

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5992913号  
(P5992913)

(45) 発行日 平成28年9月14日 (2016.9.14)

(24) 登録日 平成28年8月26日 (2016.8.26)

(51) Int. Cl.	F I		
<b>GO 2 B 21/06 (2006.01)</b>	GO 2 B	21/06	
<b>GO 2 B 21/36 (2006.01)</b>	GO 2 B	21/36	
<b>GO 1 N 21/64 (2006.01)</b>	GO 1 N	21/64	E
	GO 1 N	21/64	G

請求項の数 12 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2013-535491 (P2013-535491)	(73) 特許権者	510162850
(86) (22) 出願日	平成23年10月25日 (2011.10.25)		ユニベルシテ パリ ディデローパリ 7
(65) 公表番号	特表2013-542466 (P2013-542466A)		フランス国, エフ-75205 パリ セ
(43) 公表日	平成25年11月21日 (2013.11.21)		デ 13, リュ トマス マン, 5
(86) 国際出願番号	PCT/FR2011/052482	(74) 代理人	100106002
(87) 国際公開番号	W02012/056160		弁理士 正林 真之
(87) 国際公開日	平成24年5月3日 (2012.5.3)	(74) 代理人	100120891
審査請求日	平成26年10月16日 (2014.10.16)		弁理士 林 一好
(31) 優先権主張番号	1058913	(74) 代理人	100165157
(32) 優先日	平成22年10月28日 (2010.10.28)		弁理士 芝 哲央
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100126000
			弁理士 岩池 満
		(72) 発明者	フォル エマニュエル
			フランス国 エフ-94230 カジャン
			リュ デ ラ ソンム 11
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動的光学顕微鏡法により試料からの発光を観察する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

屈折率  $n_L$  を有する媒質 (11) 中の試料 (10) の光の放出 (14, 15) を観察する方法であって、前記試料は、 $n_L$  よりも高い屈折率  $n_s$  を有する透明の支持体 (20) の表面 (20a) 上に載置され、前記光の放出は、所定の振幅及び位相の複数の発光成分を含み、前記支持体に向けられ、前記表面 (20a) に垂直な方向 (20b) に対して角度を形成し、該複数の発光成分のうち、一方は、角度が臨界角  $c = \arcsin(n_L / n_s)$  より大きい超臨界発光成分であり、他方は、それぞれ角度が臨界角  $c$  より小さい又は臨界角  $c$  と等しい、臨界発光成分又は亜臨界発光成分であり、

前記方法は、

前記試料上の一つの観察対象領域から前記光の放出の少なくとも一部を捕捉し、前記光の放出の前記超臨界発光成分から生じる発光成分を含む一つの捕捉発光信号を得ること、一つのフィルタリングされた発光信号を取得するために、選択的に、所定の発光成分の前記振幅を減衰するように、及び/又は前記位相を変更するように、複数のフィルタ (170) を該捕捉発光信号に適用すること、

該フィルタリングされた発光信号を、前記試料上の前記観察対象領域の一つの画像域に変換すること、ができる観察装置 (100) を実行し、

前記方法は、

前記フィルタリングされた発光信号の一つの変調を実行すること、そこでは、前記試料上の同一の観察対象領域の複数の画像域 (6a、6b) を取得するために、該光の放出の

前記臨界発光成分又は亜臨界発光成分から生じる発光成分は、通過することが許容され、前記変調は、前記光の放出の前記超臨界発光成分から生ずる前記捕捉発光信号の前記発光成分の全て又は一部に関連している、

前記複数の画像域（6 a、6 b）を結合することにより前記試料の少なくとも一つの有効画像域（6 c）が生成され、該結合により、前記変調に関連する前記複数の画像域（6 a、6 b）間の差異を強調すること、を特徴とする、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記変調の対象である、前記捕捉発光信号の前記発光成分は、試料中の調査される深さの範囲に対応する所定の範囲内である前記角度の前記光の放出の前記超臨界発光成分から放出されることを特徴とする、方法。

10

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の方法であって、前記観察装置（1 0 0）を用いて得られる、結合されることによって前記試料の前記有効画像域（6 c）を生成する前記複数の画像域（6 a、6 b）は、複数のフィルタ（1 7 0）を、前記捕捉発光信号に連続的に適用することにより連続的に得られることを特徴とする、方法。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法であって、

a) 前記観察装置（1 0 0）及び、各フィルタが、複数の画像域のうち一つの画像域を取得するためにそれぞれ用いられる、複数のフィルタ（1 7 0）を用いて、前記試料上の同一の観察対象領域の前記複数の画像域を取得する手順であって、

20

前記複数のフィルタは、

該複数のフィルタのうち一つのフィルタが、前記フィルタリングされた発光信号中の、前記光の放出の前記超臨界発光成分から生じる発光成分の通過を許容し、

該複数のフィルタの全てが、前記光の放出の前記臨界発光成分又は亜臨界発光成分から生じる、前記捕捉発光信号の発光成分を通過し、かつ、前記光の放出の前記臨界発光成分又は亜臨界発光成分から生じる前記捕捉発光信号の前記発光成分について、該複数のフィルタ間で、互いに実質的に同一となるように動作し、

該複数のフィルタが、光の放出の前記超臨界発光成分から生じる捕捉発光信号の発光成分のうち少なくとも一部の振幅又は位相について、該複数のフィルタ間で、互いに実質的に異なるように動作する、少なくとも 2 つのフィルタ、である、手順と、

30

b) 手順 a) で取得した複数の画像域を結合する演算によって、前記試料の有効画像域を生成し、前記試料の前記複数の画像域の画像域同士の差異を強調する手順と、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法であって、

a) 前記観察装置と、各フィルタが、該 2 つの画像域のうち一つの画像域を取得するためにそれぞれ用いられる、2 つのフィルタとを用いて、前記試料上の一つの同一の観察対象領域から、少なくとも 2 つの画像域を取得する手順であって、

