤の概念は、このような投影測定システムには厳密には当てはまらないが、類似の概念は存在する。ここに記載の非焦点光学部品の場合、投影がなされるたびにそこからの光によって広いエアリの円盤に類似した極めて広い強度分布が(検出器の位置に)生じ、これは分解能が低いことを示唆していると考えられる。しかしながら、任意の1時点においては単一の投影が測定されるのみであるため、極めて広い分布も互いに干渉することはあり得ない。

【0026】

図6bにおいて、図6aで標本化したのと同じ線上にある他の点から散乱した光線も光検出器9aから離れるように発散する。

【0027】

10

20

30

40

50

図 6 c において、異なる走査位置（黒い矢印）からの非散乱光は、光軸と実質的に平行に試料 6 から発せられるため、光検出器 9 a へ向けて屈折される。図 6 a , 6 b と同様に、散乱光は検出器 9 a から離れるように向けられる。

【 0 0 2 8 】

図 6 d において、任意の走査位置からの非散乱光線は光検出器 6 に向けられる。レーザービームが光軸に対して垂直の方向で試料 6 全体にわたり走査される際の上記レーザービームの連続的な位置の代表例を矢印で示す。

【 0 0 2 9 】

従来、光学投影断層撮影で行なわれてきた実験はいずれも、いくらかの光は散乱されるにもかかわらず、試料の屈折率は一様であると仮定しなければならなかった。しかし、最近の実験では、いくつかの重要な試料（生検の医学的な画像化を含む）の呈する屈折率は一様でないことがわかってきた。これはすなわち、現在のアルゴリズムでは試料が正確に画像化されておらず、歪みおよびアーチファクトが導入されてしまうことを意味している。しかし、ここに記載の装置によれば、以前は入手不可能であった当該試料からの光ビームの出射角に関する情報を測定することによって上記の問題が緩和される。一般的に、低散乱でかつ屈折率の分布が一様でない試料の場合、ここに記載のシステムによれば、投影がなされるごとに経験される屈折の程度を測定することにより、上述のような一様でない分布を算出することが可能となる。

10

【 0 0 3 0 】

この装置の使用時には、清澄剤（たとえば B A B B ）を用いて大部分の光が散乱しないようにする。しかしこれは異なる形の妨害、すなわち屈折を受ける。図 7 において、散乱光を破線で示し、光の主経路を実線で示す。図 7 a の第 1 の例では、主経路は曲がらずに試料 6 の中を通過する（主経路はレンズの中を通過する際にのみ屈折する）。主経路は、試料において他の領域よりも高い屈折率の領域の中を通過する（灰色の円部分）が、異なる屈折率の領域間で主経路が遭遇する界面は両方ともこの光経路と垂直であるため、屈折は全く生じない。

20

【 0 0 3 1 】

図 7 b の第 2 の事例では、照明ビームはこれより僅かに高いところにあり、したがって試料の灰色の領域および白色の領域（異なる屈折率）間で照明ビームが遭遇する界面は僅かに垂直からずれている。これに伴い、主経路に 2 つの僅かな屈折が生じ、このため光は試料から出てきたときにはもはや入射ビームと平行ではなく、元の中心の光検出器 9 a から僅かに脇へ向けられる。光補助検出器 9 b を中心の検出器 9 a のいずれかの脇に位置付ければ、これらの光補助検出器は屈折の程度を測定することができる。投影がなされると、光検出器アレイに沿っていくらかの強度分布が必ず生じることになる。この強度分布を用いることで、光の主経路が試料から出てきた角度を求めることができる。光の主経路が試料から出てきた角度を測定するには、システムはこの分布の中心（通常は最も強い強度）がどこにあるかを求めるだけでよい。図 7 c の最後の事例においては、走査位置を異ならせたのに伴いビームの屈折は大きくなっており、これは検出器アレイに沿ったさらなるシフトに反映されている。

30

【 0 0 3 2 】

図 8 において、試料 6 内の長円形の領域は残りの領域よりも高い屈折率を有する（灰色の形状）。試料のまわりを通過する光線は屈折されず、中心の光検出器 9 a へ向けられる。試料の真中を通過する光線（図 8 では真中の 2 本の光線 1 1 ）は 2 回屈折される。光が通過する 2 つの界面（白色から灰色へ、そして灰色から白色へ）は互いに平行であり、したがって光線は試料に入射した同じ角度で試料から出射する。これらの光線もまた中心の検出器 9 a に向けられる。灰色の領域における他の部分を通過する光線もまた 2 回屈折されるが、その通過する界面は平行ではないため、これらの光線は隣接する光検出器 9 b によって検出される。

40

【 0 0 3 3 】

屈折されるがなお入射光と平行に試料 6 から出射する光線がいくつかあるという事実は

50

問題ではない。図8の例はこの切片を通じて取られる多数組の投影のうちただ1組を示すものである。完全な画像化は、このようなデータの組を上記切片を通じて多数の向きについて取得することを要し、このデータすべてを組合せることによって分布を完全に再構成することが可能である。

