

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5856814号  
(P5856814)

(45) 発行日 平成28年2月10日 (2016. 2. 10)

(24) 登録日 平成27年12月18日 (2015. 12. 18)

(51) Int. Cl.

GO 1 N 21/64 (2006.01)

F I

GO 1 N 21/64

Z

請求項の数 44 (全 26 頁)

|           |                               |           |                  |
|-----------|-------------------------------|-----------|------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2011-246462 (P2011-246462)  | (73) 特許権者 | 000000376        |
| (22) 出願日  | 平成23年11月10日 (2011. 11. 10)    |           | オリンパス株式会社        |
| (65) 公開番号 | 特開2013-104674 (P2013-104674A) |           | 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 |
| (43) 公開日  | 平成25年5月30日 (2013. 5. 30)      | (74) 代理人  | 100108855        |
| 審査請求日     | 平成26年11月7日 (2014. 11. 7)      |           | 弁理士 蔵田 昌俊        |
|           |                               | (74) 代理人  | 100159651        |
|           |                               |           | 弁理士 高倉 成男        |
|           |                               | (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         |

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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数のピクセルから構成された少なくとも1フレームの画像を取得する画像取得ステップと、

前記少なくとも1フレームの画像に対して少なくとも1つの解析領域を設定する解析領域設定ステップと、

各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、

複数の相関計算にそれぞれ使用するデータペアの複数の時間間隔を設定する時間間隔設定ステップと、

抽出データを使用して前記複数の時間間隔のおのおのに対して相関計算をおこなう相関計算ステップと、

前記相関計算ステップによる複数の相関計算結果のおのおのに対してフィッティングをおこなうフィッティングステップを有している、画像解析方法。

【請求項 2】

前記画像取得ステップは、複数フレームの画像を取得し、

前記解析領域設定ステップは、各フレームの画像に対して1つの解析領域を設定し、前記解析領域は、各フレームの画像内の同じ領域である、請求項1に記載の画像解析方法。

【請求項 3】

前記相関計算ステップは、同じフレームの画像内の同じ解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなうことを含む、請求項2に記載の画像解析方法。

10

20

## 【請求項 4】

前記相関計算ステップは、異なるフレームの画像内の同じ解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなうことを含む、請求項 2 に記載の画像解析方法。

## 【請求項 5】

前記画像取得ステップは、複数フレームの画像を取得し、

前記解析領域設定ステップは、各フレームの画像に複数の解析領域を設定し、前記複数の解析領域は、それぞれ、各フレームの画像内の同じ領域である、請求項 1 に記載の画像解析方法。

## 【請求項 6】

前記相関計算ステップは、同じフレームの画像内の異なる解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなうことを含む、請求項 5 に記載の画像解析方法。

10

## 【請求項 7】

前記相関計算ステップは、異なるフレームの画像内の異なる解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなうことを含む、請求項 5 に記載の画像解析方法。

## 【請求項 8】

前記解析領域の画像は、二次元画像であり、

前記相関計算ステップは、次式を使用して相関計算をおこなう、

## 【数 1】

$$G_{2ssa}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{f_i}(x, y) * I_{f_i}(x + \xi, y + \psi) / M_{ii}}{(\sum I_{f_i}(x, y) / M_i)^2}$$

20

ここで、 $G_{2ssa}$  は、同じフレーム  $f_i$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の自己相関値、 $I_{f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $x, y$  は、測定点の空間的座標、 $\xi, \psi$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ii}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 3 に記載の画像解析方法。

## 【請求項 9】

前記解析領域の画像は、二次元画像であり、

前記相関計算ステップは、次式を使用して相関計算をおこなう、

30

## 【数 2】

$$G_{2sdc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{f_i}(x, y) * I_{f_j}(x + \xi, y + \psi) / M_{ij}}{(\sum I_{f_i}(x, y) / M_i) (\sum I_{f_j}(x, y) / M_j)}$$

ここで、 $G_{2sdc}$  は、異なるフレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の相互相関値、 $I_{f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{f_j}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $x, y$  は、測定点の空間的座標、 $\xi, \psi$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ij}$  は、フレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_j$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 4 に記載の画像解析方法。

40

## 【請求項 10】

前記解析領域の画像は、二次元画像であり、

前記相関計算ステップは、次式を使用して相関計算をおこなう、

## 【数 3】

$$G_{2dsc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{1f_i}(x, y) * I_{2f_i}(x + \xi, y + \psi) / M_{12ii}}{(\sum I_{1f_i}(x, y) / M_{1i}) (\sum I_{2f_i}(x, y) / M_{2i})}$$

50

ここで、 $G_{2\text{dsc}}$  は、同じフレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1$ 、 $A_2$  の間の相互相関値、 $I_{1f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{2f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータ、 $x$ 、 $y$  は、測定点の空間的座標、 $\xi$ 、 $\psi$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ii}$  は、フレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1$ 、 $A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 6 に記載の画像解析方法。

【請求項 11】

前記解析領域の画像は、二次元画像であり、

前記相関計算ステップは、次式を使用して相関計算をおこなう、

10

【数 4】

$$G_{2\text{ddc}}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{1f_i}(x, y) * I_{2f_j}(x + \xi, y + \psi) / M_{12ij}}{(\sum I_{1f_i}(x, y) / M_{1i})(\sum I_{2f_j}(x, y) / M_{2j})}$$

ここで、 $G_{2\text{ddc}}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  とフレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の間の相互相関値、 $I_{1f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{2f_j}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータ、 $x$ 、 $y$  は、測定点の空間的座標、 $\xi$ 、 $\psi$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ij}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  とフレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2j}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 7 に記載の画像解析方法。

20

【請求項 12】

前記フィッティングステップは、次式を使用してフィッティングをおこなう、

【数 5】

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

30

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

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

40

ここで、 $G_s$  は、R I C S の空間相関値、 $S$  は、R I C S の解析におけるスキンの影響、 $G$  は、R I C S の解析における時間遅延の影響、 $D$  は拡散定数、 $\delta_r$  はピクセルサイズ、 $N$  は分子数、 $\xi$ 、 $\psi$  は、空間的座標の変化量、 $W_0$  は、励起レーザービームの横方向の半径、 $W_z$  は、励起レーザービームの縦方向の半径、 $\tau_p$  はピクセル時間、 $\tau_l$  はライン時間、 $\tau_f$  はフレーム時間である、請求項 8 ～ 11 のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

【請求項 13】

前記解析領域の画像は、三次元画像であり、

前記相関計算ステップは、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 6】

$$G_{3ssa}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{fi}(x, y, z) * I_{fi}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{ii}}{(\sum I_{fi}(x, y, z) / M_i)^2}$$