前記 2 つのフィルタは、

該 2 つのフィルタのうち一つのフィルタが、前記フィルタリングされた光信号のうち、前記光の放出の前記超臨界発光成分から生じる発光成分の通過を許容し、

40

他方のフィルタが、前記光の放出の前記臨界発光成分又は亜臨界発光成分から生じる捕捉発光信号の前記発光成分について、前記一つのフィルタと実質的に同一となるように動作し、前記光の放出の前記超臨界発光成分から生じる前記捕捉発光信号の前記発光成分の少なくとも一部について、前記一つのフィルタよりも振幅を実質的に減衰させる、ように構成される、手順と、

b) 手順 a) で取得した前記 2 つの画像域を結合する演算によって、前記試料の前記有効画像域を生成する手順であって、前記演算は、前記試料の前記 2 つの画像域間の算術的な差分を含む、手順と、を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 6】

50

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法であって、用いられる前記複数のフィルタは、前記光の放出の前記臨界発光成分と亜臨界発光成分とから生じる前記捕捉発光信号の前記発光成分の全て又は一部の振幅を部分的に減衰させることを特徴とする、方法。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法であって、前記光の放出の発光成分から生じる前記捕捉発光信号の、同じ角度を形成する複数の発光成分は、一つの同一のフィルタで、実質的に同様に、振幅の減衰又は位相の変更がなされることを特徴とする、方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法であって、観察対象となる前記試料上の現象が所定の特性時間を有する場合、該特性時間の半分以下の間隔で、複数の画像域を連続的に取得することを特徴とする方法。

10

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法であって、前記試料の前記複数の画像域のうち一つの画像域は、前記フィルタリングされた光信号のうち、前記光の放出の超臨界発光成分から生じる捕捉発光信号の全ての前記発光成分を、振幅を減衰させずに通すことを許容されているニュートラルフィルタを用いて取得され、

前記試料の前記複数の画像域のうち他方の画像域は、前記フィルタリングされた発光信号中の、前記光の放出の前記超臨界発光成分から生じる捕捉発光信号の全ての前記発光成分を相殺する一つのトータルフィルタを用いて取得されることを特徴とする方法。

20

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法であって、前記観察装置(100)は、フルフィールドの油浸レンズ(110)を含み、前記複数のフィルタ(170)は、該油浸レンズの後焦点面(400)及び/又は該後焦点面の共役面(420)に位置することを特徴とする、方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、前記複数のフィルタ(170)は一つの絞り(176)を含み、該絞りは、開放位置にあるとき、前記光の放出の前記超臨界発光成分から生じる前記捕捉発光信号の発光成分の通過を許容し、且つ、前記絞り(176)の閉鎖の程度に応じて、該閉鎖の程度に対応する限界値よりも大きい角度を有する、前記光の放出の前記超臨界発光成分から生じる前記捕捉発光信号の前記発光成分を覆うことを許容することを特徴とする、方法。

30

【請求項 12】

請求項 1 から 11 のいずれかに記載の方法であって、観察対象となる前記試料は生物試料であることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動的光学顕微鏡法により試料からの発光を観察する方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

試料からの発光は、散乱又は蛍光に起因する。蛍光顕微鏡法は、蛍光現象を利用して、様々な化合物を観察する技術である。蛍光特性は、一部の物質が有する、自ら蛍光を放射する特性である。

【0003】

観察対象の化合物の蛍光特性には、その化合物自身が蛍光性である(クロロフィル、油等)一次蛍光と、蛍光色素や蛍光マーカーと呼ばれる蛍光性物質により観察対象の化合物をマーキングした二次蛍光とがある。

【0004】

50

特に細胞生物学においては、細胞接着、原形質膜上のレセプターへのホルモン結合、神経伝達物質の分泌、及び膜ダイナミクス（エンドサイトーシス、エキソサイトーシス）等、細胞表面において発生する多数の分子事象を、蛍光顕微鏡法により観察する。

【0005】

蛍光顕微鏡装置は、通常、励起用の光源と、放出光子から励起光子を分離する手段と、光子を捕捉するレンズ系とを含み、更に、撮像手段も含むのが一般的である。

【0006】

蛍光技術は、様々な種類の顕微鏡で用いることができる。具体的には、試料又はレンズを励起光が通過する従来型の光学顕微鏡（後者の場合は落射蛍光顕微鏡となる）、レーザー走査等によって試料の三次元画像化が可能な共焦点顕微鏡、エバネッセント波で、試料基板（通常はガラス）と、試料が配置された液状媒質（通常は水）との界面に近接し、極めて浅い深度で蛍光を励起する全内部反射蛍光顕微鏡（TIRF）、等である。超臨界角で入射するレーザー光を照射することにより、エバネッセント波（界面に対して直交に、指数関数的に減少する）を形成する。

【0007】

近年急速に普及しているTIRF顕微鏡法は、精密な観察を可能にするが、欠点もある。この用途に適したレーザー光源は高額であり、また、生成された励起場が均質でない場合がある（光線のコヒーレンスによる干渉のため）。また、レンズによる照射では均質な励起を行うことができず、結果として、観察対象の範囲全体において、透過深度が一定でなくなる。更に、細胞により散乱された固有光に関連する励起場の閉じ込め損失がある。

【0008】

仏国特許第2943428号には、屈折率 $n_s$ を有する透明な支持体上に載置された、屈折率 $n_L$ を有する液体媒質中の、蛍光成分を含む試料を、蛍光顕微鏡法により観察する方法が開示されている。屈折率 $n_s$ は $n_L$ よりも大きく、かつ1.55以下である。観察装置は、開口数ONが1.33以上かつ $n_s$ 以下のフルフィールドの液浸レンズと、以上の画像面に画像を形成するための一連のレンズと、上記液浸レンズの後焦点面又は後焦点面の共役面に配置され臨界角 $\theta_c$ 以下の角度 $\theta$ 方向で試料の蛍光発光成分をマスキングするマスクと、を含み、ここで $\theta_c = \arcsin(n_L/n_s)$ であり、角度 $\theta$ は、観察対象の試料が載置された上記支持体の表面の垂直方向に対する蛍光発光の方向の角度である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

