

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5199407号  
(P5199407)

(45) 発行日 平成25年5月15日(2013.5.15)

(24) 登録日 平成25年2月15日(2013.2.15)

(51) Int.Cl.

F 1

GO2B 21/00	(2006.01)	GO2B 21/00
GO2B 7/28	(2006.01)	GO2B 7/11
GO2B 7/34	(2006.01)	GO2B 7/11

J

C

請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2011-21738 (P2011-21738)
(22) 出願日	平成23年2月3日(2011.2.3)
(62) 分割の表示	特願2004-202040 (P2004-202040) の分割 原出願日 平成16年7月8日(2004.7.8)
(65) 公開番号	特開2011-123518 (P2011-123518A)
(43) 公開日	平成23年6月23日(2011.6.23)
審査請求日	平成23年2月3日(2011.2.3)
(31) 優先権主張番号	特願2003-338489 (P2003-338489)
(32) 優先日	平成15年9月29日(2003.9.29)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)

(73) 特許権者	000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
(72) 発明者	米山 貴 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ リンパス株式会社内
(72) 発明者	土屋 敦宏 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ リンパス株式会社内
審査官	荒井 良子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】顕微鏡システム及び観察方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

透明体と該透明体上に載置された観察体とからなる観察試料を載せるステージと、  
該ステージに載せられた前記観察試料と対峙するように前記ステージより下方に配置される対物レンズと、  
前記ステージと前記対物レンズのうち少なくとも一方を観察光軸と平行方向に駆動させる焦準駆動部と、

前記試料を照明するための観察用光源と、

前記対物レンズを介して前記観察試料の撮影を行う撮像装置と、

前記観察光源とは異なる光源で、前記対物レンズの下方から前記観察試料に対してオートフォーカス用の検出光を出射する焦点検出光源と、  
10

前記観察試料における前記透明体から反射した前記検出光を対物レンズを介して受光する受光手段と、

前記受光手段の結果から前記焦準駆動部を制御することで前記透明部材の所定の位置にオートフォーカスをすることが可能なオートフォーカス部と、

前記所定の位置から一定量離れた前記観察体の撮影領域を設定する撮影条件設定部と、

前記撮影手段の間欠撮影時間間隔であるタイムラップス測定時間間隔を設定するタイムラップス測定時間間隔設定部と、を備え、

前記タイムラップス測定時間間隔毎に前記オートフォーカス部により前記透明部材から前記焦点検出光が反射される位置である前記所定の位置に対してオートフォーカスを行い、

10

20

前記所定の位置へのオートフォーカス終了後、前記撮影領域で少なくとも2枚の焦点位置が異なる前記観察試体の画像を撮影することを特徴とする顕微鏡システム。

【請求項2】

観察光軸と垂直にステージを駆動制御するX-Yステージ駆動部を更に備えており、前記一定量は、X-Yステージ駆動部により予め位置決めされたステージX-Yアドレス毎に設定されることを特徴する請求項1に記載の顕微鏡システム。

【請求項3】

前記撮影条件設定部は、前記所定の位置を基準とした前記焦準駆動部のピッチ又は撮影枚数のうち少なくとも何れか1つを設定することを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の顕微鏡システム。

10

【請求項4】

前記観察光源は、前記観察試料の蛍光を励起する蛍光観察用励起光源であることを特徴とする請求項1から請求項3のうち何れか1項に記載の顕微鏡システム。

【請求項5】

前記撮影条件設定部は、前記タイムラップス測定時間間隔毎に前記撮影領域を前記所定の位置を基準にして設定していることを特徴とする請求項1から請求項4のうち何れか1項に記載の顕微鏡システム。

【請求項6】

前記撮影条件設定部は、前記タイムラップス測定時間間隔毎に前記撮影領域を前記所定の位置から一定量オフセットした位置を基準にして設定していることを特徴とする請求項1から請求項4のうち何れか1項に記載の顕微鏡システム。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、顕微鏡を用いて標本を自動検査・自動画像記録を行う装置等に利用される顕微鏡オートフォーカス装置を含む顕微鏡システムに関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、顕微鏡を用いた検査装置は、各種機能面の自動化が進んでおり、標本にピント合わせを行うオートフォーカス機能も自動化項目の必須機能となっている。

30

【0003】

スライドガラスに封入された標本に対する検査装置にも顕微鏡オートフォーカスが採用されており、例えば特開昭58-83906号公報では標本を封入するスライドガラスやカバーガラスに赤外線反射膜を施し、その膜に対してピント合わせを行う方法が記載されている。また、特開平8-82747号公報では特に赤外線反射膜の構成に関する記載がされている。さらに特開2001-91821号公報では、同じくスライドガラスやカバーガラスにアクティブAF方式によりピント合わせをした後、パッシブAF方式を用いて、標本に正確にピント合わせを行う方法が記載されている。

【特許文献1】特開昭58-83906号公報

【特許文献2】特開平8-82747号公報

40

【特許文献3】特開2001-91821号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記のようなオートフォーカスシステムを、高倍率の対物レンズを用いて標本内の対象物の動きを長時間にわたり解析する場合には、以下のような問題が生じる。

【0005】

図13Aは、赤外線反射膜を施したスライドガラス上にその内部にいくつかの核をもつような標本を載せ、その核のうち、注目する1つの核の観察を行う場合のモデル図である。

50

〔 0 0 0 6 〕

図13Aに示されるように、スライドガラス201の上には赤外線反射膜202が設けられており、赤外線反射膜202の上には標本である細胞203が載せられている。細胞203は、検査対象である核204を含んでいる。図13Aにおいて、網目で示された核204は、着目する核であることを表現している。

【 0 0 0 7 】

特開昭58-63906号公報、特開平8-82747号公報で記載されている方法では、図13Aに一点鎖線で示される赤外線反射膜にピントを合わせるため、図13Aで示される着目する核が、図13Aに二点鎖線で示される焦点深度領域外となるため、観察することができない可能性が生じる。

10

【 0 0 0 8 】

また、特開2001-91821号公報で記載されているパッシブAFを用いた方法では、図13Bにおいて破線で示される核204が実線で示されるように動くと、コントラスト最大の位置が破線の位置から例えば一点鎖線の位置に動いてしまうため、着目する核の動きを観察することができない可能性がある。

〔 0 0 0 9 〕

さらに、蛍光観察のように照射する励起光により、発光する標本の部位が、例えば図13Cに示される部位205と部位206のように、異なる場合には、励起光毎に着目する位置が変化することになる。

【 0 0 1 0 】

上記のようなオートフォーカスシステムを用いない場合には、観察はさらに困難となり、例えば対物レンズの周囲温度が変化して対物レンズ自体の温度変化が発生し、それによる焦点位置ずれなどにより焦準部を固定していてもピントずれを生じてしまう。

20

【 0 0 1 1 】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、その目的は、長時間観察解析において標本の動きを確実に測定することが可能な顕微鏡システムを提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