【0034】

図9～12はこの装置の3次元図を示す。図9では、試料の2次元断面を通るすべての非屈折(かつ非散乱)光線がアレイの中心の光検出器に対して焦点合わせされる。試料6は、索引付けされた位置であってその各々において完全な走査が行なわれる位置間で垂直軸まわりに回転される。

【0035】

図10は、散乱または屈折した光が光補助検出器に至る経路を示す。

【0036】

図11は、レンズ(または光学系)によって、検出器の1次元アレイ9が試料の完全な2次元ラスタ走査からデータを取得できるようになることを例示する。1行の走査位置は、走査の垂直高さにかかわらず常に下方または上方へ1行の検出器に向けられる。

【0037】

図12に示すように、光検出器9には1次元アレイの代わりに2次元アレイを用いてもよい。こうすれば、図12に示す光線が占める平面よりも上方または下方へ散乱または屈折した光を測定することが可能となる。

【0038】

先行技術に従う広視野の光学投影断層撮影においては、試料を通して適当な投影をしてそこからCCDの各画素が情報を記録することが求められる。広視野の蛍光光学投影断層撮影においては、試料の照明/励起もまた広視野でなければならぬという事実から生じる問題が存在する。試料の光学特性で内部の光散乱が生じる場合、光子が試料から出射する際の軌跡によっては、光子を検出する画素が上記光子の由来する投影を表わしてはいないということがしばしば起きる。これにより画像にはかなりのノイズが加わる。ここに記載の光走査に関する発明によればこの問題は回避されるが、それはおおよその投影内の蛍光粒子のみが任意の1時点において励起されるからである。

【0039】

検出器アレイ9光学部品から導き出されたデータはアルゴリズムによって解釈される。

【0040】

後面投影の算出を実行するためには多くの異なるアルゴリズム手法が既に存在する。その1手法は、標準的な線形フィルタ補正後面投影アルゴリズムを使用するというものである(米国特許第5,680,484号など)。その他の手法としては、反復、最大エントロピーおよび代数再構成技術などが挙げられる(R.ゴードン(R. Gordon)他、「投影からの3次元再構成:アルゴリズムについての検討(Three-Dimensional Reconstruction from Projections: A Review of Algorithms)」)。

【0041】

アルゴリズムは以下のように働く。

【0042】

1. 後面投影の実行の際、データは平行(または扇型ビーム)データであるかのように使用される。これによって、試料の吸収特性の分布についての「ファジーな」推定値または、これに代えて試料の蛍光についてのファジーな分布が得られる。

【0043】

2. 屈折率の分布についての1番目の近似値が推定される。これはいくつかの仕方で行なうことができる。1つの有用な方法は、吸収または蛍光の分布が屈折率の分布を反映していると仮定するというものである。各々の断面の中で2次元勾配ベクトルが各ボクセルごとに算出される。これに代わる方法として一様またはランダムな分布から出発するものがある。

【0044】

10

20

30

40

50

3. 推定された屈折分布を用いて前方投影を実行する。すなわち、屈折分布の最初の推定値が正しかった場合に投影データがどのようなものとなるかについての予測を実行する。

【0045】

4. 予測された投影と実際の投影とを比較する。

【0046】

5. 推定された屈折分布に変更を加える。予測と実際との差が大きい投影は、分布におけるどの領域により多くの変更が必要かを示す。たとえば、図8に示す灰色の形状の場合、長円における曲がった端部からの投影は屈折量が大きいため予測から大きく異なるであろう。したがってこの領域にあるボクセルについては、その予測屈折率は他の領域におけるよりも大きく変化する。

10

【0047】

6. 3～6のループを繰返し、予測投影がこれ以上向上できなくなるまで続ける。

【0048】

上述のアルゴリズム手法は、その他の光学信号、たとえば蛍光または散乱の解釈にも使用可能である。

【0049】

この装置および方法は、以下に記載するようなさまざまな分析および手順において採用可能である。

【0050】

20

生物組織の構造の分析；
 生物組織の機能の分析；
 生物組織の形状の分析；
 生物組織内の細胞の種類分布の分析；
 生物組織内の遺伝子活動の分布の分析、これは

- RNA転写
- タンパク質

の分布を含む；
 生物組織内の形質転換の遺伝子活動の分布の分析；
 生物組織内の細胞活動の分布の分析、これは

30

- 停止を含む細胞周期状態
- 細胞死
- 細胞増殖
- 細胞移動

を含む；
 生物組織内の生理状態の分布の分析；
 免疫組織化学染色技術の結果の分析；
 原位置交雑染色技術の結果の分析；
 生物組織内の分子マーカの分布の分析、これは
 あらゆる有色または光吸収物質を含み、これにはたとえば

40

5, 5 - ジプロモ - 4, 4 - ジクロロ - インジゴ (またはその他のハロゲン化インジゴ化合物) ホルマザン

または、b - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼを含む酵素の触媒作用により生成された他の有色沈殿物もしくは染色基質の触媒変換で形成された他の有色沈殿物などがあり、これは