この観察方法によれば、低コストの装置により高画質な蛍光画像を得ること、又は、TIRF顕微鏡法で得られる画像の画質を向上させることが可能になる。

【0010】

上記の装置及び方法によれば、高解像度で高品質な画像を得ることができる。それでもなお、解像度の向上が求められるケースも考えられる。

【0011】

本発明の目的は、若干の変更にかかるコストのみで、画像の解像度を大幅に向上させる新たな方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明により課題を解決する手段は、屈折率 $n_L$ を有する媒質中の試料からの光の放出を観察する方法であって、試料は、 $n_L$ よりも高い屈折率 $n_s$ を有する透明の支持体の表面上に載置され、発光は、所定の振幅及び位相を有し、支持体に対して配向され、かつ、表面に対し垂直な方向に角度 $\theta$ を形成する、複数の発光成分からなり、複数の発光成分のうち、一方は、角度 $\theta$ が臨界角 $\theta_c = \arcsin(n_L/n_s)$ より真に大きい超臨界角発光成分であり、他方は、角度 $\theta$ が臨界角 $\theta_c$ より小さい又は臨界角 $\theta_c$ と等しい臨界角発光成分又は亜臨界角発光成分であり、

10

20

30

40

50

前記方法は、観察装置を用いて、

試料上の観察対象領域からの発光の少なくとも一部を捕捉し、発光の超臨界角発光成分から生じる発光成分を含む捕捉光信号を得ることと、

捕捉光信号にフィルタを適用することにより、選択的に所定の発光成分の振幅を減衰、及び/又は位相を変更してフィルタリング済み光信号を得ることと、

フィルタリング済み光信号を、試料上の観察対象領域の画像域に変換することと、を可能とする方法であって、

前記方法は、

フィルタリング済み光信号の変調を可能にし、変調において、発光の臨界角発光成分又は亜臨界角発光成分から生じる発光成分を通すことにより、試料上の同一の観察対象領域の画像域が得られ、発光の超臨界角発光成分から生じた捕捉光信号の発光成分のうち少なくとも一部が、変調の対象となることと、

複数の画像域を結合することにより試料の有効画像域が少なくとも一つ生成され、結合によって、変調に係る複数の画像域間の差異を強調することと、を特徴とする、方法。

【0013】

試料が発する光は、蛍光（適正な励起による）、又は散乱によるものである。発せられた光の一部は、観察装置により捕捉され、フィルタリングの後、画像域に変換される。

【0014】

試料の観察対象領域とは、観察の対象となる試料上の部位である。観察対象領域は、拡張又は分割可能である。後者の場合、試料を走査してより大きな画像を再構成できる。画像域とは、試料上の観察対象領域の画像である。つまり、画像域は、試料全体の画像であってもよく、試料の一部の画像や、試料上の一点の画像であってもよい。試料上の同一の観察対象領域から得られた画像域に対し、変調が行われる。

【0015】

本発明の装置によれば、より高い解像度の顕微画像が得られ、例えば、生物材料の研究に有用な情報が得られる。

【0016】

このような解像度の向上は、臨界角又は亜臨界角で試料が発した光から生じる成分の全体又は一部を除外した光信号、つまり、試料から超臨界角で発光された光から生じる成分が多く含まれる信号、を直接操作する方法（仏国特許第2943428号に記載の方法）により実現されるものではなく、試料から超臨界角で発光された光から生じる成分に信号変調を行うことで間接的に操作することにより実現される。この方法が間接的というのは、つまり、画像域の元領域における光信号を変調して生成した画像域間の差異を強調した有効画像域を得るために、試料から複数の画像域を取得して、その後結合する手順を必要とすることからである。

【0017】

上記変調は、発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分の全て又は一部に対して行われ、有効画像域における超臨界角発光成分は、上記結合によって増強される。一方、臨界角又は亜臨界角で試料が発した光から生じた捕捉光信号の成分は、上記変調の対象にならず、有効画像域における臨界角発光成分又は亜臨界角発光成分は、上記結合によって減弱される。上記結合は、復調と見なしてもよい。このようにして、有効画像域においては、変調された超臨界角発光成分の寄与度が示される。

【0018】

変調は、捕捉光信号の発光成分の振幅及び/又は位相に影響し得る。つまり、用いられているフィルタが、光波の振幅及び/又は位相を変更する。本明細書内で、フィルタに関連して「作用する」という場合、振幅及び/又は位相を変更することを指す。2つのフィルタが異なる作用をすると言った場合、「変調を行う」ことを意味する。振幅の変更は、ある程度大きな減衰であってよく、完全な遮光に至ってもよい。用いられるフィルタの一部（全てではない）は、作用を持たないニュートラルフィルタであってよく、この場合、フィルタリング後に得られる光信号は捕捉光信号と同一ではあるが、「フィルタリング後

10

20

30

40

50

の信号」と呼ぶ。発光成分を「通す」と言った場合、フィルタリングの後、減衰（振幅の低下）又は位相の変化の有無にかかわらず、発光成分が残存していることを示す。

【0019】

カメラ等のセンサを用いて形成された他の画像と同様に、画像域は、フィルタリング後の光信号の係数の二乗に対応する光度情報を含む。

【0020】

特に、発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉信号の全ての発光成分を変調した場合（図7の説明（後述）を参照）には、得られる有効画像域の解像度は、仏国特許第2943428号に開示された方法で取得される画像域と比較して約20～25%の割合で向上できる。

10

【0021】

有効画像域を得るための画像域の取得は、例えば、取得光信号を分割して、分割後の各信号にフィルタを適用するなどして、同時に行ってもよい。または、画像域を逐次的に取得してもよい。この場合、その後、光信号を取得し、逐次的にフィルタを適用することで、変調が行われる。このようにして得られたフィルタリング後の光信号のそれぞれに対して、画像域が格納される。

【0022】

この方法では、少なくとも1つの有効画像域が得られるが、観察装置とフィルタで許されている限り、必要に応じて何度でも行い、所定の間隔で複数の有効画像域を得てもよい。試料上の複数の点に対応する画像域を取得すれば、試料の空間的走査が可能となる。

20

【0023】

本発明は、特に、屈折率 $n_s$ を有する支持体と屈折率 $n_L$ を有する媒質との間の界面に位置する領域で、画像域の高感度な取得を可能にする。この界面から所定の深度の領域に至るまでの領域で発生する事象を可視化することが可能である。ガラスと水との界面（およそ $n_L = 1.33$ 、 $n_s = 1.51$ ）では、上記深度は波長の6分の1、ただし発光のうち、急角度の発光成分（超臨界角発光成分）のみを捕捉する場合にはそれ以下となり、可視領域の波長では50nm（ナノメートル）～100nm程度となる。

