(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-8055
(P2012-8055A)
(43)公開日　平成24年1月12日(2012.1.12)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 21/64	(2006.01)	G01N 21/64	Z	2G043

審査請求 未請求　請求項の数 22　ＯＬ　（全 20 頁）

(21)出願番号　特願2010-145607 (P2010-145607)
(22)出願日　平成22年6月25日 (2010.6.25)

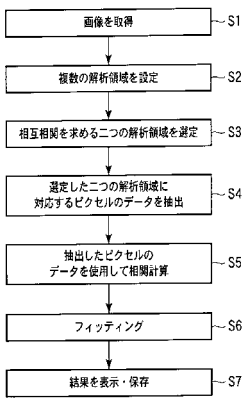
(71)出願人　000000376
オリンパス株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷２丁目４３番２号
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊
(74)代理人　100091351
弁理士　河野　哲
(74)代理人　100088683
弁理士　中村　誠
(74)代理人　100109830
弁理士　福原　淑弘
(74)代理人　100075672
弁理士　峰　隆司
(74)代理人　100095441
弁理士　白根　俊郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】画像解析方法および画像解析装置

(57)【要約】
【課題】異なる領域間の分子の動きを評価し得る画像解析方法を提供する。
【解決手段】Ｓ１～Ｓ３：空間的に異なる複数の解析領域の画像を取得する。解析領域の各画像は、時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成されている。Ｓ４～Ｓ６：解析領域の画像のピクセルのデータを使用して二つの解析領域の相互相関を求める。
【選択図】図５

図５



【特許請求の範囲】
【請求項１】
空間的に異なる複数の解析領域の画像を取得する解析領域画像取得ステップを有し、前記解析領域の各画像は、時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成されており、さらに、
前記解析領域の画像のピクセルのデータを使用して二つの解析領域の相互相関を求める相関解析ステップとを有する画像解析方法。
【請求項２】
前記解析領域画像取得ステップは、
前記解析領域を含む観察領域の画像を取得する観察領域画像取得ステップを有し、前記観察領域の画像は、同時又は時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成されており、さらに、
前記観察領域の画像に対して前記解析領域を設定する解析領域設定ステップと、
前記観察領域の画像から前記解析領域に対応するピクセルのデータを抽出するデータ抽出ステップとを有する請求項１に記載の画像解析方法。
【請求項３】
前記観察領域画像取得ステップは、前記観察領域の複数フレームの画像を取得する請求項２に記載の画像解析方法。
【請求項４】
前記解析領域画像取得ステップは、複数の光学系を使用して前記解析領域の画像をそれぞれ取得する請求項１に記載の画像解析方法。
【請求項５】
前記解析領域画像取得ステップは、前記解析領域の画像を同時に取得する請求項４に記載の画像解析方法。
【請求項６】
前記解析領域画像取得ステップは、前記解析領域の複数フレームの画像を取得する請求項４に記載の画像解析方法。
【請求項７】
前記相関解析ステップは、蛍光強度、ピクセル時間、ライン時間、フレーム時間、ピクセル位置関係、ピクセルサイズまたはそれについての統計値を使用して相互相関を求める請求項３または６に記載の画像解析方法。
【請求項８】
前記相関解析ステップは、前記データの平均値、最大値、最小値、相対差または絶対差のいずれかを使用して相互相関を求める請求項１に記載の画像解析方法。
【請求項９】
前記相関解析ステップは、前記データを再構成して得た再構成データを使用して相互相関を求める請求項１に記載の画像解析方法。
【請求項１０】
前記解析領域の各画像は二次元画像であり、相互相関を求める前記二つの解析領域は解析領域１と解析領域２であり、前記相関解析ステップは、下記の式（１）を用いて相関計算を行ない、前記相関計算の結果に対して下記の式（２）を用いてフィッティングを行なって二次元解析領域の相互相関を求める請求項１に記載の画像処理方法、
【数１】

$$G_s(\xi,\psi)=\frac{\sum I_1(x,y)*I_2(x+\xi,y+\psi)/M_{12}}{\left(\sum I_1(x,y)/M_1\right)\left(\sum I_2(x,y)/M_2\right)} \qquad \cdots(1)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、I_1は解析領域１の画像のピクセルのデータ、I_2は解析領域２の画像のピクセルのデータ、ｘ，ｙは測定点の空間的座標、ξ，ψは測定点からの空間的座標の変化量、M_{12}は解析領域１と解析領域２のデータの積和計算の回数、M_1は解析領域１のデータ総数、M_2は解析領域２のデータ総数である、

【数２】

$$G_s(\xi,\psi) = S(\xi,\psi) * G(\xi,\psi)$$

$$S(\xi,\psi) = \exp\left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi\delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi\delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \cdots(2)$$

$$G(\xi,\psi) = \frac{1}{N}\left(\left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi)}{W_0^2} \right)^{-1} * \left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi)}{W_Z^2} \right)^{-1/2} \right)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相関値、ＳはＲＩＣＳの解析におけるスキャンの影響、ＧはＲＩＣＳの解析における時間遅延の影響、Ｄは拡散定数、δ_rはピクセルサイズ、Ｎは分子数、ξ，ψは測定点からの空間的座標の変化量、W_0は励起レーザビームの横方向の半径、W_Zは励起レーザビームの縦方向の半径、τ_pはピクセル時間、τ_lはライン時間である。

【請求項１１】

前記解析領域の各画像は三次元画像であり、相互相関を求める前記二つの解析領域は解析領域１と解析領域２であり、前記相関解析ステップは、下記の式（３）を用いて相関計算を行ない、前記相関計算の結果に対して下記の式（４）を用いてフィッティングを行なって三次元解析領域の相互相関を求める請求項１に記載の画像処理方法、

【数３】

$$G_s(\xi,\psi,\eta) = \frac{\sum I_1(x,y,z) * I_2(x+\xi, y+\psi, z+\eta)/M_{12}}{\left(\sum I_1(x,y,z)/M_1\right)\left(\sum I_2(x,y,z)/M_2\right)} \quad \cdots(3)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、I_1は解析領域１の画像のピクセルのデータ、I_2は解析領域２の画像のピクセルのデータ、ｘ，ｙ，ｚは測定点の空間的座標、ξ，ψ，ηは測定点からの空間的座標の変化量、M_{12}は解析領域１と解析領域２中のデータの積和計算の回数、M_1は解析領域１のデータ総数、M_2は解析領域２のデータ総数である、

【数４】

$$G_s(\xi,\psi,\eta) = S(\xi,\psi,\eta) * G(\xi,\psi,\eta)$$

$$S(\xi,\psi,\eta) = \exp\left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi\delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi\delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\eta\delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi + \tau_f\eta)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \cdots(4)$$

$$G(\xi,\psi,\eta) = \frac{1}{N}\left(\left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi + \tau_f\eta)}{W_0^2} \right)^{-1} * \left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi + \tau_f\eta)}{W_Z^2} \right)^{-1/2} \right)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、ＳはＲＩＣＳの解析におけるスキャンの影響

、ＧはＲＩＣＳの解析における時間遅延の影響、Ｄは拡散定数、δ_rはピクセルサイズ、Ｎは分子数、ξ，ψ，ηは空間的座標の変化量、W_0は励起レーザビームの横方向の半径、W_Zは励起レーザビームの縦方向の半径、τ_pはピクセル時間、τ_lはライン時間、τ_fはフレーム時間である。

【請求項１２】

空間的に異なる複数の解析領域の画像を取得する解析領域画像取得部を有し、前記解析領域の各画像は、時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成されており、さらに、

前記解析領域の画像のピクセルのデータを使用して二つの解析領域の相互相関を求める相関解析処理部とを有する画像解析装置。

【請求項１３】

前記解析領域画像取得部は、

前記解析領域を含む観察領域の画像を取得する観察領域画像取得部を有し、前記観察領域の画像は、時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成されており、さらに、