本発明の顕微鏡システムは、透明体と該透明体上に載置された観察体とからなる観察試料を載せるステージと、該ステージに載せられた前記観察試料と対峙するように前記ステージより下方に配置される対物レンズと、前記ステージと前記対物レンズのうち少なくとも一方を観察光軸と平行方向に駆動させる焦準駆動部と、前記試料を照明するための観察用光源と、前記対物レンズを介して前記観察試料の撮影を行う撮像装置と、前記観察光源とは異なる光源で、前記対物レンズの下方から前記観察試料に対してオートフォーカス用の検出光を出射する焦点検出光源と、前記観察試料における前記透明体から反射した前記検出光を対物レンズを介して受光する受光手段と、前記受光手段の結果から前記焦準駆動部を制御することで前記透明部材の所定の位置にオートフォーカスをすることが可能なオートフォーカス部と、前記所定の位置から一定量離れた前記観察体の撮影領域を設定する撮影条件設定部と、前記撮影手段の間欠撮影時間間隔であるタイムラップス測定時間間隔を設定するタイムラップス測定時間間隔設定部と、を備え、前記タイムラップス測定時間間隔毎に前記オートフォーカス部により前記透明部材から前記焦点検出光が反射される位置である前記所定の位置に対してオートフォーカスを行い、前記所定の位置へのオートフォーカス終了後、前記撮影領域で少なくとも2枚の焦点位置が異なる前記観察試体の画像を撮影することを特徴とする。

30

## 【発明の効果】

〔 0 0 1 3 〕

本発明によれば、長時間観察解析において標本の動きを確実に測定することが可能な顕微鏡システムが提供される。

50

**【発明を実施するための最良の形態】****【0014】**

以下、図面を参照しながら本発明の実施形態について説明する。

**【0015】****第一実施形態**

本実施形態は、正立型顕微鏡を含む顕微鏡システムに向けられている。図1は、本発明の第一実施形態の顕微鏡システムの構成を示している。図1に示されるように、本実施形態の顕微鏡システム100は、観察試料102を積載するステージ101と、ステージ101に載置された観察試料102と対峙するように配置される対物レンズ109とを備えている。

10

**【0016】**

対物レンズ109はレボルバ108に装着されている。レボルバ108は電動駆動可能であり、図示しないレボルバ駆動制御部によりレボルバ108の回転を制御することにより、所望の倍率の対物レンズ109を光路中に配置させることができとなっている。

**【0017】**

ステージ101はX-Y-Z方向の位置が電動制御可能であり、顕微鏡システム100は、ステージ101のX-Y方向の位置を制御するステージX-Y制御部115と、ステージ101のZ方向の位置を制御するステージZ駆動制御部116とを備えている。ステージZ駆動制御部116は、ステージと対物レンズの少なくとも一方を焦準のために駆動する焦準駆動部を構成している。

20

**【0018】**

観察試料102は、例えば、図2Aに示されるように、スライドガラス102Aと、カバーガラス102Bと、それらの間に封入された観察体とからなる。観察体は例えば標本(例えば細胞)と培養液とからなる。従って、観察体はスライドガラス102Aとカバーガラス102Bの間に位置し、対物レンズ109はカバーガラス102Aの上方に位置している。

**【0019】**

図1に戻り、顕微鏡システム100は、公知の顕微鏡用アクティブ型のオートフォーカスユニット118を備えている。オートフォーカスユニット118は、いわゆるTTL(Through The Lens)方式により焦準駆動部すなわちステージZ駆動制御部116を制御する。つまり、オートフォーカスユニット118は、公知の技術により、対物レンズ109を含む観察光学系のピント位置を、対物レンズ109を介して光学的に検出し、その情報をステージZ駆動制御部116に送る。ステージZ駆動制御部116は、オートフォーカスユニット118からの情報に従って、観察試料102をピント位置へ移動させる。

30

**【0020】**

さらに、顕微鏡システム100は、観察試料102を透過照明するための光源103または蛍光照明を行うための光源103'を備えている。透過観察では、光源103からの照明光は、減光するためのNDフィルタ104、視野絞り(FS)105、開口絞り(AS)を内蔵したコンデンサ106を介して観察試料102に照射される。一方、蛍光観察では、光源103'からの照明光は、蛍光キューブ107により、折り返され観察試料102に励起光として照射される。各光学素子は、図示しないそれぞれの駆動制御部により、光学素子変換が電動で行えるようになっている。これにより、光源103'と蛍光キューブ107を含む蛍光観察用の照明光学系は、波長の異なる励起光を選択的に照射し得る。言い換えれば、蛍光観察用の照明光学系は、励起光を選択可能となっている。

40

**【0021】**

観察試料102からの透過照明像または蛍光像は、対物レンズ109を通過して、鏡筒110により、その一部が接眼レンズ111に導かれ、その他の光束はTVカメラ112に入射する。

**【0022】**

顕微鏡の制御は、ホストPC113から顕微鏡コントローラ114を介して行われ、顕

50

微鏡コントローラ 114 は電動制御部位に対して、それぞれの制御部を介して実際の駆動制御を行う。

【0023】

光源 103 および ND、AS、FS は、図示しないそれぞれの制御部により、顕微鏡コントローラ 114 から制御可能となっており、光源電圧や絞り径などが制御される。

【0024】

一方、TV カメラ 112 によって撮像された観察試料 102 の画像は、ビデオキャプチャボード 117 によりホスト PC 113 に取得される。ホスト PC 113 は、取得した画像を図示しない画像メモリに複数の画像を保存することが可能となっている。

【0025】

図 2A は、標本の動きを長時間観察するいわゆるタイムラプスのモデルである。図 2A は、スライドガラス 102A とカバーガラス 102B に封入された観察体中の標本（または標本中の核などの特定部位）が時間をかけて位置 A から位置 B へ移動することを示している。観察は、一点鎖線で示された図 2A 中の撮影領域中心位置から所定量だけステージを Z 方向に駆動し、撮影領域上限から撮影領域下限まで、二点鎖線で示された位置で撮影を設定された間欠時間毎に行われる。

【0026】

上記の条件により撮影時間  $t_0$  から  $t_4$  までの期間撮影した観察画像のモデルを図 3 に示す。図 3 において、縦軸方向の各画像情報は、網掛けされた丸で示される標本がステージ Z 方向に動いた距離を示しており、 $t_0$  から  $t_4$  までの間に  $Z_4$  だけ標本が動いたことを示している。同様に各画像内の X-Y 位置は、標本が X-Y 方向に動いたことを示しており、図 3 のモデルでは、 $t_0$  で画像中央に存在した標本が、 $t_4$  までの間に右方向に動いたことを示している。

【0027】

図 2B は、上記のような撮影を行うための顕微鏡システム 100 におけるホスト PC 113 の設定画面を示している。設定画面は、TV カメラ 112 からの標本画像を表示する G1 と、顕微鏡の制御に関する操作表示部 G2 と、標本画像の撮影条件を設定する表示部 G3 とで構成されている。

