

(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2008-517291

(P2008-517291A)

(43) 公表日 平成20年5月22日(2008.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 21/64 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/64 E	2 G O 4 3
<b>A 6 1 B 1/00 (2006.01)</b>	A 6 1 B 1/00 3 O O D	2 H O 5 2
<b>GO 2 B 21/00 (2006.01)</b>	GO 2 B 21/00	4 C O 6 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2007-537342 (P2007-537342)  
 (86) (22) 出願日 平成17年10月21日 (2005.10.21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月11日 (2007.6.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2005/002630  
 (87) 国際公開番号 W02006/045936  
 (87) 国際公開日 平成18年5月4日 (2006.5.4)  
 (31) 優先権主張番号 0411313  
 (32) 優先日 平成16年10月22日 (2004.10.22)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 504243970  
 マウナ ケア テクノロジーズ  
 フランス国、F-75010 パリ、リュ  
 ・ドンギャン、9  
 (71) 出願人 503427533  
 ソントル・ナショナル・ド・ラ・ルシエル  
 シュ・シアンティフィク  
 フランス国、F-75794 パリ、リュ  
 ・ミシェル・アンジュ、3  
 (71) 出願人 507132662  
 ユニヴェルシテ・ド・リモージュ  
 フランス国、F-87032 リモージュ  
 セデックス 1、リュ・フランソワ・ミ  
 ッテラン、33、オテル・ド・リュニヴェ  
 ルシテ

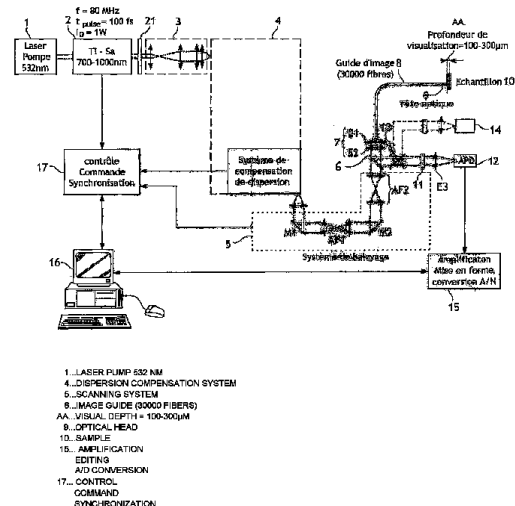
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体のファイバ式マルチフォトン式顕微鏡イメージング装置および方法

## (57) 【要約】

本発明は、内視鏡検査又は蛍光顕微鏡検査に使用するための、検体(10)のファイバ式マルチフォトン式イメージング装置に関する。この装置は：マルチフォトン励起レーザ輻射を生成するべくフェムト秒でパルスされるパルスレーザ(1、2)と、複数の光ファイバで構成され表面下の平面内での点から点への走査により検体を照射することの可能なイメージガイド(8)と、イメージガイド(8)内での励起パルスの分散効果を補償するための予備補償手段(4)と(前記手段はパルスレーザとイメージガイド(8)との間に配置されている)、励起レーザビームをイメージガイドのファイバ内へ交わる交わる差し向けるための走査手段と、特に、イメージガイドから出る励起レーザビームを検体(10)内へ集束させるための光学ヘッド(9)とを備えている。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

検体のファイバ式マルチフォトン式イメージング装置であって、この装置はマルチフォトン励起レーザビームを生成するパルスレーザを備え、この装置は更に：

- 複数の光ファイバで構成され、点から点への走査により検体を照射することの可能なイメージガイドと、
  - 前記パルスレーザとイメージガイドとの間に配置され、イメージガイド内の励起パルスの分散効果を補償するための補償手段と、
  - 励起レーザビームをイメージガイドのファイバ内へ交わる交わる差し向けるための走査手段、
- とを備えていることを特徴とする装置。

10

**【請求項 2】**

請求項 1 に基づく装置であって、前記補償手段は少なくとも 2 つのプリズムを有する分散ラインを備えていることを特徴とする装置。

**【請求項 3】**

請求項 1 に基づく装置であって、前記補償手段は少なくとも 2 つの回折格子を有する分散ラインを備えていることを特徴とする装置。

**【請求項 4】**

請求項 1 に基づく装置であって、前記補償手段は他のイメージガイド（即ち、第 2 のイメージガイド）を備え、この第 2 のイメージガイドは少なくとも 2 つのプリズムを有する分散ラインに連携してあって、この第 2 のイメージガイドと主イメージガイドとによって導入された位相ずれが前記分散ラインによって導入された位相ずれによって補償されることを特徴とする装置。

20

**【請求項 5】**

請求項 1 に基づく装置であって、前記補償手段は他のイメージガイド（即ち、第 2 のイメージガイド）を備え、この第 2 のイメージガイドは少なくとも 2 つの回折格子を有する分散ラインに連携してあって、この第 2 のイメージガイドと主イメージガイドとによって導入された位相ずれが前記分散ラインによって導入された位相ずれによって補償されることを特徴とする装置。

**【請求項 6】**

請求項 1 に基づく装置であって、前記補償手段は少なくとも 2 つのプリズムを有する分散ラインに連携された単一の光ファイバを備え、この単一の光ファイバと前記イメージガイドとによって導入された位相ずれが前記分散ラインによって導入された位相ずれによって補償されることを特徴とする装置。

30

**【請求項 7】**

請求項 1 に基づく装置であって、前記補償手段は少なくとも 2 つの回折格子を有する分散ラインに連携された単一の光ファイバを備え、この単一の光ファイバと前記イメージガイドとによって導入された位相ずれが前記分散ラインによって導入された位相ずれによって補償されることを特徴とする装置。

**【請求項 8】**

請求項 2 から 7 のいずれかに基づく装置であって、前記分散ラインはミラーによって終っており、このミラーの上手に位相・振幅マスクが配置されていることを特徴とする装置。

40

**【請求項 9】**

請求項 1 に基づく装置であって、前記補償手段は異常分散型の光ファイバを備えていることを特徴とする装置。

**【請求項 10】**

前記請求項のいずれかに基づく装置であって、前記補償手段は前記走査手段内に組み込まれていることを特徴とする装置。

**【請求項 11】**

前記請求項のいずれかに基づく装置であって、前記パルスレーザおよび補償手段は波長に

50

において調節可能であることを特徴とする装置。

【請求項 1 2】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、イメージガイドの近位端側に配置され、励起レーザビームをイメージガイドの所与の光ファイバ内に交わる交わる集束させることの可能な注入手段を更に備えていることを特徴とする装置。

【請求項 1 3】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、検体から来る蛍光信号を検出するための第 1 の検出手段を更に備えていることを特徴とする装置。

【請求項 1 4】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、検体から来る第 2 高調波生成信号を検出するための第 2 の検出手段を更に備えていることを特徴とする装置。

10

【請求項 1 5】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、検体から来る信号を検出手段の方へ差し向けることの可能な二色フィルターを更に備えていることを特徴とする装置。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に基づく装置であって、前記二色フィルターは走査手段とイメージガイドとの間に配置されていることを特徴とする装置。

【請求項 1 7】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、検体から来る第 2 高調波生成信号から蛍光信号を分離することの可能な調節可能な二色フィルターを更に備えていることを特徴とする装置。

20

【請求項 1 8】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、前記走査手段はリアルタイムで使用するに十分な毎秒画像数の収集に対応する速度で検体を走査し、検出手段はファイバを 1 本ずつサンプリングする最小限サンプリング周波数に対応する検出周波数で蛍光信号を検出することを特徴とする装置。

【請求項 1 9】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、前記走査手段は表面下の平面内のライン上で検体を走査することを特徴とする装置。

【請求項 2 0】

30

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、前記走査手段は緩慢な収集に適した周波数を有する検流式ミラーを備え、この装置は緩慢な収集速度に適したパスバンドを有するフォトセンサーを更に備えていることを特徴とする装置。

【請求項 2 1】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、前記パルスレーザはフェムト秒レーザであることを特徴とする装置。

【請求項 2 2】

請求項 1 から 2 0 のいづれかに基づく装置であって、前記パルスレーザはピコ秒レーザであることを特徴とする装置。

【請求項 2 3】

40

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、前記イメージガイドは複数の整頓されたモノモード光ファイバで構成されていることを特徴とする装置。

【請求項 2 4】

請求項 1 から 2 2 のいづれかに基づく装置であって、前記イメージガイドは複数のマルチモード光ファイバで構成されていることを特徴とする装置。

【請求項 2 5】

前記請求項のいづれかに基づく装置であって、イメージガイドから出た励起レーザビームを検体内に集束させるための光学ヘッドを備えていることを特徴とする装置。

【請求項 2 6】

請求項 1 から 2 4 のいづれかに基づく装置であって、前記イメージガイドは数千の光ファ

50

イバで構成されており、これらの光ファイバの遠位端は裸で検体の表面に直接接触して配置されるようになっていることを特徴とする装置。

【請求項 27】

前記請求項のいずれかに基づく装置であって、検体内に存在しかつ励起レーザビームによって励起された複数の蛍光体から発射された複数の蛍光信号を夫々解離しかつ検出するためのフィルター手段および検出手段を備えていることを特徴とする装置。