ここで、 $G_{2ssa}$  は、同じフレーム  $f_i$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の自己相関値、 $I_{fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ii}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 3 に記載の画像解析方法。

10

【請求項 1 4】

前記解析領域の画像は、三次元画像であり、

前記相関計算ステップは、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 7】

$$G_{3sdc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{fi}(x, y, z) * I_{fj}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{ij}}{(\sum I_{fi}(x, y, z) / M_i)(\sum I_{fj}(x, y, z) / M_j)}$$

ここで、 $G_{2sdc}$  は、異なるフレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の相互相関値、 $I_{fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{fj}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ij}$  は、フレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_j$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 4 に記載の画像解析方法。

20

【請求項 1 5】

前記解析領域の画像は、三次元画像であり、

前記相関計算ステップは、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 8】

$$G_{3dsc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{1fi}(x, y, z) * I_{2fi}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12ii}}{(\sum I_{1fi}(x, y, z) / M_{1i})(\sum I_{2fi}(x, y, z) / M_{2i})}$$

ここで、 $G_{2dsc}$  は、同じフレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1, A_2$  の間の相互相関値、 $I_{1fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{2fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ii}$  は、フレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1, A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 6 に記載の画像解析方法。

40

【請求項 1 6】

前記解析領域の画像は、三次元画像であり、

前記相関計算ステップは、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 9】

$$G_{3ddc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{1fi}(x, y, z) * I_{2fj}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12ij}}{(\sum I_{1fi}(x, y, z) / M_{1i})(\sum I_{2fj}(x, y, z) / M_{2j})}$$

ここで、 $G_{2ddc}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  とフレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の間

50

の相互相関値、 $I_{1 f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{2 f_j}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{1 2 i j}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  とフレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1 i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2 j}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 7 に記載の画像解析方法。

【請求項 17】

前記フィッティングステップは、次式を使用してフィッティングをおこなう、

【数 10】

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

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

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

ここで、 $G_s$  は、R I C S の空間相関値、 $S$  は、R I C S の解析におけるスキンの影響、 $G$  は、R I C S の解析における時間遅延の影響、 $D$  は拡散定数、 $\delta_r$  はピクセルサイズ、 $N$  は分子数、 $\xi, \psi, \eta$  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、 $\tau_p$  はピクセル時間、 $\tau_l$  はライン時間、 $\tau_f$  はフレーム時間である、請求項 13 ～ 16 のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

【請求項 18】

前記フィッティングをおこなうことにより前記解析領域内の各成分の分子種の分子数を推定し、次式を使用して分子種の割合を計算するステップをさらに有している、

【数 11】

$$P_{Ni} = \frac{N_i}{\sum_{k=1}^m N_k} \times 100 \%$$

ここで、 $N_i$  は、 $i$  成分の分子種の分子数、 $P_{Ni}$  は、 $i$  成分の分子種の分子数  $N_i$  の割合、 $N_k$  は、 $k$  成分の分子種の分子数、 $m$  は、多成分解析の成分数である、請求項 1 ～ 17 のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

【請求項 19】

前記解析領域内のピクセルのデータを再構成するステップをさらに有しており、前記相関計算ステップは、再構成されたデータを使用して相関計算をおこなう、請求項 1 ～ 18 のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

【請求項 20】

各フレームの画像は、光走査によって時系列的にデータが取得された複数のピクセルか

10

20

30

40

50

ら構成されている、請求項 1 ～ 19 のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

【請求項 2 1】

相関解析結果を表示するステップをさらに有している、請求項 1 ～ 20 のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

【請求項 2 2】

複数のピクセルから構成された少なくとも 1 フレームの画像を取得する画像取得部と、  
前記少なくとも 1 フレームの画像に対して少なくとも 1 つの解析領域を設定する解析領域設定部と、

各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、

複数の相関計算にそれぞれ使用するデータペアの複数の時間間隔を設定する時間間隔設定部と、

抽出データを使用して前記複数の時間間隔のおのおのに対して相関計算をおこなうとともに、複数の相関計算結果のおのおのに対してフィッティングをおこなう解析処理部を有している、画像解析装置。

【請求項 2 3】

前記画像取得部は、複数フレームの画像を取得し、

前記解析領域設定部は、各フレームの画像に対して 1 つの解析領域を設定し、前記解析領域は、各フレームの画像内の同じ領域である、請求項 2 2 に記載の画像解析装置。

【請求項 2 4】

前記解析処理部は、同じフレームの画像内の同じ解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう、請求項 2 3 に記載の画像解析装置。

【請求項 2 5】

前記解析処理部は、異なるフレームの画像内の同じ解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう、請求項 2 3 に記載の画像解析装置。

【請求項 2 6】

前記画像取得部は、複数フレームの画像を取得し、

前記解析領域設定部は、各フレームの画像に複数の解析領域を設定し、前記複数の解析領域は、それぞれ、各フレームの画像内の同じ領域である、請求項 2 2 に記載の画像解析装置。

【請求項 2 7】

前記解析処理部は、同じフレームの画像内の異なる解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう、請求項 2 6 に記載の画像解析装置。

【請求項 2 8】

前記解析処理部は、異なるフレームの画像内の異なる解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう、請求項 2 6 に記載の画像解析装置。

【請求項 2 9】

前記解析領域の画像は、二次元画像であり、

前記解析処理部は、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 1 2】

$$G_{2ssa}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{f_i}(x, y) * I_{f_i}(x + \xi, y + \psi) / M_{ii}}{(\sum I_{f_i}(x, y) / M_i)^2}$$

ここで、 $G_{2ssa}$  は、同じフレーム  $f_i$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の自己相関値、 $I_{f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $x, y$  は、測定点の空間的座標、 $\xi, \psi$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ii}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 2 4 に記載の画像解析装置。

【請求項 3 0】

前記解析領域の画像は、二次元画像であり、

前記解析処理部は、次式を使用して相関計算をおこなう、  
【数 1 3】

$$G_{2sdc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{fi}(x, y) * I_{fj}(x + \xi, y + \psi) / M_{ij}}{(\sum I_{fi}(x, y) / M_i) (\sum I_{fj}(x, y) / M_j)}$$

ここで、 $G_{2sdc}$  は、異なるフレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の相互相関値、 $I_{fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{fj}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $x, y$  は、測定点の空間的座標、 $\xi, \psi$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ij}$  は、フレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_j$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 2 5 に記載の画像解析装置。