【0028】

撮影条件設定方法を図 2A と図 2B を用いて説明する。

【0029】

撮影条件設定に際して、まず、スライドガラス 102A またはカバーガラス 102B に対して G4 ボタンでオートフォーカス (AF) を行う。図 2A はカバーガラス 102B に対して AF を行った場合を示しており、AF が完了するとステージ 101 は図 2A の基準位置となる。観察者は撮影対象である標本にピントを合わせるため、G5 ボタンを用いてステージ 101 を上下駆動させる。G6 は現在のステージ位置のアドレスを表示しており、カバーガラス位置 (AF が完了した位置) から標本の位置までの距離などが読みとれるようになっている。標本にピントを合わせた後、G10 ボタンを用いて図 2A の撮影カウント 3 のような撮影するステージ Z 方向の撮影領域中心位置登録を行う。このカバーガラス位置と中心位置の距離がオフセットとなる。撮影領域中心位置を登録した後、G7 および G9 ボタンを用いて、図 2A の撮影 Z 間隔、撮影カウントで示されるような標本に対する Z 方向スライス撮影を行うためのステージ Z 方向のピッチと撮影枚数を設定する。撮影枚数やピッチの設定は、撮影する Z 方向の範囲と枚数でも設定可能となっており、その場合には G8 および G9 ボタンを用いて設定を行う。撮影する Z 方向の範囲がスライドガラス 102A またはカバーガラス 102B を越えて設定された場合には、その設定条件に対する警告表示を行う。Z 撮影枚数および二方向ピッチを設定した後は、撮影する時間間隔を G11 で、また撮影期間に対する G12 を用いて設定する。撮影間隔が G7 および G9 で設定した Z 方向に対する撮影時間より、短く設定された場合には、撮影間隔の設定に対する警告表示を行う。

【0030】

10

20

30

40

50

本実施形態では、カバーガラス 102B にオートフォーカスを行った後、撮影対象物の位置設定を行ったが、これを撮影対象物の位置設定を行った後、カバーガラス 102B にオートフォーカスを行っても同様である。

【0031】

上記のように設定された顕微鏡システム 100 の動作を図 4 を用いて説明する。

【0032】

測定が開始されると (S1)、所定枚数の撮影が完了し、ホスト PC 設定の撮影時間 (合計) に応じたタイムラップス測定が終了したかチェックする (S2)。測定が終了した場合には、終了する (S10)。測定が終了していない場合には、ホスト PC 設定のタイムラップス間隔で設定したタイムラップス測定間隔に達するまで待機する (S3)。

10

【0033】

測定間隔に達するとカバーガラス 102B に対して A-F 制御を行い、図 2A で示した基準位置に位置制御を行う (S4)。基準位置に駆動した後、ホスト PC で予め設定した撮影領域中心位置すなわちオフセット量だけステージ 101 を駆動する (S5)。

【0034】

つまり、オートフォーカスユニット 118 によりカバーガラス 102B に対してオートフォーカスを行った後、ステージ Z 駆動制御部 116 によりステージ 101 を予め定めた一定量すなわちオフセット量の分だけ移動させる。

【0035】

さらに、Z 方向画像を取得するために撮影領域上限へ駆動して (S6)、撮影を行う (S7)。S5、S6 は予め撮影領域中心位置の設定値から撮影領域上限を算出しておくことにより、S5 動作を省略する (内部処理する) ことも可能である。また、これらの駆動はいわゆるバックラッシュによる位置ズレが極力発生しないように、一方向から位置制御することが望ましい。

20

【0036】

撮影が行われた後はホスト PC で設定した撮影カウント枚数分だけ、同じくホスト PC で設定した撮影 Z 間隔分だけ駆動しながら行い (S8、S9)、この動作を測定が終了するまで繰り返し続ける (S2)。

【0037】

以上のように構成・制御される本実施形態の顕微鏡システム 100 は、カバーガラス 102B にオートフォーカスをかけることにより、周囲温度の変化により対物レンズ焦点位置が変化した場合でも、基準位置が固定された状態で標本撮影位置をオフセットで設定するため、標本の動きを確実に測定することが可能となる。

30

【0038】

本実施形態の顕微鏡システム 100 は、ステージ 101 を上下させる構成となっているが、対物レンズ 109 を上下させる構成であってもよく、その場合にも、同様の効果を得ることが可能である。また、本実施形態の顕微鏡システム 100 では、顕微鏡は、正立型の顕微鏡であるが、ステージ 101 の下に対物レンズが設置されているいわゆる倒立型の顕微鏡であってもよく、その場合にも、同様の効果を得ることが可能である。さらに、本実施形態では、オートフォーカスは、アクティブ型のオートフォーカスであるが、公知のパッシブ型のオートフォーカスであってもよく、その場合にも、同様の効果を得ることが可能である。

40

【0039】

本実施形態においては、カバーガラス 102B またはスライドガラス 102A に一旦オートフォーカスを行った後、予め設定された所定量の駆動を行い、撮影するという目的を逸脱しないかぎり種々の変形が可能である。

【0040】

本実施形態では、ステージ 101 は必ずしも X-Y 方向に移動可能である必要はない。つまり、ステージ 101 が Z 方向のみに移動可能であって、ステージ X-Y 制御部 115 が省かれてもよい。また、対物レンズ 109 は必ずしも交換可能である必要はない。つま

50

り、顕微鏡は、複数の対物レンズを回転可能に保持し、それらのひとつを選択的に光路中に配置し得るレボルバの機能を有していなくてもよい。

【0041】

第二実施形態

本実施形態は、X-Y位置の異なる複数の測定点に対するタイムラプス測定に向けられている。本実施形態の顕微鏡システムの構成は、第一実施形態と同様のため省略する。本実施形態では、標本のX-Y位置毎のオフセット駆動動作を行う。

【0042】

図5は、スライドガラス102Aとカバーガラス102Bで封入された観察体内に複数の測定点XY1、XY2、XY3があるモデルを示している。このモデルにおいて、測定点XY1、XY2、XY3のカバーガラス102Bに対するZ方向位置C1、C2、C3はそれぞれ異なっている。これらの各測定点の動きをタイムラプス測定する際の手順を示す。

【0043】

図6は本実施形態で示すX-Y位置毎のオフセット駆動を設定するホストPC設定画面であり、図6は第一実施形態に対していくつかの機能追加がされたものであり、その追加機能を説明する。

【0044】

G20は、スライドガラス102Aの全体の画像であり、観察者はG23ボタンを用いてステージ101をX-Y方向に動かし、タイムラプス観察を行う核などの測定点を決定する。G24にはステージ101のX-Y位置の情報が表示され、測定点の決定はステージX-Y位置を静止させ、G21のボタンで行う。位置設定を行うと登録された測定点はG20の観察体全体画像中にX点で示される。各測定点のオフセット量設定、撮影条件設定は第一実施形態に示した手順と同様に行う。またすでに別の測定点で登録した条件設定と同じ撮影条件とする場合には、撮影条件を登録しておけばG22ボタンで呼び出すことも可能であり、全測定点あるいは特定測定点の撮影条件を統一することが可能となっている。

【0045】

以上のように設定された顕微鏡システムの動作を図7を用いて説明する。

【0046】

測定が開始されると(S20)、所定枚数の撮影が完了し、ホストPC設定の撮影時間(合計)に応じたタイムラプス測定が終了したかチェックする(S21)。測定が終了した場合には、終了する(S31)。測定が終了していない場合には、ホストPC設定のタイムラプス間隔で設定したタイムラプス測定間隔に達するまで待機する(S22)。

