

(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2004-514133

(P2004-514133A)

(43) 公表日 平成16年5月13日(2004.5.13)

(51) Int.Cl.⁷

G01N 21/64

A61B 1/00

A61B 3/10

A61B 3/12

G01N 21/65

F I

G01N 21/64

B

A61B 1/00

300D

G01N 21/65

G02B 21/00

G02B 23/24

Z

テーマコード(参考)

2G043

2H040

2H052

4C061

4C082

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-542854 (P2002-542854)
 (86) (22) 出願日 平成13年11月20日(2001.11.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年5月20日(2003.5.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/014403
 (87) 国際公開番号 W02002/040974
 (87) 国際公開日 平成14年5月23日(2002.5.23)
 (31) 優先権主張番号 00403238.9
 (32) 優先日 平成12年11月20日(2000.11.20)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

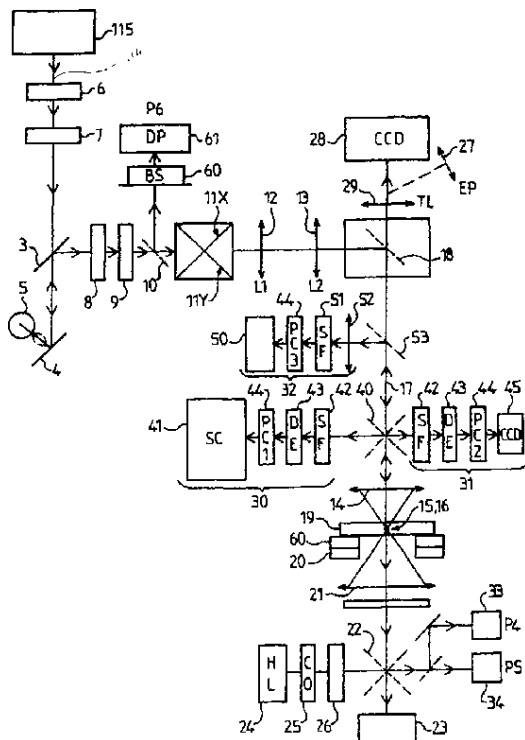
(71) 出願人 500026533
 アンスティテュ・キュリ
 INSTITUT CURIE
 フランス国、エフー75248 パリ・セ
 デックス 05、リュ・デュエルム、26
 (71) 出願人 598125981
 サークトル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシ
 エルシェ・シヤンティフィック
 Centre National de
 la Recherche Scient
 ifique
 フランス国、75794 パリ・セデクス
 16、リュ・ミシエル・アーンジュ
 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多光子イメージ化装置

(57) 【要約】

本発明は、レーザ走査を使用して固有発色団を含む物質の多次元非線形イメージ化を行う装置に関する。この装置は、(i)同期された光子の時間スタンプパルスの1以上のソース115と、(ii)固有発色団に2以上の同期された光子のグループを吸収させて応答光子を生成するためにパルスの焦点を物質上に局部的に結ばせる手段12-14と、(iii)その応答光子を1以上の収集ゾーンに導く手段22, 40, 53と、(iv)その応答光子のエネルギーがどれ程であろうと、それらの光子を収集ゾーンにおいて収集する手段30-34と、(v)収集された光子を少なくともそれらの個数を表すデータに変換し、物質に応答光子を生成させる時間スタンプパルスに少なくとも対応してそれらデータを記憶する処理手段と、(vi)物質の選択されたエリアを通過してパルスを走査する手段11, 20と、および(vii)前記憶されたデータから、前記物質の選択されたエリアをミリメートル未満の分解能によりそれらの各時間スタンプパルスの関数として表すイメージを生じさせる手段とを含んでいる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 以上の選択されたエネルギーの光子によって励起されて応答光子が生成される、固有発色団を含む物質を多次元レーザ走査するための装置において、
同期された光子の時間スタンプパルスを生成する 1 以上のソース (1 1 5) と、
前記物質の前記固有発色団に 2 以上の同期された光子のグループを吸収させて非線形応答光子を生成するために前記パルスの焦点を物質上に局部的に結ばせる手段 (1 2 - 1 4) と、
前記応答光子を 1 以上の収集ゾーンに導く手段 (2 2 , 4 0 , 5 3) と、
前記応答光子をそのエネルギーがどれ程であろうと前記 1 以上の収集ゾーンにおいて収集する手段 (3 0 - 3 4) と、
前記収集された光子を少なくともそれらの個数を表すデータに変換し、前記物質に前記応答光子を生成させる時間スタンプパルスに少なくとも対応してデータを記憶する処理手段と、
前記物質の選択されたエリアを通して前記パルスを走査する手段 (1 1) と、
前記記憶されたデータから、前記物質の選択されたエリアをミリメートル未満の分解能によりそれらの各時間スタンプパルスの関数として表すイメージを生じさせる手段とを具備している装置。

【請求項 2】

前記収集する手段は、前記応答光子をそれらの各到達時間の関数として弁別する検出器手段 (4 1) を含み、前記処理手段は少なくとも時間スタンプパルスおよび到達時間に対応して前記データを記憶するように構成されている請求項 1 記載の装置。

【請求項 3】

前記収集する手段は、前記応答光子をそれらの各エネルギーの関数として弁別する検出器手段を含み、前記処理手段は少なくとも時間スタンプパルスおよびエネルギーに対応して前記データを記憶するように構成されている請求項 1 または 2 記載の装置。

【請求項 4】

前記収集する手段は、少なくとも蛍光、ルミネセンス、非線形ラマンおよび非線形レイリーを含むグループにおいて選択された放射チャンネルにしたがって前記物質によって放出された応答光子を収集することができる請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 記載の装置。

【請求項 5】

前記収集する手段は、ほぼ 250 nm 乃至 1 μ m の波長を有する応答光子を収集することができる請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 記載の装置。

【請求項 6】

前記収集する手段は、ポイント検出器として構成された検出手段を含んでいる請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 記載の装置。

【請求項 7】

前記収集する手段は、並列の 1 組の個別のポイント検出器として構成された検出手段を含んでいる請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 記載の装置。

【請求項 8】

前記収集する手段は、2次元イメージ化検出器 (4 5) として構成された検出手段を含んでいる請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 記載の装置。

【請求項 9】

前記収集する手段はさらに前記検出手段 (5 0) の上流において、前記応答光子の焦点を前記検出手段上に結ばせるレンズ (5 2) と、これに後続するシャッタおよびフィルタ構成体 (5 1) と、および前記レンズ (5 2) に関する前記検出手段 (5 0) の位置を調節する結合機構 (4 4) とを含んでいる請求項 6 乃至 8 のいずれか 1 記載の装置。

【請求項 10】

前記収集する手段は、ストリークカメラ (4 1) として構成された検出手段を含んでいる請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 記載の装置。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記収集する手段はさらに前記検出手段(41)の上流に、シャッタおよびフィルタ構体(42)と、これに後続する色分散および前記検出手段(41)の光電陰極ウインドウ上への焦点設定のための素子(43)と、および前記素子(43)に関する前記検出手段(41)の位置を調節する結合機構(44)とを含んでいる請求項10記載の装置。

【請求項 1 2】

前記走査する手段は、前記物質を2つの直交する方向にポイント走査する結合された2つの検流計ミラー(11X, 11Y)のセットを前記ソースと前記物質との間に含んでいる請求項1乃至11のいずれか1項記載の装置。

【請求項 1 3】

前記走査する手段はさらに前記結合された検流計ミラー(11X, 11Y)のセッの下流に、前記セット(11X, 11Y)の平面と共役させるように構成された2つの収斂レンズ(12)および(13)のセットを含んでおり、レンズ(14)の後方開口が前記パルス(19)を前記物質(19)内の選択された焦点(15)上に結ばせるように構成されている請求項12記載の装置。

【請求項 1 4】

前記パルスソース(115)は第1の波長の第1の非常に短い幅のパルス(103)を生成する発振器(100)を含んでおり、前記発振器(100)はレーザ(102)により生成される持続的なレーザビーム(101)によりポンプされる請求項1乃至13のいずれか1項記載の装置。

【請求項 1 5】

前記パルスソース(115)はさらに第2の非常に短い幅のパルス(111)を生成する光学パラメトリック発振器(106)を含んでおり、前記第2の非常に短い幅のパルス(111)は前記第1の非常に短い幅のパルス(110)に類似した時間的特性を有し、そのパルスエネルギーが前記第1の非常に短い幅のパルス(110)のものと比較してわずかに少なく、前記第1の波長とは異なった第2の波長を有している請求項14記載の装置。

【請求項 1 6】

前記パルスソース(115)はさらに再生増幅器レーザ空洞(107)を含んでおり、前記再生増幅器レーザ空洞(107)は、前記第1の非常に短い幅のパルス(103)の一部分(204)を受取る第1の入力と、レーザ(102)によりポンプされる第2の入力と、第3の波長のパルス(108)を生じさせる出力とを含んでいる請求項15記載の装置。

【請求項 1 7】

前記パルスソース(115)はさらに第4の波長のパルス(112)を第3の波長のパルス(108)から生じさせる光学パラメトリック増幅器(109)を含んでおり、前記第4の波長のパルス(112)の時間的特性が前記第2の非常に短い幅のパルス(111)のものに類似している請求項16記載の装置。

【請求項 1 8】

前記パルスソース(115)はさらに、第1の非常に短い幅のパルス(110)、第2の非常に短い幅のパルス(111)、第3の非常に短い幅のパルス(108)および第4の非常に短い幅のパルス(112)を受取るための4つの入力と、これらの第1、第2、第3および第4の非常に短い幅のパルスの少なくとも1つを選択的に生じさせる出力とを備えたビームセクタ手段(113)を含んでいる請求項17記載の装置。

【請求項 1 9】

前記パルスソース(115)の下流には、ソースパワー制御手段(6)が含まれている請求項1乃至18のいずれか1項記載の装置。

【請求項 2 0】

前記ソースパワー制御手段(6)は1以上の電気光学変調器を含んでいる請求項19記載の装置。

【請求項 2 1】

10

20

30

40

50

前記パルスソース（１１５）の下流には、前記パルスの時間的分散を予め補償する手段（３－５）が含まれている請求項１乃至２０のいずれか１項記載の装置。

【請求項２２】

前記予め補償する手段（３－５）は、前記パルスを２つの逆平行のプリズムまたは格子セット（５）に伝送すると共に前記予め補償されたパルスを出力結合ミラー（３）に伝送するように構成された入力結合ミラー（４）を含んでいる請求項２１記載の装置。

【請求項２３】

前記パルスソース（１１５）の下流には、前記パルスの偏光を制御するように構成された偏光制御手段（８）が含まれている請求項１乃至２２のいずれか１項記載の装置。

【請求項２４】

前記偏光制御手段（８）は、 $\lambda/2$ または $\lambda/4$ プレートを含んでいる請求項２３記載の装置。

【請求項２５】

前記パルスソース（１１５）の下流には、パルス成形手段（９）が含まれている請求項１乃至２４のいずれか１項記載の装置。

【請求項２６】

前記パルス成形手段（９）は、２素子望遠鏡を規定する発散レンズおよび収斂レンズを含んでいる請求項２５記載の装置。

【請求項２７】

前記焦点設定手段（１２－１４）および導く手段（２２，４０，５３）は、非侵入顕微鏡およびマクロスコープの一部である請求項１乃至２６のいずれか１項記載の装置。

【請求項２８】

物質を固定した位置に維持する支持手段（６０）が含まれている請求項２７記載の装置。

【請求項２９】

前記パルスの焦点が前記物質の選択されたエリアにおいて局部的に結ばれるように前記支持手段（６０）を前記焦点設定手段（１２－１４）に関して移動可能にする位置決定手段（２０）が含まれている請求項２８記載の装置。

【請求項３０】

前記位置決定手段（２０）はモータおよび、またはピエゾアクチュエータによって移動させられるXYZ変換段（２０）を含んでおり、前記支持手段（６０）は前記変換段上に取り付けられた物質ホルダである請求項２９記載の装置。

【請求項３１】

前記支持手段（６０）は、疾患のある人間または動物の少なくとも一部分を支持するように構成されたプレートである請求項２８または２９記載の装置。

【請求項３２】

前記支持手段（６０）は、前記パルスが前記物質（１９）の第１の面上に導かれる透過照明モードに適応し、前記応答光子は少なくとも前記物質の前記第１の面の反対側の第２の面の下流で収集される請求項２８乃至３１のいずれか１項記載の装置。

【請求項３３】

前記焦点設定手段および導く手段は、内視鏡の一部である請求項１乃至２６のいずれか１項記載の装置。

【請求項３４】

前記導く手段、前記収集する手段および前記焦点設定手段は、可動ヘッド構体（２１６；２１７；２１８）内に收容されている請求項３３記載の装置。

【請求項３５】

１以上の選択されたエネルギーの光子によって励起されて応答光子が生成される、固有発色団を含む物質を多次元レーザ走査する方法において、同期された光子の時間スタンプパルスを生成し、前記物質の前記固有発色団に２以上の同期された光子のグループを吸収させて非線形応答光子を生成するために前記パルスの焦点を物質上に局部的に結ばせ、

10

20

30

40

50

前記応答光子を 1 以上の収集ゾーンに導き、
前記応答光子をそのエネルギーにかかわらず前記 1 以上の収集ゾーンにおいて収集し、
前記収集された光子を少なくともそれらの個数を表すデータに変換し、前記物質に前記応答光子を生成させる時間スタンプパルスに少なくとも対応して前記データを記憶し、
前記物質の選択されたエリアを通して前記パルスを走査し、
前記記憶されたデータから、前記物質の選択されたエリアをミリメートル未満の分解能によりそれらの各時間スタンプパルスの関数として表すイメージを生じさせるステップを含んでいる方法。

【請求項 36】

前記収集された光子はそれらの各到達時間を表すデータに変換され、少なくとも時間スタンプパルスおよび到達時間に対応して記憶される請求項 35 記載の方法。 10

【請求項 37】

前記収集された光子はそれらの各エネルギーを表すデータに変換され、少なくとも時間スタンプパルスおよびエネルギーに対応して記憶される請求項 35 または 36 記載の方法。

【請求項 38】

内視鏡検査、顕微鏡検査およびマクロスコープ検査に対する請求項 1 乃至 37 のいずれか 1 項記載の装置および方法の使用法。

【請求項 39】

外科的処置をモニタするために組織または細胞の構造および代謝に関する情報を提供するための請求項 38 記載の使用法。 20

【請求項 40】

レーザベースの処置においてレーザの位置を案内する請求項 39 記載の使用法。

【請求項 41】

レーザ剥離において励起レーザソースを案内する請求項 40 記載の使用法。

【請求項 42】

治療効果および回復の長期にわたる監視を追跡するための情報を提供する請求項 38 乃至 41 のいずれか 1 項記載の使用法。

【請求項 43】

人間、動物、植物または原核生物の生物学的物質、生合成組織またはキメラ組織、人工臓器、遺伝子操作された元素配列、移植された異種または自己の生体または固定された組織構造を元の場所で、あるいは別の場所でイメージ化する請求項 38 乃至 42 のいずれか 1 項記載の使用法。 30

【請求項 44】

癌、代謝または伝染性の病気、外部から入ってきた微生物、異質粒子、あるいは病理学的なものを光学的に検出する請求項 43 記載の使用法。

【請求項 45】

人間の皮膚または人間の粘膜の生物学的物質をその本来の場所で、あるいは別の場所でイメージ化する請求項 43 または 44 記載の使用法。

【請求項 46】

腔鏡検査、皮膚病学または口腔検査に対する請求項 45 記載の使用法。 40

【請求項 47】

オフサルモスコーピーに対する請求項 43 乃至 46 のいずれか 1 項記載の使用法。

【請求項 48】

法廷で用いられる証拠の検出または薬乱用の検出を行なうための請求項 43 乃至 47 のいずれか 1 項記載の使用法。

【請求項 49】

薬理学または薬力学において薬を局限するための請求項 43 乃至 48 のいずれか 1 項記載の使用法。

【請求項 50】

遺伝子治療において遺伝子生成物、細胞増殖部分および組織変異を局限するための請求項 50

4 3 乃至 4 9 のいずれか 1 項記載の使用法。

【請求項 5 1】

動物の病気、および人間の病気の動物モデルによる研究に対する請求項 4 3 乃至 5 0 のいずれか 1 項記載の使用法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、同期された光子の時間スタンプパルスの助けにより生物学的物質をイメージ化する分野に関する。

【0 0 0 2】

本発明は、とくに、同期された光子の時間スタンプパルスの助けによりたとえば、生物学的調査、医学的研究（たとえば、正常な組織を病的組織から守るための）、法廷用またはバイオテクノロジー用等のために生体内で、あるいは試験管内で生物学的サンプルの固有の非線形光学応答をイメージ化するための装置および方法に関する。

【0 0 0 3】

“非線形光学応答”という表現はここにおいて以降“応答光子”と呼ばれる光子を指すものであり、この光子は、サンプルに生来含まれている発色団がいくつかの（2 以上の）同期された光子によって励起されたときに、それらの発色団から放出される。さらに正確には、“非線形”という表現は、分子の励起効率が電磁界の振幅と共に非線形的に変化することを意味する。実際に、単一の光子による励起（線形応答）の効率はその振幅に比例するだけであるが、 n 個の同期された光子による励起効率はその振幅の n 乗に比例する。

【0 0 0 4】

【従来の技術】

当業者によって知られているように、生物学的サンプルの光学イメージ化は、非常に多くの方法によって行われることが可能であり、これらの方法は簡明にするために光学的なコントラストが得られる物理的メカニズムにしたがって 3 つのクラスに分けることができる。

【0 0 0 5】

第 1 のクラスは、光トランスポート特性の空間的变化に基づく方法を示す。このクラスの方法は主として、吸収率、反射率、屈折率、複屈折率または偏光のコントラストに基づいている。光トランスポート特性は、それがどのようなものであっても、そのサンプルの生化学に関する直接的な情報は提供しない。

【0 0 0 6】

第 2 のクラスは、明確な非本質的発光分子を光学的に励起した結果生じた“非本質的”信号により生成され、サンプル内に導入され、強い光信号および特定の分子認識特性の両方を提供するために選択されるコントラストに基づく方法である。この非本質的発光コントラスト剤の使用法は時間を要するものであり、無理やりラベル付けする手順を必要とする。