【請求項 3 1】

前記解析領域の画像は、二次元画像であり、

前記解析処理部は、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 1 4】

$$G_{2dsc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{1fi}(x, y) * I_{2fi}(x + \xi, y + \psi) / M_{12ii}}{(\sum I_{1fi}(x, y) / M_{1i}) (\sum I_{2fi}(x, y) / M_{2i})}$$

ここで、 $G_{2dsc}$  は、同じフレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1, A_2$  の間の相互相関値、 $I_{1fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{2fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータ、 $x, y$  は、測定点の空間的座標、 $\xi, \psi$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ii}$  は、フレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1, A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 2 7 に記載の画像解析装置。

【請求項 3 2】

前記解析領域の画像は、二次元画像であり、

前記解析処理部は、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 1 5】

$$G_{2ddc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{1fi}(x, y) * I_{2fj}(x + \xi, y + \psi) / M_{12ij}}{(\sum I_{1fi}(x, y) / M_{1i}) (\sum I_{2fj}(x, y) / M_{2j})}$$

ここで、 $G_{2ddc}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  とフレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の間の相互相関値、 $I_{1fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{2fj}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータ、 $x, y$  は、測定点の空間的座標、 $\xi, \psi$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ij}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  とフレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2j}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 2 8 に記載の画像解析装置。

【請求項 3 3】

前記解析処理部は、次式を使用してフィッティングをおこなう、

【数 1 6】

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

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

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

ここで、 $G_s$  は、R I C S の空間相関値、 $S$  は、R I C S の解析におけるスキンの影響、 $G$  は、R I C S の解析における時間遅延の影響、 $D$  は拡散定数、 $\delta_r$  はピクセルサイズ、 $N$  は分子数、 $\xi$ 、 $\psi$  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、 $\tau_p$  はピクセル時間、 $\tau_l$  はライン時間、 $\tau_f$  はフレーム時間である、請求項 29～請求項 32 のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

【請求項 3 4】

前記解析領域の画像は、三次元画像であり、

前記解析処理部は、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 1 7】

$$G_{3ssa}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{fi}(x, y, z) * I_{fi}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{ii}}{\left( \sum I_{fi}(x, y, z) / M_i \right)^2}$$

ここで、 $G_{3ssa}$  は、同じフレーム  $f_i$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の自己相関値、 $I_{fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  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、 $\xi$ 、 $\psi$ 、 $\eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ii}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 24 に記載の画像解析装置。

【請求項 3 5】

前記解析領域の画像は、三次元画像であり、

前記解析処理部は、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 1 8】

$$G_{3sdc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{fi}(x, y, z) * I_{fj}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{ij}}{\left( \sum I_{fi}(x, y, z) / M_i \right) \left( \sum I_{fj}(x, y, z) / M_j \right)}$$

ここで、 $G_{3sdc}$  は、異なるフレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の相互相関値、 $I_{fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{fj}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  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、 $\xi$ 、 $\psi$ 、 $\eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ij}$  は、フレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_j$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 25 に記載の画像解析装置。

【請求項 3 6】

前記解析領域の画像は、三次元画像であり、

10

20

30

40

50

前記解析処理部は、次式を使用して相関計算をおこなう、  
【数 1 9】

$$G_{3dsc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{1f_i}(x, y, z) * I_{2f_j}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12ij}}{(\sum I_{1f_i}(x, y, z) / M_{1i}) (\sum I_{2f_j}(x, y, z) / M_{2j})}$$

ここで、 $G_{2dsc}$  は、同じフレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1$ 、 $A_2$  の間の相互相関値、 $I_{1f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{2f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ij}$  は、フレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1$ 、 $A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 27 に記載の画像解析装置。

【請求項 37】

前記解析領域の画像は、三次元画像であり、

前記解析処理部は、次式を使用して相関計算をおこなう、

【数 20】

$$G_{3ddc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{1f_i}(x, y, z) * I_{2f_j}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12ij}}{(\sum I_{1f_i}(x, y, z) / M_{1i}) (\sum I_{2f_j}(x, y, z) / M_{2j})}$$

ここで、 $G_{2ddc}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  とフレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の間の相互相関値、 $I_{1f_i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータ、 $I_{2f_j}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ij}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  とフレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2j}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である、請求項 28 に記載の画像解析装置。

【請求項 38】

前記解析処理部は、次式を使用してフィッティングをおこなう、

【数 21】

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

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

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

ここで、 $G_s$  は、R I C S の空間相関値、 $S$  は、R I C S の解析におけるスキンの影響

10

20

30

40

50

、Gは、R I C Sの解析における時間遅延の影響、Dは拡散定数、 $\delta_r$ はピクセルサイズ、Nは分子数、 $\xi$ 、 $\psi$ 、 $\eta$ 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、 $\tau_p$ はピクセル時間、 $\tau_l$ はライン時間、 $\tau_f$ はフレーム時間である、請求項34～請求項37のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

【請求項39】

前記解析処理部は、前記フィッティングをおこなうことにより前記解析領域内の各成分の分子種の分子数を推定し、次式を使用して分子種の割合を計算する、

【数22】

$$P_{N_i} = \frac{N_i}{\sum_{k=1}^m N_k} \times 100 \%$$

10

ここで、 $N_i$ は、 $i$ 成分の分子種の分子数、 $P_{N_i}$ は、 $i$ 成分の分子種の分子数 $N_i$ の割合、 $N_k$ は、 $k$ 成分の分子種の分子数、 $m$ は、多成分解析の成分数である、請求項22～請求項38のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

【請求項40】

前記解析処理部は、前記解析領域内のピクセルのデータを再構成し、再構成したデータを使用して相関計算をおこなう、請求項22～請求項39のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

20

【請求項41】

各フレームの画像は、光走査によって時系列的にデータが取得された複数のピクセルから構成されている、請求項22～請求項40のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

【請求項42】

相関解析結果を表示する表示部をさらに有している、請求項22～請求項41のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

【請求項43】

各フレームの画像の各ピクセルのデータは蛍光強度データである、請求項8～請求項16のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

30

【請求項44】

各フレームの画像の各ピクセルのデータは蛍光強度データである、請求項29～請求項37のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、画像解析方法および画像解析装置に関する。

【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おこなうことによって分子数や拡散定数の推定をおこなう。

40

【0003】

また、ラスタ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走査画像を取得する。ラスタ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

50

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】

10

【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, P 1317-1327, August 2005.