【請求項 28】

請求項 27 に基づく装置であって、蛍光体の蛍光信号に応じて着色された領域を有する最終画像を作り上げるための処理手段を備えていることを特徴とする装置。

【請求項 29】

請求項 27 又は 28 に基づく装置であって、フィルター手段は異なる蛍光信号を 1 つの共通のセンサーの方へ逐次通過させるパスバンド調節可能なフィルターを備えていることを特徴とする装置。

【請求項 30】

請求項 27 又は 28 に基づく装置であって、フィルター手段は、また、波長に応じて夫々の蛍光信号を異なるセンサーの方へ送ることの可能なセパレータを有することができることを特徴とする装置。

【請求項 31】

前記請求項のいずれかに基づく装置であって、検体から来る信号の一部を用いてスペクトルを作り上げることの可能な分光器を更に備えていることを特徴とする装置。

【請求項 32】

請求項 31 に基づく装置であって、前記分光器は、励起信号が興味のある領域を走査する瞬間に対応する所定の瞬間に検体から来る信号の一部を分光器の方へ指向させるシャッターに連携されていることを特徴とする装置。

【請求項 33】

検体のファイバ式マルチフォトン式イメージング方法であって、この方法においてはマルチフォトン励起レーザビームが生成され、この方法は更に以下のステップを包含することを特徴とする：

- 分散効果を補償することの可能な補償手段を通して励起レーザビームを通過させ、
- 複数の光ファイバからなるイメージガイドのファイバ内に励起レーザビームを交わる交わる差し向けることにより検体を走査し、
- イメージガイドから来る励起レーザビームを用いて点から点へと走査することにより検体を照射し、
- 検体から発射された蛍光信号を検出すること。

【請求項 34】

請求項 33 に基づく方法であって、更に、検体から発射された第 2 高調波生成信号を検出することを特徴とする方法。

【請求項 35】

請求項 34 に基づく方法であって、形態学的研究を行うために第 2 高調波生成信号を使用することを特徴とする方法。

【請求項 36】

請求項 33 から 35 のいずれかに基づく方法であって、リアルタイムで使用するに十分な毎秒画像数の収集に対応する速度で検体を走査し、かつ、ファイバを 1 本ずつサンプリングする最小限サンプリング周波数に対応する検出周波数で蛍光信号を検出することを特徴とする方法。

【請求項 37】

請求項 33 から 36 のいずれかに基づく方法であって、イメージガイドから出る蛍光信号全体を検出することを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、内視鏡検査又は蛍光顕微鏡検査に使用するための、検体のファイバ式マルチフォトン式顕微鏡画像を形成するための装置および方法に関する。目的とする応用分野は、より詳しくは、生体内式 (in-vivo) かつその場式 (in-situ) イメージングの分野である。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来の共焦点式蛍光イメージングにおいては、1つの光子は1つの分子を励起する。この分子の励起解除は1つの蛍光光子の輻射を惹起する。励起光子のエネルギーは分子を所与の励起状態に持ち来すに必要なエネルギー量に正確に対応する。使用する光源は可視領域 (約400nm~650nm) における励起光子を発射するレーザである。マルチフォトン (多光子) 式顕微鏡検査においては、換言すれば蛍光の非線形顕微鏡検査においては、より詳しくは二光子式顕微鏡検査においては、遷移に必要なエネルギー量は、1つの励起光子によってではなく、2つ (或いは、マルチフォトン・イメージングにおいてはそれ以上) の光子によってもたらされるのであり、夫々の光子は従来の励起光子のエネルギーよりも二倍 (或いはそれ以上) 小さなエネルギーを有する。即ち、従来の場合における励起光子よりもエネルギーの小さな近赤外領域 (700nm~1000nm) の励起光子が使用される。しかしながら、分子によって発射される蛍光光子は従来の場合に発射されるものと同一である。

10

20

## 【0003】

二光子 (又は多光子) 式顕微鏡検査においては、2つ (又は、それ以上) の光子が関与するメカニズムは励起光源の瞬間強度の二乗 (又は、それ以上) に比例する効率を有する。大きな励起効率は強い空間的かつ時間的制約によってしか達成することができない。空間的制約は、励起ビームが組織内に正確に集束すること、即ち、照射焦点容積内における光子の空間的密度が大きいことを意味する。検出されたすべての蛍光は深いところで励起された単位的容積からしか来ないので、従って、二光子式顕微鏡検査はその自然の共焦点性という主要な利点を有する。発射された蛍光は検体の表面と励起された単位的容積との間に含まれる容積の積分ではない; これは、特に、表面と集束面との間に位置する蛍光体の光漂白の問題をすべて制限するのを可能にする。時間的制約は、超短かつ非常に強力なパルスを生成するレーザ源、即ち、照射焦点容積内における光子の時間的密度が大きいことを意味する。

30

## 【0004】

更に、近赤外は光子-物質相互作用を生じることが少ないので、照射規格の点で二光子式顕微鏡検査は評価することができると共に、超短パルスでパルスされる励起は光毒性に伴う問題をかなり低減する。

## 【0005】

蛍光のファイバ式線形顕微鏡検査の難点は、検体中への励起ビームの貫入距離が小さく、百マイクロメートル以下であるということである。貫入距離を向上させる目的でビームのパワーを増加させれば、特に一般に操作がほぼ連続的に行われることから、確実に生理的な損傷を生じるであろう。従って、検体内のより深いところにある器官にはアクセスすることができない。二光子式顕微鏡検査は、理論的な貫入距離が400マイクロメートルより大きいので、これらの不都合を解消するのを可能にする。即ち、近赤外に位置する励起光子は個別的にはエネルギーがより小さく、基本的には水からなる組織によって吸収されることが少ないので、線形蛍光に使用するものに比較してより破壊的でない。

40

## 【0006】

今日使用されている二光子式顕微鏡検査装置は、例えば画像を形成するための走査装置および検出装置を担持した高い光学盤からなる直立顕微鏡のような卓上顕微鏡である。このような画像収集装置は特に生体内式その場式の内視鏡に適用することはできない。即ち、卓上顕微鏡は往々にして嵩張っており、照射および信号回収用に従来型の対物レンズを

50

使用しており、対物レンズの下に動物を保持する必要がある、長い積分時間を必要とする（これは大きな感度を意味する）。

【 0 0 0 7 】

二光子式顕微鏡検査装置を提案した文献GB 2,338,568 (Optiscan) 「二光子内視鏡又は顕微鏡検査方法および装置」が知られている。この装置はレーザから検体に向かってパルスを送るために唯一本の光ファイバを使用している。光ファイバ内におけるパルスの線形および非線形の分散現象を制限するため、特にプリズムによる補償手段が開示してある。

【 0 0 0 8 】

文献US 6,369,928 (Optical Biopsy Technologies) には顕微鏡画像を収集するための二光子式蛍光走査顕微鏡が記載されている。この顕微鏡は少なくとも2本の光ファイバを備えている：夫々の光ファイバは光源として使用されると共に、他方の光ファイバの照射によって得られた蛍光ビームの受信部としても使用される。特に、この装置の次の2つの特徴は小型化の制約となる：1) 走査はファイバの遠位端側から（即ち、ファイバと検体との間で）行われる；2) 2つの入射ビームは検体内への入射角（従って、ファイバ間の距り）を維持する。

10

【 発明の開示 】

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、特に内視鏡検査に応用するための、小型化された新規なマルチフォトン（多光子）式顕微鏡検査装置を提供することにある。本発明の他の目的は、検体の深所の画像を収集することの可能な新規なマルチフォトン式顕微鏡検査装置を提供することにある。

20

【 0 0 1 0 】

前記目的の少なくとも1つは、特に内視鏡検査又は蛍光顕微鏡検査に使用するための、検体のファイバ式マルチフォトン式イメージング装置によって達成されるもので、この装置はマルチフォトン励起レーザビームを生成するパルスレーザを備えている。本発明によれば、この装置は更に：

- 複数の光ファイバで構成され、特に表面下の平面内での点から点への走査により検体を照射することの可能なイメージガイドと、
- 前記パルスレーザとイメージガイドとの間に配置され、イメージガイド内の励起パルスの分散効果を補償するための補償手段と、
- 励起レーザビームをイメージガイドのファイバ内へ交わる交わる差し向けるための走査手段、

とを備えている。

30

【 0 0 1 1 】

好ましくは、大きな深度に到達するため、この装置は、イメージガイドから出た励起レーザビームを検体内に集束させるための光学ヘッドを備えている。

【 0 0 1 2 】

好ましくは、光学ヘッドおよびイメージガイドのサイズはそれらが容易に操作チャンネル内で摺動できるようなものである。

40

【 0 0 1 3 】

本発明の装置は、顕微鏡的解像度を有する、生体内式、その場式の、オフセットされた蛍光画像を形成するのを可能にする。イメージガイド或いは“ファイバ・バンドル（束）”は可撓性を呈すると共に、特に操作チャンネル内に挿入することにより内視鏡への用途を可能にするサイズを有する。