【0 0 0 7】

第 3 のクラスは、サンプル中に自然に存在する明確な固有の分子を光学的に励起した結果生じた“固有の”信号により生成されたコントラストに基づく方法である。伝統的に、これらの方法により提供される横方向（l a t e r a l）および深さ（d e p t h）分解能は、詳細な組織構造を細胞以下のスケールで示すには不十分である。

【0 0 0 8】

第 2 および第 3 のクラスの方法は線形または非線形光学応答特性に基づくことができる。しかし、以降説明するように、非線形光学応答を使用することが好ましい。

【0 0 0 9】

実際に、焦点深度より厚いサンプル中の固有または非本質的な信号をイメージ化する場合、その光は焦点面に向かって導かれなければならない、コントラスト情報はその検出器の後方または前方に導かれなければならない。したがって、最適な光トランスポートには、そ

10

20

30

40

50

のサンプルが励起および放出光に対して透明であることが要求され、最適なコントラストには、サンプルが分子励起に対して透明でないことが必要とされる。

【0010】

このパラドックスから、(i)線形イメージ化顕微鏡技術は深い組織イメージ化をほとんど行うことができず、(ii)内視鏡蛍光イメージ化は表面からの信号を深い発色団によって生成された信号から分解することができないと結論づけられる。対照的に、非線形イメージ化は、生物学的サンプルの透明なスペクトルウインドウ内の長い波長の近赤外線レーザー光を使用する。したがって、励起光はその焦点に向かう途中で組織と最小限の相互作用を行い、これは、ここでは700乃至1100nmの範囲内の励起波長でほぼ0.5mmである有用な光透過境界の少なくともその範囲内で、線形イメージ化技術の透明度/励起パラドックスが解決されることを意味する。しかし、線形蛍光顕微鏡の場合のように、固有の信号は背景雑音と見なされ、適切な光フィルタにより濾波される。

【0011】

生物学的サンプルの代謝状態に関する情報を生体内または生体外で抽出するか、あるいは固有の蛍光またはラマン放出スペクトルおよび寿命を使用して悪性腫瘍のような組織病理学的特徴を決定(resolve)する方法もまた提案されている。しかし、これらのいわゆる“スペクトル病理学”方法は線形励起により行われており、したがって以下の3つの主要な欠点が生じる。

【0012】

(i)励起は焦点に制限されないので、線形分光法では空間的な分解が行われず、深いイメージ化だけでなく横断方向および深さ分解能に関して本質的に強い制限がある。

【0013】

(ii)“単一光子”蛍光励起スペクトルはかなり頻繁に単一の狭いピークを表示し、1つのレーザー波長はごく少数の分子成分しか励起しない。これは励起波長の選択に対して厳しい条件を課し、病的状態を健康なものから区別するための分光学的基準をしばしば複雑なものにする。これは、たとえば、1つを区別するためにいくつかの波長が必要となる皮膚損傷の固有のイメージ化または結腸の単一地点の固有蛍光分光法の場合である。

【0014】

(iii)スペクトル異常は、サンプルにおいて均一に分布されるのではなく、たいがい特定の細胞タイプまたは細胞未満の構造に集中された分子ソースによって引き起こされるため、それらの分光学的影響は、波長および寿命ドメインにおいて局部的に優勢である可能性がある。しかしながら、これらの局部的な影響は最終的なスペクトルでは優勢な特徴ではなく、したがってそれらは空間的に平均化されるために抽出し難い。

【0015】

要約すると、線形励起により行われるあらゆるスペクトル診断方法では、結果的に、空間分解能は非常に低いものとなり、多くのソースが必要になることが多く、感度が制限され、細胞スケールで情報を獲得することが不可能となる。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、上述した欠点の少なくとも一部分的に対する解決方法を提供することであり、とくに、(i)ミクロン未満のスケール(細胞以下のスケール)から組織および器官構造スケールまでを範囲とする分解能で生物学的サンプルの幾何学構造を示すイメージを、非線形的な固有イメージ化(顕微鏡検査、マクロスコピーおよび内視鏡検査)から獲得し、(ii)組織を詳細に診察して診断する(さらに一般的には、正常な組織と異常な組織との相違を検出する)ためにこのような非線形的な固有イメージ化を分光学と組合せることを可能にすることである。

【0017】

【課題を解決するための手段】

したがって、本発明は、2次元(2DまたはXY)または3次元(3DまたはXYZ)で空間的に分解されることができ、さらに寿命()および、または波長()でスペクト

10

20

30

40

50

ル的に解像されることのできる固有の非線形光学応答のイメージを獲得するのに適した手段を提供する。

【0018】

さらに正確に述べると、本発明は、1以上の選択されたエネルギーの光子による励起に応答して応答光子を生成する固有発色団を含む物質を多次元レーザ走査するための装置を提供する。この装置は、

- ・同期された光子の時間スタンプパルスを生成することのできる1以上のソースと、
- ・厳密に調査するために固有発色団に2以上の同期された光子のグループを吸収させて非線形応答光子を生成するためにパルスの焦点を物質上に局部的に結ばせる手段と、
- ・その応答光子を1以上の収集ゾーンに導く手段と、
- ・その応答光子をそのエネルギーがどれ程であろうと収集ゾーンにおいて収集する手段と、
- ・収集された光子を少なくともそれらの個数を表すデータに変換し、物質に応答光子を生成させる時間スタンプパルスに少なくとも対応してデータを記憶する処理手段と、
- ・物質の選択されたエリアを通してパルスを走査する手段と、
- ・物質の選択されたエリアをミリメートル未満の分解能によりデータの各時間スタンプパルスの関数として表すイメージを記憶されたデータから生じさせる手段とによって特徴付けられる。

10

【0019】

この分光学的積分のおかげで、物質の種々の構成要素の固有発色団により放出された応答光子は、それらの放射性の下方遷移チャンネルがいずれのもの[蛍光、ルミネセンス、非線形ラマンおよび非線形レイリー(2次および3次の光学的高調波の発生)]であっても収集される。したがって、この装置は細胞スケールから細胞以下のスケールに及ぶ高い分解能を有するイメージを生じさせることができる。

20

【0020】

厳密な意味で、レイリーおよびラマンプロセスは光子吸収を伴わないが、しかしながら、この明細書では簡明にするために吸収が使用される。

【0021】

収集する手段は、応答光子をそれらの各到達時間および、またはそれらの各エネルギー(または波長)の関数として区別することができる検出器手段を含み、処理手段は少なくとも時間スタンプパルスおよび到達時間および、またはエネルギー(または波長)に対応してデータを記憶するように構成されていることが好ましい。したがって、(,)方式の選択された領域を表す部分だけを記憶されたデータから抽出して、それらが生じた分子成分を決定することができる。

30

【0022】

好ましい実施形態において、収集する手段および導く手段は顕微鏡、マクロスコープおよび内視鏡の部分である。

【0023】

装置は、請求項2乃至35に規定されているように、別々にあるいは組合せられて採用される別の特徴が含まれていてもよい。

【0024】

本発明はまた、応答光子を生成するために1以上の選択されたエネルギーの光子による励起に応答して固有発色団を含む物質を多次元レーザ走査する方法を提供する。この方法は、

- ・同期された光子の時間スタンプパルスを生成し、
- ・固有発色団に2以上の同期された光子のグループを吸収させて非線形応答光子を生成するためにパルスの焦点を物質上に局部的に結ばせ、
- ・その応答光子を1以上の収集ゾーンに導き、
- ・応答光子をそのエネルギーがどれ程であろうと収集ゾーンにおいて収集し、
- ・収集された光子を少なくともそれらの個数を表すデータに変換し、物質に応答光子を生成させる時間スタンプパルスに少なくとも対応するデータを記憶し、
- ・物質の選択されたエリアを通してパルスを走査し、

40

50

・物質の選択されたエリアをミリメートル未満の分解能によりデータの各時間スタンプパルスの関数として表すイメージを記憶されたデータから生じさせるステップによって特徴付けられる。

【0025】

この方法は、別々にまたは組合せられて採用される別の特徴を含んでいてもよく、とくに、収集された光子はそれらの各到達時間および、またはエネルギーを表すデータに変換され、少なくとも時間スタンプパルスおよび到達時間および、またはエネルギーに対応して記憶されてもよい。

【0026】

【発明の実施の形態】

本発明のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および添付図面を検討することにより明らかになるであろう。

図面はその性質が本質的に確実である。したがって、それらは本発明を補足するだけでなく、適切な場合にはそれを規定するのに貢献することができる。

【0027】

以下の説明において、生物学的物質の多光子イメージ化のための装置および方法を参照とする。とくに、多光子イメージ化顕微鏡を単なる一例として参照とする。

【0028】

上述したように、本発明は、レーザビームまたはサンプル保持段の一方あるいはその両者を移動することによって、生物学的サンプルの選択エリアをかなり連続的にあるいは選択された別個の地点において2次元(2D)または3次元(3D)でレーザ走査イメージ化することを可能にする装置(または計器)に関する。

【0029】

各走査地点において、典型的に100マイクロ秒から数秒を範囲とする2つの連続した地点間の滞留時間により、パルス化されたレーザソースにより放出される光は、サンプルの表面内のまたはその表面における“焦点ボリューム”において焦点を結ばれる。サンプル中に含まれている固有の発色団は、2以上の同期された光子のグループを吸収し、数種類の検出器上で収集されて積分されることのできる非線形応答光子を生成し、これら数種類の検出器とは：(1)光電子増倍管(PMT)のようなポイント検出器または半導体ベースの検出器(または、さらに一般的には、2Dイメージ化検出器)、(2)分散素子に後続するものであり、ある方向の波長成分を垂直方向の空間分解能と共に分解するための2D半導体アレイ検出器、(3)オプショナルな色フィルタに後続し、寿命情報を提供するように構成された1組の並列な個別のポイント検出器、(4)分散素子に後続し、波長/寿命平面(、)における2D分光学的分解能のためのストリークカメラ等である。

【0030】

図1に示されている実施形態には、上述した4つのタイプの検出器の種々の組合せを同時に使用するか、あるいはある単一検出モードから別のモードに迅速に切替えるいくつかの光ポートが含まれている。以下の説明において、“5Dイメージ化”とは、平面(、)におけるサンプル応答の2D分光学的分解能と3Dレーザ走査(XYZ)により与えられる空間分解能との組合せのことであり、“4Dイメージ化”とは平面(、)におけるサンプル応答の2D分光学的分解能と2Dレーザ走査(XY)により与えられる空間分解能との組合せ、または または におけるサンプル応答の1D分光学的分解能と3Dレーザ走査(XYZ)により与えられる空間分解能との組合せのことである。

【0031】

生物学的サンプルは、巨大な組織のように一側からのみアクセス可能であるか、あるいは断面が十分に薄い場合には両側からアクセス可能であるため、好ましい実施形態は、(i)レーザビームおよび関連した走査光学系が、たとえば垂直構造が使用される場合にはその上部から生じる等、巨大なサンプルの一側から生じる構成、および(ii)光学系を全く備えていないか、あるいは2つの排他的な光学機能すなわち徹照(trans-illumination)または検出のために装備された巨大なサンプルをその反対側で受け

10

20

30

40

50

るサンプルホルダに基づいている。そのセットアップには、接眼レンズによる視覚的検査または電荷結合素子（CCD）のような簡単なイメージ化装置のいずれかを使用する徹照モードでの直接的な光学制御の可能性を含んでいる。

【0032】

提案された構成の別の基本的な原理は、光損失と幾何学的分散の影響とを最小にするために検出器が光収集光学系に可能な限り近づくように検出ポートが形成されることである。

【0033】

図1において、異なった波長、ピークエネルギー、パルス幅および繰返し率を有する非常に短い時間スタンプパルスをそれぞれ生成することが好ましいレーザソースセットアップ115のいくつかの可能なレーザの1つによって励起光114が生成される。レーザソースセットアップ115の一例は、図3に示されている。レーザパワーは、2つの異なった目的のために1または2つの電気光学変調器のセット6によって制御される：第1の変調器は手動として、あるいは走査タイミング制御に可能に結合される低周波コンピュータ制御される強度シャッタとして使用され、一方他方の変調器は同期検出、または減少された繰返し数に対するパルスの抑制のいずれかのための共振高周波数変調器として使用される。

10

【0034】

ラマンイメージ化用のノッチフィルタ7は、電気光学変調器6の下流に設けることができる。さらに、時間的な分散を予め補償するためのシステム345は、平坦な入力結合ミラー4および平坦な出力結合ミラー3と共に2つの逆平行プリズムまたは格子のセット5から構成されることが好ましい。その後、レーザ出力偏光は、 $\lambda/2$ または $\lambda/4$ プレートであることができる随意的な素子8によって制御される。ビーム成形は、必要ならば、ビームが焦点に集中することを回避するように1個の発散および1個の収斂レンズを有するように設計された簡単な2素子テレスコープ9により随意に行われる。

20

【0035】

その後、レーザビームはXおよびY方向にポイント走査するために2つの結合された検流計ミラー11Xおよび11Yのセットに向かってオブションの二色性ミラー10を横断し、この検流計ミラー11Xおよび11Yのセットはビームを2つの収斂レンズ12および13のセット上に操縦する。オブションの平坦なミラー18を介して、2つのレンズ12および13は検流計ミラー11Xまたは11Yの平面を励起光の焦点をサンプル19内の現在の焦点15に結ばせるレンズ14の後方開口と共役（conjugate）させる。現在の焦点は、軸に沿った位置16に、すなわちレンズ12、13および14の光軸上にあるか、あるいは検流計ミラーの位置に応じて軸を外れているかのいずれかであることができる。

30

【0036】

励起ビーム17はレンズ13と14との間でコリメートされ、したがってサンプルの固有の発色団により放出された応答光子もまたほぼコリメートされ、それによって光学設計が簡単になる。さらに、レンズ13と14との間の自由空間の大きさは、検出効率をさらに良くする検出ポート30、31および32の構成に対して十分である。レンズ14は真の単体レンズであるか、色消しレンズであるか、あるいは顕微鏡の対物レンズのようなレンズの複合セットであることができる。レンズ14はまた純反射性対物鏡により置換されることができ。これはとくに、スペクトルイメージ化がUV放射を伴う場合、あるいは最適なIR透過または最小の色分散が要求される場合、もしくはその代わりにサンプルを励起する、またはそれによって放出された光の最小の時間的な分散が要求される場合に重要である。

40

【0037】

サンプル19は、観察が一側だけに制限される厚いものであることができ、あるいは両側から光学的なアクセスが可能な薄いサンプルであることができる。前者の場合には、図1に示されているセットアップを切りつめたものとして扱われ、それによってサンプルホルダおよびその下方の全ての光学素子はサンプルホルダによって置換され、このサンプルホルダは同じタイプのものか、あるいは、おそらく重いサンプルまたは物質用の大型のもの

50

である。図 1 では、両側アクセスの場合で焦点が結ばれる。サンプル 19 は、機械的なモータまたはピエゾアクチュエータにより、あるいはその組合せられた機構によって移動される X Y Z 変換段 20 に固定されたプレート 60 (またはサンプルホルダ) 上に取付けられる。レンズ 14 および 21 はまたそれらの軸に沿って移動されることができる。現在のサンプル焦点 15 によって放出された光は、両レンズ 21 および 14 によって収集される。

【0038】

大型の平坦な、または湾曲した二色性レンズ 21 を下方に挿入することにより、励起光がダンプに向かって伝送されているあいだに、応答光子 (またはサンプル光) は二色性レンズ 21 の後方におよび検出ポート 30、31 および 32 に向かって反射されることができる。

10

【0039】

レンズ 14 はレンズ 21 と焦点を共有し、前者と同様に、真の単体レンズ、色消しレンズ、顕微鏡の対物レンズのようなレンズの複合セット、または純反射性対物レンズの任意のもので置換されることができる。レンズ 14 とは異なり、レンズ 21 はまた純反射性コンデンサのような非分散性素子で置換されることができる。2つのレンズ 14 および 21 の光学共役は好ましいが不要ない。これは、検出器 (または検出ポート) の下流において P4 および P5 がレンズ 21 の後方開口に接近して設置されているためである。とくに、これら 2つのレンズ 14 および 21 を最適位置に維持するために、サンプルホルダ 60 により Z 方向の運動が行われなければならない。

20

【0040】

下方のレンズ 21 によって収集された光は、二色性ミラー 22 を通って P4 および P5 と名付けられた 2つの検出ポート 33 および 34 に導かれることができる。この二色性ミラー 22 は、サンプルによって放出された可視または UV 範囲の光 (応答光子) を近赤外線 (NIR) または赤外線 (IR) 範囲の励起光から分離するめために使用される。後者の励起ビーム光は、二色性ミラー 22 を通ってビームダンプ 23 に送られる。逆に言えば、サンプル光 (または応答光子) は、平坦なまたは湾曲したミラーをレンズ 21 とミラー 22 との間に挿入することによりさらなる収集のためにサンプルに戻るよう導かれることができる。その同じ二色性ミラー 22 はまたハロゲンランプ 24 から入ってきた可視光をサンプルに向かって適切な集光光学系 25 およびホットフィルタ 26 を通って導くために使用される。この可視光は、サンプルの透過照明のために使用される。対応したイメージは、直接視覚化するために接眼レンズ 27 に向かって、あるいはチューブレンズ 29 を通って CCD 28 に送られる。その場合には、当然ながら、ミラー 18 は取除かれる。

30

【0041】

ミラー 18 を二色性ミラーで置換することにより、レーザビーム 17 によって励起されたときにサンプルにより放出された光 (応答光子またはサンプル信号) を CCD 28 上で直接イメージ化することもできる。最後に、励起レーザビーム 17 から結果的に得られたサンプル信号は検出ポート 30、31 および 32 上で検出されることができる。これには、光路中に変換されてレンズ 14 の光軸に沿って回転され、それによって光を 30 および 31 に向かって逆方向に導くことのできる 1つの二色性ミラー 40 が必要である。これら 2つの対向した排他的な収集ポート 31 および 32 は、分光学的イメージ化のために装備されているが、しかしそれらの使用は排他的である。