前記観察領域の画像に対して前記解析領域を設定する解析領域設定部と、

前記観察領域の画像から前記解析領域に対応するピクセルのデータを抽出するデータ抽出部とを有する請求項１２に記載の画像解析装置。

【請求項１４】

前記観察領域画像取得部は、前記観察領域の複数フレームの画像を取得する請求項１３に記載の画像解析装置。

【請求項１５】

前記解析領域画像取得部は、前記解析領域の画像をそれぞれ取得する複数の光学系を有する請求項１２に記載の画像解析装置。

【請求項１６】

前記解析領域画像取得部は、前記解析領域の画像を同時に取得する請求項１５に記載の画像解析装置。

【請求項１７】

前記解析領域画像取得部は、前記解析領域の複数フレームの画像を取得する請求項１５に記載の画像解析装置。

【請求項１８】

前記相関解析部は、蛍光強度、ピクセル時間、ライン時間、フレーム時間、ピクセル位置関係、ピクセルサイズまたはそれについての統計値を使用して相互相関を求める請求項１４または請求項１７に記載の画像解析装置。

【請求項１９】

前記相関解析部は、前記データの平均値、最大値、最小値、相対差または絶対差のいずれかを使用して相互相関を求める請求項１２に記載の画像解析装置。

【請求項２０】

前記相関解析部は、前記データを再構成して得た再構成データを使用して相互相関を求める請求項１２に記載の画像解析装置。

【請求項２１】

前記解析領域の各画像は二次元画像であり、相互相関を求める前記二つの解析領域は解析領域１と解析領域２であり、前記相関解析部は、下記の式（１）を用いて相関計算を行ない、前記相関計算の結果に対して下記の式（２）を用いてフィッティングを行なって二次元解析領域の相互相関を求める請求項１２に記載の画像処理装置、

【数５】

$$G_s(\xi,\psi) = \frac{\sum I_1(x,y) * I_2(x+\xi, y+\psi)/M_{12}}{\left(\sum I_1(x,y)/M_1\right)\left(\sum I_2(x,y)/M_2\right)} \qquad \cdots(5)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、I_1は解析領域１の画像のピクセルのデータ

、I_2は解析領域２の画像のピクセルのデータ、ｘ，ｙは測定点の空間的座標、ξ，ψは測定点からの空間的座標の変化量、M_{12}は解析領域１と解析領域２のデータの積和計算の回数、M_1は解析領域１のデータ総数、M_2は解析領域２のデータ総数である、

【数６】

$$G_s(\xi,\psi) = S(\xi,\psi) * G(\xi,\psi)$$

$$S(\xi,\psi) = \exp\left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi\,\delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi\,\delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi)}{W_0^2} \right)} \right) \qquad \cdots(6)$$

$$G(\xi,\psi) = \frac{1}{N}\left(\left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi)}{W_0^2} \right)^{-1} * \left(1 + \frac{4D(\tau_p\xi + \tau_l\psi)}{W_Z^2} \right)^{-1/2} \right)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相関値、ＳはＲＩＣＳの解析におけるスキャンの影響、ＧはＲＩＣＳの解析における時間遅延の影響、Ｄは拡散定数、δ_rはピクセルサイズ、Ｎは分子数、ξ，ψは測定点からの空間的座標の変化量、W_0は励起レーザビームの横方向の半径、W_Zは励起レーザビームの縦方向の半径、τ_pはピクセル時間、τ_lはライン時間である。

【請求項２２】

前記解析領域の各画像は三次元画像であり、相互相関を求める前記二つの解析領域は解析領域１と解析領域２であり、前記相関解析部は、下記の式（３）を用いて相関計算を行ない、前記相関計算の結果に対して下記の式（４）を用いてフィッティングを行なって三次元解析領域の相互相関を求める請求項１２に記載の画像処理装置、

【数７】

$$G_s(\xi,\psi,\eta) = \frac{\sum I_1(x,y,z) * I_2(x+\xi, y+\psi, z+\eta)/M_{12}}{\left(\sum I_1(x,y,z)/M_1\right)\left(\sum I_2(x,y,z)/M_2\right)} \qquad \cdots(7)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、I_1は解析領域１の画像のピクセルのデータ、I_2は解析領域２の画像のピクセルのデータ、ｘ，ｙ，ｚは測定点の空間的座標、ξ，ψ，ηは測定点からの空間的座標の変化量、M_{12}は解析領域１と解析領域２中のデータの積和計算の回数、M_1は解析領域１のデータ総数、M_2は解析領域２のデータ総数である、

【数８】

$$G_s(\xi,\psi,\eta) = S(\xi,\psi,\eta) * G(\xi,\psi,\eta)$$

$$S(\xi,\psi,\eta) = \exp\left(-\frac{\frac{1}{2}*\left[\left(\frac{2\xi\delta_r}{W_0}\right)^2+\left(\frac{2\psi\delta_r}{W_0}\right)^2+\left(\frac{2\eta\delta_r}{W_0}\right)^2\right]}{\left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi+\tau_f\eta)}{W_0^2}\right)}\right) \quad \cdots(8)$$

$$G(\xi,\psi,\eta) = \frac{1}{N}\left(\left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi+\tau_f\eta)}{W_0^2}\right)^{-1} * \left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi+\tau_f\eta)}{W_Z^2}\right)^{-1/2}\right)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、ＳはＲＩＣＳの解析におけるスキャンの影響、ＧはＲＩＣＳの解析における時間遅延の影響、Ｄは拡散定数、δ_rはピクセルサイズ、Ｎは分子数、ξ，ψ，ηは空間的座標の変化量、W_0は励起レーザビームの横方向の半径、W_Zは励起レーザビームの縦方向の半径、τ_pはピクセル時間、τ_lはライン時間、τ_fはフレーム時間である。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、画像解析方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

従来、蛍光相関分光分析法（ＦＣＣＳ）と呼ばれる画像解析の手法が知られている。ＦＣＣＳは、たとえば非特許文献１に示されている。ＦＣＣＳでは、試料中の一つまたは複数の測定点に対して、ある程度の時間のあいだ（たとえば１０秒間）励起光を継続的に照射し、測定点から発する蛍光の強度の揺らぎを検出して相関解析を行なうことによって分子数や拡散定数の推定を行なう。

【０００３】

また、ラスターイメージ相関分光法（ＲＩＣＳ：Raster Image Correlation Spectroscopy）と呼ばれる画像解析の手法も知られている。ＲＩＣＳはたとえば非特許文献２に示されている。ＲＩＣＳでは、１フレーム以上のラスター走査画像を取得する。ラスター走査画像はたとえば蛍光画像であってよい。蛍光画像の各ピクセルのデータは、対応する試料中の点から発生した蛍光の強度の情報を表す。ピクセルのデータは、それぞれ取得された時間および取得された位置が異なる。

【０００４】

これらのピクセルのデータを用いて空間自己相関解析することによって分子の揺らぎによる相関特性が得られる。分子の相関特性からは拡散定数や分子数を求めることができる。拡散定数からは分子拡散時間を求めることができる。分子拡散時間からは分子量を求めることができる。