【0047】

測定間に達すると複数の測定点の設定用にステージX-Y駆動を行う(S23)。各測定点のステージX-Y位置に駆動されると、そのステージX-Y位置のカバーガラス102Bに対してAF制御を行い、カバーガラス位置である基準位置に位置制御を行う(S24)。基準位置に駆動した後、ホストPCで予め設定した各撮影中心領域位置にすなわちオフセット量だけステージ101を駆動する(S25)。

【0048】

つまり、オートフォーカスユニット118によりカバーガラス102Bに対してオートフォーカスを行った後、ステージZ駆動制御部116によりステージ101を予め定めた一定量すなわちオフセット量の分だけ移動させる。

【0049】

さらに、Z方向画像を取得するために撮影領域上限へ駆動して(S26)、撮影を行う(S27)。S25、S26は第一実施形態と同様に予め撮影領域中心位置の設定値から撮影領域上限を算出しておくことにより、S25動作を省略する(内部処理する)ことも可能である。

【0050】

10

20

30

40

50

撮影が行われた後はホスト P C で設定した撮影カウント枚数分だけ、同じくホスト P C で設定した撮影 Z 間隔分だけ駆動しながら行い ( S 2 8 、 S 2 9 ) 、全測定点での撮影が終了し、かつタイムラプス測定終了条件に達するまで絞り返し続ける ( S 3 0 、 S 3 1 ) 。

【 0 0 5 1 】

以上のように構成・制御される本実施形態の顕微鏡システムは、複数の測定点毎にカバーガラス 1 0 2 B に対してオートフォーカスをかけることにより、周囲温度の変化により対物レンズ焦点位置が変化した場合でも、基準位置が固定された状態で標本撮影位置をオフセットで設定するため、複数の測定であっても標本の動きを確実に測定することが可能となる。

10

【 0 0 5 2 】

また X - Y の複数の測定点において、例えば標本をサーチする範囲を決定する領域など前回のタイムラプス時に取得したオートフォーカス条件を図 7 の S 2 4 に示した A F 制御中に更新すれば、より高速かつ高信頼度で A F 制御を行うことが可能となる。

【 0 0 5 3 】

本実施形態では、対物レンズ 1 0 9 は必ずしも交換可能である必要はない。つまり、顕微鏡は、複数の対物レンズを回転可能に保持し、それらのひとつを選択的に光路中に配置し得るレボルバの機能を有していなくてもよい。

【 0 0 5 4 】

第三実施形態

20

本実施形態は、対物レンズの交換を含むタイムラプス測定に向けられている。本実施形態の顕微鏡システムの構成は、第一実施形態と同様のため省略する。

【 0 0 5 5 】

タイムラプス測定の条件とひとつとして対物レンズの変換が含まれた場合、結像レンズが異なるため、オフセット量を変更しなければならない可能性がある。本実施形態では、対物レンズ毎のオフセット量を設定してタイムラプス測定を行う。

【 0 0 5 6 】

対物レンズ毎のオフセット量の設定は、第一実施形態または第二実施形態と同様にホスト P C 画面で図示しない対物レンズ毎のオフセット量設定ボタンで行う。

【 0 0 5 7 】

30

図 8 は対物レンズ毎のオフセット量が設定された顕微鏡システムの動作制御を示している。

【 0 0 5 8 】

測定が開始されると ( S 4 0 ) 、所定枚数の撮影が完了し、ホスト P C 設定の撮影時間 ( 合計 ) に応じたタイムラプス測定が終了したかチェックする ( S 4 1 ) 。測定が終了した場合には、終了する ( S 5 1 ) 。測定が終了していない場合には、ホスト P C 設定のタイムラプス間隔で設定したタイムラプス測定間隔に達するまで待機する ( S 4 2 ) 。

【 0 0 5 9 】

測定間隔に達すると設定された対物レンズを光路中に挿入する ( S 4 3 ) 。対物レンズが光路中に挿入されると、カバーガラス 1 0 2 B に対して A F 制御を行い、カバーガラス位置である基準位置に位置制御を行う ( S 4 4 ) 。基準位置に駆動した後、ホスト P C で予め設定した対物レンズ毎に設定されたオフセット量だけステージ 1 0 1 を駆動する ( S 4 5 ) 。

40

【 0 0 6 0 】

つまり、オートフォーカスユニット 1 1 8 によりカバーガラス 1 0 2 B に対してオートフォーカスを行った後、ステージ Z 駆動制御部 1 1 6 によりステージ 1 0 1 を予め定めた一定量すなわちオフセット量の分だけ移動させる。

【 0 0 6 1 】

さらに、Z 方向画像を取得するために撮影領域上限へ駆動して ( S 4 6 ) 、撮影を行う ( S 4 7 ) 。

50

## 【0062】

撮影が行われた後はホストPCで設定した撮影カウント枚数分だけ、同じくホストPCで設定した撮影Z間隔分だけ駆動しながら行い(S48、S49)、設定された全対物レンズでの撮影が終了し、かつタイムラプス測定終了条件に達するまで繰り返し続ける(S50、S51)。

## 【0063】

以上のように構成・制御される本実施形態の顕微鏡システムは、タイムラプス測定条件において複数の対物レンズによる観察が含まれている場合に各光路中の対物レンズを用いてオートフォーカスをかけることにより、対物レンズ間にオートフォーカス側を含む焦点ズレが存在した場合でも、基準位置が固定された状態で標本撮影位置をオフセットで設定するため、複数の測定であっても標本の動きを確実に測定することが可能となる。10

## 【0064】

本実施形態では、ステージ101は必ずしもX-Y方向に移動可能である必要はない。つまり、ステージ101がZ方向のみに移動可能であって、ステージX-Y制御部115が省かれてもよい。

## 【0065】

## 第四実施形態

本実施形態は、励起光変換を含むタイムラプス測定に向けられている。本実施形態の顕微鏡システムの構成は、第一実施形態と同様のため省略する。

## 【0066】

タイムラプス測定の条件とひとつとして蛍光キューブ変換すなわち励起光変換が含まれた場合、標本の発光部位が異なるため、オフセット量を変更しなければならない可能性である。本実施形態では、励起光変換毎のオフセット量を設定してタイムラプス測定を行う。20

## 【0067】

図9は励起光変換毎のオフセット量が設定された顕微鏡システムの動作制御を示している。

## 【0068】

測定が開始されると(S60)、所定枚数の撮影が完了し、ホストPC設定の撮影時間(合計)に応じたタイムラプス測定が終了したかチェックする(S61)。測定が終了した場合には、終了する(S71)。測定が終了していない場合には、ホストPC設定のタイムラプス間隔で設定したタイムラプス測定間隔に達するまで待機する(S62)。30

