

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5394893号
(P5394893)

(45) 発行日 平成26年1月22日(2014. 1. 22)

(24) 登録日 平成25年10月25日(2013. 10. 25)

(51) Int.Cl.

F I

G O 2 B 21/36 (2006.01)

G O 2 B 21/36

G O 1 N 21/64 (2006.01)

G O 1 N 21/64

E

請求項の数 8 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2009-256148 (P2009-256148)
(22) 出願日 平成21年11月9日(2009. 11. 9)
(65) 公開番号 特開2011-100058 (P2011-100058A)
(43) 公開日 平成23年5月19日(2011. 5. 19)
審査請求日 平成24年11月2日(2012. 11. 2)

(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4番2号
(74) 代理人 100118913
弁理士 上田 邦生
(74) 代理人 100112737
弁理士 藤田 考晴
(72) 発明者 桑原 洋平
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オ
リンパス株式会社内
(72) 発明者 顕谷 昭典
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オ
リンパス株式会社内

審査官 堀井 康司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザ走査型顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レーザ光を標本上で2次元走査する走査手段と、前記レーザ光の波長を切り替える波長選択手段と、

該波長選択手段により切り替えられた波長のレーザ光が標本に照射されることにより、
標本において発生した蛍光をスペクトル成分に分光する分光手段と、

該分光手段により分光されたスペクトル成分をそれぞれ検出する複数のセルを有する光
検出器と、

前記波長選択手段によるレーザ光の波長の切り替えに同期して前記光検出器のゲイン及
び/又は前記各セルの回路ゲインを切り替えるゲイン切替手段と、

観察しようとする2以上の蛍光色素の選択を受け付ける入力部と、

選択された前記蛍光色素の各々に対応するチャンネルとして、前記複数のセルの内、各前
記蛍光色素に応じて合算すべきセル群を決定し、このセル群の出力を合算して輝度デー
タを生成する合算処理部と、

前記合算された輝度データに基づいてスキャン画像を生成するコンピュータと、前記スキャン画像を表示する表示部と、

第1の蛍光色素に対応するチャンネルによる輝度データの取得を行うように予め設定され
たパラメータに基づくレーザ光の波長、セル群、光検出器のゲイン及び/又は前記回路ゲ
インと、第2の蛍光色素に対応したチャンネルによる輝度データの取得を行うように予め設
定されたパラメータに基づくレーザ光の波長、セル群、光検出器のゲイン及び/又は前記

10

20

回路ゲインとを、前記走査手段の動作に同期して切り替えることにより、前記 2 以上の蛍光色素の各々に個別に対応したスキャン画像を略同時に取得するシーケンシャルスキャン制御部とを備えるレーザ走査型顕微鏡。

【請求項 2】

前記ゲイン切替手段が、前記光検出器の各セルの感度を一括して調整する請求項 1 に記載のレーザ走査型顕微鏡。

【請求項 3】

前記ゲイン切替手段が、前記光検出器の各セルにより検出されたスペクトル成分の増幅率をそれぞれ調整する請求項 1 または請求項 2 に記載のレーザ走査型顕微鏡。

【請求項 4】

前記光検出器は、前記ゲイン切替手段により感度が調整された際に、その感度が安定するまでスペクトル成分の検出を待機する請求項 2 または請求項 3 に記載のレーザ走査型顕微鏡。

【請求項 5】

前記ゲイン切替手段が、前記レーザ光の照射領域ごとに前記光検出器のゲイン及び／又は前記回路ゲインを切り替える請求項 1 に記載のレーザ走査型顕微鏡。

【請求項 6】

同一の波長を有する前記レーザ光が照射される領域が複数ある場合、

前記ゲイン切替手段が、同一の波長を有する前記レーザ光においても照射領域ごとに前記光検出器のゲイン及び／又は前記回路ゲインを切り替える請求項 5 に記載のレーザ走査型顕微鏡。

【請求項 7】

前記走査手段が、前記レーザ光を X Y 走査する一対の走査ミラーを備え、

前記シーケンシャルスキャン制御部が、X 走査ミラーの動作に同期してライン単位で前記切り替えを行う請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載のレーザ走査型顕微鏡。

【請求項 8】

前記走査手段が、前記レーザ光を X Y 走査する一対の走査ミラーを備え、

前記シーケンシャルスキャン制御部が、Y 走査ミラーの動作に同期してフレーム単位で前記切り替えを行う請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載のレーザ走査型顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レーザ走査型顕微鏡に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、試料にレーザ光を照射して試料からの蛍光を検出するレーザ走査型顕微鏡において、複数の色素からの蛍光を取得する方法や、Photo Conversionによって互いに異なる複数の波長の蛍光を取得する方法が知られている（例えば、特許文献 1 から 2 参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開 2001 - 356272 号公報

【特許文献 2】特開 2006 - 119152 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

特許文献 1 には、1 つの検出器に対して複数のバリアフィルタを電動で切り替えることにより、時系列に複数の波長範囲の輝度データを取得する方法が記載されている。しかしながら、複数のバリアフィルタを電動で切り替える方式は、フィルタワークを必要とするため、チャンネル間の時間差が大きく、観察に支障をきたすという不都合がある。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

また、特許文献 1 には、検出器を 2 つ用意し、これに対して 1 組のバリアフィルタにより、一度に複数の波長範囲の輝度データを取得することが記載されている。この場合、同時に複数の波長範囲の輝度データを取得することができるが、波長選択の範囲は設置されたフィルタの範囲で決まるため、波長選択の自由度が低いという不都合がある。

【 0 0 0 6 】

特許文献 2 には、試料から発せられた蛍光を波長別のスペクトル成分に分割し、複数のセルを有する複数セル光検出器によって各スペクトル成分を検出するレーザ走査型顕微鏡が記載されている。この場合、複数のスペクトル成分を同時に測定することができ、且つ合算するセルを調整することによって波長選択を任意に行うことができる。しかしながら、スペクトルの重なりあう試料を観察する際に、それぞれの色素による蛍光のデータが重なって取得されてしまうという不都合がある。