【 0 0 1 4 】

本発明の有利な特徴によれば、例えば次のような異なる補償手段を採用することができる：

- 少なくとも2つのプリズムを有する分散ライン；
- 少なくとも2つの回折格子を有する分散ライン；

50

- パルスの位相とスペクトル振幅を変調する手段を有する分散ライン；
- 他のイメージガイド、即ち、第2のイメージガイド（これは、この第2のイメージガイドと主イメージガイドとによって導入された位相ずれが分散ラインによって導入された位相ずれによって補償されるように、少なくとも2つのプリズム又は回折格子を有する分散ラインに連携されている）；
- イメージガイドの応答を最適化するのを可能にする単一の光ファイバ（この単一の光ファイバは、この単一の光ファイバとイメージガイドとによって導入された位相ずれが分散ラインによって導入された位相ずれによって補償されるように、少なくとも2つのプリズム又は回折格子を有する分散ラインに連携されている）；および、
- レーザ波長に対し異常分散型の光ファイバ。

これらの補償装置は、また、この装置の他のすべての部材（光学ヘッド、レンズ、ミラー、等々）によって導入された分散を補償するために使用することもできる。

#### 【0015】

本発明によれば、イメージガイドの近位端側に配置された、励起レーザビームをイメージガイドの所与の光ファイバ内に交わる交わる集束させることの可能な、注入手段が設けられる。また、検体から来る蛍光信号を検出するための第1の検出手段が設けられる。本発明の有利な特徴によれば、更に、検体から来る第2高調波生成信号（SGH。Second Harmonic Generation）を検出するための第2の検出手段が設けられる。二光子式蛍光特性と第2高調波生成特性との間の相補性は、特に分子秩序（対称、組織）およびそれらの近接環境との相関作用に関する局所的情報にアクセスするのを可能にする。

#### 【0016】

検体から来る信号がこれらの検出手段に到達するようにするため、この装置は、蛍光信号および第2高調信号をセンサーの方へしか通過させないようになった二色フィルターを更に有する。特に、この二色フィルターは走査手段とイメージガイドとの間に配置されている。従って、検体から来る信号は走査手段を再び通過することはない。同様に、各センサーの前に濾過用穴を配置する必要はない。この場合、マルチフォトン式顕微鏡検査は自然の共焦点性を有するという利点が享受される。

#### 【0017】

本発明の装置は、また、検体から来る第2高調波生成信号から蛍光信号を分離することの可能な調節可能な二色フィルターを有することができる。

#### 【0018】

一般的に、この装置は構成要素全体（特に励起手段と検出手段との間の同期）を管理する処理ユニットを有する。このユニットは画像処理を行うもので、この画像処理は例えば文献WO 2004/008952（マウナ ケア テクノロジーズ）に記載された画像処理に基づくことができる。例えば、多数の光子を長時間にわたり積分することにより高品質の画像を形成するべく検体の緩慢な走査を指令することができる。しかしながら、本発明の好ましい実施態様によれば、走査手段はリアルタイムで使用するに十分な毎秒画像数の収集に対応する速度で検体を走査する。相補的に、検出手段はファイバを1本ずつサンプリングする最小限サンプリング周波数に対応する検出周波数で蛍光信号を検出する。より正確には、ファイバ・サンプリングの尊重（シャノン基準による）は各ファイバに良く対応する点から点への画像を得るのを可能にする。これは、平均最小限毎秒画像数（即ち、実際には $896 \times 640$ ピクセルの最大限モードの場合に最小限毎秒12画像）を尊重しながらすべてのファイバを1本ずつサンプリングすることによって情報を失わないことを可能にする。この最小限サンプリングに応じて検出周波数（検出センサーのパスバンド）を選定すれば、可能な最大数の蛍光光子を各ファイバ毎に検出することが可能になる。従って、約30,000の可撓性光ファイバからなるイメージガイドを用いた可能な実施例によれば、検出装置（アパランシュ型フォトダイオード又は同等物）のサンプリング周波数とパスバンドはほぼ1.5 MHzに設定され（ファイバ当たり約12ピクセルに対応）、 $896 \times 640$ ピクセルの最大限モードで最小限12画像/秒を得るのを可能にする。実用的には、ビームの偏向は、共鳴式“ライン”ミラーの高速の走査周波数と検流式“フレーム”ミラーの遅い走査周波数を決

10

20

30

40

50

定することにより制御される。これは、リアルタイムの画像を得るのに適切な高速でファイバを走査するのを可能にする。

【0019】

検流式ミラーは、また、緩慢な収集に適合した走査周波数を有することができる；この場合、フォトセンサーは緩慢な収集速度に適合したパスバンドを呈する。

【0020】

本発明によれば、走査手段は、また、線形走査（ライン・スキャニング）を実現するべく、表面下の平面内においてライン上で検体を走査することができる。従って、観察中のある種の元素（element）の強度又は速度を測定することができる。

【0021】

パルスレーザはフェムト秒レーザ又はピコ秒レーザであり得る。レーザのタイプの選択は目標とする蛍光のタイプ（特に感度で換算）に依存する。例えば、ピコ秒レーザはより長いパルスを有し、従って高効率の蛍光体にとって先験的に有用なレーザである。実際には、例えば10ピコ秒～10フェムト秒のパルス幅を使用することができる。

【0022】

更に、本発明によれば、パルスレーザおよび補償手段は波長において調節可能である。そうすれば、700nm～1000nm（好ましくは800nm～870nm）の波長を有するレーザを使用することができ、これは既に多数の蛍光体を検出するのを可能にする。レーザの各波長毎に補償を調節する。

【0023】

本発明の他の観点によれば、本発明は、特に内視鏡検査又は蛍光顕微鏡検査に使用するための、検体のファイバ式マルチフォトン式イメージング方法を提供するもので、この方法においてはマルチフォトン励起レーザビームが生成される。本発明によれば：

- 分散効果を補償することの可能な補償手段を通して励起レーザビームを通過させ、
- 複数の光ファイバからなるイメージガイドのファイバ内に励起レーザビームを交わる交わる差し向けることにより検体を走査し、
- イメージガイドから来る励起レーザビームを用いて点から点へと走査することにより検体を照射し、かつ、
- 検体から発射された蛍光信号を検出する。

【0024】

好ましくは、検体から出た蛍光信号の全体が検出される。従って、脱走査（デスキャン）は行われないし、フォトセンサーによる検出の前に蛍光信号は濾過されない。

【0025】

光学ヘッドのない本発明の変化形においては、イメージガイドは数千の光ファイバで構成されており、これらの光ファイバの遠位端は裸で検体の表面に直接接触して配置されるようになっており、夫々のファイバは表面から光ファイバのコアの直径に特に依存する最大深度までの間に位置する検体のマイクロボリュームを励起することの可能な拡散ビームを生成するようになっている。例えば最初の拾マイクロメートルにわたっては、ビームはなお光ファイバのコアの直径とほぼ同一の直径を有する。プローブ“S”と呼ばれるイメージガイドについては、使用されている光ファイバの直径はマルチフォトン現象が現れるべく十分に小さく、例えば1マイクロメートルである。

【0026】

従って、この変化形は、各ファイバの出口で集束する信号を走査しないが、各ファイバの出口で拡散する信号を走査する点において、光学ヘッドを有する変化形とは異なる。ファイバの出口で信号が集束しないことは、組織の表面の直ぐ下に位置するボリュームの画像（これらは活用可能で特に医学的見地から興味がある）を得るのを可能にする。これらの画像は点から点へと走査された表面下の切断面に由来するものではないので“共焦的”ではないが、表面の直ぐ下に位置するマイクロボリュームを交わる交わる走査することに由来するので“高解像度”と呼ぶことができる画像である。

【0027】



このような変化形の利点の一は、内視鏡の用途においては、内視鏡プローブの直径はイメージガイドの直径（従って、その光ファイバの数）のみに依存して非常に小さいということにある。これは、集束用光学ヘッドの小型化に固有の問題を解消することにより、例えば神経学の分野のような、内視鏡プローブのサイズが決定的な要因であるような用途に用いるのを可能にする。

#### 【0028】

本発明の他の有利な特徴によれば、この装置は、検体内に存在しかつ励起レーザービームによって励起された複数の蛍光体から発射された複数の蛍光信号を夫々解離しかつ検出するためのフィルター手段および検出手段を備えている。即ち、理想的には、所与の或る蛍光体を励起するように定められた波長を有するパルスレーザービームが生成される。しかしながら、他の蛍光体がこの波長に対して敏感であることがあり、そしてやはり蛍光信号を発することがある。また、故意に複数の蛍光体を導入することができ、これらの蛍光体を同時に励起することの可能なレーザービーム波長を使用することができる。好ましくは、濾過によって解離できるように蛍光信号は互いに十分に隔てられた波長を有する。この装置は、蛍光体の蛍光信号に応じて着色された領域を有する最終画像を作り上げるための処理手段を有することができる。本発明は、従って、検出路によって多重マーキングを実施するようになっている。フィルター手段は異なる蛍光信号を1つの共通のセンサーの方へ逐次通過させるパスバンド調節可能なフィルターを有することができる。フィルター手段は、また、波長に応じて夫々の蛍光信号を異なるセンサーの方へ送ることの可能なセパレータを有することができる。

10

20

#### 【0029】

本発明の更に他の有利な特徴によれば、この装置は、検体から来る信号の一部を用いてスペクトルを作り上げることの可能な分光器を更に備えている。この分光器は、励起信号が興味のある領域を走査する瞬間に対応する所定の瞬間に検体から来る信号の一部を分光器の方へ指向させるシャッターに連携することができる。或いは、興味のある領域だけが照射されるようにパルスレーザーを操作することも可能である。生成されたスペクトルは次いで処理手段内で処理される。好ましくは、分光器の方へ偏向せられる信号の部分は有効信号の10%より少ない。