ファストレッド (Fast Red)、ベクターレッド (Vector Red) を含み、
 かつあらゆる発光物質を含み、

したがって、たとえばアレクサ (Alexa) 色素、FITC、ローダミンなどあらゆる蛍光物質を含み、

そして、たとえば緑色蛍光タンパク質 (GFP) または類似のタンパク質などあらゆる

50

- るルミネセントの物質を含み、
 そしてあらゆる燐光物質を含む；
 あらゆる植物種からの組織の分析；
 農学研究におけるあらゆる組織の分析、これは
 植物生物学のあらゆる局面（遺伝、発生、生理、病理など）の基本研究
 遺伝子に変更を加えられた組織の分析
 を含む；
 あらゆる動物種からの組織の分析、これは
 無脊椎動物
 線虫
 脊椎動物
 あらゆる種類の魚類（ゼブラフィッシュといった硬骨類およびサメを含めた軟骨魚類
 を含む）
 両生類（ツメガエル属およびアホロートルを含む）
 爬虫類
 鳥類（ニワトリおよびウズラを含む）
 あらゆる哺乳類（あらゆるげっ歯類、イヌ、ネコおよび、ヒトを含めたあらゆる霊長
 類を含む）
 を含む；
 あらゆる目的のための胚組織の分析、これは
 あらゆる幹細胞集団の研究
 発生生物学の研究
 ヒトの症候群を含めた異常胚発生の原因の研究
 ヒトの妊娠中絶（自然中絶および誘発中絶の両方）についての解剖
 を含む；
 ゲノム研究の目的のためのあらゆる組織の分析、これは
 形質転換、ノックイン、ノックダウンまたはノックアウト有機体の分析
 遺伝子の空間分布を含めた遺伝子の表現（または活動）およびその表現レベルの分析
 または発見
 作為的な実験（たとえば、化学的または生化学的ゲノム手法を含む遺伝子的または物
 理的修飾）による干渉および/または自発的な異常（たとえば自然に生じる突然変異）、
 の結果としての組織の構造または形態における異常の発見の分析
 を含む；
 神経生物学研究の目的のためのあらゆる組織の分析、これは
 神経の形態の分析
 神経の経路および接続の分析
 動物の脳の一部または全体の分析
 を含む；
 薬学研究におけるあらゆる組織の分析、これは
 薬学的物質（たとえば薬品、分子、タンパク質、抗体など）の組織内の空間分布およ
 びその濃度を含めた薬学的物質の分析
 組織の構造または形態における異常の分析または発見
 を含む；
 医学的研究における組織の分析、これは
 動物組織の遺伝、発生、生理、構造および機能の研究
 あらゆる種類の疾患についての我々の理解を深めるための病的組織の分析
 を含み、これは
 先天性疾患
 後天性疾患
 を含み、これは

