



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106999021 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580042447.8

(22)申请日 2015.06.03

(30)优先权数据

14171378.4 2014.06.05 EP

15160630.8 2015.03.24 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/062447 2015.06.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/185661 EN 2015.12.10

(71)申请人 海德堡大学

地址 德国海德堡

(72)发明人 尼古拉斯·迪米特里亚迪斯

尼古劳斯·德里奥拉尼斯

(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291

代理人 黄志华 李欣

(51)Int.Cl.

A61B 1/04(2006.01)

A61B 1/06(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

G01J 3/10(2006.01)

G01J 3/32(2006.01)

G01J 3/44(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

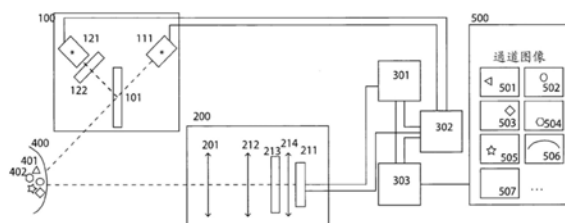
权利要求书3页 说明书16页 附图35页

(54)发明名称

用于多光谱成像的方法和部件

(57)摘要

本发明涉及样本、尤其生物组织的多光谱成像。本发明还涉及一种用于获取对象(400)的荧光图像和反射图像的方法,该方法包括如下步骤:至少利用具有多个高强度的光谱区域的第一光和至少利用具有至少一个高强度的光谱区域的第二光交替地照明对象(400),其中,第一光具有波长比高强度的区域的波长长的至少一个低强度的区域,使用公共传感器阵列(200)在利用第一光照明对象期间记录对象的第一图像以及在利用第二光照明对象期间记录对象的第二图像,其中,在第一光具有高强度的光谱区域中的至少一个光谱区域中使由传感器阵列(200)记录的光衰减。



1. 一种用于获取对象(400)的荧光图像和反射图像的方法,包括如下步骤:

至少利用具有多个高强度的光谱区域的第一光和至少利用具有至少一个高强度的光谱区域的第二光交替地照明所述对象(400),其中,所述第一光具有波长比高强度的区域的波长长的至少一个低强度的区域,

使用公共传感器阵列(200)在利用所述第一光照明所述对象期间记录所述对象的第一图像以及在利用所述第二光照明所述对象期间记录所述对象的第二图像,

其中,在所述第一光具有高强度的所述光谱区域中的至少一个光谱区域中使由所述公共传感器阵列(200)记录的光衰减。

2. 根据前一项权利要求所述的方法,其特征在于,所述公共传感器阵列(200)为多通道阵列、优选地为颜色传感器阵列,其中,每个通道具有不同的光谱灵敏度。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,在记录的所述图像的通道图像空间、例如颜色传感器的彩色图像空间中提供的的数据被转换为分量图像空间的值,其中,所述分量优选地对应于荧光物、吸收体、导出值或噪声的空间分布。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,针对所述光中的至少一者的处于较短波长的至少一个高强度区域与较长波长的至少一个低光强度区域之间的光强度的比大于或等于 1×10^2 ,优选地大于或等于 1×10^3 ,优选地大于或等于 1×10^6 ,

和/或

其特征在于,未衰减的光谱区域与衰减的光谱区域的强度之间的衰减比大于或等于 1×10^2 ,优选地大于或等于 1×10^3 ,优选地大于或等于 1×10^6 ,

和/或

其特征在于,由所述公共传感器阵列(200)记录的光在所述第一光具有高强度的所述光谱区域中的至少一个光谱区域中的衰减量使得记录在所述未衰减的光谱区域中的光的强度优选地高于记录在所述衰减的光谱区域的总和中的光的强度。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,由所述公共传感器阵列(200)记录的光被多带通滤波器(213)滤波。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一光和/或所述第二光通过如下项来生成:

a) 来自两个宽带光源(111)的宽带光,例如白光,其中,所述宽带光被多带通滤波器(112)滤波以便生成所述第一光和所述第二光,

或

b) 多个窄带光源(121),优选地多个发光二极管(LED),其中,从所述窄带光源传出的光可选地被光路径中的多频带滤波器滤波,

或

c) 根据a)的宽带光源和根据b)的窄带光源的组合。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,在利用所述第二光照明所述对象(400)期间记录的所述图像被处理以便为所述衰减的光谱区域校正所述图像。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,利用第二光和利用光谱不同的两个或更多个第一光照明所述对象(400),利用所述第二光照明所述对象用于生成由所述对象(400)反射的第一反射光,利用所述两个或更多个第一光照明所述对象用于激发由

所述对象发射的两种或更多种光谱可能不同的荧光,在所述第二光和所述两个或更多个第一光中的每一者之间交替照明所述对象,以及

使用公共传感器阵列(200)在利用所述第一光中的每一者照明所述对象期间记录所述对象的第一图像以及在利用所述第二光照明所述对象期间记录所述对象的第二图像,

其中,在所有第一光的一个、多个或所有光谱区域中使由所述公共传感器阵列(200)记录的光永久性衰减,其中,所述第一光的高强度达到使记录在未衰减的光谱区域中的光的强度高于记录在所述衰减的光谱区域中的光的强度的量。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,至少利用具有第一照明时段的所述第一光和具有第二照明时段的所述第二光交替地照明所述对象(400),以及

利用另一光的脉冲照明所述对象(400),其中,所述另一光的脉冲持续时间比所述第一照明时段短且比所述第二照明时段短,以及在利用另一光的照明期间保持记录所述第一图像和所述第二图像,

或

至少利用具有第一照明时段的所述第一光、具有第二照明时段的所述第二光、和具有第三照明时段的第三光交替地照明所述对象(400)。

10.一种用于获取对象(400)的荧光图像和反射图像的成像装置,包括:

至少一个第一光源(121)和至少一个第二光源(111),所述至少一个第一光源(121)提供具有多个高强度的光谱区域的第一光,所述至少一个第二光源(111)提供具有至少一个高强度的光谱区域的第二光,其中,所述第一光具有波长比高强度的区域的波长长的至少一个低强度的区域,其中,所述至少一个第一光源和所述至少一个第二光源配置成利用至少第一光和至少第二光交替地照明所述对象(400),

传感器阵列(200),所述传感器阵列(200)布置成在利用所述第一光照明所述对象期间记录所述对象的第一图像以及在利用所述第二光照明所述对象期间记录所述对象的第二图像,

衰减器(213),所述衰减器(213)配置成在所述第一光具有高强度的所述光谱区域中使由所述传感器阵列记录的光衰减。

11.根据前一项权利要求所述的装置,其特征在于,所述传感器阵列(200)为多通道阵列、优选地为颜色传感器阵列。

12.根据前两项权利要求中任一项所述的装置,其中,所述装置配置成将在记录的所述图像的通道图像空间、例如颜色传感器的彩色图像空间中提供的数据转换为分量图像空间的值,其中,所述分量优选地对应于荧光物、吸收体、导出值或噪声的空间分布。

13.根据前述权利要求中任一项所述的装置,其特征在于,针对所述光中的至少一者的处于较短波长的至少一个高强度区域与较长波长的至少一个低光强度区域之间的光强度的比大于或等于 1×10^2 ,优选地大于或等于 1×10^3 ,优选地大于或等于 1×10^6 ,

和/或

其特征在于,未衰减的光谱区域与衰减的光谱区域的强度之间的衰减比大于或等于 1×10^2 ,优选地大于或等于 1×10^3 ,优选地大于或等于 1×10^6 ,

和/或

其特征在于,由所述传感器阵列记录的光在所述第一光具有高强度的所述光谱区域中

的至少一个光谱区域中的衰减量使得记录在所述未衰减的光谱区域中的光的强度优选地高于记录在衰减的第二光谱区域的总和中的光的强度。

14. 根据权利要求10至13中任一项所述的成像装置, 其特征在于, 在所述对象和所述传感器阵列 (200) 之间放置带通滤波器 (213) 或多带通滤波器, 用于对由所述传感器阵列 (200) 记录的光滤波。

15. 根据权利要求10至14中任一项所述的装置, 其特征在于, 在利用第二光照明所述对象 (400) 期间记录的所述图像被处理以便为所述衰减的光谱区域校正所述图像。

16. 一种内窥镜或手术显微镜, 包括根据权利要求10至15中任一项所述的成像装置。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法、装置、内窥镜或手术显微镜用于记录反射图像和/或荧光图像的用途, 所述反射图像和/或所述荧光图像用于在汽车应用、医疗诊断、医学治疗、和/或化学和/或物理分析中的内部检查。

用于多光谱成像的方法和部件

技术领域

[0001] 本发明涉及样本、尤其生物组织的多光谱成像。

背景技术

[0002] 当使组织成像时,照明光可以被吸收或被散射。如果组织包含荧光分子,则通过将分子设置处于激发态而临时存储吸收的能量,然后吸收的能量部分地被释放为较长波长的光子。作为荧光发射的光的强度通常比已反射的激发光的强度弱许多数量级,以及因此需要将反射光与发射光分离或隔断。

[0003] 最实际的方式为在光束的激发路径和发射路径中使用带通滤波器,以限制光的光谱范围以避免反射的激发在记录的发射路径中的渗透。该方法的直接结果是,无法在同一检测路径中同时获得反射的激发图像与荧光图像。

[0004] 为了获取荧光图像和反射图像二者,需要在两种获取模式之间切换:具有滤波器和不具有滤波器。对于静态对象,即对于在获取荧光图像和反射图像期间不显著移动的对象,在滤波器之间切换以及按顺序获取两个图像从不是问题。然而,如果视野中的对象移动,则记录的图像不一致,以及甚至在密集图像处理之后,配准会非常困难。

[0005] 然而,可出现的另一问题是具有不同激发特性和发射特性的多种荧光剂的同时成像。在该情况下,必须使用不同组的用于激发和发射的成像滤波器来使不同的荧光染料成像,这最终增加了复杂度和获取图像的数量。此外,当使移动对象成像时,需要利用相当高的视频帧速率记录对象的发射的荧光和反射的激发。然后必须很快速地完成滤波器之间的切换。

[0006] 存在用于实现多光谱成像的几种方法。它们可以概略地以下列项为特征:a)所使用的传感器的数量、b)开关滤波器的使用、c)不同照明之间的切换、或d)多个带通滤波器的使用、分束器的使用等[Y.Garini、I.T.Young和G.McNamara的“Spectral imaging: Principles and applications”Cytometry Part A 69A,735-747(2006)]。

[0007] 在下文将详细地描述这些现有技术。

[0008] [开关滤波器]

[0009] 一些多光谱成像系统具有单个图像传感器且实施反射成像模式和荧光成像模式之间的快速切换机制。这可以使用安装在滤光轮或滤波器立方块上的带通激发滤波器设置和发射滤波器设置来实现,该滤光轮或滤波器立方块被快速更换,从而以高频交替地记录反射图像和荧光图像。该方法为直接的且允许最高的光吞吐量,但是需要机械地移动零件,比如滤光轮。进一步地,根据滤波器配置,它允许一次仅记录一个荧光团的强度。处于接近视频速度频率的开关滤波器在技术上为复杂的且需要与照相机的抓帧序列的准确机械同步。

[0010] 为了避免机械组件,可以使用光谱可调滤波器,例如液晶可调滤波器。适合于不同荧光团的光谱设置之间的切换可以非常快速(<1ms),然而可调滤波器的透射吞吐量被限制。此外,可调滤波器对光透射角度和光偏振高度敏感,且与相当高的成本相关联。

[0011] [分束器]

[0012] 用于多光谱成像的备选方法为使用多个传感器,其中,在每个传感器的前面布置对应的发射滤波器。通过穿过单个物镜且使用光学分束器布置来将光传递到每个传感器,光可以到达每个传感器,或者每个传感器可以具有独立的物镜。在任一情况下,每个传感器与滤波器配对,该滤波器可以阻断激发波长且记录来自一个荧光团的发射[Lucia M.A.Crane等人的J Vis Exp.2010;(44):2225]。附加传感器可以记录具有不同成像路径的反射图像。这个概念很简单,但是多个传感器、分束器或物镜的使用增大了尺寸、设计复杂度和成本。

[0013] [快速切换照明]

[0014] 用于多光谱成像的另一方案使用不同激发光之间的切换。其中,备选地利用具有特定激发光谱的激发光束照明对象,滤波器阻断该特定激发光谱进入一个或多个照相机中。在US 20130286176 A1中,使用单个颜色传感器、激发荧光的激光激发、以及开启和关闭的宽带照明源。当仅激光激发源开启时,则传感器可以捕获发射的荧光,以及当宽带照明开启时,则传感器可以捕获反射的图像。该系统产生反射图像和荧光团的图像,但是观察者可以在视觉上体验由于不同源的开启-关闭切换而造成的令人烦扰的闪烁。

[0015] [阻断多个带通图像]

[0016] 另一个方法使用与单色传感器配对的具有多个带通区域的滤波器。在该方法中,在单色传感器前面的滤波器阻断激发波长进入单色传感器中。可以单独地利用激发扫描使不同荧光团成像。可备选地,滤波后的多分量荧光可以被分为取决于波长的路径,然后使这些路径成像到单色传感器的不同空间区域上。利用该方法,可以利用单色传感器同时记录多个通道。

[0017] 在备选方法中,颜色传感器可以用于利用多通道(因此彩色)传感器记录多分量荧光。然后可以处理多通道传感器输出,从而获得各个荧光分量。

[0018] 附加传感器可以用于通过将反射的激发光分到不同的光学路径中而记录反射图像,该不同的光学路径使该光成像在该传感器上。这与反射一起提供多个荧光成像带,但是观察者将在视觉上感知伪彩色表示。根据特定激发波长,可能无法甚至在数字化上修正伪感知。

[0019] 可以进一步将反射和荧光二者分到多个附加颜色传感器上以增加光谱通道的数量。每个通道在传感器的前面具有窄带通滤波器,以及计算每个单独的窄滤波器带中的强度[US 20120085932 A1]。

[0020] 根据在具体应用中使用的激发滤波器和发射滤波器的精确组合,所使用的滤波器组被称为“Pinkel”、“Sedat”、或“全-多频带”。

发明内容

[0021] 本发明旨在提供用于多光谱成像的方法和装置,该方法和装置避免了上文提及的现有技术的问题且为简单的、快速的且有成本效益的。

[0022] 该问题通过根据权利要求1的方法和根据权利要求9的装置以及根据权利要求15的内窥镜或外科显微镜及其根据权利要求16的用途来解决。在各个从属权利要求中提供有利改进。

[0023] 根据本发明提供了一种用于获取对象的荧光图像和反射图像的方法。在该发明方法中,利用两种不同的光交替地照明对象。这至少两种不同的光包括交替地指向对象的至少一种第一光和至少一种第二光。第一光具有多个高强度的光谱区域和至少一个低强度的区域,该低强度的区域的波长比高强度的区域的波长长,同时至少第二光具有至少一个高强度的光谱区域。

[0024] 在利用这两种光交替地照明对象期间,公共传感器阵列记录图像。在利用第一光和第二光照明对象期间,记录被照明的对象的单独的图像。另外,使在其中第一光具有高强度的至少一个光谱区域中记录的光(即由对象发射的且指向公共传感器阵列的光)衰减。

[0025] 通过利用所述第一光和所述第二光交替地照明对象,因此可以在利用第一光照明期间记录该对象的荧光图像。在利用第二光照明期间可以记录该对象的反射图像。

[0026] 在第一有利改进中,公共用于交替地记录荧光图像和反射图像的传感器阵列是多通道阵列、优选地为颜色传感器阵列。这类多通道阵列将图像记录在通道图像空间中,例如在颜色传感器的彩色图像空间中。这些图像数据然后被转换为分量图像空间的值,其中,分量空间优选地对应于荧光物、吸收体、其导出值或噪声的空间分布。因此在本发明中,第一图像被记录在通道图像空间中,例如在彩色图像空间中,然后被转移到显示例如特定荧光物、吸收体等的横向分布的图像。

[0027] 如上所述,第一光和/或第二光可以具有高强度的光谱区域和低强度的光谱区域。为了记录上文提及的荧光图像和反射图像,如果处于较短波长的高强度区域和处于较长波长的低强度的相邻区域之间的光强度比至少为 1×10^2 、优选地大于或等于 1×10^6 ,则是有利的。

[0028] 另外,如上所述,在第一光具有高强度的光谱区域中的至少一个光谱区域中使由传感器阵列记录的光衰减。未衰减的光谱区域与衰减的光谱区域的强度之间的衰减比优选地至少为 1×10^2 ,优选地至少为 1×10^3 ,优选地至少为 1×10^6 。在替选实施方式中,由传感器阵列记录的光在第一光具有高强度的光谱区域中的至少一者中的衰减量使得记录在未衰减的光谱区域中的光的强度优选地高于记录在衰减的第二光谱区域的总和中的光的强度。

[0029] 特别地,由传感器阵列记录的光可以被多带通滤波器滤波。

[0030] 在本发明的优选布置中,第一光和/或第二光由宽带光生成,该宽带光然后被对应的多带通滤波器滤波以生成第一光和第二光。为了实现这点,用于第一光和第二光的所述多带通滤波器可以具有互补的滤波器区域,使得第一光的高光强度的范围与第二光的高光强度的范围交替。

[0031] 用于第一光和第二光的类似光分布可以通过将多个窄带光源用于第一光和第二光来实现,其中,用于第一光的光源的发射峰和用于第二光的光源的发射峰沿着光谱波长轴交替。

[0032] 而且,用于生成第一光和第二光的上述概念的组合是可行的。

[0033] 通过这类布置,可以在由公共传感器阵列前面的多带通滤波器透射的相同光谱区域中交替地记录荧光图像和反射图像。在优选场景中,被从通过公共传感器阵列前面的所述多带通滤波器的记录排除的波长区域可能对于反射图像的可视化不是至关重要的,这是因为记录的光谱区域可以用于重构彩色图像。

[0034] 由于使更多数量的分量(即荧光团)成像,因此可以通过使用更多数量的不同第一

光来记录单独的图像。可解混的分量(即荧光物)的数量主要取决于颜色通道的数量。例如使用RGB传感器,高达3种荧光物可以被解混。例如与同一RGB传感器一起使用一种附加的第一光,高达6种荧光物可以被分离。所述第一光应当优选地适用于所述荧光团的激发光谱,而记录的光需要根据感兴趣的所有荧光团的发射光谱来选择。为了测量荧光图像,可能需要在图像记录期间使成像装置的周围保持黑暗,从而减少非荧光。然而,尤其在医学应用中,可能需要额外提供环境光以便操作人员查看环境。为了该目的,建议利用至少一种第一光和至少一种第二光以及在另一时间段中利用另一光的脉冲来交替地照明对象,其中,该另一光的脉冲持续时间比用于利用至少第一光和至少第二光照明对象的照明时段短。也可以在至少第一光或第二光的应用期间应用所述另一光,同时在利用所述另一光照明期间停止记录第一图像和第二图像。优选地,另一光的光脉冲相应地比第一光或第二光的持续时间短。

[0035] 所述另一光于是可以足够强,从而为工作在本发明的成像装置的环境中的人员提供足够的光来观察该环境。如果所述另一光部分的频率足够高,则可以为工作在该环境中的人员提供连续的视觉效果。

附图说明

[0036] 在下文中提供本发明的不同示例。其中,针对类似的或相同的元件,使用类似的或相同的附图标记。在以下示例中,可以组合地描述对于本发明必需的特征和可选的特征的组合。然而,以这类组合描述的可选特征分别可以单独地且逐一地被使用以改进如在本权利要求中所描述的本发明。

[0037] 结合图1至图35示出多个示例,图1至图35全部示出本发明的示例的多个方面。

具体实施方式

[0038] 示例1

[0039] 图1描述了本发明的一般概念。本发明的系统包括照明系统100,该照明系统100产生且引导包含光谱多路复用特性和时间多路复用特性的光以照明对象400。从对象400发出的光被成像系统200收集且检测或成像,该成像系统200包括多个元件,比如透镜、滤波器、和光传感器/检测器阵列(即照相机)等。照明系统100和检测系统200均连接到控制和处理单元(300),该控制和处理单元(300)控制照明系统100的操作、使操作同步且从检测系统200抓取图像、以及处理图像数据,用于后续评估、显示和存储。最终,显示/可视化系统500单独地或同时地/叠加地显示分解的图像。

[0040] 照明系统100在两个(或更多个)交替阶段中操作,如图2所示。图2A示出了不同阶段的时间进程,图2B示出了第一光的光谱,图2C示出了第二光的光谱,以及图2D示出了待检测的入射光的透射。

[0041] 在阶段1中,系统利用展示具有高强度区域和低强度区域的光谱形状的光照明对象,如图2B所示。各种光谱形状是可能的,但是必不可少的是,光具有在比高强度区域的波长长的波长下具有非常低的强度的光谱区域。在那些区域中,在利用第一光激发时由对象发射的荧光可以被成像系统检测,而不检测相关量的反射光。在阶段2中,利用宽带光照明对象,如图2C所示。

[0042] 成像系统200包括一个成像通道/路径。该成像通道具有图像传感器阵列设置,用于检测和记录处于不同阶段的荧光图像和反射图像。到达图像传感器的光在光谱上衰减,使得通常阶段1的照明光在到达成像传感器之前衰减,如通过图2D中的衰减器的透射光谱所示。

[0043] 通过交替对象的照明,可以利用同一传感器在相同的光谱区域中交替地记录互补的反射图像和荧光图像。在照明阶段1中,从对象反射的光的光谱带衰减以及基本上仅荧光发射被透射且被传感器阵列检测,形成荧光图像,而在阶段2中,从对象反射的光部分地被透射且利用传感器来记录,以形成反射图像。

[0044] 待衰减的光谱区域在光到达传感器之前的衰减量可以被近似评估,从而当传感器优选地用于检测荧光时,检测的荧光信号应当优选地多于渗透的激发光。

[0045] 示例2

[0046] 在图3中示出了优选实施方式之一。其中使用两个宽带白光源111和121,这两个宽带白光源111和121可以被交替地开启和关闭。一个宽带白光源利用多带通滤波器122滤波。利用多带通多色镜101组合来自这两个源111和121的两个光束。在那些元件之间,准直透镜可以可选地放置以便将更多光引导到待成像的区域。利用物镜201(或充当物镜的透镜系统)将由对象400发射的光收集在检测系统200中,用在开放手术中的该物镜201优选地具有200mm的对焦距离。与滤波器122互补的多带通滤波器213使光束衰减。滤波的光束然后通过多通道或多色传感器阵列211来成像。处理/控制单元300由抓帧器301、控制单元302、和处理单元303组成,以生成图像501,...,图像507...。可选的透镜212、透镜214可以被用在各个元件之间以将图像转发到传感器。多带通滤波器213优选地放在光学上无限大的修正成像空间中。