#### 【0030】

本発明の他の利点や特徴は非限定的な実施例の詳細な説明と添付図面から明らかとなるう。

30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0031】

図1には検体10が示してあり、この検体は生物組織又は細胞培養物であり得る。一般に、観察される蛍光は外因性の化合物（典型的には投薬されたマーカー）又は内因性の化合物に由来することができ、後者は生物組織の細胞によって製造されるか（トランスジェニック型のマーカー）、細胞内に自然に存在する（自動蛍光）。

#### 【0032】

二光子式の非線形吸収は、減少された容積内へ非常に大きなエネルギー密度を持ち来すことを必要とする。このため、100fsのパルス幅をもってフェムト秒レートでパルスされるパルスレーザー2を使用する。これは1~532nm固体レーザーによってポンピングされるチタン-サファイア-レーザーである。レーザー2の反復周期は約80MHzであり、平均出力は1ワットのオーダーである。レーザー2から出る励起ビームの波長は700~1000nm（近赤外）、好ましくは800~870nmに調節することができる。実際、この装置の性能は基本的に光源の特性に依存している：即ち、特にイメージガイドの出口における所望のピーク出力とパルス幅である。

40

#### 【0033】

レーザー2の出口には、ノイズ反射がレーザー2のキャビティの方へ戻るのを防止するためのファラデー・アイソレータ21が配置してある。場合によりアイソレータ21には、必要に応じ、励起レーザービームを波形成形しかつ注入するための装置3が続く。この装置3

50

は 1 とは異なる倍率の無焦点光学装置からなり、レーザビームの直径を調節することの可能なレンズで構成されている。倍率は、レーザビームの直径がこのレーザビームを補償手段 4 内へ差し向けるために設けた注入手段に適合するように計算される。この補償手段の位置と角度は励起ビームの波長に応じて調節される。

#### 【 0 0 3 4 】

一般的に、補償手段 4 はイメージガイド 8 の光ファイバ内における励起パルスの拡幅を予備補償する機能を有する。この時間的拡幅は光ファイバの線形有彩色分散および非線形効果（スペクトルの拡幅を惹起する自動位相変調）に因る。この装置はイメージガイド 8 の出口において数十ミリワットの平均出力で数百フェムト秒のパルス幅を得るのを可能にする。

10

#### 【 0 0 3 5 】

走査手段 5 は、次いで、斯く予備補償された励起パルスを回収する。図 1 に示した選ばれた実施例においては、この走査手段は、ビームを水平に偏向し、従って画像のラインを実現するための、4 kHz で共鳴するミラー M1 と、ビームを垂直に偏向し、従って画像のフレームを形成するための 15 Hz 型（一般には 10 ~ 40 Hz）の検流式ミラー M2 と；統一された倍率の 2 つの無焦点系（2 つのミラーの間に位置する AF1 と、ミラー M2 の後に位置する AF2）とを備え、これらの無焦点系は 2 つのミラー M1 および M2 の回転面を 1 本のファイバへの注入面に共役させるために使用される。本発明によれば、走査速度は組織の生体内式（in-vivo）その場式（in-situ）の観察を可能にするべく決定される。このためには、走査は、最も遅いモードに対応する 896 x 640 ピクセルの表示モードで少なくとも 12 画像 / 秒がスクリーンに表示されるように、充分速くなければならない。従って、より少ないピクセルを有する表示モードの場合には、毎秒当たりの収集画像数は常に 12 画像 / 秒より大きいであろう。変化形として、走査手段は特に回転ミラー、MEMs 型の集積デバイス（XY 走査ミラー）、又は音響光学システムを有することができる。

20

#### 【 0 0 3 6 】

ミラー M1 および M2 は、また、毎秒 10 画像以下（例えば、毎秒 1 ~ 3 画像）を使用するような走査周波数をもった 2 つの検流式ミラーであることができる。この場合、対応するフォトセンサのパスバンドは検流式ミラーによって課される収集速度に合わせる。積分時間はこの装置の感度を増加させるように長くすることができる。

30

#### 【 0 0 3 7 】

走査手段 5 の出口で偏向された励起ビームは、イメージガイド 8 のいずれか 1 本のファイバ内へ注入されるべく光学手段 7 の方へ差し向けられる。走査手段 5 と注入手段 7 との間に配置された二色フィルター 6 は励起ビームに対して透明にとどまる。注入手段 7 はここでは 2 つの光学アッセンブリ E1 および E2 で構成されている。第 1 の光学アッセンブリ E1 は走査手段 5 の視野の縁における光学収差を部分的に補正するのを可能にするもので、従って、注入は光学視野の全体について、即ち中央においても縁においても、最適化される。第 2 の光学アッセンブリ E2 はいわゆる注入を行うことを目的としている。その焦点距離と開口係数はガイド 8 の光ファイバへの注入率を最適化するように選ばれる。色消し性基準を得るのを可能にする実施例によれば、第 1 のアッセンブリ E1 は 1 つの二枚玉レンズからなり、第 2 のアッセンブリ E2 は 2 つの二枚玉レンズからなり、後者の後にはイメージガイドの近くに位置するレンズがある。変化形として、この注入用光学系は、例えば 2 つの三枚玉レンズのような他の任意のタイプの標準型光学系や、屈折率分布レンズ（回折性光学素子による色収差補正付き）や、或いは顕微鏡の対物レンズで構成することができる。

40

#### 【 0 0 3 8 】

イメージガイド 8 は非常に多数の可撓性光ファイバ（例えば、夫々がモノモード、直径 2  $\mu\text{m}$ 、開口係数 0.23、隣り合うファイバに対して 3.8  $\mu\text{m}$  離間された、ゲルマニウム・ドープド・シリカからなる、30,000 本のファイバ）で構成されている。イメージガイドの横断方向断面は 0.8 mm のオーダーである。実際には、イメージガイドのファイバの全てを使用するか、或いは、これらのファイバの選ばれたサブアッセンブリ（例えば中央のもの）を使用することができる。変化形として、イメージガイドは、ガイドの横断方向断面

50

が0.65mm程度の場合について、直径1.9 $\mu$ m、開口係数0.42、3.3 $\mu$ m離間された、マルチモードのファイバで構成することができる。

#### 【0039】

光ファイバの遠位端は光学ヘッド9に接続されており、この光学ヘッドは励起用レーザービームを検体10内において単位的容積に集束させる。この単位的容積ないし点は検体の表面（光学ヘッド9はこの表面に当接せられるようになっている）から数百 $\mu$ mのところにある所与の深さに位置している。この深度は例えば200 $\mu$ mである。従って、光学ヘッド9はイメージガイドから出た光束を検体内に集束させることを可能にするが、検体から戻って来る蛍光光束を収集することをも可能にする。光学ヘッド9は2.4の倍率と、検体に対する0.5の開口係数を有する。二光子式顕微鏡検査は当然に共焦点特性を有するので、フォトセンサーが捕集した蛍光信号を濾過する必要はない；即ち、この信号のうちの異なる光束はすべてフォトセンサーに送られ、これはこの装置の感度を向上させる。倍率と開口係数をこのような数値にすれば、軸方向解像度は15 $\mu$ m程度となり、横方向解像度は2 $\mu$ m程度となる。開口係数は、また、回収される光子の数（これは出来るだけ大きくしなければならない）を最適化するように選ばれる。光学ヘッドは、従来型の光学系（二枚玉レンズ、三枚玉レンズ、非球面レンズ）及び/又は屈折率分布レンズ（GRIN）で構成することができる。作動時には、光学ヘッドは特に検体10に接触して配置される。最適には、光学ヘッドは倍率4で開口係数1の屈折光学系からなる。この光学ヘッドは水浸漬型であり、色消しではない。

10

#### 【0040】

従って、蛍光信号はイメージガイド8、注入手段72を通過し、次いで二色フィルター6で反射され、後者はこの蛍光信号を着色された拒絶フィルター11と集束レンズE3を介して蛍光センサー12の方へ指向させる。

20

#### 【0041】

二色フィルターは励起波長に対して98~99%の透過効率を有し、従って他の波長を反射する。光学ヘッドとイメージガイドとを介して検体から来る蛍光信号はこうして検出路の方へ送られる。拒絶フィルター11は励起波長におけるノイズ反射の1~2%を完全に除去するのを可能にし、それらはやはり検出路の方へ通過する。

#### 【0042】

センサー12は検査中の蛍光の波長に対して最大の感度を呈する。例えばアバランシュ型フォトダイオード（APD）やフォトマルチプリケータを使用することができる。更に、本発明によれば、パスバンドは蛍光信号の積分時間を最適化するように選ばれる。それはリアルタイムで1.5MHzであり、これは積分時間が各ピクセル毎に最適化された場合のイメージガイドの最小限サンプリング周波数に対応する。

30

#### 【0043】

本発明の装置は、第2高調波生成顕微鏡検査をマルチフォトン式顕微鏡検査に結合することを可能にする点で特に特徴的である。それは蛍光信号と同時に検体から発射された第2高調波生成信号を検出することである。このため、二色フィルター6と拒絶フィルター11との間に、第2高調波生成信号を蛍光信号から分離することの可能な、同調可能な二色フィルター13又はあらゆる他の装置を設ける。SHGセンサー14はこの第2高調波生成信号を受け取る。