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従来のRICSの解析処理は、分子の拡散時間（または分子数など）を主な解析パラメータとして扱うが、解析可能な成分は2成分にとどまる。また、フィッティング用パラメータの設定が難しく、2成分解析も難しい。そのため、複数の分子種からなるサンプルにおいて、事実上、多成分解析はほとんどおこなわれていない。

【0009】

本発明は、多成分解析可能な画像解析方法および画像解析装置を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

30

本発明による画像解析方法は、複数のピクセルから構成された少なくとも1フレームの画像を取得する画像取得ステップと、前記少なくとも1フレームの画像に対して少なくとも1つの解析領域を設定する解析領域設定ステップと、各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、複数の相関計算にそれぞれ使用するデータペアの複数の時間間隔を設定する時間間隔設定ステップと、抽出データを使用して前記複数の時間間隔のおおのに対して相関計算をおこなう相関計算ステップと、前記相関計算ステップによる複数の相関計算結果のおおのに対してフィッティングをおこなうフィッティングステップを有している。

【発明の効果】

【0011】

40

本発明によれば、多成分解析可能な画像解析方法および画像解析装置が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】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】一実施形態による画像解析のフローチャートである。

【図4】1フレームの二次元画像の蛍光画像を示している。

【図5】1フレームの三次元画像の蛍光画像を示している。

【図6】複数フレームの観察領域の画像と1つの解析領域の抽出画像を示している。

【図7】複数フレームの観察領域の画像と2つの解析領域の抽出画像を示している。

50

【図 8】同じフレームの画像内の同じ解析領域に対する相関計算を模式的に示している。

【図 9】異なるフレームの画像内の同じ解析領域に対する相関計算を模式的に示している。

【図 10】同じフレームの画像内の異なる解析領域に対する相関計算を模式的に示している。

【図 11】異なるフレームの画像内の異なる解析領域に対する相関計算を模式的に示している。

【図 12】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 13】図 12 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。

【発明を実施するための形態】

10

【0013】

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。

【0014】

[装置構成]

図 1 は、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。

【0015】

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おこなう制御部 160 と、試料 S を支持する試料ステージ 190 とを有している。

20

【0016】

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（x y 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 x y z 方向に移動し得る。

【0017】

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。

30

【0018】

光照射部 110 の n チャンネルの光源ユニット 111 は、光源 112 a, ..., 112 n とコリメートレンズ 114 a, ..., 114 n とダイクロイックミラー 116 a, ..., 116 n とを含んでいる。光源 112 a, ..., 112 n 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）を発生させるための励起光を発する。光源 112 a, ..., 112 n から発生さ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 112 a, ..., 112 n 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 114 a, ..., 114 n は、それぞれ、光源 112 a, ..., 112 n から発生された励起光をコリメートする。ダイクロイックミラー 116 a, ..., 116 n は、それぞれ、コリメートレンズ 114 a, ..., 114 n 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 116 a, ..., 116 n 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 112 a, ..., 112 n からそれぞれ射出された異

40

50

なる波長の励起光は、ダイクロイックミラー 1 1 6 a 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 1 1 6 n 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。

#### 【0019】

光照射部 1 1 0 はさらに、ダイクロイックミラー 1 2 2 とガルバノミラー 1 2 4 と対物レンズ 1 2 6 と対物レンズ駆動機構 1 2 8 を含んでいる。ダイクロイックミラー 1 2 2 は、光源ユニット 1 1 1 からの励起光をガルバノミラー 1 2 4 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 1 2 4 は、励起光を対物レンズ 1 2 6 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 1 2 6 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 1 2 6 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 0.6  $\mu\text{m}$  程度（xy 面内）、長さ 2  $\mu\text{m}$  程度（z 方向）の略円筒状となる。ガルバノミラー 1 2 4 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 1 2 8 は、対物レンズ 1 2 6 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 1 2 8 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。

10

#### 【0020】

光検出部 1 3 0 は、対物レンズ 1 2 6 とガルバノミラー 1 2 4 とダイクロイックミラー 1 2 2 を光照射部 1 1 0 と共有している。光検出部 1 3 0 はさらに、収束レンズ 1 3 2 とピンホール 1 3 4 とコリメートレンズ 1 3 6 を含んでいる。収束レンズ 1 3 2 は、ダイクロイックミラー 1 2 2 を透過した光を収束する。ピンホール 1 3 4 は、収束レンズ 1 3 2 の焦点に配置されている。つまり、ピンホール 1 3 4 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 1 3 6 は、ピンホール 1 3 4 を通過した光を平行にする。コリメートレンズ 1 3 6 を通過した光は、m チャンネルの光検出ユニット 1 3 1 に入射する。

20

#### 【0021】

m チャンネルの光検出ユニット 1 3 1 は、ダイクロイックミラー 1 3 8 a, ..., 1 3 8 m と蛍光フィルター 1 4 0 a, ..., 1 4 0 m と光検出器 1 4 2 a, ..., 1 4 2 m とを含んでいる。ダイクロイックミラー 1 3 8 a, ..., 1 3 8 m 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 1 3 8 m 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 1 4 0 a, ..., 1 4 0 m は、それぞれ、ダイクロイックミラー 1 3 8 a, ..., 1 3 8 m 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 1 1 2 a, ..., 1 1 2 n 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 1 4 0 a, ..., 1 4 0 m を透過した蛍光はそれぞれ光検出器 1 4 2 a, ..., 1 4 2 m に入射する。光検出器 1 4 2 a, ..., 1 4 2 m 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 1 4 2 a, ..., 1 4 2 m は、試料 S 内の測定点からの蛍光強度信号を出力する。

30

#### 【0022】

制御部 1 6 0 はたとえばパーソナルコンピュータで構成される。制御部 1 6 0 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）をおこなう。また制御部 1 6 0 は、xy 走査機構であるガルバノミラー 1 2 4、z 走査機構である対物レンズ駆動機構 1 2 8、試料ステージ 1 9 0 などの制御をおこなう。

40

#### 【0023】

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 1 6 0 は、図 2 に示すように、走査制御部 1 6 2 と画像形成部 1 6 4 と記憶部 1 6 6 と表示部 1 6 8 と入力部 1 7 0 と解析領域設定部 1 7 2 とデータ抽出部 1 7 4 と解析処理部 1 7 8 と時間間隔設定部 1 7 8 とステージ制御部 1 8 0 とを含んでいる。走査制御部 1 6 2 と画像形成部 1 6 4 と記憶

50

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と共働して画像取得部を構成する。

#### 【0024】

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、相関計算をおこなう解析領域のデータを抽出する。時間間隔設定部176は、複数の相関計算にそれぞれ使用するデータのペアの複数の時間間隔を設定する。解析処理部178は、解析領域の画像のピクセルのデータを使用して相関計算をおこなう。解析処理部178の処理の詳細は後述する。