【０００５】

このように、空間自己相関解析をすることによって分子量や分子数等を評価することができるため、分子間の相互作用を観察することが可能である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】
【特許文献１】特開２００７－０９３２７７号公報
【非特許文献】
【０００７】
【非特許文献１】「Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope」, Michelle A. Digman, Claire M. Brown, Parijat Sengupta, Paul W. Wiseman, Alan R. Horwitz, and Enrico Gratton, Biophysical Journal, Vol.89, P1317-1327, August 2005.
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
ＦＣＣＳは、試料中の測定点に対して励起光を照射する時間が比較的長いため、試料が損傷を受けやすい。また、解析できる対象が、拡散時間の短いものに限られ、拡散時間の比較的長いものに対しては適用できない。
【０００９】
これに対してＲＩＣＳは、試料の各点に励起光を照射する時間が短いため、試料に与えるダメージが少ない。またＲＩＣＳは、拡散時間の比較的長いものに対して有効に適用できる。
【００１０】
これまでのＲＩＣＳによる解析は、一つの領域の画像データを用いて分子の拡散時間（または分子数）を算出している。解析結果は、その領域内の分子の動きを評価したものである。このような解析は、異なる領域間の分子の動きを評価することはできない。
【００１１】
本発明は、異なる領域間の分子の動きを評価し得る画像解析方法を提供する。
【課題を解決するための手段】
【００１２】
本発明による画像解析方法は、空間的に異なる複数の解析領域の画像を取得する解析領域画像取得ステップを有する。解析領域の各画像は、同時または時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成されている。画像解析方法はさらに、前記解析領域の画像のピクセルのデータを使用して二つの解析領域の相互相関を求める相関解析ステップを有する。
【発明の効果】
【００１３】
本発明によれば、異なる領域間の分子の動きを評価し得る画像解析方法が提供される。
【図面の簡単な説明】
【００１４】
【図１】本発明の第一実施形態による画像解析装置を概略的に示している。
【図２】図１に示される制御部の機能ブロックを示している。
【図３】二次元画像の蛍光画像の例を示す。
【図４】三次元画像の蛍光画像の例を示す。
【図５】本発明の第一実施形態による画像解析のフローチャートである。
【図６】観察領域とそこに設定された複数の解析領域を示している。
【図７】観察領域と相互相関を求める二つの解析領域を示している。
【図８】試料中の分子に関する空間相互相関値の計算結果を輝度で示した画像である。
【図９】図８の空間相互相関値の計算結果のフィッティング結果を示している。
【図１０】試料中の分子に関する空間相互相関値の計算結果を輝度で示した画像である。
【図１１】図１０の空間相互相関値の計算結果のフィッティング結果を示している。
【図１２】本発明の第二実施形態による画像解析装置を概略的に示している。
【図１３】図１２に示される制御部の機能ブロックを示している。
【発明を実施するための形態】

【００１５】
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。
【００１６】
＜第一実施形態＞
[装置構成]
図１は、本発明の第一実施形態による画像解析装置を概略的に示している。この画像解析装置は、試料の蛍光観察のための走査型共焦点光学顕微鏡をベースに構成されている。
【００１７】
図１に示すように、画像解析装置１００は、試料Ｓに光たとえば励起光を照射する光照射部１１０と、試料Ｓからの光たとえば蛍光を検出する光検出部１３０と、画像解析に必要な制御を行なう制御部１６０と、試料Ｓを支持する試料ステージ１９０とを有している。
【００１８】
試料Ｓはマイクロプレートやスライドガラスなどの試料容器に収容され、試料ステージ１９０に載置される。試料ステージ１９０は、たとえば、試料Ｓを光照射部１１０および光検出部１３０に対して横方向（ｘｙ方向）および高さ方向（ｚ方向）に移動可能に支持する。たとえば、試料ステージ１９０は、出力軸が互いに直交する三つのステッピング・モーターを含んでおり、これらのステッピング・モーターによって試料Ｓをｘｙｚ方向に移動し得る。
【００１９】
画像解析装置１００は、たとえば、多重光照射・多重光検出型である。このため、光照射部１１０はｎチャンネルの光源ユニット１１１を含み、光検出部１３０はｍチャンネルの光検出ユニット１３１を含んでいる。光源ユニット１１１は、ｎ個のチャンネルを有し、ｎ種類の異なる波長の励起光を射出し得る。また光検出ユニット１３１は、ｍ個のチャンネルを有し、ｍ種類の異なる波長の蛍光を検出し得る。光源ユニット１１１は必ずしも複数のチャンネルを有している必要はなく、１つのチャンネルだけを有していてもよい。また光検出ユニット１３１も必ずしも複数のチャンネルを有している必要はなく、１つのチャンネルだけを有していてもよい。
【００２０】
光照射部１１０のｎチャンネルの光源ユニット１１１は、光源１１２ａ，…，１１２ｎとコリメートレンズ１１４ａ，…，１１４ｎとダイクロイックミラー１１６ａ，…，１１６ｎとを含んでいる。光源１１２ａ，…，１１２ｎは、試料Ｓに含まれる蛍光色素を励起して試料Ｓから光（蛍光）を発せさせるための励起光を発する。光源１１２ａ，…，１１２ｎから発せられる励起光の波長は、試料Ｓに含まれる蛍光色素の種類に対応して、互いに相違している。光源１１２ａ，…，１１２ｎは、たとえば、試料Ｓ中の蛍光色素に合った発振波長のレーザー光源で構成される。コリメートレンズ１１４ａ，…，１１４ｎは、それぞれ、光源１１２ａ，…，１１２ｎから発せられた励起光をコリメートする。ダイクロイックミラー１１６ａ，…，１１６ｎは、それぞれ、コリメートレンズ１１４ａ，…，１１４ｎを通過した励起光を同じ方向に反射する。ダイクロイックミラー１１６ａ，…，１１６ｎは、それぞれ、図１の上方から入射する励起光を透過し、図１の右方から入射する励起光を反射する。その結果、光源１１２ａ，…，１１２ｎからそれぞれ射出された異なる波長の励起光は、ダイクロイックミラー１１６ａの通過後に一本のビームに合成される。ダイクロイックミラー１１６ｎは、励起光を透過する必要がないので、単なるミラーに変更されてもよい。
【００２１】
光照射部１１０はさらに、ダイクロイックミラー１２２とガルバノミラー１２４と対物レンズ１２６と対物レンズ駆動機構１２８を含んでいる。ダイクロイックミラー１２２は、光源ユニット１１１からの励起光をガルバノミラー１２４に向けて反射し、試料Ｓから発せられる蛍光を透過する。ガルバノミラー１２４は、励起光を対物レンズ１２６に向けて反射するとともに、その反射方向を変更する。対物レンズ１２６は、励起光を収束して

試料Ｓ内の測定点に照射するとともに、試料Ｓ内の測定点からの光を取り込む。対物レンズ１２６には、微小な共焦点領域（測定点）の形成のために、ＮＡ（開口数）の大きいものが使用される。これにより得られる共焦点領域の大きさは、直径０．６μｍ程度（ｘｙ面内）、長さ２μｍ程度（ｚ方向）の略円筒状となる。ガルバノミラー１２４は、測定点をｘｙ方向に走査するｘｙ走査機構を構成している。ｘｙ走査機構は、ガルバノミラーを使用して構成するほかに、音響光学変調素子（ＡＯＭ）やポリゴンミラー、ホログラムスキャナーなどを使用して構成してもよい。対物レンズ駆動機構１２８は、対物レンズ１２６を光軸に沿って移動させる。これにより、測定点がｚ方向に移動される。つまり、対物レンズ駆動機構１２８は、測定点をｚ方向に走査するｚ走査機構を構成している。

【００２２】

光検出部１３０は、対物レンズ１２６とガルバノミラー１２４とダイクロイックミラー１２２を光照射部１１０と共有している。光検出部１３０はさらに、収束レンズ１３２とピンホール１３４とコリメートレンズ１３６とを含んでいる。収束レンズ１３２は、ダイクロイックミラー１２２を透過した光を収束する。ピンホール１３４は、収束レンズ１３２の焦点に配置されている。つまり、ピンホール１３４は、試料Ｓ内の測定点に対して共役な位置にあり、測定点からの光だけを選択的に通す。コリメートレンズ１３６は、ピンホール１３４を通過した光を平行にする。コリメートレンズ１３６を通過した光は、ｍチャンネルの光検出ユニット１３１に入射する。

【００２３】

ｍチャンネルの光検出ユニット１３１は、ダイクロイックミラー１３８ａ，…，１３８ｍと蛍光フィルター１４０ａ，…，１４０ｍと光検出器１４２ａ，…，１４２ｍとを含んでいる。ダイクロイックミラー１３８ａ，…，１３８ｍは、それぞれ、検出対象の蛍光の波長域付近の波長の光を選択的に反射する。ダイクロイックミラー１３８ｍは、光を透過する必要がないので、単なるミラーに変更されてもよい。蛍光フィルター１４０ａ，…，１４０ｍは、それぞれ、ダイクロイックミラー１３８ａ，…，１３８ｍによって反射された光から、不所望な波長成分の光を遮断し、光源１１２ａ，…，１１２ｎからの励起光によって生成された蛍光だけを選択的に透過する。蛍光フィルター１４０ａ，…，１４０ｍを透過した蛍光はそれぞれ光検出器１４２ａ，…，１４２ｍに入射する。光検出器１４２ａ，…，１４２ｍは、入射した光の強度に対応した信号を出力する。すなわち、光検出器１４２ａ，…，１４２ｍは、試料Ｓ内の測定点からの蛍光強度信号を出力する。