【 0 0 0 7 】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、複数の色素からの蛍光を取得する場合において、各色素による蛍光のスペクトルが重なっている場合にも、それぞれの蛍光を取得することができるレーザ走査型顕微鏡を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

上記目的を達成するために、本発明は以下の手段を採用する。

本発明は、レーザ光を標本上で 2 次元走査する走査手段と、前記レーザ光の波長を切り替える波長選択手段と、該波長選択手段により切り替えられた波長のレーザ光が標本に照射されることにより、標本において発生した蛍光をスペクトル成分に分光する分光手段と、該分光手段により分光されたスペクトル成分をそれぞれ検出する複数のセルを有する光検出器と、前記波長選択手段によるレーザ光の波長の切り替えに同期して前記光検出器のゲイン及び / 又は前記各セルの回路ゲインを切り替えるゲイン切替手段と、観察しようとする 2 以上の蛍光色素の選択を受け付ける入力部と、選択された前記蛍光色素の各々に対応するチャンネルとして、前記複数のセルの内、各前記蛍光色素に応じて合算すべきセル群を決定し、このセル群の出力を合算して輝度データを生成する合算処理部と、前記合算された輝度データに基づいてスキャン画像を生成するコンピュータと、前記スキャン画像を表示する表示部と、第 1 の蛍光色素に対応するチャンネルによる輝度データの取得を行うように予め設定されたパラメータに基づくレーザ光の波長、セル群、光検出器のゲイン及び / 又は前記回路ゲインと、第 2 の蛍光色素に対応したチャンネルによる輝度データの取得を行うように予め設定されたパラメータに基づくレーザ光の波長、セル群、光検出器のゲイン及び / 又は前記回路ゲインとを、前記走査手段の動作に同期して切り替えることにより、前記 2 以上の蛍光色素の各々に個別に対応したスキャン画像を略同時に取得するシーケンシャルスキャン制御部とを備えるレーザ走査型顕微鏡を採用する。

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、波長選択手段によりレーザ光の波長が切り替えられ、該レーザ光が標本に照射されることで発生した蛍光が、分光手段によりスペクトル成分に分光される。分光されたスペクトル成分は、複数のセルを有する光検出器によりそれぞれ検出される。この場合において、ゲイン切替手段によって、波長選択手段によるレーザ光の波長の切り替えに同期して、光検出器のゲインが切り替えられる。

【 0 0 1 0 】

これにより、波長選択手段によって切り替えられたレーザ光の波長毎に、光検出器の感度を調整することができ、標本上において発生した蛍光のスペクトル成分を高精度に検出することができる。また、レーザ光の波長毎に蛍光のスペクトル成分を検出することで、複数の色素からの蛍光を取得する場合において、各色素による蛍光のスペクトル成分が重なっている場合にも、色素毎の蛍光のスペクトル分布を得ることができる。

【 0 0 1 1 】

上記発明において、前記光検出器の複数のセルのうち少なくとも 1 つのセルを選択する

セル選択部と、前記波長選択手段によるレーザ光の波長の切り替えに同期して、前記セル選択部により選択されたセルによって検出されたスペクトル成分を合算する合算部とを備えることとしてもよい。

【0012】

このようにすることで、波長選択手段によって切り替えられたレーザ光の波長毎に、セル選択部により選択されたセルによって検出されたスペクトル成分を、合算部により合算することができる。これにより、レーザ光の波長毎に、所望の波長範囲における蛍光を取得することができる。また、選択されたセルからのデータのみを取得することで、全セルからのデータを取得する場合に比べて、取り扱うデータ量を減らすことができ、画像生成等の処理を高速化することができる。

10

【0013】

上記発明において、前記ゲイン切替手段が、前記光検出器の各セルの感度を一括して調整することとしてもよい。

このようにすることで、波長選択手段によって切り替えられたレーザ光の波長毎に、ゲイン切替手段によって光検出器の各セルの感度を一括して調整することができ、標本からの蛍光の検出精度を向上させ、鮮明な画像を取得することができる。

【0014】

上記発明において、前記光検出器は、前記ゲイン切替手段により感度が調整された際に、その感度が安定するまでスペクトル成分の検出を待機することとしてもよい。

光検出器の感度が安定する前に画像を生成すると、データが不正確になってしまう場合がある。したがって、ゲイン切替手段が光検出器の感度を調整した際に、その感度が安定するまで待機した後に、標本からの光を検出することで、精度の高い画像を取得することができる。

20

【0015】

上記発明において、前記ゲイン切替手段が、前記光検出器の各セルにより検出されたスペクトル成分の増幅率をそれぞれ調整することとしてもよい。

このようにすることで、各セルの検出感度に応じた増幅率でスペクトル成分を増幅することができ、鮮明な画像を取得することができる。また、前述した各セルの感度の一括調整と併用することで、さらに鮮明な画像を取得することができる。

【0016】

上記発明において、前記ゲイン切替手段が、前記レーザ光の照射領域ごとに前記光検出器のゲインを切り替えることとしてもよい。

30

このようにすることで、退色を抑えて鮮明な画像を取得するとともに、レーザ光が照射される領域を観察に必要な最小面積とすることができ、画像を生成する際に走査時間を短縮することができる。

【0017】

上記発明において、同一の波長を有する前記レーザ光が照射される領域が複数ある場合、前記ゲイン切替手段が、同一の波長を有する前記レーザ光においても照射領域ごとに前記光検出器のゲインを切り替えることとしてもよい。

このように領域毎にゲインを切り替えることで、蛍光輝度が異なる細胞でもコントラストの高い画像を取得することができ、観察精度を向上することができる。

40

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、複数の色素からの蛍光を取得する場合において、各色素による蛍光のスペクトルが重なっている場合にも、それぞれの蛍光を取得することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明の一実施形態に係る顕微鏡の概略構成図である。