10

20

30

40

50

感染性疾患
 腫瘍性疾患
 血管疾患
 炎症性疾患
 外傷性疾患
 代謝性疾患
 内分泌疾患
 消耗疾患
 薬物関連疾患
 医原性疾患または
 特発性疾患

10

を含む；

医学的診断、処置または監視のための組織の分析、これは
 生検内の癌細胞および癌組織の探索
 生検内の組織における異常な構造または形態の探索
 を含む癌患者の診断

リンパ節
 ポリープ
 肝臓生検
 腎臓生検
 前立腺生検
 筋肉生検
 脳組織

20

の分析を含めたあらゆる生検の分析

腫瘍がすべて除去されたかどうかの判断

腫瘍の種類および癌の種類的判断

を含めた、患者からの腫瘍の抽出過程で除去された組織の分析
 を含む。

【0051】

この発明はこの発明の範囲から逸脱することなく変形可能であることが認められるであ
 ろう。 30

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】この発明の好ましい実施例を形成する装置の図である。

【図2】(a)および(b)は、この発明の装置の顕微鏡光学部品を、開口数が低くまたは高くなるように構成する仕方を示す図である。

【図3】公知の像形成光学部品を示す図である。

【図4】この発明の装置の光学系における或る像形成光学部品を示す図である。

【図5】この発明の装置の光学系における別の像形成光学部品を示す図である。

【図6】(a)、(b)、(c)および(d)にて、この発明の装置の光学系における光
 経路の代表例を示す図である。 40

【図7】(a)、(b)および(c)にて、異なる程度の屈折が光学系の働きに与える影
 響について説明する図である。

【図8】1次元検出器アレイを用いた屈折の測定の仕方について説明する図である。

【図9】光学系の働きを立体的に示す図である。

【図10】光学系の働きを立体的に示す図である。

【図11】光学系の働きを立体的に示す図である。

【図12】光学系の働きを立体的に示す図である。

【 図 1 】

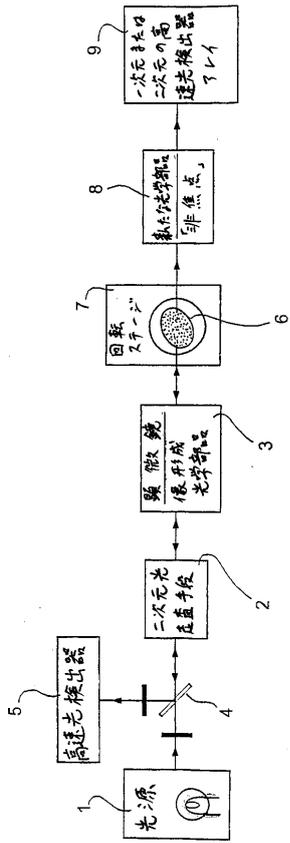


Fig.1

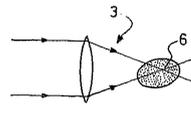


Fig. 2a

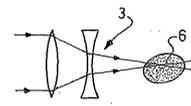


Fig. 2b

【 図 3 】

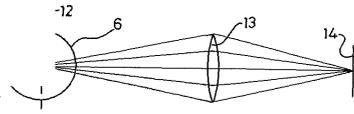


Fig. 3

【 図 4 】

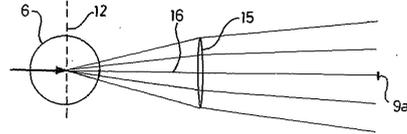


Fig. 4

【 図 5 】

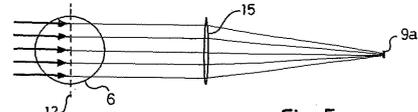


Fig. 5

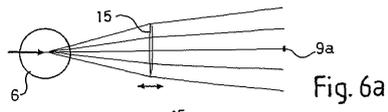


Fig. 6a

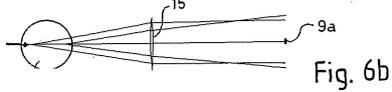


Fig. 6b

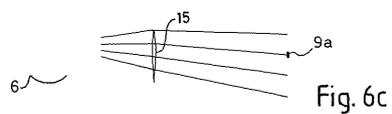


Fig. 6c

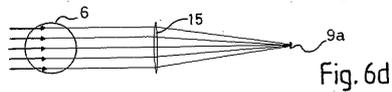


Fig. 6d

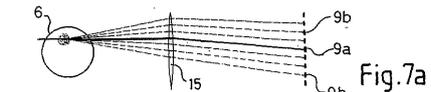


Fig. 7a



Fig. 7b



Fig. 7c

【 図 8 】

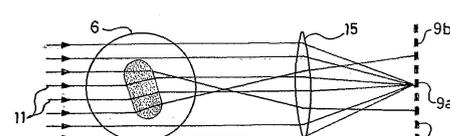


Fig. 8

【 図 9 】

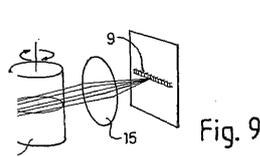


Fig. 9

【 図 1 0 】

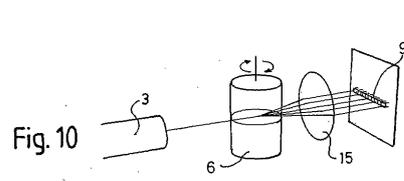
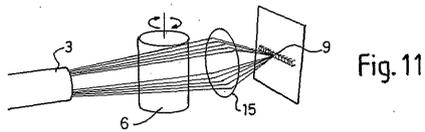
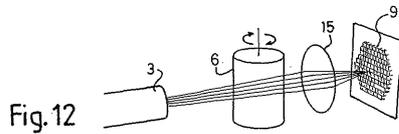


Fig. 10

【図 1 1】



【図 1 2】



【手続補正書】

【提出日】平成17年3月3日(2005.3.3)

【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】

光学投影断層撮影により試料の画像を入手するための装置であって、前記装置は、光走査手段と、索引付けされた位置であってその各々において前記試料が使用中に前記走査手段による入射光の走査動きに晒される位置へと前記試料を回転させるための回転ステージとを備える、装置。

【請求項 2】

前記入射光は、前記装置の中を通過する光の従う光軸に対し垂直の方向で走査される、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記入射光はラスタパターンで走査され、前記試料における索引付けされた各位置で 1 回の完全な走査が行なわれる、請求項 1 または 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記光走査手段は共焦点走査顕微鏡の一部を形成する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の装置。

【請求項 5】

光学投影断層撮影により試料の画像を入手する方法であって、前記試料を光ビームで走査するステップと、前記画像を導き出すために前記試料から発した光を検出するステップ

とを備える、方法。

【請求項 6】

前記光は検出される前に前記試料の中を通過する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記光は前記試料の一方側から入り、前記試料をその同じ側から離れる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料は索引付けされた位置へと回転され、前記試料における索引付けされた各位置で 1 回の完全な走査が行なわれる、請求項 5 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記検出器は、前記試料に入射する前記ビームと平行に前記試料から出射または前記試料を迂回する光を検出する、請求項 5 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記光はレーザ光である、請求項 5 から 9 のいずれかに記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

この発明は光学投影断層撮影に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

光学投影断層撮影とは、試料の 3 次元画像を生成する技術の 1 つであり、その一例が本出願人の W002/095476 明細書に開示されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

この発明は、特に蛍光画像化の場合において、一連の画像におけるノイズまたは干渉を抑制しかつ一連の画像での焦点深度を改良することを図りながら、試料に光を向ける異なる仕方を提供することを目的としてなされたものである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の概要

この発明の一局面に従うと、光学投影断層撮影により試料の画像を入手するための装置が提供され、この装置は、光走査手段と、索引付けられた位置であってその各々において上記試料が使用中に上記走査手段による入射光の走査動きに晒される位置へと上記試料を回転させるための回転ステージとを備える。

