

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6512667号
(P6512667)

(45) 発行日 令和1年5月22日(2019.5.22)

(24) 登録日 平成31年4月19日(2019.4.19)

(51) Int.Cl. F 1
G 0 2 B 21/06 (2006.01) G 0 2 B 21/06

請求項の数 10 (全 13 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2016-537279 (P2016-537279) (86) (22) 出願日 平成26年8月27日 (2014. 8. 27) (65) 公表番号 特表2016-529558 (P2016-529558A) (43) 公表日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23) (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/068139 (87) 国際公開番号 W02015/028493 (87) 国際公開日 平成27年3月5日 (2015. 3. 5) 審査請求日 平成29年7月28日 (2017. 7. 28) (31) 優先権主張番号 1358226 (32) 優先日 平成25年8月28日 (2013. 8. 28) (33) 優先権主張国 フランス (FR)</p>	<p>(73) 特許権者 304032424 イマジン・オブテック フランス国、F-91400 オルセイ、 リュ・シャルル・ド・ゴール、18 (73) 特許権者 506316557 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ ルシュ シアンティフィック フランス国 75794 パリ セデック ス 16、リュ ミシェル - アンジュ 、3 (73) 特許権者 514234458 ユニヴェルシテ デ ボルドー フランス ボルドー リュ レオ セーニ ャ 146</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 側方照明顕微鏡システム及び顕微方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料の側方照明を使った、厚い試料(12)のための顕微鏡システム(100)であって、

- 試料ホルダーと、
- 検出光路と、
- 試料照明光路とを備え、

前記検出光路は、

- 所定の光軸()及び射出瞳(118)を持つ顕微鏡レンズ(120)と、
- 検出装置と、
- 顕微鏡レンズ - 試料ホルダー間の軸方向相対移動手段とを備え、

前記試料照明光路は、

- 照明ビーム(1)のための少なくとも一つの照明ビーム光源(101)と、
- 照明ビームから照明面を作る手段と、
- 偏向手段(125)と、
- 照明ビームの角度操作走査手段(111)とを備え、

前記検出装置は、前記顕微鏡レンズの対物空間において対象物画像面と光学共役である検出面(131)を持ち、

前記偏向手段は、前記顕微鏡レンズの出射部で前記対物空間内の前記照明面の向きを変えることができ、これにより、前記顕微鏡レンズの前記光軸とほぼ直行する平面内に横断

照明面（１２４）が形成され、

前記照明ビームの角度操作走査手段（１１１）により、前記横断照明面（１２４）を前記顕微鏡レンズの前記光軸に沿って移動することができ、

前記顕微鏡システムは、照明ビームの焦点を動かす手段（１０５）を備え、

前記照明ビームの焦点を動かす手段は、前記横断照明面を前記対象物画像面上で横方向に中央揃えすることができ、

前記照明ビームの焦点を動かす手段は、前記試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の軸方向相對移動手段からは分離した手段で構成されており、顕微鏡レンズ射出瞳面の光学共役面に配置されていることを特徴とする顕微鏡システム。

【請求項２】

請求項１に記載の顕微鏡システムであって、

前記照明ビームの焦点を動かす手段（１０５）は、可動焦点距離の光学システムと結びついた一定パワーの光学システムを備えることを特徴とする顕微鏡システム。

【請求項３】

請求項１又は２に記載の顕微鏡システムであって、

前記検出光路に配備した波面空間変調装置を更に備え、

前記波面空間変調装置は、前記試料と前記検出面との間の光学異常の少なくとも一部を修正することができることを特徴とする顕微鏡システム。

【請求項４】

請求項１から３のいずれかに記載の顕微鏡システムであって、

前記偏向手段は、前記試料ホルダーに固定されていることを特徴とする顕微鏡システム

【請求項５】

請求項１から４のいずれかに記載の顕微鏡システムであって、

前記照明面を作る手段は、光束を作成し前記光束を走査することを特徴とする顕微鏡システム。

【請求項６】

請求項１から４のいずれかに記載の顕微鏡システムであって、

前記照明面を作る手段は、円柱レンズを備えていることを特徴とする顕微鏡システム。

【請求項７】

顕微鏡に適用する側方照明装置であって、

- 照明ビーム（１）のための少なくとも一つの照明ビーム光源（１０１）と、
- 照明ビームから照明面を作る手段と、
- 試料ホルダー及び偏向手段と、
- 照明ビームの角度操作走査手段（１１１）と、
- 照明ビームの焦点を動かす手段とを備え、

前記顕微鏡は、

対象物画像面を持つ顕微鏡レンズと、

顕微鏡レンズ - 前記試料ホルダー間の軸方向相對移動手段と、

検出装置とを備え、

前記偏向手段（１２５）は、

前記試料ホルダーに固定されており、

前記顕微鏡レンズの出射部で対物空間内の前記照明面の向きを変えることができ、これにより、前記顕微鏡レンズの光軸とほぼ直行する平面内に横断照明面（１２４）が形成され、