【図2】図1の光源Aによる励起波長を示す図である。

50

【図3】図1の光源Bによる励起波長を示す図である。

【図4】図1の顕微鏡により実行される処理を示すフローチャートである。

【図5】図1のCPUの機能ブロック図である。

【図6】図1のディスプレイに表示される画面例である。

【図7】図1の顕微鏡のタイミングチャートである。

【図8】第1の変形例に係る顕微鏡のタイミングチャートである。

【図9】第3の変形例に係る顕微鏡のセルの合算範囲を説明する図である。

【図10】第4の変形例に係る顕微鏡の各レーザ光の照射領域を説明する図である。

【図11】第5の変形例に係る顕微鏡の各レーザ光の照射領域を説明する図である。

【発明を実施するための形態】

10

【0020】

本発明の一実施形態に係る顕微鏡について、図面を参照して説明する。

図1は、本実施形態の顕微鏡1の構成図である。図1に示すように、本実施形態の顕微鏡1は、レーザ光を標本5に照射して標本5において発生した蛍光を検出するレーザ走査型顕微鏡であり、顕微鏡本体100と、レーザ光を出射する光源ユニット200と、パーソナルコンピュータ（以降では「PC」と表記する。）300と、コントローラ400とを主な構成要素として備えている。

【0021】

光源ユニット200は、コントローラ400により制御され、レーザ光を射出するようになっている。このレーザ光は、標本5内の蛍光指示薬を励起させ、蛍光を発生させるようになっている。

20

【0022】

光源ユニット200は、光源A202と、光源B203と、音響光学素子（波長選択手段）201とを備えている。

光源A202は、波長 λ_A のレーザ光 L_A を出射するようになっている。

光源B203は、波長 λ_B のレーザ光 L_B を出射するようになっている。

音響光学素子201は、光源A202からのレーザ光 L_A と光源B203からのレーザ光 L_B とを切り替えることができ、光源ユニット200から出射するレーザ光の波長選択および強度調節をするようになっている。

【0023】

30

このような構成を有することで、光源ユニット200は、蛍光試薬により多重染色された標本5を励起させる複数の波長のレーザ光を切り替えて出力することができるようになっている。本実施形態においては、蛍光試薬としてIndo-1とSNARF-1を用いており、レーザ光 L_A の中心波長 λ_A は350nm、レーザ光 L_B の中心波長 λ_B は515nmとする。これらのレーザ光は、シャッタや音響光学素子などにより独立して出射のON/OFF切り替えができ、1フレームごとに順次制御されるようになっている。これにより、レーザ光 L_A とレーザ光 L_B を順次切り替えて顕微鏡本体100に導入させるようになっている。

【0024】

顕微鏡本体100は、光源ユニット200からのレーザ光を標本5に照射する照射光学系10と、照射系10によりレーザ光を照射することで標本5において発生した蛍光を検出する検出光学系20とを備えている。

40

【0025】

照射光学系10は、ダイクロイックミラー111、ミラー112、走査光学ユニット113、対物レンズ114、およびステージ115から構成されている。

検出光学系20は、共焦点ピンホール116、ミラー117、分光素子（分光手段）118、複数セル光検出器（光検出器）119、増幅器120、A/D変換器121、およびCPU（ゲイン切替手段、合算部）122から構成されている。

【0026】

ダイクロイックミラー111は、光源ユニット200からのレーザ光を反射する一方、

50

標本5において発生して対物レンズ114により集光された蛍光を透過するようになっている。具体的には、ダイクロイックミラー111は、波長 λ_A (350nm)周辺と波長 λ_B (515nm)周辺の光を反射する特性を有している。このような特性を有することで、ダイクロイックミラー111は、レーザ光の光路と標本5からの蛍光の光路とを分岐するようになっている。

【0027】

走査光学ユニット113は、例えばアルミコートされた一对のガルバノミラー113a, 113bを有しており、これら一对のガルバノミラー113a, 113bの角度を変化させることで、ラスタスキャン方式で駆動されるようになっている。これにより、光源ユニット200からのレーザ光を標本5上において2次的に走査させるようになっている。

10

【0028】

標本5では、光源ユニット200からのレーザ光が照射されることによって、蛍光試薬が励起され、蛍光が発生する。

対物レンズ114は、走査光学ユニット113により走査されたレーザ光を標本5上に照射する一方、標本5から発生した蛍光を集光するようになっている。

【0029】

ここで、本実施形態で使用している蛍光試薬Indo-1は、図2に示すように、波長 λ_A のレーザ光 L_A による励起によって、波長 $\lambda_{A'}$ 、 $\lambda_{A''}$ の蛍光を発する特性を有している。また、蛍光試薬SNARF-1は、図3に示すように、波長 λ_B のレーザ光 L_B による励起によって、波長 $\lambda_{B'}$ 、 $\lambda_{B''}$ の蛍光を発する特性を有している。カルシウムイオン(以降「Caイオン」と表記する。)の濃度により $\lambda_{A'}/\lambda_{A''}$ の値が変化し、pHの変動により $\lambda_{B'}/\lambda_{B''}$ の値が変化する。具体的には、それぞれの蛍光波長は、 $\lambda_{A'} = 405\text{nm}$ 、 $\lambda_{A''} = 480\text{nm}$ 、 $\lambda_{B'} = 580\text{nm}$ 、 $\lambda_{B''} = 630\text{nm}$ である。

20

【0030】

共焦点ピンホール116は、標本5上におけるレーザ光の焦点位置から発生した蛍光のみを通過させるようになっている。すなわち、対物レンズ114により集光されてダイクロイックミラー111を透過した蛍光は、共焦点ピンホール116を通過することによりレーザ光の焦点位置(測定点)から光軸方向にずれた位置からの光がカットされる。これにより、光軸方向に焦点位置と同一な面からの蛍光だけがミラー117に入射する。

30

【0031】

分光素子118は、例えばプリズムや回折格子であり、標本5において発生し、ミラー117により反射された蛍光を波長毎のスペクトル成分に分光し、分光したスペクトル成分を複数セル光検出器119に入射させるようになっている。