[0047] 多带通滤波器和多色滤波器通常被制作为激发/发射/镜滤波器组,用以在荧光显微法中用作Sedat组、Pinkel组或全多频带组中。在图4中示出了用于四带滤波器组的透射光谱的示例,该四带滤波器组初始被配置成使四个荧光物成像。在位置122上使用“激发滤波器”、在101上使用“多色镜”、以及在位置213上使用“发射滤波器”。可以针对各种荧光物应用使用滤波器的各种不同组合以及各种滤波器组。通常在滤波器传输带之间具有小的间隙,以避免串扰(参看图表)。这个带的宽度取决于操作在一系列入射角之下的滤波器的特性连同在具有现实条件的环境中执行的滤波器组的需求。

[0048] 针对两种照明模式使用这样的滤波器组指的是,在阶段1中,该组的激发滤波器用于对来自源111的白光滤波,多色镜被用作将来自源111和源121的多个光束组合为一个光束的元件101,以及发射滤波器被用作位置122上的滤波器213以阻断来自111的激发光。实际上且假设组织中的荧光物的标称浓度(通常在 $100 \times 10^{-9} \text{M}$ 到 $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 之间,其中 $1 \text{M} = 1 \text{摩尔/升}$),6个数量级的光密度(O.D.)的干扰多个带通滤波器的阻带中的常规衰减率是足够的,然而期望的是,在许多情况下,2或3的O.D.的衰减可以是充足的。

[0049] 在阶段1中,利用来自源111的光谱成形的光照明对象400,该光至少部分地被对象400反射、透射且吸收以激发荧光。在传感器211前面的发射滤波器213使阶段1中被对象400反射的激发光衰减,该传感器211因此仅记录荧光发射。在阶段2中,利用来自源121的宽带光照明对象400。该光部分地被对象400反射,该对象400发射反射光和荧光。滤波器213仅透射一些频带的反射光和荧光发射光。由于荧光强度通常比反射光低许多数量级,因此可以

假设实际上仅记录反射图像。总而言之,在阶段1中,传感器211记录荧光,且在阶段2中记录对象在滤波器213示出足够透射的光谱区域中的反射图像。通常,荧光图像具有比反射图像低很多的强度。为了适应不同的动态范围,更长的曝光时间应当被用于荧光图像。在图5中示出了阶段和图像的这类序列。在此,图5A示出了照明阶段1和照明阶段2的时序,其中,阶段1比阶段2长。图5B示出了检测阶段1和检测阶段2的时序,其中,用于检测荧光图像的阶段1比用于检测反射图像的阶段2长。

[0050] 对象的照明和传感器的曝光的控制从处理和控制单元300中的信号来提供。两个宽带光源111和121可以为白炽灯、气体灯(比如Hg、Xe或混合物)、发光二极管(Light Emitting Diode,LED)、或任何其它宽带光源。LED源可以以高频速率来开启和关闭,其中上升时间和下降时间比100微秒快。这类系统可以以视频速率(即大约以25fps(帧/秒))、利用交替阶段照明对象。在此以及在更高的照明速率下,照明场的视觉感知是均匀的,其中任何闪烁效果是几乎观察不到的。

[0051] 传感器213优选地为具有利用多个通道记录图像的能力的多通道(多色)传感器。每个光谱区域具有不同的光谱敏感度且记录对象中的各种反射物质和荧光物质的光谱多路复用的反射光。多通道颜色传感器阵列的示例为RGB(红-绿-蓝)或CMYG(蓝绿-洋红-黄-绿)图案传感器。在图6中示出了不同类型的颜色传感器的典型的颜色敏感度。在图6A中示出了RGB传感器的红色传感元件、绿色传感元件和蓝色传感元件的敏感度。在图6B中示出了CMYG传感器的蓝绿色传感元件、洋红色传感元件、黄色传感元件和绿色传感元件的敏感度。因此,由这些传感器记录的数据为对应色彩空间(即通过对应颜色(例如RGB或CMYG)所跨越的空间)中的数据。

[0052] 图7公开了典型荧光团的典型荧光发射光谱的激发光谱和荧光发射光谱,该典型荧光团比如为异硫氰酸荧光素-FITC(图7A)、Atto647(图7B)和吲哚菁绿(ICG)(图7C)。

[0053] 然后将记录的图像从传感器213传送到处理单元300以备一系列图像处理操作,诸如演示、配准、噪声滤波、背景暗噪声减少、针对色帧的颜色校正、和光谱解混。特别地,最简单形式的光谱解混可以为从照相机和分量空间生成的颜色通道图像之间的线性变换。分量可以为光可携带来自其的信息的任何事物,诸如可以为可来自那些分量的衍生物的材料、浓度或特性、或数量。它们可具有对应于对象400的元件401、元件402的特定空间分布。在计算分量401、分量402等的空间分布的图像501、图像507之后,可以使用颜色映射(诸如伪色)将这些图像存储、显示或覆盖在其它图像上。

[0054] 用于光谱解混之后的图像的一些示例(但不限于此)示出:

[0055] a) 吸收体分布:反射光的光谱通过对象400的组织中的吸收和透射光谱来成形,且这被记录在颜色传感器信号中。通过在具有已知浓度的吸收体上的组织吸收和/或系统校准的系统和组织建模,可以导出内在组织吸收体(比如氧化的和去氧化的血红蛋白、黑色素等)或还有外部施用的吸收造影剂(例如亚甲蓝)的浓度。

[0056] b) 氧饱和:从氧化的和去氧化的血红蛋白分布的图,可以计算氧饱和度图以及相关的生理或病理参数。

[0057] c) 荧光物分布:荧光要么来自内生的荧光物、要么来自外部施用的荧光造影剂。荧光信号被颜色传感器记录,以及通过系统和组织建模和/或系统校准,可以导出荧光物分布。另外,可以计算传送关于癌症的更具体信息的荧光物图之间的比率。在下文中呈现了针

对用于计算荧光分量的图像处理的基本描述。类似值(如反射吸收分布)以及导出值类似地被建模和计算。

[0058] 在本发明中,照相机测量不同颜色通道的信号强度。该信号通过所有分量的总和的光强度来创建,该光强度与传感器211的光谱灵敏度结合,所有分量在光谱上被透射滤波器滤波且另外被传感器211的RGB颜色滤波器滤波。假设检测器响应是线性的,则生成的信号为:

$$[0059] \quad S_{c \in \{\text{颜色}\}} = \int_{\lambda_{\min}=0}^{\lambda_{\max}=\infty} \sum_{f \in \{\text{荧光通道}\}} I_{\lambda}(\lambda, f) * T(\lambda, c) d\lambda \quad \forall c \in \{\text{颜色}\}$$

[0060] 其中, S_c 为出自所有组合的颜色传感器图像的具体谱色 c 中的信号;例如 $\{\text{颜色}\} = \{R, G, B\}$ 。 $I_{\lambda}(\lambda, f)$ 为光谱荧光通道强度密度。它取决于波长和荧光通道。每个荧光通道的特征是特定的光谱光特性。在最简单的情况下,成像系统的荧光通道的光谱光特性对应于荧光团。在该情况下, $I_{\lambda}(\lambda, f)$ 对应于荧光团的光谱发射谱。在该情况下,考虑荧光团浓度、荧光团量子产率和光谱照明光强度,可以确定 $I_{\lambda}(\lambda, f)$ 的准确值。 $T(\lambda, c)$ 为特定空间颜色传感器或像素的总透射特性,这也展现了包括发射滤波器的光学系统的透射特性。假设荧光活性被定位成靠近组织表面使得荧光发射光谱轮廓和强度不受组织本征吸收严重影响以及其它非线性效果(比如淬火)可忽略不计,则光谱荧光团强度 $I_{\lambda}(\lambda, f)$ 可以被写成 $I_{\lambda}(\lambda, f) = c(f) * \Phi_{\lambda}(\lambda, f)$:

$$[0061] \quad S_{c \in \{\text{颜色}\}} = \int_{\lambda_{\min}=0}^{\lambda_{\max}=\infty} \sum_{f \in \{\text{荧光通道}\}} c(f) * \Phi_{\lambda}(\lambda, f) * T(\lambda, c) d\lambda \quad \forall c \in \{\text{颜色}\}$$

[0062] 其中, $c(f)$ 为荧光团 f 的浓度。在将荧光通道 f 用于反射成像的情况下, $c(f)$ 为强度因子。用于浓度的符号 c 与颜色通道指数相同。 $\Phi_{\lambda}(\lambda, f)$ 为摩尔光谱荧光强度密度,描述荧光团 f 的发射的光谱轮廓。该强度通过荧光团的浓度 $c(f)$ 来调整大小。在 f 为反射通道的情况下, $\Phi_{\lambda}(\lambda, f)$ 为具有光谱分布的通道的标准化的光谱反射强度。

[0063] 作为一个示例, $\Phi_{\lambda}(\lambda, f)$ 可以为眼睛中的红色受体的光谱响应。这会导致对于该红色通道的自然色印象。在重排之后,公式

$$[0064] \quad S_{c \in \{\text{颜色}\}} = \sum_{f \in \{\text{荧光通道}\}} c(f) * \underbrace{\int_{\lambda_{\min}=0}^{\lambda_{\max}=\infty} \Phi_{\lambda}(\lambda, f) * T(\lambda, c) d\lambda}_{M(f, c)} \quad \forall c \in \{\text{颜色}\}$$

[0065] 导致荧光团浓度和传感器测量的通道强度之间的线性关系:

$$[0066] \quad S_{c \in \{\text{颜色}\}} = \sum_{f \in \{\text{荧光通道}\}} c(f) * M(f, c) \quad \forall c \in \{\text{颜色}\}$$

[0067] 该线性关系允许计算所有的荧光通道强度和反射通道强度 $c(f)$ 。其中,存在针对具有通道红、绿和蓝的传感器以及染料异硫氰酸荧光素(FITC)、Atto647和吲哚菁绿(ICG)计算矩阵 M 的示例。在图7中给出了荧光团激励和发射光谱:

[0068] 信号等式为:

$$[0069] \quad S_{\text{红}} = c(\text{FITC}) * M(\text{FITC}, \text{红}) + c(\text{Atto647}) * M(\text{Atto647}, \text{红}) + c(\text{ICG}) * M(\text{ICG}, \text{红})$$

$$[0070] \quad S_{\text{绿}} = c(\text{FITC}) * M(\text{FITC}, \text{绿}) + c(\text{Atto647}) * M(\text{Atto647}, \text{绿}) + c(\text{ICG}) * M(\text{ICG}, \text{绿})$$

[0071] $S_{\text{蓝}} = c(\text{FITC}) * M(\text{FITC}, \text{蓝}) + c(\text{Atto647}) * M(\text{Atto647}, \text{蓝}) + c(\text{ICG}) * M(\text{ICG}, \text{蓝})$

[0072]

$$\begin{pmatrix} S_{\text{红}} \\ S_{\text{绿}} \\ S_{\text{蓝}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M(\text{FITC}, \text{红}) & M(\text{Atto647}, \text{红}) & M(\text{ICG}, \text{红}) \\ M(\text{FITC}, \text{绿}) & M(\text{Atto647}, \text{绿}) & M(\text{ICG}, \text{绿}) \\ M(\text{FITC}, \text{蓝}) & M(\text{Atto647}, \text{蓝}) & M(\text{ICG}, \text{蓝}) \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} c(\text{FITC}) \\ c(\text{Atto647}) \\ c(\text{ICG}) \end{pmatrix}$$

[0073] 其中针对FITC和红色检测器通道的组合示例地写出系数M:

$$[0074] \quad M(\text{FITC}, \text{红}) = \int_{\lambda_{\min}=0}^{\lambda_{\max}=\infty} \Phi_{\lambda}(\lambda, \text{FITC}) * T(\lambda, \text{红}) d\lambda$$

[0075] 可以通过倒置系数矩阵M来获得荧光强度:

$$[0076] \quad \begin{pmatrix} c(\text{FITC}) \\ c(\text{Atto647}) \\ c(\text{ICG}) \end{pmatrix} = M^{-1} * \begin{pmatrix} S_{\text{红}} \\ S_{\text{绿}} \\ S_{\text{蓝}} \end{pmatrix}$$

[0077] 在优选实施方式中,如果检测器颜色通道的数量等于待解决的荧光通道的数量,则等式系统可以被求解为等式的线性系统。变量 S_c 由成像系统测量。如果系统的其它参数是已知的($\Phi_{\lambda}(\lambda, f)$ 和 $T(\lambda, c)$),则可以计算 $c(f)$ 的值。在校准过程中可以提前确定这些因子且因此矩阵 $M(f, c)$ 。为了计算 $c(f)$,矩阵 $M(f, c)$ 需要求逆。

[0078] 如果被测通道的数量大于荧光通道的数量,则系统为超定的。处理该有利情况的一个选项为计算 $M(f, c)$ 的伪逆,其不再为方矩阵。可以使用各种算法来改善计算的结果且例如使源自于传感器中的测量的噪声最小化。

[0079] 矩阵M可以从系统建模和/或从系统校准来计算。在系统建模中,可以从光源到颜色传感器阵列像素对光通道光谱含量建模。参数包括但不限于:照明源光谱分布、激发滤波器的光谱透射、或照明光的光谱轮廓、荧光物激发和发射光谱以及量子产率、组织中的分量的近似深度、组织的光学特性、成像系统(透镜、分束镜、滤波器、镜子等)的透射特性、和/或传感器阵列的光谱灵敏度。建模计算将浓度信息与记录信号相关联的矩阵M(正演问题)。可以从逆算问题的解答导出分量分布。可替代地,系统校准可以利用记录已知组成、浓度和位置的分量的信号且然后求解未知的矩阵M,或者通过利用解混算法的盲目分解来完成,该解混算法诸如主分量分析(Principle Component Analysis, PCA)、独立分量分析(Independent Component Analysis, ICA)或类似的统计算法。最终,建模或一般地使用现有信息可以用于确定除了被测通道的数量以外的更多未知参数。

[0080] 代替线性建模,该系统可以使用非线性描述来更详细地建模。采用该方式,可以考虑非线性的潜能,诸如检测器或高荧光物浓度的淬灭效应。最终,利用建模和/或现有信息,可以计算从比可用通道的数量多的分量恢复信息的矩阵,这不同地为欠确定的系统。

[0081] [光谱带的数量]

[0082] 最终,如前所示,解混的分量的数量与从传感器可获得的通道(例如颜色)的数量、或在组合图像的情况下与组合图像的颜色通道的总数相关。然而,照明和/或透射中的光谱带的数量独立于通道(颜色)的数量和解混的分量的数量。通常,在感兴趣的区域中可用的谱带越多,越不可能将不记录来自特定分量的光谱特征。因此,许多“窄”光谱带提供反射图像的更准确的颜色表示以及各种分量的更准确的解混。然而,在光谱带的数量小于通道的数量的情况下,各种分量的光谱解混是可行的。

[0083] 重要的是强调,多频带滤波器的光谱带的数量对于待解混的荧光团的数量而言不是相关的数学条件。反而,照相机通道的数量在数学上是重要条件。

[0084] 示例3

[0085] 在下文中,我们描述用于本发明的基础光源和各种替代物。

[0086] 如前所述且如图8所示,最基础的光源100包括两个独立的光源111、121,这两个光源优选地为宽带LED 111和宽带LED 121。相比于传统光源,诸如卤素灯或氙气灯,LED通常具有非常快速的切换性能。可选地利用准直透镜119和准直透镜129使光束准直。利用带通滤波器122对从源121传出的光滤波且然后使用多色镜101将其与从源121传出的光组合。

[0087] 图9A示出了宽带LED的光谱,宽带LED对于光源111、光源121可以相同或不同。该光谱通常用于白光LED。图9B示出了多带激发滤波器122的透射光谱。图9C提供了由LED源121发射的且由滤波器122滤波的光的强度谱。

[0088] 在优选实施方式中,具有最大光谱功率密度的两个宽带高功率LED源的发射光谱大于30mW/nm。发射光被多带通滤波器滤波,如图9B所示。该滤波器具有传输带(420nm-460nm、510.5nm-531.5nm、590nm-624nm、677.5nm-722.5nm),在每个传输带中具有90%的近似最大的传输。滤波器在阻断区域中的衰减特性通常至少为光学密度2(O.D.2)。通常滤波器的带外抑制/衰减特性和O.D.6一样好。

[0089] 在图9C中示出了在利用对应的多频带滤波器滤波之后的光源的有效发射。第一光(源121)的光谱在该照明阶段期间通过滤波器来成形,以及第二光(源)的光谱为如图9A所示的固有的宽带发射轮廓或类似的宽带。因此,光的所有绘制光谱为在对应阶段期间累积的光谱。

[0090] 利用该基础光源的一个潜在缺点是,照明场对于观察者在强度方面和光谱含量方面的视觉感知可能不是最佳的。这两种光具有不同的整体强度和光谱含量,以及当它们交替时可呈现强度或颜色的视觉闪烁。另外,光谱含量不是平衡的且色外观可以不是自然的。

[0091] 替选的照明源为基础光源的变型,其中区别是第二光也利用如图10A所示的滤波器112来滤波。对第二光滤波的基础优势是,它促进整个颜色感知的优化且使闪烁最小化。滤波器112也可以为多带通滤波器。它的光谱透射特性可以与滤波器122的光谱透射特性互补且可以具有与在传感器阵列211前面的荧光发射滤波器213相同或类似的透射特性。图10B提供在第一阶段中如由光源121发射的第一激发光在通过滤波器122滤波之后的光谱。图10C提供在第二阶段中如由光源111发射的第二激发光在通过滤波器112滤波之后的光谱。互补的滤波器112和滤波器122累积地提供光谱连续的照明,该照明几乎等于通过原始宽带源的宽带照明,因此提供自然颜色感知。另外,强度或颜色闪烁的效果较小。然而,第二光(阶段2)的光照明的光谱形状可以自由改变以便达到最佳的颜色感知和最小的强度闪烁。

[0092] 另外,光源100的输出可以通过光纤耦合透镜系统耦合到光导管中。该光导管可以为单个光纤、光学纤维束、或液芯光导管。

[0093] 在如图11所示的照明系统的替选实现中,利用多频带滤波器滤波的宽带光源中的一者或多者用一组窄带的单独控制的源133、143、153来替换,这组窄带的单独控制的源可选地通过各自的窄带滤波器125来滤波。这类源133-153可以为激光器、激光二极管、LED等。在图11中,图10A的发光模块111已经被多个激光源133、143、153来替换。模块123的发射光

通过滤波器125滤波。多色镜101、多色镜104、多色镜105、多色镜106将激光器133、激光器143、激光器153的辐射与来自激光器123的辐射组合。所有的光被一起耦合到光纤103。

[0094] 分束器101可以为偏振分束器。采用该方式,可以组合不同的源123、源133、源143、源153,使损耗最小化。多个激光器133、143和153以及更多激光器可以代替一个宽带源,例如如图10中的源111。激光器133、激光器143、激光器153可以具有窄光谱发射轮廓和/或可以为可调谐的。一些激光器可以需要清除滤波器来抑制不想要的放大的自发发射。激光器也可以在波长和强度上为可调谐的,它们可以为连续波激光器或脉冲激光器。不同的激光源被长传多色镜104(截止波长为415nm)、长传多色镜105(截止波长为650nm)和长传多色镜106(具有大约785nm的截止波长的高反射率的平面反光镜)组合。包括一个阶段中的照明的这些或类似的窄带源可以同时照明(具有全部或部分时间重叠)、或可以按顺序操作。然而,与照明阶段相关联的曝光时段内的任何时间组合被视为在一个照明阶段中累积的光谱分布。

[0095] 在图12中示出了优选的光谱场景,其中,宽带LED源覆盖整个光谱范围且与窄带激光光源组合,该窄带激光光源可以优选地为(出于切换原因)激光二极管。在该情况下使用普遍的模块,比如405nm激光二极管模块、633nm激光二极管模块和785nm激光二极管模块。处于405nm的二极管激光器可以激发广泛用于脑部手术的原卟啉IX(PPIX)。处于633nm的二极管激光器可以激发高度稳定且明亮的荧光团,诸如用在荧光探针中的Alexa647,以及以785nm发光的二极管激光器激发临床相关的吲哚菁绿(ICG)。

[0096] 示例4

[0097] 在该示例中,替选的照明系统用于利用几个LED光源生成照明光。如图13所示,代替使用两个宽带LED源,该选项使用具有窄的光谱发射的多个LED121、131、141、151...。这需要更复杂的照明设备,但是在另一方面,输出功率可以显著增大且可以独立地使不同LED的强度平衡。大多数单色LED仍在旁侧光谱上具有带尾窄发射。因此,可以可选地在每个LED的前面使用激发滤波器122、激发滤波器132、激发滤波器142、激发滤波器152以清除激发光谱。类似于激光源,来自由许多窄带源组成的LED源的光可以被视为一个照明光。LED可以同时照明(具有全部或部分时间重叠)或可以无重叠按顺序操作。然而,与照明阶段相关联的曝光时段内的任何时间组合被视为在一个照明阶段中累积的光谱分布。

[0098] 这类照明子系统(比如图13中所描述的照明子系统)可以被组合在多阶段照明系统中,如图14的示意图所示。其中,提供两个光源100c和100d,各光源将其发射光耦合到分别用于样本400的照明的光纤103c和光纤103d中。

[0099] 图15至图18分别示出了LED光源的发射光谱、在发射光束中布置的滤波器的透射光谱、以及发射光在通过所述滤波器之后的强度光谱。所有的四个光源在一起可以替换一个光谱宽带光源。

[0100] 该优选配置针对多频带滤波器的每个带具有一个激发LED。这将需要用于四带通滤波器的8个单个的不同LED。在图19中示出了这类配置的光谱。图19在左侧示出了构成第一光源的4个LED的光谱、对应滤波器的透射光谱以及第一光产生的发射光谱。在右侧示出了对应于第二光的光谱。在光谱中已暗示,各个LED与一种光相关联且因此与一个阶段相关联。然而,该组的4个单独LED还可以使用在每个单独LED前面的4个单独的单带通滤波器来滤波。而且,各个LED不严格地连接到阶段之一。图20示出了4个市场上可买到的具有处于

380nm、490nm、565nm和635nm的发射峰的LED的真实发射光谱。图21示出了被四带通滤波器滤波的上述四个LED的形成的照明光谱轮廓。

[0101] 示例5

[0102] 在图22中所示的另一示例中,不同光源之间的暂时切换使用具有可变透明度的光学元件168和光学元件165来执行。在最简单的情况下,这些具有可变透明度的光学元件168和光学元件165为机械光闸。它们也可以为光调制器或声光设备。从光源161传出的宽带光被多色镜162分离,然后被互补的激发滤波器164和激发滤波器167滤波以及被类似于元件162的多色元件169再次合并。镜子163和镜子166用于对齐和引导被系统中的滤波器165滤波的部分光束。为了进一步改善,应当使激发光准直以使损耗最小化且优化系统中的滤波器性能。

