



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808702 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201310547711. 6

(22) 申请日 2013. 11. 06

(30) 优先权数据

2012-249208 2012. 11. 13 JP

(71) 申请人 索尼公司

地址 日本东京

(72) 发明人 木岛公一朗

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
11240

代理人 余刚 吴孟秋

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G02B 21/36 (2006. 01)

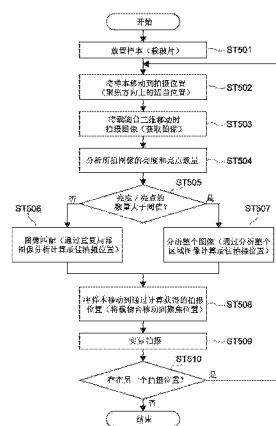
权利要求书2页 说明书19页 附图17页

(54) 发明名称

图像获取单元及图像获取方法

(57) 摘要

本发明公开了图像获取单元及图像获取方法,其中该图像获取单元包括:光源,用于生成使生物样本的荧光标签发光的激发光;图像传感器,用于形成图像;光学系统,用于将光源的激发光施加在生物样本的至少部分区域,所述部分包括荧光标签,并使图像传感器形成部分区域的荧光图像;移动控制单元,用于将光学系统的焦点位置向光学系统的光轴方向和与光轴垂直的方向移动;生成单元,用于在光学系统的焦点位置移动期间对图像传感器连续曝光,并生成部分区域的长时间曝光图像;以及,计算单元,用于分析生成的长时间曝光图像的频率,并至少利用分析结果计算荧光标签的光轴方向上的位置信息。



1. 一种图像获取装置,包括:
光源,被配置为生成使生物样本的荧光标签发光的激发光;
图像传感器,被配置为形成图像;
光学系统,被配置为:
将来自所述光源的所述激发光施加至所述生物样本的至少部分区域,所述部分区域包括所述荧光标签,并且
使所述图像传感器形成所述部分区域的荧光图像;
移动控制单元,被配置为使所述光学系统的焦点位置在所述光学系统的光轴方向和与
所述光轴垂直的方向上移动;
生成单元,被配置为:
在所述光学系统的焦点位置移动期间对所述图像传感器进行连续曝光,并且
生成所述部分区域的长时间曝光图像;以及计算单元,被配置为:
分析生成的所述长时间曝光图像的频率,并且
至少利用所述分析的结果计算所述荧光标签的在所述光轴方向上的位置信息。
2. 根据权利要求1所述的图像获取装置,其中
所述计算单元被配置为:
分析与预先设置的两个方向以及与所述两个方向不同的至少一个方向上的所述长时间曝光图像的频率,所述两个方向互相垂直,
确定方向中具有最高频率分量的一个方向,并且
基于确定的方向计算所述位置信息。
3. 根据权利要求2所述的图像获取装置,其中,
所述计算单元被配置为:
预先存储关于要被确定的方向与所述位置信息之间的相关性的信息,并且
基于关于所述相关性的所述信息从所确定的方向计算所述位置信息。
4. 根据权利要求2所述的图像获取装置,其中,
所述计算单元被配置为:
生成移动图像,所述移动图像是通过使所述长时间曝光图像针对每个方向移动预先设置的像素数量而获得的,
获得所述长时间曝光图像与每个移动图像之间的相关性,并且
确定具有最低相关性的方向。
5. 一种图像获取方法,包括:
生成使生物样本的荧光标签发光的激发光;
由光学系统将所述激发光施加至所述生物样本的至少部分区域以及使所述图像传感器形成所述部分区域的荧光图像,所述部分区域包括所述荧光标签;
将所述光学系统的焦点位置在所述光学系统的光轴方向和与光轴垂直的方向上移动;
在所述光学系统的焦点位置移动期间对所述图像传感器连续曝光,并生成所述部分区域的长时间曝光图像;并且
分析生成的所述长时间曝光图像的频率,并至少利用所述分析的结果计算所述荧光标

签在所述光轴方向上的位置信息。

图像获取单元及图像获取方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2012 年 11 月 13 日提交的日本在先专利申请 JP2012-249208 的优先权,其全部内容通过引证结合于此。

技术领域

[0003] 本发明涉及利用显微镜获取图像的图像获取装置和图像获取方法。

背景技术

[0004] 过去乳腺癌的治疗中采用(例如)分析手术中取出的组织切片并且基于分析结果选择术后给病人所用的药物的方法。

[0005] 例如,使用日本雅培制药有限公司制造的 HER-2DNA 探针盒(probe kit)对手术中取出的组织切片进行荧光染色。如果对组织切片施加激发光,从 HER2/neu 基因生成红色荧光,从 α -卫星 DNA 序列生成绿色荧光。因此,HER2/neu 基因用红色亮点标记, α -卫星 DNA 序列用绿色亮点标记。

[0006] 在使用荧光显微镜进行诊断的过程中,计数红色亮点和绿色亮点的数量。随后,如果红色亮点的数量是绿色亮点的 2.2 倍以上,可确定为阳性 HER2 反应。这种情况下,认为,通过服用分子靶向药物,霍夫曼-拉罗奇有限公司制造的赫赛汀(注册商标),可大大提高对病人术后的预后(参见 2009 年 9 月曲妥珠单抗病理委员会制定的 HER2 测试准则第三版,第 10 页《Fish 法确定方法》)。

[0007] 另外,日本专利申请公开第 2011-107669 号公开了一种从生物样本的荧光图像中检测标记细胞的亮点的技术。在日本专利申请公开第 2011-107669 号公开的生物样本图像获取装置中,生物样本的靶向部分由物镜放大并拍摄。通过在拍摄过程中根据需要移动物镜的焦点,提高了检测亮点的精确性。

发明内容

[0008] 在上文所述的使用显微镜等进行诊断的过程中,重要的是适宜地设置光学系统的焦点位置。例如,将诸如组织切片等样本置于载玻片上,通过封固剂将盖玻片置于其上。将由此产生的所制备的载片放置在荧光显微镜的载物台上。此时,由于各种原因,例如,样本厚度不均匀、载玻片厚度不均匀、载玻片与载物台之间夹有灰尘,需要对置于载物台上的每个制备的载片调整焦距位置。

[0009] 另一方面,荧光显微镜观察的图像的分辨率和亮点的亮度随着光学系统的数值孔径(NA)的增加而增加。因此,通过使用具有较高数值孔径(NA)的光学系统的显微镜,诊断准确性趋于提高。但是,如果光学系统的数值孔径(NA)增加,则由于焦深减小,容易错过焦点位置。具体来说,上述焦点调整方式难以进行。

[0010] 鉴于此,例如,可设想这样的方法:即,通过每次以小于焦深的间隔改变焦点位置时拍摄图像来搜索焦点位置并分析所拍摄的图像。但是,该方法需要拍摄许多图像,需要用

于存储大量所拍摄图像的数据的大容量存储器。另外,由于该方法需要基于多个图像的数据来计算焦点位置,这花费了大量工时,从而效率低下。如上所述,某些情况下使用荧光显微镜拍摄图像效率低下,因此需要在各个方面进行改进。

[0011] 鉴于上述情况,需要提供一种能够高效地拍摄附着有荧光标签的生物样本的图像的图像获取装置和图像获取方法。

[0012] (1) 根据本发明的一个实施例,提供了一种图像获取装置,包括:光源,用于生成使生物样本的荧光标签发光的激发光;图像传感器,用于形成图像;光学系统,用于将光源的激发光施加在生物样本的至少部分区域,所述部分包括荧光标签,并使图像传感器形成部分区域的荧光图像;移动控制单元,用于将光学系统的焦点位置向光学系统的光轴方向和与光轴垂直的方向移动;生成单元,用于在光学系统的焦点位置移动期间对图像传感器连续曝光,并生成部分区域的长时间曝光图像;以及,计算单元,用于分析生成的长时间曝光图像的频率,并至少利用分析结果计算荧光标签的光轴方向上的位置信息。

[0013] 在本发明该实施例中,分析长时间曝光图像的频率,至少基于分析结果计算光轴方向上荧光标签的位置信息,并基于计算的位置信息拍摄用于诊断的荧光图像。因此,可高效拍摄附着了荧光标签的生物样本的图像。

[0014] (2) 在图像获取装置中,计算单元可分析与预先设置的互相垂直的两个方向不同的至少一个方向上的长时间曝光图像的频率,确定具有最高频率分量的方向,并基于确定的方向计算位置信息。

[0015] 在本发明该实施例中,由于在至少三个方向分析长时间曝光图像的频率,所以可准确确定至少三个方向中最大频率分量最高的方向。

[0016] (3) 在图像获取装置中,计算单元可预先存储要确定的方向与位置信息之间的相关性信息,并基于相关性信息计算所确定的方向中的位置信息。

[0017] 在本发明该实施例中,预先存储要确定的方向与位置信息之间的相关性信息,并基于相关性信息进行处理。因此,即使拍摄长时间曝光图像时光学系统的焦点位置不以恒定速度移动,也可准确计算位置信息。

[0018] (4) 在图像获取装置中,计算单元可生成移动图像,移动图像通过将长时间曝光图像按为每个方向预先设置的像素数量移动而获得;获得长时间曝光图像与每个移动图像之间的相关性;并且,确定相关性最低的方向。

[0019] 在本发明该实施例中,可仅通过(例如)移动图像并利用与原始图像的差计算相关系数的简单处理,确定相关性最低的方向。

[0020] (5) 根据本发明的一个实施例,提供了一种图像获取方法,包括:生成使生物样本的荧光标签发光的激发光;由光学系统将激发光施加在生物样本的至少部分区域,所述部分包括荧光标签,并通过光学系统使图像传感器形成部分区域的荧光图像;将光学系统的焦点位置向光学系统的光轴方向和与光轴垂直的方向移动;在光学系统的焦点位置移动期间对图像传感器连续曝光,并生成部分区域的长时间曝光图像;分析生成的长时间曝光图像的频率,并至少利用分析结果计算荧光标签的光轴方向上的位置信息。

[0021] 如上所述,根据本发明,可高效拍摄附着了荧光标签的生物样本的图像。

[0022] 根据附图所示的本发明最佳实施例的以下详细说明,本发明的这些和其他目的、特征和优点得以更加明确。

附图说明

- [0023] 图 1 为示出了根据本发明实施例的图像获取装置的示意图；
- [0024] 图 2 为从侧面方向示出了置于载物台 11 上的生物样本的示意图；
- [0025] 图 3 为示出了数据处理单元 20 的硬件配置的框图；
- [0026] 图 4 为根据该实施例的获取生物样本的图像的过程的功能框图；
- [0027] 图 5 为示出了由图像获取装置拍摄图像的区域示意图；
- [0028] 图 6A 为示出了在载物台 11 移动的情况下光学系统的焦点位置的移动的示意图；
- [0029] 图 6B 为示出了在载物台 11 移动的情况下光学系统的焦点位置的移动的示意图；
- [0030] 图 7 为示出了曝光时由于载物台 11 的移动改变了焦点位置，图像传感器 14 拍摄的图像的形状和位置随着时间变化的示意图；
- [0031] 图 8A 为用于详细说明根据该实施例的焦点位置的移动范围的示意图；
- [0032] 图 8B 为详细说明根据该实施例的焦点位置的移动范围的示意图；
- [0033] 图 9 为示出了在每个分割的拍摄范围内拍摄的样本部分的荧光图像的示意图；
- [0034] 图 10 示出了与图 9 所示的各个荧光图像对应的作为该实施例的示例所拍摄的照片；
- [0035] 图 11 为示出了分布信息计算单元进行的计算过程的示例的流程图；
- [0036] 图 12 为示出了根据该实施例的用于计算起始位置与聚焦图像之间的角度 θ 的过程的示例的示意图；
- [0037] 图 13 为示出了根据该实施例的多个荧光标记的分布信息的示例的示意图；
- [0038] 图 14 为示出了根据该实施例的多个荧光标记的分布信息的示例的示意图；
- [0039] 图 15 为示出了根据该实施例的多个荧光标记的分布信息的示例的示意图；
- [0040] 图 16 为示出了载玻片与载物台之间夹有灰尘等的状态的示意图；
- [0041] 图 17 为示出了分布信息计算单元进行的计算过程的修改例的流程图；
- [0042] 图 18 为示出了本发明的整个过程的流程的流程图，包括初步拍照、根据第一实施例的分析、根据第二实施例的分析和实际拍照之间的关系；
- [0043] 图 19 为 x 轴方向为荧光图像的水平方向，y 轴方向为荧光图像的垂直方向，相对于 x 和 y 轴方向倾斜 45 度的方向 A 被确定为获得频率分量的方向的示意图；
- [0044] 图 20 为示出了亮点轨迹的最亮的几乎直线部分在两个方向出现的状态的示意图；
- [0045] 图 21 为示出了作为没有位移的原始图像的荧光图像的示意图；
- [0046] 图 21A 为示出了原始图像和通过将原始图像向左方向移动预定数量的像素而获得的图像之间的相关性被获得的状态的示意图；
- [0047] 图 21B 为示出了原始图像和通过将原始图像向左下方位移预定数量的像素而获得的图像之间的相关性被获得的状态的示意图；
- [0048] 图 21C 为示出了原始图像和通过将原始图像向下位移预定数量的像素而获得的图像之间的相关性被获得的状态的示意图；
- [0049] 图 21D 为示出了原始图像和通过将原始图像向右下方位移预定数量的像素而获得的图像之间的相关性被获得的状态的示意图；以及

[0050] 图 21E 为示出了原始图像和通过将原始图像向右位移预定数量的像素而获得的图像之间的相关性被获得的状态的示意图。

具体实施方式

[0051] 下文将参考附图对本发明的实施例进行说明。

[0052] 在本发明中,当荧光显微镜对通过用荧光标记对采集自活体的组织进行染色而制备的制备载片(下文称为生物样本 SPL)的荧光图像进行拍摄时,荧光显微镜自动聚焦在适当位置。

[0053] 在以下说明中,通过适当聚焦在生物样本 SPL 中的荧光标记的亮点上而拍摄用于诊断的荧光图像称为“实际拍照”,在“实际拍照”之前进行的,拍摄用于调整焦点位置以搜索适当焦点位置的荧光图像来用于“实际拍照”,称为“初步拍照”。本发明涉及初步拍照。应注意的是,由于实际拍照是使用荧光显微镜进行的典型拍照,其说明将省略。

[0054] 应注意的是,在将本发明应用于使用荧光显微镜进行的初步拍照的情况下,根据从活体采集组织的方法的不同,应用方法会有部分区别。例如,在从验血或尿检中采集样本的情况下,如果拍摄完整生物样本 SPL 的图像,则所拍摄图像中的细胞密度或细胞中荧光染色的亮点的密度较低,其数量各不相同,例如,从几个到约一百不等。

[0055] 另一方面,在生物样本 SPL 由作为手术中取下的切片而获得的器官等样本制备而成的情况下,细胞密度较高,所拍摄的图像中亮点的数量不小于几百个。因此,在细胞核被荧光染色的情况下,不易于单独观察单个细胞核。

[0056] 在以下说明中,在本发明的第一实施例中将对本发明专用于拍摄具有较低细胞密度、较少亮点的生物样本 SPL 的图像的情况的应用进行了详细说明,在本发明的第二实施例中描述本发明的包括低细胞密度和高细胞密度的状态的应用。