40

【0042】

第 3 の検出ポート 32 はポート 30 または 31 のいずれかと同時に使用されることが可能であり、PMT または半導体ベースの検出器のような小型のポイント検出器 50 であることが好ましい。このポイント検出器 50 はシャッタ/フィルタ構体 51 の前面においてポートコネクタに結合され、サンプル信号のフーリエイメージ化を行うために検出器の入力平面をレンズ 14 の後方開口と共役させるレンズ 52 により先行される。スライドする二色性フィルタ 53 はサンプル信号をレンズ 52 に導く。検出器 50 はまた検出ポート 33 (P4) または 34 (P5) に配置されることができる。

50

【 0 0 4 3 】

2つの検出ポート30および31の一方、たとえば検出ポート30はストリークカメラ41を備えていることが好ましく、このストリークカメラ41の前面にはシャッタおよびフィルタ構体42と、色分散およびストリークカメラ41の光電陰極ウインドウ上への焦点設定のための素子43（分散素子）と、および素子43に関するストリークカメラ41の位置を調節する結合機構44とが設けられている。以下、図2を参照としてストリークカメラ41およびその結合に関する詳細を説明する。他方のポート31は、以下説明するように4Dスペクトルイメージ化セクション内にスペクトルイメージ化検出器を備えていることができる。これら2つのタイプの検出手段を同時に使用する理由はない。2つの検出手段41および45のいずれもサンプルを越えて検出ポート34の位置に配置することが可能なことは注目すべきことである。

10

【 0 0 4 4 】

最後に、ビーム操縦手段60を備えた検出ポート61（またはP6）は検流計ミラー11の上流で利用可能であることが好ましく、この位置においてデスキャン（descan）される（すなわち、応答光子のビームの位置がほぼ固定される）。その位置において、走査している最中に上述の任意の検出手段が使用されることができる。

【 0 0 4 5 】

ストリークカメラ41の目的は（ ）、平面においてサンプル信号を解析することであり、これは励起ビーム17が好ましくは軸方向に固定されていなければならないことを意味する。その後、モータおよび、または piezoelectric アクチュエータによる2Dまたは3Dサンプルモーションによってイメージ化が行われる。このようなストリークカメラ41は3つの出口ポート30、31または35の任意のものに結合されることができる。

20

【 0 0 4 6 】

サンプルによって放出された応答光子（光）は二色性ミラー40または22によって反射され、最初に“シャッタ/モジュラフィルタ”構体42を通して進行し、この“シャッタ/モジュラフィルタ”構体42はストリークカメラ41を保護し、サンプルの非線形的な光学応答特性を全体的に、あるいは部分的に解析するために必要とされる任意の種類の色またはニュートラルデンシティフィルタが取付けられる。その後、応答光子は、ストリークカメラの入力面41a上に位置するその入力ウインドウ41b上にレンズまたは格子43自身により焦点を結ばれる前に、プリズム構体または格子43（あるいはDE）によって分散され（図2に示されているように）、その後光子を時間的に垂直方向に分解する。ストリークカメラ41はレーザ周波数と同位相で同期走査モードで動作するか、あるいはパルス選択装置を使用してその周波数の約数で動作する。ストリークカメラ上で解析されるべき中心波長および分散利得の選択は分散カップラ43の変換により行われる。

30

【 0 0 4 7 】

別の構成では、ストリークカメラ41の1つの方向が寿命（ ）イメージ化に対して使用され、ストリークカメラ41のそれと垂直の方向がサンプルにおいてラインに沿って寿命をイメージ化するライン走査と同時に使用されるように、分散素子43は除去されることができる。その場合、走査方法は4D（または5D）スペクトルイメージ化に関して以下に説明するものに非常に類似しており、その相違は、ストリークカメラ41の時間偏向方向が4D（または5D）検出システムのスペクトル分散方向に対応していることである。

40

【 0 0 4 8 】

ここで、本発明による非線形イメージ化装置に適合されたレーザソースセットアップの一例を説明するために図3を参照とする。

【 0 0 4 9 】

非線形光学応答（たとえば、蛍光応答光子）を生じさせる多光子励起には、可視赤色または近赤外線領域で非常に短いパルスを供給する異なったタイプのレーザにより達成されることのできる高い瞬間パワーが必要とされる。700 - 1050 nmの範囲の波長を有する60 - 100 fs（フェムト秒）のパルスを供給するモードロックされたレーザは、多光子励起イメージ化のための典型的なソースである。ピコ秒ソースもまた使用可能である

50

。本発明の目的は、蛍光だけでなくルミネセンスおよび非線形ラマンならびにレイリー応答も含む非常に一般的な方法で組織の固有の非線形応答を励起することであるため、広い範囲の短パルスソースが使用されなければならない。このようなレーザソースを選択するために、いくつかのパラメータ、すなわち、波長、パルス幅およびパルスエネルギーならびに繰返し数が使用されてもよい。

【0050】

伝統的に700 - 1050 nmの範囲で選択された波長は、組織の線形励起が生じて、非線形励起の利点が失われるために、可視範囲にさらに深く選択されることができない。対照的に、水の透過率の限界の高い波長は、いくつかの理由：(i) 組織からの散乱を減少させることができること、(ii) 低い吸収率と少ない散乱との間の妥協を改善することができ、および(iii) 光学素子および光ファイバにおける時間的な分散を減少させることができることのために有効である。1乃至1.6 μm (ミクロン)の範囲の波長は固有発色団の非線形のサブ共鳴励起を提供し、したがって非線形ラマンおよびレイリー励起に対して選別され、蛍光励起に関しては望ましくないことは注目すべきことである。本発明の方法では、ラマンはまた、好ましくはピコ秒モードでの700 - 800 nmの基本放射の非線形励起によってUV共鳴モードで励起されることができ、したがって、3つの同期された光子の励起が、とくにDNA検出に対して好ましい。とくに、2次または3次の高調波(非線形レイリー)、あるいは固有の組織構成要素の3光子イメージ化が広い範囲の励起波長で容易である。

10

【0051】

パルスエネルギーは、深さの透過がサンプル焦点におけるパワーにより制限されるため、生物学的イメージ化に対して重要な問題である。当業者によって知られているように、所定のサンプルにおける透過の深さはレーザパワーの対数としておよそスケールされる。たとえば、非線形蛍光励起に対して実際に使用されているレーザソースに対する伝統的なモードロックされた発振器は、1 - 10 nJ (ナノジュール)の範囲のパルスを供給し、これは本来の場所および別の場所の組織における0.5 mmの近似的な実効顕微鏡イメージ化深度となる。高いエネルギーのパルスは深い部位にアクセスすることができるが、しかしそれは組織の損傷を引き起こす可能性が高く、これはサンプル焦点には不要であり、そのサンプルの表面ではすでに発生している。しかしながら、マイクロジュール(μJ)の範囲のパルスを提供する増幅された光学パラメータ発振器(OPA)は、組織イメージ化に対して使用されることができ、以下説明するように、適切な光学系(たとえば、広い表面のレンズを備えた特別な光学設計または大型のカタディオプトリックデバイス)がレーザビームの焦点をサンプル上に結ばせる。

20

30

【0052】

本発明の装置は、有効に、いくつかのパルス化されたレーザの1つを使用し、これらレーザは、それらが生成するビーム特性：パルス幅、エネルギー、波長に関してのみ選択されたものである。レーザソースにおいて使用される結晶の実際の性質はそれ程重要ではなく、別のレーザ設計はそれらが類似した放射線を生成する限り使用されることができ、非線形の固有光学応答を最もフレキシブルな方法でイメージ化するために、好ましい実施形態には図3に示されている1組のレーザソースが含まれている。もちろん、これらのレーザが全て同時に必要とされるわけではなく、これらのレーザ素子の任意のサブセットは、それが有用な放射線を生成する限り本発明に対して十分である。

40

【0053】

以下に説明するレーザソースセットアップ全体は、一例として、図1の素子115に対応している。

Ti : サファイア発振器100は、5 / 10 Wの固体レーザ102 (別の発振器および、とくに、結晶発振器が使用されてもよい) によって生成された532 nmの連続的なレーザビーム101によりポンプされる。この第1の発振器100は、700 - 1050 nmの範囲におけるフェムト秒(たとえば、60 - 100 fs)またはピコ秒(たとえば、1 - 4 ps)のパルス化されたビーム103を生成し、1.8 Wまでの平均パワーおよび7

50

6 - 80 MHz の繰返し数を有する。このビーム 103 は、このビームの一部 204 を再生増幅器レーザ空洞 107 に向かって導くオプションの平坦な部分的反射ミラー 104 を照射する。ビーム 103 の残りの部分 203 は、ビームセクタ 113 に向かうビーム 110 として平坦なミラー 105 によって随意に全体的にまたは部分的に反射される。この残りの部分 203 は、フェムト秒またはピコ秒パルス 111 を生成する光学パラメータ発振器 106 中に部分的にまたは全体的に入ることができ、このパルス 111 はビーム 110 に類似した時間特性を有していることが好ましく、そのパルスエネルギーはわずかに低下しているが、波長は 1 - 2 . 4 μm の範囲のものである。再生増幅器レーザ空洞 107 は、レーザ 102 と同じ別のレーザによりポンプされてビーム 204 により注入されたときに、800 nm の波長および 250 kHz の繰返し数でマイクロジュールからフェムト秒（典型的に、130 fs）のパルス 108 を出力する。その後、このパルス 108 は光学パラメータ増幅器 109 内においてパルス 112 に変換され、このパルス 112 はパルス幅がパルス 111 に類似しているが、その波長は 1 . 1 - 3 . 2 μm 領域のものである。（部分的）反射ミラーの助けによりビーム 108 を直接使用することも可能である。

10

【0054】

最後に、ビーム（パルス）110、111 および 112（および最終的には 108）は全て、ビームセクタ 113 に到達し、このビームセクタ 113 は入力ビームの 1 つまたはそれらの 2 以上のものの組合せを選択的に出力する。レーザ空洞 107 ではビーム 103 のごくわずかな部分が動作すればよく、また、光学パラメータ発振器 106 ではビーム 103 の 20 - 30 % が動作すればよい。3 つのビーム 110、111 および 112 の全てが同時に生成されて使用されることができる。再び、このセットアップの最大のフレキシビリティは本発明により満足できる結果を得るために必ずしも必要ではなく、大部分の適用にはいくつかの可能なサブセットで十分である。

20

【0055】

フェムト秒およびピコ秒動作は原理的には共に固有イメージ化に対して使用可能であるが、励起効率に関して別個の利点を有する。とくに、ピコ秒モードはフェムト秒モードに比較して、ラマンラインを分解するために必要とされる、より狭いスペクトルを示し、それはまた、とくに内視鏡用途に対して非常に重要な光ファイバ中への伝播について優れている。ピコ秒モードにおいて、ノッチフィルタは必要ない。上述したように、励起ビームは、パルス選択のために共鳴方式で、あるいはシャッタとして機能するように低い周波で電気光学変調器 6 によって変調されることができる。

30

【0056】

装置の全てのレンズは、適用により要求されるスペクトル範囲におけるそれらの透過率および反射防止コーティングを慎重に選択される。色収差の補正は、光学系の焦点設定を選択する際には重要な問題ではない。球面収差の補正のほうが重要である。さらに、組織のイメージ化には、一般に非常に低い次数の開口を有する低倍率の対物レンズが必要とされることが多い。これらの理由のために、大きい後方絞り開口および高次の開口を有すると共に非常に優れた球面収差補正を行う特定のレンズを使用することが好ましい。大きい絞り開口およびビーム拡張は、励起ビームがマイクロジュールパルスで OPA レーザソース 109 から入ってきたときに、焦点設定素子を通して過度の光パワーを減少させるために、および組織面を横断するフラックスを最小にするためにも必要である。屈折光学素子の過度の時間的および空間的分散が分光学的解析の品質およびこの方法の全体的な効率を低下させることを考慮に入れながら、光学素子を選択することもまた重要である。したがって、可能である限り、とくにレンズ 14 および 21 に対して純粋に反射性の素子が好ましい。

40

【0057】

上記の実施形態は本質的に、顕微鏡またはマクロスコープ段 60、20 上に位置されることのできるサンプルに適応され、この顕微鏡またはマクロスコープ段 60、20 は移動されることができるが、大型の装置に取付けられたままである。これには伝統的な隔離された顕微鏡検査またはマクロスコーピーのサンプルだけでなく、人間または動物の体の一部

50

分（少なくとも）の解剖学的に完全なままのさらに大型のサンプルを含んでいる。しかし、本発明はまた、レーザソースにフレキシブルな方法で接続された遠隔イメージ化ヘッドに関する別の実施形態に適応される。

【0058】

このような実施形態の1例は図4に示されている。入力カップラ200はビーム成形光学系9のすぐ下流に配置され、図1の装置の検流計ミラー11X, 11Yを置換している。この入力カップラ200は、ソースセットアップ115から入ってきた励起レーザビームの焦点を結び、レーザ入力を最適化するためにフレキシブルな導波体201の適切な位置を設定する。導波体201は、たとえば光ファイバであることができる。このファイバ201の内部の時間的分散は、予め補償するための素子3、4および5を適切に調節することによって補償されることが好ましい。導波体201の出力は入力カップラ200に類似している出力カップラ202に結合され、これは2つの検流計ミラー203Xおよび203Yを照射する平行なビームを生成する。これらのミラー203は、図1を参照として説明された方法と同様に、2つのレンズ206および207によって焦点設定レンズ208に向かって励起光ビーム205を操縦し、検流計ミラーをレンズ208の後方開口上にイメージ化する。レンズ208は励起光ビーム205の焦点をサンプル209中の、可調スリーブ210により調節されたレンズからの相対距離の位置に結ぶ。

10

【0059】

その後、サンプルから戻ってきた応答光子は二色性ミラー211を通過して検出装置215に向かって導かれ、この検出装置215は少なくともフィルタ212、光子を光検出器214（PD）に導く素子213を含んでいる。最も簡単な実施形態においては、素子213は平坦なミラーであり、一方光検出器214は小型の光電子増倍管（PMT）である；その場合、レンズ208の後方開口を検出器入口と共役させるレンズが追加されることが好ましい。素子213はまた小型分散素子（DE）であることができ、したがって検出器214は（, x）イメージ化向けに組立てられた2Dアレイ検出器（たとえば、CCD）であり、それはある方向が信号の色解析のために使用され、それに垂直な方向がミラー上におけるサンプル走査のために使用される。そのモードでは、ラインはCCD検出器のフレーム周波数で走査され、解析されることが好ましい。Y方向、すなわち 方向における小さい振幅の走査は、スペクトル情報を損なわずに行われることができる。これは、連続したY位置が連続したイメージに対応し、そのY方向の関数としてスペクトルオフセットが補償されることができるからである。

20

30

【0060】

ある変形において、素子213は、時間的に分解される解析のためのゲートを有する光電子増倍管であることができる。ファイバカップラの下流に接続されたこの構体の全ての部品は閉じた堅牢なマウント204中に封入されている。光検出器構体215は、所望される収集効率および、または便利さに応じてレンズ207と208との間に、あるいは図5に示されているように検流計ミラー203とレンズ220との間に位置された二色性ミラー211から応答光子を収集することができる。図5に示されている後者の場合、図4を参照として上述した検出器を使用することができる。さらに、物質の横方向の観察はまたミラー218に関して直角で可能である。

40

【0061】

図6には、別の実施形態が示されている。この実施形態は、とくに内視鏡モードにおける非線形の固有イメージ化に適合する。その場合、ファイバ出力カップラ221は、ファイバの先端をカップラレンズ223の焦点面において2つの直交する方向に動かすことのできる遠隔制御装置222を含んでいる。ファイバの先端のコアから生じた励起光は、サンプル209中に焦点を結ばれて焦点面において対応的に走査されるようにカップラレンズ223によって焦点設定レンズ224に導かれる。したがって、レンズ224はレンズ223の焦点面に位置している。再び、スリーブ機構225はサンプルの内部の焦点面を位置させる。構体218の部品222 - 225は、小さい直径の堅牢な管228内に収容されている。サンプル209から生じた応答光子は、ファイバコアの周囲の大面积クラッド

50

イングによって収集され、その後ファイバ 2 0 1 から収集ファイバ 2 2 6 に分割されることが好ましく、収集ファイバ 2 2 6 がそれらを符号 2 1 5 により示されている構体に類似した光検出器構体 2 2 7 に向けて導く。

【 0 0 6 2 】

サンプル 1 9 の非線形イメージ化は、少なくとも以下に説明するステップを含んでいた。

【 0 0 6 3 】

第 1 のステップにおいて、1 以上の選択された波長の同期された光子の時間スタンプパルスソース 1 1 5 で生成する。

【 0 0 6 4 】

第 2 のステップにおいて、パルスは物質（サンプル）の選択されたエリアの第 1 の部分に局部的に焦点を結ばれて、物質（サンプル）の固有の発色団に 2 以上の同期された光子のグループを吸収させ、それらの各構成（もっと正確には、それらの特定のエネルギーランジション）および多光子励起波長に関連したエネルギーの光子を放出することによりそれら自身を下方遷移させる。

【 0 0 6 5 】

第 3 のステップにおいて、サンプルによって放出された光子（応答光子）は、位置 5 0 または 3 3 あるいは 3 4 に配置された 1 以上の収集ゾーンに導かれる。

【 0 0 6 6 】

第 4 のステップにおいて、応答光子はそれらのエネルギーがどれ程であろうと、たとえばポイント検出器等の検出器により検出され、このような検出器は UV 領域から、たとえば、ほぼ 8 0 0 n m 近赤外線（N I R）領域までを範囲とする非常に広い可能なスペクトル領域にわたって高い感度を有している。技術的に知られている全ての非線形イメージ化装置とは対照的に、その装置のフィルタだけが励起光を排除するために使用される。そのため、たとえば、蛍光放射、ラマンおよびレイリー散乱のように、全ての可能なフォトフィジカル（p h o t o p h y s i c a l）メカニズム（放射性下方遷移チャンネル）により発生された固有の発色団放射の結果生じた（ 、 ）平面の全ての最も広いアクセス可能な領域の分光学的積分が行われる。

