

(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2012-220558

(P2012-220558A)

(43) 公開日 平成24年11月12日(2012.11.12)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
GO2B	21/06	(2006.01)	GO2B 21/06
GO1N	21/17	(2006.01)	GO1N 21/17 A
GO6T	5/00	(2006.01)	GO6T 5/00 100
HO4N	5/238	(2006.01)	HO4N 5/238 Z
			2G059
			2H052
			5B057
			5C122

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2011-83592 (P2011-83592)
 (22) 出願日 平成23年4月5日 (2011.4.5)

(71) 出願人 000004112
 株式会社ニコン
 東京都千代田区有楽町1丁目12番1号
 (74) 代理人 100077919
 弁理士 井上 義雄
 (74) 代理人 100153899
 弁理士 相原 健一
 (72) 発明者 三村 正文
 東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株
 式会社ニコン内

Fターム(参考) 2G059 AA05 BB14 EE01 FF03 GG02
 JJ11 KK04 MM01 MM03 NN06
 2H052 AB01 AC05 AC18 AC29 AC33
 AD03 AD06 AD25 AD35 AF02
 AF21 AF25

最終頁に続く

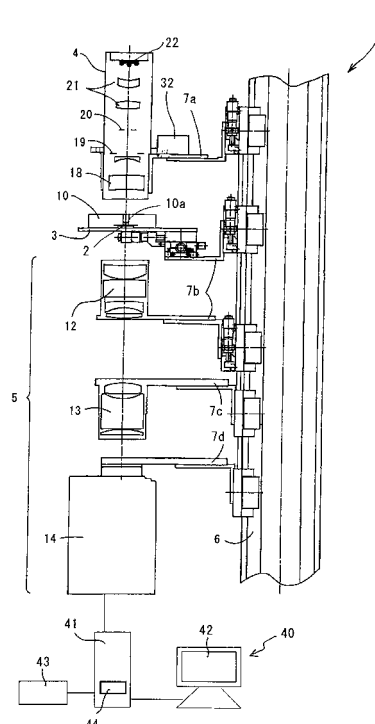
(54) 【発明の名称】顕微鏡装置

(57) 【要約】

【課題】一つのウェル領域を広い視野で一度に観察する際に、観察画像の輝度ムラを良好に補正した均一な輝度の標本画像を取得できる顕微鏡装置を提供すること。

【解決手段】ステージ3に載置された標本を照明する照明光学系4と、照明光で照明された前記標本の像を結像する結像光学系5と、前記結像の位置に配設された撮像装置14と、前記撮像装置の撮像面の輝度分布が変化するように前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を駆動する駆動手段32と、前記撮像装置で撮像した前記標本の画像を処理する画像処理装置40とを有し、前記画像処理装置は、前記駆動手段で前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を駆動して前記撮像装置を介して取得した前記標本の画像の輝度を略均一にした前記標本の新たな画像を生成することを特徴とする顕微鏡装置。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ステージに載置され、液体中に存在する被観察物を有する標本を照明する照明光学系と、
 前記照明光学系の実効的な開口数よりも小さい開口数を有し、照明光で照明された前記標本の像を結像する結像光学系と、
 前記結像の位置に配設された撮像装置と、
 前記撮像装置の撮像面の輝度分布が変化するように前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を駆動する駆動手段と、
 前記撮像装置で撮像した前記標本の画像を処理する画像処理装置とを有し、
 前記画像処理装置は、前記駆動手段で前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を駆動して前記撮像装置を介して取得した前記標本の画像の輝度を略均一にした前記標本の新たな画像を生成することを特徴とする顕微鏡装置。

10

【請求項 2】

前記駆動手段は、前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を光軸を中心として回転することを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 3】

前記駆動手段は、前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を光軸に沿って移動することを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

20

【請求項 4】

前記駆動手段は、前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を光軸に略垂直な方向に移動することを特徴とする請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

【請求項 5】

前記標本の画像は、前記駆動に応じて複数取得され、
 前記画像処理装置は、前記撮像装置の各画素に対する、複数の前記標本の画像それぞれの輝度値を平均化処理することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡装置。

【請求項 6】

前記画像処理装置は、前記撮像装置の各画素に対する、予め取得してある基準画像の輝度値と前記標本の画像の輝度値とのずれ量に基き加重平均処理することを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡装置。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標本画像を取得する顕微鏡装置に関する。