[0057] 应注意的是,在以下说明中,如果细胞密度较低,则亮点密度低,并且如果细胞密度较高,则亮点密度高。如果细胞密度高,则亮点密度低,则可通过根据假定细胞密度低的第一实施例的方法进行实际拍照。

[0058] < 第一实施例 >

[0059] 在本发明的第一实施例中,假定荧光显微镜所拍摄的生物样本 SPL 的细胞密度低,并且可明确地识别通过用荧光标签对细胞染色获得的荧光图像的各个亮点的状态。因此,第一实施例中本发明的特征在于明确识别荧光图像的单个亮点,并分析每个亮点的形状。

[0060] 【关于图像获取装置的配置】

[0061] 首先将对该实施例中进行初步拍照和实际拍照的图像获取装置的配置进行说明。图 1 为根据本发明实施例的图像获取装置的示意图。如图 1 所示,根据该实施例的图像获取装置 100 包括显微镜 10 和数据处理单元 20。下文将对显微镜 10 和数据处理单元 20 的配置进行详细说明。

[0062] 【关于显微镜 10 的配置】

[0063] 显微镜 10 包括载物台 11、光学系统 12、光源 13 和图像传感器 14。载物台 11 包括置物表面,生物样本 SPL (例如,组织切片、细胞和生物聚合物(包括染色体))可置于置物表面上,载物台 11 可在与置物表面平行的方向(x-y 平面方向)和与置物表面垂直的方向(z

轴方向)移动。

[0064] 与置物表面垂直的方向(z轴方向)与生物样本 SPL 的厚度方向对应。与置物表面平行的方向(x-y 平面方向)与和厚度方向垂直的平面方向对应。

[0065] 光学系统 12 布置在载物台 11 上方。光学系统 12 包括物镜 12A、成像透镜 12B、二向色镜 12C、发射光滤光片 12D 和激发光滤光片 12E。光源 13 包括(例如)灯泡,例如,银灯或 LED(发光二极管),将激发光施加在附着在生物样本 SPL 上的荧光标签上。

[0066] 获取生物样本 SPL 的荧光图像时,激发光滤光片 12E 通过仅使从光源 13 发出的光中具有激发荧色的激发波长的光透过,从而生成激发光。二向色镜 12C 将透过激发光滤光片入射的激发光反射给物镜 12A。物镜 12A 将激发光集中到生物样本 SPL。随后,物镜 12A 和成像透镜 12B 以预定放大率放大生物样本 SPL 的图像,并将放大图像成像在图像传感器 14 的成像表面上。

[0067] 如果将激发光施加在生物样本 SPL 上,粘着在生物样本 SPL 的组织上的染料发出荧光。荧光经由物镜 12A 透过二向色镜 12C,并经由发射光滤光片 12D 到达成像透镜 12B。发射光滤光片 12D 吸收物镜 12A 放大的,透过激发光滤光片 12E 的光,并仅使彩色再现光的一部分透过其中。丢失了外光的彩色再现光的图像由成像透镜 12B 放大,并且成像在图像传感器 14 上,如上所述。

[0068] 使用(例如)CCD(电荷耦合器件)或 CMOS(互补金属氧化物半导体)图像传感器作为图像传感器 14。图像传感器 14 包括接收 RGB(红、绿、蓝)色的光并将光转换为电信号的光电转换单元,并作为从入射光中获取彩色图像的彩色成像仪。

[0069] 【关于置于载物台 11 上的生物样本 SPL 和亮点】

[0070] 图 2 为从载物台 11 的侧向示出了在载物台 11 上放置的生物样本 SPL(制备的载玻片)的示意图。如图 2 所示,生物样本 SPL 在 z 方向的厚度为(例如)几微米至几十微米。另外,生物样本 SPL 夹在载玻片 SG 与盖玻片 CG 之间,并通过预定固定方法固定。载玻片 SG 的厚度为(例如)约 1mm。盖玻片 CG 的厚度为(例如)约 0.15 至 0.17mm。

[0071] 用荧光染料染色生物样本 SPL。荧光染料是一种由从同一光源施加的激发光发出荧光的染料。荧光染料的示例包括 DAPI(4',6-双脒基-2-苯基吲哚)、SpAqua 和 SpGreen。

[0072] 对生物样本 SPL 染色,因此荧光标签附着在生物样本 SPL 的靶生物组织 50 上。如果在荧光标签上施加预定激发光,荧光标签发出预定荧光。因此,在通过拍摄生物样本 SPL 的图像而生成荧光图像的情况下,靶生物组织 50 用显示预定颜色的亮点(下文称为“荧光标记 55”)标记。

[0073] 【关于数据处理单元的配置】

[0074] 数据处理单元 20 驱动光源 13、通过使用图像传感器 14 获取生物样本 SPL 的荧光图像,并将荧光图像存储为样本数据。

[0075] 图 3 为数据处理单元 20 的硬件配置的框图。数据处理单元 20 包括计算机,例如,PC(个人计算机)。数据处理单元 20 将图像传感器 14 获取的生物样本 SPL 的荧光图像存储为任意格式(例如,JPEG(联合图像专家组))的数字图像数据。

[0076] 如图 3 所示,数据处理单元 20 包括 CPU(中央处理器)21、ROM(只读存储器)22、RAM(随机存取存储器)23、操作输入单元 24、接口单元 25、显示单元 26 和存储器 27,这些块通过总线 28 连接。

[0077] ROM22 固定存储多个程序,例如,用于执行各种处理的固件以及数据。RAM23 用作 CPU21 的工作区域,临时存储 OS (操作系统)、执行的各种应用程序和要处理的各种类型的数据。

[0078] 存储器 27 包括,例如, HDD (硬盘驱动器)、闪存,或另一种非易失性存储器,例如,固态存储器。存储器 27 存储 OS、各种应用和各种类型的数据。在该实施例中,特别地,存储器 27 还存储从图像传感器 14 中捕获的荧光图像数据或进行荧光图像数据的图像处理的图像处理应用程序。

[0079] 接口单元 25 与分别驱动显微镜 10 的载物台 11、光源 13 和图像传感器 14 的控制板(载物台驱动单元 15、光源驱动单元 16 和拍摄控制单元 17)连接,并通过预定通信标准在控制板与数据处理单元 20 之间交换信号。

[0080] CPU21 将 ROM22 或存储器 27 中存储的多个程序之中与操作输入单元 24 发出的命令对应的程序扩展到 RAM23,并根据需要基于扩展程序控制显示单元 26 和存储器 27。

[0081] 操作输入单元 24 包括操作装置,例如,包括鼠标的指示装置、键盘和触摸板。

[0082] 显示单元 26 包括(例如)液晶显示器、EL (电致发光)显示器、等离子显示器或 CRT (阴极射线管)显示器。显示单元 26 可结合于数据处理单元 20 内,或外部连接至数据处理单元 20。

[0083] 【关于获取生物样本图像的过程概述(初步拍照)】

[0084] 在该实施例中,为了搜索焦点位置以进行实际拍照,光学系统 12 的焦点位置在拍照范围内移动,该拍照范围包括初步拍照中生物样本 SPL 被拍照部分的厚度。在焦点位置移动期间,对图像传感器 14 进行曝光,因此获取了生物样本 SPL 的初步拍照荧光图像。基于初步拍照荧光图像,计算拍照目标厚度方向上的荧光标签的分布信息。荧光标签的分布信息与用荧光标记 55 标记的靶生物组织 50 的分布信息对应。

[0085] 基于计算的分布信息,可易于(例如)根据情况计算用于拍摄荧光标记 55 的图像的焦点位置。因此,可高效地拍摄附着了荧光标记 55 的生物样本 SPL 的图像。下文将对其进行详细说明。

[0086] 【关于获取生物样本图像的过程的功能块(初步拍照)】

[0087] 数据处理单元 20 的 CPU21 将 ROM22 或存储器 27 中存储的多个程序之中与操作输入单元 24 发出的命令对应的程序扩展入 RAM23 中。CPU21 基于扩展的程序(图像获取程序)执行获取生物样本图像的过程。

[0088] 图 4 为获取生物样本图像的过程的功能框图。数据处理单元 20 包括载物台控制单元 31 (移动控制单元)、图像获取单元 32 (生成单元)、分布信息计算单元 33 (计算单元)、数据记录单元 34、数据存储器 35 和光源控制单元 36。

[0089] 载物台控制单元 31 (例如)按顺序移动载物台 11,以使生物样本 SPL 的被拍照部分(下文也称为样本部分)位于拍照范围内,并将生物样本 SPL 分配到拍照范围 AR 内,如图 5 所示。应注意的是,在图 5 中,虽然要分配到拍照范围 AR 内的生物样本 SPL 的区域没有重叠,但相邻区域的一部分可能会重叠。

[0090] 另外,在对图像传感器 14 曝光时,载物台控制单元 31 同时并且一体地在 x 轴方向、y 轴方向和 z 轴方向移动载物台 11,以拍摄用于调整焦点位置的荧光图像。下文将对整体移动方法进行说明。

[0091] 每次目标样本部分通过载物台 11 的移动而在拍照范围 AR 内移动时,图像获取单元 32 向拍摄控制单元 17 发送对图像传感器 14 曝光的命令,以拍摄用于调整焦点位置的荧光图像。

[0092] 每次完成用于调整焦点位置的荧光图像的拍摄时,图像获取单元 32 通过拍摄控制单元 17 从图像传感器 14 获取用于调整样本部分的焦点位置的荧光图像。随后,图像获取单元 32 通过利用预定耦合算法对将分配在拍照范围 AR 内的样本部分的图像进行耦合,从而生成整个生物样本的图像。

[0093] 分布信息计算单元 33 基于图像获取单元 32 获取的用于调整生物样本 SPL 的焦点位置的荧光图像,计算样本部分的厚度方向上荧光标记 55 的分布信息。

[0094] 数据记录单元 34 通过对图像获取单元 32 生成的样本部分的生物样本的图像耦合而生成一个生物样本图像,将该图像以预定压缩格式(例如, JPEG (联合图像专家组))编码为样本数据,并将编码数据存储在数据存储器 35 中。该过程可在分布信息计算单元 33 计算分布信息之前进行。

[0095] 另外,数据记录单元 34 接收分布信息计算单元 33 计算的分布信息,并将与样本数据相关的数据存储在数据存储器 35 中。

[0096] 数据存储器 35 可存储(例如)分布信息计算单元 33 对荧光标记 55 的测量结果的数据(例如,荧光标记的面积、数量和类型)、生物样本 SPL 采样人员的姓名、采样人员的性别和年龄、采样日期等信息。

[0097] 上文对获取生物样本图像的过程的功能框图进行了说明。

[0098] **【关于载物台 11 的移动】**

[0099] 现在将对载物台 11 的两种类型的移动进行概述。在载物台 11 的一种类型的移动中,载物台 11 按顺序在 x 轴方向或 y 轴方向移动,以在 x-y 平面按顺序对生物样本 SPL 的每个部分进行初步拍照。这种移动如图 5 所示移动。

[0100] 然后,每次进行一种类型的移动并且生物样本 SPL 的一个新部分位于拍照范围内时,进行载物台 11 另一种类型的移动。载物台 11 另一种类型的移动是,对图像传感器 14 曝光时,执行载物台 11 在 x 轴方向、y 轴方向和 z 轴方向的整体移动,以拍摄用于调整焦点位置的荧光图像。下文将对对于载物台 11 是另一种类型的移动时拍摄用于调整焦点位置的荧光图像的方法进行说明。

[0101] **【关于拍摄用于调整焦点位置的荧光图像的方法】**

[0102] 在对载物台 11 每种类型的移动进行用于调整焦点位置的荧光图像的拍摄中,载物台控制单元 31 对载物台 11 的移动和图像获取单元 32 对图像传感器 14 的曝光同步进行。

[0103] 载物台控制单元 31 通过在 x-y 平面方向和 z 轴方向移动载物台 11 而相对于样本部分移动光学系统的焦点。在该实施例,由于载物台 11 的移动被控制,所以焦点在样本部分的厚度方向(z 轴方向(物镜 12A 的光轴方向))和与厚度方向垂直的平面方向(x-y 平面方向)移动。

[0104] 作为具体示例,载物台控制单元 31 根据以下公式移动载物台 11 的位置。

[0105] **【数学公式 1】**

$$[0106] \quad x(t) = x_0 + R \times \cos\left(2\pi \frac{t}{t_{ex}}\right) \dots\dots\dots (1)$$

$$[0107] \quad y(t) = y_0 + R \times \sin\left(2\pi \frac{t}{t_{ex}}\right) \dots\dots\dots (2)$$

$$[0108] \quad z(t) = z_{start} + (z_{end} - z_{start}) \frac{t}{t_{ex}} \dots\dots\dots (3)$$

[0109] 如以下公式 (1) 和 (2) 所示,载物台 11 以恒定速度在 x-y 平面上沿中心坐标为 (x0, y0),半径为 R 的圆圈移动。如果可拍摄拍照范围 AR 内的图像,中心坐标 (x0, y0) 的位置和半径 R 的大小可任意设置。

[0110] 但是,如果半径 R 太小,难以将下文所述的聚焦焦点上的亮点图像与图像内散焦亮点图像分开。因此,半径 R 需要比聚焦时亮点的尺寸大得多。特别地,由于 NA 为 0.8 的情况下绿色焦点图像的尺寸约为 0.3 μm,所以期望半径 R 的值应比亮点图像的尺寸大得多,例如,大于 2 至 3 μm 的值。

[0111] 在公式 (1) 和 (2) 中, t_{ex} 代表曝光时间段。特别地,图像传感器 14 曝光时,载物台 11 以圆形轨迹移动。换句话说,在该实施例中,在载物台 11 以圆形轨迹移动时对图像传感器 14 曝光。

[0112] 如公式 (3) 所示,载物台 11 也沿 z 轴方向移动。在图像传感器 14 的曝光时间段内,载物台 11 以恒定速度从作为移动起始位置的 z_{start} 移动到作为移动终点位置的 z_{end} 。

[0113] 随后,在自开始移动载物台 11 以拍摄用于调整焦点位置的荧光图像,到完成载物台 11 的移动期间,图像获取单元 32 向拍摄控制单元 17 发送对图像传感器 14 进行曝光的命令。

[0114] 图 6A 和 6B 为载物台 11 移动的情况下光学系统的焦点位置的移动示意图。如图 6 所示,包括焦点位置的聚焦面 FP 沿 z 轴方向从 z_{start} 向 z_{end} 移动。另外,聚焦面 FP 以圆形轨迹在 x-y 平面上绕中心坐标 (x0, y0) 移动。

[0115] 下文将对载物台 11 的移动方法进行详细说明。

[0116] 图 7 为由于曝光时载物台 11 的移动改变了焦点位置而使图像传感器 14 拍摄的图像的形状和位置随着时间而变化的示意图。图像的位置变化用轨迹 41 表示。

[0117] 如图 7 所示,载物台控制单元 31 在 z 轴方向从下到上以恒定速度移动载物台 11,并在 x-y 平面上以恒定速度以圆形轨迹移动载物台 11。在从开始曝光到完成曝光期间,物镜 12A 没有聚焦在粘合在特定基因上的荧光标记 55 上的状态变为聚焦状态,并再次变为非聚焦状态。