10

#### 【0025】

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方向にラスタ走査される。また必要であれば、一回のラスタ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178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。

20

30

40

#### 【0026】

##### [解析手順]

以下、図3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4～図11を参照しながら説明する。

#### 【0027】

##### (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画像たとえば蛍光画像を取得する

50

。蛍光画像は、光源ユニット 1 1 1 の 1 つのチャンネルと、それに対応する光検出ユニット 1 3 1 の 1 つのチャンネルとを介して取得したものである。各フレームの蛍光画像は、励起光の走査によって時系列的にデータが取得された複数のピクセルから構成されている。測定点は、実際には、 $x y z$  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。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。

#### 【0028】

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。観察領域が二次元的領域である場合、蛍光画像は、 $x y$  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、 $x y z$  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】

1 フレームの二次元画像の蛍光画像を図 4 に示す。図 4 において、 $\tau_p$  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  $\tau_p$  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  $\tau_l$  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  $\tau_l$  は、1 ラインを走査するのに要する時間を意味する。

#### 【0030】

1 フレームの三次元画像を図 5 に示す。図 5 において、 $\tau_p$  はピクセル時間、 $\tau_l$  はライン時間、 $\tau_f$  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  $\tau_f$  は、1 フレームを走査するのに要する時間を意味する。

#### 【0031】

##### （ステップ S 2）

取得した 1 フレームまたは複数フレームのおおのの観察領域の画像たとえば蛍光画像に対して 1 つまたは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。図 6 では、複数フレーム  $f_1 \sim f_{100}$  のおおのの観察領域の蛍光画像に対して 1 つの解析領域  $A_1$  が設定されており、解析領域  $A_1$  は細胞の核外に位置している。また図 7 では、複数フレーム  $f_1 \sim f_{100}$  のおおのの観察領域の蛍光画像に対して 2 つの解析領域  $A_1, A_2$  が設定されており、解析領域  $A_1$  は細胞の核外に位置し、解析領域  $A_2$  は細胞の核内に位置している。

#### 【0032】

##### （ステップ S 3）

各解析領域に対応するピクセルのデータを抽出する。図 6 には、抽出された複数フレーム  $f_1 \sim f_{100}$  の解析領域  $A_1$  のピクセルのデータすなわち画像が示されている。また図 7 には、抽出された複数フレーム  $f_1 \sim f_{100}$  の解析領域  $A_1, A_2$  のピクセルのデータすなわち画像が示されている。

#### 【0033】

##### （ステップ S 4）

複数の相関計算にそれぞれ使用するデータペアの複数の時間間隔（遅延時間）を設定する。各時間間隔は、各相関計算のための積和計算に使用する複数ペアのピクセルのデータの取得時間の差に対応している。たとえば、ある時間間隔は、同じフレームの同じまたは異なる解析領域内の 2 つのピクセルに対応し、別の時間間隔は、異なるフレームの同じまたは異なる解析領域内の 2 つのピクセルに対応する。これらの時間間隔は、好ましくは、十分な回数の積和計算をおこなえるように設定される。

## 【0034】

(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おこなう。相関計算に適用する計算式は、解析領域の画像が二次元画像か三次元画像かで異なる。さらに、相関計算の積和計算に使用する複数のデータペアのおおのの2つのピクセルが同じ解析領域に属するか異なる解析領域に属するかで異なる。加えて、相関計算の積和計算に使用する複数のデータペアのおおのの2つのピクセルが同じフレームの画像に属するか異なるフレームの画像に属するかで異なる。

## 【0035】

二次元画像に対する適用計算式は次の通りである。

10

## 【0036】

1. 各データペアの2つのピクセルが同じ解析領域の画像に属し、同じフレームの画像に属する場合。この場合、同じフレームの画像内の同じ解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう。この相関計算は自己相関計算となる。図8は、この場合の相関計算を模式的に示している。

## 【0037】

【数1】

$$G_{2ssa}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{f_i}(x, y) * I_{f_i}(x + \xi, y + \psi) / M_{ii}}{(\sum I_{f_i}(x, y) / M_i)^2} \quad \dots(1)$$

20

## 【0038】

ここで、 $G_{2ssa}$ は、同じフレーム $f_i$ の同じ解析領域 $A_1$ の間の自己相関値、 $I_{f_i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ 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、 $\xi, \psi$ は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ii}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータの総数である。

## 【0039】

2. 各データペアの2つのピクセルが同じ解析領域の画像に属し、異なるフレームの画像に属する場合。この場合、異なるフレームの画像内の同じ解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう。この相関計算は相互相関計算となる。図9は、この場合の相関計算を模式的に示している。

30

## 【0040】

【数2】

$$G_{2sdc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{f_i}(x, y) * I_{f_j}(x + \xi, y + \psi) / M_{ij}}{(\sum I_{f_i}(x, y) / M_i)(\sum I_{f_j}(x, y) / M_j)} \quad \dots(2)$$

## 【0041】

ここで、 $G_{2sdc}$ は、異なるフレーム $f_i$ とフレーム $f_j$ の同じ解析領域 $A_1$ の間の相互相関値、 $I_{f_i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、 $I_{f_j}$ は、フレーム $f_j$ の解析領域 $A_1$ 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、 $\xi, \psi$ は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ij}$ は、フレーム $f_i$ とフレーム $f_j$ の同じ解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータの総数、 $M_j$ は、フレーム $f_j$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータの総数である。

40

## 【0042】

3. 各データペアの2つのピクセルが異なる解析領域の画像に属し、同じフレームの画像に属する場合。この場合、同じフレームの画像内の異なる解析領域内のピクセルのデー

50

タのペアを使用して相関計算をおこなう。この相関計算は相互相関計算となる。図10は、この場合の相関計算を模式的に示している。

【0043】

【数3】

$$G_{2dsc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{1f_i}(x, y) * I_{2f_i}(x + \xi, y + \psi) / M_{12ij}}{(\sum I_{1f_i}(x, y) / M_{1i})(\sum I_{2f_i}(x, y) / M_{2i})} \quad \dots(3)$$

【0044】

ここで、 $G_{2dsc}$ は、同じフレーム $f_i$ の異なる解析領域 $A_1$ 、 $A_2$ の間の相互相関値、 $I_{1f_i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、 $I_{2f_i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_2$ 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、 $\xi$ 、 $\psi$ は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ij}$ は、フレーム $f_i$ の異なる解析領域 $A_1$ 、 $A_2$ の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_2$ の画像のピクセルのデータの総数である。