【0032】

複数セル光検出器119は、分光素子118により分光されたスペクトル成分をそれぞれ検出する複数のセルを有しており、検出したスペクトル成分の輝度を電気信号へ変換する素子である。複数セル光検出器119には、波長毎に分割されたスペクトル成分が入射されるため、各セルにそれぞれ異なる波長の光が入射される。この複数セル光検出器119の具体例として、例えば浜松ホトニクス(株)製のH7260(32セルフオートマルチプライヤ)を用いることができる。なお、複数セル光検出器119は、外部から感度調整を行うことができるが、感度(光検出器ゲイン)は全セル一括でしか調整できないものである。

40

【0033】

複数セル光検出器119の後段には、電気信号を増幅する増幅器120がセル毎に設けられている。増幅器120は、複数セル光検出器119により変換された微弱信号を増幅することができる。この増幅器120により、各セルの回路ゲインを個別に調整することができるが、光検出器ゲインと比べてゲイン可変範囲が狭く、速度とS/Nを確保するためには10倍程度が限界である。

50

【 0 0 3 4 】

増幅器 1 2 0 の後段には、A / D 変換器 1 2 1 がセル毎に設けられている。A / D 変換器 1 2 1 は、増幅器 1 2 0 により増幅された電気信号をデジタル信号に変換するものである。

【 0 0 3 5 】

A / D 変換器 1 2 1 の後段には、C P U 1 2 2 が接続されている。C P U 1 2 2 は、複数セル光検出器 1 1 9 の複数のセルにより検出され、デジタル化されて送られてきた輝度信号を合算するようになっている。

また、C P U 1 2 2 は、音響光学素子 2 0 1 によるレーザ光の波長の切り替えに同期して複数セル光検出器 1 1 9 のゲインを切り替えるようになっている。

10

【 0 0 3 6 】

C P U 1 2 2 には、P C 3 0 0 の内部にあるパーソナルコンピュータ本体（以降「P C 本体」と表記する。）3 0 1 が接続されている。このP C 本体 3 0 1 には、ディスプレイ 3 0 2 および入力装置（セル選択部）3 0 3 が接続されている。

【 0 0 3 7 】

入力装置 3 0 3 は、ユーザによりゲイン設定、色素選択についての入力が行われるようになっており、その入力結果をP C 本体 3 0 1 に送信するようになっている。入力装置 3 0 3 により色素選択の入力を行うと、この設定はP C 本体 3 0 1 を介してC P U 1 2 2 に送られ、C P U 1 2 2 内では選択した色素に対応する合算セルの決定および合算処理が行われるようになっている。

20

【 0 0 3 8 】

また、入力装置 3 0 3 から光検出器ゲインの調整を行うと、P C 本体 3 0 1 を介して、C P U 1 2 2 によって複数セル光検出器 1 1 9 のゲインが一括調整される。また、入力装置 3 0 3 から回路ゲインの調整を行うと、P C 本体 3 0 1 を介して、C P U 1 2 2 によって増幅器 1 2 0 のゲインがセル毎に調整されるようになっている。

【 0 0 3 9 】

P C 本体 3 0 1 は、C P U 1 2 2 により合算された輝度信号に基づいてスキャン画像を生成するようになっている。

ディスプレイ 3 0 2 は、P C 本体 3 0 1 に接続されており、P C 本体 3 0 1 により生成されたスキャン画像の表示が行われるようになっている。

30

コントローラ 4 0 0 は、走査光学ユニット 1 1 3、C P U 1 2 2、および光源ユニット 2 0 0 を制御して、これら装置間の同期をとるようになっている。

【 0 0 4 0 】

上記構成を有する顕微鏡 1 の作用について以下に説明する。

ここでは、細胞内のC a イオン濃度、p H の同時測定をフレームシーケンシャルで行う場合を例に説明する。ここで、細胞機能の研究において、細胞内のC a イオン濃度変化と共にp H が重要な働きを担っているという報告があり、高速でこの二つのイオンの変化を同時測定したいという要求がある。そこで、これらのイオンを観察する蛍光色素として、I n d o - 1 およびS N A R F - 1 を用いる。

【 0 0 4 1 】

40

まず、光源ユニット 2 0 0 内の光源 A 2 0 2 ($\lambda_A = 350 \text{ nm}$) と光源 B 2 0 3 ($\lambda_B = 515 \text{ nm}$) のレーザ光のうち、C a イオン濃度の測定に必要な波長である光源 A 2 0 2 からのレーザ光 L_A が、音響光学素子 2 0 1 により選択されて出射される。レーザ光 L_A は、顕微鏡本体 1 0 0 内にあるダイクロイックミラー 1 1 1 に入射する。ここで、ダイクロイックミラー 1 1 1 は、350 nm 周辺の波長を反射する特性を有しているため、レーザ光 L_A は、ミラー 1 1 2 に向けて反射される。レーザ光 L_A は、ミラー 1 1 2 により反射されて走査光学ユニット 1 1 3 に入射する。走査光学ユニット 1 1 3 に入射したレーザ光 L_A は、走査光学ユニット 1 1 3 の動作によって偏向され、標本 5 上において2次元的に走査される。

【 0 0 4 2 】

50

走査されたレーザ光 L_A は、対物レンズ 114 に入射し、ステージ 115 上に置かれた標本 5 上に集光されて照射される。標本 5 の焦点面においては、レーザ光 L_A により標本 5 内の蛍光物質が励起されて蛍光が発生する。

【0043】

標本 5 から発せられた蛍光は、対物レンズ 114 により集光され、走査光学ユニット 113 及びミラー 112 を通過して、ダイクロイックミラー 111 に入射する。ダイクロイックミラー 111 に入射した蛍光は、ダイクロイックミラー 111 を透過し、共焦点ピンホール 116 へ導光される。

【0044】

共焦点ピンホール 116 では、標本 5 の焦点面において発生した蛍光のみを通過させ、レーザ光 L_A の焦点位置（測定点）に対して光軸方向にずれた位置からの光がカットされる。これにより、光軸方向に測定点と同一な面からの蛍光だけがミラー 117 に入射される。