## 【0069】

測定間に達すると設定された蛍光キューブを光路中に挿入する(S63)蛍光キューブが光路中に挿入され、励起光が切り替わると、カバーガラス102Bに対してAF制御を行い、カバーガラス位置である基準位置に位置制御を行う(S64)。基準位置に駆動した後、ホストPCで予め設定した励起光毎に設定されたオフセット量だけステージ101を駆動する(S65)。

## 【0070】

つまり、オートフォーカスユニット118によりカバーガラス102Bに対してオートフォーカスを行った後、ステージZ駆動制御部116によりステージ101を予め定めた一定量すなわちオフセット量の分だけ移動させる。40

## 【0071】

さらに、Z方向画像を取得するために撮影領域上限へ駆動して(S66)、撮影を行う(S67)。

## 【0072】

撮影が行われた後はホストPCで設定した撮影カウント枚数分だけ、同じくホストPCで設定した撮影Z間隔分だけ駆動しながら行い(S68、S69)、設定された全励起光での撮影が終了し、かつタイムラプス測定終了条件に達するまで繰り返し続ける(S70、S71)。50

## 【0073】

以上のように構成・制御される本実施形態の顕微鏡システムは、蛍光観察のタイムラプス測定条件において励起光毎に標本の発光点が異なる対象物の動きを観測する場合に、スライドガラス102Aまたはカバーガラス102Bに対してオートフォーカスをかけることにより、基準位置が固定された状態で標本撮影位置をオフセットで設定するため、各励起光毎に標本の動きを確実に測定することが可能となる。

## 【0074】

本実施形態では、観察を行う毎に、スライドガラス102Aまたはカバーガラス102Bに対してオートフォーカスを行っているが、これを間欠時間経過ごとに一度だけ行うことにより、撮影時間の短縮を図ってもよい。

10

## 【0075】

これまで、第二実施形態のステージX-Y毎のオフセット、第三実施形態の対物レンズ毎のオフセット、第四実施形態の励起光毎のオフセットは、単独で行うものとして説明したが、それらのいずれか二つを組み合わせて行ったり、それらの三つをすべて組み合わせ行ったりしてもよく、その場合には、より高精度な測定を行うことが可能となる。

## 【0076】

## 第五実施形態

本実施形態は、スライドガラス102Aまたはカバーガラス102Bに対して行うAF制御に向けられている。本実施形態の顕微鏡システムの構成は、第一実施形態と同様のため省略する。

20

## 【0077】

図10は本実施形態で用いるスライドガラス102Aのモデル図である。図10に示されるように、スライドガラス102AはAF用マーキング102Cを有している。AF用マーキング102Cは、観察体102Dに影響がない範囲に位置し、オートフォーカス制御の精度を向上させる処理が施されている。本実施形態では、アクティブAFを例に挙げ、AF用マーキング102Cは、アクティブAFで用いられるレーザー光を高い反射率で反射する膜のコーティング処理が施されている。

## 【0078】

図11は上述の顕微鏡システムの動作制御を説明したものである。

## 【0079】

30

測定が開始されると(S80)、所定枚数の撮影が完了し、ホストPC設定の撮影時間(合計)に応じたタイムラプス測定が終了したかチェックする(S81)、測定が終了した場合には、終了する(S81)。測定が終了していない場合には、ホストPC設定のタイムラプス間隔で設定したタイムラプス測定間隔に達するまで待機する(S82)。

## 【0080】

測定間隔に達するとAF用マーキング位置にステージX-Y駆動を行う(S83)。AF用マーキング位置に移動すると、オートフォーカス制御を行い、カバーガラス位置である基準位置に位置制御を行う(S84)。基準位置に位置制御を行った後、実際に測定を行うステージX-Y位置に移動する(S85)。基準位置に駆動した後、ホストPCで予め設定されたオフセット量だけステージ101を駆動する(S86)。

40

## 【0081】

つまり、オートフォーカスユニット118によりスライドガラス102AのAF用マーキング102Cに対してオートフォーカスを行った後、ステージZ駆動制御部116によりステージ101を予め定めた一定量すなわちオフセット量の分だけ移動させる。

## 【0082】

さらに、Z方向画像を取得するために撮影領域上限へ移動して(S87)、撮影を行う(S88)。

## 【0083】

撮影が行われた後はホストPCで設定した撮影カウント枚数分だけ、同じくホストPCで設定した撮影Z間隔分だけ駆動しながら行い(S89、S90)、設定された全励起

50

光での撮影が終了し、かつタイムラプス測定終了条件に達するまで繰り返し続ける（S90、S81）。

#### 【0084】

本実施形態の顕微鏡システムでは、スライドガラス102Aに対して高精度なAFが可能となるため、測定の精度を向上することができる。さらに、オートフォーカスの対象が周知のものとなるため、最適なオートフォーカス条件を設定することができる。これにより、ピント合わせ時間の短縮が可能となり、測定のスループットが向上する。

#### 【0085】

また、本実施形態では、オートフォーカスがアクティブ方式のAFであり、これに対応してAF用マーキング102Cが反射膜である例について述べたが、オートフォーカスはパッシブ方式のAFであってもよく、その場合には、AF用マーキング102Cを高コントラストのマーキングとし、公知の山登り方式などのオートフォーカス制御を行えばよい。

10

#### 【0086】

##### 第六実施形態

本実施形態は、倒立型顕微鏡を含む顕微鏡システムに向けられている。図12は、本発明の第六実施形態の顕微鏡システムの構成を示している。

#### 【0087】

図12に示されるように、本実施形態の顕微鏡システム600は、観察試料610を載せるためのステージ621と、ステージ621に載せられた観察試料610と対峙するよう配置される対物レンズ631を含む観察光学系とを備えている。

20

#### 【0088】

観察試料610は観察体611とこれを収容する容器612（いわゆるディッシュ）とからなる。観察体611は例えば標本（例えば細胞）と培養液とからなる。容器612は、底部に開口を持つ皿状の透明な容器本体613と、容器本体613の開口を塞いでいるカバーガラス614とから構成されている。従って、観察体611はカバーガラス614の上に位置し、対物レンズ631はカバーガラス614の下方に位置している。

#### 【0089】

ステージ621はX-Y方向に移動可能である。顕微鏡システム600は、ステージ621のX-Y方向の位置を電動制御するため、ステージ621をX-Y方向に移動させるためのステージ駆動用モータ622と、ステージ621のX-Y方向の位置を制御するステージX-Y制御部623とを備えている。

30

#### 【0090】

対物レンズ631は電動レボルバに装着されている。電動レボルバは、複数の対物レンズ631を保持できるレボルバ本体632と、レボルバ本体632を回転させるためのレボルバ用モータ633と、レボルバ用モータ633を制御するためのレボルバ用モータ駆動部634とを備えている。

#### 【0091】

電動レボルバは、レボルバ用モータ駆動部634によってレボルバ本体632の回転を制御することにより、レボルバ本体632に保持された対物レンズ631の一つを選択的に光路上に配置させることができる。

40

#### 【0092】

レボルバ本体632は、対物レンズ631を取り付けることのできる複数の対物レンズ取付穴を有しており、電動レボルバはさらに、光路上に配置されている対物レンズ631が取り付けられているレボルバ本体632の対物レンズ取付穴を検出するための取付穴位置検出部618を有している。