[0118] 特别地,在曝光起始位置,荧光标记发出的具有圆形形状的彩色再现光的散焦图像 40 拍摄在图像传感器 14 上。

[0119] 随后,曝光时间段结束时,该图像逐渐聚焦,如果曝光起始位置上的图像的 z 轴坐标用 z_{start} 表示,曝光结束位置上的图像的 z 轴坐标用 z_{end} 表示,曝光时间段用 t_{ex} 表示,则在图像的 z 轴坐标为 $(z_{end}+z_{start})/2$ 并且曝光时间段为 $t_{ex}/2$ 时,聚焦图像 42 拍摄在图像传感器 14 上。在聚焦状态下,荧光标记发出的具有圆形形状的彩色再现光的图像较小,边缘

清晰,亮度较高。

[0120] 如果曝光时间段再次结束,图像再次变成散焦图像,荧光标记发出的具有圆形形状的色彩再现光的散焦图像 43 在曝光结束位置被图像传感器 14 拍摄。

[0121] 如上所述,在图像传感器 14 上,按顺序曝光图像 40 至 43,拍摄具有半圆形形状的图像。

[0122] 上文对拍摄用于调整焦点位置的荧光图像的方法进行了说明。

[0123] 【关于在 Z 轴方向重复拍摄用于调整焦点位置的荧光图像】

[0124] 拍摄用于调整焦点位置的荧光图像时,如上所述,z 轴方向的焦点位置从 z_{start} 向作为移动终点位置的 z_{end} 移动。但是,z 轴方向的移动不必一次覆盖 z 轴方向的整个拍照范围。因此,z 轴方向的拍照范围分成多个范围,多次拍摄用于调整焦点位置的荧光图像。

[0125] 图 8A 和 8B 均为详细说明根据该实施例的焦点位置的移动范围的示意图。如图 8 所示,在该实施例中,设置多个分割拍照范围(Zscan_1 至 3),多个分割拍照范围通过在 z 轴方向分割至少包括样本部分的厚度范围 T 的拍照范围 L 而获得。在每个分割拍照范围中,拍摄用于调整焦点位置的荧光图像。特别地,在每个分割拍照范围中,设置 z_{start} (1 至 3) 和 z_{end} (1 至 3) (见图 8B)。

[0126] Z 轴方向上分割拍照范围的尺寸为,例如,20 μm 至 50 μm 。但是,尺寸并不限于该值。另外,分割拍照范围的数量也没有限制。另外,至少包括样本部分的厚度范围 T 的拍照范围 L 的尺寸也没有限制。

[0127] 在将预定样本部分分配到拍照范围 AR 内的状态下,焦点位置在多个分割拍照范围中的每一个内移动。随后,为每个分割拍照范围获取用于调整焦点位置的荧光图像。在该实施例中,由于拍照范围在 z 轴方向分成三个范围,所以相对于预定样本部分获取用于调整焦点位置的三个荧光图像。

[0128] 例如,可在分配预定样本部分的状态下按顺序拍摄三个荧光图像。可替代地,使用一个分割拍照范围拍摄整个生物样本 SPL 的图像后,可拍摄另一个分割拍照范围内的图像。

[0129] 【用于调整焦点位置的荧光图像的具体示例】

[0130] 图 9 为在多个分割拍摄范围中的每一个内拍摄的样本部分的荧光图像的示意图(Zscan_1 至 3)。另外,图 10 显示了与图 9 所示的各个荧光图像对应的所拍摄的照片,作为该实施例的示例。这些照片是以圆形轨迹的半径 R 为 15 μm ,z 轴方向($z_{\text{end}}-z_{\text{start}}$)的移动量为 20 μm ,图像传感器 14 的曝光时间段为 1 秒的条件作为拍照条件而拍摄的荧光图像。另外,根据情况调整伽玛值等拍照条件。

[0131] 分割拍照范围 Zscan_1 和 3 是在 z 轴方向不包括荧光标记 55 的拍照范围。因此,在作为在该范围内拍摄的荧光图像的 image_Zscan1 和 3 内,荧光标记 55 的图像散焦非常严重(各个图中 Zscan_1 和 Zscan_3 的情况)。

[0132] 另一方面,在作为在分割拍照范围 Zscan_2 内拍摄的荧光图像的 image_Zscan2 中,焦点位置在包括具有荧光标记 55 的位置的范围内移动。因此,在拍摄的 image_Zscan2 内,拍摄荧光标记 55 随着焦点位置的移动而聚焦的轨迹的图像,如各个图中 Zscan_2 的情况所示。

[0133] 【关于荧光标记 55 的分布信息计算过程】

[0134] 接下来将对荧光标记 55 的分布信息计算过程进行说明。

[0135] 基于在多个分割拍照范围(Zscan_1 至 3)中的每一个内拍摄的多个荧光图像,计算样本部分厚度方向上荧光标记 55 的分布信息。如上所述,由分布信息计算单元 33 进行计算。

[0136] 图 11 为分布信息计算单元 33 进行的计算过程的示例的流程图。

[0137] 首先,分布信息计算单元 33 对在每个分割拍照范围(Zscan_1 至 3)内拍摄的多个荧光图像进行频率分析(步骤 101)。

[0138] 由此计算多个荧光图像(image_Zscan1 至 3)中的每一个的空间频率。

[0139] 接下来,分布信息计算单元 33 将荧光图像的最大频率分量互相比,选择最大频率分量最高的荧光图像(步骤 102)。

[0140] 在荧光图像 image_Zscan1 和 3 中,荧光标记 55 的图像散焦。另一方面,在荧光图像 image_Zscan2 中,显示了荧光标记 55 的轨迹的聚焦图像。因此,在步骤 102 中,选择荧光图像 image_Zscan2 作为最大频率分量最高的荧光图像。

[0141] 接下来,分布信息计算单元 33 分析最大频率分量最高的荧光图像 image_Zscan2 中荧光标记 55 的轨迹图像(步骤 103)。

[0142] 特别地,在该实施例中,在该步骤中分析荧光图像 image_Zscan2 中荧光标记 55 的数量和形状。在下文中,该分析称为荧光标记形状分析。通过形状分析,获得了荧光标记的形状的曝光起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 。下文将对其进行详细说明。

[0143] 最后,分布信息计算单元 33 基于为每个荧光标记 55 计算的曝光起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ ,计算样本部分厚度方向上每个荧光标记 55 的分布信息(步骤 104)。

[0144] 特别地,在该实施例中,为每个荧光标记 55 计算 z 轴方向上的位置信息。因此,可计算多个荧光标记 55 的分布信息。

[0145] 上文对荧光标记 55 的分布信息计算方法进行了说明。

[0146] **【关于荧光标记的形状分析和标记颜色】**

[0147] 现在将对计算荧光标记 55 的分布信息时对荧光标记进行的形状分析中的标记颜色进行说明。

[0148] 分布信息计算单元 33 对图像获取单元 32 获取的荧光图像 image_Zscan2 中标记靶生物组织 50 的荧光标记 55 (下文还称为“靶标记”,描述为荧光标记 55a)进行检测。

[0149] 在分布信息计算单元 33 上,将(例如)靶标记显示的颜色(下文称为“靶标记颜色”)和标记细胞核的荧光标记 55 (下文称为“核标记”)显示的颜色(下文称为核标记颜色)设置为设置信息。

[0150] 另外,在使用对选为控制基因的基因进行标记的荧光标记 55 (下文称为“控制标记”,描述为荧光标记 55b)的情况下,正常细胞核内存在的选为控制基因的基因数量也在分布信息计算单元 33 上设置。另外,在这种情况下,也设置标记控制基因的荧光标记显示的颜色(下文称为“控制标记颜色”)。

[0151] 根据将用于荧光染色的探针的制造商和荧光标记类型等使用条件而明确地确定设置信息。特别地,在(例如)使用日本雅培制药有限公司制造的 HER-2DNA 探针盒的情况下,HER2 基因的靶标记颜色设为“红色”,核标记颜色设为“蓝色”。另外,这种情况下,染色

体上与 HER2 基因相邻的基因为控制基因,控制基因的控制标记颜色设为“绿色”。

[0152] 分布信息计算单元 33 通过显示设置的每个标记颜色并检测高于阈值的亮度而检测荧光标记 55 的形状(面积)和数量。随后,分析荧光标记 55 的形状,由此计算多个荧光标记 55 的分布信息。

[0153] 【关于荧光标记的形状分析(具体示例)】

[0154] 现在将对计算荧光标记 55 的分布信息时对荧光标记的形状进行分析的具体示例进行说明。

[0155] 在图 9 所示的 Zscan_2 的情况下,对通过用上述方法拍摄两个荧光标记 55a 和 55b 的图像而获取的轨迹作为示例进行图解说明。如上所述,在光学系统 12 的焦点位置移动时对图像传感器 14 曝光,从而拍摄荧光图像 image_Zscan2。

[0156] 由于焦点位置在作为载物台 11 的平面方向的 x-y 平面上以圆形轨迹移动,荧光标记 55a 和 55b 沿圆形 0 移动。特别地,荧光标记 55a 和 55b 的轨迹从作为焦点的移动起始位置的 z_{start} 向作为移动终点位置的 z_{end} 以半圆形运动而移动(此处说明了焦点位置在曝光时间段内以半圆形移动的情况)。

[0157] 光学系统 12 的焦点位置在分割拍照范围 Zscan_2 内在 z 轴方向向上移动。在移动期间的任何焦点位置上,其更接近聚焦在荧光标记 55a 和荧光标记 55b 的其中之一上。在聚焦最好的状态下,荧光标记 55a 和 55b 的图像面积最小,亮度最高。面积最小的图像称为聚焦图像 60。

[0158] 在该实施例中,分布信息计算单元 33 计算起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ ,并基于角 θ 计算样本部分厚度方向上荧光标记 55 的分布信息。下文将对角 θ 的计算方法的示例进行说明。

[0159] 例如,在图 9 中的 Zscan_2 的情况所示的荧光标记 55b 的情况下,由于聚焦图像 60 处于以半圆形运动移动的荧光标记 55b 的轨迹的中心位置,角 θ 约为 90 度。这种情况下,焦点位置移动到分割拍照范围 Zscan_2 的中心时,其更接近聚焦。因此,可以看出,荧光标记 55b 位于分割拍照范围 Zscan_2 的中心。

[0160] 在另一个荧光标记 55a 的情况下,与以半圆形运动移动的荧光标记 55a 的轨迹中心位置相比,聚焦图像 60 处于更靠近终点位置 z_{end} 的位置。角 θ 约为 135 度。这种情况下,焦点位置移动到分割拍照范围 Zscan_2 的中心之外并处于其上部时,其更接近聚焦。因此,可以看出,荧光标记 55a 位于分割拍照范围 Zscan_2 的上部。

[0161] 特别地,随着曝光起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 变得越小,荧光标记 55 位于越靠近起始位置 z_{start} 的位置。特别地,在生物样本 SPL 中,荧光标记 55 位于靠近载物台 11 的一侧。

[0162] 另一方面,随着曝光起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 变得越大,荧光标记 55 位于越靠近终点位置 z_{end} 的位置。特别地,在生物样本 SPL 中,荧光标记 55 位于远离载物台 11 的一侧。

[0163] 应注意的是,上文的说明假定载物台 11 在 z 轴方向和 x-y 平面上以恒定速度移动。但是,载物台 11 在 z 轴方向和 x-y 平面上的移动不一定以恒定速度进行。应注意的是,这种情况下,需要预先设置载物台 11 在 x-y 平面上的移动量,即,角 θ 与载物台在 z 轴方向上的移动量之间的一对一关系的相关信息,并存储该信息。

[0164] 上文对荧光标记的形状分析的具体示例进行了说明。

[0165] **【关于曝光起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 的计算】**

[0166] 现在将对计算荧光标记 55 的分布信息时进行的角 θ 的计算方法进行说明。

[0167] 图 12 为根据该实施例的曝光起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 的计算过程的示例的示意图。

[0168] 首先,分布信息计算单元 33 通过裁切过程从用于调整焦点位置的荧光图像 70 中切割要被分析的荧光标记 55 的图像(步骤 201)。

[0169] 对理论图像和裁切图像 75 进行匹配过程。如图 12 所示,在该实施例中,理论图像的文件预先存储在存储器 27 等中。文件中存储有与 0 至 359 度的各个角度关联的多个理论图像 80。在该实施例中,关联角度的大小为理论图像 80 的标识号。

[0170] 可根据情况预先设置用于创建理论图像 80 的波长、数值孔径、放大率、像素间距等。另外,还可根据情况设置设为 0 度的角,对每多少度的角准备理论图像等。例如,在为每 1 度准备理论图像 80 的情况下,创建了 360 个理论图像 80。

[0171] 接下来,分布信息计算单元 33 计算多个理论图像 80 与裁切图像 75 之间的相关系数(步骤 202)。

[0172] 随后,分布信息计算单元 33 计算相关系数最高的理论图像 80 的标识号(步骤 203, 见图 11 的图表)。

[0173] 最后,分布信息计算单元 33 计算对于捕获图像 70 的多个荧光标记 55 中相关系数最高的理论图像 80 的标识号,生成与多个荧光标记 55 关联的标识号列表,并使存储器 27 等存储列表(步骤 204)。

[0174] 在上述方法中,基于根据各个荧光标记 55 计算的理论图像 80 的标识号(角度)适当计算上述起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 。例如,可准备理论图像 80,使角 θ 与作为标识号的角对应。可替代地,通过作为标识号的角度确定荧光标记 55 的形状,随后可再次计算起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 。应注意的是,起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 的计算方法并不限于上述方法,可采用其他方法。

[0175] 上文对角 θ 的计算方法进行了说明。

[0176] **【关于使用荧光标记的分布信息的具体示例和方法】**

[0177] 现在将对使用荧光标记的分布信息的具体示例和方法进行说明。

[0178] 图 13 至 15 均为多个荧光标记 55 的分布信息的示例图表。如上所述,荧光标记 55 的分布信息可生成为直方图格式的数据。在这些图表中,水平轴代表荧光标记 55 在 z 轴方向的位置,垂直轴代表荧光标记 55 的数量。

[0179] 在该实施例中,水平轴由物镜焦深 F 的一半尺寸 ($F/2$) 分隔开,计数每个范围内包括的荧光标记 55 的数量。水平轴的分辨率并不限于 $F/2$,可根据情况设置小于焦深的值。另外,还可设置大于焦深的值。

[0180] 特别地,如果将光学系统 12 的焦点位置设于水平轴的范围内,拍摄该范围内包括的荧光标记 55 的聚焦图像。拍摄另一个范围内包括的荧光标记 55 的散焦图像,因为其远离焦点位置。

[0181] 基于荧光标记 55 的这种分布信息拍摄生物样本 SPL 的图像。由于可参照荧光标记 55 的分布,所以实际拍照可根据拍照模式和拍照用途高效并且精确地进行。

[0182] 例如,假定目的在于在实际拍照中拍摄荧光图像,从而使得生物样本 SPL 中存在的多个荧光标记 55 中仅特定数量的荧光标记 55 需要聚焦。这种情况下,如图 13 所示,确定仅需要进行实际拍照,对具有最大荧光标记 55 数量的范围内包括的位置 A 进行聚焦。由此,可在实际拍照中精确地拍摄荧光图像。

[0183] 另外,例如,假定目的在于定量地观测生物样本 SPL 中包括的全部荧光标记 55 的数量或类型等。这种情况下,如图 14 所示,通过根据分布信息计算荧光标记 55 所处的整个范围 B,并对整个范围 B 进行扫描,可拍摄包括所有荧光标记 55 的荧光图像。