【００２４】

制御部１６０はたとえばパーソナルコンピューターで構成される。制御部１６０は、試料Ｓの観察領域の蛍光画像の取得・記憶・表示、解析領域の設定などの入力待ち、画像の解析処理（相関値の計算や分子数・拡散時間の推定など）を行なう。また制御部１６０は、ｘｙ走査機構であるガルバノミラー１２４、ｚ走査機構である対物レンズ駆動機構１２８、試料ステージ１９０などの制御を行なう。

【００２５】

図１に示される制御部の機能ブロックを図２に示す。制御部１６０は、図２に示すように、走査制御部１６２と画像形成部１６４と記憶部１６６と表示部１６８と入力部１７０と解析領域設定部１７２とデータ抽出部１７４と解析処理部１７６とステージ制御部１８０とを含んでいる。走査制御部１６２と画像形成部１６４と記憶部１６６とステージ制御部１８０は、上述した光照射部１１０と光検出部１３０と共働して観察領域画像取得部を構成する。この観察領域画像取得部はさらに、解析領域設定部１７２とデータ抽出部１７４と共働して解析領域画像取得部を構成する。

【００２６】

走査制御部１６２は、試料Ｓの蛍光画像を取得する際、励起光の照射位置を試料Ｓに対してラスター走査するようにガルバノミラー１２４を制御する。走査制御部１６２はまた、必要であれば、励起光の照射位置を試料Ｓに対してｚ走査するように対物レンズ駆動機構１２８を制御する。画像形成部１６４は、走査制御部１６２から入力される励起光の照射位置の情報と光検出器１４２ａ，…，１４２ｍの出力信号とから試料Ｓの蛍光画像を形

成する。これにより、蛍光画像が取得される。記憶部１６６は、画像形成部１６４で形成された蛍光画像を記憶する。表示部１６８は、試料Ｓの蛍光画像や解析処理結果を表示する。入力部１７０は、たとえばマウスやキーボードを含み、表示部１６８と共同してＧＵＩを構成する。このＧＵＩは、観察領域や解析領域の設定などに利用される。ステージ制御部１８０は、たとえば観察領域を設定するために、入力部１７０からの入力情報にしたがって試料ステージ１９０を制御する。解析領域設定部１７２は、入力部１７０からの入力情報にしたがって解析領域を設定する。データ抽出部１７４は、相関を求める二つの解析領域のデータを抽出する。解析処理部１７６は、二つの解析領域の画像のピクセルのデータを使用して相互相関を求める。解析処理部１７６の処理の詳細は後述する。

【００２７】

図１において、光源１１２ａ，…，１１２ｎから発せられた励起光は、コリメートレンズ１１４ａ，…，１１４ｎとダイクロイックミラー１１６ａ，…，１１６ｎとダイクロイックミラー１２２とガルバノミラー１２４と対物レンズ１２６を経て試料Ｓ内の測定点に照射される。励起光が照射される測定点は、ガルバノミラー１２４によってｘｙ方向にラスター走査される。また必要であれば、一回のラスター走査が終了するたびに、対物レンズ駆動機構１２８によってｚ走査される。測定点は観察領域の全体にわたって走査される。励起光を受けた試料Ｓは測定点から蛍光を発する。試料Ｓからの光（蛍光のほかに不所望な反射光などを含む）は、対物レンズ１２６とガルバノミラー１２４とダイクロイックミラー１２２と収束レンズ１３２を経てピンホール１３４に至る。ピンホール１３４は測定点と共役な位置にあるため、試料Ｓ内の測定点からの光だけがピンホール１３４を通過する。ピンホール１３４を通過した光すなわち試料Ｓ内の測定点からの光はコリメートレンズ１３６を経てｍチャンネルの光検出ユニット１３１に入射する。ｍチャンネルの光検出ユニット１３１に入射した光は、ダイクロイックミラー１３８ａ，…，１３８ｍによって波長にしたがって分離される（つまり分光される）とともに、蛍光フィルター１４０ａ，…，１４０ｍによって不所望な成分が除去される。蛍光フィルター１４０ａ，…，１４０ｍを通過した蛍光は光検出器１４２ａ，…，１４２ｍにそれぞれ入射する。光検出器１４２ａ，…，１４２ｍは、それぞれ、入射光すなわち試料Ｓ内の測定点から発せられた蛍光の強度を示す蛍光強度信号を出力する。この蛍光強度信号は画像形成部１６４に入力される。画像形成部１６４は、入力される蛍光強度信号をｘｙ方向（およびｚ方向）の位置情報に同期させて処理して、試料Ｓ内の観察領域の蛍光画像を形成する。形成された蛍光画像は、記憶部１６６に保存される。記憶部１６６に保存された蛍光画像は、そのまま表示部１６８に表示されるか、解析処理部１７６によって処理され、解析処理結果が表示部１６８に表示される。

【００２８】

[観察領域と空間相関計算式]

観察領域の蛍光画像は、時系列的に取得された複数のデータを有する複数のピクセルから構成される。測定点は、実際には、ｘｙｚ方向に空間的広がりを有しており、ピクセルは、この測定点の空間的広がりに対応した大きさを有する。観察領域が二次元的領域である場合、蛍光画像は、ｘｙ方向に大きさを持つピクセルが二次元的に配列された二次元画像である。また観察領域が三次元的領域である場合、蛍光画像は、ｘｙｚ方向に大きさを持つピクセルが三次元的に配列された三次元画像である。三次元画像はまた、別の見方をすれば、ｚ位置の異なる複数フレームの二次元画像から構成される。

【００２９】

二次元画像の例を図３に示す。図３において、τ_pは、あるピクセルとこれに隣接する次のピクセルとの間の取得時間のずれ（ピクセル時間）である。すなわち、ピクセル時間τ_pは、１ピクセルのデータを取得するのに要する時間である。またτ_lは、あるラインの最初のピクセルとその次のラインの最初のピクセルとの間の取得時間のずれ（ライン時間）である。すなわち、ライン時間τ_lは、１ラインを走査するのに要する時間を意味する。

【００３０】

次式（１）は、二次元画像に対する使用するＲＩＣＳの解析に使用する空間相互相関計算式を表している。式（１）は、解析領域１と解析領域２の相互相関計算式の例である。

【００３１】

【数１】

$$G_s(\xi,\psi) = \frac{\sum I_1(x,y) * I_2(x+\xi, y+\psi)/M_{12}}{\left(\sum I_1(x,y)/M_1\right)\left(\sum I_2(x,y)/M_2\right)} \qquad \cdots(1)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、I_1は解析領域１の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、I_2は解析領域２の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、ｘ，ｙは測定点の空間的座標、ξ，ψは測定点からの空間的座標の変化量、M_{12}は解析領域１と解析領域２のデータの積和計算の回数、M_1は解析領域１のデータ総数、M_2は解析領域２のデータ総数である。

【００３２】

次式（２）は、二次元画像に対するＲＩＣＳの解析に使用するフィッティング式を表している。

【００３３】

【数２】

$$G_s(\xi,\psi) = S(\xi,\psi) * G(\xi,\psi)$$

$$S(\xi,\psi) = \exp\left(-\frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi\delta_r}{W_0}\right)^2 + \left(\frac{2\psi\delta_r}{W_0}\right)^2\right]}{\left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi)}{W_0^2}\right)}\right) \qquad \cdots(2)$$

$$G(\xi,\psi) = \frac{1}{N}\left(\left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi)}{W_0^2}\right)^{-1} * \left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi)}{W_Z^2}\right)^{-1/2}\right)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、ＳはＲＩＣＳの解析におけるスキャンの影響、ＧはＲＩＣＳの解析における時間遅延の影響、Ｄは拡散定数、δ_rはピクセルサイズ、Ｎは分子数、ξ，ψは測定点からの空間的座標の変化量、W_0は励起レーザビームの横方向の半径、W_Zは励起レーザビームの縦方向の半径、τ_pはピクセル時間、τ_lはライン時間である。