#### 【0093】

レボルバ本体632は観察光軸に沿って移動可能であり、顕微鏡システム600はさらに、照準のためにレボルバ本体632を観察光軸に沿って移動させるための照準用モータ636と、照準用モータ636を制御するための焦準用モータ駆動部637とを備えている。

50

る。照準用モータ 636 と焦準用モータ駆動部 637 は、ステージと対物レンズの少なくとも一方を焦準のために駆動する焦準駆動部を構成している。

【0094】

顕微鏡システム 600 は、アクティブ瞳分割法によるアクティブ方式の AF 装置を備えている。AF 装置は、基準光源 671 と、レーザー駆動部 672 と、コリメートレンズ 673 と、投光側ストップ 674 と、偏光ビームスプリッター (PBS) 675 と、集光レンズ群 676 と、色収差補正レンズ群 677 と、/4 板 678 と、ダイクロイックミラー 679 と、受光センサー 681 と、信号処理部 682 と、色収差補正レンズ群駆動用モータ 683 と、色収差レンズ駆動部 684 とから構成されている。

【0095】

顕微鏡システム 600 は、ステージ X-Y 制御部 623 とレボルバ用モータ駆動部 634 と焦準用モータ駆動部 637 と色収差レンズ駆動部 684 を制御するための顕微鏡コントローラ 691 を備えている。顕微鏡コントローラ 691 は周知の CPU 回路である。顕微鏡コントローラ 691 には、各種操作 SW を有する操作部 692 が接続されている。観察者は操作部 692 を介して、AF 開始 / 停止や対物レンズの切り替えなどの操作や、ガラス厚などの AF に関する必要情報の入力などを行える。また顕微鏡コントローラ 691 には、パルスカウンタ 695 とジョグエンコーダ 694 を介して、ジョグダイヤル 693 が接続されている。観察者はジョグダイヤル 693 によってレボルバ本体 632 を上下移動させることができる。

【0096】

顕微鏡システム 600 は、観察試料 610 を透過照明するための透過照明光学系を備えている。透過照明光学系は、照明用光源 641 と、レンズ 642 と、ミラー 643 と、レンズ 644 とを有している。

【0097】

また顕微鏡システム 600 は蛍光観察用の照明光学系を備えている。蛍光照明光学系は、励起光を発する光源 651 と、蛍光キューブ 652 とを有している。蛍光キューブ 652 は電動制御によって交換可能である。これにより、蛍光観察用の照明光学系は、波長の異なる励起光を選択的に照射し得る。言い換えれば、蛍光観察用の照明光学系は、励起光を選択可能となっている。

【0098】

顕微鏡システム 600 は、必ずしも透過照明光学系と蛍光観察用の照明光学系の両方を備えている必要はなく、観察目的に合ったどちらか一方の照明光学系を備えているだけであってもよい。

【0099】

顕微鏡システム 600 はさらに、観察像を撮像するための TV カメラ 661 と、ビデオキャプチャボード 662 と、ホスト PC 663 とを備えている。

透過照明観察において、照明用光源 641 からの照明光は、レンズ 642 を通り、ミラー 643 によって反射され、レンズ 644 によって集光され、観察試料 610 を上方から照明する。観察試料 610 を透過した光は、対物レンズ 631 を通り、ダイクロイックミラー 679 を透過して、TV カメラ 661 に入射する。

【0100】

また蛍光観察において、光源 651 から発せられた励起光は、蛍光キューブ 652 で反射され、対物レンズ 631 を通して観察試料 610 に照射される。観察試料 610 から発生した蛍光は、対物レンズ 631 を通り、蛍光キューブ 652 によって波長選択され、ダイクロイックミラー 679 を透過して、TV カメラ 661 に入射する。

【0101】

TV カメラ 661 によって撮像された画像は、第一実施形態と同様に、ビデオキャプチャボード 662 によりホスト PC 663 に取得される。ホスト PC 663 は、取得した画像を図示しない画像メモリーに複数の画像を保存することが可能となっている。

【0102】

10

20

30

40

50

本実施形態の顕微鏡システム 600において、アクティブ瞳分割法の A F 装置は、レーザー光を観察試料に照射し、その反射光を検出することによって、ピント合わせを行う。

【0103】

基準光源 671 は、可視外の波長領域の光を発する光源、例えば赤外線レーザーで構成される。基準光源 671 はレーザー駆動部 672 によって制御される。レーザー駆動部 672 は、基準光源 671 のパルス点灯などを行い、基準光源 671 の強弱を制御する。

【0104】

基準光源 671 から発せられたレーザー光は、コリメートレンズ 673 を通過することにより平行光束になり、投光側ストップ 674 によって光束径の半分がカットされ、その後、偏光ビームスプリッター (PBS) 675 によって P 偏光成分だけが反射される。

10

【0105】

偏光ビームスプリッター (PBS) 675 からの光束は、集光レンズ群 676 によって一旦収束された後、色収差補正レンズ群 677 を通過する。色収差補正レンズ群 677 を通過した光は、/4 板 678 を通過する際に 45 度偏光され、ダイクロイックミラー 679 に入射する。ダイクロイックミラー 679 は、赤外域の光だけ反射するため、レーザー光束は反射される。反射された光束は、対物レンズ 631 を通って観察試料 610 に照射され、光スポットを形成する。

【0106】

観察試料 610 によって反射された光束は、対物レンズ 631 に入射し、ダイクロイックミラー 679 によって反射される。反射された光束は、/4 板 678 を再び通過する際にさらに 45 度偏光され、S 偏光成分に変わる。光束はさらに、色収差補正レンズ群 677 と集光レンズ群 676 を通過し、PBS 675 に入射する。光束は、S 偏光成分になっているので、PBS 675 を透過する。透過した光束は、集光レンズ群 680 を通過した後に受光センサー 681 に結像される。

20

【0107】

受光センサー 681 は、隣接した二つの受光部を持つ二分割フォトダイオードであり、二つの受光部の境界線上に光軸が位置するように配置されている。信号処理部 682 は、受光センサー 681 からの出力に基づいて、ピント位置とピント合わせ方向とを判断できるいわゆる S 字カーブを取得する。顕微鏡コントローラ 691 は、信号処理部 682 で得られた情報 (S 字カーブ) に基づいて焦準用モータ駆動部 637 を制御することにより、観察光学系のオートフォーカス制御を行う。

30

【0108】

この A F 装置は、色収差補正レンズ群駆動用モータ 683 によって色収差補正レンズ群 677 を光軸に沿って移動させることによって、赤外線レーザーの色収差補正が可能であるとともに、ピント位置をずらすいわゆる光学的なオフセット駆動が可能である。これにより、例えば温度変化に起因して発生する観察光学系と A F 光学系のフォーカスドリフトの差を補償する、言い換えれば両者のフォーカスドリフトを同一にすることが可能である。

【0109】

本実施形態の顕微鏡システム 600において、第一実施形態と同様に、アクティブ A F によってカバーガラス 614 に対してオートフォーカスを行った後、焦準用モータ駆動部 637 によりレボルバ本体 632 を移動させて対物レンズ 631 を予め定めた一定量すなわちオフセット量の分だけ移動させる。これにより、第一実施形態と同様の利点が得られる。