【0005】

上記入射光は、上記装置の中を通過する光により規定される光軸に対し垂直の方向で走査され得る。

【0006】

上記光走査手段は、共焦点走査顕微鏡の一部を形成し得る。

【0007】

この発明の別の局面に従うと、光学投影断層撮影により試料の画像を入手する方法が提供され、この方法は、上記試料を光ビームで走査するステップと、上記画像を導き出すた

めに上記試料から発した光を検出するステップとを備える。

【0008】

好ましくは、上記検出器は、上記試料に入射する上記ビームと平行に上記試料から出射またはこれを迂回する光を検出する。

【0009】

好ましくは、上記入射光はラスタパターンで走査され、上記試料における索引付けされた各位置で1回の完全な走査が行なわれる。

【0010】

この発明に従うと、この発明で用いられる標本は、先の特許出願に記載されたように、かつ/または当業者には周知である従来の病理学および組織学的技術および手順を用い、調製され得る。

【0011】

たとえば、原位置交雑（特にRNAの検出に有用）については、ハモンド K・L、ハンソン I・M、ブラウン A・G、レティス L・A、ヒル R・E（Hammond K L, Hanson I M, Brown A G, Lettice L A, Hill R E）、「哺乳類およびショウジョウバエダックスフント遺伝子は、Ski原腫瘍遺伝子に関係し、目および肢において表現される（Mammalian and Drosophila dachshund genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb）」、発生の機構（Mech Dev.）、1998年6月、第74巻（第1～2号）、121～31頁。

【0012】

免疫組織化学（特にタンパク質およびその他の分子の検出に有用）については、シャープ J、アールグレン U、ペリー P、ヒル B、ロス A、ヘックシャー・ゾーレンセン J、バルドック R、デービッドソン D（Sharpe J, Ahlgren U, Perry P, Hill B, Ross A, Hecksher-Sorensen J, Baldock R, Davidson D）、「3次元顕微鏡検査および遺伝子表現研究におけるツールとしての光学投影断層撮影（Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies）」、サイエンス（Science）、2002年4月19日、第296巻（第5567号）、541～5頁。

【0013】

この発明はこの発明の範囲を逸脱することなく変形可能であることが認められるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、この発明について添付の図面を参照して例により説明する。

【0015】

図面の詳細な説明

図1を参照して、この装置は光源1（レーザの形態をとる）を備える。光源1は光を2次元光走査手段2に供給する。光走査手段2の走査機構は二重鏡の系を有する。走査運動での光は像形成光学部品3を通して送り込まれる。光源1と走査手段2との間に置かれたダイクロミックミラー4は、返された光を高速光検出器5に向ける。構成要素1～5は共焦点光走査顕微鏡とすることができる。

【0016】

光学部品3からの光は試料6の中を通過する。試料6は回転ステージ7の中で回転させられ、上記ステージにより支持される。回転ステージ7の構造は、本出願人の同時係属の国際特許出願番号PCT/GB02/02373に開示された回転ステージに対応したものである。回転ステージ7は、索引付けされた連続的な位置であってその各々において試料の静止中に励起光での1回の完全な走査が行なわれる位置へと試料6を回転させる。光は試料6の中を通過した後、光学系8によって処理される。光学系8は、高速光検出器9からなる1次元または2次元アレイに光を向ける。

【0017】

蛍光モードにおいては、試料6からの光は、光学部品3および走査手段2を通り、そこ

から鏡 4 を介して高速光検出器 5 へ返される。この蛍光画像化方法においては、励起光は試料の一方側から入射し、これの同じ側で試料から出射して検出されることになる。図 1 のステージ 7 の右方に示す各構成要素が用いられるのは、下に記載の透過モードにおいてである。

【 0 0 1 8 】

顕微鏡光学部品 3 は、高開口数（図 2 a）を有していても、または低開口数（図 2 b）を有するよう適合されていてもよい。このうち後者は、画像化されるべき試料のいくつかにおいて有用である。

【 0 0 1 9 】

図 3 は公知の像形成システムを例示する。（試料内の）焦平面 1 2 上の任意の点からの光はレンズ 1 3 によって集光されて像平面 1 4 上の単一の点へと屈折される。ここでは対称性が存在するため、像平面 1 4 上のいずれの点も焦平面 1 2 上の或る点へと写像し、逆もまた当てはまる。

【 0 0 2 0 】

これとは対照的に、図 4、図 5 のこの発明の「非焦点」光学部品においては、像形成用の光学機構の必要性がなく、この光学部品は上記の例のような対称性を呈しない。非焦点光学系 8 の代表例として凸レンズ 1 5 を示す。焦平面 1 2 上の単一の点からの光は単一の光検出器に対して焦点合わせされず、光は発散されるため、入射ビームと平行に試料 6 から出射またはこれを迂回する光のみが、光軸上に位置付けられた単一の光検出器 9 a に到達する。図 4、図 5 のレンズ 1 5 の目的は図 3 と異なっており、光走査状況下で機能するものである。光ビームは試料全体にわたって多数の異なる位置（そのうち 5 つを図 5 の黒い矢印で示す）を通じて（たとえばラスタパターンで）走査される。非焦点光学系 8（すなわちレンズ 1 5）の目的は、光ビームの走査位置にかかわらず、入射光と平行に試料から出射またはこれを迂回する光を単一の光検出器 9 a に向けることである。このシステムによれば、顕著な光散乱を引起す試料の場合に、散乱光の検出を制限することによってより高い信号対雑音比を得ることが可能となる。