10

【0045】

ミラー 117 で反射された蛍光は、分光素子 118 に入射し、波長毎のスペクトル成分に分解される。分解されたスペクトル成分は、複数セル光検出器 119 の各セルに入射し、各セルによりそれぞれの波長成分についての輝度に応じた電気信号に変換される。

【0046】

これらの電気信号は、増幅器 120 によりそれぞれ増幅され、A/D変換器 121 によりアナログ信号からデジタル信号に変換される。デジタル信号となった電気信号は CPU 122 に送られる。フレームシーケンシャルでは、この状態で走査光学ユニット 113 により 1 フレーム分走査がされるまでこの動作が続けられる。

20

【0047】

次に、光源ユニット 200 内の光源 A 202 ($\lambda_A = 350 \text{ nm}$) と光源 B 203 ($\lambda_B = 515 \text{ nm}$) のレーザ光のうち、pH の測定に必要な波長である光源 B 203 からのレーザ光 L_B が、音響光学素子 201 により選択されて出射される。レーザ光 L_B は、ダイクロイックミラー 111 に入射する。ここで、ダイクロイックミラー 111 は、515 nm 周辺の波長を反射する特性を有しているため、レーザ光 L_B はミラー 112 に向けて反射される。レーザ光 L_B は、ミラー 112 により反射されて走査光学ユニット 113 に入射する。走査光学ユニット 113 に入射したレーザ光 L_B は、走査光学ユニット 113 の動作によって偏向され、標本 5 上において 2 次的に走査される。

30

【0048】

走査されたレーザ光 L_B は、光源 A 202 からのレーザ光 L_A と同様に、対物レンズ 114 に入射し、ステージ 115 上に置かれた標本 5 上に集光されて照射される。標本 5 から発せられた蛍光は先と同じ経路で進み、波長ごとに分解され、複数セル光検出器 119 の各セルに入射する。

【0049】

そして、各セルによりそれぞれの波長成分についての輝度に応じた電気信号（電流信号）に変換される。この信号は増幅器 120 により増幅され、A/D変換器 121 によりアナログ信号からデジタル信号に変換される。デジタル信号となった電気信号は CPU 122 に送られる。走査光学ユニット 113 により 1 フレーム分走査がされるまでこの動作が続けられる。

40

【0050】

次に、CPU での制御について、図 4 および図 5 を用いて説明を行う。図 4 はシーケンシャルスキャンのフローチャート、図 5 は CPU 122 内で実行される処理を展開して示した機能ブロック図である。

【0051】

図 4 に示すように、ステップ S1 では、ユーザが入力装置 303 を用いて色素選択を行う。ここで、色素として indo-1 と SNARF-1 を使用しているため、ユーザは GUI を通じてこれら 2 色を選択する。この設定は PC 本体 301 を介して CPU 122 へ

50

送られる。

【 0 0 5 2 】

ステップ S 2 ~ ステップ S 3 は C P U 1 2 2 内での処理である。

ステップ S 2 では、C P U 1 2 2 は色素情報を受け取り、色素情報とセルとが対応付けられたデータテーブルを呼び出して、それぞれの色素に関して合算すべきセルを決定する（図 5 に示す色素選択処理）。ここでは、i n d o - 1 と S N A R F - 1 に関して合算すべきセル群を、それぞれチャンネル 1（C H 1）、チャンネル 2（C H 2）とする。

【 0 0 5 3 】

続いてステップ S 3 において、C P U 1 2 2 の処理により G U I 上に 2 色分の仮想的なセル群がチャンネル 1、チャンネル 2 としてウインドウ表示される。このウインドウ表示の一例を図 6 に示す。ここでは、色素選択を行わないで、ユーザが任意に合算するセルを決定する方法にしてもよい。この場合は仮に未登録の色素があっても対応することができる。

10

【 0 0 5 4 】

ステップ S 4 ~ ステップ S 5 はユーザが行う操作である。

ステップ S 4 では、ユーザは G U I 上で先ほど表示されたウインドウからセルを選択してスキャンを開始し、スキャン画像を見ながら回路ゲインの調整を行う（図 5 に示す回路ゲイン設定処理）。この動作を全てのセル群（チャンネル）について行う。なお、このときに表示されているスキャン画像は、対応するセルの輝度データを合算表示しているものである。

ステップ S 5 では、ユーザがシーケンシャルスキャンの開始命令を行う。

20

【 0 0 5 5 】

以降は C P U 1 2 2 内の処理である。

ステップ S 6 では、シーケンシャルスキャン開始命令を受け取ると、スキャン動作に同期して、C P U 1 2 2 により予め設定されたパラメータに基づいて、レーザ光の波長、複数セル光検出器 1 1 9 のセル合算範囲、回路ゲインをそれぞれ切り替えて、合算された輝度データを取得する。

【 0 0 5 6 】

本実施形態ではフレームシーケンシャルスキャンを行っているため、図 7 のタイミングチャートに示すように、Y ガルバノの動作に同期して、レーザ光の波長および複数セル光検出器 1 1 9 による輝度データの取得の切り替えが行われる。この動作を全てのセル群（チャンネル）についてシーケンシャルに行う。

30

【 0 0 5 7 】

最後にステップ S 7 において、得られた輝度データから、多重染色に関してのスキャン画像を表示する。

なお、ここで説明した処理方法は一例であり、異なる構成で処理を行ってもよい。

【 0 0 5 8 】

以上のように、本実施形態に係る顕微鏡 1 によれば、音響光学素子 2 0 1 によりレーザ光の波長が切り替えられ、レーザ光が標本 5 に照射されることで発生した蛍光が、分光素子 1 1 8 によりスペクトル成分に分光される。分光されたスペクトル成分は、複数のセルを有する複数セル光検出器 1 1 9 によりそれぞれ検出される。この場合において、C P U 1 2 2 によって、音響光学素子 2 0 1 によるレーザ光の波長の切り替えに同期して、複数セル光検出器 1 1 9 の回路ゲインが切り替えられる。