【0024】

顕微鏡法、特に蛍光顕微鏡法で広く用いられる支持体はガラス製であり、このガラスは、屈折率が1.55以下の低コストの従来型のガラスから選択しても良く、より高い屈折率を有するガラスでもよい。

30

【0025】

蛍光色素は、信号を伝達できるアンテナの役割を果たす。この伝達物質の近接範囲（数十ナノメートル）には、均質な媒質上ではエバネッセントである電磁成分が配置される。この電磁成分は、蛍光色素が界面近くに位置したときに光を伝播するように挙動する。その後、屈折率が最大となった媒質内で、臨界角よりも大きい角度で光を伝播する。

【0026】

図5aは、支持体20と液体媒質11との間の界面に位置する伝達物質12による蛍光発光の発光成分を示したものである。

【0027】

伝達物質12による蛍光発光には、 $0 \sim \theta_c$ の間である角度 $\theta$ で発せられる発光成分14と、 $\theta_c$ よりも大きい角度 $\theta$ で発せられる発光成分15（「ノーライト」又は「超臨界光」という）と、が含まれる。発光成分15は、液状媒質11に含まれ、透明な支持体20で光を伝播するよう挙動するエバネッセント成分に対応する。

40

【0028】

例えば、ガラスと水との界面では、超臨界光は、発光された全光量の3分の1程度の光量に達し得ることが分かった。

【0029】

臨界角の値は、スネルの屈折の法則 $\theta_c = \arcsin(n_L/n_s)$ により求められる。液体が水（ $n_L = 1.33$ ）であり、支持体が一般的なガラス（ $n_s = 1.52$ ）の

50

場合、 $\theta_c$  は  $61^\circ$  となる。

【0030】

図5bは、より離れた約100nmに位置する伝達物質12による蛍光発光の発光成分を示したものである。

【0031】

発光には、 $0 \sim \theta_c$  の間である角度で発せられた同一の発光成分14が含まれているが、超臨界光に対応する、 $\theta_c$  以上の角度で発せられた発光成分は含まれないことが分かった。

【0032】

本発明の方法によれば、超臨界光に含まれる情報を取得することで、構造についての情報と、液体媒質/支持体の界面から深度100nmにおいて起こり得るその進展についての情報とを含む有効画像域を生成できる。

【0033】

レンズの開口数ONは、 $ON = n \cdot \sin(\theta_{max})$  で定義される。ここで、 $n$  はレンズの動作環境の指標であり、 $\theta_{max}$  はレンズの最大集束角である。

【0034】

現在は、油浸 ( $n = 1.51$ ) の、開口数の高いレンズが開発され、市販されている。このようなレンズのONは、例えば1.45や1.49等である。最大集束角は臨界角 $\theta_c$  よりも大きい。したがって、これらのレンズによれば、超臨界光の大部分を捕捉できる。これらのレンズは、高画質のフルフィールドの画像が得られるよう、球面収差及び色収差について補正されることが望ましい。

【0035】

本発明の実施形態において、本発明は以下の性質のうち少なくとも1つを備えている。

上記変調の対象となる捕捉光信号の発光成分は、角度 $\theta$  が、試料のうち調査対象となる深度の範囲に対応する所定の範囲内であるような、発光の超臨界角発光成分から発せられる。

観察装置を用いて得られ、結合によって、試料の有効画像域を生成する複数の画像域は、捕捉光信号に連続的にフィルタを適用することで連続的に得られる。

本方法には、次の手順が含まれてよい。

a) 観察装置及び複数のフィルタを用いて、試料上の同一の観察対象領域から、複数の画像域を取得する手順であって、各フィルタは、複数の画像域のうち1つの画像域を取得するためにそれぞれ用いられ、複数のフィルタは、

+ 複数のフィルタのうち1つのフィルタが、フィルタリング済み光信号のうち、発光の超臨界角発光成分から生じる発光成分を通し、

+ 複数のフィルタの全てが、発光の臨界角発光成分又は亜臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分を通し、かつ、発光の臨界角発光成分又は亜臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分に対して、互いに略同一の作用を持ち、

+ 複数のフィルタのうち少なくとも2つのフィルタが、発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分のうち少なくとも一部の振幅又は位相に対して、互いに異なる作用を持つように構成される。

b) 手順a) で取得した複数の画像域を結合する演算によって、試料の有効画像域を生成し、試料の複数の画像域の画像域同士の差異を強調する。

本方法には、次の手順が含まれてよい。

a) 観察装置及び2つのフィルタを用いて、試料上の同一の観察対象領域から、少なくとも2つの画像域を取得する手順であって、各フィルタは、2つの画像域のうち1つの画像域を取得するためにそれぞれ用いられ、2つのフィルタは、

2つのフィルタのうち1つのフィルタが、前記フィルタリング済み光信号のうち、発光の超臨界角発光成分から生じる発光成分を通し、

他方のフィルタが、発光の臨界角発光成分又は亜臨界角発光成分から生じる、前記捕捉光信号の発光成分に対し、一のフィルタと略同一の作用を持ち、発光の超臨界角発光成

10

20

30

40

50

分から生じる、捕捉光信号の発光成分の少なくとも一部について、一のフィルタより著しく振幅を減衰させるように構成される。

b) 手順 a) で取得した2つの画像域を結合する演算によって、試料の有効画像域を生成する手順であって、演算は、試料の2つの画像域間の代数差を含む。

用いられるフィルタは、発光の臨界角発光成分及び亜臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分の全て又は一部の振幅を部分的に減衰させる作用も有する。

前記発光の発光成分から生じる捕捉光信号の、同じ角度  $\theta$  を形成する複数の発光成分は、同一のフィルタで、略同様に、振幅の減衰又は位相の変更がなされる。

試料の示す、観察対象となる現象が、所定の特性時間を有する場合、特性時間の半分以下の間隔で、連続して複数の画像域を取得する。

10

試料の画像域のうち1つが、フィルタリング済み光信号のうち、発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の全ての発光成分を、振幅を減衰させずに通すニュートラルフィルタを用いて取得され、試料の他方の画像域は、フィルタリング済み光信号のうち、発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の全ての発光成分を相殺するトータルフィルタを用いて取得される。

