

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号  
特許第4873917号  
(P4873917)

(45) 発行日 平成24年2月8日(2012.2.8)

(24) 登録日 平成23年12月2日(2011.12.2)

(51) Int.Cl.

F I

GO 2 B 21/00 (2006.01)

GO 2 B 21/00

GO 1 N 21/64 (2006.01)

GO 1 N 21/64

E

請求項の数 4 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2005-283023 (P2005-283023)	(73) 特許権者	000000376
(22) 出願日	平成17年9月28日 (2005. 9. 28)		オリンパス株式会社
(65) 公開番号	特開2007-93988 (P2007-93988A)		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
(43) 公開日	平成19年4月12日 (2007. 4. 12)	(74) 代理人	100118913
審査請求日	平成20年9月11日 (2008. 9. 11)		弁理士 上田 邦生
		(74) 代理人	100112737
			弁理士 藤田 考晴
		(72) 発明者	服部 敏征
			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
		(56) 参考文献	特開2003-195172 (JP, A)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 走査型レーザー顕微鏡装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標本の特定部位に刺激を与えるための刺激用レーザー光の照射領域と目標積算値とを入力する入力手段と、

前記刺激用レーザー光を前記入力された照射領域に走査して照射する刺激用光学系と、  
前記刺激用レーザー光の一部を前記標本へ至る手前で分岐してその光強度を計測し、前記計測された光強度を予め設定された補正值で補正して標本に照射された刺激用レーザー光の強度を算出する光強度計測手段と、

前記光強度計測手段からの前記標本に照射された刺激用レーザー光の強度の時間的な積算値を求める積算手段と、

前記積算手段の積算結果を表示する表示手段と、

前記積算手段の算出結果が前記入力された目標積算値以上であるか否かを判定する判定手段と、

該判定手段の判定結果に応じて前記刺激用レーザー光の照射を停止させる制御手段と、  
を具備するレーザー顕微鏡装置。

【請求項 2】

前記判定手段は、前記照射領域を構成する小領域毎に前記判定を行う請求項 1 に記載のレーザー顕微鏡装置。

【請求項 3】

前記判定手段は、前記照射領域の全域に前記刺激用レーザー光が照射された後に、前記判

定を行う請求項 1 に記載のレーザ顕微鏡装置。

【請求項 4】

前記目標積算値に基づいて、レーザ照射時間及びレーザ強度を決定するレーザ照射条件決定手段を備え、

前記制御手段が、前記レーザ照射条件決定手段により決定された前記レーザ照射時間及びレーザ強度に基づいて、前記刺激用光学系を制御する請求項 1 から請求項 3 のいずれかの項に記載のレーザ顕微鏡装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標本面上をレーザ光で走査したときの標本からの透過光や反射光又は標本に発生する蛍光を検出する走査型レーザ顕微鏡装置に係り、特に、光刺激により標本に与えた光量の検出に関するものである。

【背景技術】

【0002】

走査型レーザ顕微鏡は、レーザ光を標本の X 軸及び Y 軸方向に走査しながら照射し、標本からの透過光や反射光又は標本に発生する蛍光を検出器で検出して透過光や反射光又は蛍光の二次元の輝度情報を得る顕微鏡である。また、この輝度情報を X - Y 走査位置に対応させてディスプレイなどに輝度の二次元分布として表示することによって、標本の蛍光像、透過像あるいは反射像を観察することも可能である。

【0003】

このような走査型レーザ顕微鏡では、アルゴンレーザ等のガスレーザが用いられている。このガスレーザは、温度変化等の環境変化によりレーザ光の出力に変動が見られる。このため、光刺激を定量化しようとしても照射するレーザ光の変動により定量化が困難であった。

【0004】

このような問題に対し、特開 2003 - 195172 号公報（特許文献 1）には、レーザ光量をモニタし、そのモニタした結果をレーザ光源にフィードバックすることで、レーザ光量の安定化を図る方法が開示されている。この方法によれば、長時間行われるタイムラプス観察のような実験において定量的な観察が可能となる。

【0005】

【特許文献 1】特開 2003 - 195172 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ところで、上述した光刺激の実験を行う際、光刺激を定量化するには、標本に照射した光量を正確に把握することが重要となる。

しかしながら、上記特許文献 1 に開示されている方法では、標本に対してどのくらいの光量が照射されたのかを正確に把握することができないという問題があった。

【0007】

本発明は、このような事情に鑑みてなされたものであって、オペレータに対して、光刺激により標本に照射した光量を通知することにより、定量的な観察を可能とする走査型レーザ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】

【0008】

上記課題を解決するために、本発明は以下の手段を採用する。

本発明は、標本の特定部位に刺激を与えるための刺激用レーザ光の照射領域と目標積算値とを入力する入力手段と、前記刺激用レーザ光を前記入力された照射領域に走査して照射する刺激用光学系と、前記刺激用レーザ光の一部を前記標本へ至る手前で分岐してその光強度を計測し、前記計測された光強度を予め設定された補正值で補正して標本に照射さ