40

【 0 0 5 9 】

これにより、音響光学素子 2 0 1 によって切り替えられたレーザ光の波長毎に、複数セル光検出器 1 1 9 の感度を調整することができ、標本 5 上において発生した蛍光のスペクトル成分を高精度に検出することができる。また、レーザ光の波長毎に蛍光のスペクトル成分を検出することで、複数の色素からの蛍光を取得する場合（本実施形態では i n d o - 1 と S N A R F - 1）において、各色素による蛍光のスペクトル成分が重なっている場合にも、色素毎の蛍光のスペクトル分布を得ることができる。

【 0 0 6 0 】

50

また、レーザ光の波長の切り替えに同期して、選択されたセルによって検出されたスペクトル成分をCPU122により合算することで、レーザ光の波長毎に、所望の波長範囲における蛍光を取得することができる。また、選択されたセルからのデータのみを取得することで、全セルからのデータを取得する場合に比べて、取り扱うデータ量を減らすことができ、画像生成等の処理を高速化することができる。

【0061】

また、CPU122が、増幅器120の回路ゲイン、すなわち複数セル光検出器119の各セルにより検出されたスペクトル成分の増幅率をそれぞれ調整することで、各セルの検出感度に応じた増幅率でスペクトル成分を増幅することができ、鮮明な画像を取得することができる。

10

【0062】

[第1の変形例]

本実施形態に係る顕微鏡1の第1の変形例として、回路ゲインを切り替える代わりに、光検出器ゲイン(HV)を切り替えることにより(図5に示す光検出器ゲイン設定処理)、シーケンシャルスキャンを行うこととしてもよい。あるいは、検出器ゲインと回路ゲインを併用してシーケンシャルスキャンを行うこととしてもよい。

【0063】

このようにすることで、音響光学素子201によって切り替えられたレーザ光の波長毎に、複数セル光検出器119の各セルの感度を一括して調整することができ、標本5からの蛍光の検出精度を向上させ、鮮明な画像を取得することができる。

20

【0064】

また、光検出器ゲインのダイナミックレンジは広いため、色素間の輝度差が大きいサンプルにおいても、回路ゲインで調整する場合と比較して、S/Nを向上させることができる。

光検出器ゲインは、複数セルに対して1つしかないが、シーケンシャルにデータを取得するため、色素間の輝度差の大きいサンプルにおいても、データを取得することができ、通常の同時観察では観察できないサンプルの変化などを観察することができる。

なお、検出器ゲインと回路ゲインを併用することで、さらに鮮明な画像を取得することができる。

【0065】

30

本変形例において、光検出器ゲインを切り替えた時に得られる輝度値が安定するまでに時間がかかる場合は、フレーム間にインターバル(待機時間)を設けてスキャンを行ってもよい。インターバルを設けた場合のタイミングチャートを図8に示す。ここでは、インターバルを例えば10msと設定する。

【0066】

複数セル光検出器119の感度が安定する前に画像を生成すると、データが不正確になってしまう場合がある。したがって、CPU122が複数セル光検出器119の感度を調整した際に、その感度が安定するまで待機した後に、標本5からの蛍光を検出することで、精度の高い画像を取得することができる。

【0067】

40

[第2の変形例]

本実施形態に係る顕微鏡1の第2の変形例として、ラインシーケンシャルスキャンで画像を取得することとしてもよい。このラインシーケンシャルスキャンでは、ラインごとに照射波長の切り替え、合算セル組み合わせの変更、ゲインの切り替えを行うことができる。

【0068】

この場合はXガルバノの動作に同期して、レーザ光の波長、複数セル光検出器119のセル合算範囲、およびゲインの切り替えが行われる。すなわち、図7、図8においてYガルバノとして示している波形がXガルバノの波形になる。

このようにすることで、フレームシーケンシャルスキャンでは観察できないような色素

50

間の速い変化を観察することができる。

【 0 0 6 9 】

[第 3 の変形例]

本実施形態に係る顕微鏡 1 の第 3 の変形例として、画像取得の際、指定したセルの分だけ輝度データを取得するのではなく、全セルについての輝度データを取得し、その後、合算するセルを選択することとしてもよい。この場合、スキャン後にデータを見ながらユーザが任意に合算範囲を選択するなどの処理を行う。

【 0 0 7 0 】

具体的には、図 9 に示すように、スキャン 1 回目における蛍光のスペクトル分布が F 1、スキャン 2 回目における蛍光のスペクトル分布が F 2 である場合を例に挙げて説明する。この場合、複数セル光検出器 119 の全セルによる輝度データの取得後に、例えばチャンネル 1 の合算範囲をセル a ~ i、チャンネル 2 の合算範囲をセル g ~ p と設定する。

10

【 0 0 7 1 】

このようにすることで、スキャンした後、データを見ながら任意にセルの合算範囲を選択することができるため、実験後のデータ処理における自由度を向上することができる。

【 0 0 7 2 】

[第 4 の変形例]

本実施形態に係る顕微鏡 1 の第 4 の変形例として、レーザ光の切り替えおよびゲインの切り替えを標本上の照射領域毎に行うこととしてもよい。

具体的には、図 10 に示すように、標本 5 上において波長 λ_A のレーザ光 L_A が照射される領域を領域 A、標本 5 上において波長 λ_B のレーザ光 L_B が照射される領域を領域 B とした場合に、これら領域 A と領域 B とで回路ゲインまたは光検出器ゲインを切り替えて、合算された輝度データを取得する。

20

【 0 0 7 3 】

このようにすることで、退色を抑えて鮮明な画像を取得するとともに、レーザ光 L_A およびレーザ光 L_B が照射される領域を観察に必要な最小面積とすることができ、走査時間の短縮ができる。

【 0 0 7 4 】

[第 5 の変形例]

本実施形態に係る顕微鏡 1 の第 5 の変形例として、第 4 の変形例において、同一波長のレーザ光による照射領域が複数個所ある場合に、同一波長のレーザ光が照射された領域においてもゲインを変えることとしてもよい。