【 0 0 6 7 】

このステップの目的は、その固有の非線形光学応答を可能な限り完全に使用する 2 D または 3 D 空間サンプルイメージ化である。

【 0 0 6 8 】

第 5 のステップにおいて、検出器は収集された光子を最初に、たとえば電圧または電流等のアナログ物理信号に変換し、その後少なくともそれらの個数を表すデータに変換する。その後、データは固有の発色団に 2 以上の同期された光子を生じさせる時間スタンプパルスに少なくとも対応して記憶される。当然ながら、検出器が異なった波長 および、または到達時間（または寿命時間）を弁別できる場合、データはまた波長および、または到達時間に対応して記憶される。

【 0 0 6 9 】

その後、第 6 のステップにおいて、物質エリアの他のあらゆる部分に対して第 2 乃至第 4 のステップが再び行われる。これはそのエリアを通してパルスを走査することにより行われる。それは 2 D または 3 D 空間走査であることができる。

【 0 0 7 0 】

最後に、第 7 のステップにおいて、記憶されたデータから物質の選択されたエリアをミリメートル未満の分解能によりそれらの各時間スタンプパルスの関数として表す完全なイメージを生じさせる。

【 0 0 7 1 】

以下、別のイメージ化方法の例を説明する。第 1 の方法によると、最初に、（ 、 ）平面における信号積分をさす全応答（または分光学的積分）を捕獲することにより上述されたサンプルの 2 D または 3 D イメージを記録する。この全応答イメージは、位置 5 0、3 3 または 3 4 に配置された光電子増倍管または A P D のようなポイント検出器により非常

10

20

30

40

50

に簡単に捕獲される。さらに完全な分光学的応答はおそらく、後続するステップを容易にするように1以上の別の励起波長を使用して生じさせることができる。

【0072】

その後、一般に著しく鮮明な結果的に得られたイメージは、おそらく自動的なイメージセグメント化工程によってその主要な幾何学的構成要素を識別するように処理され、それによってその構成要素の寸法、体積、各強度が評価される。この簡単な解析は分光学的積分だけにに基づき、分光学的解析が欠けているが、いくつかの場合において、組織、細胞または細胞未満のレベルで特徴、正常および異常を認識するにはこの解析で十分である。とくに、細胞配列の幾何学的無秩序および細胞外特徴だけでなく、増殖中心を見ることができる。

10

【0073】

その代りに、分光学的積分イメージがセグメント化されると、物質の異なった領域の特定の分光学的シグナチャを抽出するための(,)平面における全分光学的解析が行われる。このシグナチャのセットは、その後、既知の物質領域情報との比較のために大型データベースを構成するのに役立ち、あるいはデータベース中に記憶されている既存のシグナチャとの比較による診断に関する解釈に役に立つことができる。

【0074】

この方法の変形において、組織応答のスペクトルだけが獲得される。これは、図1の光学ポート31において高感度2D CCD検出器45を保護または選択的なシャッタ/フィルタ構体42および分散/焦点設定素子43の後方に結合することにより簡単に行われる。再びストリークカメラ41に関しては、重要な任意の所定の波長領域が容易に選択可能であるために、分散素子43(またはDE)が機械的に取付けられている。4Dスペクトルイメージ化は、波長分散素子43に垂直なライン沿って検流計ミラーの1つ11Xを駆動し、その方向の一方が波長分散の方向であり、他方がたとえばXのような走査ミラーの移動方向であるように設置された2方向性(アレイ)CCDチップ45を使用することにより行われる。サンプルに関するレーザビームの走査の垂直方向Yは、他方の検流計ミラー11Yまたはサンプルホルダ20, 60のいずれかによって実行されることができる。全2D走査パターンはCCD45のラインフレーム周波数に等しいライン周波数において方向YまたはZの遅い垂直運動により獲得されることができる。

20

【0075】

第2の方法は、(,)平面において生成された、あるいは最も伝統的にドメインにおいて生成され、第1の方法にしたがって獲得された分光学的シグナチャからスタートする。ここでは、シグナチャは一般的に、(,)平面におけるポイントの所定の分布を、たとえば重要な領域の重量または2つの重量の比率等のスカラーに変換するスカラー関数を示す。その後、選択されたシグナチャはサンプル全体またはそのサンプルの一部をイメージ化し、選択されたシグナチャによりその強度が表わされるイメージを生成するために使用される。その後、選択されたシグナチャの関連性は、ターゲットにされた構造の局所化、形状および範囲を示し、量的に評価されることができる。

30

【0076】

第3の方法は、任意の前の知識を仮定せず、セグメント化のために分光学的積分を使用できるという仮定も行わない。その場合、全5Dイメージ(3D空間および2Dスペクトル)が生成され、5D空間において情報が探索される。微分されたスペクトルおよびおそらく幾何学構造を示すために、たとえば、エントロピー最小化方法、主要な構成要素の解析または他の線形代数ツール等の種々の方法が使用される。

40

【0077】

上述したように、技術導入により得られた非線形イメージとは対照的に、本発明の方法および装置は、全てのフォトフィジカルメカニズム、共鳴または非共鳴、弾性または非蛍光より生成されたサンプルの全体的な固有応答を可能な限り完全にイメージ化することである。これらのイメージは、ミリメートルスケールから細胞未満のスケールまでの組織構造の非常に完全な画像をミクロン解像度で示す。したがって、本発明はラベル付け工程を伴

50

わずに組織、細胞および種々の細胞未満のオルガネラを瞬時に視覚化することを可能にする。

【0078】

本発明の別の主な利点は、連続した地点で行われるこの非線形分光法が平均スペクトルで空間的に“希釈”されるスペクトルの局部特異性 (singularity) を分解することである。対照的に、これらの局部特異性は局部的に優勢であり、したがってはるかに容易に検出される。その結果、本発明はバルク分光学的な方法より感度が高く、固有の構造を他のイメージ化ツールよりはるかに良好に深く示す。さらに、本発明ははるかに豊富で効率的なスペクトルシグナチャセットを設定するのに有用である。これは、それらが真に2D (,) であることができるだけでなく、組織幾何学形状と相関されるためである。これらのフォトフィジカルシグナチャは、細胞内における、細胞間における、および組織領域のスケールで位置を突き止められることができるため、それらの元の分子に関してそれらを解釈することがさらに容易になる。したがって、これらの分光学的シグナチャを細胞の生化学に関して顕微鏡スケールで解釈することが可能となり、細胞増殖制御、組織内の細胞間の相互作用、細胞形状、細胞内分泌メカニズム、および虚血のような病理学的メカニズムに対する洞察は潜在的に非常に興味深いものとなる。

10

【0079】

固有の蛍光レイリーおよびラマン励起、ならびに、細胞および組織内の種々の正常および病的プロセス (それらに限定されないが)、とくにこれらに対して設定されたものに基づく分光学的シグナチャは、本発明の非線形励起方法および装置によってアクセス可能である。したがって、本発明の簡単な適用は全て、1以上の空間ディメンションおよび1以上の分光学的ディメンションで分解されたイメージ、あるいは全2D分光学的積分 (,) に基づくイメージのいずれかを設定するために細胞および組織の固有の応答を非線形励起により徹底的に調べる。

20

【0080】

非常に多くの組織構成要素は、チロシン、ポルフィリン、フラビン、NADH、NADPH、セロトニン、ドーパミン、コラーゲン、メラニン、ヘモグロビン、f u s c i n s、インドールアミンおよびエラスチンのような単一の光子励起のときに固有の蛍光応答を生じさせることが証明されている。たとえば、クロム親和性細胞で表されるセロトニンは、腫瘍検出に対して認められ、使用されることができる。

30

【0081】

本発明にしたがって得られたラマンスペクトルは、コレステロール、コラーゲン、エラスチン、脂質 (たとえば、コレステロール、DNA、カロチン) のような分子を識別するために使用されることができる。

【0082】

さらに、本発明にしたがって得られたハイパーレイリースペクトル、すなわち2次および、または3次の高調波応答は、たとえばコラーゲンおよびDNAを識別するために使用されることができる。高調波信号が顕微鏡的スケールでの局部オーダリングに敏感であり、したがって一般にコラーゲン組織および極性高分子構造を示すそのインジケータであることは注目すべきである。

40

【0083】

本発明の固有のイメージ化は、植物物質、原核生物、動物および人間の生物学的サンプル、あるいは生合成組織またはキメラ組織のようなサンプル、および、とくに、木材、植物、動物または人間の細胞、組織または器官、再構成された皮膚、移植された異種または自己の生体または固定された組織構造のような人工臓器の元の場所および別の場所での観察に関連している。それ故、本発明は、生物学的リサーチ、バイオテクノロジー (再構成された組織のイメージ化のような)、法廷で用いる調査および法医学に適用される。少なくとも、皮膚、口腔粘膜および粘膜下組織、眼科学的研究に關与する目の内部および外部の組織、上方および下方呼吸管、食道、肺、イーソファージ (a e s o p h a g u s)、乳房、冠状動脈、胃腸管、子宮頸部および子宮内膜を含む生殖路、膀胱、および肛門の組織

50

はイメージ化されることができる。これらの組織のほとんどに対して、蛍光および、またはラマンスペクトルが成分識別のために使用可能である。したがって、本発明を使用してこれらのスペクトルを得ることができる。

【0084】

これらのターゲットおよびその他の組織に対して、高い開口数の顕微鏡対物レンズのような対応した対物レンズ、レンズベースの対物レンズおよび純反射性対物レンズにより、非侵襲性の顕微鏡検査およびマクロスコーピーモードで図1、4および5を参照として説明し、あるいは内視鏡検査モードで図6を参照として説明した同じ原理と共にレーザ走査イメージ化が行われることができる。

【0085】

本発明は、サンプルのフィルタ処理されていない非線形光学応答（分光学的積分）から結果的に得られた純粋に幾何学的にイメージ化したものに全て基づく4つの主要なイメージ化モードを提供し、この非線形光学応答は、

(i) 1以上のスペクトルディメンション（ および、または ）、または分光学的平面（ , ）から精巧に生成されたシグナチャ、

(ii) スペクトルイメージの構成を伴う、あるいは伴わない走査による特定の分光学的敵シグナチャのローカリゼーション、

(iii) 1以上の特定の非本質的発色団の非線形光学応答と関連していることが好ましい。この最後のモードは、この技術の方法においていわゆるカウンターステイン（ c o u n t e r s t a i n ）を必要とする特定の発色団の正確なローカリゼーションとの関連 20
でとくに重要である。この方法を使用することで、細胞境界、細胞核または組織のような細胞または組織構造の主なエレメント（または成分）が固有の信号により視覚化されることができ、カウンターステインは必要ない。組織および細胞解剖学的構造を直接視覚化できると同時に、非本質的発色団のイメージ化および分光学的解析を行うことができる。

【0086】

このように固有応答により示された解剖学的関係と共に非本質的発色団を視覚化することが可能なことは、いくつかのタイプの用途に用いることができる。第1に、非本質的な外部からの信号は、バクテリア、ウィルスまたは寄生虫のような病理学関連の生体物質から、あるいは石綿のような不活性粒子から生じる可能性が高い。第2に、これらの種々の感 30
染物質または不活性物質の存在に関連した組織応答方向（ t o w a r d ）または組織変化もまた本発明により評価されることができる。第3に、信号はまた、薬の乱用に関連した、あるいは法的調査に重要な外生物質の存在からも発生することができる。

【0087】

本発明はまた、肉体的な生検を必要とせずに固有の非線形イメージ化を行う元の場所でのターゲットの医学的診断に関する。したがって、本発明は、検査されて、ミクロン解像度で分光学的に解析され、それによって細胞の形態学的構造、組織障害および微小な血管新生を示すことのできるメラノーマまたは母斑を含むが、それに限定はされない、皮膚組織における病気の検出に関する。本発明はまた、非線形プロトポルフィリン光学応答を使用して腫瘍および癌の初期兆候を検出する符号217（図5の）で示されているような遠隔 40
感知ヘッドによる口腔の診断に関する。この技術は、伝統的な組織生検および病理学的評価を補助し、あるいはこれに取って代わることさえ可能であり、また、いくつかの（11個までの）異なった波長を必要とする既存の分光学的技術を補助し、あるいはこれに取って代わることさえできる。

【0088】

腔鏡検査および子宮頸部検査はまた、符号216（図4の）で示されているような遠隔感知ヘッドを備えたデバイスを使用する本発明の別の用途である。事実上、形成異常ならびに前侵襲性および侵襲性の癌は、頸部上皮細胞、絨毛膜および深い層の少なくとも固有の蛍光を使用して検出されることができる。子宮頸部上皮細胞の場合には、とくにそのリコーゲン含有量のために、ピコ秒励起下でラマン信号シグナチャもまた検出されることがで 50

きる。結腸上皮細胞の強い固有応答からは、単一細胞レベルの組織幾何学形状を示すイメージが生成される。本発明はまた、外科的処置をモニタするために組織および細胞構造ならびにメタボリズムに関する非常に重要な情報を外科医に提供するようにGI管、筋肉および中枢神経系のような外科的に露出された組織の元の場所での直接的な巨視的または微視的イメージ化に適用される。

【0089】

細胞または組織試料はまた、組織病理学および細胞病理学的解析に加えて即座に診断（検出）するために1以上の空間ディメンションおよび1以上のスペクトルディメンションにより本発明による非線形固有スペクトルイメージ化によって視覚化され、解析されることができる。

10

【0090】

診断目的に加えて、本発明による非線形固有スペクトルイメージ化はまた、フォトダイナミック・ローカル・トリートメント（PDT）またはフォトアブレーションのようなレーザベース処置と並行して使用されることができる。事実、組織の構造およびそれらの異常を検出しているあいだに、固有のレーザ走査イメージ化を使用して同じ光路をたどる別のレーザアクションを誘導することができる。したがって、フォトアブレーションまたはフォトダイナミック・トリートメントに対して使用されるレーザビームは、単一細胞照準正確度により正確にターゲットされることができる。その代り、イメージ化ビーム（レーザ励起）自身が非線形フォト誘導破壊活動に対してローカルスケールで使用されることができる。さらに、非線形スペクトルイメージ化はまた、詳しい組織構造を細胞または細胞未満のスケールで示すことによってこれら2つのタイプのアクションの効果をモニタするために使用されることができる。最後に、上述した同じ診断（または検出）方法は、治療効果および回復を長期監視する追跡方法に容易に変形されることができる。

20

【0091】

本発明はまた、薬理学的および薬力学的問題を解くための薬の局限化および新陳代謝にねらいを定めた研究に適応される。本発明により、重要な薬は、それらが非線形励起により視覚化されることが可能ならば、生体内で空間的および時間的に、組織の解剖学的関係において顕微鏡的解像度で局限されるであろう。これは、薬設計および薬物殻の解放問題の生体内評価に対して、あるいは遺伝子治療（遺伝子操作された元素配列の視覚化、遺伝子生成物の局限、細胞増殖および組織変異）において非常に有用である。

30

【0092】

動物学的研究に対する本発明の医学的適用はまた、動物の疾病および人間の疾病の動物モデルの研究に対する1組の簡単に導出された方法を提供する。

【0093】

本発明は単なる例示により上述された装置の実施形態および方法の実施に制限されるものではなく、添付された請求の範囲を逸脱することなく当業者により考慮されることのできる何れの変形をカバーするものである。

【0094】

とくに、本発明は、完全なものに近い図1に示された装置を参照として説明されている。しかし、この装置は、それが光子エネルギーがどれ程であろうと1以上の収集ゾーンにおいて応答光子を収集する1以上の収集手段を含んでいるならば、はるかに簡単なものであってもよい。換言すると、この装置は異なった収集ゾーンに配置された1、2、3、4、5または6つの、あるいは必要ならば、それより多くの異なった収集手段を設けられることができる。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の装置を示す概略図。

【図2】

図1の装置に対するストリークカメラの入力ウインドウを示す概略図。

【図3】

50

図 1 の装置に対するレーザソース機構を示す概略図。

【図 4】

非侵襲性の顕微鏡検査またはマクロスコープ検査に適応された第 1 の可動光検出器構体を示す概略図。

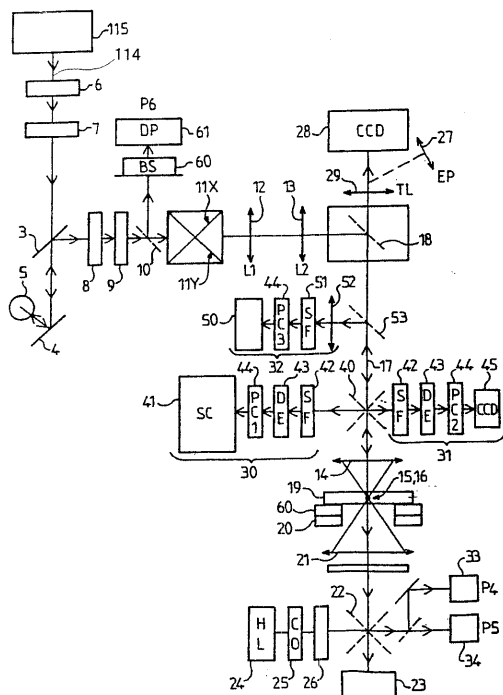
【図 5】

非侵襲性の顕微鏡検査またはマクロスコープ検査に適応された第 2 の可動光検出器構体を示す概略図。

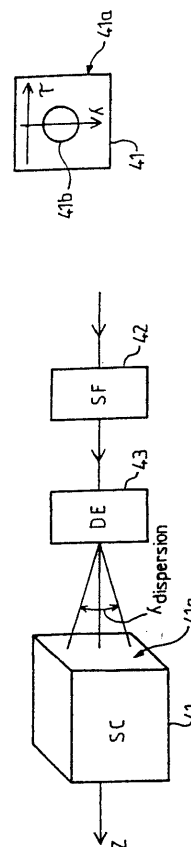
【図 6】

内視鏡検査に適応された光検出器構体を示す概略図。

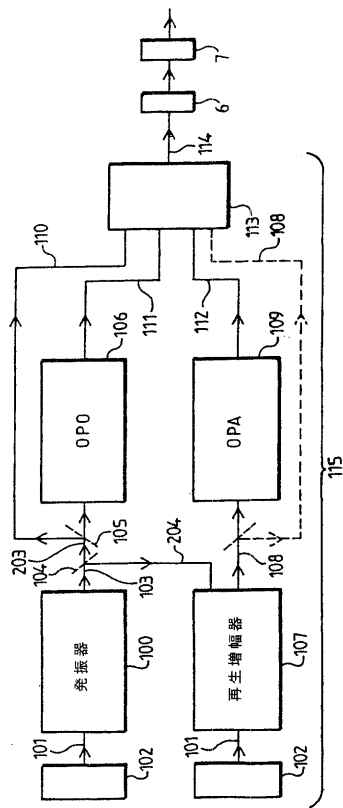
【図 1】



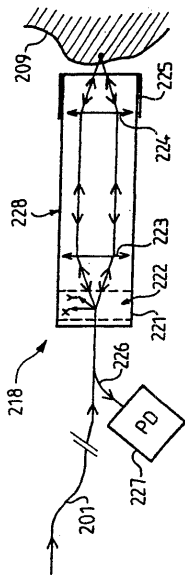
【図 2】



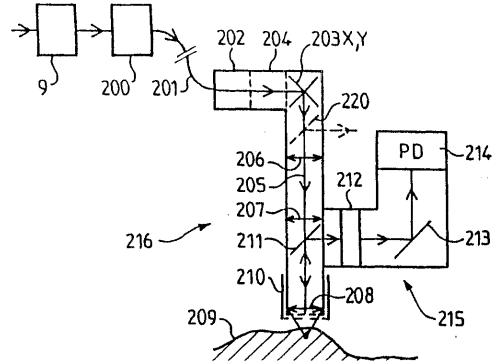
【 図 3 】



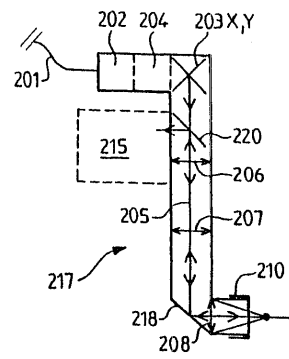
【 図 6 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 May 2002 (23.05.2002)