【００３４】

三次元画像の例を図４に示す。図４において、τ_pはピクセル時間、τ_lはライン時間、τ_fは、あるフレームの最初のピクセルとその次のフレームの最初のピクセルとの間の取得時間のずれ（フレーム時間）である。すなわち、フレーム時間τ_fは、１フレームを走査するのに要する時間を意味する。

【００３５】

次式（３）は、三次元画像に対するＲＩＣＳの解析に使用する空間相互相関計算式を表している。式（３）は、解析領域１と解析領域２の相互相関計算式の例である。

【００３６】

【数３】

$$G_s(\xi,\psi,\eta) = \frac{\sum I_1(x,y,z) * I_2(x+\xi, y+\psi, z+\eta)/M_{12}}{\left(\sum I_1(x,y,z)/M_1\right)\left(\sum I_2(x,y,z)/M_2\right)} \qquad \cdots(3)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、I_1は解析領域１の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、I_2は解析領域２の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、ｘ，ｙ，ｚは測定点の空間的座標、ξ，ψ，ηは測定点からの空間的座標の変化

量、M_{12}は解析領域１と解析領域２中のデータの積和計算の回数、M_1は解析領域１のデータ総数、M_2は解析領域２のデータ総数である。

【００３７】

次式（４）は、三次元画像に対するＲＩＣＳの解析に使用するフィッティング式を表している。

【００３８】

【数４】

$$G_s(\xi,\psi,\eta) = S(\xi,\psi,\eta) * G(\xi,\psi,\eta)$$

$$S(\xi,\psi,\eta) = \exp\left(-\frac{\frac{1}{2}*\left[\left(\frac{2\xi\delta_r}{W_0}\right)^2+\left(\frac{2\psi\delta_r}{W_0}\right)^2+\left(\frac{2\eta\delta_r}{W_0}\right)^2\right]}{\left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi+\tau_f\eta)}{W_0^2}\right)}\right) \quad \cdots(4)$$

$$G(\xi,\psi,\eta) = \frac{1}{N}\left(\left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi+\tau_f\eta)}{W_0^2}\right)^{-1} * \left(1+\frac{4D(\tau_p\xi+\tau_l\psi+\tau_f\eta)}{W_Z^2}\right)^{-1/2}\right)$$

ここで、G_sはＲＩＣＳの空間相互相関値、ＳはＲＩＣＳの解析におけるスキャンの影響、ＧはＲＩＣＳの解析における時間遅延の影響、Ｄは拡散定数、δ_rはピクセルサイズ、Ｎは分子数、ξ，ψ，ηは空間的座標の変化量、W_0は励起レーザビームの横方向の半径、W_Zは励起レーザビームの縦方向の半径、τ_pはピクセル時間、τ_lはライン時間、τ_fはフレーム時間である。

【００３９】

[測定手順]

以下、図５を参照しながら画像解析の手順について説明する。また、各ステップについて、適宜、図６～図１１を参照しながら説明する。

【００４０】

（ステップＳ１）

試料Ｓの観察領域の１フレームまたは複数フレームの蛍光画像を取得する。蛍光画像は、光源ユニット１１１の１つのチャンネルと、それに対応する光検出ユニット１３１の１つのチャンネルとを介して取得したものである。観察領域は二次元の領域または三次元の領域あり、それに対応して蛍光画像は二次元画像または三次元画像である。二次元画像の場合、図３に示した一枚の蛍光画像が１フレームにあたる。また三次元画像の場合、図４に示した複数枚の蛍光画像が１フレームにあたる。蛍光画像の各ピクセルのデータは、たとえば、対応する測定点から発せられる蛍光の強度である。

【００４１】

（ステップＳ２）

図６に示すように、各フレームの観察領域の蛍光画像に対して複数の解析領域を設定する。複数の解析領域は、空間的に異なる領域であり、通常、互いに離れていて重複していない。解析領域は、二次元の観察領域に対しては二次元の領域であり、三次元の観察領域に対しては、通常、三次元の領域であるが、二次元の領域であってもよい。なお、図６は１つの細胞の内部を示しており、中央部の楕円の部分Ａが核を示している。

【００４２】

（ステップＳ３）

図７に示すように、１フレームの観察領域の蛍光画像に対して、空間相互相関を求める

二つの解析領域（解析領域１と解析領域２）を選定する。ここでは、解析領域１として核の内側の領域Ｘを、解析領域２として核の外側の領域Ｙを選定している。

【００４３】

（ステップＳ４）

二つの解析領域（解析領域１と解析領域２）に対応するピクセルのデータを抽出する。

【００４４】

（ステップＳ５）

抽出したピクセルのデータを使用して相関計算を行なう。二次元画像に対しては式（１）の空間相互相関計算式を使用する。また三次元画像に対しては式（３）の空間相互相関計算式を使用する。

【００４５】

相関計算に使用する各ピクセルのデータは、そのピクセルのデータそのものであってもよいし、そのピクセルを含む複数のピクセルのデータの統計値であってもよい。複数のピクセルは、たとえば、注目のピクセルおよびこれに隣接するピクセルであってよい。統計値は、たとえば、ピクセルのデータの平均値、最大値、最小値、相対差、絶対差、相対比のいずれかであってよい。どのような統計値を使用するかは、ＲＩＣＳの解析によってどのような情報を得たいかによって決める。

【００４６】

また相関計算に使用するデータは、ピクセル時間、ライン時間、フレーム時間、ピクセル位置関係、ピクセルサイズまたはそれについての統計値であってもよい。

【００４７】

また相関計算は、ピクセルのデータに基づいて画像をそれぞれ再構成し、再構成した画像について相関計算してもよい。たとえば、隣のピクセルのデータ同士を足して、ピクセルのデータの数を半分にする。または、一つのピクセルのデータを複数に分割する。本来ならば、一度画像を取得するとピクセルのデータの数は増えないが、取得したピクセルのデータの強度がそのピクセルのデータの周囲にガウシアン分布で広がっていると仮定して、本来取得できていないピクセルのデータを補う。本質的にピクセルのデータの数が増えている訳ではないが、見た目が良くなる。

【００４８】

（ステップＳ６）

ステップＳ５の相関計算の結果に対してフィッティングを行なって、分子数と拡散時間の少なくとも一方を推定する。二次元画像に対しては式（２）のフィッティング式を使用し、三次元画像に対しては式（４）のフィッティング式を使用する。

【００４９】

具体的には、式（１）または式（３）を使用して異なる遅延時間に対する相互相関値G_sをそれぞれ求める。そして、相互相関値G_sと遅延時間との関係から、式（２）または式（４）を使用して、拡散定数と分子数を求める。

【００５０】

実際に分子数と拡散定数は、式（２）および式（４）の理論値を測定値を使った相関演算の結果と残差比較すること（フィッティング）で求める。フィッティングでは、まず、（ａ）所定の拡散定数Ｄと分子数Ｎを用いて、理論値として得られるG_s（以下、理論相関値G_sとする）を算出する。そして、（ｂ）理論相関値G_sと測定値として得られる相関値G_s（以下、測定相関値G_sとする）との比較を行ない、両者の残差を算出する。続いて、（ｃ）理論相関値G_sにおける拡散定数Ｄと分子数Ｎを変化させて、新たな理論相関値G_sを算出する。続いて、（ｄ）新たな理論相関値G_sと測定相関値G_sとの比較を行ない、両者の残差を算出する。続いて、（ｅ）上記の（ｂ）で得られた残差と（ｄ）で得られた残差を比較して、残差が大きくなったか小さくなったかを判定する。このように、フィッティングでは、理論相関値G_sにおける拡散定数Ｄと分子数Ｎを変化させながら（ｂ）～（ｅ）を繰り返し行ない、測定相関値G_sと理論相関値G_sとの残差が最小となる理論相関値G_sを最終的に求める。最終的に得られた理論相関値G_sにおける拡散定数