10

【0045】

4. 各データペアの2つのピクセルが異なる解析領域の画像に属し、同じフレームの画像に属する場合。この場合、異なるフレームの画像内の異なる解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう。この相関計算は相互相関計算となる。図11は、この場合の相関計算を模式的に示している。

20

【0046】

【数4】

$$G_{2ddc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_{1f_i}(x, y) * I_{2f_j}(x + \xi, y + \psi) / M_{12ij}}{(\sum I_{1f_i}(x, y) / M_{1i})(\sum I_{2f_j}(x, y) / M_{2j})} \quad \dots(4)$$

【0047】

ここで、 $G_{2ddc}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ とフレーム $f_j$ の解析領域 $A_2$ の間の相互相関値、 $I_{1f_i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、 $I_{2f_j}$ は、フレーム $f_j$ の解析領域 $A_2$ 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、 $\xi$ 、 $\psi$ は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ij}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ とフレーム $f_j$ の解析領域 $A_2$ の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2j}$ は、フレーム $f_j$ の解析領域 $A_2$ の画像のピクセルのデータの総数である。

30

【0048】

三次元画像に対する適用計算式は次の通りである。

【0049】

1. 各データペアの2つのピクセルが同じ解析領域の画像に属し、同じフレームの画像に属する場合。この場合、同じフレームの画像内の同じ解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう。この相関計算は自己相関計算となる。図8は、この場合の相関計算を模式的に示している。

40

【0050】

【数5】

$$G_{3ssa}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{fi}(x, y, z) * I_{fi}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{ii}}{(\sum I_{fi}(x, y, z) / M_i)^2} \quad \dots(5)$$

50

## 【0051】

ここで、 $G_{2ssa}$  は、同じフレーム  $f_i$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の自己相関値、 $I_{fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ii}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である。

## 【0052】

2. 各データペアの2つのピクセルが同じ解析領域の画像に属し、異なるフレームの画像に属する場合。この場合、異なるフレームの画像内の同じ解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう。この相関計算は相互相関計算となる。図9は、この場合の相関計算を模式的に示している。

10

## 【0053】

## 【数6】

$$G_{3sdc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{fi}(x, y, z) * I_{fj}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{ij}}{(\sum I_{fi}(x, y, z) / M_i) (\sum I_{fj}(x, y, z) / M_j)} \quad \dots(6)$$

## 【0054】

ここで、 $G_{2sdc}$  は、異なるフレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の間の相互相関値、 $I_{fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、 $I_{fj}$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{ij}$  は、フレーム  $f_i$  とフレーム  $f_j$  の同じ解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_i$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_j$  は、フレーム  $f_j$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数である。

20

## 【0055】

3. 各データペアの2つのピクセルが異なる解析領域の画像に属し、同じフレームの画像に属する場合。この場合、同じフレームの画像内の異なる解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう。この相関計算は相互相関計算となる。図10は、この場合の相関計算を模式的に示している。

30

## 【0056】

## 【数7】

$$G_{3dsc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{1fi}(x, y, z) * I_{2fi}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12ii}}{(\sum I_{1fi}(x, y, z) / M_{1i}) (\sum I_{2fi}(x, y, z) / M_{2i})} \quad \dots(7)$$

## 【0057】

ここで、 $G_{2dsc}$  は、同じフレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1, A_2$  の間の相互相関値、 $I_{1fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、 $I_{2fi}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  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、 $\xi, \psi, \eta$  は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ii}$  は、フレーム  $f_i$  の異なる解析領域  $A_1, A_2$  の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_1$  の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2i}$  は、フレーム  $f_i$  の解析領域  $A_2$  の画像のピクセルのデータの総数である。

40

## 【0058】

4. 各データペアの2つのピクセルが異なる解析領域の画像に属し、同じフレームの画像に属する場合。この場合、異なるフレームの画像内の異なる解析領域内のピクセルのデータのペアを使用して相関計算をおこなう。この相関計算は相互相関計算となる。図11

50

は、この場合の相関計算を模式的に示している。

【0059】

【数8】

$$G_{3ddc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_{1f_i}(x, y, z) * I_{2f_j}(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12ij}}{(\sum I_{1f_i}(x, y, z) / M_{1i})(\sum I_{2f_j}(x, y, z) / M_{2j})} \quad \dots(8)$$

【0060】

ここで、 $G_{2ddc}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ とフレーム $f_j$ の解析領域 $A_2$ の間の相互相関値、 $I_{1f_i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータたとえば蛍光強度データ、 $I_{2f_j}$ は、フレーム $f_j$ の解析領域 $A_2$ 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、 $\xi, \psi, \eta$ は、測定点からの空間的座標の変化量、 $M_{12ij}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ とフレーム $f_j$ の解析領域 $A_2$ の画像のピクセルのデータの積和計算の回数、 $M_{1i}$ は、フレーム $f_i$ の解析領域 $A_1$ の画像のピクセルのデータの総数、 $M_{2j}$ は、フレーム $f_j$ の解析領域 $A_2$ の画像のピクセルのデータの総数である。

10

【0061】

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。

20

【0062】

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。

【0063】

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。

30

【0064】

(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おこなう。これにより、分子数と拡散時間の少なくとも一方を推定する。フィッティングに適用する計算式は、解析領域の画像が二次元画像か三次元画像かで異なる。

【0065】

二次元画像に対する適用計算式は次の通りである。

40

【0066】

【数 9】

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

$$S(\xi, \psi) = \exp \left( - \frac{\frac{1}{2} * \left[ \left( \frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left( \frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left( 1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \dots(9)$$

10

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

【0067】

ここで、 $G_s$  は、R I C S の空間相関値、 $S$  は、R I C S の解析におけるスキンの影響、 $G$  は、R I C S の解析における時間遅延の影響、 $D$  は拡散定数、 $\delta_r$  はピクセルサイズ、 $N$  は分子数、 $\xi$ 、 $\psi$  は、空間的座標の変化量、 $W_0$  は、励起レーザービームの横方向の半径、 $W_z$  は、励起レーザービームの縦方向の半径、 $\tau_p$  はピクセル時間、 $\tau_l$  はライン時間、 $\tau_f$  はフレーム時間である。

20

【0068】

三次元画像に対する適用計算式は次の通りである。

【0069】

【数 10】

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

$$S(\xi, \psi, \eta) = \exp \left( - \frac{\frac{1}{2} * \left[ \left( \frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left( \frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left( \frac{2\eta \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left( 1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \dots(10)$$