観察装置は、フルフィールドの液浸レンズを含み、前記フィルタは、油浸レンズの後焦点面及び/又は後焦点面の共役面に位置する。

フィルタは絞りを備え、絞りは、開放位置においては発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の全ての発光成分を通すことができ、又、その絞りの程度に応じて、絞りの程度に関連する限界値よりも大きい角度  $\theta$  を有する、発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分をマスキングできる。

20

観察対象の試料は生物試料である。

#### 【0036】

特定の実施形態では、変調は、発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の全ての発光成分には影響しない。変調は、角度  $\theta$  が所定の範囲内、例えば、 $[\theta_a, \theta_b]$  間である発光成分にのみ適用される。ここで  $\theta_a$  及び  $\theta_b$  は、 $\theta_c$  よりも真に大きい。これにより、試料上の対応する範囲を調査できる(図1の説明を参照)。

#### 【0037】

他の実施形態では、本方法は、a) 変調後の複数の光信号に対応する複数の画像域を取得する手順を含む。変調のためには、用いられるフィルタのうち少なくとも1つが、発光の超臨界部から生じる発光成分を通すよう構成されていることが必要である。また、その他のフィルタが、捕捉光信号の超臨界角発光成分の全て又は一部に対し、1つのフィルタとは異なる作用を与えるよう構成されていることが必要である。ここで「異なる」とは、フィルタが、処理される発光成分の振幅をより強く、又はより弱く、減衰させることを意味する。また、位相に対する作用の違いであってもよい。振幅に対する作用と位相に対する作用は組み合わせてよい。

30

#### 【0038】

その一方で、これらのフィルタは、発光の臨界部又は亜臨界部から生じる発光成分に対しては略同一の作用を有さなくてはならない。フィルタによって、発光の臨界部又は亜臨界部から生じる発光成分を変更して画像域を得てよいが、有効画像域を生成するためには、加えられる変更は、結合される全ての画像域について略同一である必要がある。ここで「略同一」とは、特定の実施形態においては差異がないが、他の実施形態においては、望ましい変調(発光の超臨界角発光成分から生じる発光成分の変調)から若干の差異があってもよいことを意味する。フィルタリング済み光信号には、発光の臨界角発光成分又は亜臨界角発光成分から生じる発光成分が残っていることが望ましい。

40

#### 【0039】

本方法は、b) 手順 a) で取得した複数の画像域を結合する手順を含む。この結合は、光量に基づいた演算により行われる。この演算は、用いられるフィルタに基づき、変調に起因する画像域間の差異を強調するものである。

#### 【0040】

50



複数の画像域を取得する方法のメリットは、例えば演算に平均値を導入することで、バックグラウンドノイズを低減できることである。

【0041】

例えば、試料上の同一の観察対象領域から、3つ連続で画像域を取得してよい。このうち1つ目の画像域は、捕捉信号の超臨界部から生じる全ての発光成分についての情報を含む、試料の画像域である。つまり、用いられたフィルタはこれらの発光成分を大きく変更していない。このうち2つ目の画像域は、捕捉信号の超臨界部から生じる発光成分についての情報を含まない画像域である。つまり、用いられたフィルタはこれらの発光成分をマスキングしている。3つ目の画像域は、1つ目の画像域と同一の条件で取得される。これら3つの連続した画像域の結合としては、まず1つ目と3つ目の画像域の平均、その後、2つ目の画像域との差異の絶対値を算出する方法が考えられる。これにより、有効画像域中のノイズ（光脱色、励起強度の変化、試料の移動）を低減できる。

10

【0042】

これらの画像は、電界全体の（正の）強度についての情報が含まれる。2つの画素間の差異は正でも負でもあり得るため、有効画像域の強度を示す正の結果を得るためには絶対値を用いることが必要である。

【0043】

別の特定の実施形態では、手順a)で、試料上の同一の観察対象領域から、2つの画像域が取得される。1つ目の画像域は、発光の超臨界部から生じる発光成分を通すよう構成されたフィルタで取得される。2つ目の画像域は、捕捉信号の超臨界成分の全て又は一部に対し、1つ目のフィルタとは異なる作用をし、かつ、捕捉信号の臨界成分又は亜臨界成分に対しては、1つ目のフィルタと略同一の作用をするフィルタで取得される。手順b)で、各画素に対して、2つの画像域間の差異の絶対値を算出することにより、2つの画像域が結合される。この結果が、有効画像域の強度を示す。この実施形態のメリットは、画像域の結合が簡易であるため、演算がより簡易、かつ高速に行えることである。

20

【0044】

特定の実施形態では、2つの画像域において同様に、発光の臨界角発光成分及び亜臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分の全て又は一部を減衰させてよい。これは、亜臨界角光線から発せられる光が、超臨界角光線から発せられる光に比べて非常に強い場合に重要な処理である。

30

【0045】

一般的に、用いられるフィルタは、発光の発光成分から生じる捕捉光信号の、同じ角度を形成する複数の発光成分を、回転対称性を考慮し、略同様に処理する。実際には、発光した光の成分のアジマス角を調整することには、大きな意義はない。一方、アジマス角を調整しない場合には、有効画像域に非点収差が導入されることを妨げる。

【0046】

試料が、特性時間で経時変化する場合（細胞膜等）には、特性時間の半分よりも短い間隔（ビデオフレームレート）で、連続する画像域（試料を深さ方向に表す）を取得することで、この変化を観察する。この方法により、通常、連続する画像域と同じ速度で、有効画像域（試料の界面を表す）を取得できる。つまり、仏国特許第2943428号のようにビデオフレームレートの半分ではなく、このビデオフレームレートで取得が可能である。

40

【0047】

レンズの後焦点面及び/又は後焦点面の共役面に絞りを追加するのは容易であり、市販の顕微鏡にも適用可能である。これにより、装置の改善のためのコストを削減できる。

【0048】

絞りは、絞りの開口度に応じた、特定の角度以上の角度 方向において、試料からの発光の発光成分から生じた捕捉光信号の発光成分をマスキングする働きをもつ。図5a及び図5bは、蛍光発光の性質を表した図である。本方法のメリットは、結合に用いられる画像域で、亜臨界の情報が必ず得られることである。この情報は、試料の最深部と関連して