前記照明ビーム走査手段（１１１）により、前記横断照明面（１２４）を前記顕微鏡レンズの前記光軸に沿って移動することができ、

前記照明ビームの焦点を動かす手段（１０５）は、前記横断照明面（１２４）を前記対象物画像面上で横方向に中央揃えすることができ、

10

20

30

40

50

前記照明ビームの焦点を動かす手段は、前記試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の軸方向相対移動手段からは分離した手段で構成されており、顕微鏡レンズ射出瞳面の光学共役面に配置されており、

前記検出装置は、前記顕微鏡レンズの前記対物空間において前記対象物画像面と光学共役である検出面を持つことを特徴とする側方照明装置。

【請求項 8】

試料の側方照明を使って、試料ホルダーに置いた厚い試料 (1 2) を顕微する方法であって、

- 少なくとも一つの照明ビーム (1) を照射するステップと、
 - 照明ビームから照明面を作成するステップと、
 - 所定の光軸 () 及び射出瞳 (1 1 8) を有する顕微鏡レンズを用いて前記試料内で前記照明面の焦点合わせをするステップ、及び顕微鏡レンズが作った照明面を偏向するステップと、

- 顕微鏡レンズにより、試料の一部領域の画像を作成するステップと、
 - 照明ビームを走査するステップと、
 - 照明ビームの焦点を動かすステップとを具備し、

前記顕微鏡レンズが作った照明面を偏向するステップにより、前記顕微鏡レンズの光軸とほぼ直行する平面内に横断照明面 (1 2 4) の形成が可能となり、

前記試料は、検出装置 (1 3 0) の検出面 (1 3 1) 上で、前記横断照明面により照明されており、

前記照明ビームを走査するステップにより、前記顕微鏡レンズの光軸に沿った前記横断照明面 (1 2 4) の移動が可能となり、

前記焦点合わせ手段は、「試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の相対移動手段」からは分離した手段により構成されており、

前記照明ビームの焦点を動かすステップは、前記横断照明面を前記対象物画像面上で横方向に中央揃えすることができ、

前記中央揃えは、前記試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の軸方向相対移動手段からは分離した手段で構成され、顕微鏡レンズ射出瞳面の光学共役面に配置されている手段を用いて行い、

前記対象物画像面は、前記顕微鏡レンズの対物空間において前記検出面と共役であることを特徴とする顕微方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の顕微方法であって、

空間変調装置を用いて、前記試料と前記検出面との間の光学異常の少なくとも一部を修正するステップを更に含むことを特徴とする顕微方法。

【請求項 10】

請求項 8 又は 9 のいずれかに記載の顕微方法であって、

前記照明ビームから照明面を作成するステップは、光束の作成及び前記光束の走査を含んでいることを特徴とする顕微方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、側方照明顕微鏡システム及び顕微方法に関する。

【背景技術】

【0002】

光学顕微鏡により、自然環境下における生体細胞の追跡が可能である。既知の顕微鏡技術の例として、厚さの薄い生体試料の直接観察を可能とする蛍光顕微鏡や、より厚い試料の画像生成ができる共焦点レーザ走査顕微鏡やマルチフォトン顕微鏡 (非線形) などがある。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

近年、試料の側方照明を基礎とした厚い試料のための蛍光顕微鏡装置が開示され、これらは光シート照明顕微鏡あるいはSPIM (Single-plane illumination microscope: 単一面照明顕微鏡) として知られている。SPIM顕微鏡は、顕微鏡レンズの光軸を横断する試料平面を選択的に照明するように構成されており、深部撮像のために試料の光学断面を作り出すことができる。このような装置の開示例として、米国特許出願2011/0304723; ベッセルビーム照明を実装したもの、R. Jorand他の論文(「厚く不均一な試料深部の鮮明な光学画像処理」Plos One Volume 7 Issue 4 (2012); 画質向上のために、SPIM技術と検出光路上の適応光学ループとを組み合わせたもの)、F. Zanacchi他の論文(「厚い生物試料の生細胞3D超高解像度画像処理」Nature Methods / Vol. 8 No. 12 (2011); SPIM技術を超高解像度顕微鏡に適用したもの)、Gebhart他の論文(「生体哺乳類細胞のDNAに結合する転写因子の単分子画像処理」Nature Methods DOI: 10.1038/NMETH_2411 (2013); 平行軸上にある二つの顕微鏡レンズと偏向ミラーの配置について提案するもの)などがある。

10

【0004】

しかしながら従来のSPIMには必ず、試料に近い位置に二つの顕微鏡レンズを置くことが要求される。すなわち、光シートで照明された試料の縁と検出平面との間の光学共役を確実にするため、検出光路上の通常の顕微鏡レンズに加えて、試料照明光路上の第2のレンズが必要となる。つまり試料内の光シートの焦点合わせを確実にするために、それぞれ独立した二つの光路、すなわち照明光路と検出光路とが形成される。しかしこの制約により、実装上の機械的複雑さが著しく増加し、標準的な顕微鏡が使用できず、使用するレンズの開口数に制限が課されることになる。