[0103] 示例6

[0104] 在如图23所示的备选实施方式中,照明系统被配置成通过光学系统照明。光学导光管将光从多光谱照明系统100传送到成像设备200的处于连接器端口204的部分。照明路径可以包含用于优化对对象400的照明的光学透镜系统203。然后光被偏振滤波器206滤波且随后与具有分束器设备205的成像路径组合。这类设备可以为偏振分束器立方体205。然后使光通过可旋转的半波片207,当光正在通过时,该半波片207旋转偏振的角度。这允许根据半波片的位置减少或消除反射光的反射。在简单组装中,半波片207位于物镜201前面。

[0105] 示例7

[0106] 在下文中提供各种替选的检测器系统的描述。

[0107] 作为一般性描述,传感器211为多通道颜色传感器。这意味着传感器记录多个不同的光谱分布中的光场。这可以利用以下各种选项来实现:a)在像素前面具有微型滤波器的传感器,该微型滤波器遵循拜耳(Bayer)RGGB微型滤波器模式或其改造版(比如RG(IR)B、CMYG),b)任何其它滤波器镶嵌模式,其中每个像素记录具有不同光谱分布的光,和/或c)在单色传感器上的任何其它光束分离、颜色滤波和成像。在图24中示出了这些模式中的一些。

[0108] 通常,RGGB模式实现更准确的颜色再现,而CMYG可以为更敏感的。全分辨率彩色图像可以通过去马赛克来恢复,这可以发生在照相机硬件中或后续发生在图像处理中。微型滤波器模式通常可以被扩展到多种颜色或多种光谱透射轮廓,比如ABCDEFGH等。如此示例为平版印刷而形成图案的双色滤波器阵列,如在US 6638668 B2中所公开。

[0109] 可备选地,多通道颜色传感器可以基于Foveon X3传感器(参看US 6632701)或如图25所示的类似技术。相比于微型滤波器模式,Foveon传感器具有在空间上布置在x方向和y方向上的光电传感器,以及多个层(层1、层2...)竖直叠放。每个层由于硅吸收和对于光之上的层的不同透射深度而对不同的光谱区域敏感,因此每个层的所生成的图像对应于不同的颜色。利用这点可以实现更高的空间分辨率。

[0110] 在如图26A所示的备选实施方式中,使用分束器或镜252、镜253、镜254、镜255将待检测的光束分为三条平行的局部光束以及利用滤波器或利用双色镜对光束滤波。另外,如图3所示的多通道传感器211被单色传感器251替换。每个滤波器或双色镜具有特定的透射光谱轮廓,该轮廓透射如图26B和图26C所示的三种不同颜色之一的光。因此不同图像彼此横向远离地被形成在单色传感器中,各单色传感器使不同的光谱带成像。

[0111] 另外,多颜色通道可以利用多次分光和多个滤波器来实现,诸如在US 3659918中

所公开的棱镜3-CCD几何结构。在这个或类似分光实现方式中,每个路径被滤波以携带具有特定颜色(例如RGB)的光谱的光。该方法可以被扩展到提供多个成像路径(3个以及更多)的类似的多个分束器。

[0112] 示例8

[0113] 对于大多数荧光应用,需要避免或阻断环境光,这是因为环境光的强度比源自于荧光染料的荧光的强度高多个数量级。环境光可来自于太阳且穿过窗户到达对象上,或环境光可由室内灯发射。在现有技术的系统中,环境黑暗以避免来自荧光通道中的环境光的密集信号。作为备选,将会穿过发射滤波器的环境光的特定波长区域可以被滤波器阻断。遗憾地,这类滤波器通常非常昂贵,且不可能用这类滤波器覆盖大的窗口或室内灯,或这类滤波器刚好不是对于任何光谱配置都可用。

[0114] 在此呈现的技术描述了允许房间的环境照明和在相同情况下检测荧光的备选方案。这个改进在开放式手术期间的外科荧光成像中是特别重要的。

[0115] 呈现了两个不同的选项。两个选项利用脉冲光源作为环境照明来操作。在第一方法/实施方式中,在记录(在权利要求中称为“保持记录”)帧期间阻断成像路径中的所有光,以及第二方法/实施方式在用于环境照明的帧之间使用传感器阵列的停滞时间。

[0116] 示例8A

[0117] 相比于人眼的最大频率感知(例如处于200Hz),使室内灯的照明以高频发出脉冲。脉冲的持续时间(占空比)通常为整个周期的一小部分(例如该周期的5%-20%,通常0.1ms-5ms),这允许更长的曝光时间用于荧光成像,如图27所示。用于使荧光信号成像的光路径在环境照明的光脉冲期间被阻断。该图示出了成像系统的阶段以及允许环境照明的光闸设备的对应时序。

[0118] 在图28中所示的实施方式中,提供室内照明/环境照明光源902,该光源902的光被耦合到激发光路径中。还在成像路径中提供附加的光闸900。在该实施方式中,出于简化原因,光闸位于光学系统200的物镜前面。然而,光闸也可以位于路径中的另一位置。可替代地,光闸设备900可以被包括在传感器阵列的正前方的成像路径中。光闸900和室内照明902二者均由控制/处理单元300来控制。

[0119] 当关闭光闸900时,光闸900阻断所有的光进入成像/检测路径且因此光不到达传感器系统200中的传感器阵列。来自源902的环境照明的操作频率不一定适应荧光成像系统的操作频率。如果成像系统以30Hz-60Hz运转来生成对于人眼的流畅的荧光和反射的图像流,则是优选的。环境照明902优选地利用较高的频率来操作,因此人眼在室内环境中感知不到任何闪烁。

[0120] 优选地,环境照明系统902的操作频率为成像频率的高次谐波。在该情况下,每个按顺序拍摄的图片等地受关闭的成像路径影响。但是也可以检测环境照明时序以及数字地校正用于略有不同地遮蔽的成像路径的影响的成像数据(若需要)。

[0121] 光闸900可以为可允许或阻断光沿着光束路径传播的任何机电设备。在优选实施方式中,环境光和光学成像路径903被如图29所示的光束斩波轮901来遮蔽,该光束斩波轮901以光闸效应的频率的一半来旋转。

[0122] 斩波轮901为以特定频率中断成像路径的良好选择且通常以比光学光闸更高的频率操作。可替代地,斩波轮可以用通过使路径不透明而保持图像记录的不同设备来交换,该

不同设备比如光电调制器、SLM、或声波-光学调制器。在另一替选中,使用偏振滤波器且使用具有光的可变偏振敏感透射的电子设备来关闭路径。这还允许有效地阻断成像路径。

[0123] 光源可以为可利用短脉冲操作的任何类型的环境光源。光源902优选地包括电子脉冲LED。这类LED很好地适合于手术室的环境照明以及可以使这类LED非常精确地以比人眼的频率高很多的频率发出脉冲。

[0124] 示例8B

[0125] 如图30所示的替选实施方式使用来自不同光源的照明光的附加阶段(第3阶段),该附加阶段一直在用于环境照明的成像设置的阶段1和阶段2之间。该阶段以其它阶段的频率的双倍进行运转。该光源可以为独立的(类似于光源902)或被包括在照明系统的光源100中。由该光源发射的光不一定用于成像,但可以主要地用于改善人眼在对象和/或周围环境中的视觉感知。

[0126] 在基础实施方式中,成像区域的照明仅被优化用于检测图像分量和图像处理,尤其用于解混不同的荧光团。通常,这类照明对于外科医生的视觉印象而言不是最佳的且可以形成低的图像对比度和非自然的视觉印象。然而,附加的第三照明阶段的光谱分布和强度是自由的以优化用户(OR中的外科医生和医务人员)的整体视觉感知和亮度,如针对所有照明阶段所累积感知的。

[0127] 在第3阶段中的照明脉冲短得足以适应两个阶段之间的成像传感器的停滞时间,如图30所示。通常,停滞时间发生在将数据从传感器200传送到控制单元300时。因此需要具有高准确度的环境光的短脉冲。如果成像系统以30Hz的频率工作,则脉冲式环境照明可以以该频率(即60Hz)的双倍工作。如果环境照明应当仅消耗1%的占空比,则脉冲的脉冲宽度应当大约170 μ s。如果环境照明消耗5%的占空比,则附加的照明阶段提供更明亮的场以及脉冲式环境照明持续时间为800 μ s。

[0128] 示例9

[0129] 在前文描述中,使用具有两个不同阶段的对象照明描述了组合式光谱和时间多路复用系统的概念。然而,本发明可以被扩展到在更详尽的成像场景中的其它阶段。这些允许例如获取关于反射图像和/或荧光图像的附加光谱信息。在如下章节中将详细地描述多阶段系统的附加示例。

[0130] 示例9A

[0131] 在图31中描述了利用4个光源在4个阶段中操作的方法。该示例具有四个不同的光源110、120、130和140以及在多个带中传输光的成像系统200。在图32中示出了光源的各自的示例性发射光谱以及成像(检测)系统200中的光传输。所有的四种光的光谱轮廓由多个光谱带组成。光1和光2的光谱带与成像系统的光谱衰减带一致,而光3和光4的光谱带与成像系统的传输带一致。如图33所示(照明的时间进程),通过四个光源110、120、130和140在4个阶段中按顺序照明样本。在每个阶段中,一种光照明对象400。在该特定示例中,光1和光2随后激发荧光。成像系统中的滤波器使反射的激发光衰减,同时传输荧光发射,以及从利用第一光和第二光的照明形成荧光发射图像。随后利用光3和光4照明对象400。光3和光4被对象反射且通过成像系统传输以形成反射光。总共记录4个图像,每个图像源自于每个照明阶段。两个荧光图像(当利用光1和光2照明时)被处理单元300组合以形成合成荧光图像,该合成荧光图像被处理以在光谱上解混荧光分量,以及两个反射图像(当利用光3和光4照明时)

被处理单元300组合以形成合成反射图像,该合成反射图像被处理以在光谱上解混反射分量。

[0132] 假设每个传感器具有3个检测通道(例如标准的RGB照相机),则在4个阶段完成以后,系统记录来自6个通道的组合的反射图像和来自6个通道的组合的荧光信息。

[0133] 存在多阶段光谱多路复用方法的各种替选。每种光的光谱轮廓不需要在光谱上与相邻光分离,但是可以在光谱上部分重叠,但不相同。唯一的必要条件是指定用于激发荧光的光应当在成像系统200的传输带内不具有光谱分量。另外,它们不必须按顺序来操作,任何次序都是可行的。另一替选可以具有用于激发的光的不同组合。例如,当利用RGB传感器将一种光用于荧光且将三种光用于反射时,可以组合荧光图像并将其分解为3个荧光分量和9个反射分量。或者当将两种光用于荧光且将一种光用于反射时,可以组合图像并将其分解为6个荧光分量和3个反射分量。

[0134] 示例10

[0135] 多光谱成像方法和系统可以通过集成到各种成像工具中来实现。在图34A所示的第一实施方式中,通过将检测器200与照相机适配器附接而将多光谱成像系统与作为物镜的变焦镜头291一起使用。照明系统100利用导光管将光传送到对象。

[0136] 在图34B所示的另一实施方式中,检测系统200连接到手术显微镜292的视频端口,且照明系统100利用导光管连接到照明端口以通过显微镜的物镜照明对象。

[0137] 在图34C所示的另一实施方式中,检测系统200可选地使用适配器连接到硬式内镜的目镜端口,以及照明系统100利用导光管连接到照明端口。

[0138] 在图34D所示的另一实施方式中,检测系统200被小型化且被集成到弹性内镜的尖端中,同时照明系统100附接到该内镜的照明端口。

[0139] 在图34E所示的另一实施方式中,检测系统200连接到弹性纤维镜的照相机端口,该弹性纤维镜使用弹性纤维束将图像从其尖端传送到其远端点,以及照明系统100连接到照明端口。

[0140] 示例11

[0141] 在下文中描述本发明的方法的几个可行应用。

[0142] a) 应用场景:血氧的成像:在下文中通过评估组织上含氧的血红蛋白与缺氧的血红蛋白(HbO和Hb)相对浓度来使示例性氧饱和成像。由于HbO和Hb具有如图35所示的不同吸收光谱,因此反射光携带可记录在系统中的光谱轮廓信息。通过在光谱上解混多个反射分量,可以生成a)在视觉系统中待显示的RGB图像,b)HbO和Hb分量的体内分布的附加图。氧饱和图通过HbO与总的血氧饱和度之间的比率来计算。

[0143] b) 应用场景:癌性病变、解剖特征、或官能条件的检测

[0144] 另一设想的应用为使用系统使用于体内临床诊断成像的可注射的荧光造影剂的体内分布可视化。这些荧光造影剂可以为无定位的,比如用于突出血管化、血液灌注等的荧光蛋白或吲哚菁绿,或以通过结合到与组织中的相关官能或病理活动相关联的分子位点而可利用荧光突出疾病(诸如癌症)、医疗状况(诸如炎症)、或解剖特征(诸如神经和淋巴结)的方式来定位。一个示例为在脑部手术期间使用5-ALA(诱导在癌细胞中产生原卟啉的化合物)对恶性胶质肿瘤成像。这些应用可以涉及将发明方法集成在医学成像系统中,该医学成像系统比如手术显微镜、内窥镜、腹腔镜、胃窥镜、气管镜、检眼镜、眼底照相机等。

[0145] c) 应用场景:多上报器成像

[0146] 特别感兴趣的是将发明的实时多光谱成像技术应用在利用双上报器诊断方法的临床应用中。使用两个或更多个荧光探针可以提供关于不同生物标记的多样信息以获取组织的病理或官能状态。不同药剂(其在解混之后作为图像分量)的体内分布的组合可以增强待成像的目标(即病变)的可视化,提高病理特征的检测敏感度和特异性。

[0147] d) 应用场景:机器检查

[0148] 实时多光谱荧光成像的附加设想的应用场景是关于机械检查。由于内部封闭而难以在视觉上检查的引擎或机械部分(诸如齿轮)可能具有损害,比如小裂纹。在利用荧光溶液冲洗引擎的内部之后,可以使用内窥镜使这些结构缺陷可视化,以在内部检查保持有荧光流体的裂纹的位置。实时多光谱成像可以同时提供颜色反射图像和荧光图像。

[0149] e) 应用场景:pH敏感的染料

[0150] 化学环境可以影响荧光染料的发射或激发。改变染料吸收和发射特性的这些参数之一为pH值。

[0151] 发射敏感的染料的情况:

[0152] 优选的是,以检测在光谱上对pH值的变化敏感的信号的方式来优化各自滤波器的透射带。还优选的是,具有极大地取决于pH值的检测通道,而其它大部分对pH值的变化不敏感。

[0153] 这例如可以通过调整发射滤波器频带来实现,使得各自测量的荧光带的中心匹配染料发射光谱在pH值变化时改变最大的光谱点,或染料发射光谱最低程度地取决于pH值的光谱点。

[0154] 激发敏感染料的情况:

[0155] 优选的是,以检测在光谱上对pH值的变化敏感的信号的方式来优化各自滤波器和光源的激发带。还优选的是具有激发带使得一些检测通道极大地取决于pH值,而其它通道大部分对pH值的变化不敏感。

[0156] 激发滤波器带应当被调整,使得各自带的中心匹配染料激发光谱在pH值变化时改变最大的光谱点,或染料激发光谱最低程度地取决于pH值的光谱点。

[0157] 以如下这类方式在多光谱上记录、在光谱上解混和处理记录的图像:这些图像使pH值的空间分布可视化。

[0158] f) 应用场景:通过PPIX发射光谱中的差别来区分肿瘤浸润区和实体肿块

[0159] 对于肿瘤诊断,对患者实施5-ALA,导致原卟啉IX(PPIX)在肿瘤组织中的积累。物质PPIX既为荧光染料、又为用于光动力治疗的药剂。

[0160] PPIX的荧光发射光谱根据肿瘤内部的位置和微环境来改变。更精确地,相比于实体肿块,浸润区展现不同的荧光发射光谱。可以使用该光谱差别,以便在肿块和浸润区之间区分。

[0161] 在620nm和635nm处具有最大值的两个不同峰值的PPIX光谱可以被记录且利用本发明的系统来解混。

[0162] 另外,也可以记录其它荧光团和自发荧光。

[0163] g) 应用场景:自发荧光

[0164] 感兴趣的应用是内在组织自发荧光的光谱检测,该自发荧光为通常在不实施荧光

造影剂(例如荧光团)的情况下所发射的荧光。组织内在的自发荧光归因于组织中存在或产生的各个分子,组织诸如NADPH、黄素、胶原蛋白、弹性蛋白等。存在、产生、积累或其它浓度属性被链接到各种组织特征,诸如解剖特征、官能特征和病理特征。根据本发明的组织自发荧光的多光谱成像和相关联的化合物的光谱解混可以揭示组织的帮助评估或诊断医疗状况的特征或特性。自发荧光的多光谱成像和解混可以利用系统管理的荧光分子而一起发生。

[0165] h) 应用场景:视网膜成像

[0166] 可以通过眼睛使视网膜成像。目前,该成像模式被用在主要出于视网膜本身的诊断目的的临床实践中。

[0167] 眼睛将透明窗口提供给在视网膜血管中直视的主体的血管。利用根据本发明的视网膜的多光谱成像和光谱解混,可以识别存在于视网膜中或在其血管中循环的荧光分子。这些荧光分子可已经被系统管理,以自由地循环或瞄准细胞(可能为转移性癌细胞)、微生物、病毒或分子。多光谱成像和解混可以识别这些物质,这些物质通常可以提供关于血液循环或目标的循环的信息,这可以帮助评估“患者”的官能或病理状态。因此可以使用视网膜成像获得关于视网膜自身的信息以及还获得关于在血液中循环的化合物的信息。

[0168] i) 应用场景:机器人手术

[0169] 多光谱成像和系统的感兴趣应用为将其与外科手术机器人系统组合。首先,它可以使外科医生利用在反射色域中或在(自发)荧光域中关于组织解剖、官能或疾病的视觉多光谱信息来操作。在第二层面上,可以提供提高机器人操作的安全性的输入,例如禁止医生意外损伤(即切割)组织(例如神经)。在第三层面上,它可以直接向自动化的机器人手术过程提供输入和/或反馈,这降低了人员控制或使人员控制最小化。