[0184] 另外,可通过在将焦点位置从整个范围 B 的起始位置向终点位置移动时对图像传感器 14 曝光而拍摄一个荧光图像。另外,可将焦点位置在通过在整个范围 B 的两侧增加预定边缘 M 而获取的扩展范围 C 内移动。由此拍摄位于整个范围 B 的中心的荧光标记 55 和位于端部的荧光标记 55 的散焦图像(散焦程度几乎相似)。特别地,由于拍摄了具有几乎相似的尺寸和亮度的全部荧光标记 55 的图像,可提高荧光标记 55 的测量精确性。

[0185] 有一种称为所谓的 Z-stack 堆栈式的拍照模式,在这种模式下,在 z 轴方向上的不同焦点位置对一个样本部分拍摄多个荧光图像。同样在实施 Z-stack 堆栈式的情况下,可根据情况使用分布信息。例如,通过参照图 14 所示的整个范围 B,确定了实施 Z-stack 堆栈式的范围。另外,可根据情况参照图表设置不同焦点位置之间的间隔、拍照次数等。例如,可根据分隔水平轴的范围实施 Z-stack 堆栈式。如上所述,通过参照分布信息,可高精度拍摄荧光图像。

[0186] 另外,如图 15 所示,可设想荧光标记 55 的分布图分成两个山形部分的情况。这种情况的具体示例包括荧光标记 55 的分布集中在两个不同位置附近的情况。这种情况下,由于仅需要对特定数量的荧光标记 55 聚焦,如果在中心位置进行拍照,拍照可能会失败。

[0187] 参照分布信息,对山形部分中包括的位置 D 和位置 E 作为焦点位置进行计算。通过在这两个位置上聚焦并进行两次拍照,可在实际拍照中成功地以高精度拍摄荧光图像。

[0188] 上文对使用荧光标记的分布信息的具体示例和方法进行了说明。

[0189] 【本发明概述】

[0190] 在上文中,在根据该实施例的图像获取装置 100 中,光学系统 12 的焦点位置在至少包括样本部分厚度范围 T 的拍照范围 L 内移动。在移动期间对图像传感器 14 进行曝光,获取生物样本 SPL 的荧光图像。基于生物样本 SPL 的荧光图像,计算样本部分的厚度方向(z 轴方向)上荧光标记 55 的分布信息。由此,可易于(例如)适当地根据拍照模式和拍照用途计算用于拍摄荧光标记 55 的图像的焦点位置。因此,可高效地拍摄附着了荧光标记 55 的生物样本 SPL 的图像。

[0191] 【现有技术中的问题(拍照次数的问题)】

[0192] 例如,假定(例如)通过每次以小于焦深的间隔改变焦点位置时拍摄图像而搜索焦点位置,并分析每个所拍摄的图像的方法。该方法需要拍摄许多图像,需要有助于存储大量所拍摄图像的数据的大容量存储器。另外,由于该方法需要基于多个图像的数据计算焦点位置,因此花费了大量工时,效率低下。

[0193] 特别地,在 NA 为 0.8 的情况下,焦深约为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 。随后,假定通过在将焦点位置改变(例如 $1\text{ }\mu\text{m}$)时拍摄多个图像以搜索焦点位置,并分析图像,从而搜索焦点位置。这种情况下,如果在大于 $50\text{ }\mu\text{m}$ 的范围内将焦点位置改变 $1\text{ }\mu\text{m}$ 时进行测量,需要拍摄 50 个以上的图

像,并将其存储。在使用 24M 像素,14 比特的成像仪的情况下,一个图像文件的容量在 tif 格式下约为 100MB。因此,由于需要使用 5GB 以上的存储器来处理 50 个以上的图像,处理变得复杂。

[0194] 【本发明获得的优点(减少拍照次数)】

[0195] 在该实施例中,如图 8 所示,将 Zscan_1 至 3 设为三个分割拍照范围。如上所述,设置大于焦深的范围,通过较少拍照次数计算分布信息。由此,可在大大减少拍照次数的情况下搜索焦点位置。

[0196] 【将拍照范围 L 设置较大的原因】

[0197] 在图 8A 中,设置包括不具有生物样本 SPL 的范围的拍照范围 L(Zscan_1 和 3)。例如,如图 16 所示,某些情况下,载玻片 SG 与载物台 11 之间夹有头发等灰尘 90(尺寸约为,例如,20 μm 至 50 μm)。这种情况下,如果(例如)设置拍照范围 L 时仅考虑载玻片 SG 的厚度,很可能会错过焦点位置。因此,通过根据情况设置包括不具有生物样本 SPL 的范围的拍照范围 L,可精确计算荧光标记 55 的分布信息。如上所述,由于可通过较少拍照次数搜索焦点位置,可将拍照范围 L 设置较大。

[0198] 【本发明中获得的优点(消除灰尘等造成的影响)】

[0199] 在自动搜索和调整焦点位置的情况下,可能会发生成像仪上的灰尘或成像仪的缺陷被错误识别为载玻片 GS 上的荧光亮点,与真实焦点位置不同的位置被确定为焦点位置的错误。

[0200] 在该实施例中,在图 11 所示的步骤 101 和 102 中,计算荧光图像(image_Zscan1 至 3)的各个空间频率,选择最大频率最高的图像。如上所述,通过分析频率分量并对其进行比较,可在不受成像仪(图像传感器 14)上的灰尘、成像仪的缺陷等的影响的情况下选择包括荧光标记 55 的聚焦图像 60 的荧光图像 image_Zscan2。

[0201] <修改例 1(根据亮度选择荧光图像)>

[0202] 根据本发明的实施例并不限于上述实施例,并可进行各种修改。

[0203] 图 17 为图 11 所示的分布信息计算单元 33 进行的荧光标记 55 的分布信息计算处理的修改例的流程图。

[0204] 在该修改例中,首先,计算每个荧光图像(image_Zscan1 至 3)的亮度(步骤 301)。

[0205] 随后,选择亮度最高的荧光图像(步骤 302)。

[0206] 随后,对所选荧光图像进行荧光标记分析处理(步骤 303)。

[0207] 如上所述,可基于在多个分割拍照范围内拍摄的每个荧光图像的亮度,选择进行分布信息的计算处理的荧光图像。由此,可减少计算量。

[0208] <修改例 2(拍照范围 L 的合并)>

[0209] 在上述实施例中,如图 8A 所示,设置通过分割拍照范围 L 而获得的多个分割拍照范围,为每个分割拍照范围拍摄荧光图像。但是,还可通过移动载物台使得在一次拍照期间扫描整个拍照范围 L,来生成荧光图像。随后,可基于荧光图像计算荧光标记 55 的分布信息。

[0210] 例如,可在尺寸约为 100 μm 的拍照范围 L 内进行一次拍照。由此,可(例如)减少计算量,增加处理速度。可基于拍照范围 L 的尺寸和图像传感器 14 的精度确定是否设置分割拍照范围。

[0211] < 修改例 3 (基于分布确定拍照模式) >

[0212] 在上文中,对可根据拍照模式和拍照用途适当使用分布信息的情况进行了说明。相反地,可基于分布信息选择最佳拍照模式和拍照用途。

[0213] 例如,可进行以下确定过程:在多个荧光标记 55 集中在焦深范围内的情况下选择焦点位置固定的一次拍照,在多个荧光标记 55 分散的情况下选择 Z-stack 堆栈式拍照。此时,例如,数据处理单元 20 起拍照模式确定单元的作用。

[0214] < 修改例 4 (基于标记颜色计算分布信息) >

[0215] 另外,仅荧光标记 55 中的靶标记(红色)或控制标记(绿色)可被设为分布信息的计算目标。这些设置可通过(例如)用户操作而输入。

[0216] < 修改例 5 (要计算的荧光标记的渐灭) >

[0217] 另外,并非必须对荧光图像中的所有荧光标记 55 计算位置信息。特别地,荧光标记 55 渐少,并被选择,可基于位置信息计算分布信息。

[0218] < 修改例(其它) >

[0219] 应注意的是,在根据上述实施例的显微镜 10 的配置中,物镜 12A 可为目镜。

[0220] 另外,在上述实施例中,尽管移动载物台 11 被移动以用于移动焦点位置,但也可移动光学系统 12 的物镜 12A。

[0221] 在上述实施例中,尽管数据存储器 35 设于数据处理单元 20 内,生物样本的图像、荧光标记 55 的分布信息等存储在数据存储器 35 内,但其也存储在外部存储器内。

[0222] 为了连接显微镜 10 与数据处理单元 20,不仅可使用总线传输路径,还可使用有线或无线传输介质,例如,局域网、互联网和数字卫星广播。

[0223] < 第二实施例 >

[0224] 在第二实施例中,主要假定:荧光显微镜拍摄的生物样本 SPL 的细胞密度高,并且无法清楚地识别通过用荧光标签对细胞染色所获得的荧光图像的每个亮点。

[0225] 另外,即使可区分亮点,但由于亮点的数量较大,在第一实施例所述的分析每个亮点轨迹的形状的算法中,假定了进行分析花费的时间过长的情况。

[0226] 因此,本发明在第二实施例中的特征为,将整个图像视为组织而不需要区分荧光图像的每个亮点,并对组织进行分析。通过该方法,与第一实施例所述的分析每个亮点轨迹的形状的算法的情况相比,可在细胞密度较高的情况下缩短处理时间。

[0227] 应注意的是,在下文的说明中,通过与第一实施例相同的部件用相同数字表示来进行描述,除非另有说明。

[0228] 【关于与第一实施例的具体区别】

[0229] 首先将对与第一实施例的具体区别进行说明。与第一实施例的具体区别在于描述第一实施例中角 θ 的计算方法的【关于曝光起始位置 z_{start} 与聚焦图像 60 之间的角 θ 的计算】这一段的一部分。在第一实施例中,从用于调整焦点位置的荧光图像 70 剪下裁切图像 75,并且为每个裁切图像 75 计算与 0 至 359 度的各个角关联的多个理论图像 80 的相关系数。

[0230] 另一方面,在该实施例中,将用于调整焦点位置的整个荧光图像作为组织进行分析,通过下文所述的两种类型的方法中的任一种计算角 θ 。这是该实施例中的主要不同之处。

[0231] 与整个荧光图像的分析相关的区别的示例包括,不同于第一实施例,在该实施例中,不可能获得各个荧光标记 55 的分布信息,只能获得所有荧光标记 55 的平均位置。

[0232] **【关于包括实际拍照的整个流程】**

[0233] 现在将对整个过程的流程进行说明,以总结初步拍照、根据第一实施例的分析、根据第二实施例的分析与实际拍照之间的关系。

[0234] 图 18 为示出了本发明的整个过程的流程的流程图,整个过程包括初步拍照、根据第一实施例的分析、根据第二实施例的分析和实际拍照之间的关系。

[0235] 首先,将样本(载玻片、生物样本 SPL)置于荧光显微镜 10 的载物台 11 上(步骤 501)。样本的放置可由搬运机器人或手动操作进行。

[0236] 接下来,载物台控制单元 31 移动载物台 11,以使生物样本 SPL 的适当部位接近拍照范围 AR (步骤 502)。

[0237] 载物台 11 的移动是第一实施例所述的载物台 11 的一种类型的移动。在该步骤中,载物台 11 在 z 轴方向上的位置位于所分割的拍照范围 Zscan_1 的曝光起始位置 z_{start} 。

[0238] 接下来,载物台控制单元 31 和图像获取单元 32 同步运行,以拍摄用于调整焦点位置的荧光图像(步骤 503)。

[0239] 该步骤为初步拍照。拍摄用于调整焦点位置的荧光图像的方法是第一实施例中**【关于拍摄用于调整焦点位置的荧光图像的方法】**这一段落所述的方法。

[0240] 接下来,分布信息计算单元 33 分析所拍摄的用于调整焦点位置的荧光图像(步骤 504)。

[0241] 分析包括获取荧光图像的平均亮度的方法和获取亮度值为预先设置的阈值以上的亮点的数量的方法。

[0242] 此处,在获取亮点数量的方法中,可对比荧光图像的背景值亮的像素数量来进行计数,来代替对亮点数量进行计数。

[0243] 接下来,分布信息计算单元 33 确定在步骤 504 中获取的平均亮度或亮点的数量是否大于预先设置的阈值(步骤 505)。

[0244] 在将亮点数量与阈值相比较的情况下,阈值通常约为(例如) 100。

[0245] 在平均亮度或亮点的数量小于预先设置的阈值的情况下(步骤 505 中的“否”),分布信息计算单元 33 确定生物样本 SPL 中的细胞密度较低,并对各个亮点的轨迹进行第一实施例所述的图像匹配,以计算荧光标记的分布信息(步骤 506)。

[0246] 在平均亮度或亮点的数量大于预先设置的阈值的情况下(步骤 505 中的“是”),分布信息计算单元 33 确定生物样本 SPL 中的细胞密度较高,并对整个荧光图像进行组织分析,如第二实施例中将描述,从而计算荧光标记的分布信息(步骤 507)。

[0247] 如果在步骤 506 或 507 中获得了荧光标记的分布信息,接下来,载物台控制单元 31 在 z 轴方向移动载物台 11,以获得通过分布信息确定的最佳焦点位置(步骤 508)。

[0248] 接下来,图像获取单元 32 进行实际拍照(步骤 509)。

[0249] 通过实际拍照获取的荧光图像由观察者(例如,病理学家)进行分析,并用于诊断。

[0250] 接下来,数据处理单元 20 确定是否存在另一个拍照位置(步骤 510)。

[0251] 在还存在另一个拍照位置的情况下(步骤 510 中的“是”),过程返回到步骤 502 并继续。在不存在另一个拍照位置的情况下(步骤 510 中的“否”),过程完成。

[0252] 上文对本发明的整个过程的流程,包括初步拍照、根据第一实施例的分析、根据第二实施例的分析和实际拍照之间的关系进行了概述。

[0253] 【关于视为组织并进行分析的原理】

[0254] 现在将描述能够分析用于调整初步拍照中获取的焦点位置的整个荧光图像的原因。

[0255] 有两个原因,第一个原因是,由用于调整焦点位置的荧光图像中许多亮点的重叠轨迹压印成特有形状。

[0256] 在细胞密度较高的情况下,亮点数量较大,许多亮点轨迹在初步拍照中拍摄的荧光图像中重叠,因此难以确定散焦亮点轨迹的黑暗部分的图像。随后,仅可在图像中确定包括聚焦图像 60 的亮点轨迹的最亮部分。因此,虽然亮点轨迹最初为圆形或半圆形,但仅“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”以可确定形状压印在荧光图像中。在该实施例中,这是确定的原理。

[0257] 第二个原因是样本部分中作为分布有荧光标记 55 的范围的厚度和拍摄用于调整焦点位置的荧光图像时用于在 z 轴方向上移动焦点位置的范围的相对比率。

[0258] 荧光染色的样本部分的厚度约为 $4\mu\text{m}$ 至 $6\mu\text{m}$,荧光标记 55 的亮点仅分布在该厚度范围内。另一方面,拍摄用于调整焦点位置的荧光图像时焦点位置在 z 轴方向上移动的范围例如 $20\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ 。

[0259] 如上所述,焦点位置在 z 轴方向移动的范围比分布有荧光标记 55 的范围大几倍至十倍。在该比率较大的情况下,分布有荧光标记 55 的范围内的位置处于可变性相对较小的范围内。