20

【0005】

本発明は、特に独創的な光シート焦点合わせ制御を有する、側方照明顕微鏡システムと顕微方法を提案し、照明光路と検出光路において単一の顕微鏡レンズの使用を可能とするものである。

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

第1の態様では本発明は、試料の側方照明を使った、厚い試料のための顕微鏡システムに関するもので、試料ホルダーと、検出光路と、試料照明光路とを有する。

【0007】

検出光路は、所定の光軸を持つ顕微鏡レンズと、検出装置と、「試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の軸方向相対移動手段」を有する。この検出装置は検出面を持っており、この検出面は顕微鏡レンズの対物空間において対象物画像面と光学共役である。

【0008】

試料照明光路は、少なくとも一つの照明ビーム光源と、この照明ビームから照明面を作る手段と、前記顕微鏡レンズと、偏向手段と、照明ビーム走査手段とを有する。この偏向手段は、顕微鏡レンズの出射部で対物空間内の照明面の向きを変えることができる。これにより、顕微鏡レンズの光軸とほぼ直行する平面内に横断照明面を形成することができる。またこの照明ビーム走査手段により、横断照明面を顕微鏡レンズの光軸に沿って移動することができる。

40

【0009】

第1の態様の顕微鏡システムは更に、焦点合わせ手段を有する。この焦点合わせ手段は、対象物画像面と横断照明面とを重ね合わせることができ、「試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の相対移動手段」からは分離した手段で構成される。

【0010】

以下で詳述するように、対象物画像「面」と横断照明「面」は、正確には幾何学的意味

50

での面ではない。そうではなくてむしろ、できる限り厚さ（顕微鏡レンズの光軸に沿った長さ）を薄くした平行六面体のことである。

【0011】

「対象物画像面」と「横断照明面」の「重ね合わせ」は、二つの正六面体の中央平面を単一の同一面にすることと、これらを互いに横方向に中央揃えすることからなる。

【0012】

このような顕微鏡システムの構成により、単一の顕微鏡レンズを有するSPIM型システムにおいて、顕微鏡レンズの対物空間の横断照明面又は「光シート」の位置を次のように制御することが可能となる。すなわち、顕微鏡レンズの光軸方向に沿う顕微鏡レンズと試料ホルダーとの相対位置とは無関係に、横断照明面又は光シートの位置が、レンズの対象物画像面上に重ね合わされた状態を維持するような制御である。

10

【0013】

一つの変形例において、焦点合わせ手段は、検出光路に配備した波面空間変調装置を備える。別の変形例において、更にこの波面空間変調装置は、試料と検出面との間の光学異常の少なくとも一部を修正することができる。

【0014】

焦点合わせ手段はまた、照明ビームの焦点を動かし、横断照明面を対象物画像面上で横方向に中央揃えする手段を備えていてもよい。試料内で光シートが大きく移動する場合、この手段は特に有用である。

【0015】

この照明ビームの焦点を動かす手段は、例えば、可動焦点距離の光学システムと結びついた一定パワーの光学システムを備えていてよい。

20

【0016】

一例では、偏向手段を試料ホルダーに固定することができる。これは、「試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の軸方向相対移動手段」が、試料ホルダーの軸方向移動手段を備える場合、特に有用である。この場合試料ホルダーが移動すると、それに伴って偏向手段も移動する。

【0017】

第2の態様では本発明は、次のような顕微鏡に適用する側方照明装置に関する。すなわち「対象物画像面を持つ顕微鏡レンズ」と「試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の軸方向相対移動手段」と「対象物画像面と光学共役な検出面を持つ検出器」とを備えるような顕微鏡である。

30

【0018】

第2の実施態様によるこの照明装置は、少なくとも一つの照明ビーム光源と、この照明ビームから照明面を作る手段とを有する。この照明装置は更に、試料ホルダーと、試料ホルダーに固定された偏向手段とを備える。この偏向手段は、顕微鏡レンズの出射部で照明面の向きを変え、顕微鏡レンズの光軸とほぼ直行する平面内に横断照明面を形成することを意図している。第2の実施態様によるこの照明装置はまた、照明ビーム走査手段と、照明ビームの焦点を動かす手段を備える。この照明ビーム走査手段により、横断照明面を顕微鏡レンズの光軸に沿って移動することができる。また、この照明ビームの焦点を動かす手段により、横断照明面（124）を対象物画像面上で横方向に中央揃えすることができる。

40

【0019】

この装置により、広い分野における従来の蛍光顕微鏡を、簡単に側方照明顕微鏡システムに変更することができる。偏向手段が備えられた試料ホルダーは、使用後に廃棄可能な部品とすることができ、通常の試料ホルダーの代わりとなる。

【0020】

有利には、側方照明装置は、ビームスプリッタ又は二色性フィルタを用いて顕微鏡に組み込むことができる。照明装置は予め顕微鏡の一部として形成してもよいし、後から追加してもよい。