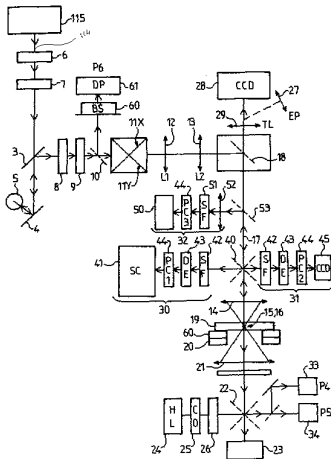
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/40974 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 21/64, 302B 21/00
- (21) International Application Number: PCT/EP01/14403
- (22) International Filing Date: 20 November 2001 (20.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00403238.9 20 November 2000 (20.11.2000) EP
- (71) Applicants (for all designated States except US): INSTITUT CURIE [FR/FR], 26, rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05 (FR). CENTRE NATIONAL DE
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): AMBLARD, François [FR/FR]; 3, rue Laplace, F-75005 Paris (FR). SASTRE-GARAU, Xavier [FR/FR]; 54, avenue de Paris, F-94300 Vincennes (FR). ROBINE, Sylvie [FR/FR]; 3, rue Raymond Marcheron, F-92170 Vanves (FR).
- (74) Agents: ERNEST GUTMANN-VYVES PLASSERAUD S.A. et al.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,

[Continued on next page]

(54) Title: MULTI-PHOTON IMAGING INSTALLATION



(57) Abstract: An installation is provided for multi-dimensional non-linear imaging of a material comprising intrinsic chromophores, using laser scanning. This installation comprises i) at least one source (115) of time stamp pulses of synchronized photons, ii) means (12-14) for locally focusing the pulses on a material to cause its intrinsic chromophores to absorb groups of at least two synchronized photons to produce response photons, iii) means (22, 40, 53) for directing the response photons to at least one collecting zone, iv) means (30-34) for collecting the response photons in the collecting zone(s) whatever their energy, v) processing means for converting the collected photons into data at least representative of their number and storing them in correspondence with at least the time stamp pulses that cause the material to produce the response photons, vi) means for scanning (11, 20) the pulses through a chosen area of the material, and vii) means for delivering from said data stored an image representative of said material chosen area, with a sub-millimeter resolution, and in function of the respective time stamp pulses of data.

WO 02/40974 A2

WO 02/40974 A2



SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/40974

PCT/EP01/14403

Multi-photon imaging installationField of the invention

The invention relates to the field of biological material imaging with the help of time stamp pulses of synchronized photons.

This invention more particularly relates to installations and methods for imaging the intrinsic non-linear optical response of biological samples, *in vivo* or *in vitro*, for example, for the purpose of biological research, medical investigations (for screening normal from pathologic tissues, for example), forensic or biotechnology applications.

The expression "non-linear optical response" designates the photons, hereafter called "response photons", which are emitted by chromophores, naturally contained in a sample, when they are excited by several (at least two) synchronized photons. More precisely, the expression "non-linear" means that the efficiency for the excitation of molecules varies in a non linear way with the electromagnetic field amplitude. In fact, the efficiency of the excitation by n synchronized photons is proportional to the n th power of the amplitude, while the efficiency of the excitation by a single photon (linear response) is simply proportional to the amplitude.

Background of the invention

As it is known by the person skilled in the art, the optical imaging of biological samples can be achieved through a large number of methods that can be classified, for the sake of simplicity, in three classes according to the physical mechanisms by which optical contrast is obtained.

The first class refers to methods based on spatial variations of the light transport properties. The classical methods are mainly based on contrast of absorption, reflectivity, refringence, birefringence, or polarization. Whatever the light transport property, it does not yield direct information about the sample biochemistry.

The second class refers to methods based on contrasts produced by "extrinsic" signals resulting from the optical excitation of well defined extrinsic

WO 02/40974

2

PCT/EP01/14403

luminescent molecules, introduced in the sample and selected both for giving strong optical signals and specific molecular recognition properties. The use of extrinsic luminescent contrast agents is time-consuming and requires constraining labelling procedures.

5 The third class refers to methods based on contrasts produced by "intrinsic" signals resulting from the optical excitation of well defined intrinsic molecules naturally present in the sample. Classically these methods offer lateral and depth resolutions which are insufficient for revealing the intimate tissue structures at cellular and sub-cellular scales.

10 The methods of the second and third classes may be based on the linear or non-linear optical response. But, as explained hereafter, it is preferable to use the non-linear optical response.

Indeed, when imaging intrinsic or extrinsic signals deep into a sample that is thicker than the depth of focus, the light must be directed toward the focus plane, and contrast information must be directed backwards or forward to the detector. So, an optimal light transport would require that the sample be transparent for excitation and emission light, and an optimal contrast would require that the sample not be transparent to the molecular excitations.

15 It results from this paradox that i) linear imaging microscopy technique can hardly perform deep tissue imaging and ii) endoscopic fluorescence imaging cannot resolve signals coming from the surface from those produced by deep chromophores. In contrast, the non-linear imaging uses a long wavelength near-infrared laser light which is in the transparency spectral window of the biological sample. So, the excitation light minimally interacts with the tissue on its way to the focus, which means that the transparency/excitation paradox of linear imaging techniques is solved, at least within a useful light penetration boundary which is currently at around 0.5 mm with excitation wavelength in the 700-1100 nm range. But, as in the case of linear fluorescence microscopy, intrinsic signals are considered as background noise and filtered out with appropriate optical filters.

20 25 30 Methods have also been proposed for extracting information about the metabolic status of a biological sample, *in vivo* or *ex vivo*, or for resolving histopathological features, like the malignancies of tumors, using intrinsic

WO 02/40974

3

PCT/EP01/14403

fluorescence or Raman emission spectra and lifetime. But, these so-called "spectral pathology" methods have been implemented with a linear excitation, thus leading to three major disadvantages :

- i) since excitation is not confined at a focus, the linear spectroscopy is not spatially resolved and intrinsically bears strong limitations in terms of lateral and depth resolutions, as well as deep imaging.
- ii) "Single-photon" fluorescence excitation spectra most often display a single and narrow peak, and one laser wavelength will only excite few molecular components. This puts stringent conditions on the choice of excitation wavelengths, and often leads to complicated spectroscopic criteria for resolving pathologic situations from healthy ones. This is for instance the case of intrinsic imaging of skin lesions or single point intrinsic fluorescence spectroscopy of the colon, where several wavelengths are necessary for one discrimination.
- iii) Since spectral anomalies are produced by molecular sources which are not uniformly distributed in the sample, but most likely concentrated in specific cell types or sub-cellular structures, their spectroscopic contribution might be locally dominant in the wavelength and lifetime domain. Nevertheless, these local contributions are never dominant features in the final spectrum and therefore are difficult to extract, because they are spatially averaged out.

To summarize, every spectral diagnostic method implemented with linear excitation results in a very poor spatial resolution, a frequent need for multiple sources, a limited sensitivity, and an impossibility to get information at the cellular scale.

Summary of the invention

An object of the invention is to provide a solution to at least part of the drawbacks described above, and more particularly to make it possible i) to get images showing the geometric structure of a biological sample with resolution ranging from the sub-micron scale (cellular and sub-cellular scales) to the scale of tissular and organ structures, from a non-linear intrinsic imaging (microscopy,

WO 02/40974

4

PCT/EP01/14403

macroscopy or endoscopy), and ii) to combine such non-linear intrinsic imaging with spectroscopy for tissue exploration and diagnosis (or more generally detection of differences between normal and abnormal tissues).

To this end, the invention provides means appropriate to acquire images
5 of the intrinsic non-linear optical response which may be resolved spatially in two dimensions (2D, or XY) or three dimensions (3D or XYZ), and, additionally, spectrally in lifetime (τ) and/or wavelength (λ).

More precisely, the invention provides an installation for multi-dimensional laser scanning of a material comprising intrinsic chromophores
10 responsive to excitation by photons of at least one chosen energy to produce response photons. This installation is characterized by :

- * at least one source capable of producing time stamp pulses of synchronized photons,
- * means for locally focusing the pulses on a material to investigate, to cause its
15 intrinsic chromophores to absorb groups of at least two synchronized photons to produce non-linear response photons,
- * means for directing the response photons to at least one collecting zone,
- * means for collecting the response photons in the collecting zone(s), whatever their energy,
- 20 * processing means for converting the collected photons into data at least representative of their number, and storing the data in correspondence with at least the time stamp pulses that cause the material to produce the response photons,
- * means for scanning the pulses through a chosen area of the material, and
25 * means for delivering from the data stored an image representative of the material chosen area, with a sub-millimeter resolution, and as a function of the respective time stamp pulses of the data.

Thanks to this spectroscopic integral, the response photons emitted by intrinsic chromophores of numerous components of the material are collected,
30 whatever their radiative de-excitation channel (fluorescence, luminescence, non linear Raman and non linear Rayleigh (generation of second and third optical harmonics)). Therefore, the installation is able to deliver images with a high resolution extending from the cellular scale to the sub-cellular scale.

WO 02/40974

PCT/EP01/14403

5

The Rayleigh and Raman processes do not involve photon absorption *stricto sensu*, but in the present specification absorption will still be used for simplicity.

Preferably, the collecting means comprises detector means capable of
 5 discriminating the response photons as a function of their respective arrival time and/or their respective energy (or wavelength), and the processing means is configured for storing the data in correspondence with at least a time stamp pulses and an arrival time and/or energy (or wavelength). Thus, it is possible to extract from the stored data only a part representative of a chosen region of the
 10 (λ, τ) plan in order to determine their originating molecular component(s).

In preferred embodiments, the collecting means and directing means are parts of a microscope, a macroscope or an endoscope.

The apparatus may include other characteristics taken separately or in combination, as defined in claims 2 to 35.

15 The invention also provides a method for multi-dimensional laser scanning of a material comprising intrinsic chromophores responsive to excitation by photons of at least one chosen energy to produce response photons. This method is characterized by the following steps :

- * producing time stamp pulses of synchronized photons,
- 20 * locally focusing the pulses on a material to cause its intrinsic chromophores to absorb groups of at least two synchronized photons to produce non-linear response photons,
- * directing the response photons to at least one collecting zone,
- * collecting the response photons in the collecting zone(s), whatever their energy,
- 25 * converting the collected photons into data at least representative of their number, and storing the data in correspondence with at least the time stamp pulses that causes the material to produce the response photons,
- * scanning the pulses through a chosen area of the material, and
- * delivering from the data stored an image representative of the material chosen
 30 area, with a sub-millimeter resolution, and as a function of the respective time stamp pulses of the data.

The method may include other characteristics taken separately or in combination, and in particular the collected photons may be converted into data

WO 02/40974

PCT/EP01/14403

6

representative of their respective arrival time and/or energy, and stored in correspondence with at least a time stamp pulses and an arrival time and/or energy.

5 Brief description of the drawings

Other characteristics and advantages of the invention will appear on examining the following detailed description and the accompanying drawings, in which :

- 10 - Figure 1 is a diagram illustrating an apparatus of the invention;
- Figure 2 is a diagram illustrating the input window of a streak camera, for the installation of figure 1;
- Figure 3 is a diagram illustrating a laser source setup for the installation of figure 1;
- 15 - Figure 4 is a diagram illustrating a first movable photodetector assembly adapted to non invasive micro or macroscopy;
- Figure 5 is a diagram illustrating a second movable photodetector assembly adapted to non invasive micro or macroscopy ; and
- Figure 6 is a diagram illustrating a photodetector assembly adapted to endoscopy.

20 The accompanying drawings are essentially certain in character. Consequently, they can serve not only to complement the invention, but also to contribute in defining it, where appropriate.

25 Detailed description of the preferred embodiments

In the description below, reference is made to an installation and a method for multi-photon imaging of a biological material. More precisely, reference is made, purely by way of example, to a multi-photon imaging microscope.

As mentioned above, the invention refers to an installation (or instrument) that permits laser scanning imaging of a biological sample chosen area, in an appreciably continuous way or at selected discrete points, in two (2D) or three (3D) dimensions, by moving either a laser beam or the sample holding stage, or both.

At each scanning point, with a dwell time between two successive points typically ranging from 100 microseconds up to seconds, a light emitted by a pulsed laser source is focused in a "focal volume" within or at the surface of the

WO 02/40974

7

PCT/EP01/14403

sample. The intrinsic chromophores comprised in the sample absorb groups of at least two synchronized photons to produce non-linear response photons which can be collected and integrated on several kinds of detectors : (1) a point detector such as a photo-multiplier tube (PMT) or a semi-conductor based detector (or more generally a 2D imaging detector), (2) a 2D semiconductor array detector, coming after a dispersing element, for resolving the wavelength composition in one direction along with a spatial resolution in a perpendicular direction, (3) a set of a discrete point detectors in parallel, coming after optional chromatic filters and arranged to provide lifetime information, (4) a streak camera for 2D spectroscopic resolution in the wavelength/lifetime plane (λ, τ), coming after a dispersing element.

The embodiment illustrated in Figure 1 contains several optical ports for simultaneously using different combinations of the 4 above mentioned types of detection, or rapidly switching from one single detection mode to another one. In the following description, a "5D imaging" refers to the combination of a 2D spectroscopic resolution of the sample response in the plane (λ, τ) with a spatial resolution provided by a 3D laser scanning (XYZ); and a "4D imaging" refers to the combination of a 2D spectroscopic resolution of the sample response in the plane (λ, τ) with a spatial resolution provided by a 2D laser scanning (XY), or to the combination of a 1D spectroscopic resolution of the sample response in λ or τ with a spatial resolution provided by a 3D laser scanning (XYZ).

Since biological samples can either be accessed from only one side, like bulk tissues, or from both sides in the case of thin enough sections, the preferred embodiment is based on a configuration in which i) the laser beam and associated scanning optics comes from one side of the bulk sample, e.g., from the top if an upright configuration is used, and ii) a sample holder for receiving the opposite side of the bulk sample without any optics, or equipped for two exclusive optical functions, namely trans-illumination or detection. The setup incorporates the possibility of direct optical control in trans-illumination mode, using either visual inspection through eyepieces or a simple imaging device like a Coupled Charge Device (CCD).

WO 02/40974

PCT/EP01/14403

8

Another basic principle of the proposed configuration is that detection ports are built to bring detectors as close as possible to the light collecting optics, so as to minimize optical losses and the effects of geometric dispersion.

In Figure 1 an excitation light 114 is produced by one of several possible lasers of a laser source setup 115, producing ultrashort time stamp pulses of different wavelengths, peak energies, pulse duration and repetition rates, respectively and preferably. An example of laser source setup 115 is illustrated in Figure 3. The laser power is controlled by a set 6 of one or two electro-optical modulators for two distinct purposes : the first modulator is used as a manual or low frequency computer-controlled intensity shutter possibly coupled to the scanning timing control, while the other modulator is used as a resonant high frequency modulator either for synchronous detection or for suppressing pulses for reduced repetition rate.

Notch filters 7 for Raman imaging can be installed downstream the electro-modulator(s) 6. Further, a system 3, 4, 5 for precompensation of temporal dispersion is preferably installed by either a set of two antiparallel prisms or gratings 5, with a flat input coupling mirror 4 and a flat output coupling mirror 3. The laser output polarization is then controlled by an optional element 8, which can be a $\lambda/2$ or $\lambda/4$ plate. Beam shaping is optionally achieved if necessary with a simple 2-elements telescope 9 designed with one divergent and one convergent lenses to avoid beam focalisation.

The laser beam then traverses an optional dichroic mirror 10, towards a set of two coupled galvanometric mirrors 11X and 11Y for point scanning in the X and Y direction, which steers the beam onto a set of two converging lenses 12 and 13. Via an optional flat mirror 18, the two lenses 12 and 13 conjugate the plane of the galvanometric mirror 11X or 11Y with the back aperture of the lens 14 that focuses the excitation light at a current focus 15 within the sample 19. The current focus can either be axial at position 16, i.e., on the optical axis of the lenses 12, 13 and 14, or away from the axis depending on the position of the galvanometric mirrors.