Ｄと分子数Ｎが、測定相関値Ｇ$_s$における拡散定数Ｄと分子数Ｎとなる。このように、式（２）または式（４）によるフィッティングとは、理論相関値Ｇ$_s$における拡散定数Ｄと分子数Ｎを変動させながら、二次元または三次元の観察領域における最適な分子数または拡散定数を推定することである。

【００５１】

拡散定数と拡散時間との間には、次式（５）で表される関係がある。したがって、求めた拡散定数から拡散時間を求めることができる。

【数５】

$$\tau = W_0^2 / 4D \qquad \cdots(5)$$

【００５２】

（ステップＳ７）

分子数または拡散定数の画像を表示し保存する。解析結果の一例を図８～図１１に示す。図８と図１０は、試料Ｓ中のある分子に関する空間相互相関値の計算結果を画像としてＣＲＴに表示した例であり、図９と図１１は、それぞれ、図８と図１０の空間相互相関値の計算結果のフィッティング結果を示している。図８と図１０では、空間相互相関値の大きさをＣＲＴの輝度で示している。なお、図８と図１０では、輝度（空間相互相関値）の変化が分かるように等高線で示している。また、図８（図９）と図１０（図１１）とでは、二つの解析領域の組み合わせが相違している。図８と図９の解析結果では、解析領域１（図６の領域Ｘ）と解析領域２（図６の領域Ｙ）との間の分子の動きが比較的速いことが読み取れる。また、図１０と図１１の解析結果では、解析領域１（図６の領域Ｘ）と解析領域２（図６の領域Ｚ）との間の分子の動きが比較的遅いことが読み取れる。

【００５３】

以上で、一つの組み合わせの二つの解析領域に対する画像の解析処理が終了する。必要であれば、別の組み合わせの二つの解析領域に対してもステップＳ３～ステップＳ７の操作を繰り返す。または、別のフレームの観察領域の蛍光画像に対してもステップＳ３～ステップＳ７の操作を繰り返す。

【００５４】

本実施形態によれば、試料Ｓ内の異なる領域間の分子の動きを評価することが可能になる。さらに、解析領域の組み合わせを次々に変更しながら空間相互相関を求めることによって、試料Ｓ内の異なる領域間の分子の動きを二次元的または三次元的に把握することも可能になる。たとえば、一つの解析領域とその周囲に位置する複数の解析領域との各組み合わせに対して空間相互相関を求めることによって、その一つの解析領域とその周囲の複数の解析領域との間の分子の動きを二次元的または三次元的に把握することも可能になる。

【００５５】

本実施形態では、走査型共焦点光学顕微鏡によって蛍光画像を得ている。この場合、画像の形成は時系列的に形成されるので、解析領域１の蛍光画像が得られた時刻と、解析領域２の蛍光画像が得られた時刻は異なる。そのため、時系列的に得られた蛍光画像では、移動速度が比較的遅い分子について、その動きを評価することができる。なお、画像の形成が同時に行なわれる場合（ＣＣＤやＣＭＯＳ等の２次元撮像素子による撮像）は、解析領域１の蛍光画像が得られた時刻と、解析領域２の蛍光画像が得られた時刻は同じになる。この場合は、移動速度が比較的速い分子について、その動きを評価することができる。

【００５６】

＜第二実施形態＞

図１２は、本発明の第二実施形態による画像解析装置を概略的に示している。この画像解析装置は、試料の蛍光観察のための走査型共焦点光学顕微鏡をベースに構成されている。

【００５７】

図１２に示すように、画像解析装置２００は、試料Ｓに光たとえば励起光をそれぞれ照

射する二つの光照射部２１０Ａ，２１０Ｂと、試料Ｓからの光たとえば蛍光をそれぞれ検出する二つの光検出部２３０Ａ，２３０Ｂと、画像解析に必要な制御を行なう制御部２６０と、試料Ｓを支持する試料ステージ２９０とを有している。光照射部２１０Ａ，２１０Ｂは、それぞれ、試料Ｓ内の異なる領域に光を照射する。光検出部２３０Ａ，２３０Ｂは、それぞれ、光照射部２１０Ａ，２１０Ｂによって励起光が照射された領域からの光を検出する。

【００５８】

試料Ｓはマイクロプレートやスライドガラスなどの試料容器に収容され、試料ステージ２９０に載置される。試料ステージ２９０の詳細は、第一実施形態の試料ステージ１９０と同様である。

【００５９】

光照射部２１０Ａ，２１０Ｂは、それぞれ、光源ユニット２１１Ａ，２１１Ｂとダイクロイックミラー２２２Ａ，２２２Ｂとガルバノミラー２２４Ａ，２２４Ｂと対物レンズ２２６Ａ，２２６Ｂと対物レンズ駆動機構２２８Ａ，２２８Ｂを含んでいる。各光源ユニット２１１Ａ，２１１Ｂと各ダイクロイックミラー２２２Ａ，２２２Ｂと各ガルバノミラー２２４Ａ，２２４Ｂと各対物レンズ２２６Ａ，２２６Ｂと各対物レンズ駆動機構２２８Ａ，２２８Ｂの詳細は、それぞれ、第一実施形態の光源ユニット１１１とダイクロイックミラー１２２とガルバノミラー１２４と対物レンズ１２６と対物レンズ駆動機構１２８と同様である。

【００６０】

光検出部２３０Ａ，２３０Ｂは、それぞれ、対物レンズ２２６Ａ，２２６Ｂとガルバノミラー２２４Ａ，２２４Ｂとダイクロイックミラー２２２Ａ，２２２Ｂを光照射部２１０Ａ，２１０Ｂと共有している。光検出部２３０Ａ，２３０Ｂはさらに、それぞれ、収束レンズ２３２Ａ，２３２Ｂとピンホール２３４Ａ，２３４Ｂとコリメートレンズ２３６Ａ，２３６Ｂと光検出ユニット２３１Ａ，２３１Ｂとを含んでいる。各収束レンズ２３２Ａ，２３２Ｂと各ピンホール２３４Ａ，２３４Ｂと各コリメートレンズ２３６Ａ，２３６Ｂと各光検出ユニット２３１Ａ，２３１Ｂは、それぞれ、第一実施形態の収束レンズ１３２とピンホール１３４とコリメートレンズ１３６と光検出ユニット１３１と同様である。

【００６１】

制御部２６０はたとえばパーソナルコンピューターで構成される。制御部２６０は、蛍光画像の取得・記憶・表示、解析領域の設定などの入力待ち、画像の解析処理、ｘｙ走査機構であるガルバノミラー２２４Ａ，２２４Ｂ、ｚ走査機構である対物レンズ駆動機構２２８Ａ，２２８Ｂ、試料ステージ２９０などの制御を行なう。

【００６２】

図１２に示される制御部の機能ブロックを図１３に示す。制御部２６０は、図１３に示すように、走査制御部２６２Ａ，２６２Ｂと画像形成部２６４Ａ，２６４Ｂと記憶部２６６と表示部２６８と入力部２７０と解析処理部２７６とステージ制御部２８０とを含んでいる。走査制御部２６２Ａ，２６２Ｂと画像形成部２６４Ａ，２６４Ｂと記憶部２６６とステージ制御部２８０は、上述した光照射部２１０Ａ，２１０Ｂと光検出部２３０Ａ，２３０Ｂと共働して解析領域画像取得部を構成する。