[0260] 因此,“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”所显示的角 θ 的可变性被认为是较小的。因此,通过将荧光图像作为组织进行分析,并获取“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”显示的角 θ 的平均值,可获得荧光标记 55 在 z 轴方向上的平均高度,即,在聚焦了许多亮点的 z 轴方向上的位置。

[0261] 上文已经描述了关于将荧光图像视为组织并对组织进行分析的原理。

[0262] 【通过组织分析获取角 θ 的方法(第一)】

[0263] 下文将对通过组织分析获取角 θ 的第一方法进行说明。

[0264] 在该方法中,确定用于针对荧光图像获取频率分量以调整初步拍照中获取的焦点位置的多个方向。随后,获取确定方向上的频率分量,并且确定最大频率分量最高的方向上的角 θ 。

[0265] 图 19 为其中 x 轴方向为荧光图像的水平方向, y 轴方向为荧光图像的垂直方向,相对于 x 和 y 轴方向倾斜 45 度的方向 A 确定为获得频率分量的方向的示意图。如上所述,获取频率分量的方向数量优选为三个以上。获取频率分量的方向数量取决于靶角(target angle) θ 的精确性。

[0266] 其原因在于,在两个方向的情况下,“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的方向难以被唯一地确定。例如,如图 20 所示,考虑“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”出现在图案 A 的方向和图案 B 的方向的情况。为了区分两个方向并确定正确方向, x 轴方向和 y 轴方向这两个方向是不够的。

[0267] 通过获取荧光图像(在如上所述确定的方向上包括许多“亮点轨迹最亮并且几乎

为直线的部分 BL”)的频率分量,可确定“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的许多倾斜角集中在哪个方向。这是因为,垂直穿过“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的方向是最大频率分量最高的方向。

[0268] 例如,与图 9 中的 Zscan_2 的情况所示的荧光标记 55a 的亮点轨迹的情况相似,假定曝光起始位置 z_{start} 处的角为 0 度,曝光结束位置 z_{end} 处的角为 180 度,并且聚焦图像 60 位于 135 度角处。

[0269] 这种情况下,“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的斜率与圆圈 0 中聚焦图像 60 的位置上的切线的斜率相同,即,45 度。随后,垂直穿过“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的方向(即,最大频率分量最高的方向)为方向 A (-45 度方向)。可以看出,根据曝光起始位置 z_{start} 为 0 度并且曝光结束位置 z_{end} 为 180 度的关系,角 θ 约为 135 度。

[0270] 上文已经对通过组织分析来获取角 θ 的第一方法进行了说明。

[0271] 【通过分析组织获取角 θ 的方法(第二)】

[0272] 下文将对通过分析组织来获取角 θ 的第二方法进行说明。

[0273] 在该方法中,将用于调整初步拍照中获取的焦点位置的荧光图像 70 用作原始图像,针对多个方向,生成将原始图像向预定方向位移预定数量的像素而获取的图像。随后,获取生成的多个图像与原始图像之间的相关性。相关性最低的图像的方向被视为垂直穿过“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的方向,由此确定角 θ 。

[0274] 图 21A 至 21E 分别为示出了原始图像和通过将原始图像向预定方向位移预定数量的像素而获得的图像之间的相关性被获得的状态的示意图。现在将根据附图对第二方法进行说明。

[0275] (1) 首先,分布信息计算单元 33 获取用于调整焦点位置的荧光图像 70 作为原始图像。

[0276] 原始图像如图 21 的左上部所示,在图像中拍摄了两个“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”。应注意的是,由于该实施例中假定生物样本 SPL 的细胞密度较高的情况,实际上在原始图像中拍摄了 100 个以上的“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”。但是,仅显示了两个“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”,以使图 21 更为清楚。

[0277] (2) 接下来,分布信息计算单元 33 生成通过使原始图像在多个方向上位移预定数量的像素而获取的图像。

[0278] 图 21A 至 21E 分别示出了将原始图像在作为多个方向的五个方向上以在 0 至 180 度的范围内位移每 45 度的状态。在图 21A 至 21E 中,虚线表示的位置为原始图像位移前“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的位置。原始图像位移的角度和方向取决于靶角 θ 的精度。

[0279] 应注意的是,在“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的宽度为(例如)10 像素的情况下,图像位移的预定像素数量通常约为 15 个像素。

[0280] (3) 接下来,分布信息计算单元 33 计算原始图像与将原始图像位移预定数量的像素而获取的图像之间的相关性。

[0281] 相关性计算方法的示例包括比较原始图像与位移图像之间每个像素的差别。该方法用于图 21A 至 21E 中的图像。在图 21A 和 21E 所示的图像中,“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”与通过位移“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”而获取的图像 BL’

之间的重叠较大,差别较小。特别地,相关性较高。

[0282] 另一方面,在图 21C 的图像中,“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”与通过使“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”移动而获取的图像 BL’ 之间几乎没有重叠,并且差别最大。特别地,相关性最低。

[0283] (4) 最后,分布信息计算单元 33 将相关性最低的图像的方向确定为垂直穿过“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的方向,并获取角 θ 。

[0284] 在图 21C 的图像中,由于原始图像向下位移,可以看出,90 度或 270 度的角度方向是垂直穿过“亮点轨迹最亮并且几乎为直线的部分 BL”的方向。因此,如果曝光起始位置 z_{start} 处的角为 0 度,曝光结束位置 z_{end} 处的角为 180 度,则角 θ 约为 90 度。