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

30

40

【0070】

ここで、 $G_s$  は、R I C S の空間相関値、 $S$  は、R I C S の解析におけるスキンの影響、 $G$  は、R I C S の解析における時間遅延の影響、 $D$  は拡散定数、 $\delta_r$  はピクセルサイズ、 $N$  は分子数、 $\xi$ 、 $\psi$ 、 $\eta$  は、空間的座標の変化量、 $W_0$  は、励起レーザービームの横方向の半径、 $W_z$  は、励起レーザービームの縦方向の半径、 $\tau_p$  はピクセル時間、 $\tau_l$  はライン時間、 $\tau_f$  はフレーム時間である。

【0071】

分子数と拡散定数は、式(1)～式(8)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)により求める。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

50

$G_s$ とする)を算出する。次に、(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)との比較をおこない、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 $G_s$ との比較をおこない、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)を繰り返しおこない、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(9)または式(10)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。

10

#### 【0072】

拡散定数と拡散時間との間には、次式(11)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。

#### 【0073】

#### 【数11】

$$\tau = W_0^2 / 4D \quad \dots(11)$$

20

#### 【0074】

#### (ステップS7)

解析結果たとえば分子数または拡散定数の画像を保存する。必要であれば、分子数または拡散定数の画像を表示してよい。解析結果の表示は、すべての時間間隔に対する解析が終了した後におこなってもよい。解析結果の一例を図12と図13に示す。図12は、試料S中のある分子に関する空間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13は、図12の空間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では、空間相互相関値の大きさをCRTの輝度で示している。

30

#### 【0075】

#### (ステップS8)

ステップS5～ステップS7の操作によって一つの時間間隔に対する解析が終了する。ステップS4で設定した複数の時間間隔のおののについてステップS5～ステップS7の操作を繰り返す。つまり、解析にまだ適用していない時間間隔が残っている間は、解析に適用する時間間隔を変更してステップS5に戻る。言い換えれば、複数の時間間隔のおののに対して相関計算をおこない、その複数の相関計算結果のおののに対してフィッティングをおこなう。

#### 【0076】

短い時間間隔に対する解析結果は、小さい分子量の分子種の変化を強く反映しており、長い時間間隔に対する解析結果は、大きい分子量の分子種の変化を強く反映している。つまり、ある一つの時間間隔に対する相関結果は、その時間間隔に対応した分子種の変化を強く反映している。したがって、複数の時間間隔のおののに対して相関解析をおこなっているため、複数の分子種のおののに関する変化を知ることができる。すなわち、多成分解析をおこなうことができる。

40

#### 【0077】

#### (ステップS9)

必要であれば、解析領域内の分子種の割合を計算する。計算に適用する式は次の通りである。

#### 【0078】

50

【数 1 2】

$$P_{Ni} = \frac{N_i}{\sum_{k=1}^m N_k} \times 100 \% \quad \dots(12)$$

【0079】

ここで、 $N_i$  は、 $i$  成分の分子種の分子数、 $P_{Ni}$  は、 $i$  成分の分子種の分子数  $N_i$  の割合、 $N_k$  は、 $k$  成分の分子種の分子数、 $m$  は、多成分解析の成分数である。

【0080】

本実施形態によれば、試料  $S$  内の異なる複数の分子について、たとえば動きを評価することが可能になる。つまり、多成分解析が可能になる。たとえば、移動速度が速い分子や遅い分子や中間的な分子などのそれぞれについて、その動きを評価することができる。

10

【0081】

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。

【0082】

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。

20

【0083】

また実施形態では、ラスタ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。さらには、画像は、CCDやCMOSなどの二次元撮像素子によって撮像されたものであってもよい。この場合、1フレームの画像は、同時にデータが取得された複数のピクセルで構成され、ステップ  $S1$  において、複数フレームの画像を取得することが前提になる。

【符号の説明】

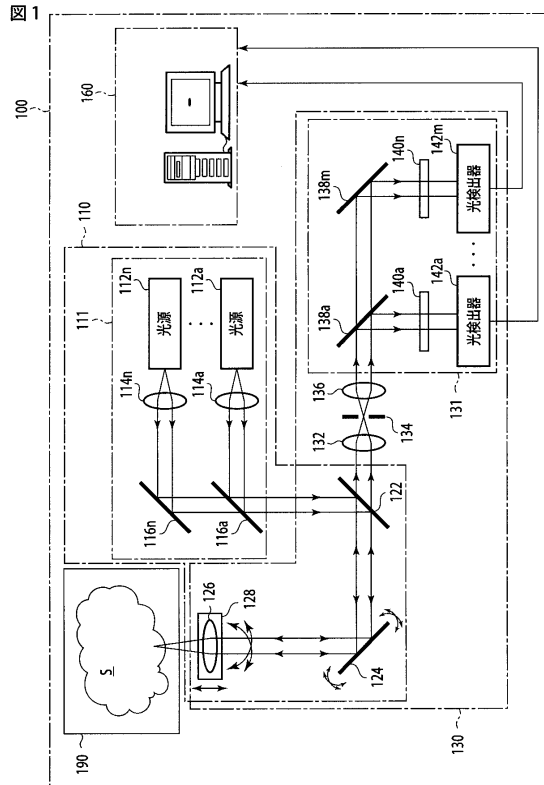
30

【0084】

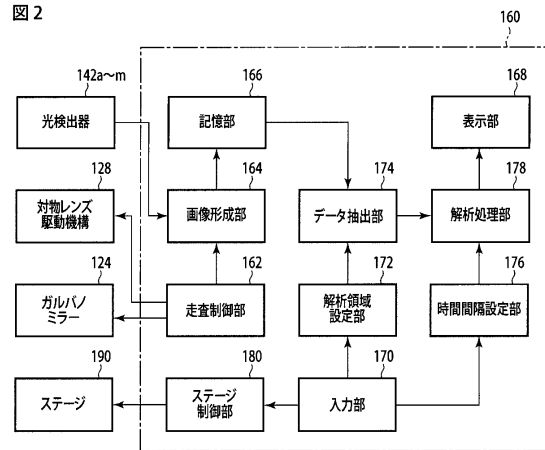
100…画像解析装置、110…光照射部、111…光源ユニット、112a, …, 112n…光源、114a, …, 114n…コリメートレンズ、116a, …, 116n…ダイクロイックミラー、122…ダイクロイックミラー、124…ガルバノミラー、126…対物レンズ、128…対物レンズ駆動機構、130…光検出部、131…光検出ユニット、132…収束レンズ、134…ピンホール、136…コリメートレンズ、138a, …, 138m…ダイクロイックミラー、140a, …, 140m…蛍光フィルター、142a, …, 142m…光検出器、160…制御部、162…走査制御部、164…画像形成部、166…記憶部、168…表示部、170…入力部、172…解析領域設定部、174…データ抽出部、176…時間間隔設定部、178…解析処理部、180…ステージ制御部、190…試料ステージ。