【背景技術】

40

【0002】

従来、複数のウェルが配置されたウェルプレートの各ウェルの細胞標本などを観察するための顕微鏡では、培養液の表面張力などに起因する表面形状の変化によるレンズ作用を低減し細胞標本の観察を可能にする顕微鏡が提案されている（例えば、特許文献 1 参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特許第 3 4 3 7 2 5 7 号公報

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0004】**

しかしながら、従来の顕微鏡で取得される細胞の標本画像は、一つのウェル領域を一度に観察するような広い視野において均一な明るさが得られるわけではなく、微妙な光軸ずれやフォーカス方向のずれなどにより取得した輝度ムラが発生する。この輝度ムラを補正するには、事前に画像の明るさを表す画像を採取して、取得した標本画像からの差分をとったり、輝度ムラを曲面近似したり、或いはハイパスフィルタをかけるなどの処理を行ってきたが、このような手法では、事前取得された画像と標本画像とが一致しなかったり、取得された標本画像の輝度階調を補正することによる量子化誤差が発生するなどの問題があった。

10

【0005】

本発明は、上記に鑑みて行われたものであり、一つのウェル領域を広い視野で観察する際に、観察画像の輝度ムラを良好に補正した均一な輝度の標本画像を取得できる顕微鏡装置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】**【0006】**

上記課題を解決するため、本発明は、ステージに載置され、液体中に存在する被観察物を有する標本を照明する照明光学系と、前記照明光学系の実効的な開口数よりも小さい開口数を有し、照明光で照明された前記標本の像を結像する結像光学系と、前記結像の位置に配設された撮像装置と、前記撮像装置の撮像面の輝度分布が変化するように前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を駆動する駆動手段と、前記撮像装置で撮像した前記標本の画像を処理する画像処理装置とを有し、前記画像処理装置は、前記駆動手段で前記照明光学系または前記標本から前記撮像装置までのいずれか一方を駆動して前記撮像装置を介して取得した前記標本の画像の輝度を略均一にした前記標本の新たな画像を生成することを特徴とする顕微鏡装置を提供する。

20

【発明の効果】**【0007】**

本発明によれば、一つのウェル領域を広い視野で観察する際に、観察画像の輝度ムラを良好に補正した均一な輝度の標本画像を取得できる顕微鏡装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

30

【0008】

【図1】実施の形態にかかる顕微鏡装置の概略構成図。

【図2】輝度ムラのある画像の一例

【図3】輝度ムラを補正した画像を取得手順のフローチャート

【図4】フローチャートにおける輝度ムラ補正説明図

【図5】第2、および第2の変形例の輝度ムラ低減方法を説明する図

【発明を実施するための形態】**【0009】**

以下、本願の実施形態にかかる顕微鏡装置について図面を参照しつつ説明する。なお、以下の実施形態は、発明の理解を容易にするためのものに過ぎず、本願発明の技術的思想を逸脱しない範囲において当業者により実施可能な付加・置換等を施すことを排除することは意図していない。

40

【0010】

本実施形態にかかる顕微鏡装置は、シャーレやウェルプレート等の培養容器に配した試料を培養液で浸した状態で低倍率、広視野で観察することに適した明視野顕微鏡と画像を処理する画像処理装置などから構成されている。

【0011】

図1に示すように、本実施形態にかかる顕微鏡装置1は、試料2を載置するためのステージ3、ステージ3の上方に配置された照明光学系4、およびステージ3の下方に配置された結像光学系5を有している。なお、ステージ3、照明光学系4、および結像光学系5

50

は、下方に不図示のベース部を備えた顕微鏡支柱6に対して、支持部材7(7a~7d)を介して上下方向の位置を変更可能に支持されている。

【0012】

本実施形態において、試料2には細胞等の位相物体が用いられている。斯かる試料2は、例えば96ウェルプレート10の各ウェル10aに培養液11と共に注入されており、当該96ウェルプレート10がステージ3上に載置されている。

【0013】

結像光学系5は、照明光学系4で照明された任意のウェル10a内の試料2を観察するためのものであり、図1に示すように、ステージ3側から順に、高開口数の第1対物レンズ12、第2対物レンズ13、およびCCDやCMOSなどで構成されるカメラ14を有する。

10

【0014】

第1対物レンズ12は、ウェル10aの底面から射出された光を略漏れなく集光するための高い開口数(NA)を有する対物レンズであり、本実施形態においては6.4mm程度の実視野を実現するために、倍率が1.25倍、開口数が0.25以上のものが用いられている。

【0015】

カメラ14には、2/3インチCCDカメラが用いられている。また、カメラ14には、画像処理装置40が接続されている。画像処理装置40は、例えばパーソナルコンピュータ(以後、単にPCと記す)41とモニター42とキーボードやマウスなどの入出力デバイス43と、メモリ44とから構成されている。