50

おり、しばしば有益である。

【図面の簡単な説明】

【0049】

本発明のその他の特徴及び利点については、図面を参照し、発明を限定しない例としての以下の実施形態を通じて説明する。

【図1】図1は、本発明の方法を実施できる顕微鏡装置の模式図である。

【図2】図2は、図1に示した装置の本発明による変形例で、共焦点顕微鏡法に適した装置を表す図である。

【図3】図3は、図1に示した装置の本発明による変形例で、TIRF顕微鏡法に適した装置を表す図である。

【図4】図4は、本発明の方法を実施するためのフィルタの例を表す図である。

【図5】図5a及び5bは、異なる構成における蛍光発光成分を表す図である(上述)。

【図6】図6a及び6bは、発光の臨界角発光成分及び亜臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分がある場合とない場合の、同一の細胞の画像域をそれぞれ表す図である。図6cは、図6a及び6bに示す画像域を結合して得られた、上記の細胞の有効画像域である。

【図7】図7は、同一の実験試料から得られた染色部の光量をグラフで表した図である。一方は仏国特許第2943428号に記載の方法(臨界要素又は亜臨界要素をマスキング)によるもの、他方は本発明の方法(超臨界要素を変調した後、復調)によるものである。

【発明を実施するための形態】

【0050】

説明を明確にするために、図面中に描かれた要素は、必ずしも実際の寸法のとおり比率となっていない。図面内で、同じ参照番号は同じ要素を指す。

【0051】

図1は、蛍光顕微鏡装置100の模式図である。蛍光顕微鏡装置100は、ONが1.33以上である液浸レンズ110を備える。液浸レンズ110の上方に、ガラス支持体20が配置されている。液浸レンズ110とガラス支持体20との間に油が介在している。

【0052】

観察対象の試料10は、ガラス支持体20の上に配置される。この試料10は、例えば、水中に分散された蛍光発光成分を含む。

【0053】

レンズの後焦点面を参照番号400で示す。励起光は、光源からの光線200により生成され、励起フィルタ210を通った後、ダイクロイックミラー120により反射され、透明の支持体20を通過し試料10に照射される。入射する励起光の光路の一例が、図の上部に向かう矢印により示されている。入射する励起光を、部分的に反射した後、発光フィルタ130でフィルタリングすることにより、像面に形成される画像に、試料10から発行された蛍光のみが含まれるようにしてもよい。

【0054】

試料10から発せられた蛍光は、透明の支持体20と、ダイクロイックミラー120と、発光フィルタ130とを通過する。

【0055】

図1に図示された実施形態では、この光はミラー140に反射され、装置の残りの部分ではこの反射光を処理することになる。

【0056】

レンズ150はチューブレンズと呼ばれるレンズで、光を中間像面410に集束させることができる。

【0057】

その後、この光はレンズ160によって平行化され、レンズ180によって像面430に集束される。画像はここで、カメラ300などの適切な装置により取得される。像面4

10

20

30

40

50

30及び410はいずれも、観察面の共役面である。

【0058】

レンズ160及び180は、液浸レンズ110の後焦点面の共役面420が、レンズ160とレンズ180との間に位置するよう配置される。

【0059】

可変開口絞り170は、液浸レンズの後焦点面に配置される。この絞りは、捕捉光信号の発光成分に対してフィルタの役割を果たす。絞りを開放位置にすれば、発光の発光成分から生じる捕捉光信号の全ての発光成分を通す。絞りを部分閉鎖位置にすれば、捕捉光信号の発光成分の一部をマスキングする。

【0060】

具体的には、観察面に位置する試料10の蛍光発光体から特定の角度で発せられた光線は、レンズの後焦点面400（もしくは、後焦点面400のいずれかの共役面420）の、その中心（光軸により定義される）から特定の距離 $r(\theta)$ 離れた位置で受け止められる。 $r(\theta)$ は、 $\theta$ の増加関数である。例えば無収差レンズの場合、 $r(\theta)$ は、 $\sin(\theta)$ に比例する。したがって、角度 $\theta$ で発せられた光線（円錐形）は、後焦点面において、半径 $r(\theta)$ の円を形成する。

【0061】

絞り170が、レンズ110の後焦点面400に配置された場合、 $r(\theta)$ と $\sin(\theta)$ との関係は $r(\theta) = n_i \times f_o \times \sin(\theta)$ であり、ここで $f_o$ は液浸レンズ110の焦点距離（通常数ミリメートル程度）であり、 $n_i$ はレンズに用いられる液浸媒質（通常は油）の指標である。

【0062】

実施形態では、倍率 $G = 100$ の液浸レンズが用いられ、チューブレンズ150の焦点距離は $f_t = 200 \text{ mm}$ である。

【0063】

つまり、 $f_o = f_t / G = 2 \text{ mm}$ となる。この構成においては、 $r(\theta_c) = 2.66 \text{ mm}$ である。

【0064】

絞り170が後焦点面の共役面に配置される場合、光学系の拡大係数を考慮に入れる必要がある。例えば、共役面420では、増倍率 $G' = f_{160} / f_{150}$ を導入する必要がある。ここで $f_{150}$ はチューブレンズ150の焦点距離、 $f_{160}$ はレンズ160の焦点距離である。

【0065】

発光の臨界角発光成分又は亜臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分は、半径 $r(\theta_c)$ の、有心閉鎖円盤状に、後焦点面で受け止められる。発光の超臨界角発光成分から生じる捕捉光信号の発光成分（ $\theta_c < \theta < \theta_{max}$ ）は、後焦点面で $r(\theta_c) < r(\theta) < r(\theta_{max})$ となる解放環を形成する。このように、光軸に中心を有し、開口 $r(\theta_c)$ が設けられた絞り170を採用することで、超臨界角発光成分を全てマスキングできる。

【0066】

このように、発光の時点で選択がなされる。その結果、標準的な落射蛍光観察装置で用いられる照明装置を、そのまま利用できる。これにより、非コヒーレント光源（水銀灯等で得られる通常の白色光等）によって、照射が可能である。この構成の利点は、レーザー光を必要とするTIRFM顕微鏡法のような多額の追加コストが必要なく、かつ、定量的測定をも可能にし得る均質な視野が得られることである。