The excitation beam 17, between 13 and 14, is collimated, and the response photons emitted by the intrinsic chromophores of the sample are

WO 02/40974

9

PCT/EP01/14403

therefore also approximately collimated, which simplifies the optical design. In addition, the free space between 13 and 14 is large enough for implementing detection ports 30, 31 and 32 for a better detection efficiency. The lens 14 can either be a true single lens, an achromat, or a compound set of lenses like a microscope objective. The lens 14 can also be replaced with a purely reflective objective. This is particularly important when a spectral imaging involves UV emission, or requires optimal IR transmission, or minimal chromatic dispersion or else requires minimal temporal dispersion of the light exciting the sample or emitted by it.

The sample 19 can either be a thick one with observation limited to one side, or a thin sample with possible optical access from both sides. The former case is treated as a truncation of the setup shown in Figure 1, by which the sample holder and all optical elements below it are replaced with a sample holder only, of the same type, or possibly more bulky for heavier samples or materials. In Figure 1, it is focus on the case of the two-sided access. The sample 19 is mounted on a plate 60 (or sample holder) which is fixed to an XYZ translation stage 20 moved by mechanical motors or piezoactuators, or else a combined mechanism. The lenses 14 and 21 can also be moved along their axis. The light emitted by the current sample focus 15 is collected by both lenses 21 and 14.

By inserting a large flat or curved dichroic 21 below, the response photons (or sample light) can be reflected backwards it and toward the detection ports 30, 31 and 32, while excitation light is being transmitted forward to the dump.

The lens 14, that is confocal with lens 21, and similarly to the former, can be replaced with any of the following elements : a true single lens, an achromat, a compound set of lenses like a microscope objective, or a purely reflective objective. Unlike lens 14, lens 21 can also be replaced with a non dispersive element like a purely reflective condensor. The optical conjugation of the two lenses 14 and 21 is better but not necessary, since downstream detectors (or detection ports) P4 and P5 are set close to the back aperture of lens 21. In particular, to keep these two lenses 14 and 21 at the optimal location, the Z-motion must be preferably achieved by the sample holder 60.

WO 02/40974

10

PCT/EP01/14403

The light collected by the below lens 21 can be directed toward two detection ports 33 and 34 named P4 and P5, through a dichroic mirror 22. This dichroic mirror 22 is used for separating the light (response photons) emitted by the sample, which is in the visible or UV range, from the excitation light which is in the near infrared (NIR) or infrared (IR) range. The latter excitation beam light is sent through the dichroic mirror 22 toward a beam dump 23. Conversely, sample light (or response photons) can be directed back to the sample for further epicollection by inserting a flat or curved mirror between 21 and 22. The same dichroic mirror 22 is also used for directing toward the sample a visible light coming from a halogen lamp 24, through the appropriate condensing optics 25 and hot filter 26. This visible light is used for trans-illumination of the sample. The corresponding image is sent toward eye-pieces 27 for direct visualization or a CCD 28, through a tube lens 29. In that case of course, the mirror 18 is removed.

By replacing the mirror 18 with a dichroic mirror, one can also directly image, on the CCD 28, the light (or response photons or sample signals) emitted by the sample upon excitation by the laser beam 17. Finally, the sample signals resulting from the excitation laser beam 17 can be detected on detection ports 30, 31 and 32. This involves one dichroic mirror 40 that can be translated into the optical path and rotated along the optical axis of lens 14 to direct the light in opposed directions toward 30 or 31. These two opposed and exclusive collection ports 31 and 32 can be equipped for spectroscopic imaging, but their use is exclusive.

A third detection port 32 can be used simultaneously with either port 30 or 31, and is preferably a compact size point detector 50, like a PMT or a semiconductor-based detector. This point detector 50 is coupled to a port connector in front of a shutter/filter assembly 51, and preceded by a lens 52 that conjugates the detector input plane with the back aperture of the lens 14, to provide a Fourier imaging of the sample signals. A sliding dichroic filter 53 directs the sample signals toward lens 52. The detector 50 can also be located at the detection port 33 (P4) or 34 (P5).

One of the two detection ports 30 and 31, for example 30, is preferably equipped with a streak camera 41, in front of which are installed a shutter and

WO 02/40974

11

PCT/EP01/14403

filter assembly 42, an element 43 for chromatic dispersion and focalisation (or dispersing element) onto the streak camera 41 photocathode window, and a coupling mechanism 44 for adjusting the position of the streak camera 41 relative to element 43. Details on the streak camera 41 and its coupling are given below with reference to Figure 2. The other port 31 can be equipped with a spectral imaging detector described below in the 4D spectral imaging section. There is no reason for using these two types of detections simultaneously. Noteworthy, any of the two detection means 41 and 45 can also be located beyond the sample at the location of the detection port 34.

At last, a detection port 61 (or P6) with a beam steering 60 is preferably available upstream the galvanometric mirrors 11, at a position which is de-scanned (i.e., the beam of response photons is approximately fixed in position). At that position, any detection means mentioned above can be used while scanning.

The streak camera 41 is aimed at analyzing sample signals in the (λ, τ) plane, which means that the excitation beam 17 must be fixed, and preferably axial. Imaging is then achieved by a 2D or 3D sample motion with a motor and/or piezo-actuators. Such a streak camera 41 can be coupled to any of the three exit ports 30, 31 or 35.

The response photons (light) emitted by the sample are reflected by the dichroic mirror 40 or 22 and go first through a "shutter/modular filter" assembly 42, for protecting the streak camera 41, and for installing any sort of chromatic or neutral density filter required for analyzing the non-linear optical response of the sample as whole or in part. The response photons are then dispersed by a prism assembly or a grating 43 (or DE) before being focused by a lens or the grating 43 itself onto the streak camera input window 41b located on its input face 41a (as illustrated in Figure 2), which then resolves the photons in time in the perpendicular direction. The streak camera 41 works in a synchroscan mode in phase with the laser frequency, or at a submultiple of that frequency using a pulse selection device. The selection of the center wavelength and the dispersion gain to be analyzed on the streak is achieved by translations of the dispersion coupler 43.

WO 02/40974

12

PCT/EP01/14403

In a different configuration, the dispersing element 43 can be removed so that one direction of the streak camera 41 be used for lifetime (τ) imaging, and the perpendicular direction of the streak camera 41 be used in conjunction with line scanning for imaging lifetime along lines in the sample. In that case the scanning strategy is very similar to that described below for 4D (or 5D) spectral imaging, the difference lying in the fact that the time deflection direction of the streak camera 41 corresponds to the spectral dispersion direction of the 4D (or 5D) detection system.

Reference is now made to Figure 3 to describe an example of a laser source setup adapted to non-linear imaging installation according to the present invention.

A multi-photon excitation able to induce a non-linear optical response (for example fluorescence response photons) requires a high instantaneous power which can be achieved by different types of lasers providing very short pulses in the visible red or near infra-red region. Mode-locked lasers providing 60-100 fs (femtosecond) pulses with wavelengths in the 700-1050 nm range are typical sources for multi-photon excitation imaging. Picosecond sources can also be used. Because the present invention aims at exciting the intrinsic non-linear response of tissues in a very general way, including not only fluorescence but also luminescence and non-linear Raman and Rayleigh responses, a wider range of short pulsed sources must be preferably used. Several parameters may be used for choosing such a laser source : the wavelength, the pulse duration, and the pulse energy and repetition rate.

Wavelengths, classically selected in the 700-1050 nm range, cannot be chosen much deeper into the visible range since linear excitation of tissues will arise and advantages of non-linear excitation will be lost. To the contrary, higher wavelengths in the limit of water transmission are advantageous for several reasons : (i) it allows a reduced scattering from tissues, (ii) it might allow an improved tradeoff between low absorption and low scattering, (iii) it allows a reduced temporal dispersion in optical elements and optical fibers. Noteworthy, wavelengths in the 1-1.6 μm (micron) range provide non-linear sub-resonant excitation of intrinsic chromophores, and is therefore more selective for non-

WO 02/40974

13

PCT/EP01/14403

linear Raman and Rayleigh excitation with respect to unwanted fluorescence excitation. Raman can also be excited in the present method in the UV resonant mode, via a non-linear excitation of the 700-800 nm fundamental radiation, preferably in the picosecond mode. To this end a 3 synchronized photon
5 excitation is preferable, especially for DNA detection. In particular second or third harmonics (non-linear Rayleigh), or three photon imaging of intrinsic tissue components is easier with a wider range of excitation wavelengths.

The pulse energy is an important concern for biological imaging since the depth penetration is limited by the power at the sample focus. As known by the
10 person skilled in the art, the penetration depth in a given sample is approximately scaling as the logarithm of the laser power. For example, the classical mode-locked oscillators for laser source, actually used for non-linear fluorescence, provides pulses in the 1-10 nJ (nanojoule) range, which leads to an approximate effective microscopic imaging depth of 0.5 mm in *in situ* and *ex situ* tissues.
15 Higher energy pulses can give access to deeper regions, but it can induce tissue damage, not necessary at the sample focus, but already at the surface of the sample. Nevertheless, amplified parametric oscillators (OPA) giving pulses in the microjoule (μ J) range can be used for tissue imaging, with an appropriate optics for focusing the laser beam into the sample (for example a special optical design
20 with large surface lenses, or large catadioptric devices), as described hereafter.

Advantageously, the installation of the present invention uses one of several pulsed lasers, which are selected only for the beam characteristics they produce : pulse duration, energy, wavelength. The very nature of the crystals
25 employed in the laser sources is not of central importance, other laser designs could be used as long as they produce similar radiations. In order to image non-linear intrinsic optical responses in the most flexible way, the preferred embodiment comprises a set of laser sources illustrated in Figure 3. Of course, not all of these lasers are simultaneously required, and any subset of these laser elements is enough for the invention, as long as it produce a useful radiation.

30 The whole laser source setup that will be described hereafter, as an example, corresponds to the element 115 in Figure 1.

WO 02/40974

14

PCT/EP01/14403

A Ti:Sapphire oscillator 100 is pumped by a continuous laser beam 101 at 532 nm, produced by a 5/10 W solid-state laser 102 (other oscillators, and especially crystal oscillators, may be used). This first oscillator 100, produces a femtosecond (for example 60-100 fs) or picosecond (for example 1-4 ps) pulsed beam 103 in the 700-1050 range, with an average power up to 1.8 W and a repetition frequency of 76-80 MHz. The beam 103 impinges on an optional flat semi-reflecting mirror 104 which directs a part 204 of this beam toward a regenerative amplifier laser cavity 107. The remaining part 203 of beam 103 is optionally reflected, totally or partially, by a flat mirror 105 as a beam 110 toward a beam selector 113. The remaining part 203 can, partially or totally, enter into an optical parametric oscillator 106 which produces femtosecond or picosecond pulses 111 preferably with temporal characteristics similar to beam 110, with a slightly reduced pulse energy but wavelengths in the 1-2.4 μm range. The regenerative amplifier laser cavity 107, when pumped by another laser identical to laser 102 and injected with beam 204, outputs microjoule-femtosecond (typically 130 fs) pulses 108 at a wavelength of 800 nm and a repetition rate of 250 kHz. The pulses 108 are then converted within an optical parametric amplifier 109 into pulses 112, similar in duration, but not in repetition rate, to pulses 111, but in the 1.1-3.2 μm wavelength region. It is also possible to directly use the beam 108 with the help of a (semi)reflective mirror.

Finally, beams (pulses) 110, 111, and 112 (and eventually 108) all arrive in a beam selector 113, that selectively outputs one of the input beams, or a combination of at least two of them. Since the laser cavity 107 only requires a very minor fraction of beam 103 to operate, and since the optical parametric oscillator 106 only needs 20 to 30% of beam 103 to operate, all three beams 110, 111, and 112 can be produced and used simultaneously. Again, the maximal flexibility of the present set-up is not absolutely necessary for getting satisfactory results with the present invention, and several possible subsets are sufficient for most applications.

Femtosecond and picosecond operation can in principle both be used for intrinsic imaging, but with distinct advantages in terms of excitation efficiency. In particular, picosecond mode as compared to femtosecond mode shows a more

WO 02/40974

15

PCT/EP01/14403

narrow spectrum which is required for resolving Raman lines, and is also better for propagation into optical fibers of considerable interest especially for endoscopic applications. In the picosecond mode, the notch filters are not necessary. As above mentioned the excitation beam can be modulated by an electro-optical modulator 6, either in a resonant way for pulse selection, or at low frequency to serve as a shutter.

All lenses of the installation are carefully selected for their transmittance and antireflecting coating in the spectral range required by the application. The correction of chromatic aberration is not an important concern in selecting the focusing of optics. The correction of spherical aberrations is more important. In addition, imaging tissue often require low magnification objectives which have also a very low numerical aperture in general. For these reasons, it is preferable to use specific lenses having a large back pupil, a high numerical aperture, and a very good correction of spherical aberrations. Large pupils and beam expansion are necessary when the excitation beam comes from the OPA laser source 109 with microjoule pulses, in order to reduce excessive light power through the focusing element, but also to minimize the flux traversing the tissue surface. It is also important to select the optical elements while taking into account the fact that excessive temporal and spatial dispersion of refractive optical elements deteriorates the quality of spectroscopic analyses and the overall efficiency of the methods. Therefore, purely reflective elements are preferred as soon as it is possible, especially for lenses 14 and 21.

The above embodiment applies essentially to samples that can be brought onto a microscope or macroscope stage 60, 20 which can be translated but remains attached to a bulk installation. This includes classical isolated micro or macroscopy samples, but also more bulky samples that remain intact in their anatomic context, like a part (at least) of a human or animal body. But the invention also applies to another embodiment with a remote imaging head connected in a flexible way to the laser source.

One example of such an embodiment is illustrated in Figure 4. An input coupler 200 is installed immediately downstream the beam shaping optics 9 and replaces the galvanometric mirrors 11X-Y of the installation of Figure 1. This

WO 02/40974

16

PCT/EP01/14403

input coupler 200 focuses the excitation laser beam coming from the source setup 115 and establishes the proper position of a flexible light guide 201 in order to optimize the laser input. The light guide 201 can be, for instance, an optical fiber. The temporal dispersion inside the fiber 201 is preferably compensated by a proper adjustment of the pre-compensation elements 3, 4 and 5. The output of the light guide 201 is coupled to an output coupler 202 similar to the input coupler 200 and which produces a parallel beam that impinges on two galvanometric mirrors 203X and 203Y. These mirrors 203 steer the excitation light beam 205 through two lenses 206 and 207 toward a focusing lens 208, to image the galvanometric mirrors onto the back aperture of 208, in a way similar to the one described in reference to Figure 1. The lens 208 focuses the excitation light beam 205 into the sample 209, at a relative distance from the lens that is adjusted by an adjustable sleeve 210.

The response photons coming back from the sample are then directed through a dichroic mirror 211 toward a detection unit 215 comprising at least a filter 212, an element 213 that directs the photons onto a photodetector 214 (PD). In the most simple embodiment, the element 213 is a flat mirror, while the photodetector 214 is a compact photomultiplier tube (PMT); in that case an additional lens is preferably introduced for conjugating the back aperture of the lens 208 with the detector entrance. The element 213 can also be a small dispersing element (DE), the detector 214 then being a 2D array detector (for example a CCD) assembled for (λ, x) imaging, with one direction used for chromatic analysis of the signal, and a perpendicular direction used for sample scanning on the mirror. In that mode, lines are preferably scanned and analyzed at the frame frequency of the CCD detector. Small amplitude scanning in the Y direction, i.e., in the λ direction can be achieved without losing the spectral information, since successive Y-positions correspond to successive images, with a spectral offset that can be compensated for as a function of the Y-direction.

In a variant, the element 213 can be a gated photomultiplier for time-resolved analysis. All the parts of the assembly connected to and downstream the fiber coupler are enclosed in a closed rigid mount 204. The photodetector assembly 215 can collect the response photons from a dichroic 211 positioned

WO 02/40974

17

PCT/EP01/14403

between lenses 207 and 208, or between the galvanometric mirrors 203 and the lens 220 as illustrated in Figure 5, depending on the desired collection efficiency and/or accessibility. In the latter case, shown in Figure 5, one can use the detectors above mentioned in reference to Figure 4. Moreover a lateral observation of the material is also possible at a right angle with a mirror 218.

Another alternative embodiment is illustrated in Figure 6. This embodiment is more particularly adapted to non-linear intrinsic imaging in an endoscopic mode. In that case, the fiber output coupler 221 includes a remote control device 222 which can move the tip of the fiber in two perpendicular directions in the focal plane of a coupler lens 223. The excitation light emerging from the core of the fiber tip is directed by lens 223 to a focusing lens 224 in order to be focused into the sample 209 and scanned correspondingly in the focus plane. To this end, the lens 224 is in the focal plane of the lens 223. Again, a sleeve mechanism 225 positions the focus plane inside the sample. Parts 222-225 of assembly 218 are enclosed in a small diameter and rigid tube 228. The response photons emerging from the sample 209 are preferably collected by a large cladding around the fiber core, and then split away from fiber 201 into a collecting fiber 226 that directs them toward a photodetector assembly 227 similar to the assemblies referenced 215.

The non-linear imaging of a sample 19 comprised at least the steps mentioned hereafter.

In a first step one produces time stamp pulses of synchronized photons of at least one chosen wavelength, with the source 115.

In a second step the pulses are locally focused on a first part of a chosen area of the material (sample) to cause its intrinsic chromophores to absorb groups of at least two synchronized photons and de-excite themselves by emitting photons of energies depending from their respective constitution (more precisely their specific energy transitions) and from the multiphotons excitation wavelength.

In a third step, the photons emitted by the sample (response photons) are directed to at least one collecting zone located at 50 or 33 or 34.

WO 02/40974

18

PCT/EP01/14403

In a fourth step, the response photons are detected, whatever their energy, by a detector, for example a point detector, with a high sensitivity over the widest possible region of the spectrum, ranging from the UV region to the near infra-red (NIR) region, for example around 800 nm. In contrast to all the non-linear imaging installations known in the art, the only filter of the installation is the one used for rejecting the excitation light. So, one carries out a spectroscopic integration, of all the largest accessible region of the (λ, τ) plane, resulting from the intrinsic chromophore emission produced by all possible photo-physical mechanisms (radiative de-excitation channels), like for instance, fluorescence emission, Raman and Rayleigh scattering.