40

#### 【0044】

検出された信号を制御し、分析し、デジタル処理し、表示するための電子情報処理手段16（例えば、マイクロコンピュータ）は以下のボードを有する：

- 次の機能を有する同期ボード17：

- 走査（即ち、ラインミラーM1とフレームミラーM2の動き）を同期して制御すること；

- SHGセンサー14から来るデータの分析を蛍光画像と同期して制御すること；

- このように走査されるレーザスポットの位置をあらゆる瞬間において知ること；および、

50

- それ自身も制御され得るマイクロコンピュータを介して他のすべてのボードを管理すること；および、

- この装置の波長同調性を管理するべく予備補正手段を制御すること；

- 特にインピーダンス適合を行うアナログ回路と、増幅器と、アナログ・デジタル変換器と、次いで、信号を成形するプログラム可能な論理デバイス（例えば、FPGA回路）とを各検出路毎に有する検出ボード15。

#### 【0045】

マイクロコンピュータ16は、また、可変周波数のデジタルデータの流れを処理してそれをグラフィックボード（図示せず）を用いてスクリーンに表示するためのデジタル収集ボード（図示せず）を有する。

#### 【0046】

非限定的な例として、本発明で使用される画像処理は、特に文献WO 2004/008952及び/又はWO 2004/010377に記載されているような画像処理の簡単な修正でもよい。

#### 【0047】

光学ヘッドのないイメージガイドの場合に関しては、この装置の作動は、以下の点を除けば、前述したものと同様である：イメージガイドの出口では、注入されたファイバから出る発散光は検体内で拡散し、蛍光信号は表面と数 $\mu\text{m}$ （ファイバのコアの直径とその開口係数による）の深さとの間に位置するマイクロボリューム内で回収される。走査により、検体はマイクロボリュームからマイクロボリュームへと照射される。各瞬間毎に、組織内の励起されたマイクロボリュームは蛍光信号を発射し、この蛍光信号はより短い波長の方へずれようとする特性を有する。この蛍光信号はイメージガイドによって捕集され、それから励起ビームとは逆の光路を経て二色フィルター6に達し、後者は蛍光信号を検出路の方へ送るであろう。検出された信号は、次々と、図1を参照しながら前述したのと同じ画像処理によって特にリアルタイムで処理され、リアルタイムで画像を再構成して画面に表示するのを可能にする。

#### 【0048】

図2から図14は予備補償装置の幾つかの実施例を示す。予備補償は、超短レーザパルスを準備して、それにスペクトル幅と位相変調を与えることからなり、これらはイメージガイド8の出口においてその最適な時間的圧縮をもたらすであろう。用いる技術は、装置全体のグループ速度分散を補償すると共に、光パルスがイメージガイド内を伝播する時に光パルスが受ける不可避免的な非線形効果をも補償することを目的としている。目的とする予備補償の原理は、S.W. Clark、F.O. Ilday、F.W. Wiseが「チタン：サファイア・レーザからのフェムト秒パルスのファイバ供給」（Optics Letters、vol. 26, No. 17, 2001年9月1日）に発表したものと同一である。

#### 【0049】

典型的には、予備補償は2つの部分からなる：即ち、光ファイバの切断片と、それに続く回折格子式の分散ライン。

- 単一の光ファイバ又は1つのイメージガイドからなる光ファイバ切断片：用いる単一の光ファイバはレーザ波長に対してはモノモードである。切断片の長さはマルチコア・イメージガイド8の長さに近い。この長さは、例えばイメージガイドの長さやレーザビームの波長やイメージガイドの入口および出口における出力とパルス幅等々のような装置の他のパラメータに応じて最適化される。このファイバのモード直径は、予備補償の2つの部分内で遭遇する非線形効果を均衡するため、イメージガイドのコアのモード直径より大きい。従って、大モード面積（large mode area (LMA)）の光ファイバ、又はエア・シリカ構造化クラッド型の新世代光ファイバに属する光ファイバを使用する。このモノモードファイバの切断片は、正常グループ速度分散がある程度のレート（主として2と3のオーダー）であることと、モード直径を介して制御される（特に切断片の最初の数ミリメートルにわたる）スペクトル拡幅の非線形効果が発現することとを特徴としている。単一の光ファイバ又は1つの第2のイメージガイドからなるこの切断片は励起レーザパルスに位相ずれをもたらす。この位相ずれは主イメージガイド8内の分散を予備補償するべく作用す

10

20

30

40

50

るが、例えば光学ヘッドのようなこの装置の残部によって導入される他のあらゆる分散を補償するべく作用をすることもできる。

【 0 0 5 0 】

- 回折格子式の分散ライン：この部分は、反射で作動し、平面的で、効率の大きな、完全に反射性の中間平面ミラーに連結された、2つの回折格子からなる。回折格子は互いに向かい合って数センチメートルのところに平行に配置されている。レーザビームは、光をほぼ自らの方へ送り返す平面ミラーに到達する前に、斜めの入射角でこれら2つの格子に順次に入射する。従って、レーザビームは分散ラインから再び出て行く前に4回これらの格子に入射する。この分散ラインの目的は、この装置内に大きなレート of 異常グループ速度分散を導入することである。これはレーザスペクトルの最も赤い光子を遅延させることになり、これは前述したモノモードファイバの切断片内においてだけでなくイメージガイド内においても同時に起こることとは逆の挙動に対応する。“トリーシィ (Treacy) ライン”の名称で知られるこの装置は、フェムト秒レーザチェーン周波数偏移式の増幅装置（ここではこの装置はチェーン末端のパルスコンプレッサの役割を果たす）において広く使用されている。この分散ラインは、格子のピッチ、格子間距離、およびこれらの格子に対する入射角に応じて、異常グループ速度分散がある程度のレート（主として2および3のオーダー）であることを特徴としている。

【 0 0 5 1 】

図2から図14は本発明の装置の簡素化模式図であり、これらの図には予備補償装置4が詳細に示してある。明瞭化のため、装置3は示してない。図1のものと同一構成要素は図2から図14には同じ参照符号で示してある。レーザ2、走査装置5、二色フィルター6（これは励起ビームを検体の方へ送ると共に蛍光信号をセンサー12の方へ送る）が示してある。図2から図7は第1切断片を備えていない基本的補償装置を示す。ファラデー・アイソレータ21から出たビームは直接に回折格子式又はプリズム式の分散ラインの方へ進む。図2では、このラインは2つの回折格子23、24と1つのミラー25からなる。分散ライン内におけるレーザビームの進路は次の通りである：第1回折格子23上で第2回折格子24に向かって反射、第2回折格子24上でミラー25に向かって反射（ミラー25ではレーザビームは第2格子24に向かって、次いで第1格子23に向かって完全に反射される）。分散ラインから出たパルス19はレーザ2から出たパルス18より長い。回折格子23から来るビームは次いでミラー22上で走査装置5の方へ反射し、次いでイメージガイド8の方へ反射する。図2から図14は上面図である；特に、図2、3、6～9においては、レーザ2から出て格子23へ向かうレーザビームはミラー22を横切ることなくその上方を通過する。反対に、格子23から走査装置5へ向かうレーザビームはミラー22で反射する。このミラー22は、レーザからの励起ビームを分散ラインの方へ通過させると共に分散ラインからの励起ビームを走査装置の方へ反射するセパレータで置換することができる（この場合、2つのビームは整列せられる）。しかし、後者の場合には、セパレータによって生じる損失が大きい（入射信号の25%のみが使用される）。

【 0 0 5 2 】

イメージガイド8内における線形分散および非線形効果は励起パルスの時間的かつスペクトル的なプロファイルを修正し、このプロファイルは再びレーザ2から出るパルス18とほぼ同じになる。分散ラインはイメージガイド8によってもたらされた+の位相ずれをほぼ補償するべく - の位相ずれをもたす。図3では、2つの回折格子は2つのプリズム26および27によって置換されており、励起レーザビームの進路は同じである。

【 0 0 5 3 】

図4および図5では、分散ラインとミラー22は、夫々、4つの回折格子（図4の場合）および4つのプリズム（図5の場合）によって置換してある。励起レーザビームは順次に4つの回折格子28、29、30、31（プリズム32、33、34、35）で反射する。

【 0 0 5 4 】

10

20

30

40

50

図 6 および図 7 は図 2 および図 3 に対応するもので、位相・振幅マスク 3 6 はミラー 2 5 の上手に導入してある。このマスクはイメージガイドの分散に対してパルスの形を精密に調整することにより予備補償性能を向上させることを可能にする。このマスクは、スペクトル位相に対して作用する異なるガラスプレートと、横断方向に可変でスペクトル振幅に対して作用するフィルターとを組み合わせることにより構成することができる。

【 0 0 5 5 】

図 8 ~ 1 1 は夫々図 2 ~ 5 に対応するが、ミラー 2 2 ( 図 2 および 3 ) の上手、或いは 4 つの回折格子 ( 図 4 ) の上手、或いは 4 つのプリズム ( 図 5 ) の上手に配置された切断片を更に備えている。

【 0 0 5 6 】

この切断片は、単一の光ファイバ、又はイメージガイドを構成する各光ファイバの特性が主イメージガイドの特性とほぼ同一であるような 1 つのイメージガイドで構成することができる。