【0067】

一実施形態によれば、絞りの作動手段はビデオフレームレート（通常、数十ヘルツ程度）で動作し、画像取得の速度に合わせて開放位置と閉鎖位置とを交互に切り替える。これにより、体積についての情報と、表面についての情報とを同時に得ることができる。

【0068】

10

20

30

40

50

この画像取得方法は、生物試料の画像取得、特に、細胞接着、エンドサイトーシス/エキソサイトーシス等の生細胞の生物学的作用の研究に好適である。

【0069】

図2は、図1に示した装置の本発明による変形例を示す模式図であるが、どちらの実施形態でも、像面430の前に配置される部材は同じである。図2に図示した装置では、孔195を有するピンホール型のマスク190が像面に配置される。シングルビーム検出器350によって、ポイントごとに、孔195を通過する光を取得できる。このように、共焦点顕微鏡法を行うための構成が実現される。

【0070】

図3は、図1に示した装置の本発明による変形例を示す模式図であるが、顕微鏡装置の部材は同じである一方、光源が異なっている。

10

【0071】

図3に図示した装置では、光250はレーザーにより発光され、試料の照明は全内部反射により行われる。これにより、改良されたTIRF型の装置が実現される。

【0072】

なお、市販のレンズの後焦点面は、一般的にレンズの内部に位置し、アクセス困難である。そのため、この後焦点面の画像形成を可能にするシステムを設け、センサとレンズとの間にフィルタ系170を挿入できるようにするのが望ましい。

【0073】

一実施形態では、ニコン社製のTi型倒立蛍光顕微鏡を用いる。この顕微鏡は、後焦点面の画像形成と、環状のマスクの位置決めとを行うことができるモジュール(TI-T-BHP、MEB55810)を備えており、高開口数レンズとの(外部)位相コントラストが可能になる。このタイプのモジュールに、本発明の装置の絞り170を適用できる。このような、面の心出しと位置調整のシステムは、超臨界角をフィルタリングする絞りに最適である。このシステムは、様々なレンズに対応できるように、複数の位置を有する。

20

【0074】

図4は、液浸レンズ110の後焦点面400又は後焦点面の共役面420に位置する、絞り170の模式図である。絞り170は、光をマスクできる周辺領域176を有する。この領域176は、可動式(カメラ等の場合)であってもよいし、モータ駆動の回転式フィルタディスクを回すことで絞りを切り替えられるタイプであってもよい。

30

【0075】

絞り170は、ソーラボ社製の絞りのように、虹彩絞りであってもよい。このタイプの絞りでは、機械式の可動部品(図示せず)を動かすことで開口を調整する。

【0076】

また、ディスク上の複数の領域に開口又は半透明の材料を設けたディスクを採用し、これを回転させて用いてもよい。この場合、この絞りは、不透明の材料に開けられた、適切な直径の円形孔として実現されてよい。これにより、きわめて短いサイクルで、例えばカメラによる画像取得のスピードに合わせて、透過/閉鎖を行うことができる。

【0077】

実施形態の一例では、ニコン社製倒立蛍光顕微鏡Ti-U(登録商標)が、位相差用双眼式ベースTI-T-BPH(登録商標)と、開口数1.49の油浸レンズ(100倍)と共に用いられる。透過フィルタと、ダイクロイックプレートと、励起フィルタとを含む、蛍光フィルタキューブが用いられる。ここで使用される光源は、130Wの水銀ランプと発生器C-HGFI(登録商標)とを備える、ニコン社製のファイバ光源Intensilight(登録商標)である。カメラは、EMCCD Andor Ixon+を約-75に冷却して用いる。絞り170は、ソーラボ社製の虹彩絞りである。

40

【0078】

位相リングに代えて、この絞りをニコンMEB55810モジュール(TI-T-BPH)に配置する。絞りの位置は、顕微鏡のベルトランレンズによって、また、心出しと軸合わせ用の調整ねじによって、モジュールを移動することにより調整される。以降の調整

50

手順は、モジュールに付属の位相リングの調整と同様にして行う。

【0079】

ヒト胎児腎臓細胞を、Alexa488とコレラトキシン（細胞膜の糖脂質と脂質ラフトの構成要素に結合する）との組み合わせによって、染色し、ニコン社製Intensilightの130W水銀ランプ（従来型のランプ）で励起し、観察を行った。使用されるフィルタキューブは、帯域幅450～490nmの励起フィルタと、500nmのダイクロミックミラーと、帯域幅510～550nmの透過フィルタと、からなる。

【0080】

図6a及び図6bは、開放絞り（6a）と、超臨界角発光要素を全てマスキングする閉鎖絞り（6b）とによって、得られた画像をそれぞれ示すものである。図6aと6bにおいて、休止時間（ $T = 300\text{ms}$ ）及びゲイン（ $G = 0$ ）は同じである。図6cは、図6aと6bの画像の差異（画像に関連する信号の強さの差異）の絶対値として取得した画像である。

10

【0081】

図6aと6bの画像は同じように見えるが、6cの画像はコントラストが強い。6a、6bの2つの画像では、細胞内部からの他の情報が含まれているために区別が難しいが、このようにして、膜現象に付随する光量変化を良好に観察することが可能である。

【0082】

この観察は、レーザーを採用することなく、従来型のランプによって、好適に実現された。

20

【0083】

方位分解能の測定は、励起/発光が580/605nmの蛍光ビーズFluosphere（登録商標、インビトロジェン社製）を回転（スピンコーティング）により通常のスライドガラス（厚み0.13～0.16mm）に付着させ、蒸留水に浸漬することで行った。