[0285] 上文对通过分析组织来获取角 θ 的第二方法进行了说明。

[0286] 【补充说明】

[0287] 本发明的实施例并不限于上述实施例,在不背离本发明的主旨的前提下,可进行各种修改。

[0288] 本领域的技术人员应理解的是,可以根据设计要求和因素进行各种修改、组合、子组合以及替换,只要它们在所附权利要求或其等同物的范围内即可。

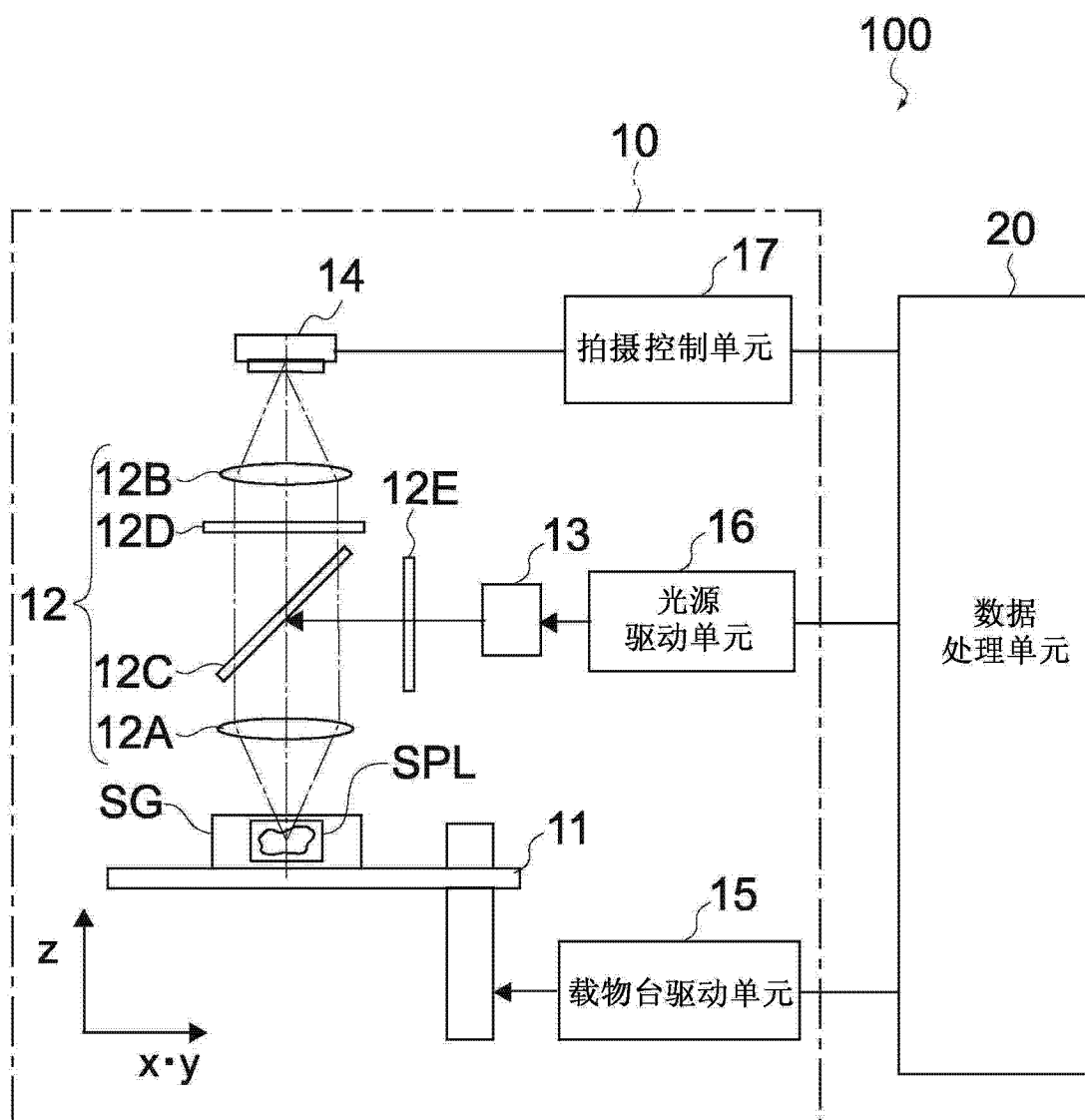


图 1

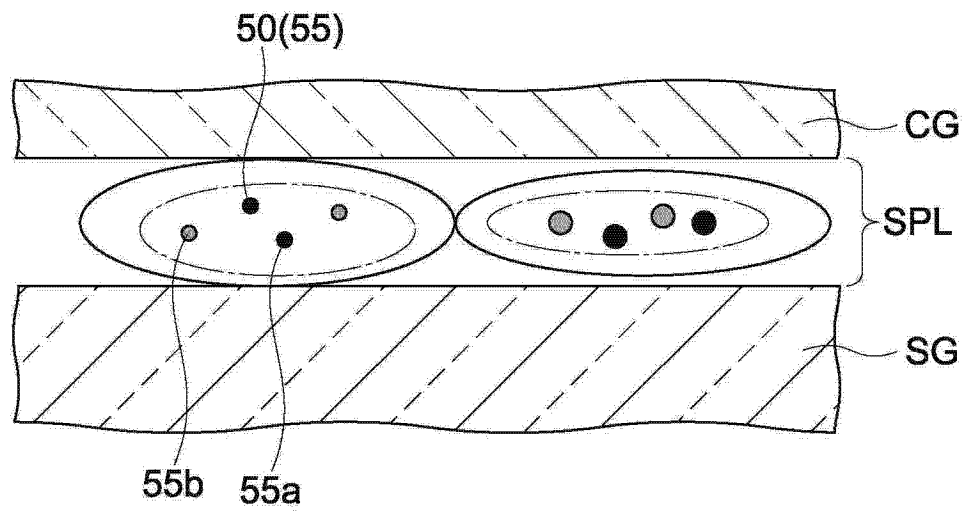


图 2

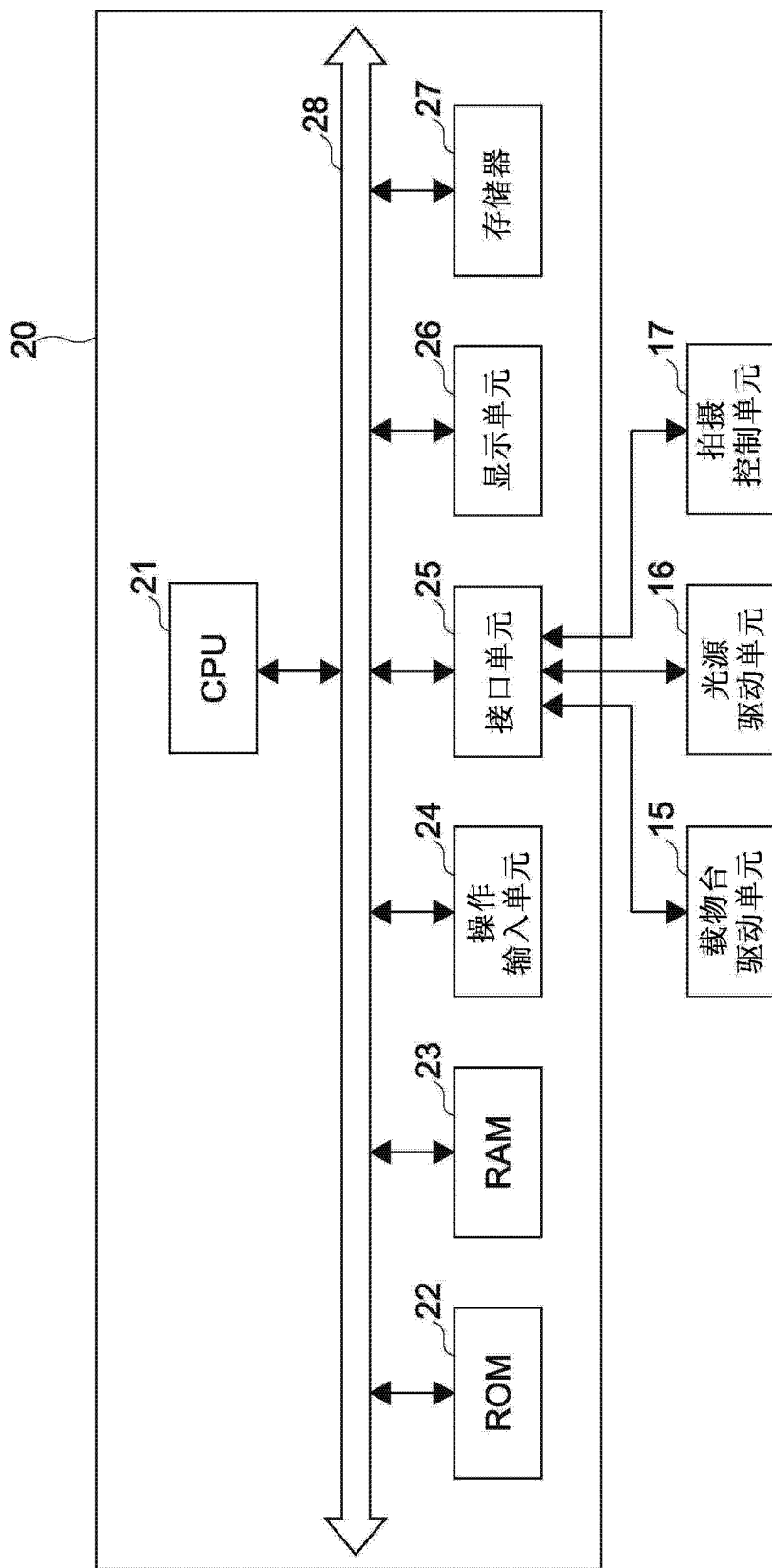


图 3

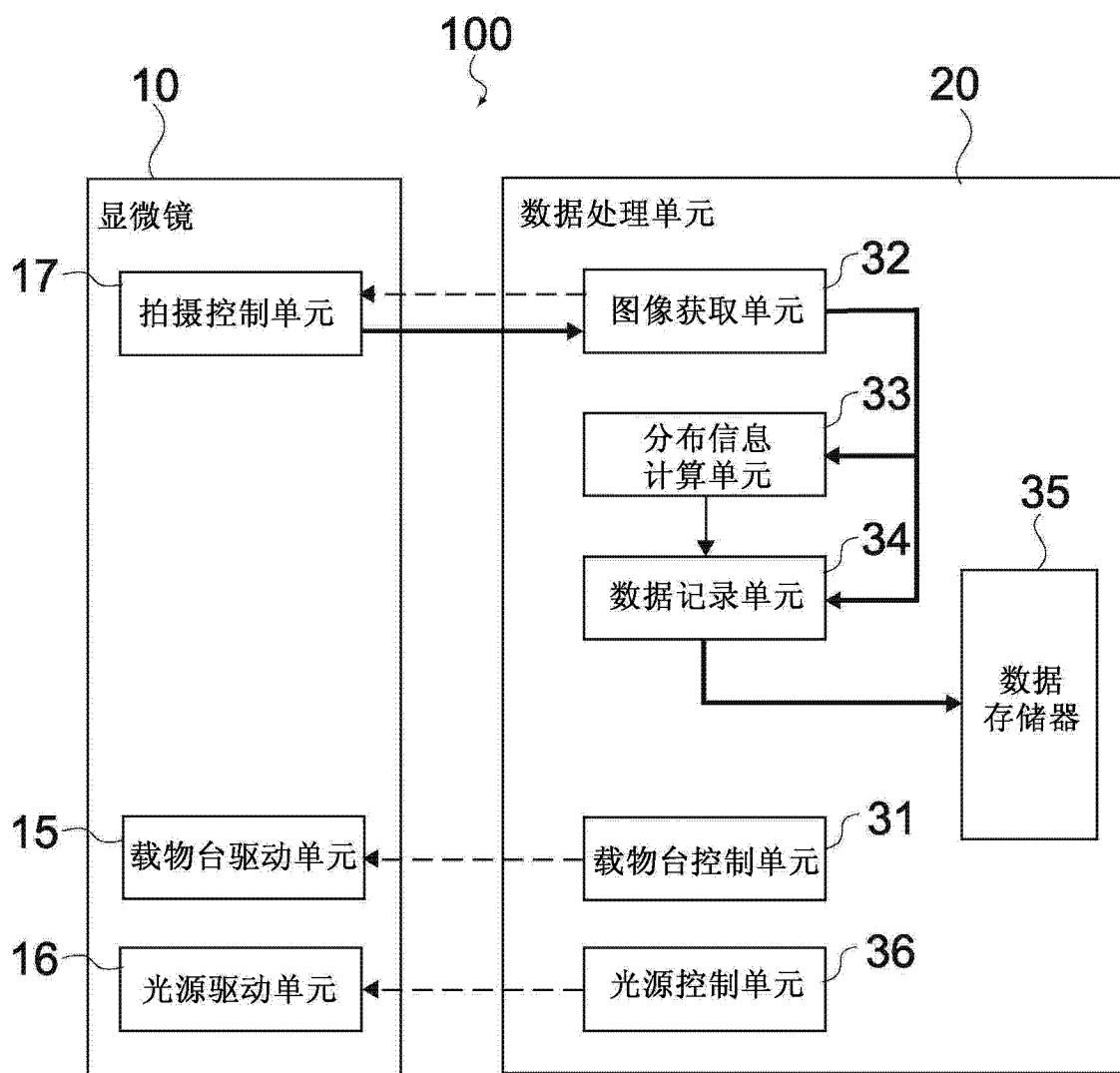


图 4

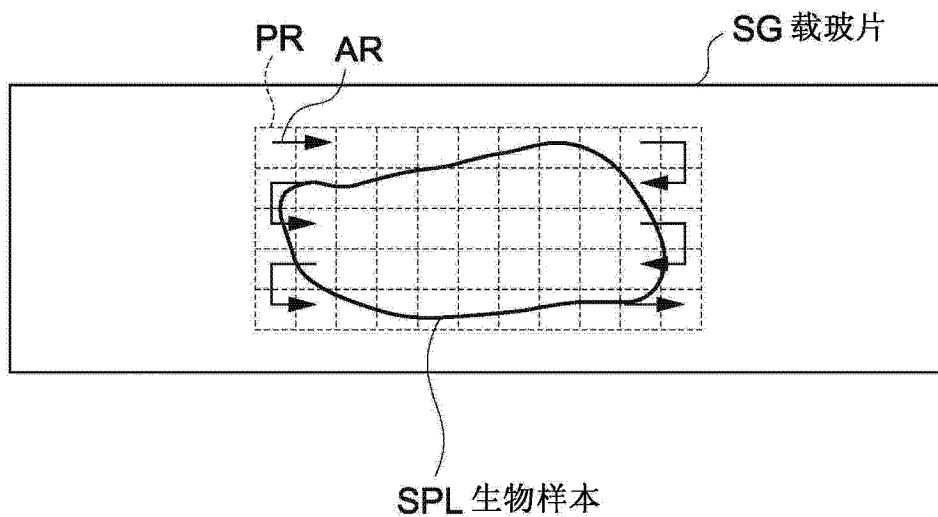


图 5

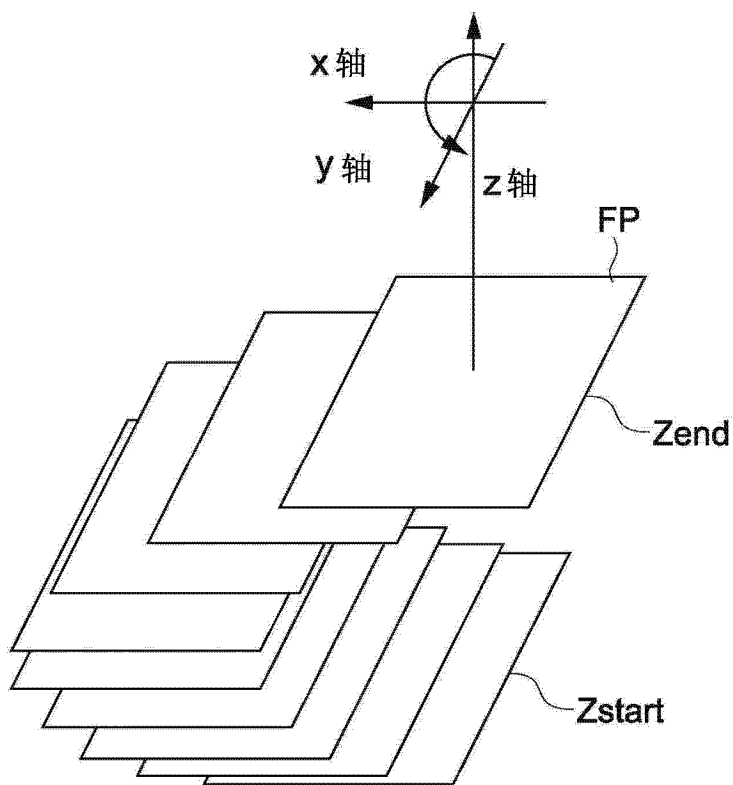


图 6A

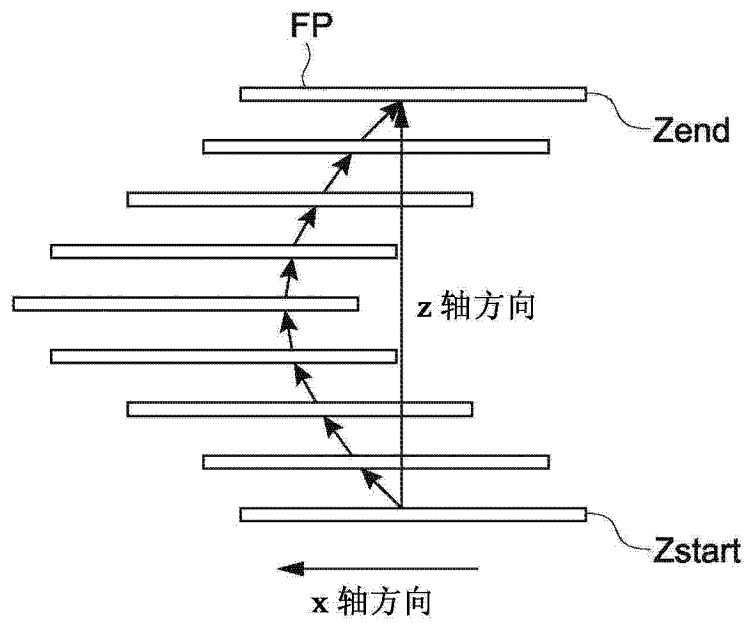


图 6B