20

【0016】

また、支持部材7aには照明光学系4を、XYZ駆動可能な駆動手段32が配置されている。また駆動手段32は、照明光学系4のXYZ方向の各移動量を検出する検出手段を内蔵している。

【0017】

照明光学系4は、ウェル10a内の試料2を透過照明するためのものであり、図1に示すように、ステージ3側から順に、コンデンサレンズ18、開口絞り19、可動絞り20、コレクタレンズ21、および光源22を有する。

【0018】

可動絞り20は、ウェル10aの底面を略均一に照明するための低NAの照明光を生成するための絞り部材である。本実施形態において可動絞り20には、照明光学系4から射出される照明光のNA(以下、「照明NA」という。)が0.1以下となるように、絞り径や光軸上の位置等が予め設計された絞り部材が用いられている。なお、可動絞り20は、照明光がウェル10aの壁面で反射または透過することを防止するために、照明光の光束がウェル10aの内径よりも小さくなるように照明光の照射領域を絞る役割も果たしている。

30

【0019】

また、可動絞り20には、可動絞り20を光軸方向および光軸に垂直な方向へ移動させるための不図示の移動機構と、絞り径を変更するための不図示の絞り径調整機構が備えられている。これにより、前記移動機構によって可動絞り20を光軸方向へ移動させることで、試料2への照明光の主光線の角度を変更することができる。また、前記絞り径調整機構によって可動絞り20の絞り径を変更し、照明光の実効的なNAを変更することができる。さらには、前記移動機構によって可動絞り20を光軸に垂直な方向へ移動させることで、照明光学系4から射出される照明光の試料2に対する照射位置を光軸に垂直な方向へ変更することができる。

40

【0020】

コンデンサレンズ18には、コンデンサレンズ18を光軸方向へ移動させるための不図示の移動機構が備えられている。これにより、当該移動機構によってコンデンサレンズ18を光軸方向へ移動させることで、照明光の集光位置を光軸方向へ変更することができ、

50

これによって視野内のシェーディングなどを除去することができる。

【0021】

光源22には、位相物体の観察に好適なコヒーレント性の高い赤色LED（発光ダイオード）が用いられている。これにより、照明の均一性と長寿命性を確保することができる。また、培養液11内のフェノールレッド等の栄養素が培養液11の劣化に伴って変色し、これが可視域の光を吸収してしまうため、培養状態によって観察像の明るさが変化してしまうという影響を解消することができる。

【0022】

以上の構成の下、本実施形態にかかる顕微鏡装置1において、照明光学系4の光源22から発せられた照明光は、コレクタレンズ21を経た後、可動絞り20を通過する。可動絞り20は、光軸上の位置によって、主光線の方向を変えることができ、開口の大きさや開口部の位置を光軸から離れた位置に変化させることにより、照明光の実効的なNAを変えることができる。そして斯かる照明光は、開口絞り19を通過し、コンデンサレンズ18で集光されることにより、必要な照明光の実効的なNAや主光線の方向を形成することとなる。このようにして形成された照明光は、ステージ3上の96ウェルプレート10における任意のウェル10a内の試料2に培養液11を介して照射される。このように、照明光学系4は、試料2に対して一点に集光する光束の収束角とその主光線の方向が制御された照明を実現することができる。

10

【0023】

ここで、当該ウェル10a内の培養液11の液面は、上述のように凹面となってレンズ効果が生じている。本顕微鏡装置1では、第1対物レンズ12の開口数を十分に大きくし、結像光学系5を構成する第1対物レンズ12の開口数よりも小さい実効的なNAを持つ照明光を斯かる培養液11の凹面に照射することで、培養液11の凹面によって照明光の方向が第1対物レンズ12の外側に向かって屈折しても、培養液11の液面によるレンズ効果の影響を受けにくくしている。また、このときに、照明光の主光線の方向を培養液11の液面により屈折される方向を考慮して、屈折される方向とは逆方向に光軸に対して主光線の方向を向けることで、屈折した照明光がウェル10aの壁面で反射又は透過することを防止することができ、即ち照明光束がウェル10a内のみを進行することとなり、これによってウェル10aの底面をムラなく略均一に照明することができる。