50

【 0 0 2 1 】

第3の態様では本発明は、試料の側方照明を使って、試料ホルダーに置いた厚い試料を顕微する方法であって、以下のステップを具備する。

- 少なくとも一つの照明ビームの照射
- 照明ビームからの照明面の作成
- 所定の光軸を有する顕微鏡レンズを用いた試料内における照明面の焦点合わせ、及び顕微鏡レンズが作った照明面の偏向（この偏向により、顕微鏡レンズの光軸とほぼ直行する平面内に横断照明面の形成が可能となる）
- 前記顕微鏡レンズによる、試料（この試料は、検出装置の検出面上で、横断照明面により照明されている）の一部領域の画像作成
- 照明ビームの走査（この走査により、顕微鏡レンズの光軸に沿った横断照明面の移動が可能となる）
- 焦点合わせ手段（この焦点合わせ手段は、「試料ホルダー - 顕微鏡レンズ間の相対移動手段」からは分離した手段により構成される）による、対象物画像面（この対象物画像面は、顕微鏡レンズの対物空間において検出面と共役である）と横断照明面の重ね合わせ

10

【 0 0 2 2 】

一つの変形例において、対象物画像面と横断照明面の重ね合わせは、照明ビームの焦点を動かすステップを含んでいてよい。この焦点を動かすステップにより、横断照明面を対象物画像面上で横方向に中央揃えすることが可能となる。

【 0 0 2 3 】

一つの変形例において、対象物画像面と横断照明面の重ね合わせは、照明面により照明された試料領域から放射された波面の、波面空間変調ステップを含んでいてよい。この波面空間変調ステップにより、対象画像面と照明面は単一の同一面にすることができる。

20

【 0 0 2 4 】

一つの変形例において、照明ビームからの照明面の作成は、光束の作成及びこの光束の走査を含んでいてよい。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

本発明のその他の利点や特徴は、以下の図面を用いた説明から読み取ることができる。

【 0 0 2 6 】

【 図 1 A 】 図 1 A は、典型的な実施形態における本発明の側方照明顕微鏡システムを示す略図である。

【 図 1 B 】 図 1 B は、図 1 A のタイプの顕微鏡システムの焦点合わせを更に詳細に示す略図である。

【 図 2 】 図 2 は、顕微鏡レンズの対物空間の Z 軸に沿った光シートの移動を示す略図である。

【 図 3 】 図 3 A から 3 C は、試料の照明ビームを焦点合わせを 3 段階で行う様子を示す略図である。

【 0 0 2 7 】

一貫性を持たせるために、異なる図面で、同じ要素は同じ符号で識別する。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 8 】

図 1 A と 1 B は、典型的な実施形態における本発明の側方照明顕微鏡システム 1 0 0 を表す。図 1 B は、システムの一部であって図 1 A の点線で囲った部分を更に詳細に表す図である。

【 0 0 2 9 】

図 1 A と 1 B の例において顕微鏡システム 1 0 0 は、照明光路と検出光路とを有する。これらの光路は、板 1 1 0（例えば二色性フィルタ又はビームスプリッタ）により分離されており、共通部分に顕微鏡レンズ 1 2 0 を備える。

【 0 0 3 0 】

30

40

50

顕微鏡システムは更に、試料ホールド手段12を備える。この試料ホールド手段12は、板10と「試料ホルダー-顕微鏡レンズ間の相対移動手段」(図示しない)とを備え、画像化したい領域をカバーすることができる。ホルダー移動手段は、例えばモータ駆動プラットフォーム(図示しない)やピエゾ電気プラットフォームを備え、顕微鏡レンズ又は板10(この板10の上には、試料12を置くことが意図されている)のいずれかを移動することができる。この移動は、顕微鏡レンズの光軸()と直行するXY平面内の移動、及び顕微鏡レンズの光軸()と平行なZ軸に沿った移動である。図では顕微鏡システムはXZ平面で描かれている。XZ平面は、顕微鏡レンズの対物空間の基準座標系である。すなわちXZ平面は、試料12の板10の表面と直行し、顕微鏡レンズの光軸を含む。

【0031】

検出光路は、画像化したい試料の領域を、検出手段130の検出面131上に結像することを意図している。検出手段130の例としては、EMCCD(Electron Multiplying Charge Coupled Display: 電子増倍CCD)型のカメラなどのマトリクス検出器がある。検出光路は、顕微鏡レンズ120を備える。顕微鏡レンズは、例えば無限遠焦点光学配置で機能することを意図している。すなわち最適条件では、F点(顕微鏡レンズの対物空間(「対象物画像面」と呼ばれる)の中心)から放射されたビーム2は、対物レンズの出射部において無限遠にコリメートされたビームとなる。検出光路はまた、検出面上で画像を結像する光学要素、例えばレンズ132や偏向手段134を備える。

【0032】

照明光路は、試料照明ビーム1のための一つ又は複数の光源101を備える。有利にはこの光源は、例えばシングルモードファイバで導いた空間コヒーレント光源、例えばレーザー光源などである。本発明のある実施形態では、複数の光源を与えることができる。これにより例えば異なる波長の照明ビームを形成し、例えばこれを蛍光体に適用することで異なる蛍光の励起を実現することができる。またPALMに適用することで光活性化(Photo-activation)や、光交換(photo-conversion)や、蛍光たんぱく質の励起などを実現することができる。光源からの光は、レンズ103により、コリメートされたビームにすることができる。