【 0 0 5 7 】

この単一の光ファイバ又は第 2 のイメージガイドは正の位相ずれ + 1 をもたらす。イメージガイド 8 はまた正の位相ずれ + 2 をもたらす。従って、分散ライン ( 図 8 ~ 1 1 ) は負の位相ずれ - ( 1 + 2 ) をもたらす。

【 0 0 5 8 】

図 1 2 に示したように、予備補償ステップはレーザ波長に対して異常分散型の単一の光ファイバ切断片 3 8 を用いても得ることができる。この特殊なファイバはレーザ波長より短い波長においてゼロの分散を呈する。これは次のいずれかの構造を有する最適化された長さの新世代ファイバの切断片を用いることにより得ることができる： - 同心的デュアルコアファイバ、エア - シリカ構造化クラッド型ファイバ、中空コア型エア - シリカ構造化クラッド型光子ファイバ、中空コア型ブラッグクラッド型光子ファイバ。この予備補償用ファイバ切断片は、また、このウエーブガイド内における伝播に関連する非線形効果を考慮するべくモード直径が最適化されていることを特徴としている。

【 0 0 5 9 】

前述したものの変化形として、予備補償は図 1 3 および図 1 4 に示したように走査装置内に組み込むことができる。即ち、図 2 ~ 1 1 に示した補償装置のいずれかを走査装置 5 の光路に挿入することができる。

【 0 0 6 0 】

本発明は、従って、コンパクト性とフレキシビリティが利点であるイメージガイドをベースとする顕微鏡に関するもので、これは組織内にイメージガイドを挿入することにより内視鏡への用途を可能にする。最後に、マルチフォトン式顕微鏡検査とイメージガイドによるファイバ式顕微鏡検査との組み合わせは、観察すべき検体の深いところに位置する器官の蛍光画像の収集を可能にする。実際には、この装置は順応可能型であることができ、即ち、レーザ源なしで設計され、従って研究所内の既存のレーザ源とインターフェース可能である。

【 0 0 6 1 】

本発明は多数の用途を有するもので、特に非侵襲性の或いは少ししか侵襲性でない方法を必要とする用途に利用することができる。

これらの用途は、例えば、1 mm より小さな直径の光学プローブを例えば膀胱内に挿入する場合の尿道内視鏡；小動物の結腸鏡検査；角膜および網膜の可視化；筋肉繊維および神経繊維の可視化；白血球および血流の微小循環；血管構造および腎臓構造；肝細胞隔膜；および例えば生きている小動物の、又はヒトのための潜在的臨床的用途の、深層脳構造を可視化するためのその場式の神経生物学である。

【 0 0 6 2 】

勿論、本発明は前記実施例に限定されるものではなく、本発明の範囲を逸脱することなく種々の変更を加えることができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 3 】

【図 1】図 1 は本発明の収集装置の模式図である。

【図 2】図 2 は回折格子をベースとする補償部を備えた本発明の装置を上から見た模式図である。

【図 3】図 3 はプリズムをベースとする補償部を備えた本発明の装置を上から見た模式図である。

【図 4】図 4 は 4 つの回折格子をベースとする補償部を備えた本発明の装置を上から見た模式図である。

【図 5】図 5 は 4 つのプリズムをベースとする補償部を備えた本発明の装置を上から見た模式図である。

【図 6】図 6 は図 2 に示した装置と等価的な装置を示すもので、この装置は、更に、位相および振幅においてパルス波形に作用する位相マスクおよび振幅マスクを備えている。

【図 7】図 7 は図 3 に示した装置と等価的な装置を示すもので、この装置は、更に、位相および振幅においてパルス波形に作用する位相マスクおよび振幅マスクを備えている。