20

【0024】

そして、以上のように結像光学系5を構成する第1対物レンズ12の開口数よりも小さいNAの照明光で照明された試料2からの光は、結像光学系5の第1対物レンズ12に照射する。ここで、第1対物レンズ12は上述のように高開口数の対物レンズであるため、ウェル10aの底面から射出された光（前述の屈折した照明光で照明された試料2からの光を含む）を略漏れなく集光することができる。このようにして第1対物レンズ12によって集光された光は、第2対物レンズ13を介して、カメラ14の撮像面上に試料2の観察像を形成する。なお、詳細には、上述のような主光線の方向と照明光の実効的なNAを持つ照明光によってウェル10aの壁面での反射光、即ちノイズ光の発生を抑えながらウェル10aの底面を略均一に照明することで、試料2の背景（バックグラウンド）からの光（直接光）のNAが小さくなるため、斯かる直接光と試料2で回折された回折光とが干渉してコントラストの良好な試料2の観察像が形成されることとなる。このようにして形成された試料2の観察像は、カメラ14で撮影されて不図示のモニタに表示され、使用者に観察されることとなる。

30

40

【0025】

ここで、上述のように再生医療の研究等において培養した細胞を観察する際には、低倍率で視野の全域を観察することが求められており、培養液のレンズ効果の影響を考慮しながら視野の全域で観察を行うためには、第1対物レンズに0.25相当の開口数と1.25倍程度の倍率が必要となる。

【0026】

これに対して本実施形態にかかる顕微鏡装置1は、上述のように照明光の実効的なNA

50

が 0.1 以下、第 1 対物レンズ 12 の倍率が 1.25 倍で開口数が 0.25 以上であり、これによって視野の全域 (6.4 mm 程度の実視野) で観察を行うことができる。また、上述のように 96 ウェルプレート 10 におけるウェル 10 a の内径は 6.4 mm 程度であるため、本実施形態にかかる顕微鏡装置 1 は、2/3 インチ CCD カメラであるカメラ 14 によって、96 ウェルプレート 10 のウェル 10 a の底面全域を 1 枚の画像として撮影することができる。即ち、最大限のスループットでレンズ効果の影響を解消した試料 2 の観察像を取得することができる。

【0027】

また、上述のように培養液 11 のレンズ効果の大きさは、培養容器の種類、培養液 11 の組成、培養容器の材質、及び培養液 11 の量等によって様々に変化する。特に、培養容器の種類によって培養液 11 の凹面の直径は異なり、これによって凹面の曲率半径は大きく変化し、レンズ効果も大きく変化することとなる。

10

【0028】

そこで、本実施形態にかかる顕微鏡装置 1 は、培養液 11 のレンズ効果の変化に応じて、上述のように可動絞り 20 を光軸方向に移動させたり、可動絞り 20 の絞り径を変更させたりすることで、照明光の実効的な NA や照明光の主光線の方向を変更することができる。これにより、培養液 11 のレンズ効果が変わった場合でも、これに対応した低 NA の照明光によって培養容器の底面を略均一に照明することができ、レンズ効果の影響を解消した試料 2 の観察像を取得することができる。

20

【0029】

しかし、上述のような照明光学系 4、結像光学系 5 においても、照明光学系 4 や結像光学系 5 の配置ずれやカメラ 14 の感度ムラなどにより、カメラ 14 で撮影される画像に図 2 に示すような輝度ムラが発生することがある。

【0030】

図 2 において、S は視野であるウェル 10 a の底面全域の画像領域を示し、S1 は輝度の高い領域を、S2 は輝度の低い領域をそれぞれ示している。本顕微鏡装置 1 では、低い倍率でウェル 10 a の底面全域に亘る領域の試料 2 (細胞) を観察するため、図 2 に示すような輝度ムラが存在すると視野内で試料 2 のコントラストむらが発生し、試料 2 の細胞分布状態を正確に計測できないという問題が生じる。

30

【0031】

本顕微鏡装置 1 は、このような視野 S 内に輝度ムラがある画像から視野 S 全体を均一な輝度に補正し、ウェル 10 a 底面全域に亘って良好な輝度状態の試料 2 (細胞観察) を可能にする画像処理装置 40 を有している。以下、画像処理装置 40 において、視野 S 内の輝度を均一にした画像を生成するフローチャートを図 3 に基づき説明する。

【0032】

(第 1 の方法)