【0033】

試料照明光路は更に、照明ビームから照明面を作る手段を備える。これらの手段は、非常に簡単には、開口数の小さいレンズ(例えばレンズ103)を備えていてもよい。これは、面を作るための走査手段(例えばロータリーミラー111によって得られる)と連携して、所定の回折長の光束を作ることができる。選択的には光束を作るために、特定の光学要素(例えば、アキシコン型の非回折光学素子や、ベッセルビーム型ビームを作るために使われる素子など)を使うことができる。一般に照明面は、以下に詳述するように、回折長と直接関連した厚さを持つだろう。照明面を作る手段はまた、小開口数のレンズ又は非回折光学素子と組み合わせた円柱レンズを備えていてもよい。これにより走査手段を省くことができる。

【0034】

照明光路は更に顕微鏡レンズ120(図1Bでは収束レンズで表す)を備え、その射出瞳を118で表す。図1AにおいてPで表した平面は、顕微鏡レンズ120の射出瞳118面の共役面である。一方のレンズ107, 109と他方のレンズ113, 115は、照明ビームの伝達、及び瞳面Pの共役を確実にするためのリレーレンズである。

【0035】

顕微鏡レンズ120の対物空間には、試料12と偏向手段125とがある。顕微鏡レンズと偏向手段で形成した構成により、顕微鏡レンズの光軸とほぼ直行する平面126内の横断照明面124に、照明面を結像することができる。

【0036】

横断照明面の長さや厚さは、照明光路のパラメータによって決まる。例えば図1Bの基準座標系を取ったとき、顕微鏡レンズの対物空間における照明面のY方向の長さは、与え

10

20

30

40

50

られた照明光路の光学系に応じて、照明ビームのY方向の走査の幅が、又は円柱レンズの非点収差の大きさによって決まる。照明面のX方向の長さ及び(Z軸に沿った)厚さは、レンズ入射部における励起ビームの大きさと、顕微鏡レンズの焦点距離とに直接関係する。「照明面の厚さ」という表現は、Z軸上における回折像の主ローブの大きさという意味に理解されるべきである。しかしベッセル型照明ビームの場合、この表現は、回折像のこの主ローブに集中した光エネルギーと、副ローブに分散したエネルギーとの比率も意味する。従って、薄い横断照明面、すなわち典型的には対象物画像面の厚さ(これ自体は顕微鏡レンズの被写界深度によって決まる)と同じオーダの厚さの横断照明面が走査された場合、それより著しく厚い照明面を得た場合に比べて、X軸上でより短い横断照明面が得られるだろう。典型的には、 $\times 100$ で開口数 $NA = 1.3$ の顕微鏡レンズの場合、被写界深度は $1\ \mu\text{m}$ より浅い。横断照明面の長さは典型的には、X方向で $10\ \mu\text{m}$ と $50\ \mu\text{m}$ との間、Y方向で約 $100\ \mu\text{m}$ にすることができる。すべての場合において、横断照明面124の中心点123は、X軸上の最良焦点位置、Y軸上の幾何学的中心位置に一致するものとして定義することができる。図1Bの例では、中心点123は顕微鏡レンズ120の対物焦点Fに一致している。

【0037】

偏向手段は例えば、顕微鏡レンズの光軸に対して 45° 傾いたマイクロミラーを備える。この偏向手段は、開口数の大きな顕微鏡レンズに対応した大きさである必要がある。Y軸上(図1B参照)の反射面の大きさは、使用する顕微鏡レンズの視野とほぼ同等であることが好ましい。 45° 傾いた軸上における有用な反射面の大きさは、有利には顕微鏡レンズの視野の四分の一から半分の間である。従って高倍率($60\times$ 又は $100\times$)レンズの場合、反射面の大きさは $50 \times 200 = 10000\ \mu\text{m}^2$ のオーダとすることができ、これは低倍率($10\times$ 又は $20\times$)レンズの場合の5倍の大きさである。反射面の周長は反射面の大きさと同じオーダである必要がある。顕微鏡レンズが作った照明ビームを反射できるようにするために、偏向手段の有効面は、顕微鏡レンズの有効領域に置く必要がある。

【0038】

好適な偏向手段は、原子間力顕微鏡針(Gebhart他の論文を参照)のホルダー(又は「カンチレバー」)により、顕微鏡レンズの光軸に対して 45° 傾いた所に形成することができる。これはまた構造プレート(例えば公開番号US7974003の特許出願)を備えていてもよい。ある変形例において偏向手段は、本明細書の以下で説明するように、試料ホルダーに固定されるように設計されている。