【図 8】図 8 は図 2 に示した装置と等価的な装置を示すもので、この装置は、更に、光ファイバ又はイメージガイドの分散性切断片を備えている。

【図 9】図 9 は図 3 に示した装置と等価的な装置を示すもので、この装置は、更に、光ファイバ又はイメージガイドの分散性切断片を備えている。

【図 10】図 10 は図 4 に示した装置と等価的な装置を示すもので、この装置は、更に、光ファイバ又はイメージガイドの分散性切断片を備えている。

【図 11】図 11 は図 5 に示した装置と等価的な装置を示すもので、この装置は、更に、光ファイバ又はイメージガイドの分散性切断片を備えている。

【図 12】図 12 は異常分散型の光ファイバをベースとする補償部を備えた本発明の装置を上から見た模式図である。

【図 13】図 13 は走査装置と補償装置とを組合せてなる本発明の装置を上から見た模式図である。

【図 14】図 14 は図 13 に示した装置と等価的な装置を示すもので、この装置は、更に、光ファイバ又はイメージガイドの分散性切断片を備えている。

10

20

【図 1】

1/8

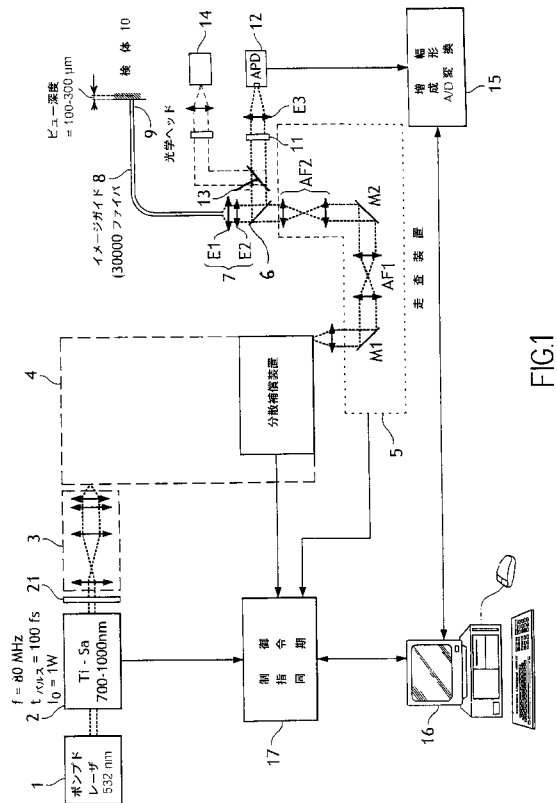


FIG.1

【図 2】

2/8

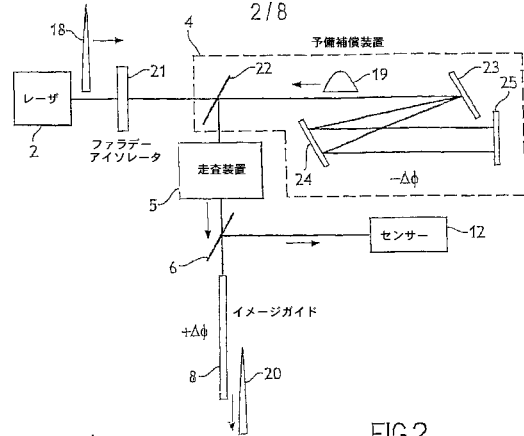


FIG.2

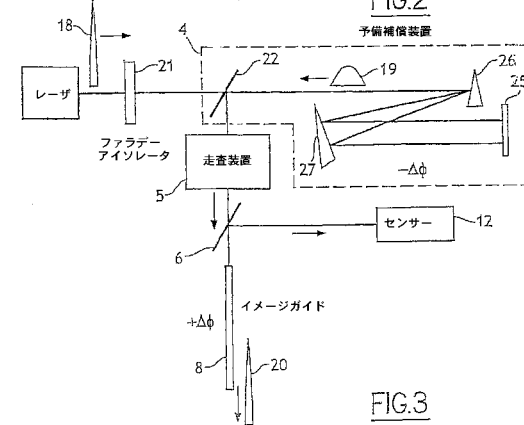


FIG.3

【図 3】

3/8

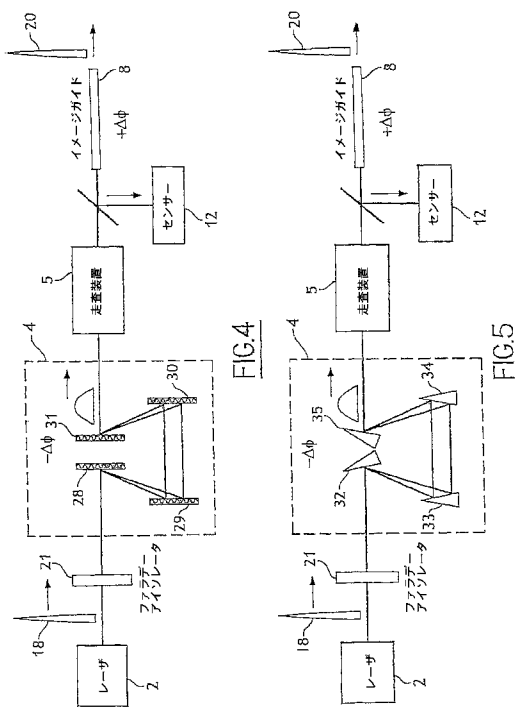


FIG.4

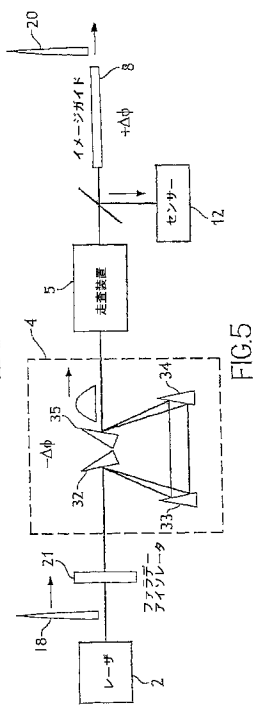


FIG.5

【図 4】

4/8

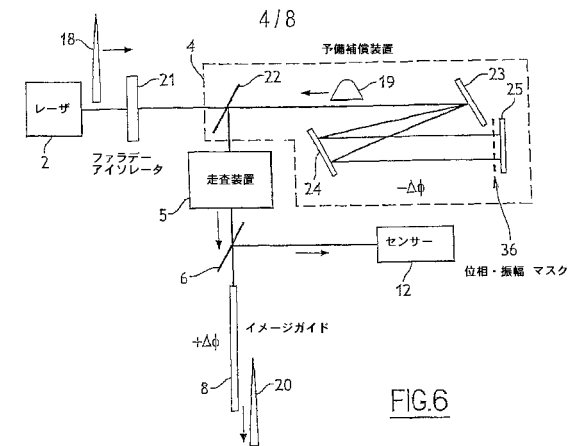


FIG.6

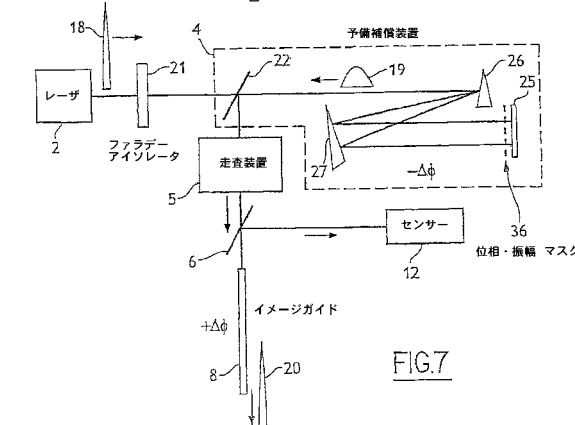
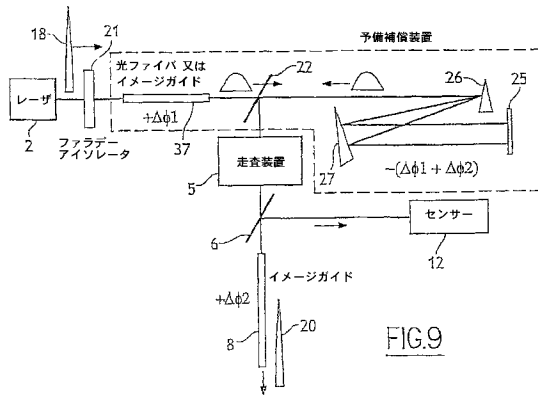
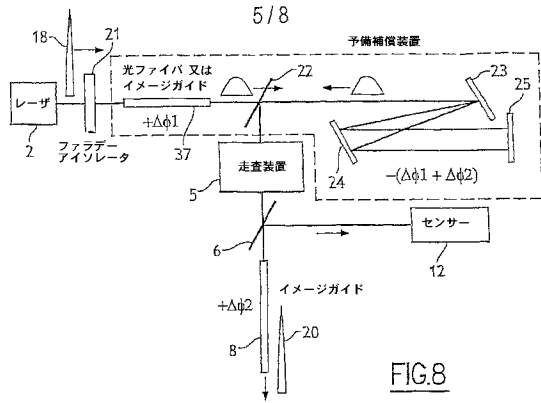


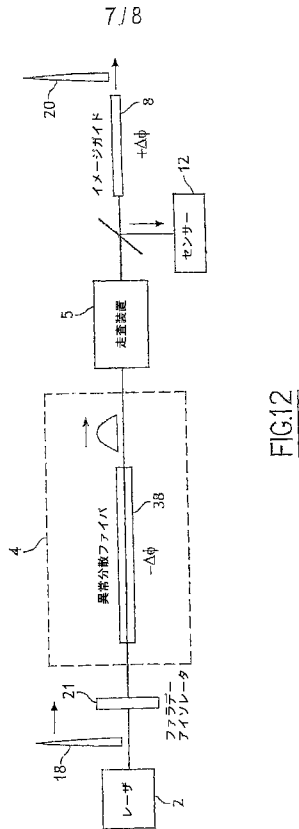
FIG.7



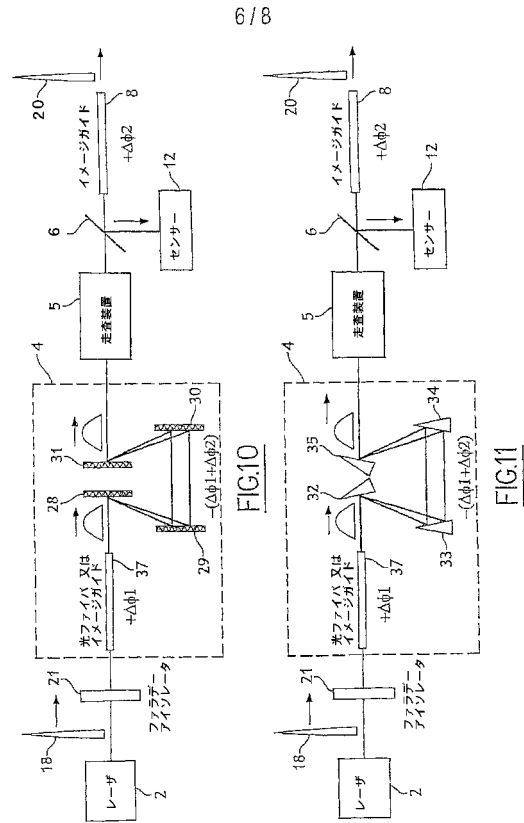
【図 5】



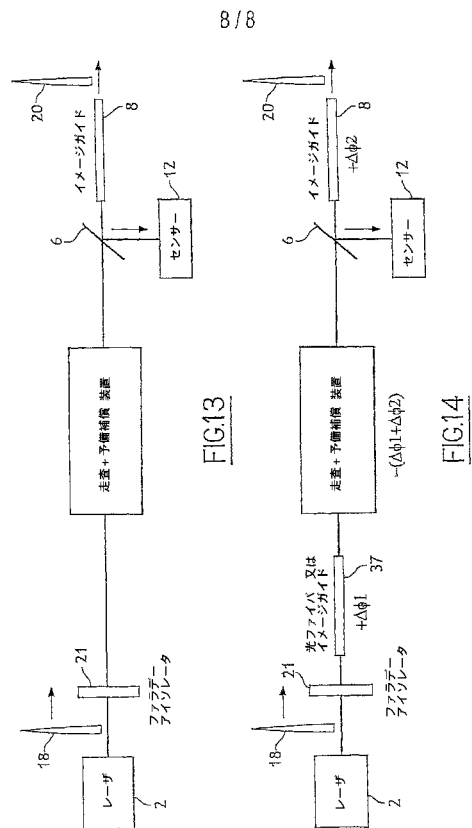
【図 7】



【図 6】



【図 8】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/FR2005/002630
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G02B21/00 G02B21/16		
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) G02B G01N A61B G01J H01S		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2003, no. 12, 5 December 2003 (2003-12-05) -& JP 2003 344777 A (JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP), 3 December 2003 (2003-12-03) abstract paragraphs [0016], [0023] - [0032]	1,12,13, 15,16, 21-26, 33,37
Y A	----- US 6 249 630 B1 (STOCK MICHELLE L ET AL) 19 June 2001 (2001-06-19) column 3, line 22 - line 23 column 5, line 54 - line 67 column 6, line 41 - column 7, line 6 column 8, line 30 - line 54 column 10, line 12 - line 22 figure 1 ----- -/--	2-7,9,11 8,10
Y		2-7,11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  1 February 2006		Date of mailing of the international search report  24.04.2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hornung, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2005/002630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WERNER GÖBEL ET AL.: "Distortion-free delivery of nanojoule femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser through a hollow-core photonic crystal fiber" OPTICS LETTERS, vol. 29, no. 11, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 1285-1287, XP002329618  page 1285, right-hand column  page 1287, left-hand column  figure 1</p>	9
A	<p>-----  S.W. CLARK ET AL.: "Fiber delivery of femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser" OPTICS LETTERS, vol. 26, no. 17, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 1320-1322, XP002329619  cited in the application  page 1320 - page 1321; figure 1</p>	2-7,9
A	<p>-----  US 5 995 281 A (SIMON ET AL)  30 November 1999 (1999-11-30)  column 2, line 15 - line 44  column 2, line 59 - line 67  column 5, line 44 - line 65  figures 3,4</p>	11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2005/002630

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

**See continuation sheet**

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

**See annexe**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2005/002630

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 1-11, 33-37

Multiphotonic fibre imaging system comprising a pulsed laser, a light guide comprising a plurality of optical fibres, scanning means and specific means for compensating pulse dispersion effects in the light guide, as well as corresponding process