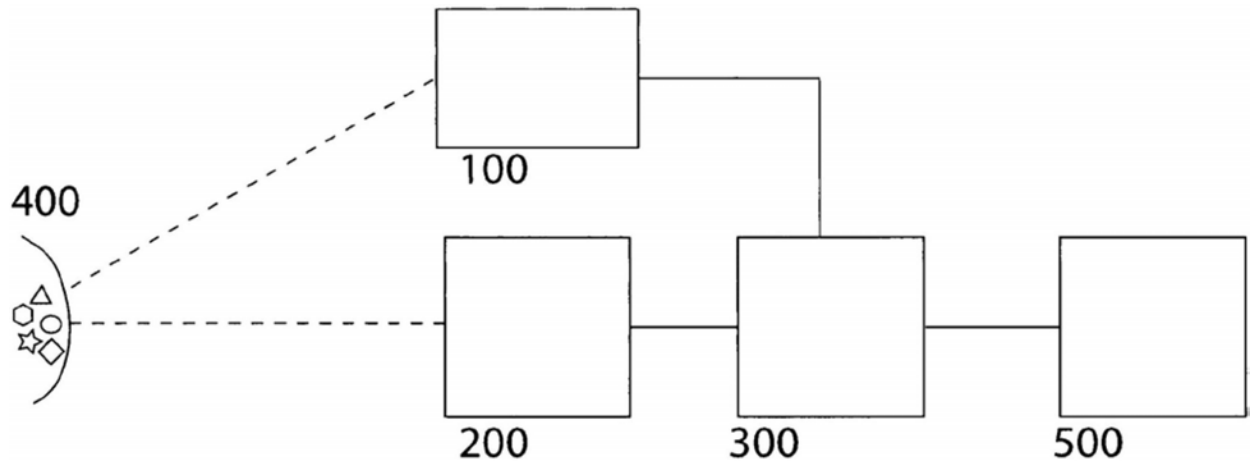


图1

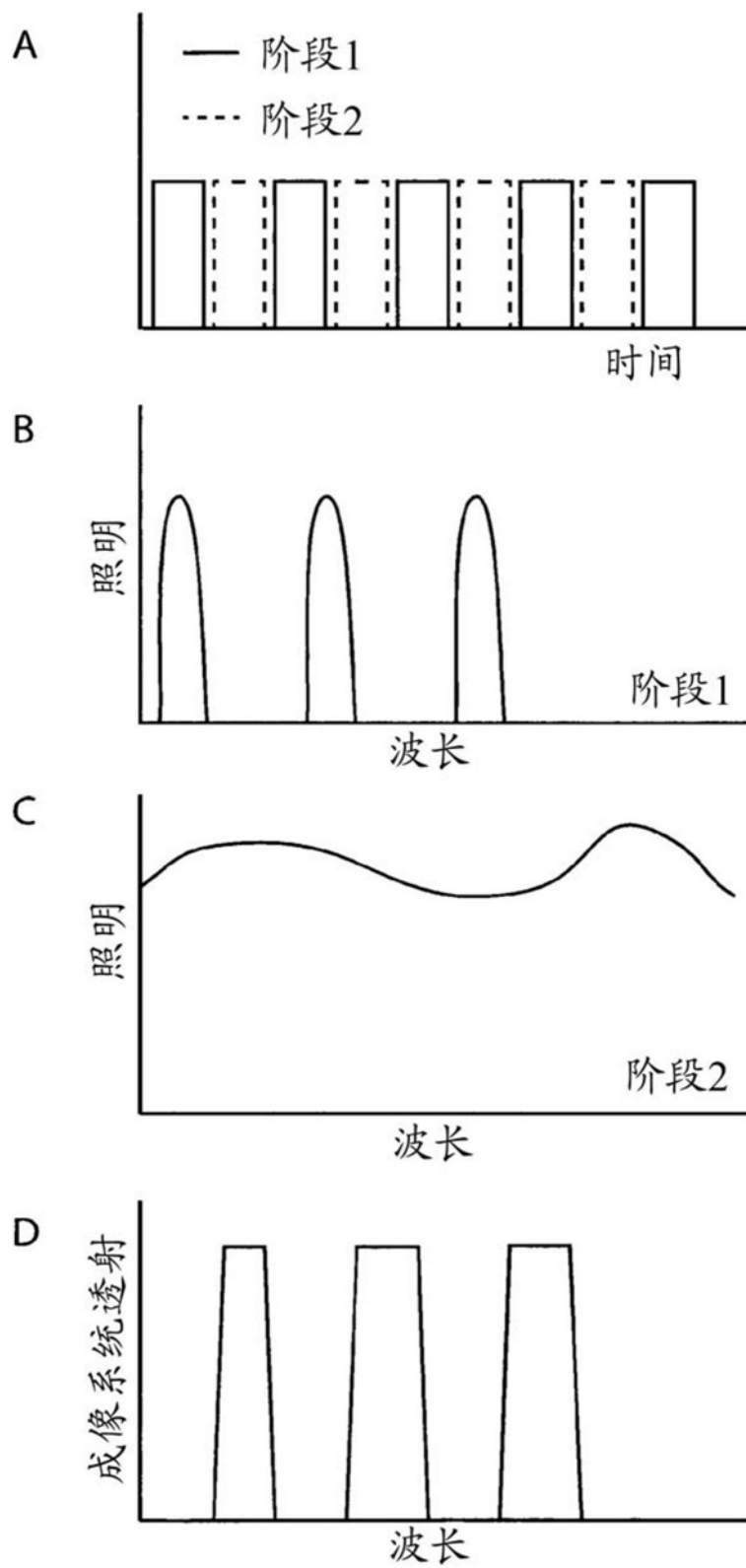


图2

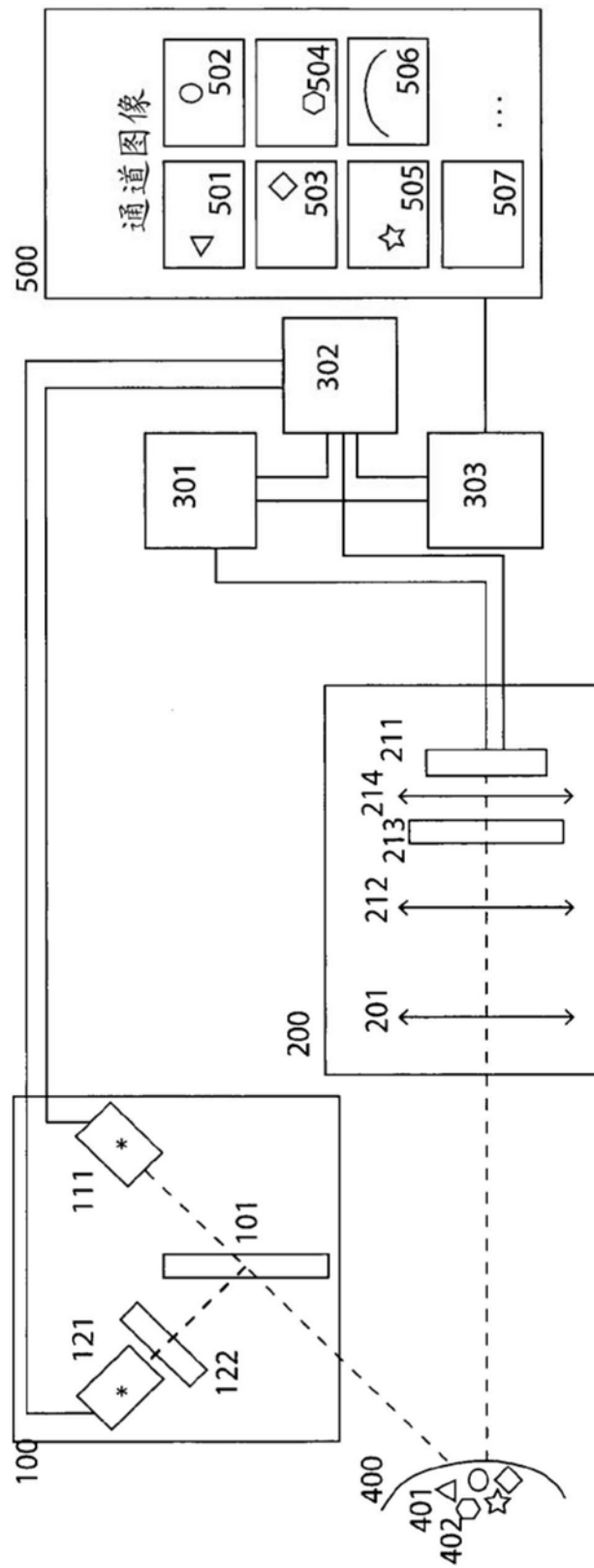


图3

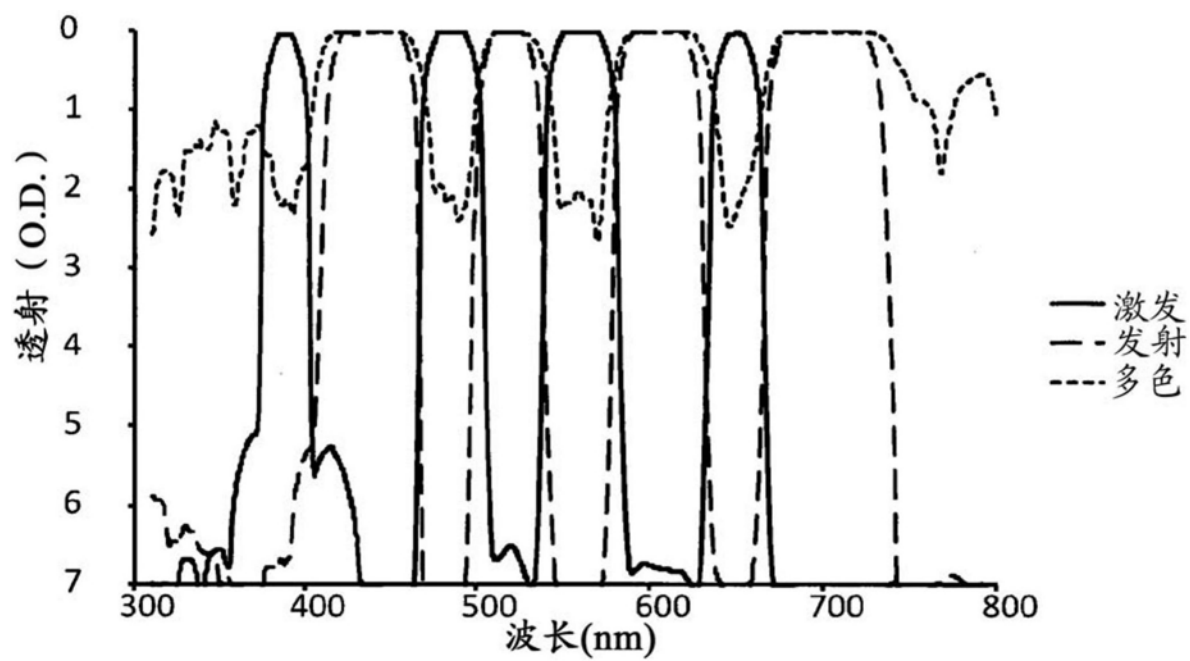


图4

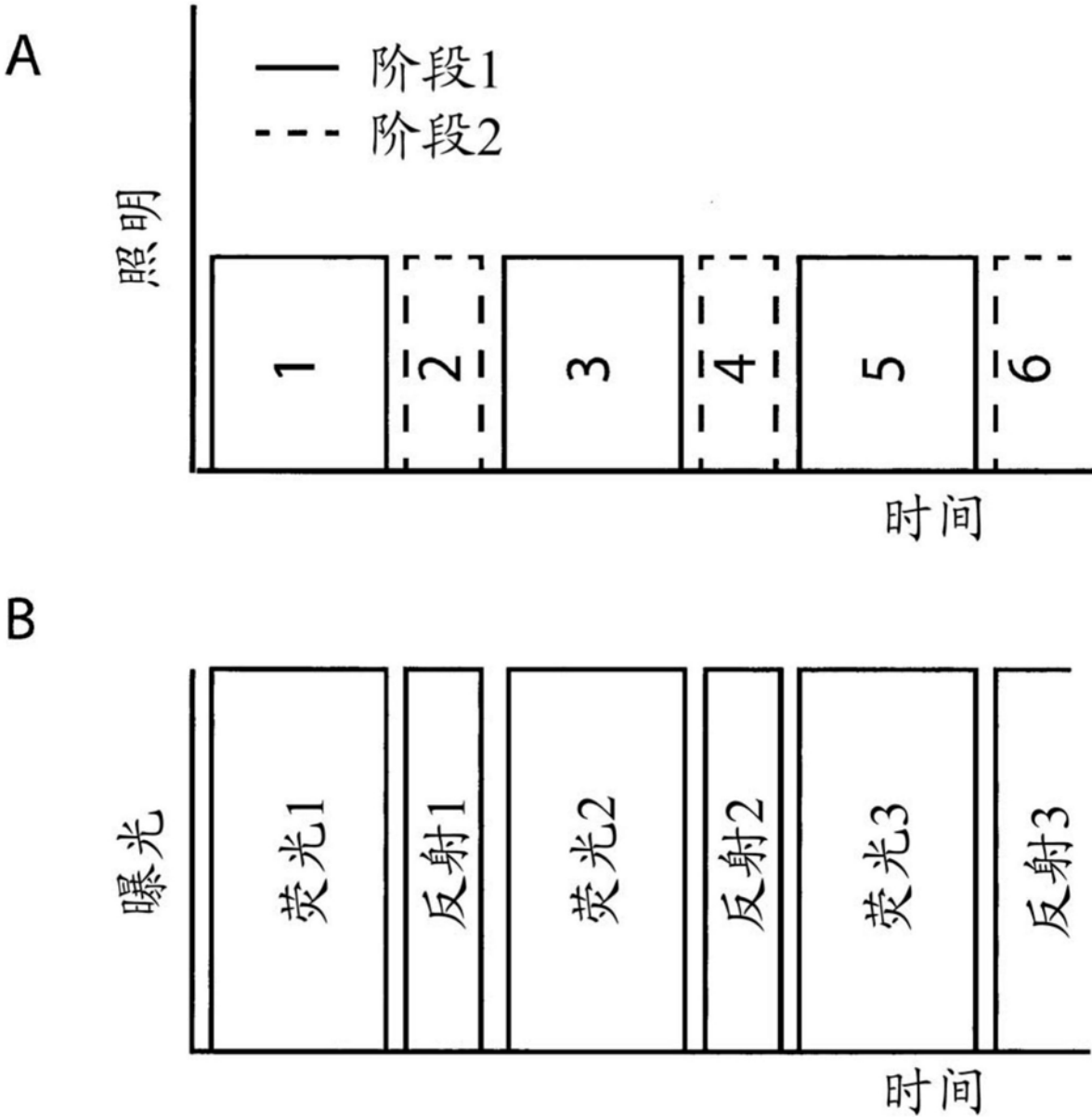


图5

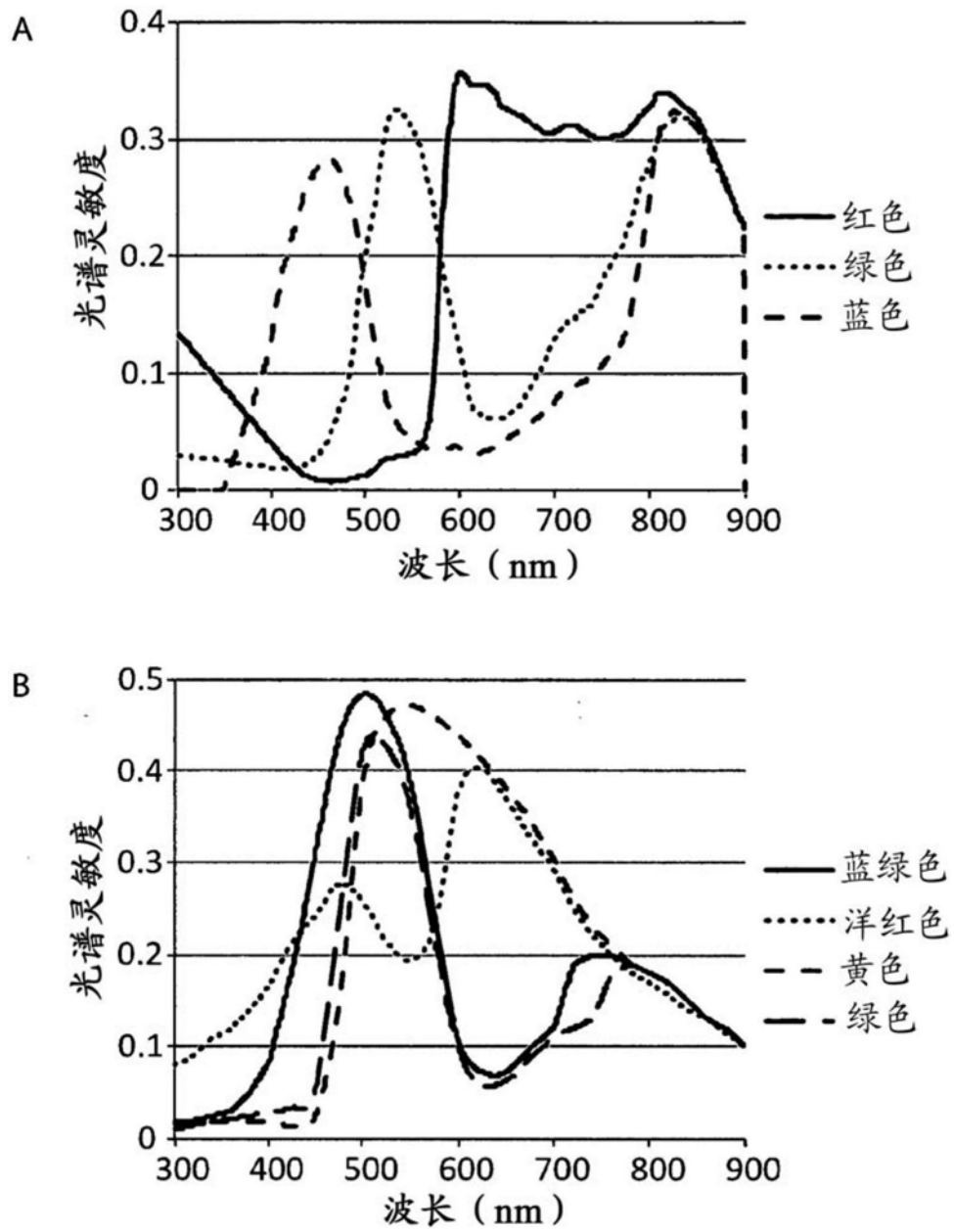


图6

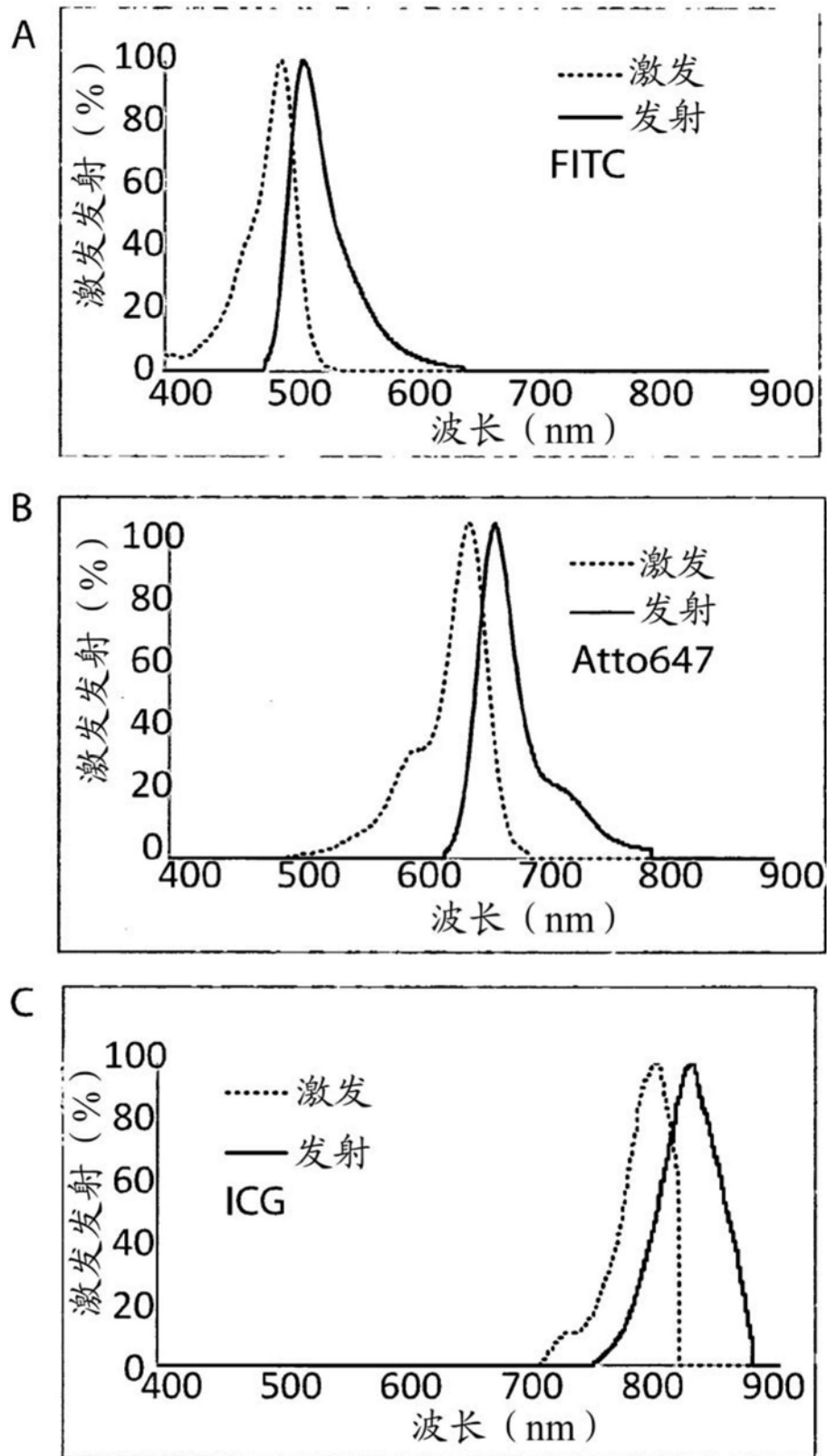


图7

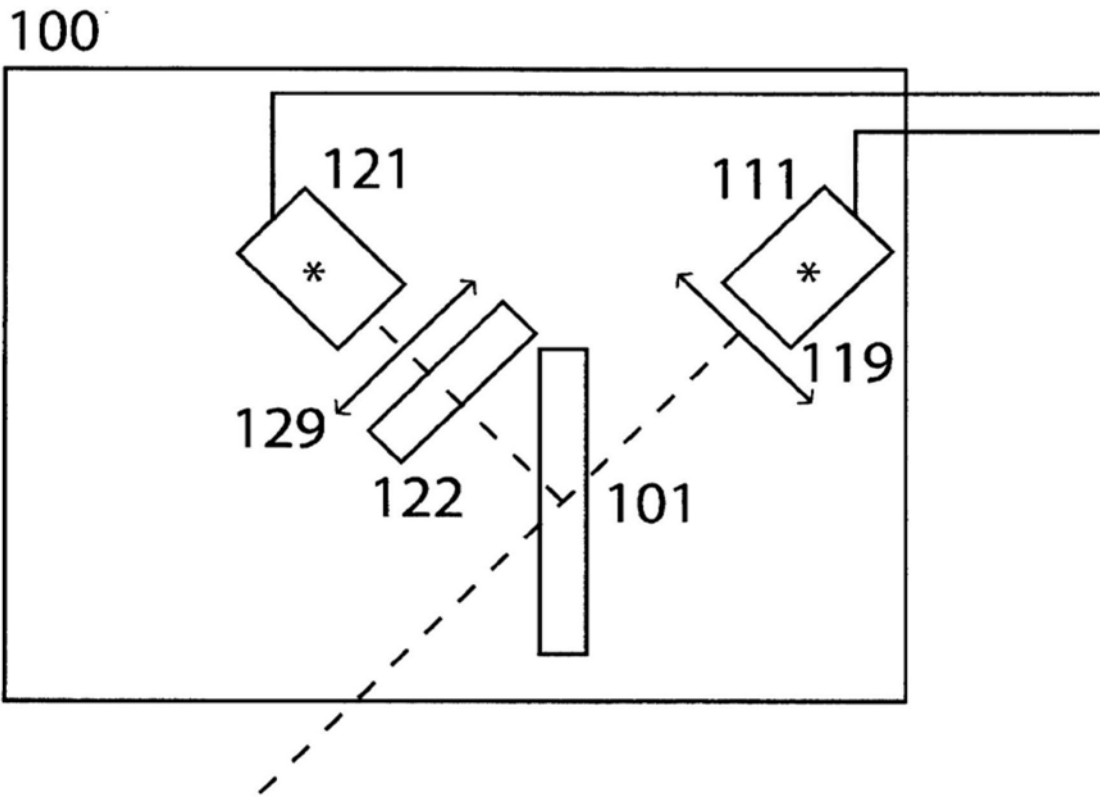


图8

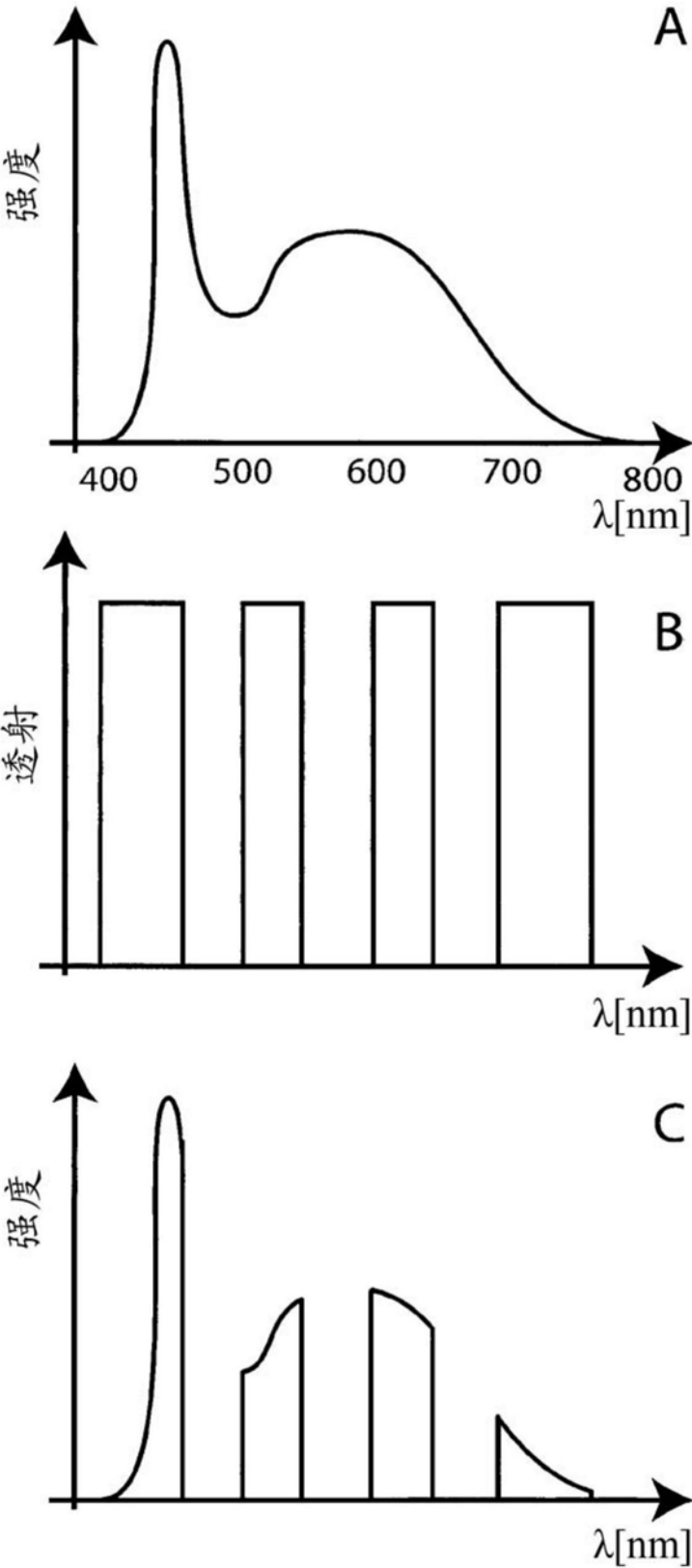


图9

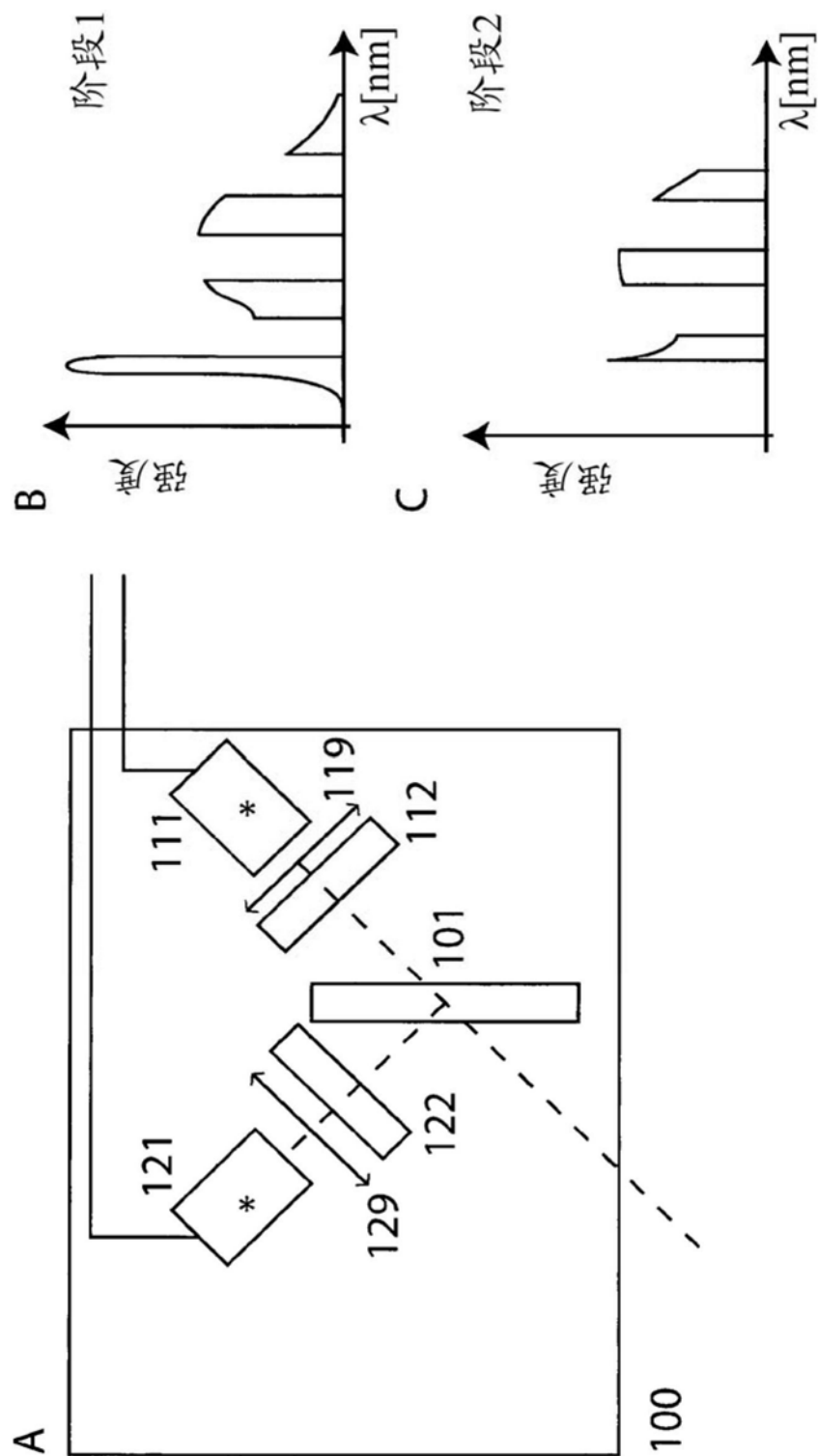


图10