40

【図 1】

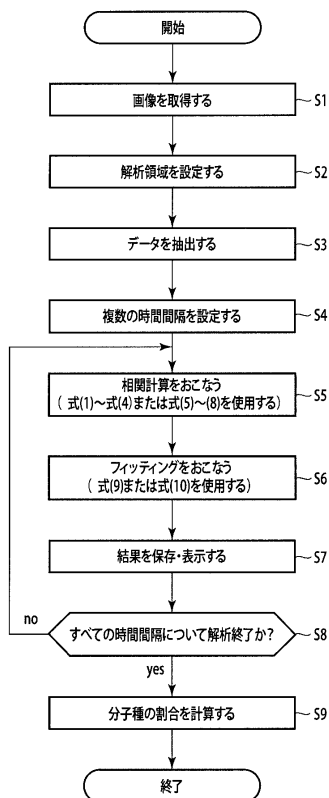


【図 2】



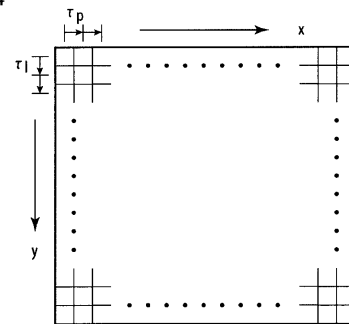
【図 3】

図 3



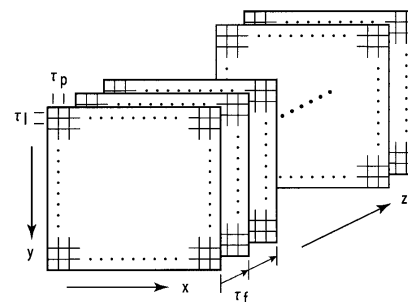
【図 4】

図 4



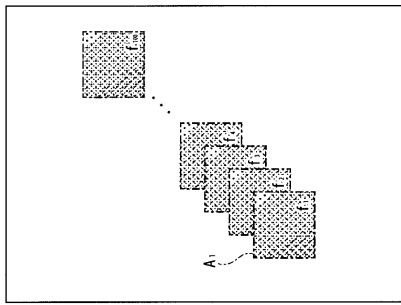
【図 5】

図 5



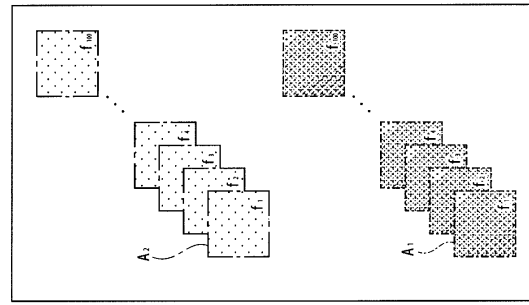
【図 6】

図 6



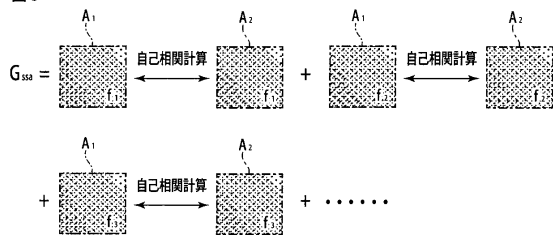
【図 7】

図 7



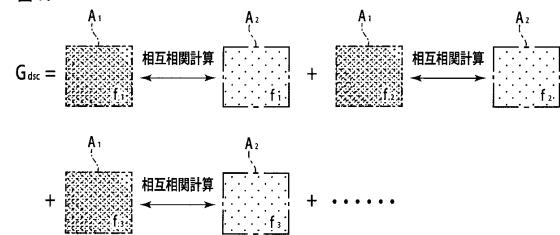
【図 8】

図 8



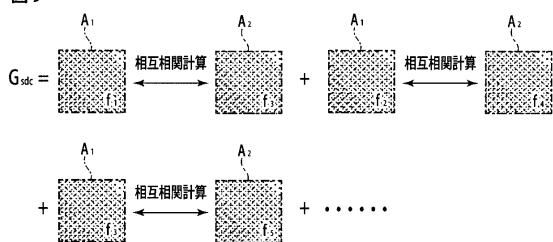
【図 10】

図 10



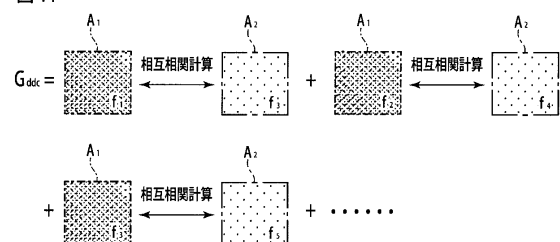
【図 9】

図 9



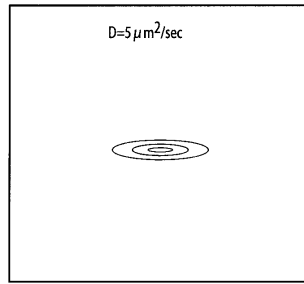
【図 11】

図 11



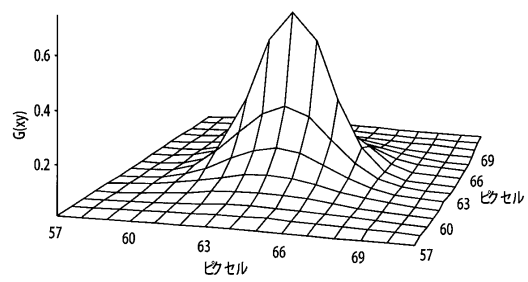
【図 1 2】

図 12



【図 1 3】

図 13



---

フロントページの続き

- (74)代理人 100095441  
弁理士 白根 俊郎
- (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 100158805  
弁理士 井関 守三
- (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
- (72)発明者 鈴木 明美  
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリnbas株式会社内

審査官 横井 亜矢子

- (56)参考文献 特開2011-017677 (JP, A)  
国際公開第2011/046212 (WO, A1)  
国際公開第2008/087869 (WO, A1)  
特開2007-093371 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 21/62-21/74  
G02B 21/00  
G02B 21/06-21/36  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)