【 0 0 2 1 】

図 6 a ~ 6 d は元のビーム位置からの逸脱を示す例としての散乱を示し、（レーザビームから導き出された）光線が試料 6 から発せられて非焦点光学系の中を通過する間の光経路の或る代表例を示す。左方から試料に近づくビームは試料に入射するビームである。

【 0 0 2 2 】

図 6 a においては、試料 6 の中心における 1 点から散乱した光線は光検出器 9 a から離れるように発散される。検出される散乱光線の割合は、検出器の有効サイズを変えることで調整され得る。この制御は調整可能な絞りによって可能となる（これは共焦点走査顕微鏡におけるピンホールと極めて類似する）。これに代えて、レンズの位置を調整して散乱光線の発散をより大きくまたはより小さくしてもよい。光学像形成システムにおいては、エアリの円盤は、当該試料内の単一の点から発せられた光により生じる干渉パターンである。生じるエアリの円盤がより大きい光学システムほどその分解能は低くなるが、それは試料内の隣り合う点からのエアリの円盤同士が重なり合うからである。エアリの円盤の概念は、このような投影測定システムには厳密には当てはまらないが、類似の概念は存在する。ここに記載の非焦点光学部品の場合、投影がなされるたびにそこからの光によって広いエアリの円盤に類似した極めて広い強度分布が（検出器の位置に）生じ、これは分解能が低いことを示唆していると考えられる。しかしながら、任意の 1 時点においては単一の投影が測定されるのみであるため、極めて広い分布も互いに干渉することはない。

【 0 0 2 3 】

図 6 b において、図 6 a で標本化したのと同じ線上にある他の点から散乱した光線も光検出器 9 a から離れるように発散する。

【 0 0 2 4 】

図 6 c において、異なる走査位置（黒い矢印）からの非散乱光は、光軸と実質的に平行に試料 6 から発せられるため、光検出器 9 a へ向けて屈折される。図 6 a, 6 b と同様に

、散乱光は検出器 9 a から離れるように向けられる。

【0025】

図 6 d において、任意の走査位置からの非散乱光線は光検出器 6 に向けられる。レーザービームが光軸に対して垂直の方向で試料 6 全体にわたり走査される際の上記レーザービームの連続的な位置の代表例を矢印で示す。

【0026】

従来、光学投影断層撮影で行なわれてきた実験はいずれも、いくらかの光は散乱されるにもかかわらず、試料の屈折率は一様であると仮定しなければならなかった。しかし、最近の実験では、いくつかの重要な試料（生検の医学的な画像化を含む）の呈する屈折率は一様でないことがわかってきた。これはすなわち、現在のアルゴリズムでは試料が正確に画像化されておらず、歪みおよびアーチファクトが導入されてしまうことを意味している。しかし、ここに記載の装置によれば、以前は入手不可能であった当該試料からの光ビームの出射角に関する情報を測定することによって上記の問題が緩和される。一般的に、低散乱かつ屈折率の分布が一様でない試料の場合、ここに記載のシステムによれば、投影がなされるごとに経験される屈折の程度を測定することにより、上述のような一様でない分布を算出することが可能となる。

【0027】

この装置の使用時には、清澄剤（たとえば B A B B）を用いて大部分の光が散乱しないようにする。しかしこれは異なる形の妨害、すなわち屈折を受ける。図 7 において、散乱光を破線で示し、光の主経路を実線で示す。図 7 a の第 1 の例では、主経路は曲がらずに試料 6 の中を通過する（主経路はレンズの中を通過する際にのみ屈折する）。主経路は、試料において他の領域よりも高い屈折率の領域の中を通過する（灰色の円部分）が、異なる屈折率の領域間で主経路が遭遇する界面は両方ともこの光経路と垂直であるため、屈折は全く生じない。

【0028】

図 7 b の第 2 の事例では、照明ビームはこれより僅かに高いところにあり、したがって試料の灰色の領域および白色の領域（異なる屈折率）間で照明ビームが遭遇する界面は僅かに垂直からずれている。これに伴い、主経路に 2 つの僅かな屈折が生じ、このため光は試料から出てきたときにはもはや入射ビームと平行ではなく、元の中心の光検出器 9 a から僅かに脇へ向けられる。光補助検出器 9 b を中心の検出器 9 a のいずれかの脇に位置付ければ、これらの光補助検出器は屈折の程度を測定することができる。投影がなされると、光検出器アレイに沿っていくらかの強度分布が必ず生じることになる。この強度分布を用いることで、光の主経路が試料から出てきた角度を求めることができる。光の主経路が試料から出てきた角度を測定するには、システムはこの分布の中心（通常は最も強い強度）がどこにあるかを求めるだけでよい。図 7 c の最後の事例においては、走査位置を異ならせたのに伴いビームの屈折は大きくなっており、これは検出器アレイに沿ったさらなるシフトに反映されている。