【0039】

照明光路はまた、走査手段111を備える。これにより横断照明面124は、照明ビーム1に連動して、顕微鏡の光軸に沿って移動することができる。

【0040】

図2は、本発明の顕微鏡システムにおける、横断照明面の軸方向の移動を表す。

【0041】

図2に示すように、顕微鏡レンズ124の光軸に沿った(すなわちZ軸に平行な)横断照明面124の移動は、入射照明ビーム1の角度走査によって効果的に実現することができる。この角度走査により、ビームは横移動(図2ではX軸方向の移動)することになる。入射ビームが顕微鏡レンズの対象物空間内の偏向手段125上で反射された後、この横移動は照明面の軸方向移動に反映される。有利には、この角度走査の回転軸は、顕微鏡の瞳の光学共役面内にある。顕微鏡レンズの空間内で、変位Zとビームの角度変化とを結びつける関係は $Z = f \times \theta$ である。ここでfは顕微鏡レンズの焦点長である。この表式は角度が小さいとき、すなわち角度のタンジェントがその角度自体で近似できるとき成り立つ。こうして図2では、ビーム1の回転がビーム1'を作り出し、これが横断照明面の変位Zにつながる。この回転は照明光路の走査手段111によって得られる。この走査手段111は、例えば回転レンズを具備する。この回転レンズにより、ビームのX方向の移動(これは照明面の軸方向移動を生み出す)が可能となり、選択的にはY方向

10

20

30

40

50

の移動（これは照明ビームを走査することにより、照明面を生み出す）も可能となる。この回転レンズは例えば、複数のガルバノメトリックシステムの組み合わせ、複数の一軸MEMSミラーの組み合わせ、又は単一の二軸MEMSミラーなどであってよい。これら二つの回転を作るために二つの異なるミラーが使われる場合、これらの二つのミラーの二つの回転軸は光学共役であることが好ましい。

【0042】

このような走査手段のおかげで、顕微鏡の光軸に沿って横断照明面124を移動して試料を精査することができる。図2に示されるように、横断照明面124を移動すると、試料が照明される領域は、顕微鏡レンズの対象物の作業面（例えば対象物の焦点面）から外れ、検出面とも共役でなくなる。本明細書の顕微鏡システムは、焦点合わせ手段を有する

10

【0043】

移動が小さい場合（典型的には顕微鏡レンズの被写界深度の10分の1より小さい場合）、移動の結果生じる検出光路上の焦点外れは、単純に検出面を動かすことで修正できる。焦点合わせ手段は、検出面の軸方向移動手段にまで減らすことができる。焦点合わせ手段は、検出光路に備えられた波面空間変調装置を備えていてもよい。この空間変調装置は、焦点合わせを修正するために移動された単一の光学レンズ（例えばレンズ132）、あるいは可変パワーの光学システム（液晶弁、可変ミラーなど）を備えていてもよい。焦点

20

【0044】

しかしながら移動が大きい場合、横断照明面は、顕微鏡レンズの設計上の対象物作業面（例えば対象物焦点面）から外れてしまう。このように横断照明面が設定から大きく離れてしまうと、著しい光学的逸脱のみならず開口数の変化が生じる。そこで有利には、焦点合わせ手段は、照明光路上に、照明ビームの焦点を動かす手段105（図1A参照）を備える。これにより、横断焦点面124を対象物画像面上で横方向に中央揃えできる。

【0045】

図3Aから3Cは、一例において、照明ビームの焦点を動かす手段105を実装した本

30

【0046】

図3Aは前に説明した図1Bに相当するもので、ビーム1は顕微鏡レンズの対象物作業空間において、横断照明面124という形（例えば対象物焦点面）で焦点合わせされる。この構成では、試料から放射されるビーム2（例えば試料の蛍光）は、顕微鏡レンズの射出部において検出光路の無限遠にコリメートされ、検出装置の検出面上で完全に焦点合わせされる。こうして横断照明面と対象物画像面は、顕微鏡レンズの対物空間において共役となり、この空間において重ね合わされる。

【0047】

図3Bは、試料の横断照明面を移動するために、ビーム1を（顕微鏡レンズの画像空間において）走査する場合を示す。走査後のビーム1（ビーム1'で表す）により、横断照明面を初期位置からz移動させたときのオフセット124'を作ることができる。顕微鏡の対象物作業面内で横断検出面124'の位置を変えるために、顕微鏡レンズの光軸に沿って試料と顕微鏡レンズとの間の相対移動が行われる。こうして、図3Bにおける横断照明面124'は、顕微鏡レンズからのZ軸方向の距離に関して、図3Aにおける横断照明面124と同じ位置（すなわち顕微鏡レンズの対象物作業面）に置かれる。そして試料から放射されるビーム2は再び、顕微鏡レンズの射出部において、検出光路の無限遠にコリメートされ、検出装置の検出面上で完全に焦点合わせされる。しかしながら図3Bに示されるように、試料と顕微鏡レンズとの間の軸方向の相対移動は、横断照明面の横方向の移動を引き起こす。このように、横断焦点面の中心点に一致する最良焦点位置123は、

40

50

顕微鏡レンズの光軸からずれる。このずれは、顕微鏡レンズと試料との間の軸方向相対移動の結果生じたものである。換言すると、対象物画像面と横断照明面とは完全に同一面内にあるが、中心がずれている。照明ビームの焦点を動かす手段105は、図3Cに示すように、横断焦点面124を対象物画像面上に横方向に再度中央揃えすることを可能とする。