図 3 のフローチャート、および図 4 を参照しつつ第 1 の輝度ムラ補正画像取得手順について説明する。

【0033】

本手順では、顕微鏡装置 1 において、カメラ 14 でウェル 10 a の底面全域に亘る試料 2 の画像を取得する際、駆動手段 32 で照明光学系 4 を光軸に直交する面内 (XY 面内) を所定の移動量 (X、Y) 移動して試料 2 の複数の画像をそれぞれ取得し、画像処理装置 40 の画像処理部を内蔵する PC 41 により輝度値補正処理して輝度ムラを補正した画像を生成しモニタ 42 に表示すると共にメモリ 44 に保存する。以下、ステップ毎に説明する。なお、PC 41 が画像処理を開始する前に観察者がステージ 3 上にウェルプレート 10 を載置し、画像を取得するウェル 10 a を照明光学系 4 及び結像光学系 5 の光路に配置しているとする。

40

【0034】

(ステップ S1)

PC 41 は、この位置でのウェル 10 a 底面全域 (視野 S) にわたる細胞画像 I0 (i

50

= 0) をカメラ 14 で取得し不図示のバッファメモリに保存する。また、PC 41 は、対象とする画像 S 領域を画像処理部で輝度信号などの信号変化を検出して自動的に行う。なお、画像 S 領域の抽出は、観察者がモニタ 42 の画像を見ながら抽出することもできる。

【0035】

(ステップ S 2)

PC 41 は、画像 I 0 の各画素の輝度信号値分布から、輝度平均値 μ 、ノイズ分布 を計算し、閾値 $T = \mu + 3$ を決定する。

【0036】

(ステップ S 3)

PC 41 は、決定した閾値 T により画像 S 内で光量が異常となる面積 $R(i)$ を算出する。算出結果の一例を図 4(a) に示す。図 4(a) では、左側部分に三日月状に光量異常領域 R_i が存在する場合を示している。また、PC 41 は、 $R(i) = R(i) - R(i-1)$ を算出する。 $R(i)$ は、今回取得した画像の光量異常面積とひとつ前に取得した光量異常面積との差分である。 $i = 1$ の時は $R(1) = R(1)$ となる。

10

【0037】

(ステップ S 4)

PC 41 は、前もって決定してある最小光量許容面積 $R(\min)$ とステップ S 3 で求めた光量異常面積 R_i の大小比較を行い、 $R(i) > R(\min)$ ならば次のステップ S 5 を実行し、 $R(i) \leq R(\min)$ ならばステップ S 12 を実行する。 $R(\min)$ は、計測対象物(本願では細胞)の面積にほぼ等しい値に設定されるが、これに限られず任意の面積に設定することができる。

20

【0038】

(ステップ S 5)

PC 41 は、光量異常面積 $R(i)$ が $R(\min)$ より大きいので、照明光学系 4 を X Y 面内で前もって決めてある所定移動量 $L(X, Y)$ 加えた位置に移動する。

【0039】

(ステップ S 6)

PC 41 は、照明光学系 4 を所定量移動した後、この位置でカメラ 14 を介して画像 I ($i+1$) を取得する。

30

【0040】

(ステップ S 7)

PC 41 は、閾値 T を用いて光量異常面積 $R(i+1)$ を算出するとともに、 $R(i) = R(i+1) - R(i)$ を算出する。この状態を図 4(b) に示す。 $R(i+1)$ は、一つ前の $R(i)$ より小さな領域となる。

【0041】

(ステップ S 8)

PC 41 は、 $R(i)$ と予め求められている光量異常面積閾値 T_r とを比較する。 $R(i) > T_r$ ならば次のステップ S 9 を実行し、 $R(i) \leq T_r$ ならばステップ S 5 にもどりステップ S 5 からステップ S 7 を実行する。なお、光量異常面積閾値 T_r は視野 S のほぼ 25% 程度の値を用いるが、これに限られず任意に設定できる。

40

【0042】

(ステップ S 9)

PC 41 は、カウンタ i が前もって決められている i_{\max} 値に達したか否かを判断する。カウンタ i が i_{\max} に達していなければステップ S 10 に、 i_{\max} に達していればステップ S 13 を実行する。

【0043】

(ステップ S 10)

PC 41 は、カメラ 14 を介して再度画像を取得し、メモリ 44 に保存する(ステップ S 11)。またカウンタ i に 1 をプラスして ($i = i + 1$)、ステップ S 2 に戻る。以降

50

ステップ S 2 からステップ S 9 を実行する。

【 0 0 4 4 】

(ステップ S 1 2)

P C 4 1 は、光量異常面積 R_i が予め設定した R_{min} 以下となったのでほぼ光量異常面積がなくなると判断する。そして、P C 4 1 は、メモリ 4 4 に保存してある画像 I_i (I_0 、 I_1 、 \dots 、 I_i) を用いて、各画像の画素毎に輝度値を平均化する処理を行い視野 S の全域にわたって輝度が均一になった画像を生成して、モニタ 4 2 に表示するとともにメモリ 4 4 に保存し、観察者に画像処理が終了した旨の表示をして知らせる。