【００６３】

走査制御部２６２Ａ，２６２Ｂは、それぞれ、励起光の照射位置を試料Ｓの観察領域にラスター走査するようにガルバノミラー２２４Ａ，２２４Ｂを制御する。走査制御部２６２Ａ，２６２Ｂはまた、必要であれば、それぞれ、励起光の照射位置を試料Ｓに対してｚ走査するように対物レンズ駆動機構２２８Ａ，２２８Ｂを制御する。画像形成部２６４Ａ，２６４Ｂは、それぞれ、走査制御部２６２Ａ，２６２Ｂから入力される励起光の照射位置の情報と光検出ユニット２３１Ａ，２３１Ｂの出力信号とから試料Ｓの蛍光画像を形成する。これにより、蛍光画像が取得される。記憶部２６６は、画像形成部２６４Ａ，２６４Ｂで形成された蛍光画像を記憶する。表示部２６８は、試料Ｓの蛍光画像や解析処理結果を表示する。入力部２７０は、たとえばマウスやキーボードを含み、表示部２６８と共

同してＧＵＩを構成する。このＧＵＩは、観察領域の設定などに利用される。ステージ制御部２８０は、たとえば観察領域を設定するために、入力部２７０からの入力情報にしたがって試料ステージ２９０を制御する。解析処理部２７６は、画像形成部２６４Ａ，２６４Ｂで取得された二つの観察領域の画像のピクセルのデータを使用して相互相関を求める。

【００６４】

光照射部２１０Ａ，２１０Ｂと光検出部２３０Ａ，２３０Ｂと走査制御部２６２Ａ，２６２Ｂと画像形成部２６４Ａ，２６４Ｂとによる各観察領域の蛍光画像の取得は、第一実施形態による蛍光画像の取得と同様の手法によって行なわれる。二つの観察領域の蛍光画像は、同時に取得されても、時間をずらして取得されてもよい。

【００６５】

解析処理部２７６による画像の解析処理は、第一実施形態における二つの解析領域の画像が画像形成部２６４Ａ，２６４Ｂで取得された二つの観察領域の画像に代わるほかは、第一実施形態の解析処理部１７６による画像の解析処理と同様に行なわれる。

【００６６】

本実施形態によっても、第一実施形態と同様の利点が得られる。また二つの観察領域の蛍光画像を同時に取得することによって、より正確な空間相互相関を得ることができる。

【００６７】

これまで、図面を参照しながら本発明の実施形態を述べたが、本発明は、これらの実施形態に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において様々な変形や変更が施されてもよい。

【００６８】

たとえば、実施形態では、試料Ｓからの発生する蛍光を検出して構築した画像つまり蛍光画像の解析について説明したが、解析対象の画像は蛍光画像に限らない。解析対象の画像は、蛍光画像のほかに、たとえば、りん光、反射光、可視光、化学発光、生物発光、散乱光を検出して構築した画像であってもよい。

【００６９】

また実施形態では、ラスター走査によって取得された画像について説明したが、画像は、ラスター走査によって取得されたものに限定されるものではなく、ピクセルのデータが時系列的に取得された複数のピクセルからなる画像であればよく、他の走査方法によって取得されたものであってもよい。

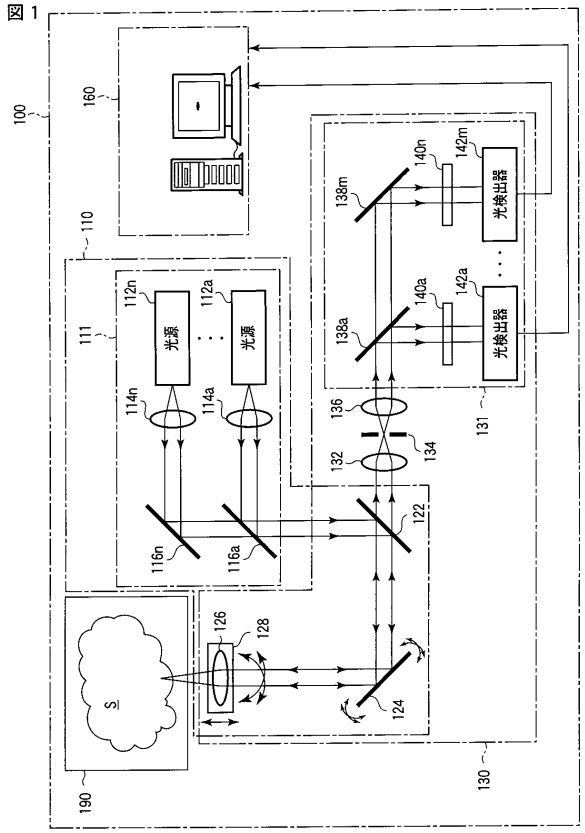
【符号の説明】

【００７０】

１００…画像解析装置、１１０…光照射部、１１１…光源ユニット、１１２ａ，…，１１２ｎ…光源、１１４ａ，…，１１４ｎ…コリメートレンズ、１１６ａ，…，１１６ｎ…ダイクロイックミラー、１２２…ダイクロイックミラー、１２４…ガルバノミラー、１２６…対物レンズ、１２８…対物レンズ駆動機構、１３０…光検出部、１３１…光検出ユニット、１３２…収束レンズ、１３４…ピンホール、１３６…コリメートレンズ、１３８ａ，…，１３８ｍ…ダイクロイックミラー、１４０ａ，…，１４０ｍ…蛍光フィルター、１４２ａ，…，１４２ｍ…光検出器、１６０…制御部、１６２…走査制御部、１６４…画像形成部、１６６…記憶部、１６８…表示部、１７０…入力部、１７２…解析領域設定部、１７４…データ抽出部、１７６…解析処理部、１８０…ステージ制御部、１９０…試料ステージ、２００…画像解析装置、２１０Ａ，２１０Ｂ…光照射部、２１１Ａ，２１１Ｂ…光源ユニット、２２２Ａ，２２２Ｂ…ダイクロイックミラー、２２４Ａ，２２４Ｂ…ガルバノミラー、２２６Ａ，２２６Ｂ…対物レンズ、２２８Ａ，２２８Ｂ…対物レンズ駆動機構、２３０Ａ，２３０Ｂ…光検出部、２３１Ａ，２３１Ｂ…光検出ユニット、２３２Ａ，２３２Ｂ…収束レンズ、２３４Ａ，２３４Ｂ…ピンホール、２３６Ａ，２３６Ｂ…コリメートレンズ、２６０…制御部、２６２Ａ，２６２Ｂ…走査制御部、２６４Ａ，２６４Ｂ…画像形成部、２６６…記憶部、２６８…表示部、２７０…入力部、２７６…解析処理部、２８０…ステージ制御部、２９０…試料ステージ。