【0048】

照明ビームの焦点を動かす手段105は例えば、可変焦点レンズ（例として、Vari optic（登録商標）、Optotunes（登録商標）、Polight（登録商標）、あるいはLens Vector（登録商標）型の可変焦点レンズ）、又は単一（又は複数）の可動レンズからなるレンズ、又は実際に変形可能なレンズや液晶弁などを備える。

10

【0049】

有利には、照明ビームの焦点を動かす手段105は、顕微鏡レンズ射出瞳面の光学共役面に配置する。この面は一般に顕微鏡レンズの画像焦点面である。このようにすることで、照明ビームの焦点面を変更しても、顕微鏡レンズ瞳面におけるビームサイズは変わらず、従って照明面の厚さも変わらない。

【0050】

本発明の一つの実施例において、照明ビームの焦点を動かす手段105は、可変焦点レンズシステムに結合された一定パワーのシステムの組み合わせであってよい。この一定パワーのシステムは、平均焦点距離を補償するために使ってもよい。この平均焦点距離は、偏向手段の使用に関係し、対物空間（試料空間）におけるレンズの視野半径に概ね一致する（典型的には、100xのレンズの場合40μmから60μm）。照明ビームの焦点を動かす手段105は、ユーザが望む深度の画像領域をカバーできるよう、その能力が調整可能である。例えば試料の観察で深さ方向50μmの視野が望まれる場合、照明ビームの焦点を動かす手段105は、平均焦点面の前後で少なくとも50μmのZ方向の移動を許容するようなものを選ぶことができる。

20

【0051】

本発明の一つの実施例において、検出光路は、この検出光路上で（光学画像システム及び試料自身が原因となって）発生する光学収差を修正する装置を備えていてよい。この光学収差修正装置は、例えば変形可能なミラーを備える。これは、光学異常分析装置（例えばシャックハルトマン型）により制御することができる。この光学収差修正装置は、前記のように焦点調整のために使うこともできる。点描型（PALM/STORM/SPT）3D顕微鏡においては、この光学収差修正装置をPSF形成のために使うこともでき、その結果PSF像と放射粒子のz上位置との間に全単射関係を確立することができる（例えば特許出願FR2971693に記載）。

30

【0052】

ここで記述した顕微鏡システムを用いて、試料の深さ方向にわたる多数の連続面内画像を作ることにより、単一の顕微鏡レンズで大量の画像を生み出すことが可能となる。

【0053】

本発明の側方照明装置により、三次元顕微鏡システムの形成のために、既知の二次元画像用顕微鏡システムを適用することも可能となる。典型的には、既知の二次元画像用顕微鏡システム（広い分野における顕微鏡）は、「対象物画像面を持つ顕微鏡レンズ」と「試料ホルダ - 顕微鏡レンズ間の軸方向相対移動手段」と「対象物画像面と光学共役な検出面を持つ検出器」とを備える。

40

【0054】

側方照明装置は有利には、少なくとも一つの照明ビーム光源と、この照明ビームから照明面を作る手段と、試料ホルダー及びこの試料ホルダーに固定された偏向手段と、照明ビーム走査手段と、照明ビームの焦点を動かす手段とを備える。偏向手段は、顕微鏡レンズの出射部で照明面の向きを変え、顕微鏡レンズの光軸とほぼ直行する平面内に横断照明面を形成することを意図している。照明ビーム走査手段により、横断照明面を顕微鏡レンズ

50

の光軸に沿って移動することができる。照明ビームの焦点を動かす手段により、横断照明面を対象画像面上で横方向に中央揃えすることができる。これらの全ての手段は、側方照明顕微鏡システムに関連して、上記で説明されている。

【0055】

変形例として、試料ホルダーと試料ホルダーに固定された偏向手段は、適用先の顕微鏡のための照明装置を備える。これら試料ホルダーと偏向手段は、通常使われる試料ホルダーの代わりとして使われる。

【0056】

本発明で記述された側方照明装置と顕微鏡システムは、すでに光シート横断照明技術の利点の恩恵を受けたあらゆる顕微鏡技術に対して、また特に、広範囲の蛍光顕微鏡と点描型(PALM/STORM/SPT)高解像度顕微鏡に対して応用可能である。これら二つのタイプの顕微鏡においては、光シート横断照明により、光学的「切断」効果(対象物の縁だけが照明される)が得られる。更に、画像の縁だけが照明されるため、検出信号のより良好な信号対雑音比が得られる。従って画像面のいずれの側にも試料層に起因する迷光が発生せず、各分子のより深部における結像が可能となる。この顕微鏡システムはまた、非線形顕微鏡、その他の構造化照明顕微鏡法(Structured Illumination Microscopy)SIMにも適用できる。

10

【0057】

いくつかの典型的な実施形態を通して記述したが、本発明による顕微方法及びこの方法に使われる装置は、異なるバリエーション、変形、改良などを含む。これらのバリエーション、変形、改良が、請求項で規定される本発明の範囲内にあることは、当業者にとって明らかだろう。