40

【0110】

さらに、第一実施形態に対して第二実施形態～第五実施形態が適用されたのと同様に、本実施形態の顕微鏡システム 600 に対しても第二実施形態～第五実施形態が適用されてもよい。それらの場合にもそれぞれ第二実施形態～第五実施形態と同様の利点が得られる。

【0111】

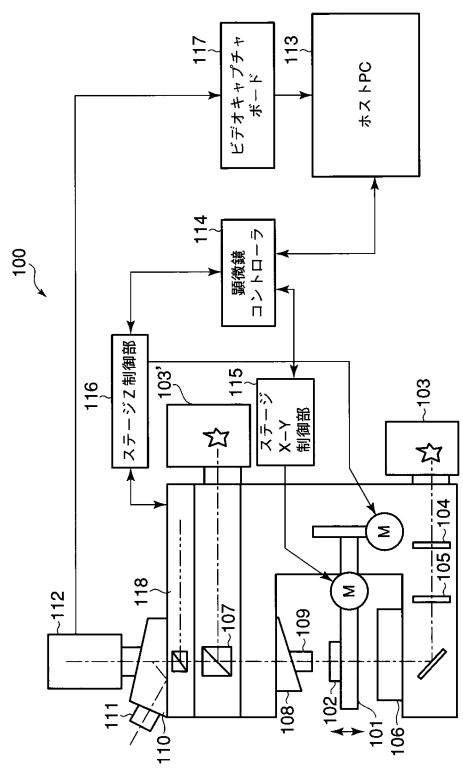
これまで、図面を参照しながら本発明のいくつかの実施形態を述べたが、本発明は、こ

50

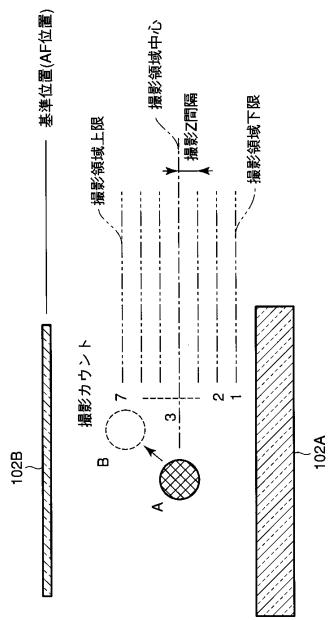


ビームスプリッター、676…集光レンズ群、677…色収差補正レンズ群、678…/4板、679…ダイクロイックミラー、680…集光レンズ群、681…受光センサー、682…信号処理部、683…色収差補正レンズ群駆動用モータ、684…色収差レンズ駆動部、691…顕微鏡コントローラ、692…操作部、693…ジョグダイヤル、694…ジョグエンコーダ、695…パルスカウンタ。