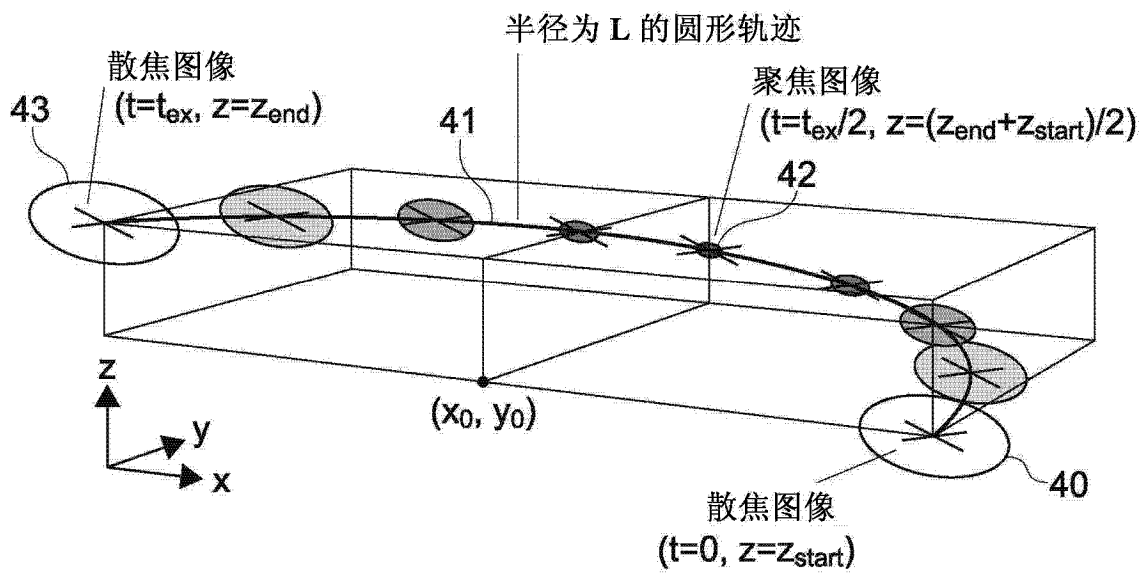


图 7

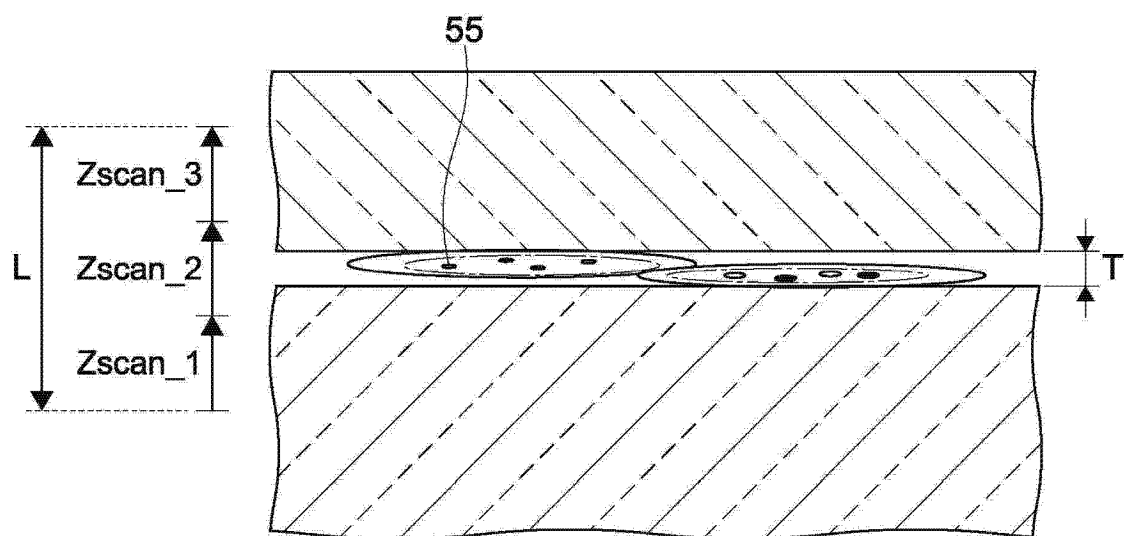


图 8A

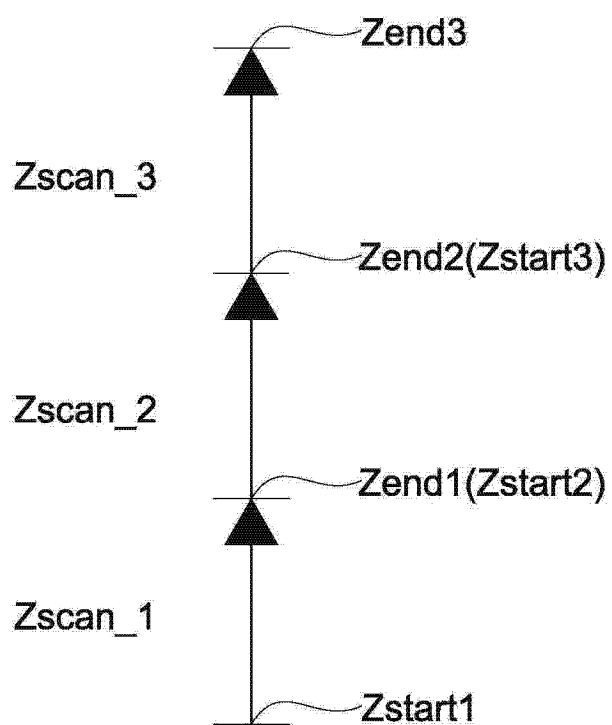


图 8B

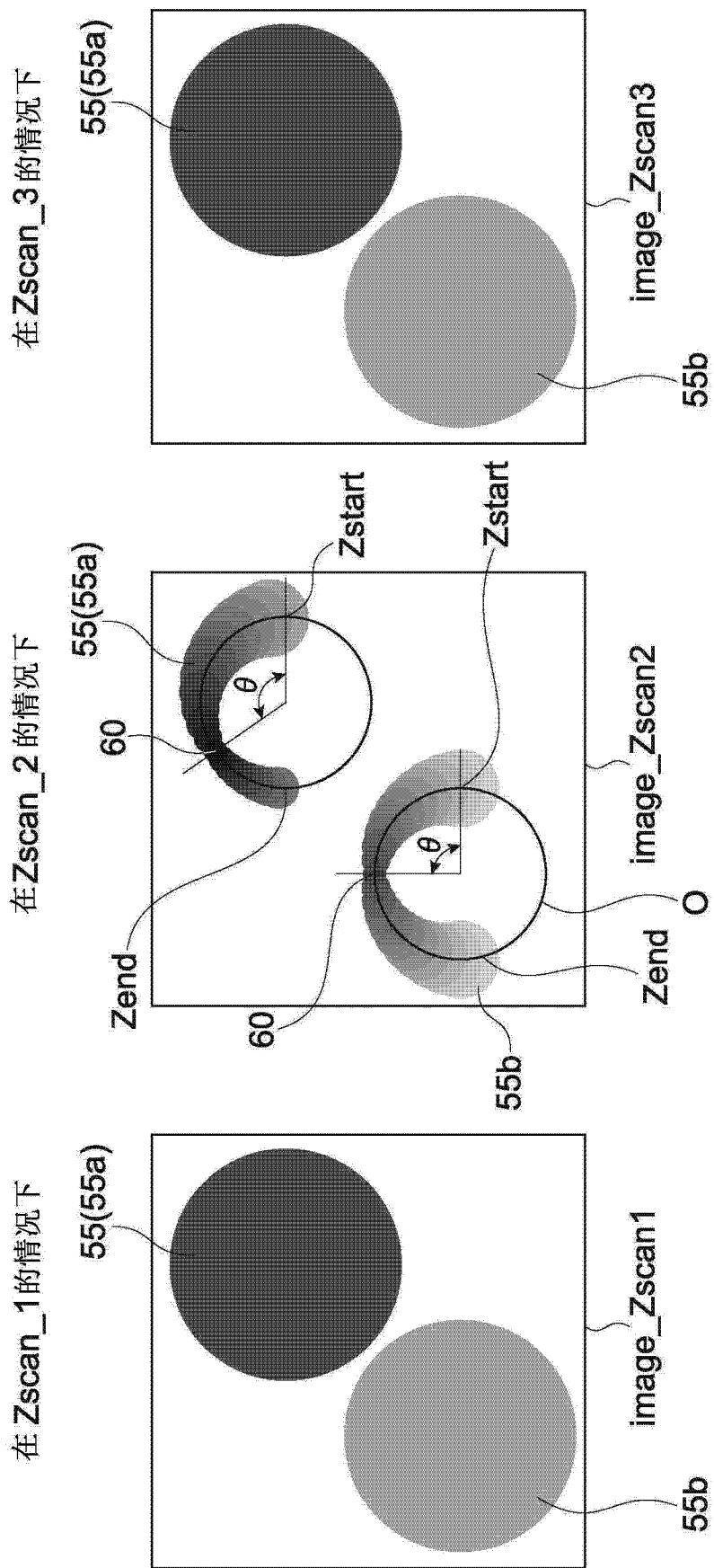


图 9

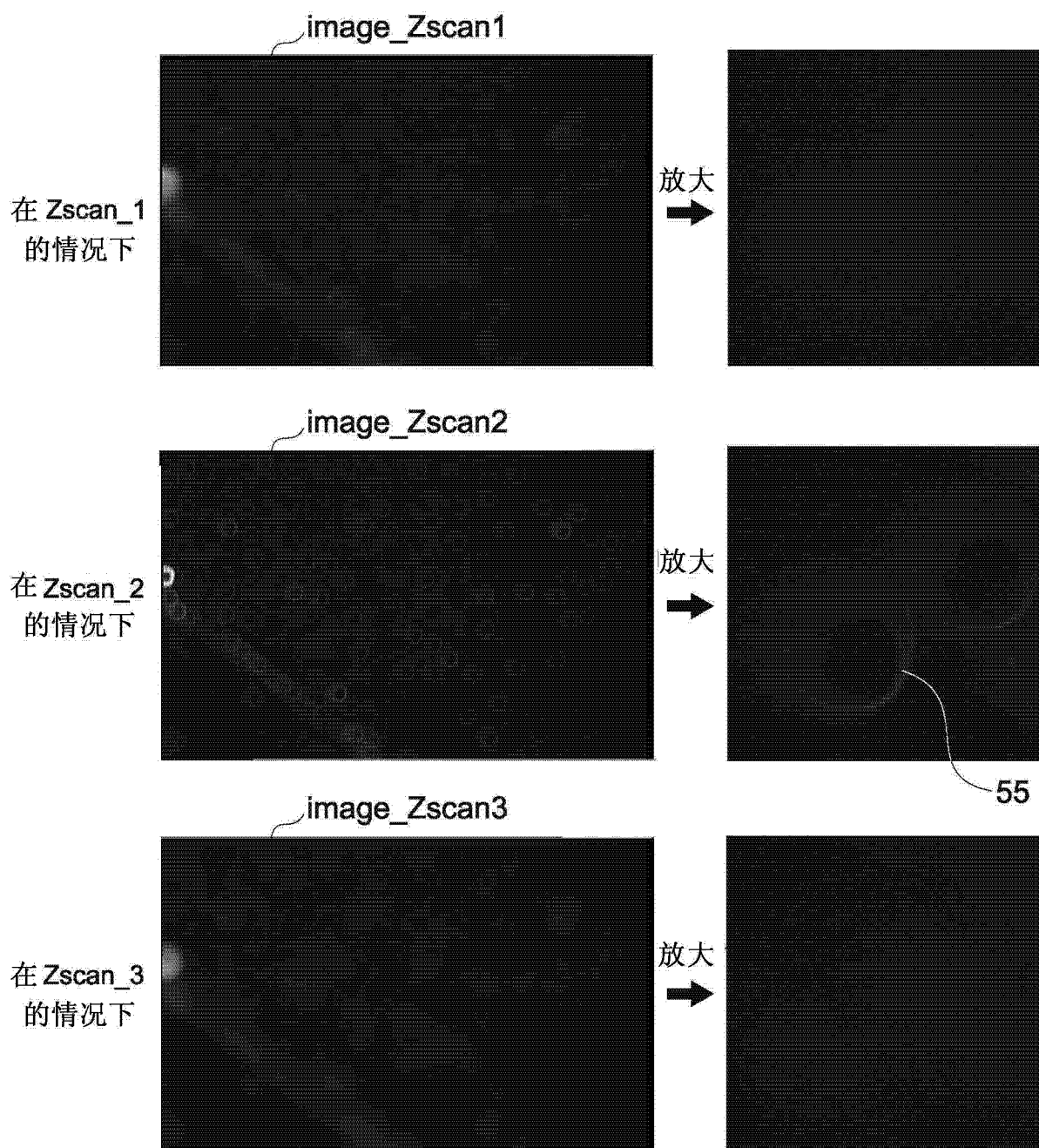


图 10

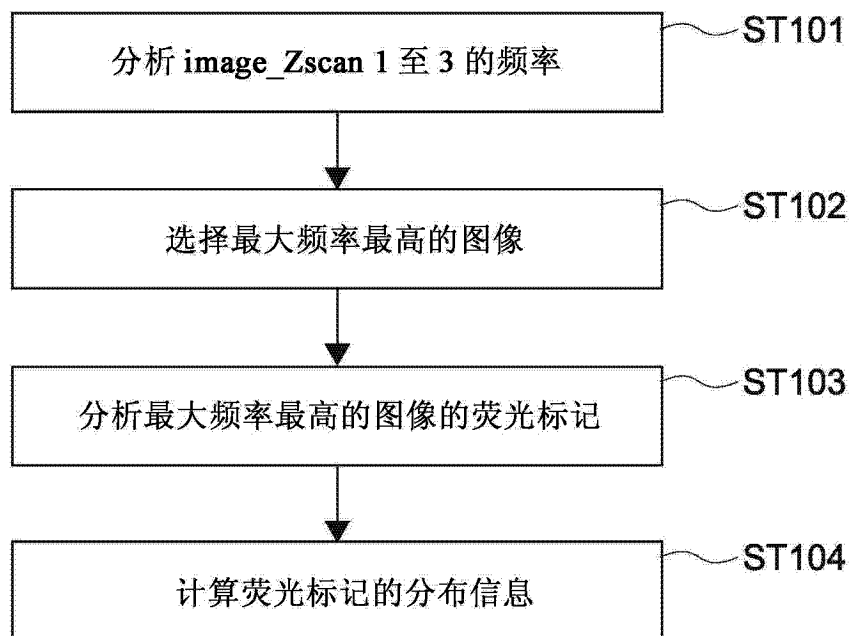


图 11

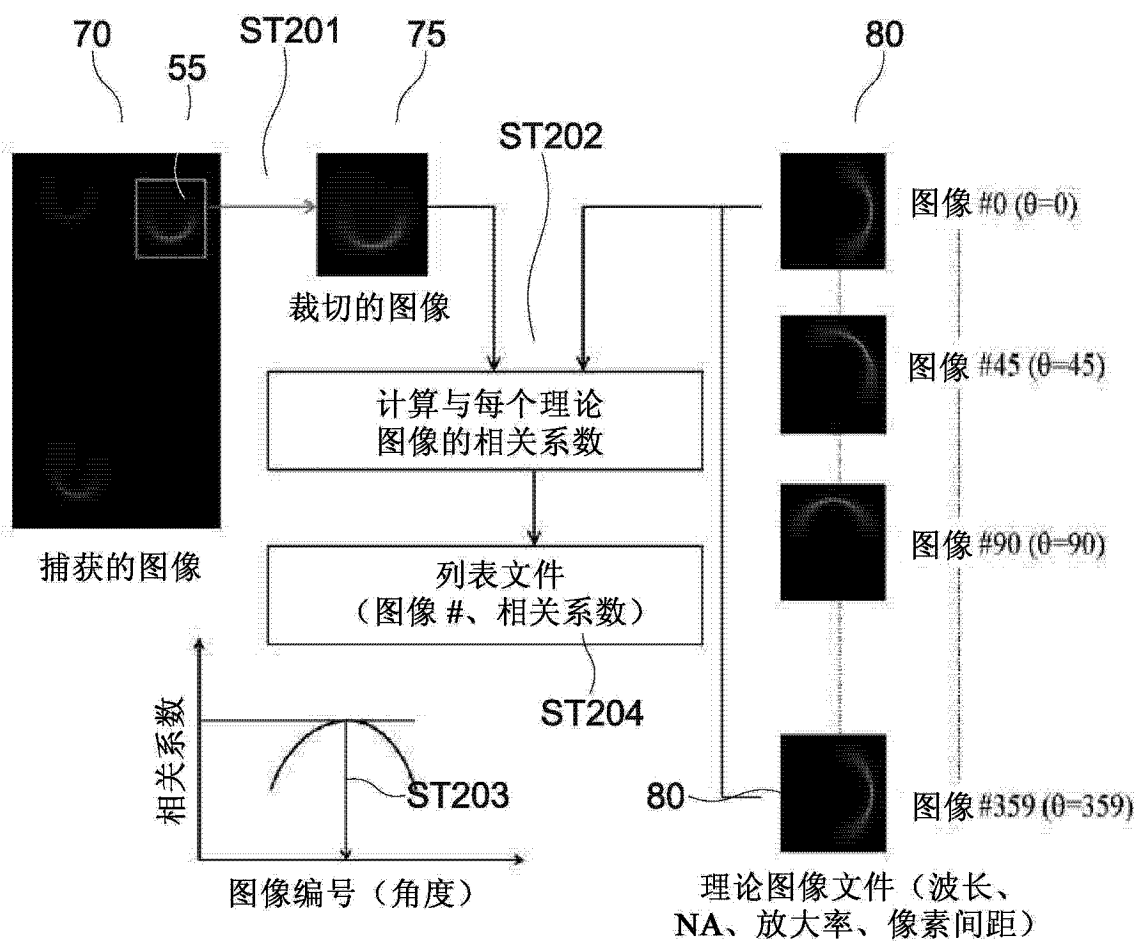


图 12

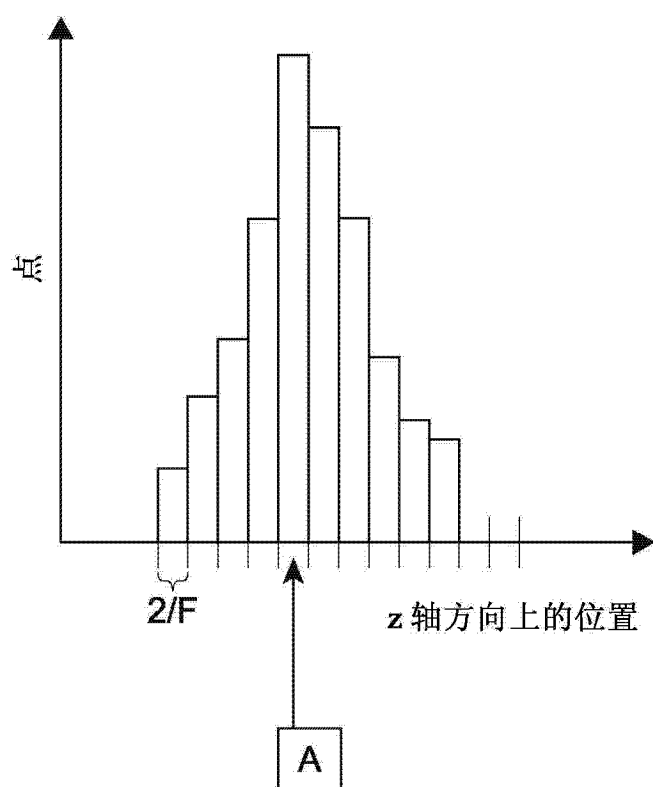


图 13

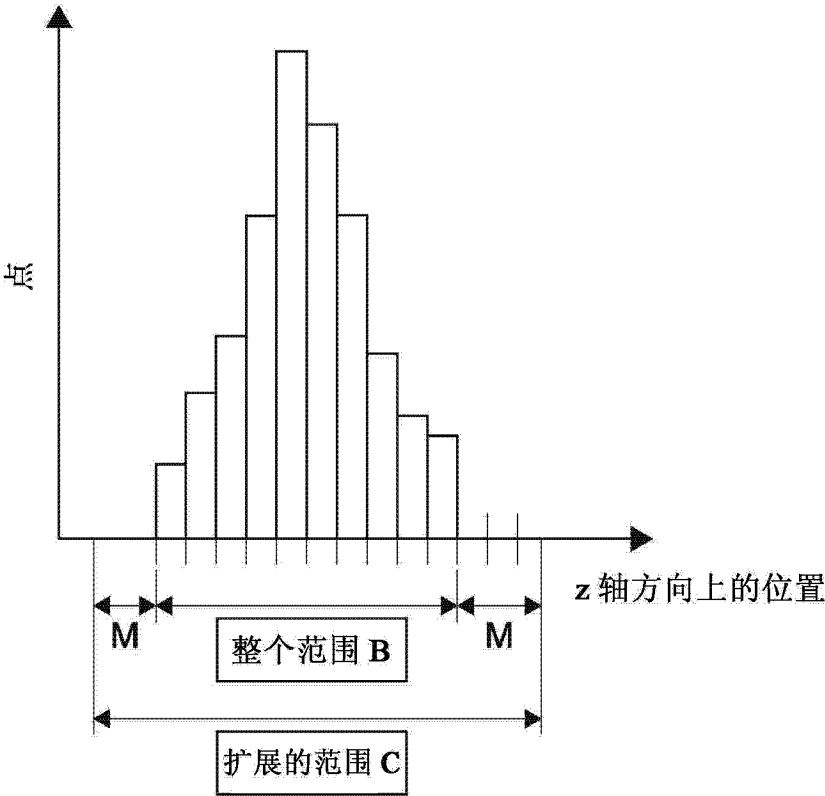


图 14

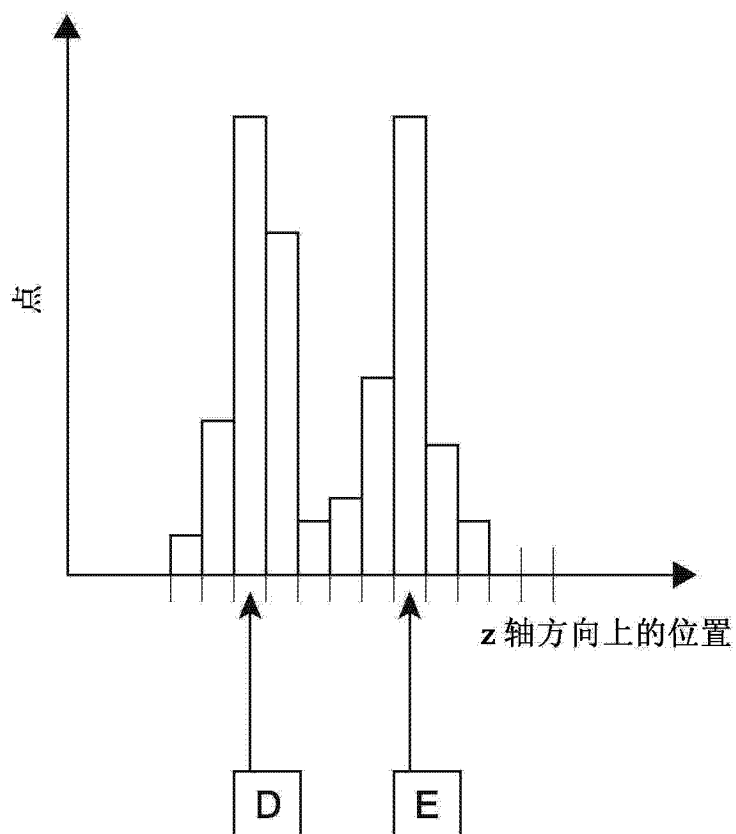


图 15

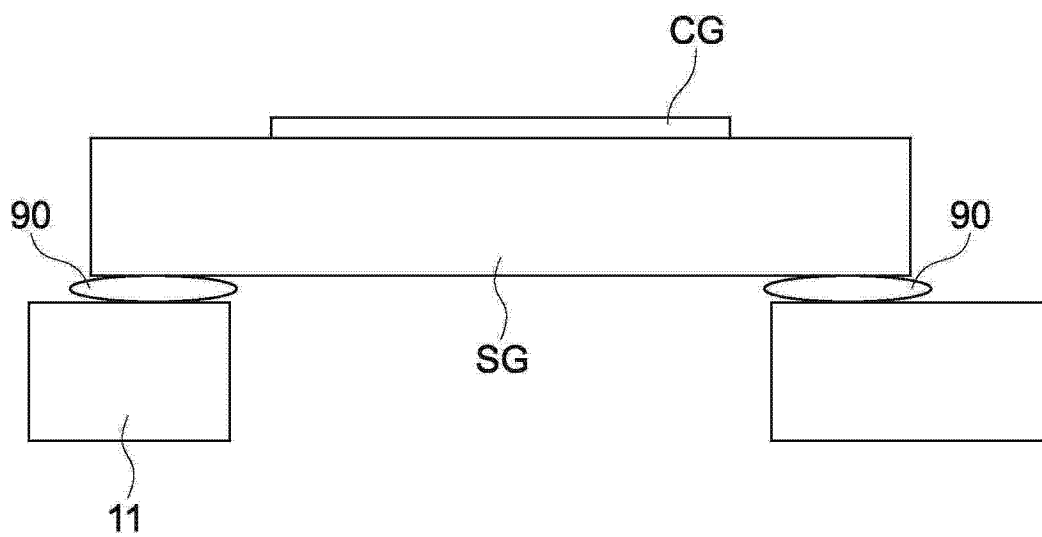