20

【図1A】

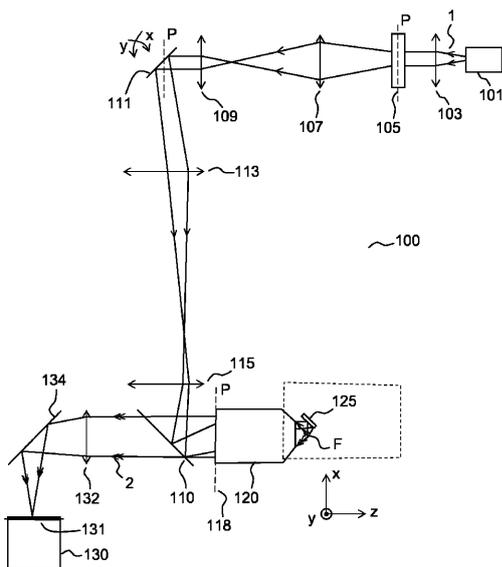


FIG.1A

【図1B】

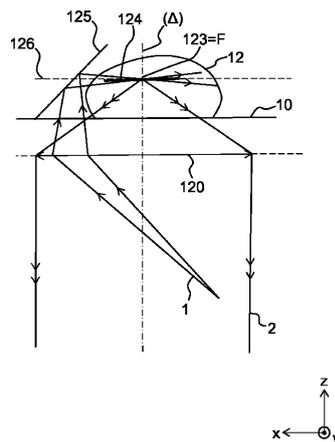


FIG.1B

【 図 2 】

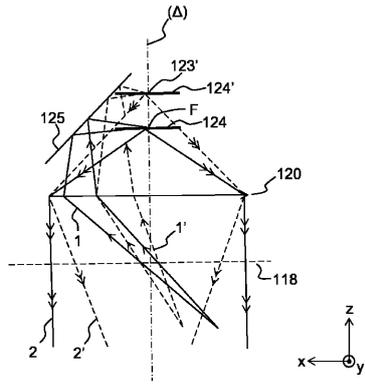
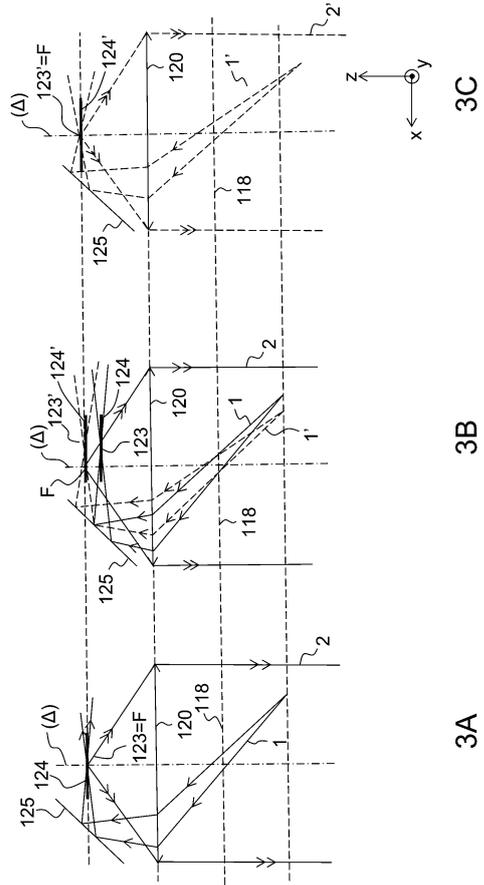


FIG.2

【 図 3 】



3A

3B

3C

フロントページの続き

- (74)代理人 100105924
弁理士 森下 賢樹
- (72)発明者 レベック、ザビエル
フランス国 エフ - 9 1 1 9 0 ジフ - シュル - イヴェット、アリー デ ラ ガンパウデリー
1 6
- (72)発明者 ヴィアスノフ、ヴァーギル
フランス国 エフ - 9 2 1 7 0 ヴァンヴ、アヴェニュー ヴィクター ヒュゴ 1 6
- (72)発明者 シバリタ、ジャン - バプティスト
フランス国 エフ - 3 3 4 0 0 タランス、リュ バヤード 2 9
- (72)発明者 スチューダー、ヴィンセント
フランス国 エフ - 3 3 0 0 0 ボルドー、リュ セオドア ドゥコス 1 3
- (72)発明者 ガランド、レミ
フランス国 エフ - 3 3 6 0 0 ベサック、アパートメント ビー 2 0 2、リュ ヘルマン レ
モイン 7

審査官 殿岡 雅仁

- (56)参考文献 特開2013 - 097380 (JP, A)
特開2013 - 003585 (JP, A)
特開平11 - 326860 (JP, A)
特開2011 - 133580 (JP, A)
特表2015 - 523602 (JP, A)
特開2006 - 030991 (JP, A)
特開2012 - 108491 (JP, A)
特表2013 - 506153 (JP, A)
米国特許出願公開第2011 / 0261446 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 2 B 2 1 / 0 0 - 2 1 / 3 6
G 0 1 N 2 1 / 6 2 - 2 1 / 7 4