30

【 0 0 7 5 】

具体的には、図 11 に示すように、標本 5 上において波長 λ_A のレーザ光 L_A が照射される領域を領域 A 1、A 2、標本 5 上において波長 λ_B のレーザ光 L_B が照射される領域を領域 B 1、B 2 とした場合に、これら領域 A 1、A 2、B 1、B 2 の全てにおいて回路ゲインまたは光検出器ゲインを切り替えて、合算された輝度データを取得する。

【 0 0 7 6 】

このように領域毎にゲインを切り替えることで、蛍光輝度が異なる細胞でもコントラストの高い画像を取得することができ、観察精度を向上することができる。

40

【 0 0 7 7 】

以上、本発明の実施形態について図面を参照して詳述してきたが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲の設計変更等も含まれる。

例えば、本実施形態において、波長の異なる 2 種類のレーザ光を用いた場合について説明したが、3 種類以上のレーザ光を採用し、それぞれの波長に同期して複数セル光検出器 119 のゲインを切り替えることとしてもよい。

【 符号の説明 】

【 0 0 7 8 】

1 レーザ走査型顕微鏡

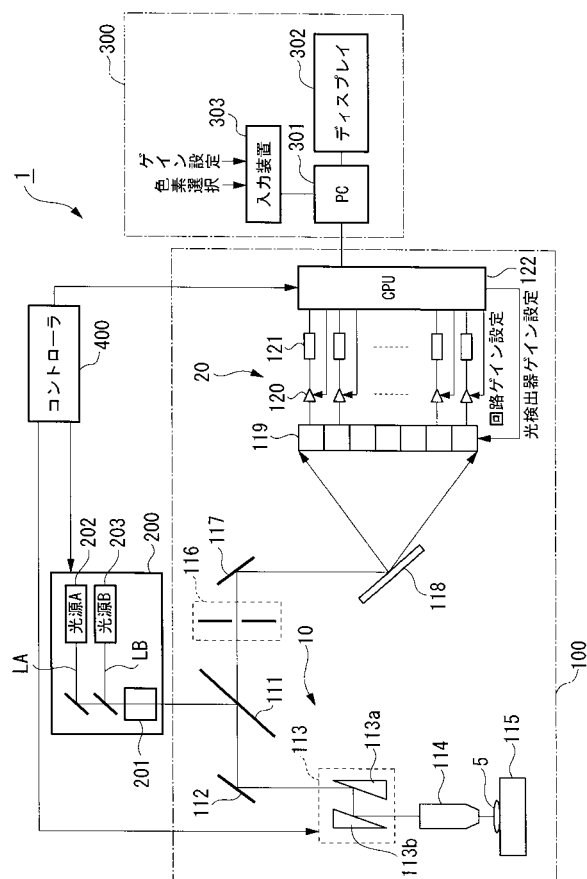
50

- 5 標本
- 10 照射光学系
- 20 検出光学系
- 100 顕微鏡本体
- 111 ダイクロイックミラー
- 112 ミラー
- 113 走査光学ユニット
- 114 対物レンズ
- 115 ステージ
- 116 共焦点ピンホール
- 117 ミラー
- 118 分光素子（分光手段）
- 119 複数セル光検出器（光検出器）
- 120 増幅器
- 121 A / D 変換器
- 122 CPU（ゲイン切替手段、合算部）
- 200 光源ユニット
- 201 音響光学素子（波長選択手段）
- 202 光源 A
- 203 光源 B
- 300 パーソナルコンピュータ（PC）
- 301 PC 本体
- 302 ディスプレイ
- 303 入力装置
- 400 コントローラ