【 0 0 4 5 】

(ステップ S 1 3)

P C 4 1 は、カウンタ i が $imax$ を超えたことを観察者にアラーム表示をして知らせる。照明光学系 4 の移動量 L 値が不適切 (小さすぎた) で所定の反復回数では輝度均一画像の取得ができなかったため、観察者に照明光学系 4 の移動量 L 値の変更を指示する表示をする。観察者は、新たな移動量 L (X 、 Y) を設定し、再度ステップ S 1 から実行するように P C 4 1 に指示する。

【 0 0 4 6 】

以上のフローを P C 4 1 が実行することで、視野 S 全域にわたって輝度を均一にした画像を生成することができる。

【 0 0 4 7 】

なお、上記説明では、照明光学系 4 を光軸に直行する面内 (XY 平面) に移動する場合について説明したが、光軸方向 (Z 軸) に移動しながら同様の処理を行ってもよいし、光軸を中心として回転 (θ 方向) しながら同様の処理を行うことで、輝度の均一な画像を生成することができる。

【 0 0 4 8 】

また、上記説明では照明光学系 4 を XYZ 方向に移動する場合について述べたが、ステージ 3 からカメラ 1 4 までを一体的に移動することでも上記と同様の効果を奏することができる。

【 0 0 4 9 】

(第 2 の方法)

上記方法では、顕微鏡装置 1 において、カメラ 1 4 でウェル 1 0 a の底面全域に亘る試料 2 の画像を取得する際、照明光学系 4 を XY 面内で L ずつ移動して輝度値補正処理した輝度ムラ補正画像を生成したが、以後の説明では、照明光学系 4 を光軸を中心として回転し、得られた複数の画像の各画素を平均化処理して輝度ムラ補正画像を生成する場合について説明する。なお、ステージ 3 からカメラ 1 4 までを回転しても同様の処理で輝度ムラを補正した画像を生成することができる。

【 0 0 5 0 】

図 5 (a) に示すように、画像処理装置 4 0 の P C 4 1 は、駆動手段 3 2 を駆動して、照明光学系 4 を光軸を中心として 90 度ずつ回転して (例えば $\theta = 0$ 、 90 、 180 、 270 °)、各回転角度の画像をそれぞれ取得する。例えば 90 度毎の場合、画像は 4 枚取得する。P C 4 1 は、この取得した 4 枚の画像の各画素それぞれの輝度値の単純平均化処理を行い、輝度ムラを良好に補正し輝度の均一な画像を生成する。なお、等分割角度であれば回転角度は 90 度に限らず任意の角度で良いことは言うまでもない。

【 0 0 5 1 】

詳説すると、P C 4 1 は駆動手段 3 2 を駆動して、画像を取得する角度に照明光学系 4 の回転角度を設定し、内蔵する検出手段で角度を検出し回転角度が設定し終わった後、カメラ 1 4 で画像 ($\theta = 0$ °) を取得して P C 4 1 のメモリ 4 4 に記憶する。

【 0 0 5 2 】

続いて、P C 4 1 は駆動手段 3 2 を駆動して照明光学系 4 を次の回転角度 ($\theta = 90$ °) 位置に回転し、この角度での画像をカメラ 1 4 で取得して P C 4 1 のメモリ 4 4 に記憶する。

10

20

30

40

50

【0053】

以降、PC41は同様にして $\theta = 180^\circ$ 、 $\theta = 270^\circ$ の画像をカメラ14を介して取得してPC41のメモリ44に記憶する。

【0054】

PC41は、4枚の画像が取得できたので補正画像生成処理を開始する。PC41は内蔵されている画像処理部において、記憶されている4枚の画像の各画素の輝度値を用いて輝度値の単純平均化処理を行い、処理結果に基づいて輝度ムラを補正した画像を生成しモニタ42に表示する(図5(b)参照)と共にメモリ44に記憶する。なお、ここで用いられる単純平均化処理は、公知の手段あるいはプログラムを使用することができる。

【0055】

このように、本実施形態の第2の方法にかかる顕微鏡装置1では、PC41は照明光学系4を回転しながら複数枚の画像を取得して、取得した全画像を用いた単純平均化処理を行うことで、輝度ムラを良好に補正し輝度の均一な1枚の画像を生成しモニタ42に表示することができる。

【0056】

(第2の方法の変形例)