【0029】

図 8 において、試料 6 内の長円形の領域は残りの領域よりも高い屈折率を有する（灰色の形状）。試料のまわりを通過する光線は屈折されず、中心の光検出器 9 a へ向けられる。試料の真中を通過する光線（図 8 では真中の 2 本の光線 1 1）は 2 回屈折される。光が通過する 2 つの界面（白色から灰色へ、そして灰色から白色へ）は互いに平行であり、したがって光線は試料に入射した同じ角度で試料から出射する。これらの光線もまた中心の検出器 9 a に向けられる。灰色の領域における他の部分を通過する光線もまた 2 回屈折されるが、その通過する界面は平行ではないため、これらの光線は隣接する光検出器 9 b によって検出される。

【0030】

屈折されるがなお入射光と平行に試料 6 から出射する光線がいくつかあるという事実は問題ではない。図 8 の例はこの切片を通じて取られる多数組の投影のうちただ 1 組を示すものである。完全な画像化は、このようなデータの組を上記切片を通じて多数の向きにつ

いて取得することを要し、このデータすべてを組合せることによって分布を完全に再構成することが可能である。

【0031】

図9～12はこの装置の3次元図を示す。図9では、試料の2次元断面を通るすべての非屈折（かつ非散乱）光線がアレイの中心の光検出器に対して焦点合わせされる。試料6は、索引付けされた位置であってその各々において完全な走査が行なわれる位置間で垂直軸まわりに回転される。

【0032】

図10は、散乱または屈折した光が光補助検出器に至る経路を示す。

【0033】

図11は、レンズ（または光学系）によって、検出器の1次元アレイ9が試料の完全な2次元ラスタ走査からデータを取得できるようになることを例示する。1行の走査位置は、走査の垂直高さにかかわらず常に下方または上方へ1行の検出器に向けられる。

【0034】

図12に示すように、光検出器9には1次元アレイの代わりに2次元アレイを用いてもよい。こうすれば、図12に示す光線が占める平面よりも上方または下方へ散乱または屈折した光を測定することが可能となる。

【0035】

先行技術に従う広視野の光学投影断層撮影においては、試料を通して適当な投影をしてそこからCCDの各画素が情報を記録することが求められる。広視野の蛍光光学投影断層撮影においては、試料の照明/励起もまた広視野でなければならないという事実から生じる問題が存在する。試料の光学特性で内部の光散乱が生じる場合、光子が試料から出射する際の軌跡によっては、光子を検出する画素が上記光子の由来する投影を表わしてはいないということがしばしば起きる。これにより画像にはかなりのノイズが加わる。ここに記載の光走査に関する発明によればこの問題は回避されるが、それはおよそその投影内の蛍光粒子のみが任意の1時点において励起されるからである。

【0036】

検出器アレイ9光学部品から導き出されたデータはアルゴリズムによって解釈される。

【0037】

後面投影の算出を実行するためには多くの異なるアルゴリズム手法が既に存在する。その1手法は、標準的な線形フィルタ補正後面投影アルゴリズムを使用するというものである（米国特許第5,680,484号など）。その他の手法としては、反復、最大エントロピーおよび代数再構成技術などが挙げられる（R.ゴードン（R. Gordon）他、「投影からの3次元再構成：アルゴリズムについての検討（Three-Dimensional Reconstruction from Projections: A Review of Algorithms）」）。

【0038】

アルゴリズムは以下のように働く。

【0039】

1. 後面投影の実行の際、データは平行（または扇型ビーム）データであるかのように使用される。これによって、試料の吸収特性の分布についての「ファジーな」推定値または、これに代えて試料の蛍光についてのファジーな分布が得られる。

【0040】

2. 屈折率の分布についての1番目の近似値が推定される。これはいくつかの仕方で行なうことができる。1つの有用な方法は、吸収または蛍光の分布が屈折率の分布を反映していると仮定するというものである。各々の断面の中で2次元勾配ベクトルが各ボクセルごとに算出される。これに代わる方法として一様またはランダムな分布から出発するものがある。

【0041】

3. 推定された屈折分布を用いて前方投影を実行する。すなわち、屈折分布の最初の推定値が正しかった場合に投影データがどのようなものとなるかについての予測を実行する

。

【0042】

4. 予測された投影と実際の投影とを比較する。

【0043】

5. 推定された屈折分布に変更を加える。予測と実際との差が大きい投影は、分布におけるどの領域により多くの変更が必要かを示す。たとえば、図8に示す灰色の形状の場合、長円における曲がった端部からの投影は屈折量が大きいため予測から大きく異なるであろう。したがってこの領域にあるボクセルについては、その予測屈折率は他の領域におけるよりも大きく変化する。

【0044】

6. 3～6のループを繰返し、予測投影がこれ以上向上できなくなるまで続ける。

【0045】

上述のアルゴリズム手法は、その他の光学信号、たとえば蛍光または散乱の解釈にも使用可能である。

【0046】

この発明はこの発明の範囲から逸脱することなく変形可能であることが認められるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】この発明の好ましい実施例を形成する装置の図である。