This step is aimed at 2D or 3D spatial sample imaging using its intrinsic non-linear optical response as completely as possible.

In a fifth step, the detector converts the collected photons first in an analog physical signal, for example a voltage or a current, and then in data at least representative of their number. The data are then stored in correspondence with at least the time stamp pulses that cause the intrinsic chromophores to produce the response photons. Of course, when the detector is able to discriminate the different wavelengths λ and/or arrival time (or lifetime) τ , the data are also stored in correspondence with the wavelength and/or arrival time.

Then in a sixth step, one carries out again the second to fourth steps for every other parts of the material area. This is achieved by scanning the pulses through the area. It can be a 2D or 3D spatial scanning.

Finally, in a seven step, one delivers from the stored data a full image representative of the material chosen area, with a sub-millimeter resolution, and in function of their respective time stamp pulses.

Other examples of imaging methods will now be described. According to the first method, one first records a 2D or 3D image of the sample as above described, by capturing the full response (or spectroscopic integral), referring to the signal integration in the (λ, τ) plane. This full response image, most simply captured by a point detector located at 50, 33 or 34, such as a photomultiplier or an APD. A more complete spectroscopic response can possibly be established

WO 02/40974

19

PCT/EP01/14403

using at least one other excitation wavelength, so as to make the following step easier.

Then, the resulting image, which is in general quite contrasted, is processed to identify its main geometric components, through a possibly automatic image segmentation procedure, from which the size, the volume, the respective intensity of the components are assessed. In some cases, this simple analysis, only based on the spectroscopic integral and devoided of any spectroscopic analysis, is enough for the purpose of recognizing features, normal and abnormal, at the tissular, cellular, or subcellular level. In particular, proliferation centers can be seen, as well as geometric disorders of the cellular arrangement, and extracellular feature.

Alternatively, once the spectroscopic integral image has been segmented, a full spectroscopic analysis in the (λ, τ) plane is carried out for extracting specific spectroscopic signatures of the different regions of the material. This set of signatures can then either serve to construct a large database, with comparison to the known material region information, or be interpreted in terms of diagnosis by comparison with existing signatures stored in a database.

In a variant of this method one only acquires the λ -spectrum of the tissue response. This is simply accomplished by coupling a sensitive 2D CCD detector 45 in the optical port 31 of Figure 1, behind a protective or selective shutter/filter assembly 42, and a dispersing/focusing element 43. Again, as for the streak camera 41, the dispersing element 43 (or DE) is mechanically installed in order any given wavelength region of interest can be easily selected. A 4D spectral imaging is achieved by driving one of the galvanometric mirror 11X along a line perpendicular to the wavelength dispersion element 43, and using a bi-directional (array) CCD chip 45 installed in such a way that one of its directions is that of the wavelength dispersion, while the other is that of the scanning mirror movement, for example X. The perpendicular direction Y of scanning of the laser beam relative to the sample can be executed either by the other galvanometric mirror 11Y or the sample holder 20,60. A full 2D scanning pattern can be achieved at a

WO 02/40974

20

PCT/EP01/14403

line frequency equal to the line frame frequency of the CCD 45, with slow perpendicular motion in direction Y or even Z.

The second method starts from the spectroscopic signatures established in the (λ, τ) plane or most classically in the λ domain, and obtained according to the first method. Here, a signature most generally designates a scalar function that transforms a given distribution of points in the (λ, τ) plane into a scalar, e.g., the weight of a region of interest or the ratio of two weights. Selected signatures are then used to image the entire sample, or part of the sample, and produce images in which the intensity is given by the selected signature(s). The relevance of the selected signature then reveals the localisation, the shape, and the extent of the targeted structure, which can be quantitatively assessed.

The third method does not assume any previous knowledge, nor the assumption that the spectroscopic integral can be used for segmentation purposes. In that case, the full 5D image (3D spatial and 2D spectral) is established, and information is sought after in the 5D space. Various methods are employed to reveal differentiated spectral and possibly geometric structures, e.g., entropy minimisation methods, principal component analysis or other linear algebra tools.

As above mentioned, in contrast to the non-linear images delivered by the installations of the art, the method and installation of the invention aim at imaging the total intrinsic response of a sample as completely as possible, produced by all the photophysical mechanisms, resonant or non-resonant, elastic or not-fluorescence. These images show a quite complete picture of tissue structures from the millimeter scale down to subcellular scales, with micron resolution. Therefore the invention allows the instantaneous visualization of tissues, cells and various subcellular organelles, without any labelling procedure.

Another major advantage of the invention is that the present non-linear spectroscopy carried out at successive points resolves local singularities of the spectrum that are spatially "diluted" out in the average spectrum. In contrast, these local singularities are locally dominant and thus much more easily detected. Consequently the present invention is more sensitive than bulk spectroscopic methods, and shows intrinsic structures much better and deeper

WO 02/40974

21

PCT/EP01/14403

than other imaging tools. In addition, the invention is useful for establishing a more rich and efficient set of spectral signatures, not only because they can be truly 2D (λ, τ), but also because they are correlated with the tissue geometry. Because these photophysical signatures can now be localized within the cell, between cells, and at the scale of tissular regions, it is more easy to interpret them in terms of their molecular origin. Therefore, interpretations of these spectroscopic signatures in terms of cellular biochemistry are now possible at the microscopic scale, with potentially very interesting insight into pathophysiological mechanisms such as cell proliferation control, intercellular interactions within tissues, cell shape, intracellular secretion mechanisms and ischemia.

The spectroscopic signatures based on intrinsic fluorescence Rayleigh and Raman excitation and in particular, but not exclusively, those established for various normal and pathologic processes in cells and tissues are accessible by the present non-linear excitation method and installation. Therefore, straightforward applications of the present invention are all applications in which intrinsic response of cells and tissues are probed by non-linear excitation to establish images either resolved in at least one spatial dimension and at least one spectroscopic dimension, or based on a full 2D spectroscopic integration (λ, τ).

A very large number of tissue components have been shown to yield an intrinsic fluorescence response upon single photon excitation, such as : tyrosine, porphyrins, flavins, NADH, NADPH, serotonin, dopamine, collagen, melanins, hemoglobin, fuscins, indolamine and elastin. Serotonin, for instance expressed by enterochromaffin cells, can be seen and used for tumor detection

Raman spectra, obtained according to the present invention, can be used to identify molecules such as : cholesterol, collagen, elastin, lipids (for example cholesterol, DNA, β -carotene).

Moreover, hyper-Rayleigh spectra, i.e., second and/or third harmonic responses, obtained according to the present invention, can be used to identify collagen and DNA, for example. Noteworthy, harmonic signals are sensitive to, and thus indicators of, a local ordering at a microscopic scale, which reveals collagen organisation and polar polymeric structures in general.

WO 02/40974

22

PCT/EP01/14403

The present intrinsic imaging concerns *in situ* and *ex situ* observation of biological samples of plant material, procaryotes, animals and human beings, or bio-synthetic samples such as reconstituted tissues or chimeric tissues, and more particularly wood, plant, animal or human cells, tissues or organs, artificial organs such as reconstituted skin, implanted xenogenic or autologous living or fixed tissue structures. Consequently, the invention applies to biological research, biotechnology (such as imaging of reconstituted tissues), forensic investigation applications and medicine. At least the following tissues can be imaged : skin, oral mucosa and submucosa, intra and extra ocular tissues concerned by ophthalmologic investigations, upper and lower respiratory tract, oesophagus, lungs, aesophagus, breast, coronary arteries, gastro-intestinal tract, genital tract including the uterine cervix and endometrium, bladder and anus. For most of these tissues, fluorescence and/or Raman spectra can be used for component identifications. So the present invention can be use to obtain these spectra.

For these targets and other tissues, laser scanning imaging can be performed along with the same principles as those described with reference to Figures 1, 4 and 5 in non invasive macroscopic and microscopic modes, or to Figure 6 in an endoscopic mode, with corresponding objectives such as high numerical aperture macroscopic objectives, with lens-based objectives as well as purely reflective ones.

The present invention offers four main imaging modes all based on a purely geometric imaging resulting from an unfiltered non-linear optical response of the sample (spectroscopic integral), preferably associated with:

- i) at least one spectral dimension (λ and/or τ) or a signature elaborated from the spectroscopic plane (λ, τ),
- ii) a localisation of a specific spectroscopic signature by scanning with or without constructing a spectral image,
- iii) non-linear optical response of at least one specific extrinsic chromophore. This last mode is of particular importance in the context of the precise localisation of specific chromophores which requires a so-called counter stain in the methods of the art. With the present method, since major elements

WO 02/40974

23

PCT/EP01/14403

(or components) of cells or tissues such as cell boundaries, nuclei, or tissular organisation can be visualized with an intrinsic signal, no counter stain is required. The tissular and cellular anatomy is directly visible, while imaging and spectroscopic analysis of extrinsic chromophores can be carried out simultaneously.

This possibility of visualizing extrinsic chromophores together with the anatomic context revealed by the intrinsic response can be applied to several types of applications. Firstly, extrinsic signals can arise from pathology-related living objects such as bacteria, viruses or parasites, or from inert particles such as asbestos. Secondly, the tissue reactions toward or the tissue alterations related to the presence of these various infectious agents or inert objects can also be assessed by the present invention. Thirdly, signals can also arise from the presence of exogeneous substance related to drug abuse, or of interest for forensic investigations.

The invention also concerns medical diagnosis of targets *in situ* for intrinsic non-linear imaging without requiring any physical biopsy. The invention relates therefore to the detection of disorders in the skin tissue, including but not limited to melanoma or nevi that can be inspected and spectroscopically analyzed with micron resolution, thus revealing cell morphology, tissular lesions, and micro-vascularisation. It also concerns diagnosis of the oral cavity, with a remote sensing head such as 217 (of Figure 5), to detect early evidence of tumor and cancer, namely using non-linear protoporphyrin optical response. This technique can supplement or even replace classical tissue biopsy and pathological evaluation, and can also supplement or even replace existing spectroscopy techniques which require several (up to 11) different wavelengths.

Colposcopy and uterine cervix investigation are also other applications of the present invention using a device with remote sensing head such as 216 (Figure 4). Indeed, dysplasia and pre-invasive and invasive cancer can be detected using at least intrinsic fluorescence of the cervix epithelium, chorion, and deeper layers. In the case of uterine cervix epithelium, in particular due to its glycogen content, Raman signal signatures may also be detected under picosecond excitation. The strong intrinsic response of the colonic epithelium

WO 02/40974

24

PCT/EP01/14403

yields images showing the tissue geometry at the single cell level. The present invention also applies to direct *in situ* macroscopic or microscopic imaging of surgically exposed tissues, such as the GI tract, muscles, and central nervous system, to provide the physician with very important information relating to the

5 tissular and cellular structure and metabolism to monitor the surgical procedure.

Cells or tissue specimen can also be visualized and analyzed by non-linear intrinsic spectral imaging according to the present invention, with at least one spatial dimension and one spectral dimension for immediate diagnosis (or detection), in addition to a histopathological or cytopathological analysis.

10 Besides diagnosis purposes, non-linear spectral imaging according to the present invention can also be used in parallel with a laser-based procedure such as photodynamic local treatment (PDT) or photoablation. Indeed, while detecting tissular architectures and their abnormalities, intrinsic laser scanning imaging can be applied to guide another laser action following the same optical path. Laser

15 beams used for photoablation or photodynamic treatment can thus be accurately targeted with single cellular pointing accuracy. Alternatively, the imaging beam (laser excitation) itself can be used for non-linear photo induced destructive activity at a local scale. In addition, non-linear spectral imaging can also be used to monitor the effect of these two types of action, by revealing the intimate tissue

20 structure at cellular or subcellular scales. Finally, the same diagnosis (or detection) methods described above can be easily translated into follow-up methods for long term monitoring treatment effects and recovery.

The invention also applies to investigations aimed at drug localization and metabolization, to answer pharmacological and pharmacodynamic issues.

25 With the present invention, drugs of interest, provided they can be made visible by non-linear excitation, will be localized in space and time *in vivo*, in the anatomical context of the tissues, with microscopic resolution. This should be very useful for the *in vivo* evaluation of drug design and delivery problems, or in gene therapy (visualization of genetically engineered elements, localization of

30 gene products, cell proliferation and tissue modification).

WO 02/40974

25

PCT/EP01/14403

Medical applications of the present invention to animal investigations also provide a set of straightforwardly derived methods for the investigation of animal diseases and animal models of human diseases.

The invention is not limited to the embodiments of the installation and the
s implementation of the method as described above purely by way of example, but it covers any variant that could be envisaged by the person skilled in the art within the ambit of the following claims.

In particular, the invention has been described with reference to the
installation illustrated in Figure 1, which is a very full one. But, the installation
-o may be much more simple provided it comprises at least one collecting means for collecting response photons in at least one collecting zone, whatever the photon energy. In other words, the installation may be provided with one, two, three, four, five or six different collecting means located in different collecting zones, or even more if required.

CLAIMS

1. An installation for multi-dimensional laser scanning of a material
comprising intrinsic chromophores responsive to excitation by photons of at least
one chosen energy to produce response photons, said installation comprising :
* at least one source (115) for producing time stamp pulses of synchronized
photons,
* means (12-14) for locally focusing said pulses on a material to cause said
intrinsic chromophores of said material to absorb groups of at least two
synchronized photons to produce response photons,
* means (22,40,53) for directing said response photons to at least one collecting
zone,
* means (30-34) for collecting said response photons in said at least one
collecting zone, whatever their energy,
* processing means for converting said collected photons into data at least
representative of their number, and storing said data in correspondence with at
least the time stamp pulses that cause said material to produce said response
photons,
* means (11) for scanning said pulses through a chosen area of said material,
* means for delivering from said data stored an image representative of said
chosen area of said material, with a sub-millimeter resolution, and as a function
of their respective time stamp pulses.
2. Installation according to claim 1, wherein said collecting means
comprises detector means (41), for discriminating said response photons as a
function of their respective arrival time, and said processing means is configured
for storing said data in correspondence with at least a time stamp pulses and an
arrival time.
3. Installation according to claim 1 or 2, wherein said collecting means
comprises detector means for discriminating said response photons as a function
of their respective energy, and said processing means is configured for storing
said data in correspondence with at least a time stamp pulses and an energy.

WO 02/40974

27

PCT/EP01/14403

4. Installation according to any of claims 1 to 3, wherein said collecting means is able to collect response photons emitted by said material according to radiative channels chosen in a group comprising at least fluorescence, luminescence, non linear Raman and non linear Rayleigh.

5. Installation according to claims 1 to 4, wherein said collecting means is able to collect response photons with wavelengths comprised between approximately 250 nm and 1 μ m.

6. Installation according to claims 1 to 5, wherein said collecting means comprises a detection means configured as a point detector.

7. Installation according to claims 1 to 6, wherein said collecting means comprises a detection means configured as a set of discrete point detectors in parallel.

8. Installation according to claims 1 to 7, wherein said collecting means comprises a detection means configured as a bi-dimensional imaging detector (45).

9. Installation according to claims 6 to 8, wherein said collecting means further comprises, upstream said detection means (50), a lens (52) for focusing said response photons on said detection means, followed by a shutter and filter assembly (51) and by a coupling mechanism (44) for adjusting the position of said detection means (50) relative to said lens (52).

10. Installation according to claims 1 to 9, wherein said collecting means comprises a detection means configured as a streak camera (41).

11. Installation according to claim 10, wherein said collecting means further comprises, upstream said detection means (41), a shutter and filter assembly (42) followed by an element (43) for chromatic dispersion and focalisation onto a photocathode window of said detection means (41), and by a coupling mechanism (44) for adjusting the position of said detection means (41) relative to said element (43).

12. Installation according to claims 1 to 11, wherein said scanning means comprises, between said source and said material, a set of two coupled galvanometric mirrors (11X,11Y) for point scanning said material in two perpendicular directions (X,Y).

13. Installation according to claim 12, wherein said scanning means further comprises, downstream said set of coupled galvanometric mirrors

WO 02/40974

28

PCT/EP01/14403

(11X,11Y), a set of two converging lenses (12) and (13) adapted for conjugating a plane of said set (11X,11Y) with a back aperture of a lens (14) adapted for focusing said pulses at a chosen focus (15) within said material (19).

14. Installation according to claims 1 to 13, wherein said pulse source (115) comprises an oscillator (100) pumped by a continuous laser beam (101) produced by a laser (102) for producing first ultrashort pulses (103) of a first wavelength.

15. Installation according to claim 14, wherein said pulse source (115) further comprises an optical parametric oscillator (106) for producing second ultrashort pulses (111) with temporal characteristics similar to those of said first ultrashort pulses (110), a slightly reduced pulse energy compared to the one of said first ultrashort pulses (110), and a second wavelength different from said first wavelength.

16. Installation according to claim 15, wherein said pulse source (115) further comprises a regenerative amplifier laser cavity (107) comprising a first input for receiving a part (204) of said first ultrashort pulses (103) and a second input to be pumped by a laser (102), and an output for delivering pulses (108) of a third wavelength.

17. Installation according to claim 16, wherein said pulse source (115) further comprises an optical parametric amplifier (109) for delivering, from said third ultrashort pulses (108), pulses (112) of a fourth wavelength with temporal characteristics similar to those of said second ultrashort pulses (111).

18. Installation according to claim 17, wherein said pulse source (115) further comprises a beam selector means (113) comprising four inputs for receiving said first (110), second (111), third (108) and fourth (112) ultrashort pulses, and one output for selectively delivering at least one of these first, second, third and fourth ultrashort pulses.

19. Installation according to claims 1 to 18, wherein it comprises, downstream said pulse source (115), a source power control means (6).

20. Installation according to claim 19, wherein said source power control means (6) comprises at least one electro-optical modulator.

21. Installation according to claims 1 to 20, wherein it comprises, downstream said pulse source (115), a means (3-5) for precompensation of the temporal dispersion of said pulses.

WO 02/40974

29

PCT/EP01/14403

22. Installation according to claim 21, wherein said precompensation means (3-5) comprises an input coupling mirror (4) adapted to transmit said pulses to a set of two antiparallel prisms or gratings (5) and to transmit said precompensated pulses to an output coupling mirror (3).