【0084】

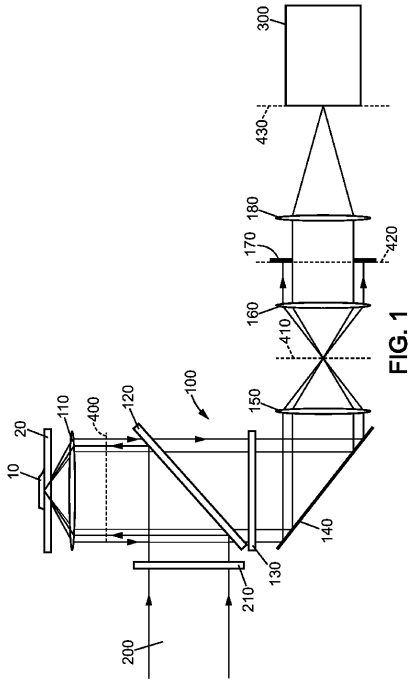
図7は、これらのビーズの蛍光光量プロファイル（横軸に示す側方変位の関数として、正規化された信号強度を縦軸に示す。単位ミクロン）を示すものである。本発明の方法により取得した有効画像域に対応するC2プロファイルは、仏国特許第2943428号に記載の方法で取得した画像に対応するC1プロファイルよりも狭いことが分かる。分解能の改善率は、20～25%である。

30

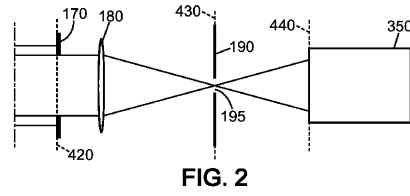
【0085】

本発明は上記の実施形態に限定されるものでなく、非限定的に解釈されるべきものであり、同等のあらゆる実施形態が本発明の範囲に含まれるものである。

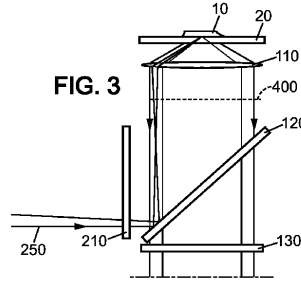
【 図 1 】



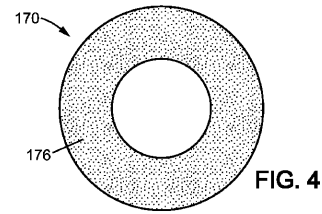
【 図 2 】



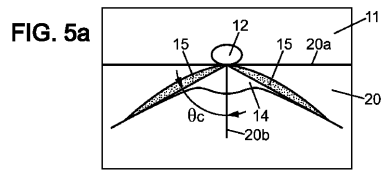
【 図 3 】



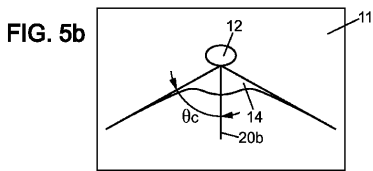
【 図 4 】



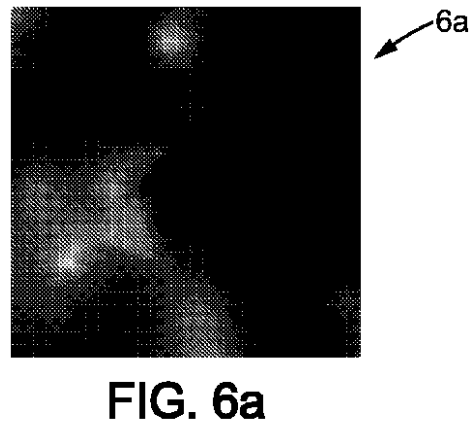
【 図 5 a 】



【 図 5 b 】



【 図 6 a 】



【 6 b 】

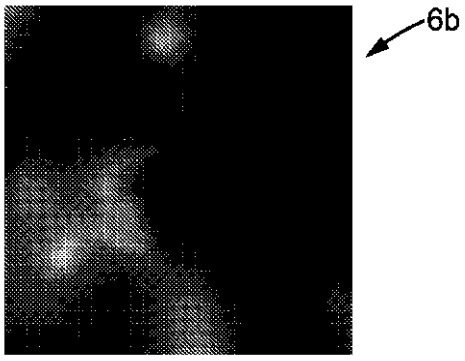


FIG. 6b

【 6 c 】

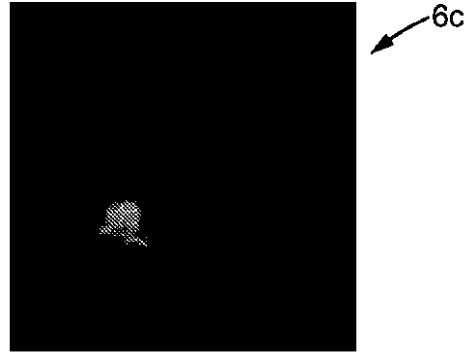
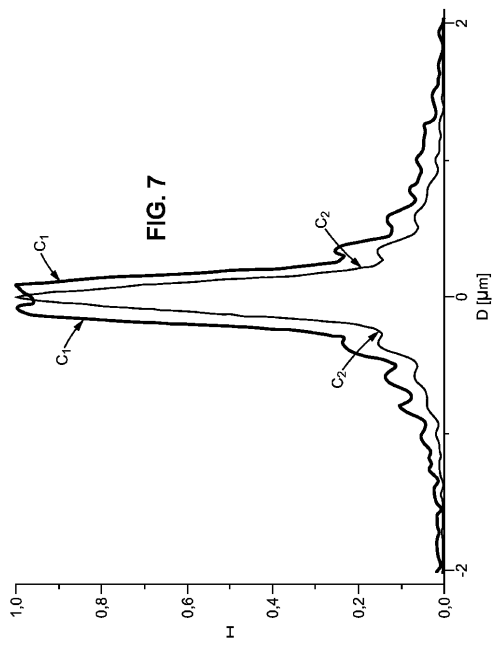


FIG. 6c

【 7 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 レベク フォル サンドリーヌ  
フランス国 エフ - 9 4 2 3 0 カシャン リュ デ ラ ソンム 1 1
- (72)発明者 バラー カルラ  
フランス国 エフ - 9 4 1 6 0 サン マンデ アヴェニュー ガリエニ 1 8 0
- (72)発明者 バルロカ トーマス  
フランス国 エフ - 9 4 8 0 0 ヴィルジュイフ 2 リュ バビュッフ - アペテ 2 1 3

審査官 越河 勉

- (56)参考文献 特開 2 0 0 8 - 0 6 4 9 7 7 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 1 0 / 1 0 6 2 8 9 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 0 9 - 5 3 6 6 6 9 ( J P , A )  
米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 5 5 7 1 8 ( U S , A 1 )  
米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 1 9 1 0 9 2 ( U S , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

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