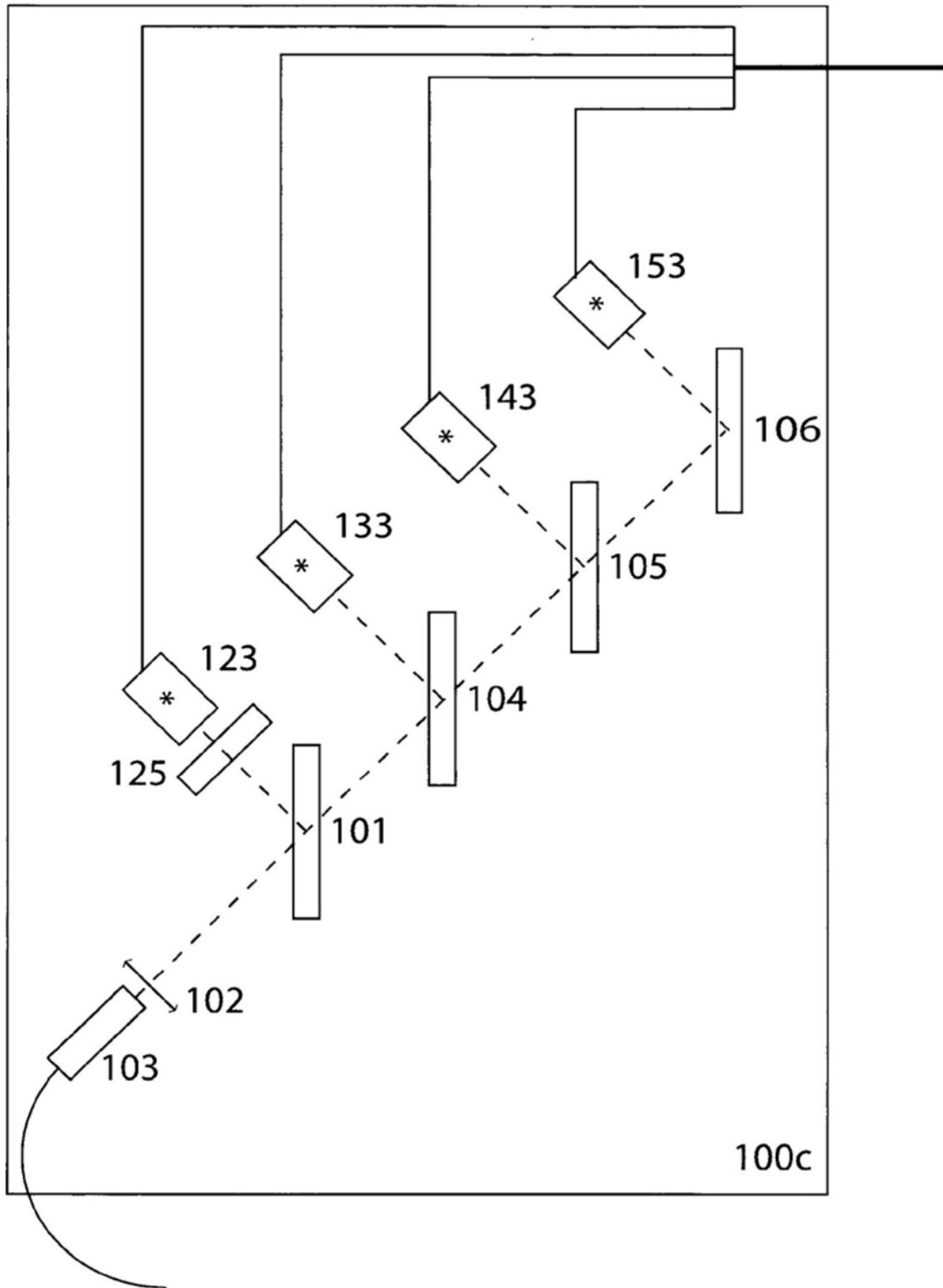


图11

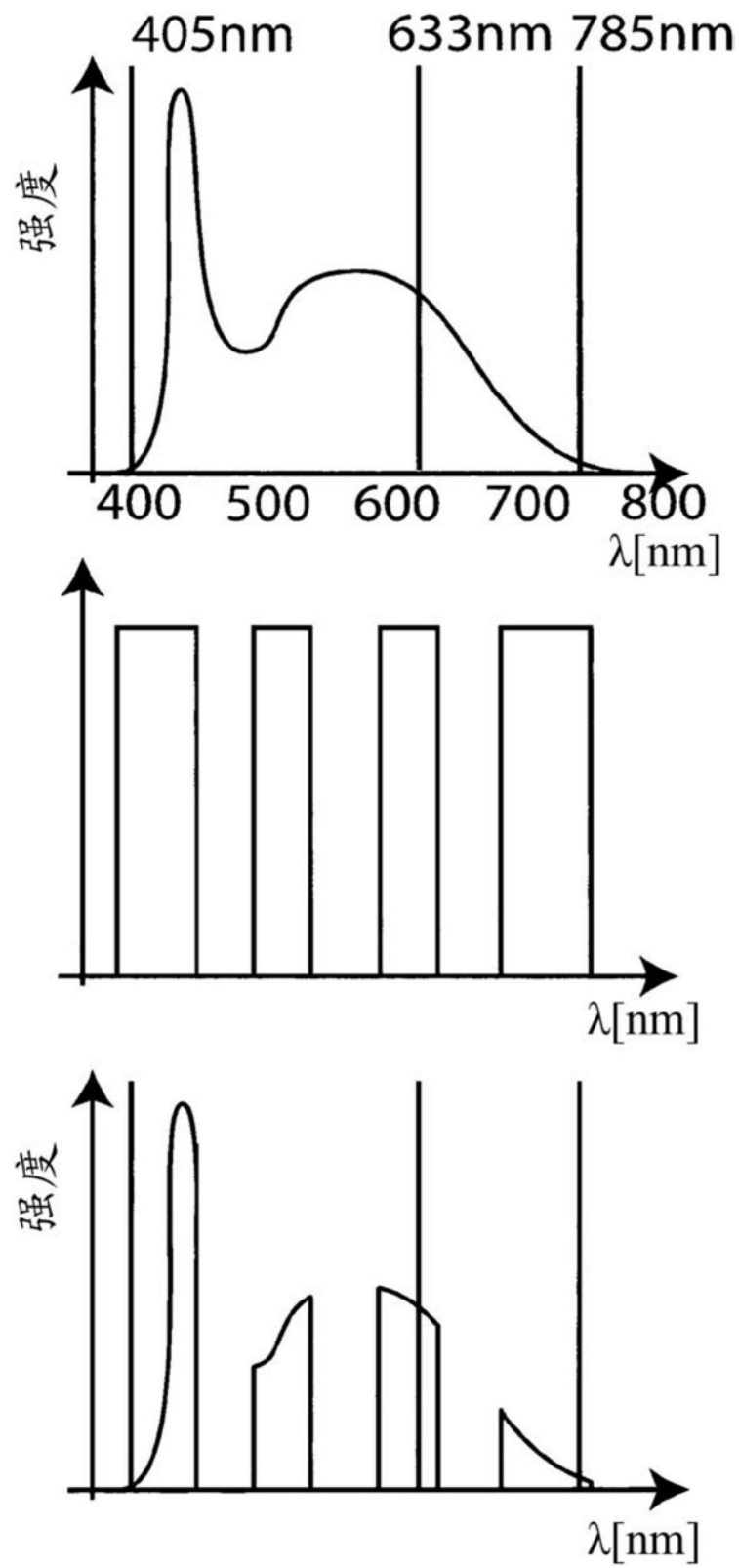


图12

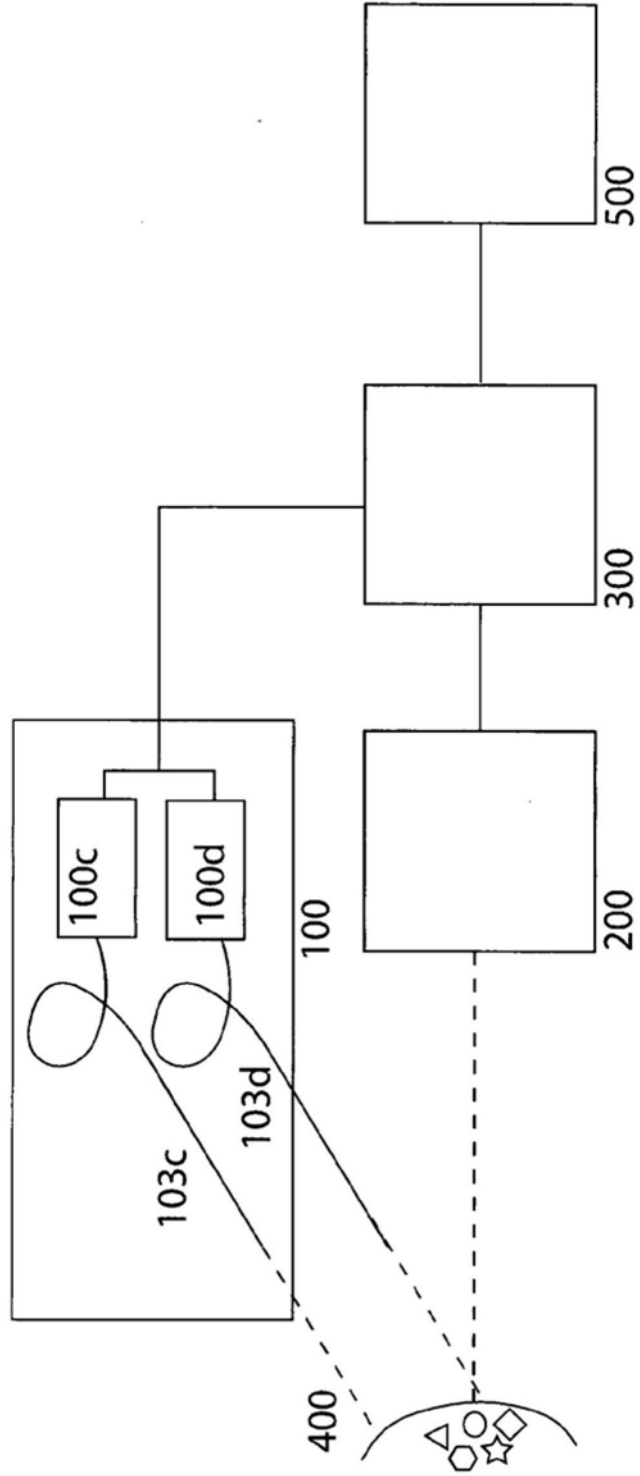


图14

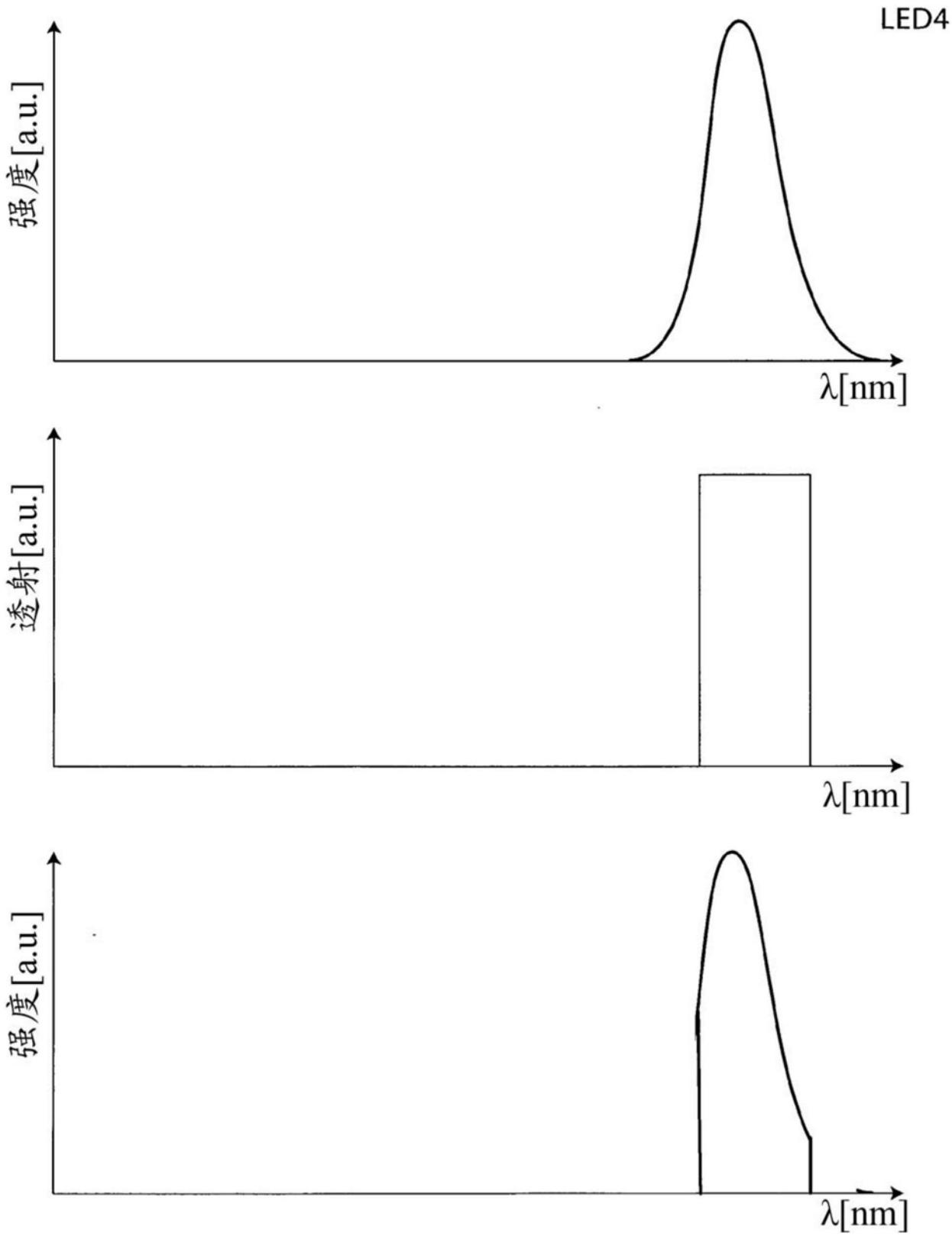


图15

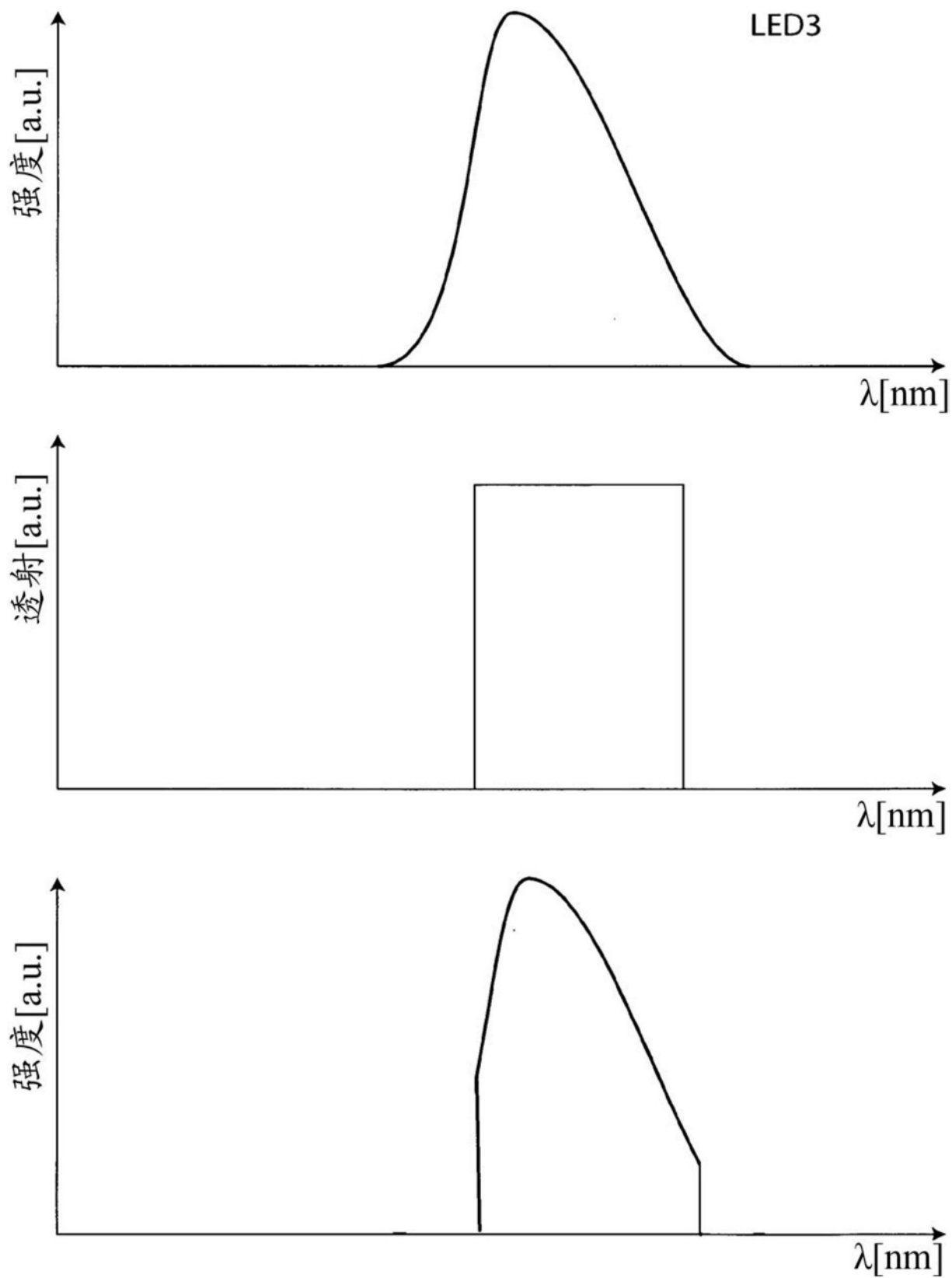


图16

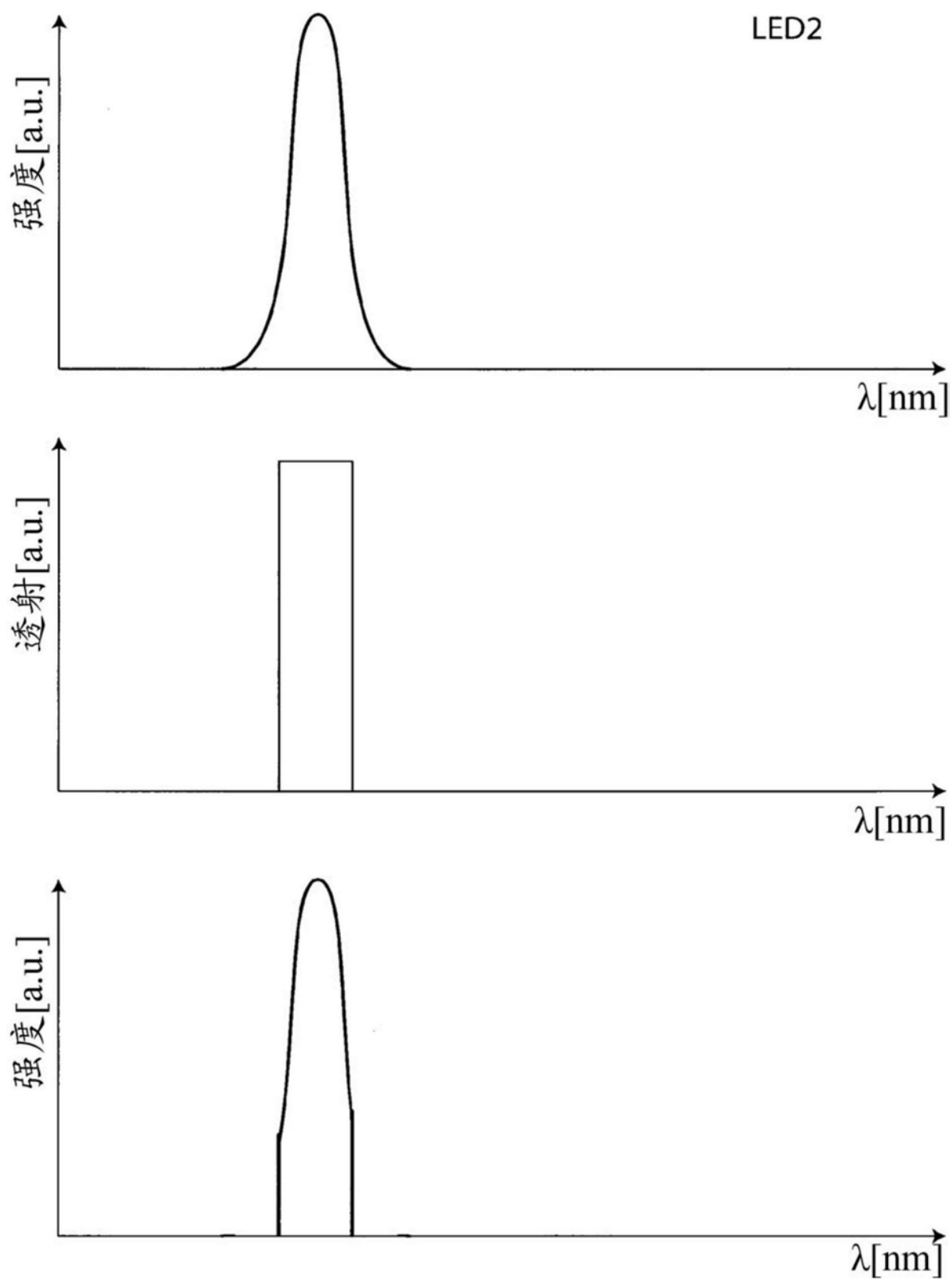


图17

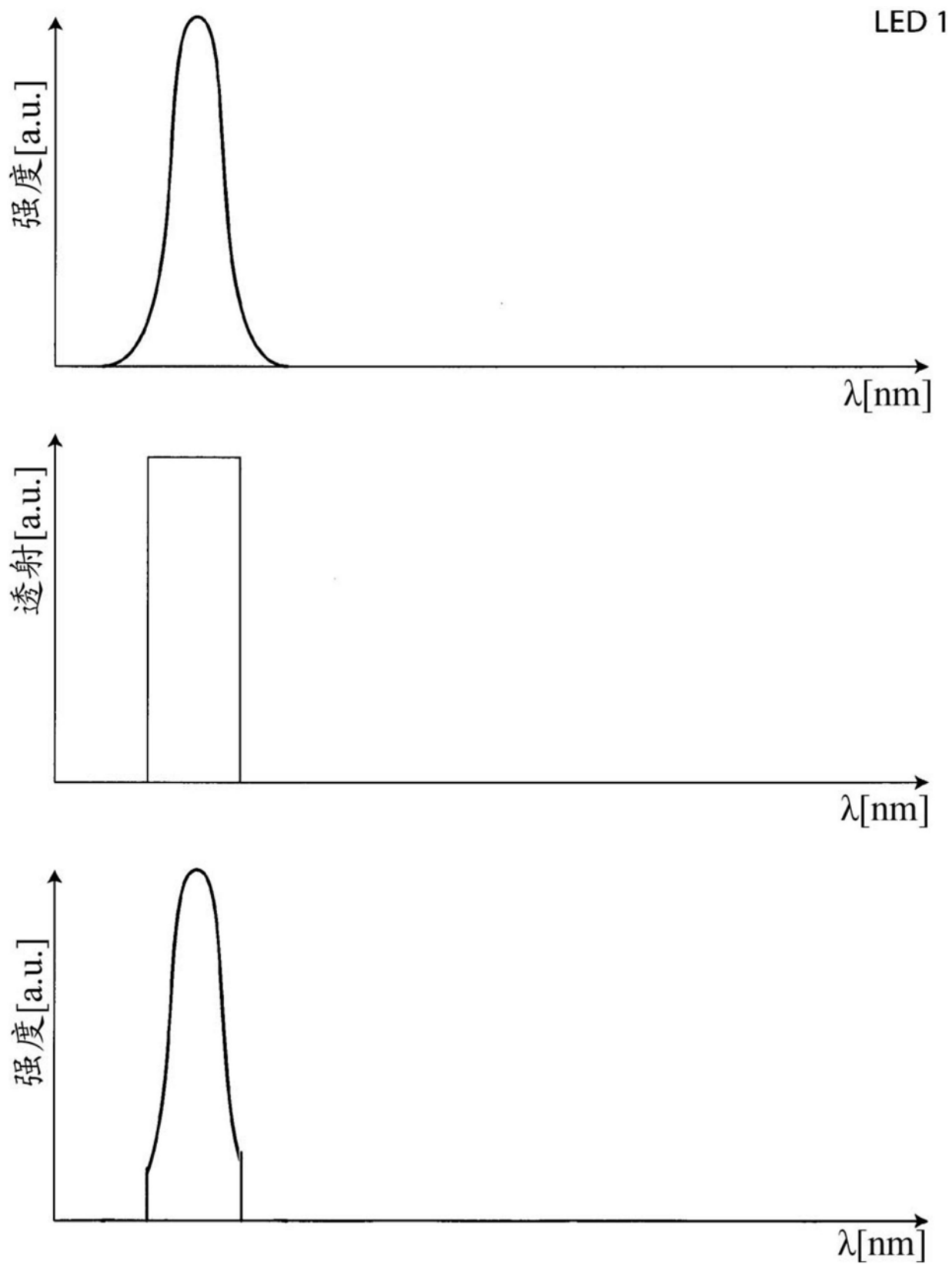


图18

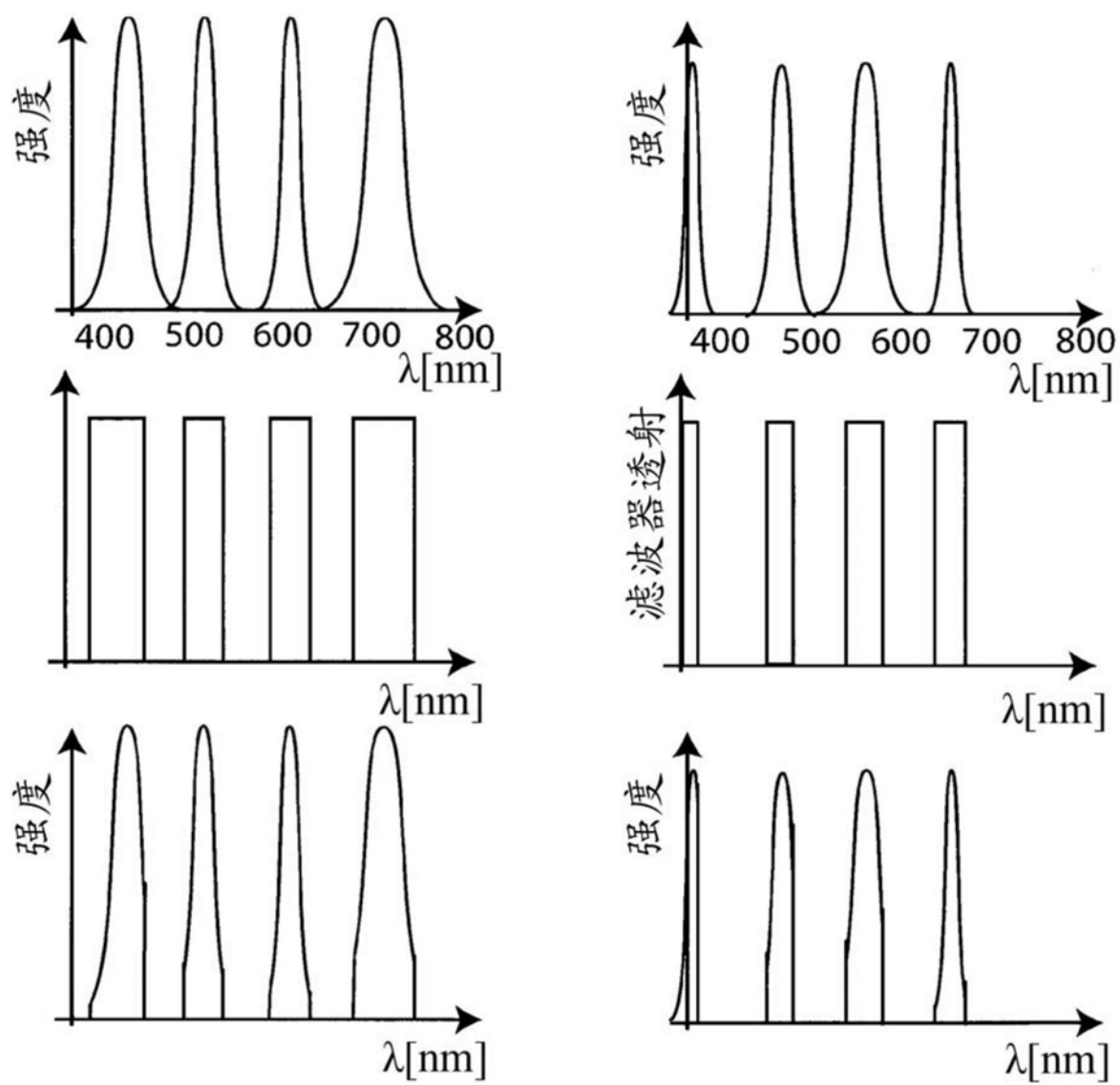


图19

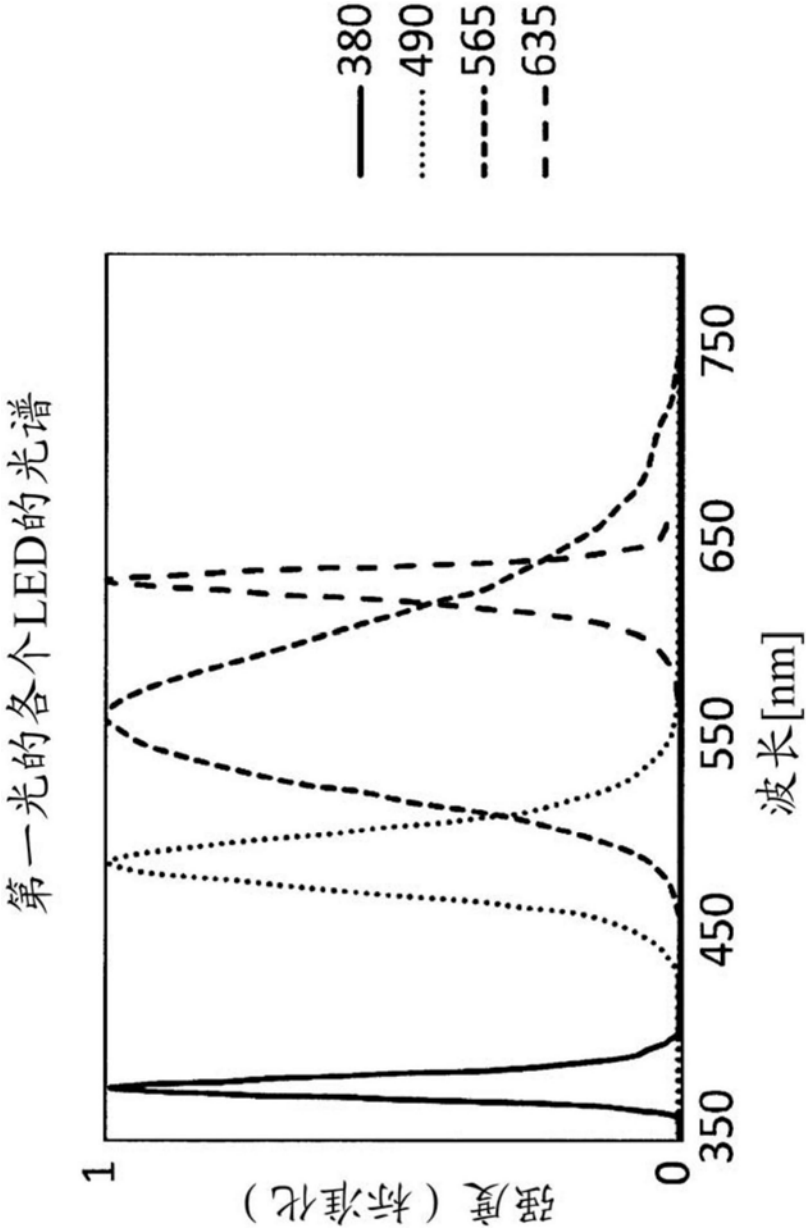


图20

滤波之后的第一光的LED的光谱

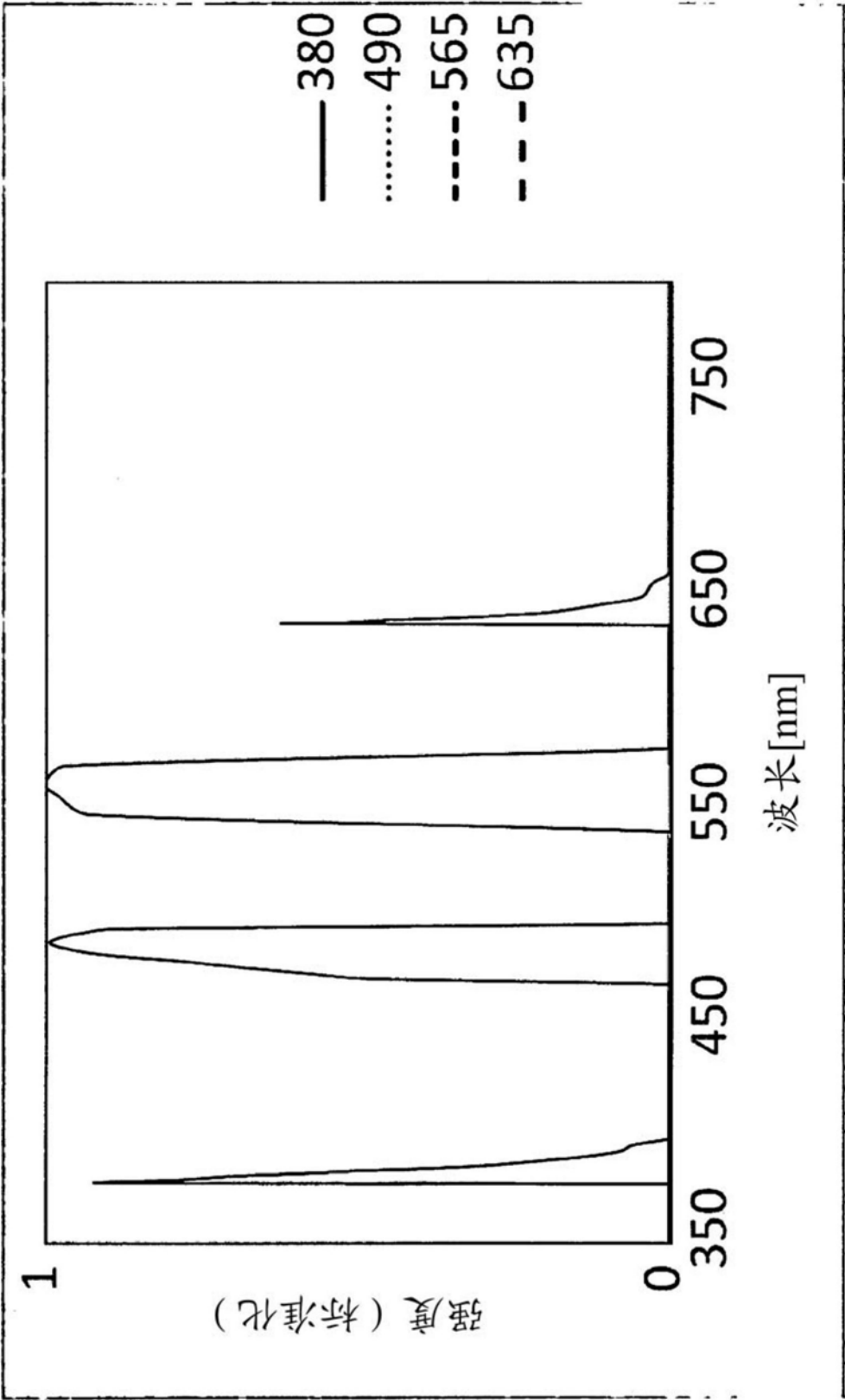


图21