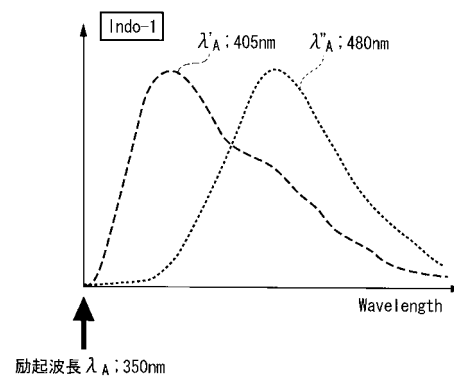
10

20

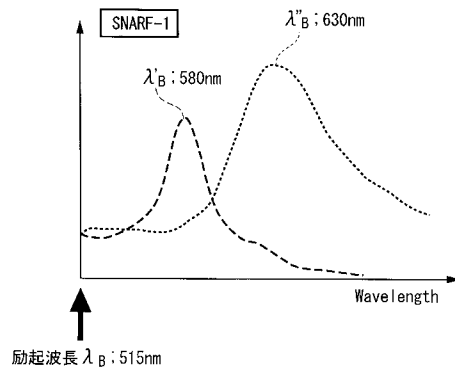
【図 1】



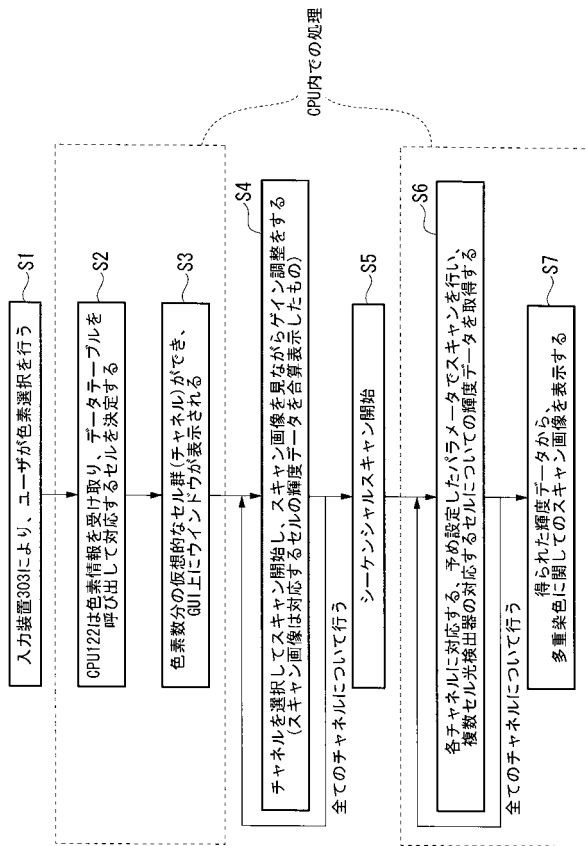
【図 2】



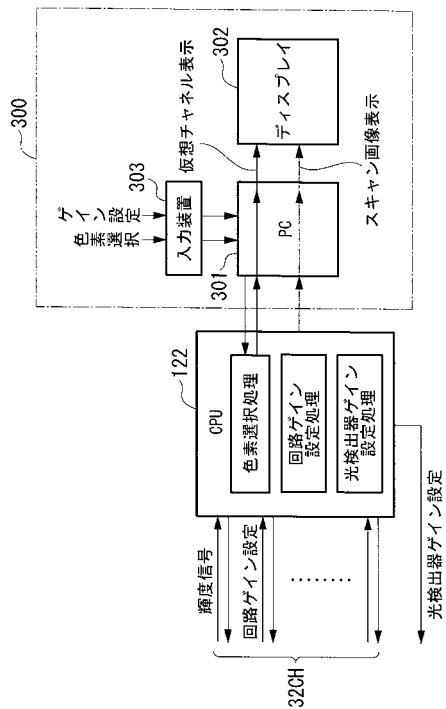
【 図 3 】



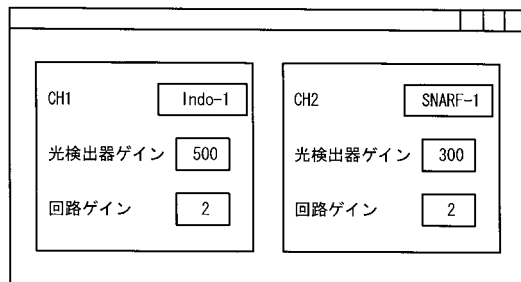
【 図 4 】



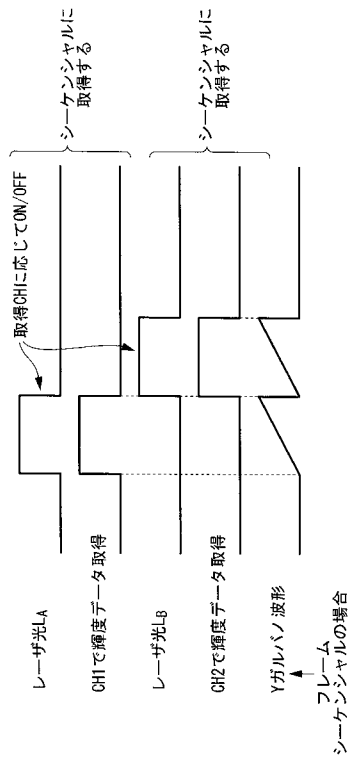
【 図 5 】



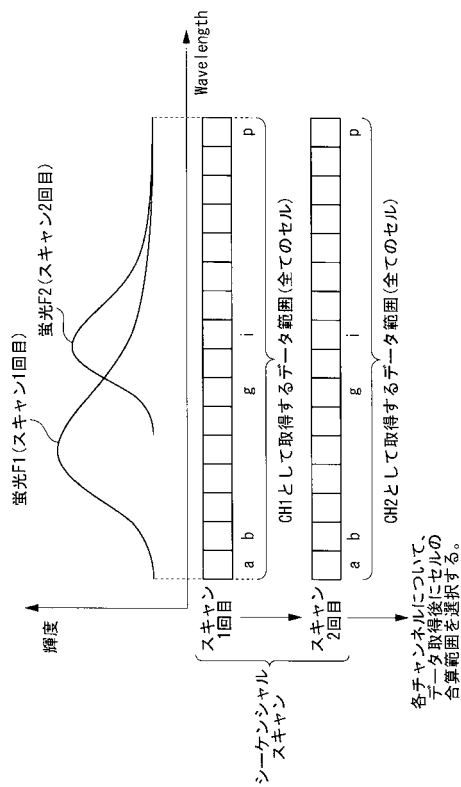
【 図 6 】



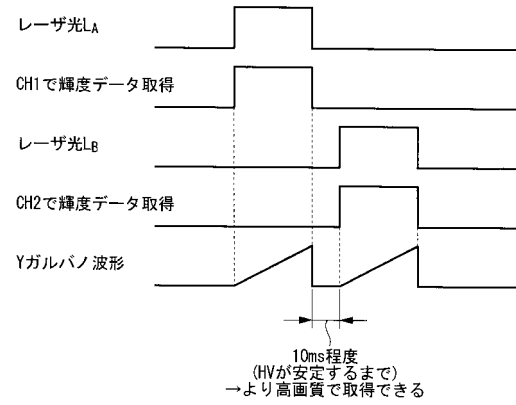
【図 7】



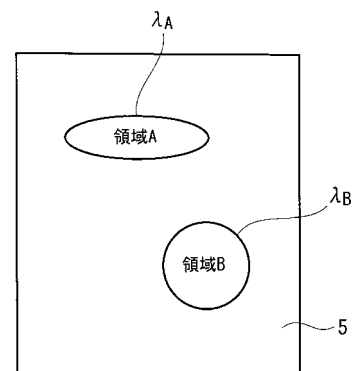
【図 9】



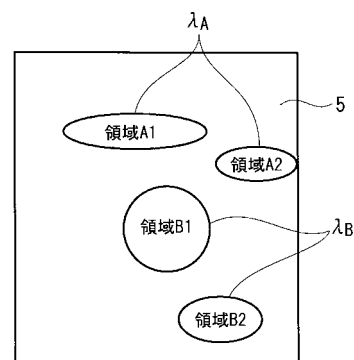
【図 8】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開2009-244156(JP,A)
特開平11-183806(JP,A)
特開2006-119152(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G02B 21/36
G01N 21/64