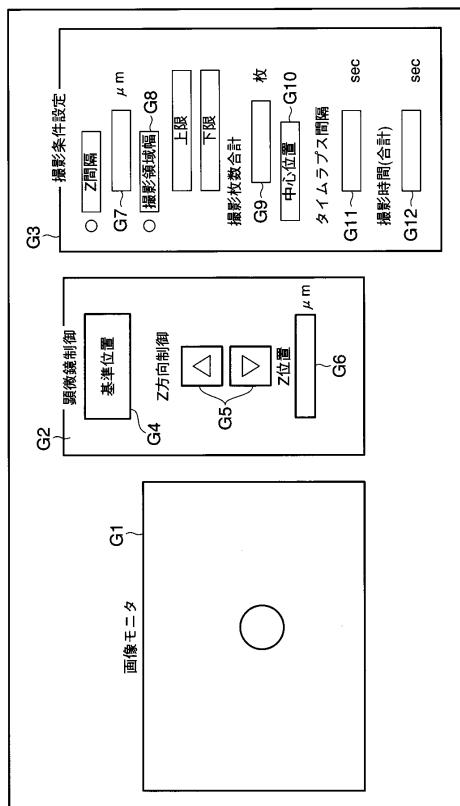
【図1】



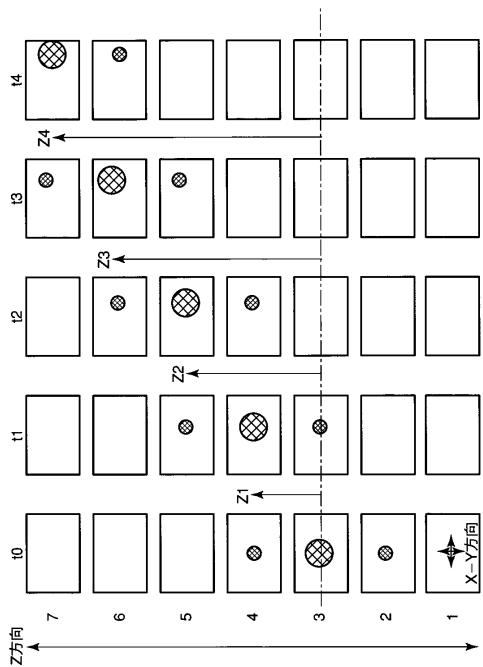
【図2A】



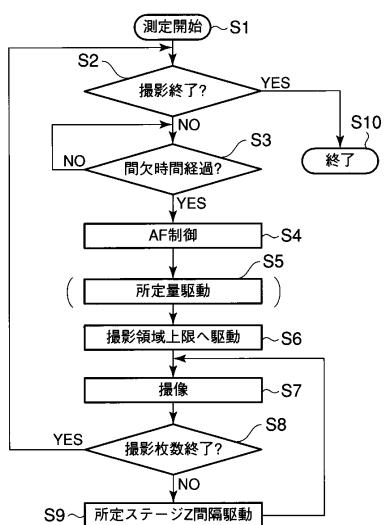
【図2B】



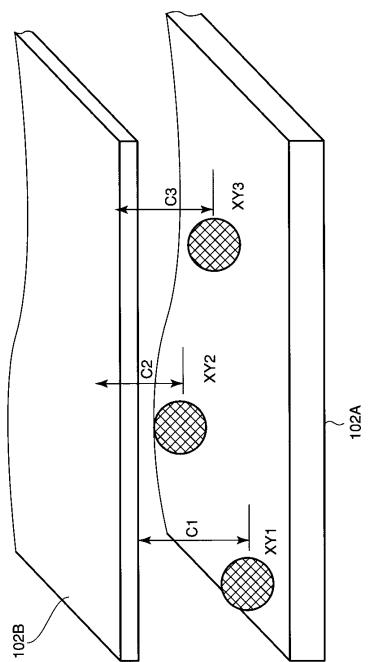
【図3】



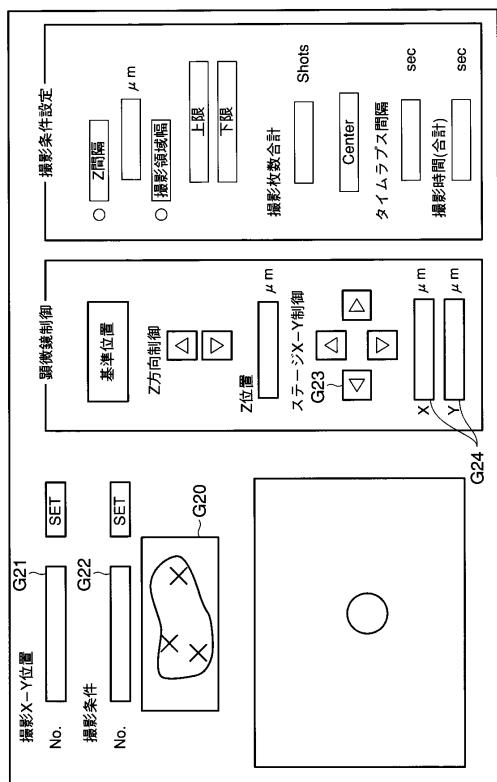
【図4】



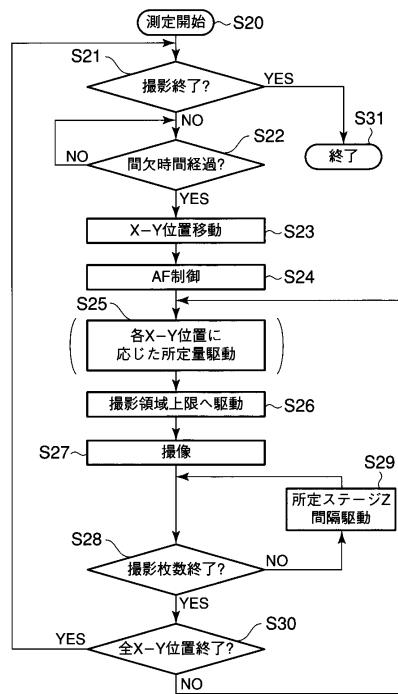
【図5】



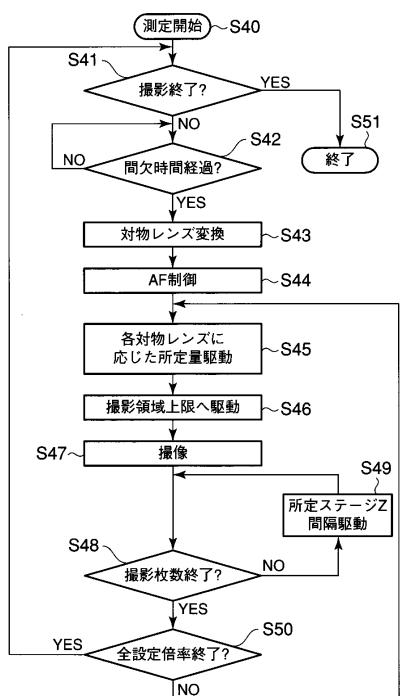
【図6】



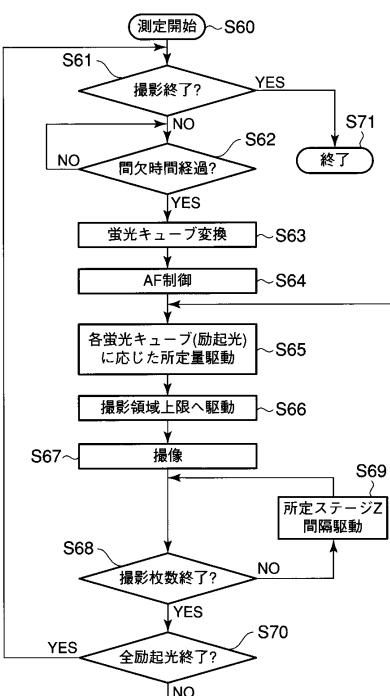
【図7】



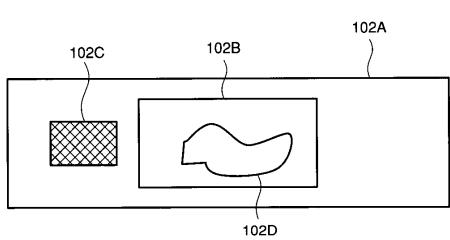
【図8】



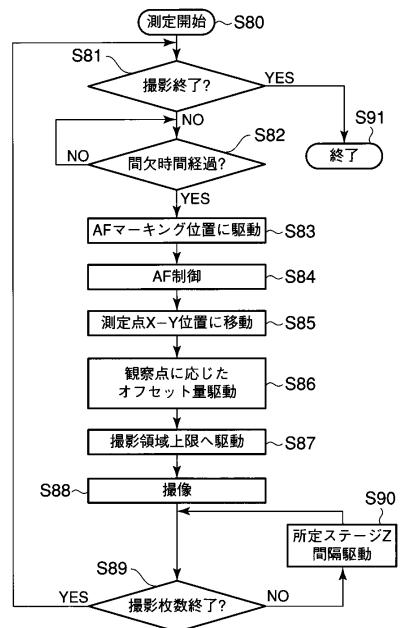
【図9】



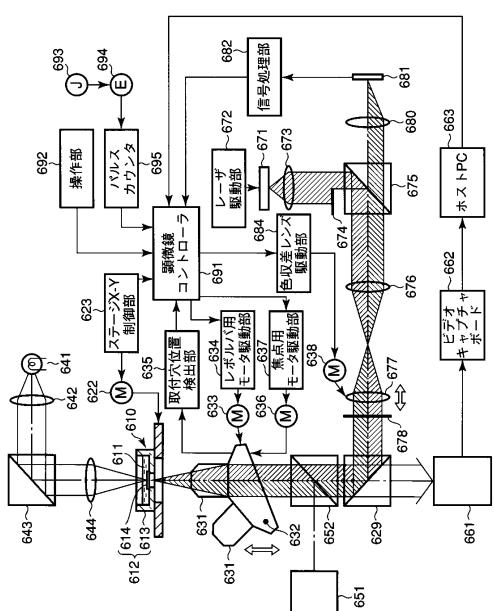
【図10】



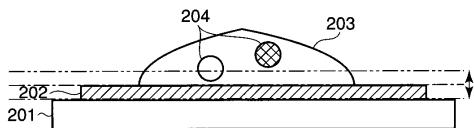
### 【図 1 1】



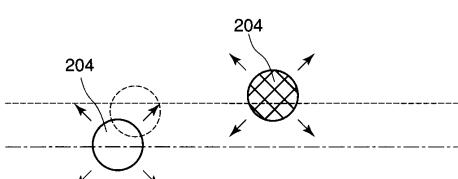
【図12】



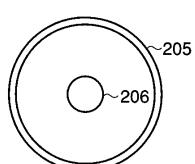
【図 1 3 A】



〔 义 13 B 〕



【図 1.3.C】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2001-296478(JP,A)  
特開2002-258163(JP,A)  
特開平10-122823(JP,A)  
特開平11-133309(JP,A)  
特開2000-316120(JP,A)  
特開昭63-167313(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 02 B 21/00  
G 02 B 7/28  
G 02 B 7/34