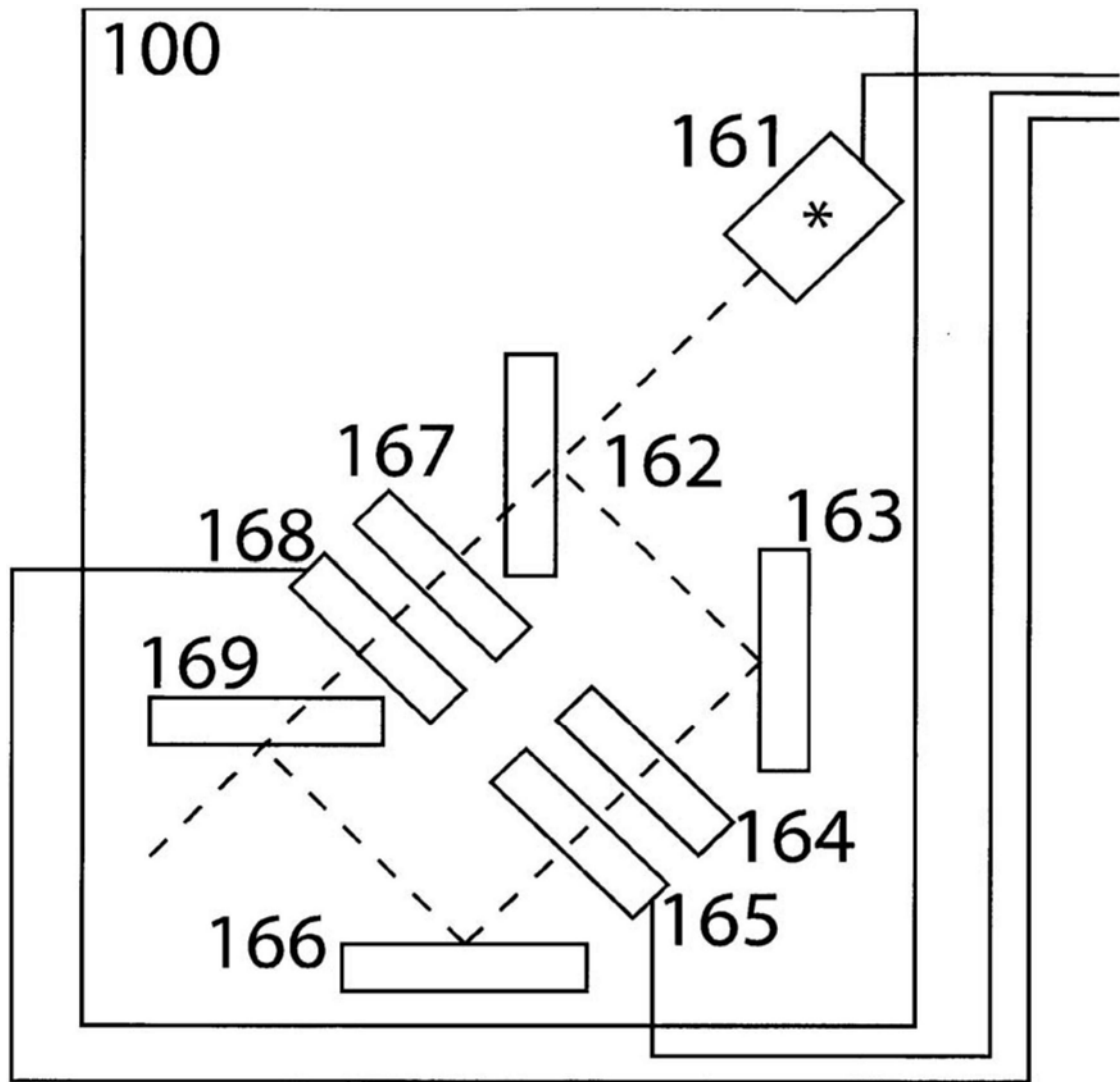


图22

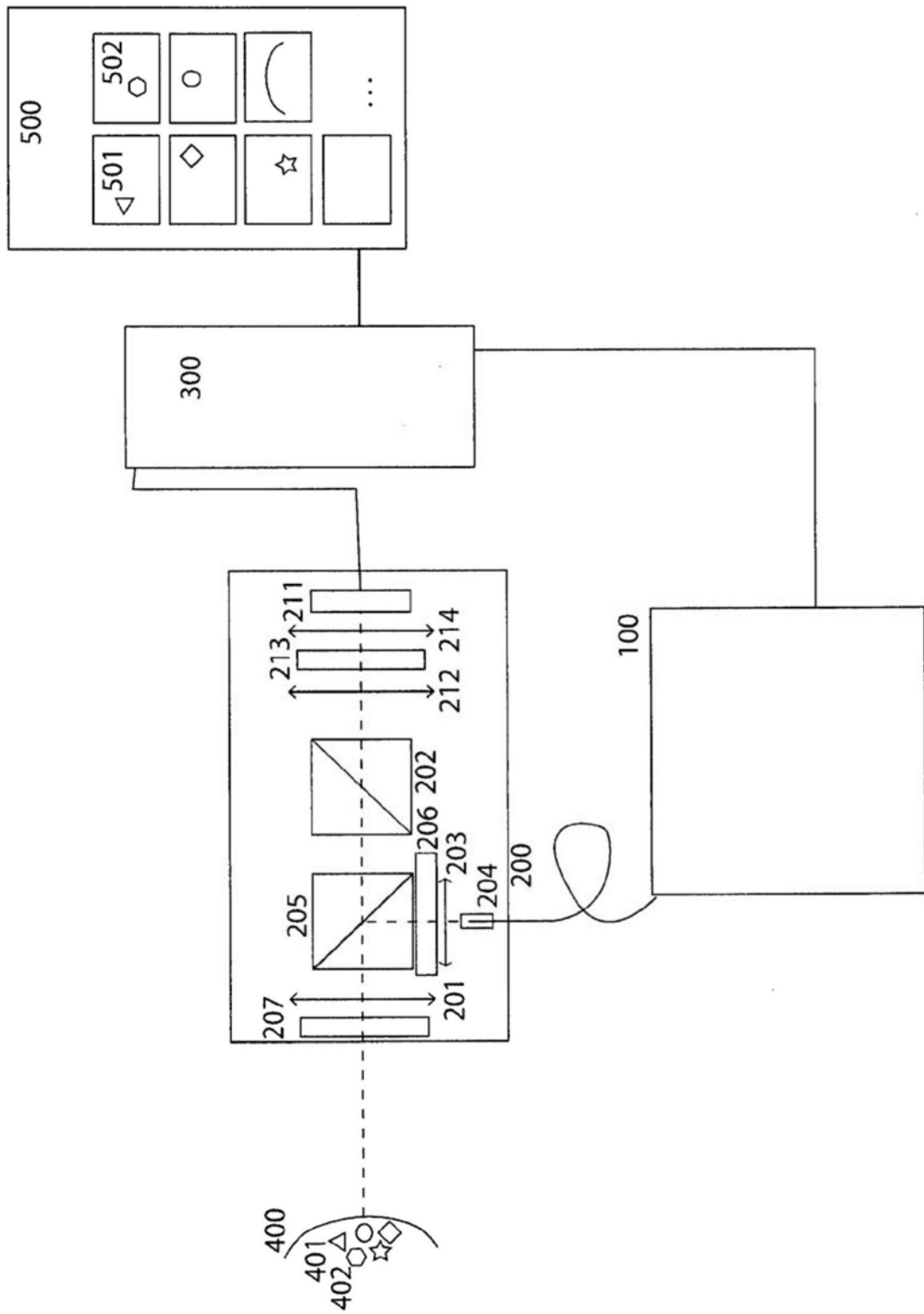


图23

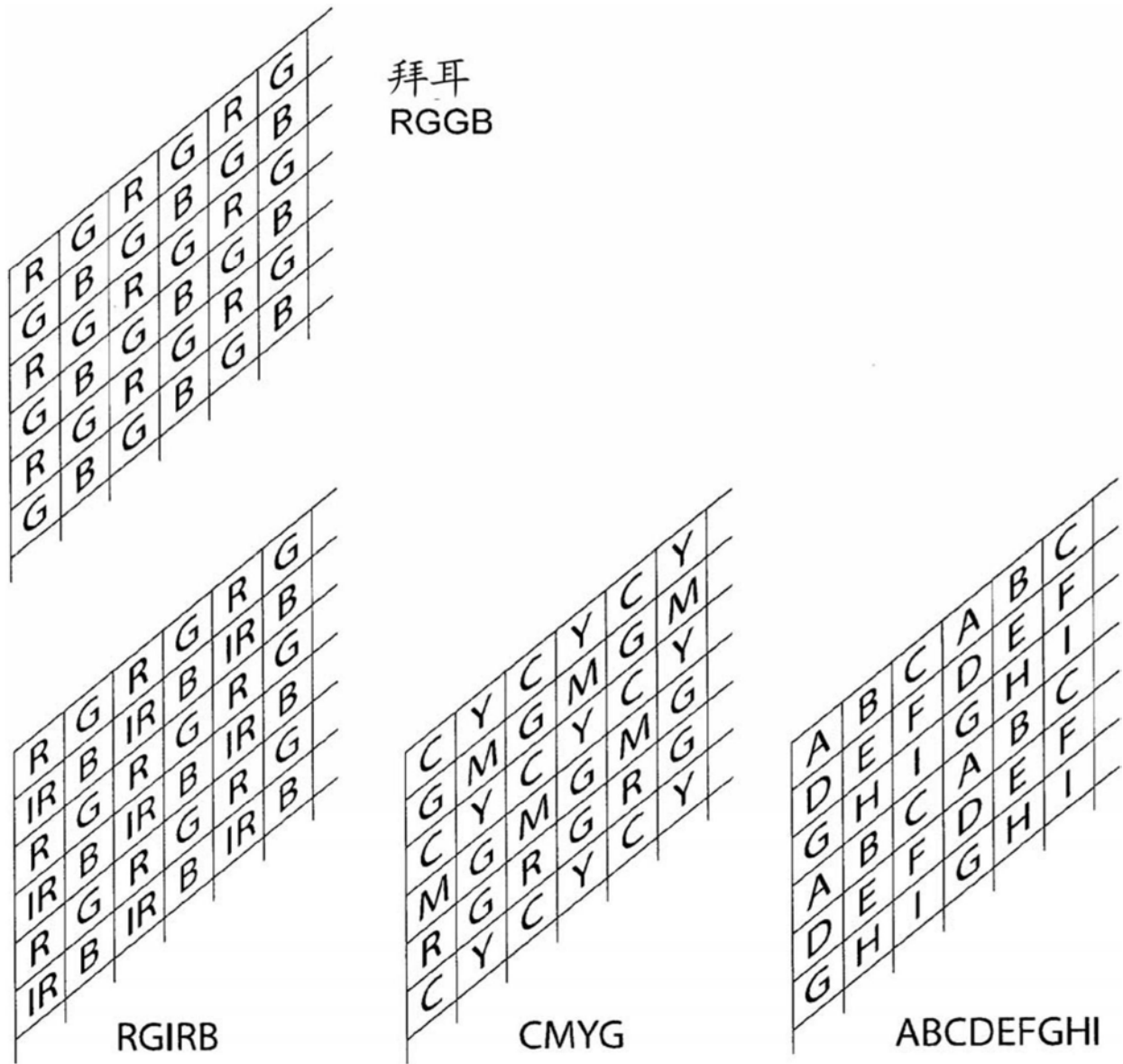


图24

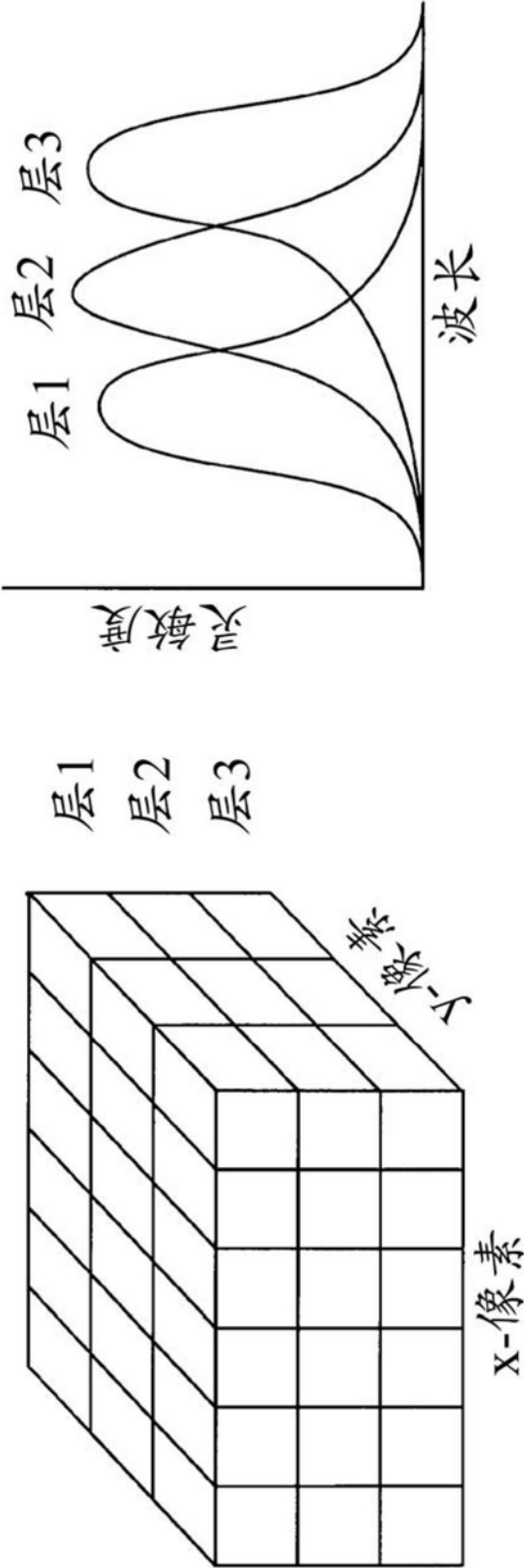


图25

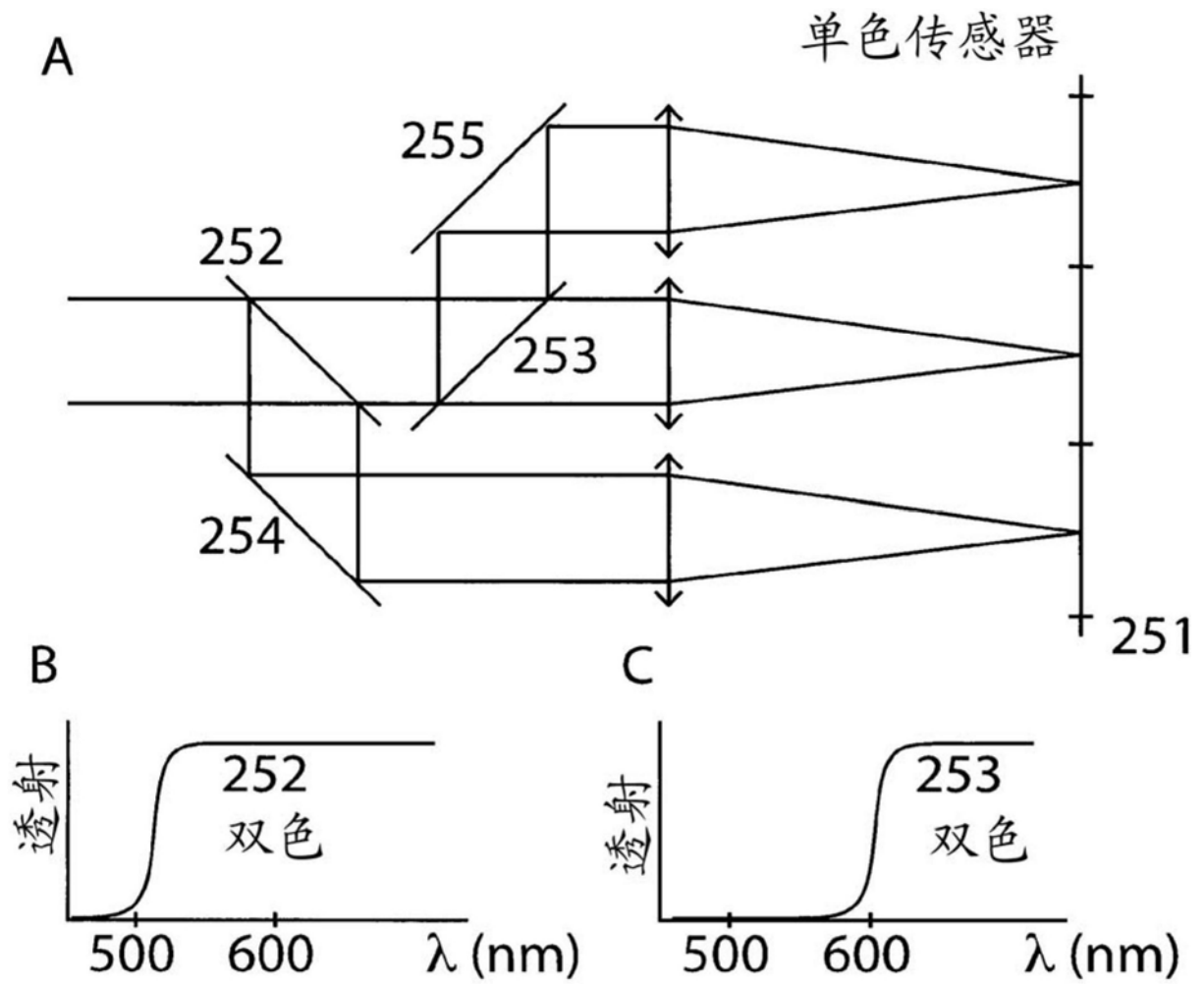


图26

时间和光谱多路复用

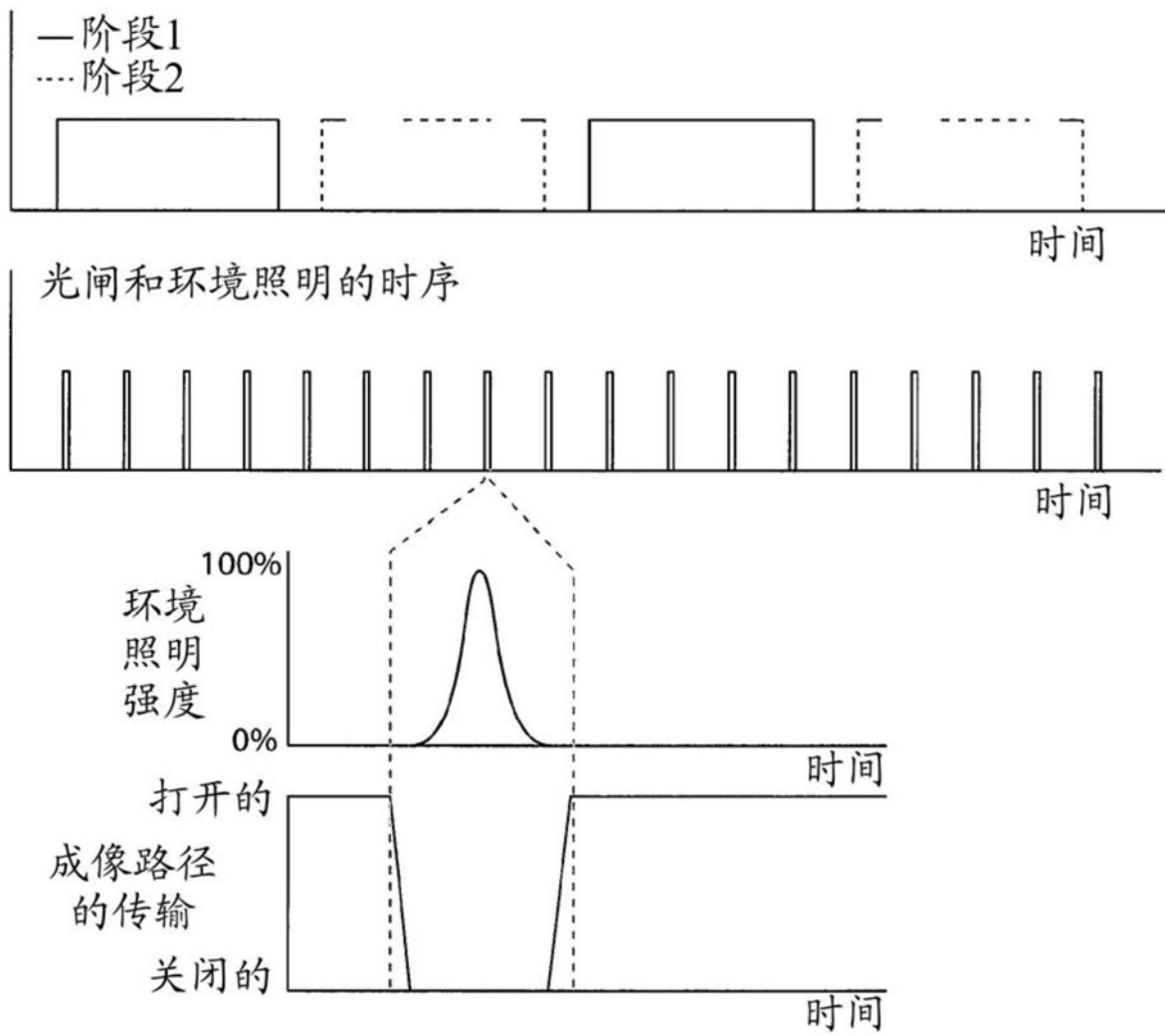


图27

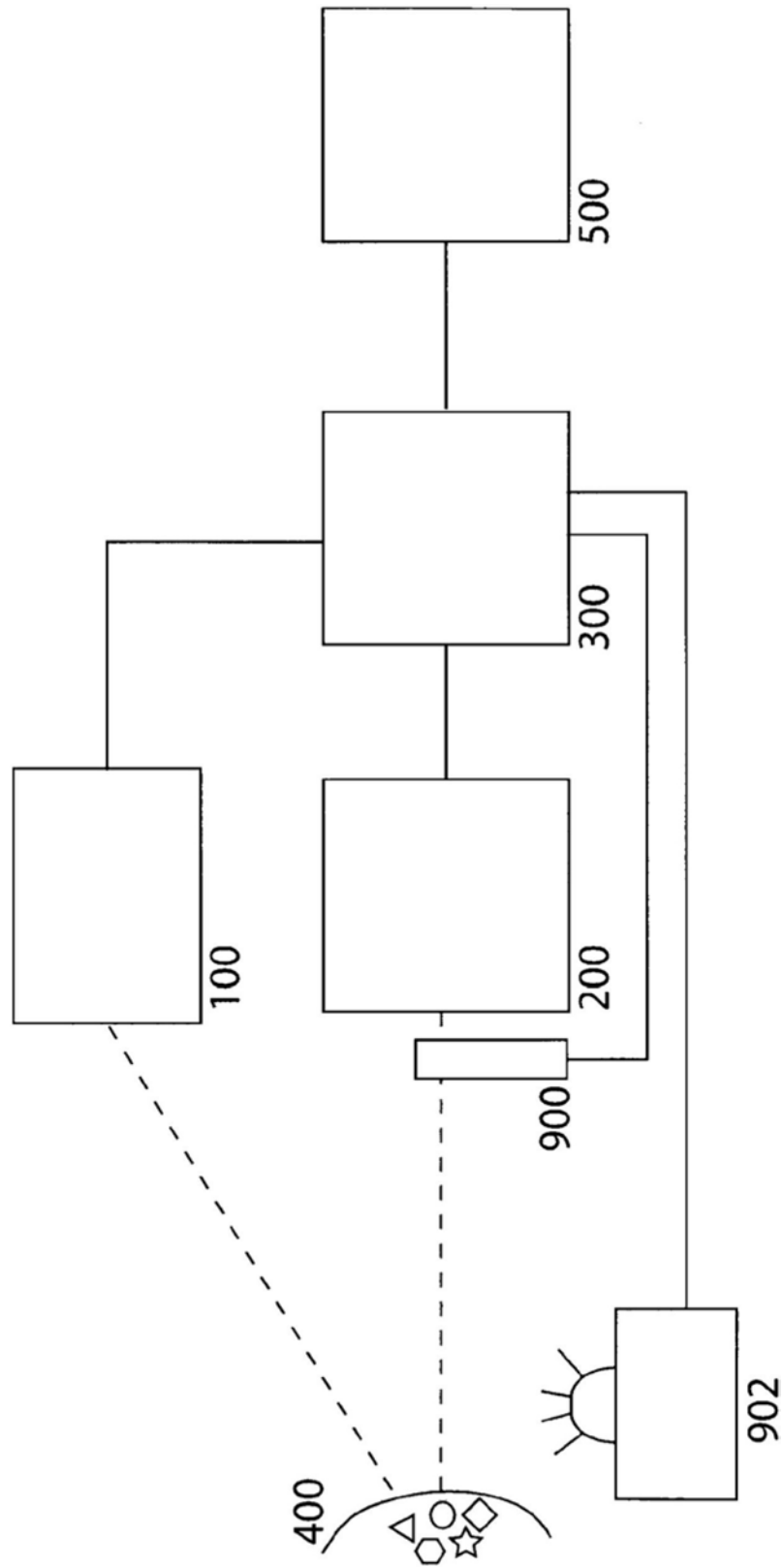


图28

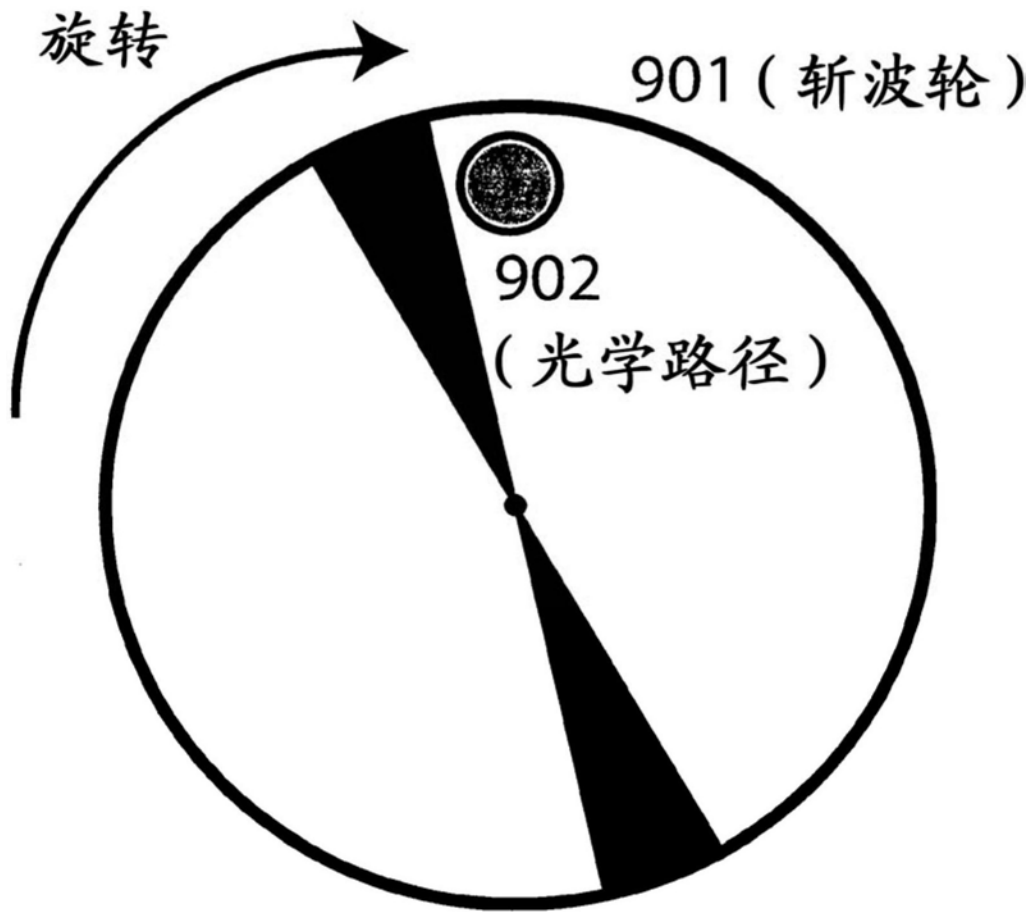


图29

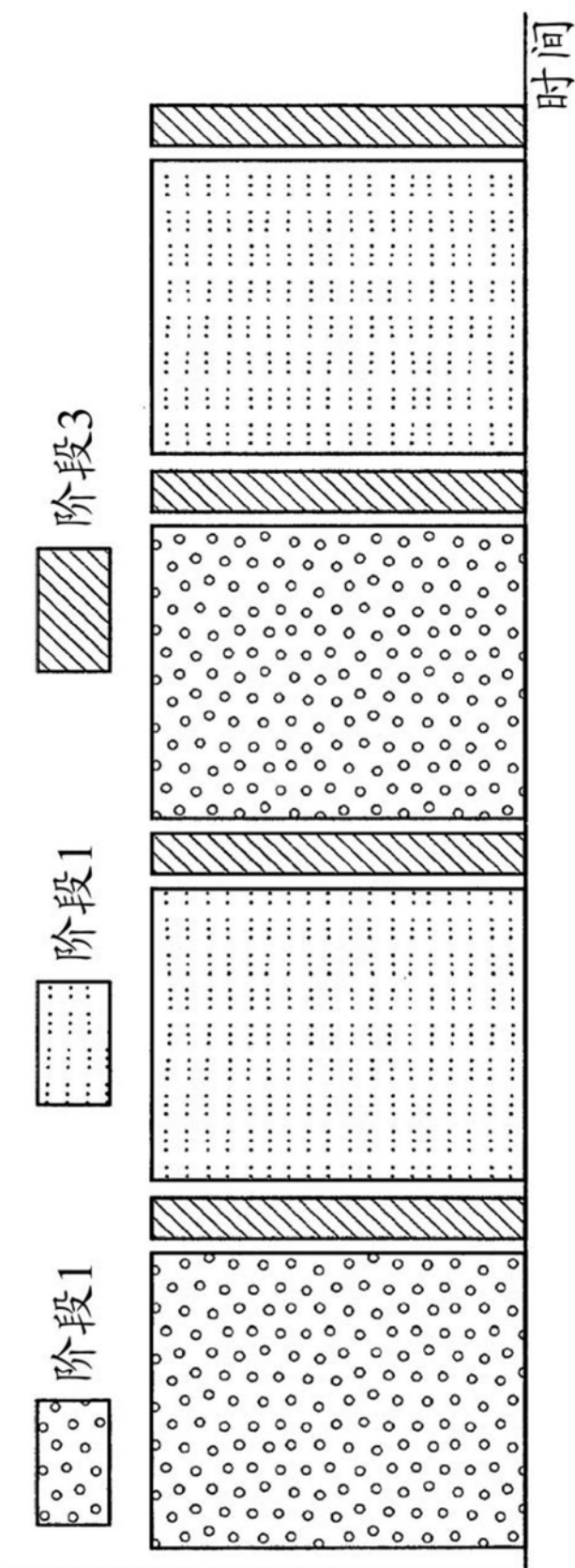


图30

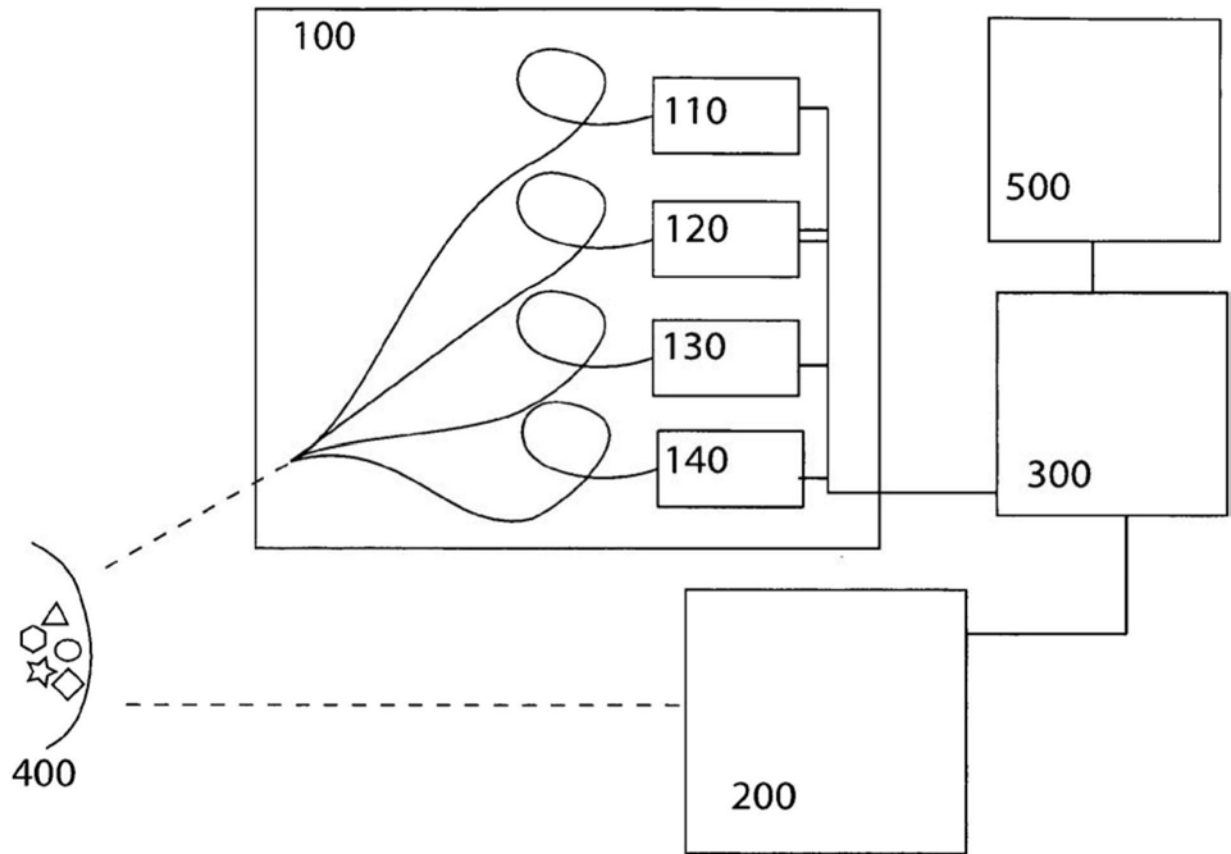


图31