1.1 Claims: 12, 13, 15, 16, 21-26

Multiphotonic fibre imaging system comprising a pulsed laser, a light guide comprising a plurality of optical fibres, scanning means, compensating means and injection means (claim 12), detection means (claim 13), a dichroic filter (claims 15, 16), a specific laser source (claims 21, 22), a specific light guide (claims 23-26)

2. Claims: 14, 17, 34, 35

Multiphotonic fibre imaging system comprising a pulsed laser, a light guide comprising a plurality of optical fibres, scanning means, compensating means and means for detecting a signal indicating the generation of a second harmonic, as well as corresponding process

3. Claims: 18-20, 36

Multiphotonic fibre imaging system comprising a pulsed laser, a light guide comprising a plurality of optical fibres, compensating means and specific scanning means

4. Claims: 27-32

Multiphotonic fibre imaging system comprising a pulsed laser, a light guide comprising a plurality of optical fibres, scanning means, compensating means and detection means: the detection means are either means for detecting a plurality of fluorescence signals, or a spectrometer.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2005/002630

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2003344777	A	03-12-2003	NONE	
US 6249630	B1	19-06-2001	NONE	
US 5995281	A	30-11-1999	NONE	

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale n°  
 PCT/FR2005/002630

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. G02B21/00 G02B21/16		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G02B G01N A61B G01J H01S		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-internal, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2003, no. 12, 5 décembre 2003 (2003-12-05) -& JP 2003 344777 A (JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP), 3 décembre 2003 (2003-12-03) abrégé	1,12,13, 15,16, 21-26, 33,37
Y	alinéas [0016], [0023] - [0032]	2-7,9,11 8,10
A	-----	
Y	US 6 249 630 B1 (STOCK MICHELLE L ET AL) 19 juin 2001 (2001-06-19) colonne 3, ligne 22 - ligne 23 colonne 5, ligne 54 - ligne 67 colonne 6, ligne 41 - colonne 7, ligne 6 colonne 8, ligne 30 - ligne 54 colonne 10, ligne 12 - ligne 22 figure 1 ----- -/--	2-7,11
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" documents se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  1 février 2006		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  24.04.2006
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Fonctionnaire autorisé  Hornung, A

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2005/002630

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WERNER GÖBEL ET AL.: "Distortion-free delivery of nanojoule femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser through a hollow-core photonic crystal fiber" OPTICS LETTERS, vol. 29, no. 11, 1 juin 2004 (2004-06-01), pages 1285-1287, XP002329618  page 1285, colonne de droite  page 1287, colonne de gauche  figure 1</p>	9
A	<p>-----  S.W. CLARK ET AL.: "Fiber delivery of femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser" OPTICS LETTERS, vol. 26, no. 17, 1 septembre 2001 (2001-09-01), pages 1320-1322, XP002329619  cité dans la demande  page 1320 - page 1321; figure 1</p>	2-7,9
A	<p>-----  US 5 995 281 A (SIMON ET AL)  30 novembre 1999 (1999-11-30)  colonne 2, ligne 15 - ligne 44  colonne 2, ligne 59 - ligne 67  colonne 5, ligne 44 - ligne 65  figures 3,4</p>	11



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR2005/002630**Cadre II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
  
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
  
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>  
voir annexe

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Demande internationale No. PCT/ FR2005/ 002630

## SUIVE DES RENSEIGNEMENTS INDICES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

## 1. revendications: 1-11,33,37

Système d'imagerie multiphotonique fibré comprenant un laser pulsé, un guide d'image constitué d'une pluralité de fibres optiques, des moyens de balayage ainsi que des moyens spécifiques de compensation des effets de dispersion des impulsions dans le guide d'image. Procédé correspondant.

## 1.1. revendications: 12,13,15,16,21-26

Système d'imagerie multiphotonique fibré comprenant un laser pulsé, un guide d'image constitué d'une pluralité de fibres optiques, des moyens de balayage, des moyens de compensation ainsi que des moyens d'injection (rev. 12), des moyens de détection (rev. 13), un filtre dichroïque (rev. 15,16), une source laser spécifique (rev. 21, 22), un guide d'image spécifique (rev. 23-26).

---

## 2. revendications: 14,17,34,35

Système d'imagerie multiphotonique fibré comprenant un laser pulsé, un guide d'image constitué d'une pluralité de fibres optiques, des moyens de balayage, des moyens de compensation ainsi que des moyens de détection d'un signal de génération de second harmonique. Procédé correspondant.

---

## 3. revendications: 18-20,36

Système d'imagerie multiphotonique fibré comprenant un laser pulsé, un guide d'image constitué d'une pluralité de fibres optiques, des moyens de compensation ainsi que des moyens spécifiques de balayage.

---

## 4. revendications: 27-32

Système d'imagerie multiphotonique fibré comprenant un laser pulsé, un guide d'image constitué d'une pluralité de fibres optiques, des moyens de balayage, des moyens de compensation ainsi que des moyens de détection: ces moyens de détection sont soit des moyens de détection de plusieurs signaux de fluorescence, soit un spectromètre.

---

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE			
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets			
Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)
			Date de publication
JP 2003344777	A	03-12-2003	AUCUN
US 6249630	B1	19-06-2001	AUCUN
US 5995281	A	30-11-1999	AUCUN

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100090099

弁理士 伊藤 宏

(74)代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(72)発明者 ヴィエルローブ、ベルトラン

フランス国、F - 9 4 1 3 0 ノジョン・シュール・マルヌ、リュ・ド・フォントネイ、1 2 1

(72)発明者 ラコンム、フランソワ

フランス国、F - 9 2 3 7 0 シャビル、アヴニュ・ロジェ・サレングロ、2 1 7 3

(72)発明者 ロアゾー、アレグザンドル

フランス国、F - 7 5 0 0 9 パリ、リュ・ド・ラ・グランジュ・パトリエール、1 0

(72)発明者 ルーラドゥール、フレデリック

フランス国、F - 8 7 1 2 0 イム・チエール、アヴニュ・ド・サント・アンヌ、2 3

(72)発明者 ルレック、ミカエル

フランス国、F - 1 9 1 0 0 プリヴ・ラ・ゲイヤールド、リュ・ア・ジョーペール、2 6、アパルトマン 3 7セ、レジダンス・ラ・クロアゼ

(72)発明者 バルトレミイ、アラン

フランス国、F - 8 7 0 0 0 リモージュ、リュ・ド・ラルゴンヌ、4 1

(72)発明者 パヌー、ドミニク

フランス国、F - 8 7 0 0 0 リモージュ、ランドウージュ、リュ・ドゥ・キャヴー、2

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA02 HA02 HA05 HA09 HA11 HA15 JA02

JA04 JA05 KA01 KA08 KA09 MA06

2H052 AA07 AC26

4C061 CC04 WW17

专利名称(译)	纤维型多光子显微成像装置和样品的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008517291A</a>	公开(公告)日	2008-05-22
申请号	JP2007537342	申请日	2005-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	莫纳基技术公司 儿子托·伊格纳西奥·纳多·拉尔外壳格哈德青色T恤网络点击 单威赛引用和利摩日		
申请(专利权)人(译)	莫纳克亚技术 Sontoru全国德拉RECHERCHE , Shiantifiku Université电去利摩日		
[标]发明人	ヴィエルローブベルトラン ラコンムフランソワ ロアゾーアレグザンドル ルーラドゥールフレデリック ルレックミカエル バルトレミイアラン パヌードミニク		
发明人	ヴィエルローブ、ベルトラン ラコンム、フランソワ ロアゾー、アレグザンドル ルーラドゥール、フレデリック ルレック、ミカエル バルトレミイ、アラン パヌー、ドミニク		
IPC分类号	G01N21/64 A61B1/00 G02B21/00		
CPC分类号	G02B23/2484 A61B5/0062 A61B5/0068 A61B5/0071 A61B5/0075 A61B5/0086 G01N21/6452 G01N21/6458 G01N2021/6417 G01N2021/6484 G01N2201/08 G01N2201/1053 G02B6/04 G02B21/002 G02B21/16 G02B23/2469		
FI分类号	G01N21/64.E A61B1/00.300.D G02B21/00		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/FA02 2G043/HA02 2G043/HA05 2G043/HA09 2G043/HA11 2G043/HA15 2G043/JA02 2G043/JA04 2G043/JA05 2G043/KA01 2G043/KA08 2G043/KA09 2G043/MA06 2H052/AA07 2H052/AC26 4C061/CC04 4C061/WW17		
代理人(译)	伊藤 宏 森田健一		
优先权	2004011313 2004-10-22 FR		
其他公开文献	JP5102622B2 JP2008517291A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

纤维型多光子型成像设备技术领域本发明涉及一种用于内窥镜或荧光显微镜下的标本(10)的纤维型多光子型成像设备。该设备是：以飞秒为单位产生多光子泵浦激光辐射的脉冲激光器(1、2)，以及在由多根光纤组成的地下平面中通过点对点扫描的分析物。能够照射激光的图像导向器(8)，用于补偿激发脉冲在图像导向器(8)中的色散效应的预补偿装置(4)，(该装置是脉冲激光器和图像导向器(8))具有扫描装置，该扫描装置用于引导激发激光束与图像引导器的纤维相交，并且特别是用于将离开图

像引导器的激发激光束聚焦到样本 ( 10 ) 中。光学头 ( 9 ) 。 [选型图]图  
1