23. Installation according to claims 1 to 22, wherein it comprises, downstream said pulse source (115), a polarization control means (8) adapted for controlling the polarization of said pulses.

24. Installation according to claim 23, wherein said polarization control means (8) comprises a $\lambda/2$ or $\lambda/4$ plate.

25. Installation according to claims 1 to 24, wherein it comprises, downstream said pulse source (115), a pulse shaping means (9).

26. Installation according to claim 25, wherein said pulse shaping means (9) comprises a divergent lens and a convergent lens, defining a two-element telescope.

27. Installation according to claims 1 to 26, wherein said focusing means (12-14) and directing means (22,40,53) are parts of a non invasive microscope or a macroscope.

28. Installation according to claim 27, wherein it comprises support means (60) for maintaining the material in a fixed position.

29. Installation according to claim 28, wherein it comprises positioning means (20) able to move said support means (60) relatively to said focusing means (12-14), in order said pulses be locally focused in said material chosen area.

30. Installation according to claim 29, wherein said positioning means (20) comprises an XYZ translation stage (20) moved by a motor and/or piezoactuators, said support means (60) is a material holder mounted on said translation stage.

31. Installation according to claim 28 or 29, wherein said support means (60) is a plate adapted to support at least a part of a human or animal patient.

32. Installation according to claims 28 to 31, wherein said support means (60) is adapted to a trans-illumination mode in which said pulses are directed on a first face of said material (19) and said response photons are collected at least downstream a second face of said material, opposite to said first face.

WO 02/40974

30

PCT/EP01/14403

33. Installation according to claims 1 to 26, wherein said focusing means and directing means are parts of an endoscope.

34. Installation according to claim 33, wherein said directing means, said collecting means and said focusing means are enclosed in a movable head assembly (216;217;218).

35. A method for multi-dimensional laser scanning of a material comprising intrinsic chromophores responsive to excitation by photons of at least one chosen energy to produce response photons, said method comprising :

* producing time stamp pulses of synchronized photons,

* locally focusing said pulses on a material to cause said intrinsic chromophores of said material to absorb groups of at least two synchronized photons to produce response photons,

* directing said response photons to at least one collecting zone,

* collecting said response photons in said at least one collecting zone, whatever the energy,

* converting said collected photons into data at least representative of their number, and storing said data in correspondence with at least the time stamp pulses that cause said material to produce said response photons,

* scanning said pulses through a chosen area of said material, and

* delivering from said data stored an image representative of said chosen area of said material, with a sub-millimeter resolution, and as function of their respective time stamp pulses.

36. Method according to claim 35, wherein said collected photons are converted into data representative of their respective arrival time, and stored in correspondence with at least a time stamp pulses and an arrival time.

37. Method according to claim 35 or 36, wherein said collected photons are converted into data representative of their respective energy, and stored in correspondence with at least a time stamp pulses and an energy.

38. Use of the installation and method according to any preceding claims, for endoscopy, microscopy or macroscopy.

39. Use according to claim 38, for providing information about a tissular or cellular structure and metabolism to monitor a surgical procedure.

40. Use according to claim 39, for guiding the position of a laser in a laser-based procedure.

WO 02/40974

31

PCT/EP01/14403

41. Use according to claim 40, for guiding the excitation laser source in a laser ablation.

42. Use according to claims 38 to 41, for providing information for following long term monitoring treatment effects and recovery.

43. Use according to claims 38 to 42, for imaging *in situ* or *ex situ* biological material of human, animals, plants or prokaryotes, bio-synthetic tissues or chimeric tissues, artificial organs, genetically engineered elements, implanted xenogenic or autologous living or fixed tissue structures.

44. Use according to claim 43, for the optical detection of cancer, metabolic or infectious diseases, foreign microorganisms, foreign particles or pathologies.

45. Use according to claim 43 or 44, for imaging *in situ* or *ex situ* biological material of human skin or human mucosa.

46. Use according to claim 45, for colposcopy, dermatology or oral cavities investigations.

47. Use according to claims 43 to 46, for ophtalmoscopy.

48. Use according to claim 43 to 47, for forensic detection or drug abuse detection.

49. Use according to claims 43 to 48, for localization of drugs in pharmacology or pharmacodynamics.

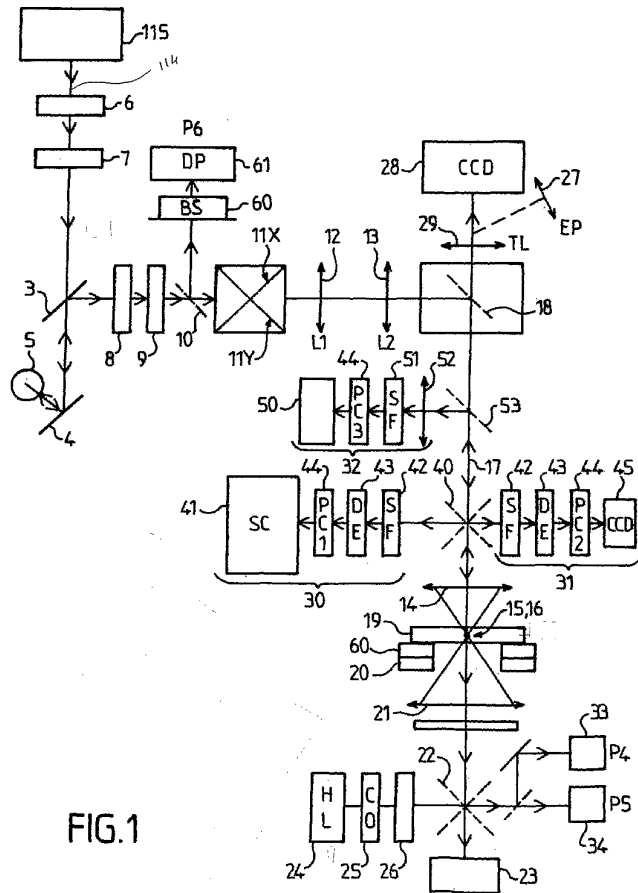
50. Use according to claims 43 to 49, for localization of gene product, cell proliferation and tissue modification in gene therapy.

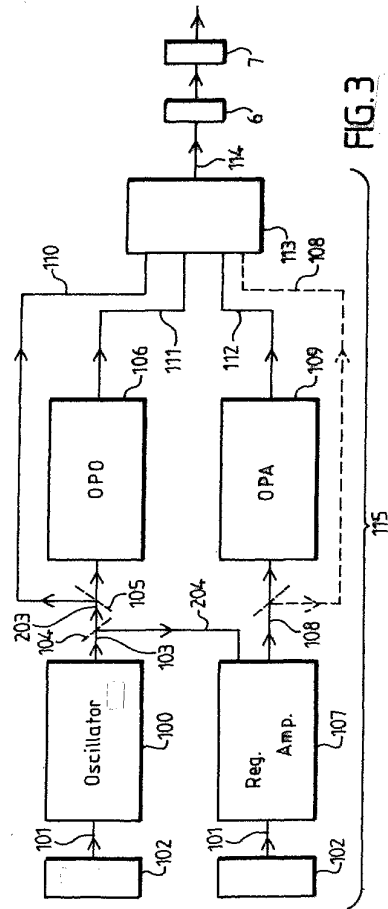
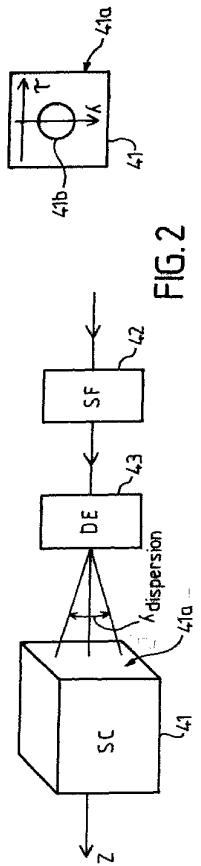
51. Use according to claims 43 to 50, for investigation of animal diseases and animal models of human diseases.

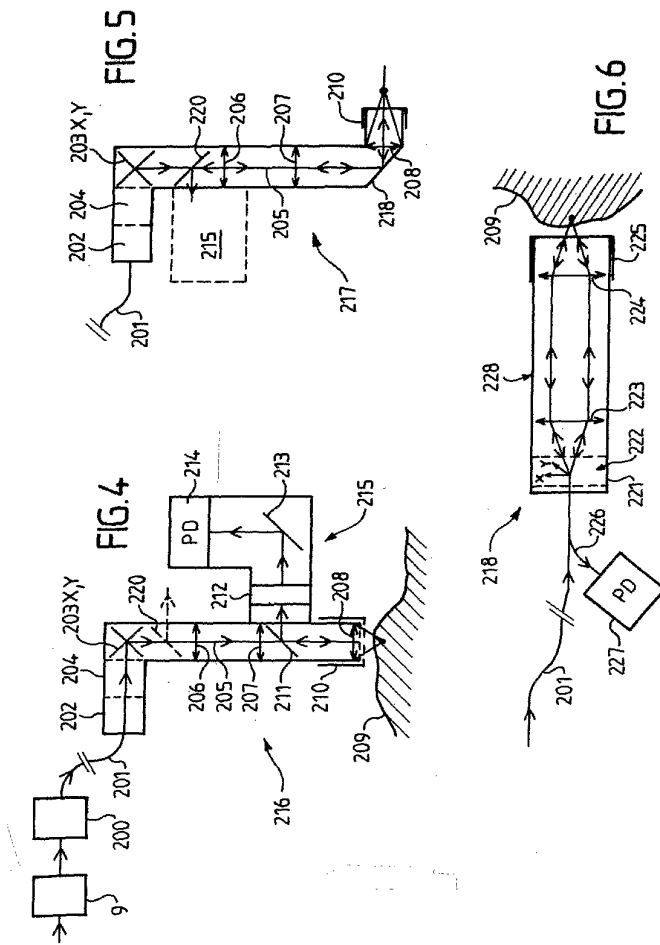
WO 02/40974

1/3

PCT/EP01/14403







【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
23 May 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/040974 A3(51) International Patent Classification: G01N 21/64,
G02B 21/00LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue
Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(21) International Application Number: PCT/EP01/14403

(72) Inventors: and

(22) International Filing Date:
20 November 2001 (20.11.2001)(75) Inventors/Applicants (for US only): AMBLARD,
François [FR/FR]; 3, rue Laplace, F-75005 Paris (FR).
SASTRE-GARAU, Xavier [FR/FR]; 54, avenue de Paris,
F-94300 Vincennes (FR). ROBINÉ, Sylvie [FR/FR]; 3,
rue Raymond Marcheron, F-92170 Vanves (FR).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

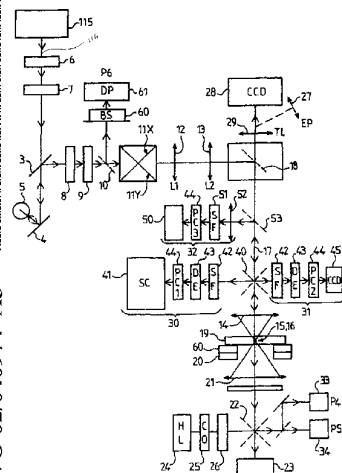
(74) Agents: ERNEST GUTMANN-VYVES PLASSERAUD
S.A. et al.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

(30) Priority Data: 00403238.9 20 November 2000 (20.11.2000) EP

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AU, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, 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, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,

[Continued on next page]

(54) Title: MULTI-PHOTON IMAGING INSTALLATION



(57) Abstract: An installation is provided for multi-dimensional non-linear imaging of a material comprising intrinsic chromophores, using laser scanning. This installation comprises i) at least one source (115) of time stamp pulses of synchronized photons, ii) means (12-14) for locally focusing the pulses on a material to cause its intrinsic chromophores to absorb groups of at least two synchronized photons to produce response photons, iii) means (22, 40, 53) for directing the response photons to at least one collecting zone, iv) means (30-34) for collecting the response photons in the collecting zone(s) whatever their energy, v) processing means for converting the collected photons into data at least representative of their number and storing them in correspondence with at least the time stamp pulses that cause the material to produce the response photons, vi) means for scanning (11, 20) the pulses through a chosen area of the material, and vii) means for delivering from said data stored an image representative of said material chosen area, with a sub-millimeter resolution, and in function of the respective time stamp pulses of data.

WO 02/040974 A3

WO 02/040974 A3



SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

Published:

— with international search report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
19 September 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/14403
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N21/64 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) WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 11355 A (CORNELL RES FOUNDATION INC ;WEBB WATT W (US); XU CHRIS (US)) 27 March 1997 (1997-03-27) page 2, line 28 -page 7, line 25 page 8, line 8 -page 12, line 4 page 17, line 2 - line 10 claims; figure 1	1, 4, 5, 8, 27, 28, 35, 38, 43
A		14-17, 40
A	WO 90 06718 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 28 June 1990 (1990-06-28) page 2, line 4 -page 5, line 34 figure 3A	1, 4, 33, 35, 38-51
<input 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 ** 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 *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 June 2002		Date of mailing of the international search report 10/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Krametz, E

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/14403

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9711355	A	27-03-1997	AU 700560 B2	07-01-1999
			AU 6972496 A	09-04-1997
			CA 2231222 A1	27-03-1997
			DE 852716 T1	19-07-2001
			EP 0852716 A1	15-07-1998
			JP 10512959 T	08-12-1998
			NO 981032 A	04-05-1998
			NZ 318277 A	25-02-1999
			US 6166385 A	26-12-2000
			WO 9711355 A	27-03-1997
			US 6344653 B1	05-02-2002
WO 9006718	A	28-06-1990	AT 133545 T	15-02-1996
			DE 68925586 D1	14-03-1996
			DE 68925586 T2	24-10-1996
			EP 0449883 A1	09-10-1991
			WO 9006718 A1	28-06-1990
			US 5562100 A	08-10-1996
			US 5419323 A	30-05-1995

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 2 B 21/00	A 6 1 B 3/12	Z
G 0 2 B 23/24	A 6 1 B 3/10	R
// A 6 1 N 5/06	A 6 1 N 5/06	E

(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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,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,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,P T,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100058479
弁理士 鈴江 武彦

(74)代理人 100091351
弁理士 河野 哲

(74)代理人 100088683
弁理士 中村 誠

(74)代理人 100108855
弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 アンブラール、フランソワ
フランス国、エフ - 7 5 0 0 5 パリ、リュ・ラブラス 3

(72)発明者 サストール - ガロー、グザビエ
フランス国、エフ - 9 4 3 0 0 バンセンヌ、アブニュ・ドゥ・パリ 5 4

(72)発明者 ロビーヌ、シルビー
フランス国、エフ - 9 2 1 7 0 パンベ、リュ・レイモン・マルシェロン 3

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 EA03 FA01 FA02 FA03 FA05 FA06 GA01
GB01 HA01 HA02 HA05 HA07 HA09 HA11 JA02 KA01 KA02
KA03 KA08 KA09 LA03 NA01
2H040 BA05 BA23 CA02 CA04 CA08 FA02 FA08 FA12 GA02
2H052 AA07 AA09 AC07 AC12 AC13 AC15 AC16 AC29 AC34 AF02
AF06 AF11 AF14 BA15
4C061 AA01 AA08 AA16 CC06 FF50 HH51
4C082 RE58 RE60 RJ06 RL02 RL05 RL06 RL12

【要約の続き】

【選択図】図 1

专利名称(译)	多光子成像系统		
公开(公告)号	JP2004514133A	公开(公告)日	2004-05-13
申请号	JP2002542854	申请日	2001-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	居里研究所 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	居里研究所 - Santoru-Nashiyonaru德拉Rusherushe谢伊洋科技		
[标]发明人	アンブラールフランソワ サストールガローグザビエ ロビーヌシルビー		
发明人	アンブラール、フランソワ サストール-ガロー、グザビエ ロビーヌ、シルビー		
IPC分类号	A61B1/00 A61B3/10 A61B3/12 A61N5/06 G01N21/64 G01N21/65 G02B21/00 G02B23/24		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N21/6458 G02B21/0024 G02B21/0076 G02B21/0084		
FI分类号	G01N21/64.B A61B1/00.300.D G01N21/65 G02B21/00 G02B23/24.Z A61B3/12.Z A61B3/10.R A61N5/06.E		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/EA03 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/FA03 2G043/FA05 2G043/FA06 2G043/GA01 2G043/GB01 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/HA05 2G043/HA07 2G043/HA09 2G043/HA11 2G043/JA02 2G043/KA01 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA08 2G043/KA09 2G043/LA03 2G043/NA01 2H040/BA05 2H040/BA23 2H040/CA02 2H040/CA04 2H040/CA08 2H040/FA02 2H040/FA08 2H040/FA12 2H040/GA02 2H052/AA07 2H052/AA09 2H052/AC07 2H052/AC12 2H052/AC13 2H052/AC15 2H052/AC16 2H052/AC29 2H052/AC34 2H052/AF02 2H052/AF06 2H052/AF11 2H052/AF14 2H052/BA15 4C061/AA01 4C061/AA08 4C061/AA16 4C061/CC06 4C061/FF50 4C061/HH51 4C082/RE58 4C082/RE60 4C082/RJ06 4C082/RL02 4C082/RL05 4C082/RL06 4C082/RL12		
代理人(译)	河野 哲 中村诚		
优先权	2000403238 2000-11-20 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用激光扫描对包含固有发色团的材料进行多维非线性成像的设备。该装置用于在固有发色团中产生 (i) 一个或多个同步光子时间戳脉冲源115和 (ii) 一组两个或多个同步光子以产生响应光子。这意味着将脉冲局部聚焦在材料上的装置12-14, (iii) 将响应光子引导到一个或多个收集区的装置22、40、53, 以及 (iv) 响应光子的能量。如果有的话, 则是用于在收集区中收集那些光子的装置30-34, 以及 (v) 将收集到的光子转换成至少表示其数量的数据, 转换成时间戳脉冲, 该时间戳脉冲使材料产生响应光子。至少一个相应的用于存储数据的处理装置, (vi) 用于扫描脉冲穿过材料的选定区域的装置11、20, 以及 (vii) 从存储的数据中选择材料。亚毫米分辨率所覆盖的区域 和用于创建图像的装置表示为时间标记脉冲的功能。 [选型图]图1