图 16

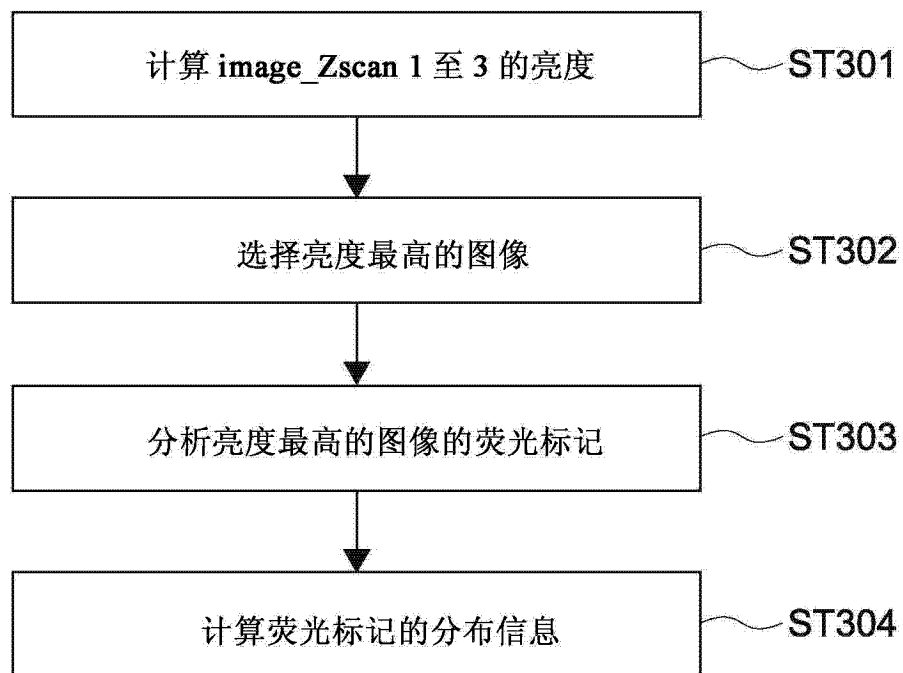


图 17

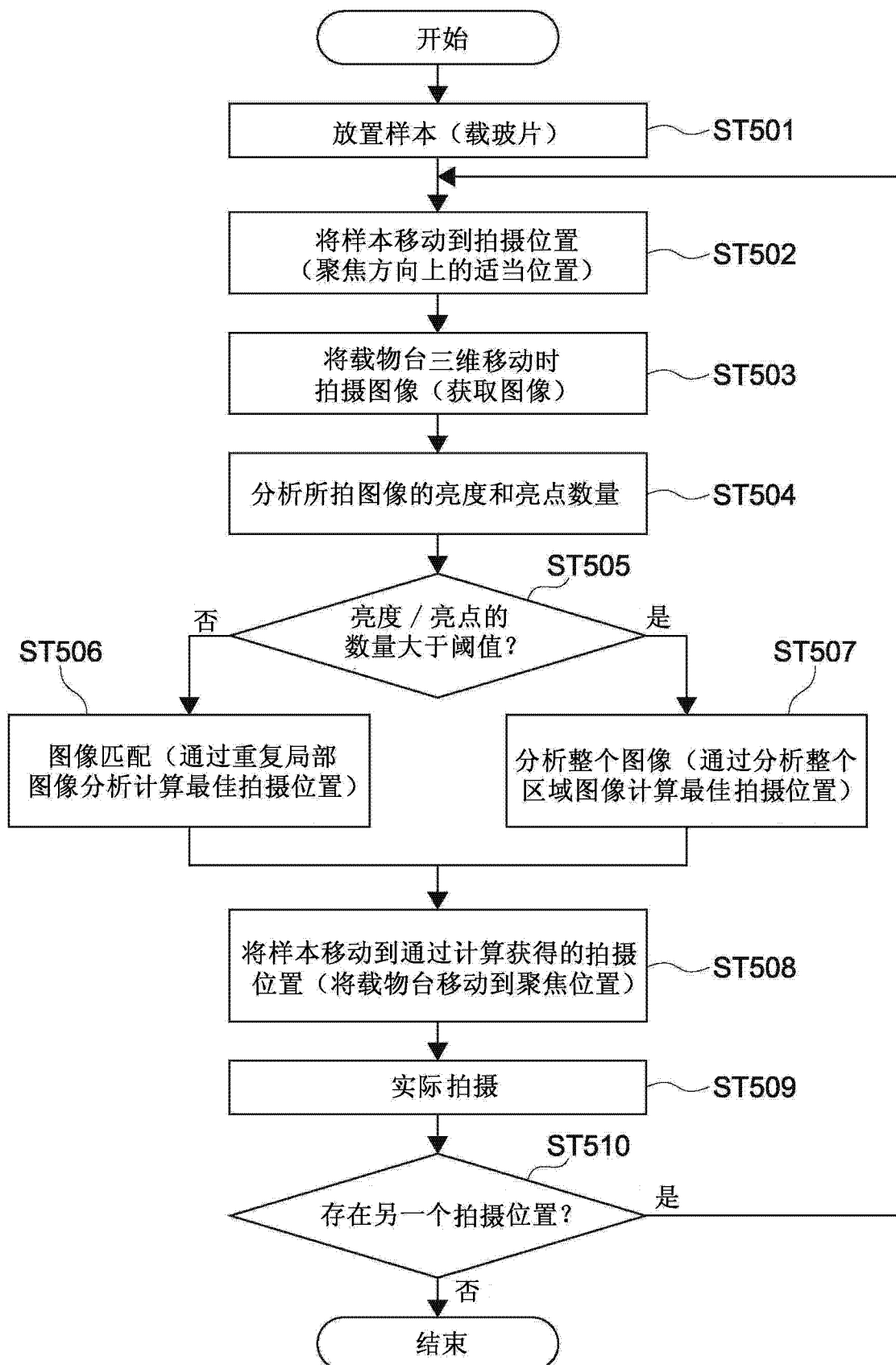


图 18

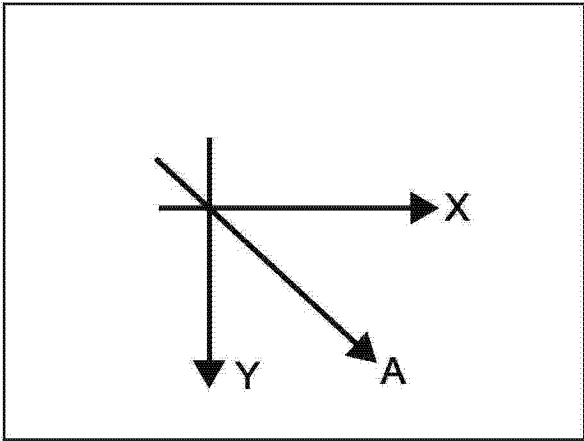


图 19

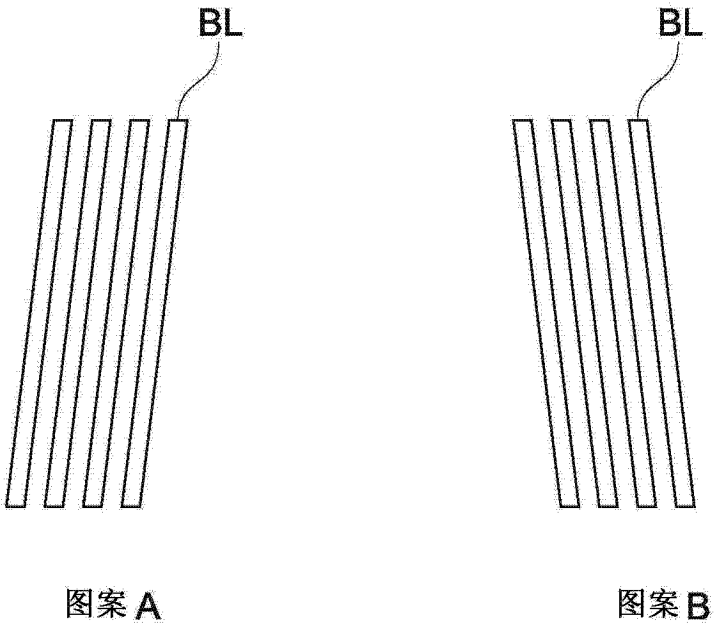


图 20

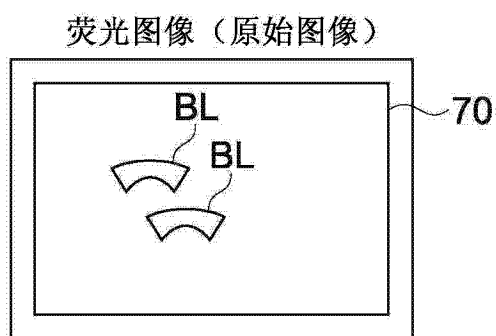


图 21

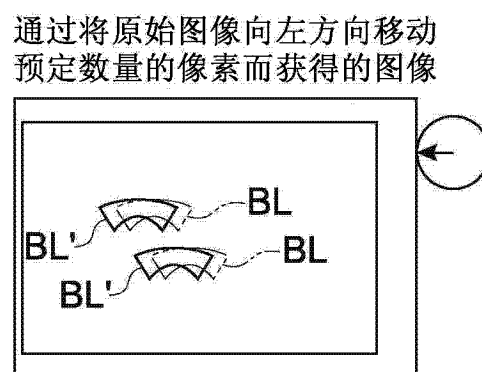


图 21A

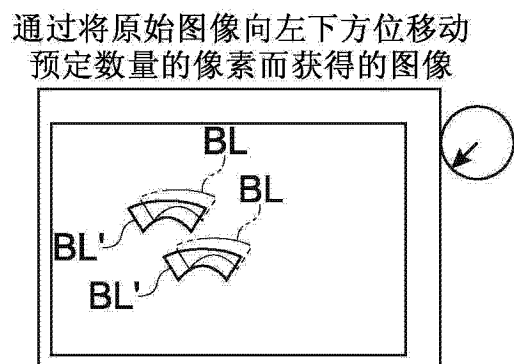


图 21B

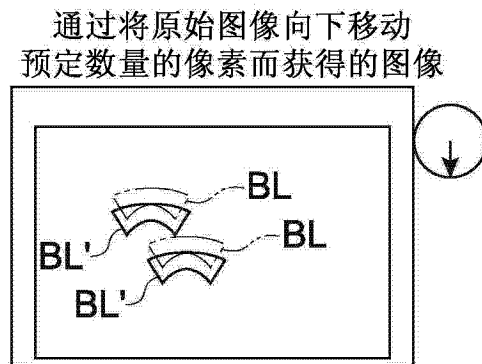


图 21C

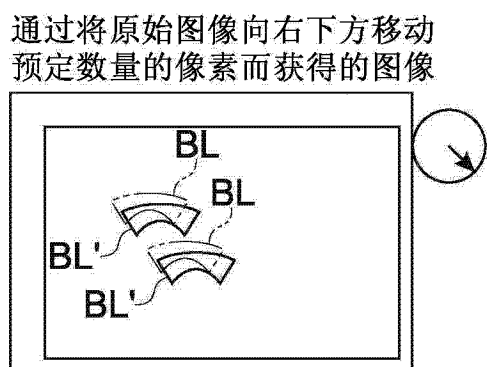


图 21D

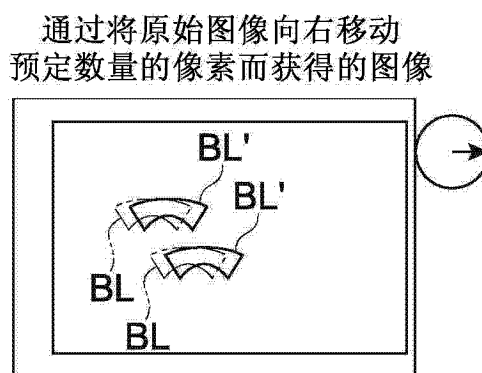


图 21E