【図2】(a)および(b)は、この発明の装置の顕微鏡光学部品を、開口数が低くまたは高くなるように構成する仕方を示す図である。

【図3】公知の像形成光学部品を示す図である。

【図4】この発明の装置の光学系における或る像形成光学部品を示す図である。

【図5】この発明の装置の光学系における別の像形成光学部品を示す図である。

【図6】(a)、(b)、(c)および(d)にて、この発明の装置の光学系における光経路の代表例を示す図である。

【図7】(a)、(b)および(c)にて、異なる程度の屈折が光学系の働きに与える影響について説明する図である。

【図8】1次元検出器アレイを用いた屈折の測定の仕方について説明する図である。

【図9】光学系の働きを立体的に示す図である。

【図10】光学系の働きを立体的に示す図である。

【図11】光学系の働きを立体的に示す図である。

【図12】光学系の働きを立体的に示す図である。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/JP 03/03726
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50 G01N1/31 G01N21/17 G02B21/00		
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) IPC 7 G01N 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 practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02 095476 A (MEDICAL RES COUNCIL ;PERRY PAUL ERNEST (GB); SHARPE JAMES ALEXANDE) 28 November 2002 (2002-11-28) page 2 -page 20; claims; figures --- -/-	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 21 November 2003		Date of mailing of the international search report 19/12/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer GONCALVES M L F C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP 03/03726

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SHARPE J ET AL: "OPTICAL PROJECTION TOMOGRAPHY AS A TOOL FOR 3D MICROSCOPY AND GENE EXPRESSION STUDIES" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 296, 19 April 2002 (2002-04-19), pages 541-545, XP001152115 ISSN: 0036-8075 cited in the application *see also the supplemental data part of this article relating to "specimen staining " and "imaging" at www.sciencemag.org/cgi/content/full/296/5567/541/DC1* page 543; figure 1</p>	1-10
P,A	<p>SHARPE J: "Optical projection tomography as a new tool for studying embryo anatomy" JOURNAL OF ANATOMY 01 FEB 2003 UNITED KINGDOM, vol. 202, no. 2, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 175-181, XP002262076 ISSN: 0021-8782 the whole document</p>	1-10
A	<p>SHARPE JAMES: "OPT microscopy: A new approach for 3D microscopy and gene expression studies" FASEB JOURNAL, vol. 16, no. 5, 22 March 2002 (2002-03-22), page A1092 XP009021394 Annual Meeting of Professional Research Scientists on Experimental Biology;New Orleans, Louisiana, USA; April 20-24, 2002 ISSN: 0892-6638 abstract</p>	1-10
A,P	<p>KENG WEE TEIK., SHARPE J., FITZPATRICK D. R.: "Optical Projection Tomographic Examination of Miscarried Human Embryos" JOURNAL OF MEDICAL GENETICS (BRITISH HUMAN GENETICS CONFERENCE. YORK, ENGLAND, UK. SEPTEMBER 23-25), vol. 39, no. supplement 1, September 2002 (2002-09), page s23 XP009021392 ISSN 0022-2593 abstract</p>	1-10
X	<p>US 5 680 484 A (KIKUCHI SUSUMU ET AL) 21 October 1997 (1997-10-21) cited in the application abstract; claims</p>	1-10

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP 03/03726

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 30167 A (MEDICAL RES COUNCIL ;WHITE JOHN GRAHAM (US); AMOS WILLIAM BRADSHAW) 9 November 1995 (1995-11-09) abstract; claims; figures ---	1-10
A	US 5 724 171 A (AMOS WILLIAM BRADSHAW ET AL) 3 March 1998 (1998-03-03) abstract; claims ---	1-10
A	US 5 032 720 A (WHITE JOHN G) 16 July 1991 (1991-07-16) abstract; claims -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
JP/GB 03/03726

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 11, 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP 03/03726

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02095476	A	28-11-2002	WO 02095476 A2	28-11-2002
US 5680484	A	21-10-1997	JP 3327948 B2 JP 5341195 A	24-09-2002 24-12-1993
WO 9530167	A	09-11-1995	WO 9530167 A1	09-11-1995
US 5724171	A	03-03-1998	DE 69415519 D1 DE 69415519 T2 EP 0699308 A1 WO 9427167 A1 JP 3403408 B2 JP 8510550 T	04-02-1999 27-05-1999 06-03-1996 24-11-1994 06-05-2003 05-11-1996
US 5032720	A	16-07-1991	CA 1329255 C US 5144477 A	03-05-1994 01-09-1992

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA ,ZM,ZW

(74)代理人 100109162

弁理士 酒井 将行

(72)発明者 シャープ, ジェームズ・アレクサンダー

イギリス、イー・エイチ・3 8・ビィ・ゼット エディンバラ、ガードナーズ・クレセント、6 / 6

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA05 EA01 FA01 FA02 HA01 HA09 KA09 LA03
2G045 AA25 BA14 BB20 BB24 CB01 CB17 CB19 CB20 DA36 DA37
DA77 FA16 FB07 FB11 FB12 JA07