この変形例は、第2の方法と同様に、顕微鏡装置1において、カメラ14でウェル10aの底面全域に亘る試料2の画像を取得する際、照明光学系4とステージ3から結像光学系5のカメラ14の少なくとも一方を光軸を中心として回転しながら試料2の複数の画像をそれぞれ取得し、画像処理装置40のPC41により後述する方法で輝度値補正処理して輝度ムラを補正した画像を生成する。

【0057】

図3(a)に示すように、PC41は駆動手段32を駆動して照明光学系4を光軸を中心として90度ずつ回転して(例えば $\theta = 0, 90, 180, 270^\circ$)、各回転角度の画像をそれぞれ取得する。90度毎の場合、画像は4枚取得する。PC41は、予め取得しておいた基準画像の輝度値とこの取得した4枚の画像とのそれぞれの輝度値のずれ量に応じた加重平均化処理を行い、輝度ムラを良好に補正し輝度の均一な画像を生成する。なお、等分割角度であれば回転角度は90度に限らず任意の角度で良いことは言うまでもない。

【0058】

PC41は、駆動手段32を駆動して画像を取得する角度に照明光学系4の回転角度を設定し、回転角度が設定し終わった後、カメラ14で画像($\theta = 0^\circ$)を取得してPC41のメモリ44に記憶する。

【0059】

以降、PC41は、駆動手段32を駆動して、 $\theta = 90^\circ$ 、 $\theta = 180^\circ$ 、 $\theta = 270^\circ$ の画像をカメラ14を介して取得してPC41のメモリ44に記憶する。

【0060】

PC41は、4枚の画像が取得できたのでPC41は内蔵されている画像処理部において記憶されている基準画像の輝度値と取得した4枚の画像の各画素の輝度値から加重平均化処理を行い、処理結果に基づいて輝度ムラを補正した画像を生成しモニタ42に表示する(図3(b)参照)と共にメモリ44に記憶する。なお、ここで用いられる加重平均化処理は、公知の手段あるいはプログラムを使用することができる。

【0061】

このように、本実施形態にかかる顕微鏡装置1では、PC41は照明光学系4を回転しながら複数枚の画像を取得して、取得した全画像と予め取得しておいた基準画像の輝度値とから加重平均化処理を行うことで、輝度ムラを良好に補正し輝度の均一な画像を生成しモニタ42に表示することができる。この第2の方法の変形例は、複数枚の画像に基づく加重平均化処理を行う分、従来に比べて輝度ムラ補正精度を向上させた画像を生成することができる。

【0062】

10

20

30

40

50

このように、本実施形態にかかる顕微鏡装置 1 では、P C 4 1 は照明光学系 4 を駆動しながら取得した画像の輝度ムラ領域を検出し、この輝度ムラ領域が所定の面積以下になるように照明光学系 4 を移動して取得した画像の各画素の輝度値を平均化処理することで、輝度の均一な画像を生成しモニタ 4 2 に表示することができる。

【 0 0 6 3 】

また、本実施形態にかかる顕微鏡装置 1 では、P C 4 1 は照明光学系 4 を駆動しながら複数枚の画像を取得して、取得した画像の 1 枚から基準となる輝度値を選択し加重平均化処理を行うことで、輝度ムラを良好に補正し輝度の均一な画像を生成しモニタ 4 2 に表示することができる。