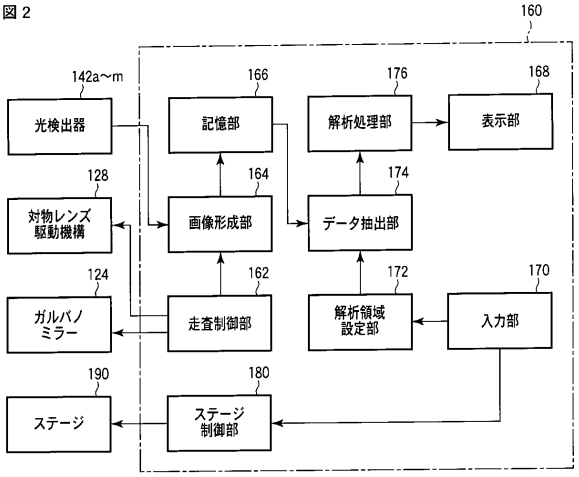
【図１】

図1



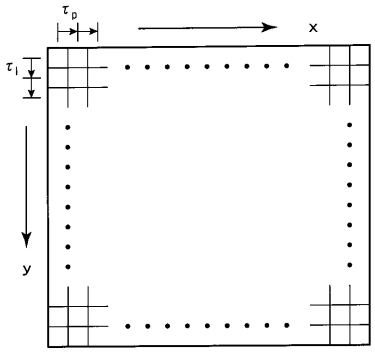
【図２】

図2



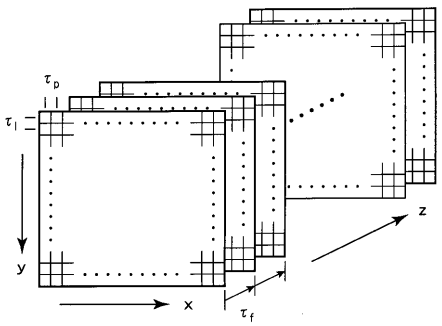
【図３】

図3



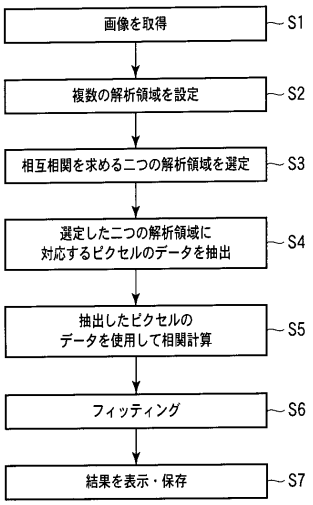
【図４】

図4



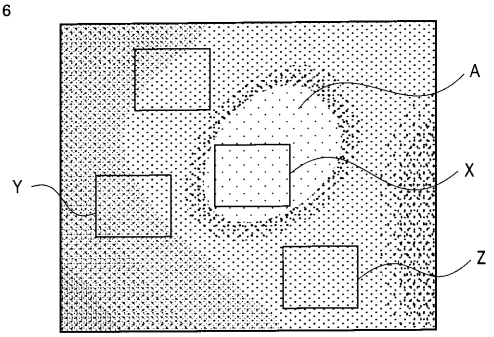
【図５】

図5



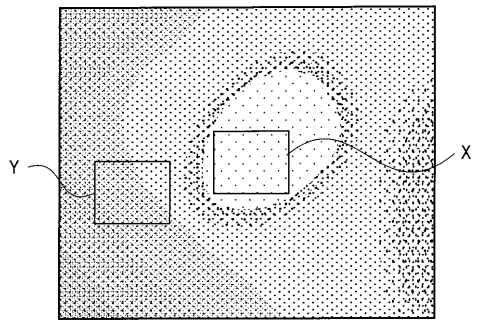
【図６】

図6



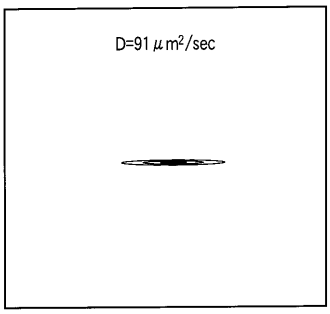
【図７】

図7



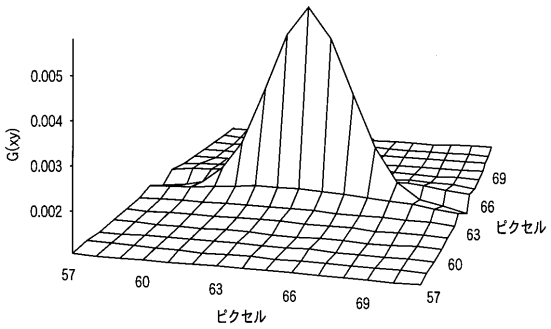
【図８】

図8



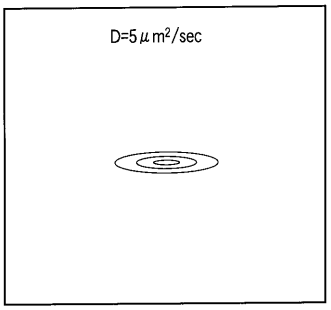
【図９】

図9



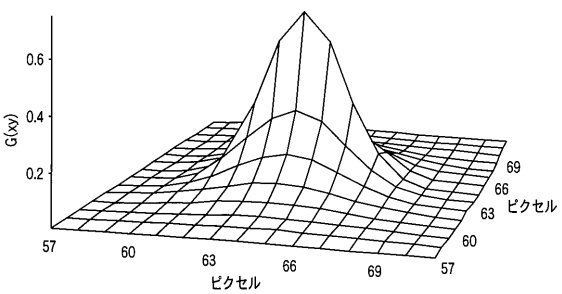
【図１０】

図10



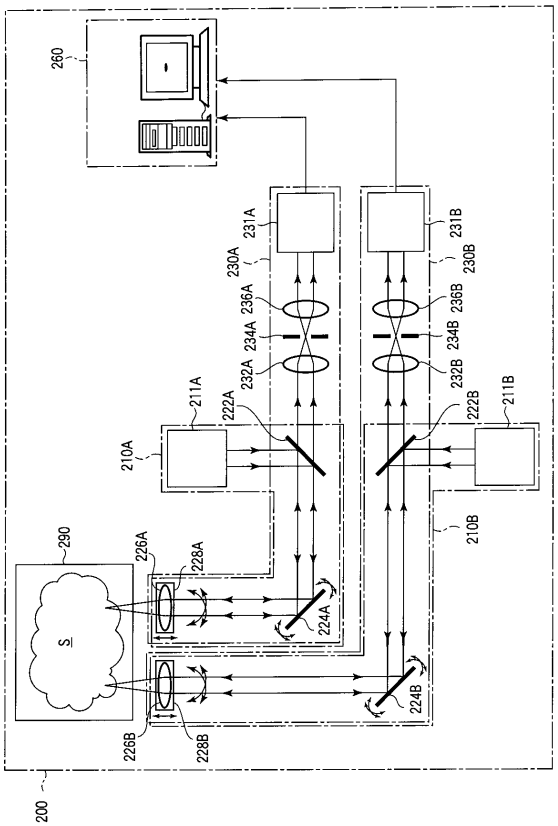
【図１１】

図11



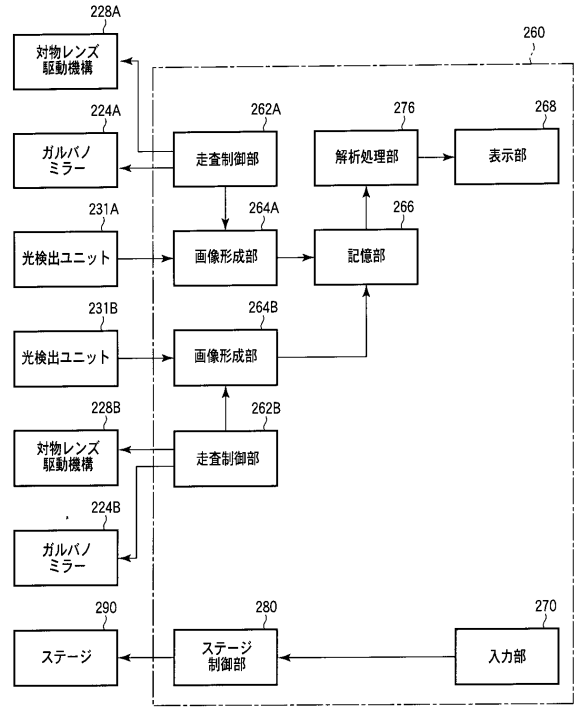
【図１２】

図12



【図１３】

図 13


228A
対物レンズ駆動機構
260
224A
ガルバノミラー
262A
走査制御部
276
解析処理部
268
表示部
231A
光検出ユニット
264A
画像形成部
266
記憶部
231B
光検出ユニット
264B
画像形成部
228B
対物レンズ駆動機構
262B
走査制御部
224B
ガルバノミラー
290
ステージ
280
ステージ制御部
270
入力部

フロントページの続き

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
(74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久
(74)代理人 100119976
弁理士 幸長 保次郎
(74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
(74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
(74)代理人 100101812
弁理士 勝村 紘
(74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志
(74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志
(74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子
(74)代理人 100134290
弁理士 竹内 将訓
(74)代理人 100127144
弁理士 市原 卓三
(74)代理人 100141933
弁理士 山下 元
(72)発明者 鈴木 明美
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

Ｆターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 EA14 FA03 HA01 HA02 HA09 JA02 LA01
NA01 NA02