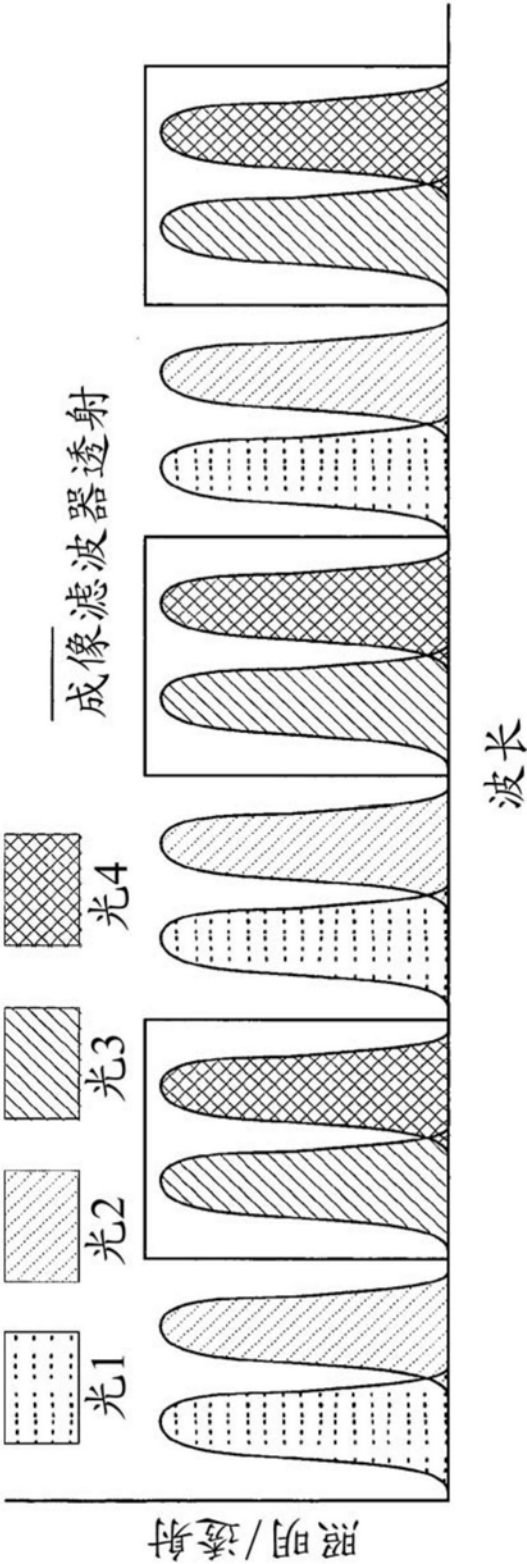


图32

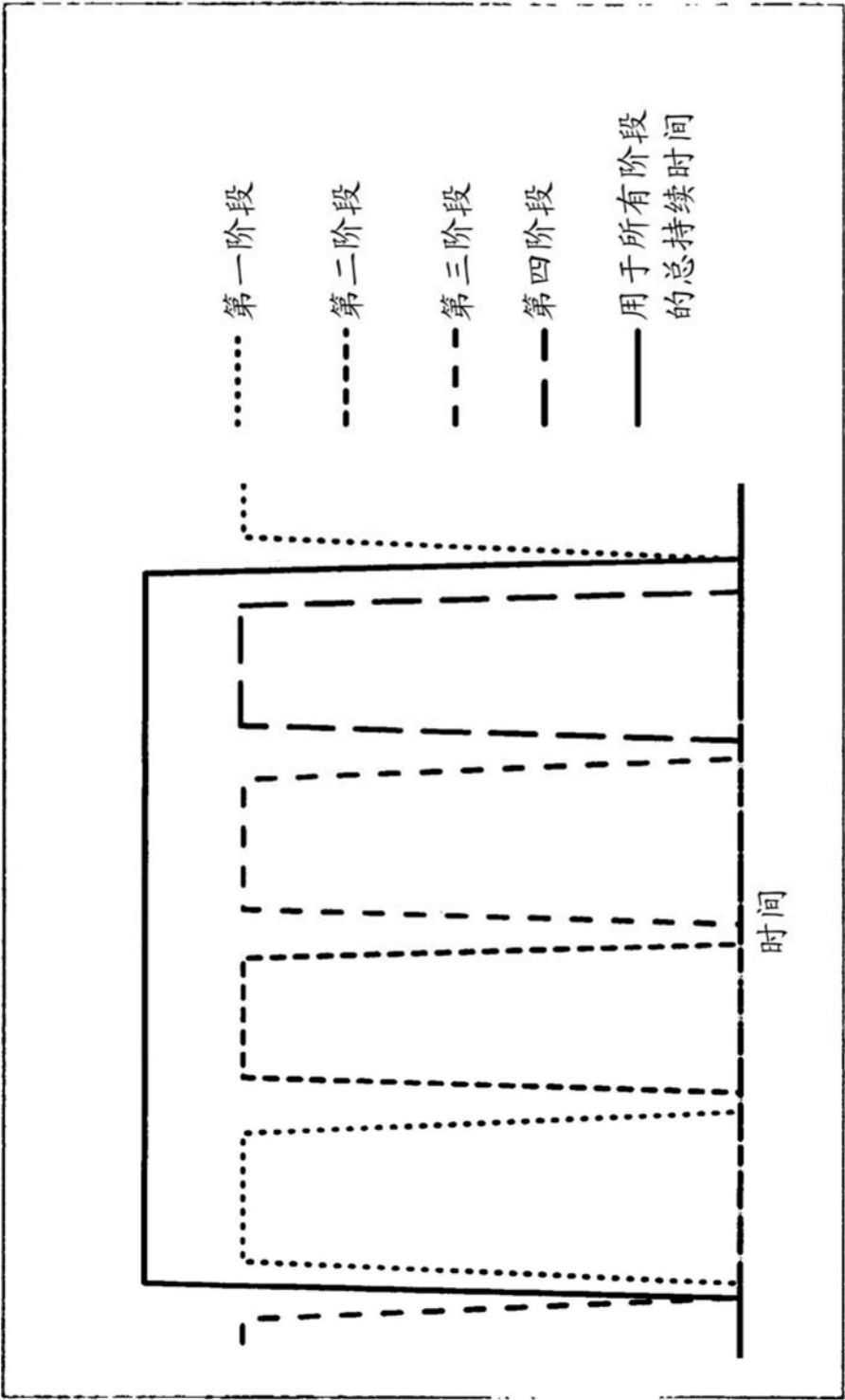


图33

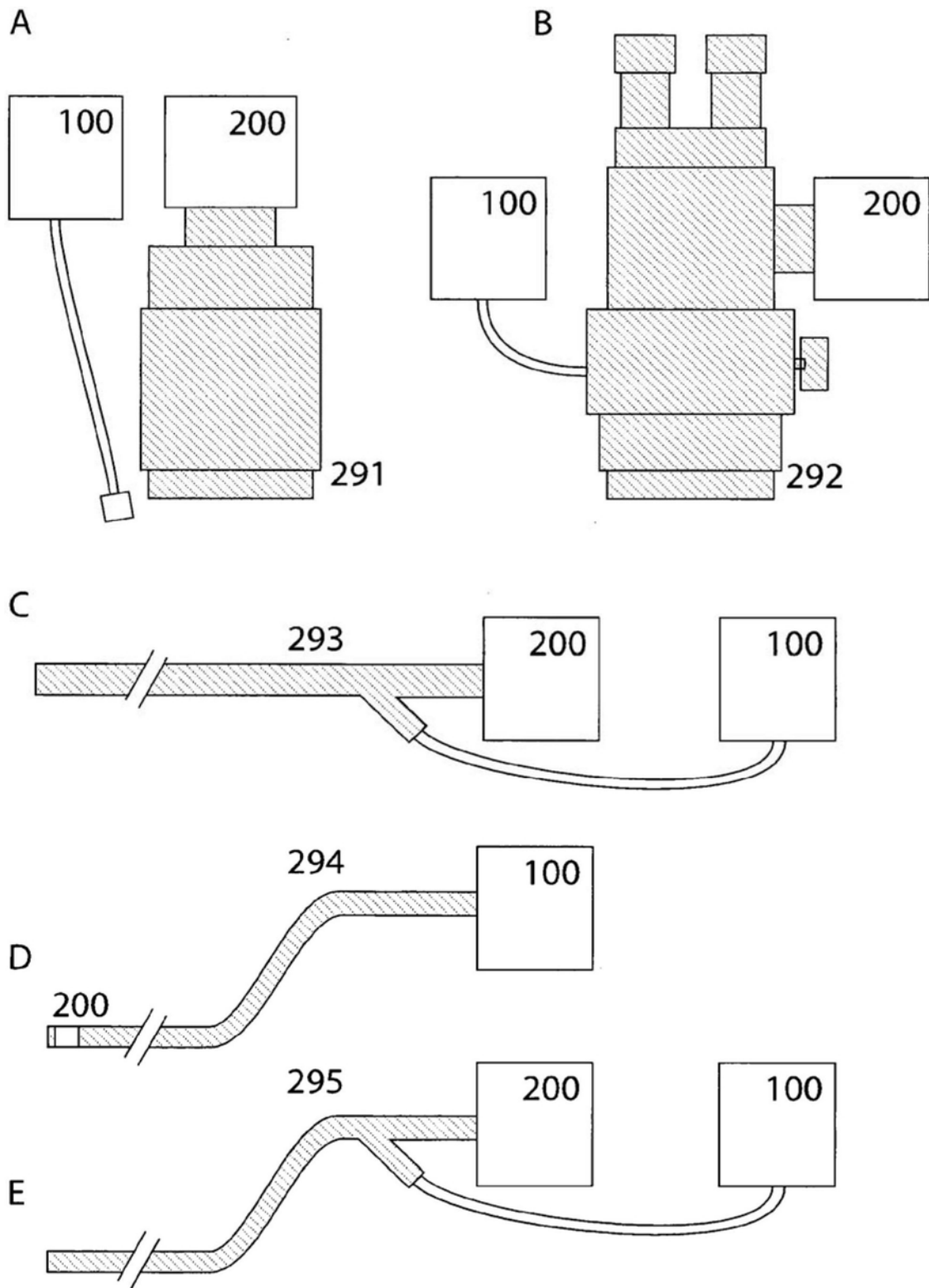


图34

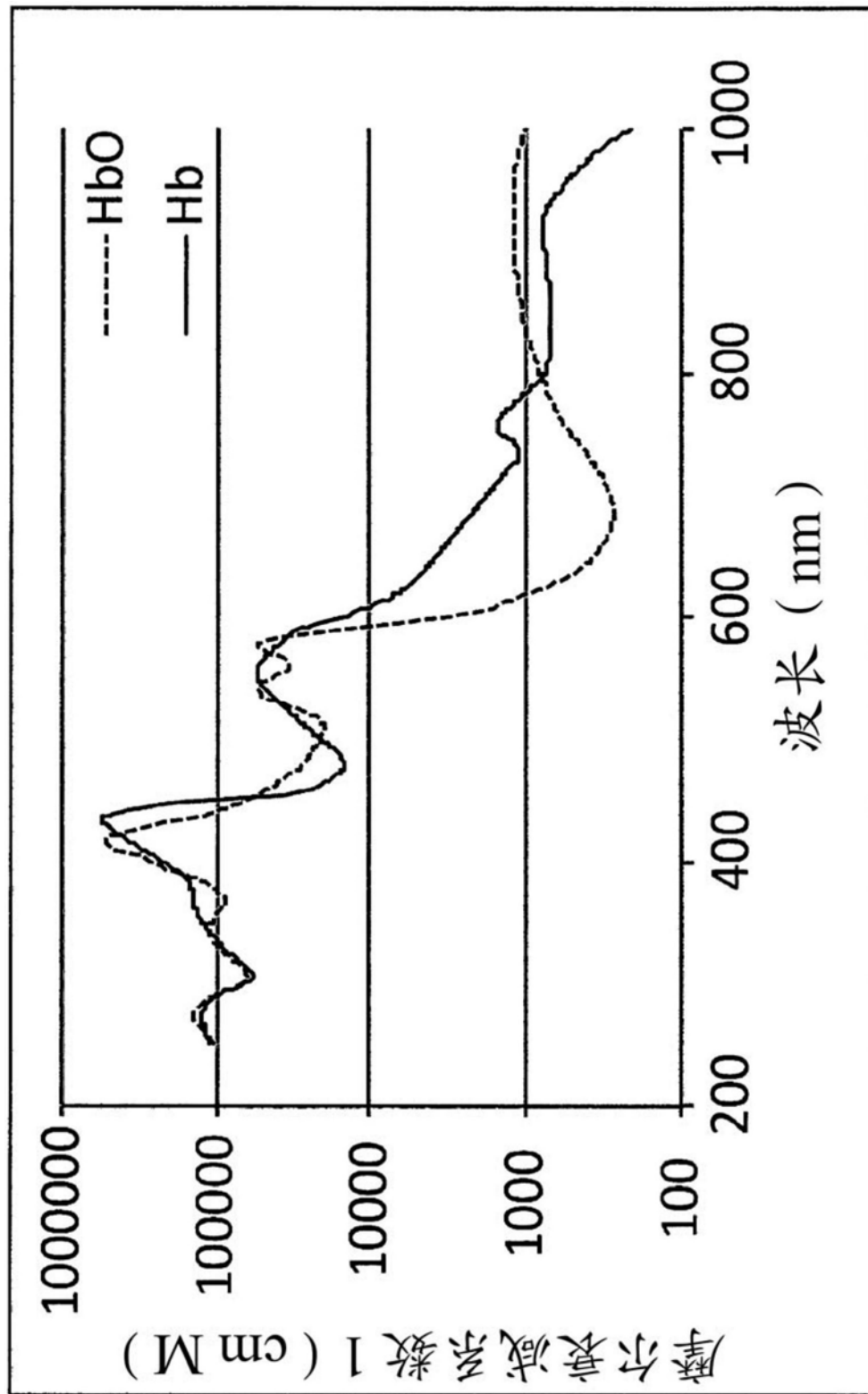


图35

专利名称(译)	用于多光谱成像的方法和部件		
公开(公告)号	CN106999021A	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201580042447.8	申请日	2015-06-03
发明人	尼古拉斯·迪米特里亚迪斯 尼古劳斯·德里奥拉尼斯		
IPC分类号	A61B1/04 A61B1/06 A61B5/00 G01J3/10 G01J3/32 G01J3/44 G01N21/64		
CPC分类号	A61B1/043 A61B1/0638 A61B5/0071 G01J3/10 G01J3/32 G01J3/4406 G01J2003/106 G01N21/6456 G01N21/80 G01N21/91 G01N2021/6417 A61B3/14 A61B5/14551 G01J2003/102 G01N21/6428 G01N2021/6439		
代理人(译)	黄志华 李欣		
优先权	2014171378 2014-06-05 EP 2015160630 2015-03-24 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及样本、尤其生物组织的多光谱成像。本发明还涉及一种用于获取对象(400)的荧光图像和反射图像的方法，该方法包括如下步骤：至少利用具有多个高强度的光谱区域的第一光和至少利用具有至少一个高强度的光谱区域的第二光交替地照明对象(400)，其中，第一光具有波长比高强度的区域的波长长的至少一个低强度的区域，使用公共传感器阵列(200)在利用第一光照明对象期间记录对象的第一图像以及在利用第二光照明对象期间记录对象的第二图像，其中，在第一光具有高强度的光谱区域中的至少一个光谱区域中使由传感器阵列(200)记录的光衰减。