【 符号の説明 】

10

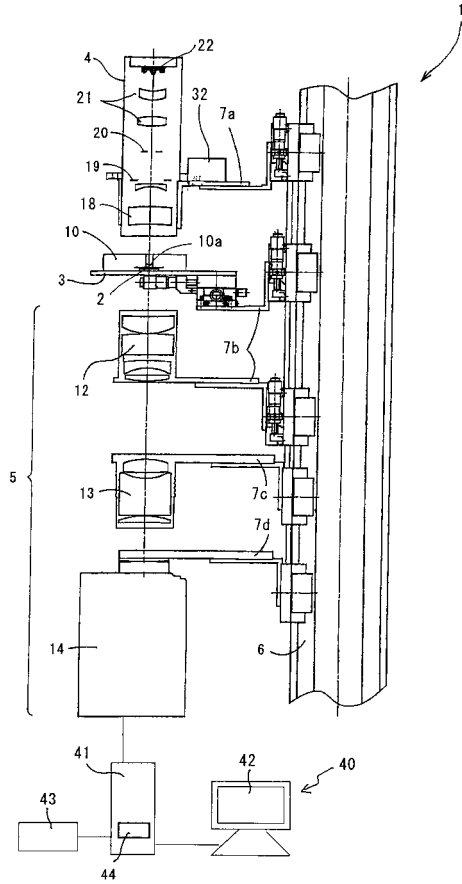
【 0 0 6 4 】

- 1 顕微鏡
- 2 試料
- 4 照明光学系
- 5 結像光学系
- 1 0 9 6 ウェルプレート
- 1 1 培養液
- 1 2 第 1 対物レンズ
- 1 3 第 2 対物レンズ
- 1 4 カメラ
- 1 8 コンデンサレンズ
- 1 9 開口絞り
- 2 0 可動絞り
- 2 1 コレクタレンズ
- 2 2 光源
- 3 2 駆動手段
- 4 0 画像処理装置
- 4 1 P C
- 4 2 モニタ
- 4 3 入出力デバイス
- 4 4 メモリ

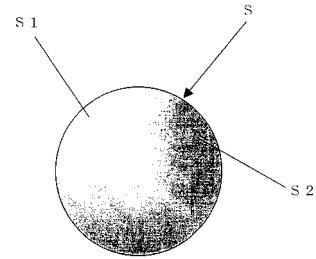
20

30

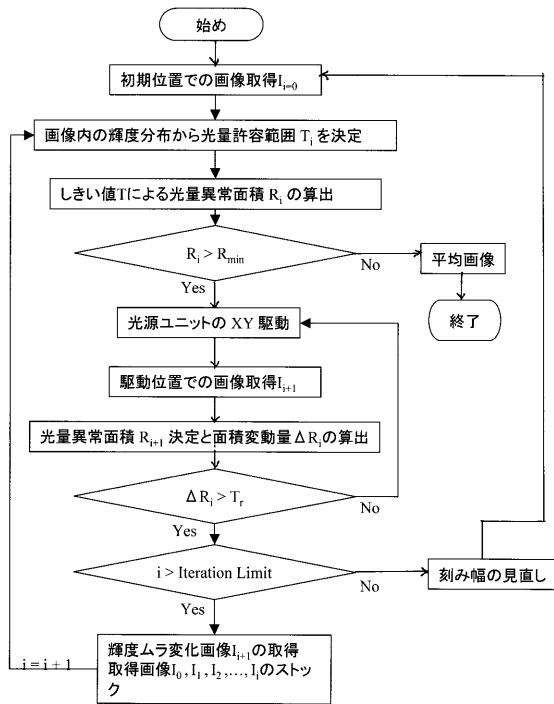
【 図 1 】



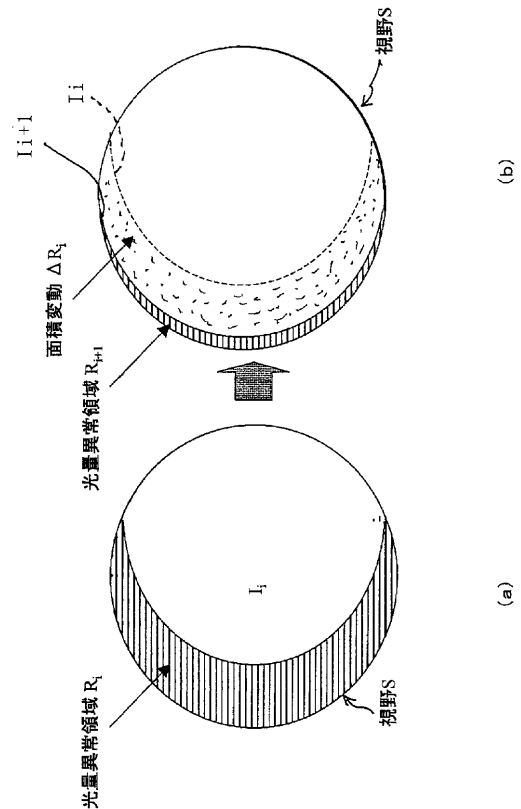
【 図 2 】



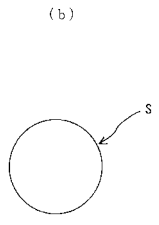
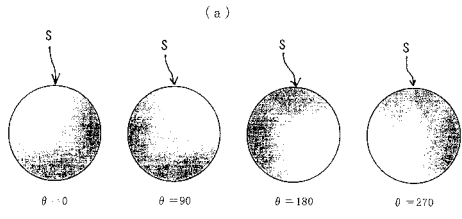
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 5B057 AA10 CA08 CA12 CA16 CB08 CB12 CB16 CC01 CE11
5C122 DA25 EA12 FB03 GG08 HA82 HA88 HB01