10

20

30

40

50

れた刺激用レーザ光の強度を算出する光強度計測手段と、前記光強度計測手段からの前記標本に照射された刺激用レーザ光の強度の時間的な積算値を求める積算手段と、前記積算手段の積算結果を表示する表示手段と、前記積算手段の算出結果が前記入力された目標積算値以上であるか否かを判定する判定手段と、該判定手段の判定結果に応じて前記刺激用レーザ光の照射を停止させる制御手段と、を具備するレーザ顕微鏡装置を提供する。

【0009】

上記レーザ顕微鏡装置によれば、標本に照射した光刺激用レーザ光の光強度を計測し、その計測値の積算値を表示させるので、オペレータは光刺激により標本に照射した正確な光量を把握することが可能となる。これにより、定量的な観察等を行うことができる。

上記光強度計測手段は、例えば、後述する実施形態に係るビームスプリッタ41、光検出器42及び光量補正回路43に相当する。

【0011】

また、光刺激により標本に照射した光量が目標積算値以上であった場合には、自動的に刺激用光学系による光刺激を停止させることが可能となるので、オペレータの負担を軽減することができる。更に、手動で光刺激を停止させる場合に比べて、より正確なタイミングで光刺激を停止させることができるので、光刺激の照射精度を向上させることが可能となる。

【0012】

上記レーザ顕微鏡装置において、予め設定された照射領域に前記刺激用レーザ光を走査して照射する場合、前記判定手段は、例えば、前記照射領域を構成する小領域毎に前記判定を行っても良く、或いは、前記照射領域の全域に前記刺激用レーザ光が照射された後に、前記判定を行っても良い。

【0013】

照射領域を構成する小領域毎に、その小領域に照射した光刺激用レーザ光の強度が目標積算値に達したか否かを判定する場合には、各小領域に対して目標となる光量の光刺激を正確に与えることができる。

小領域は、例えば、照射領域を走査する際に決定されるピクセルを用いることができる。また、ピクセル以外にも、所定の条件に従って、照射領域を複数の領域に分割し、分割した一つ一つの小領域について、上記判定を行うようにしても良い。

また、照射領域の全域に刺激用レーザ光が照射された後に、該全域に照射した刺激用レーザ光の強度が目標積算値に達したか否かを判定する場合には、全域に一定の速度で光刺激を与えることが可能となるので、光刺激の定量性を確保しつつ、該照射領域に対して目標となる光量の光刺激を与えることが可能となる。

なお、上記走査領域は、標本上に複数箇所設定されていても良い。また、走査領域は、面積を有する所定の領域のほか、線状（ライン状）に設定されていても良く、また、点（ポイント）として設定されていてもよい。

【0015】

更に、本発明のレーザ顕微鏡装置は、前記目標積算値に基づいて、レーザ照射時間及びレーザ強度を決定するレーザ照射条件決定手段を備え、前記制御手段が、前記レーザ照射条件決定手段により決定された前記レーザ照射時間及びレーザ強度に基づいて、前記刺激用光学系を制御するような構成としても良い。目標積算値に基づいて、好適なレーザ照射時間及びレーザ強度を自動的に決定することができるので、効率の良い光刺激を実現させることが可能となる。

【0016】

本発明の参考例は、標本の特定部位に刺激を与えるための刺激用レーザ光を照射する刺激用光学系を備えるレーザ顕微鏡に用いられる光量検出装置であって、前記刺激用レーザ光の光強度を計測する光強度計測手段と、前記光強度計測手段からの計測値を積算する積算手段と、前記積算手段の積算結果を出力する出力手段とを具備する光量検出装置を提供する。

上記光量検出装置によれば、標本に照射した光刺激用レーザ光の光強度を計測し、その

10

20

30

40

50

計測値の積算値を出力するので、該積算値を受信した装置において、積算値を表示装置等に表示することにより、オペレータに対して光刺激により標本に照射した光量を通知することができる。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、光刺激により標本に照射した光量を提供するので、定量的な観察ができるという効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明の実施形態について、図面を参照して説明する。

【0019】

〔第1の実施形態〕

図1は、本発明の第1の実施形態に係るレーザ顕微鏡装置の概略構成を示すブロック図である。

本実施形態に係るレーザ顕微鏡装置は、走査型レーザ顕微鏡1とコンピュータ2とを備えて構成されている。

走査型レーザ顕微鏡1は、画像取得用のレーザ光を標本の焦点面上に2次元的に走査させて照射する画像取得用光学系10と、標本に刺激を与えるための刺激用レーザ光を標本に照射する刺激用光学系20と、標本からの反射光を検出する検出光学系30と、刺激用レーザ光の強度を計測する光量計測装置40とを備えている。

【0020】

画像取得用光学系10は、第1の光源11、ダイクロイックミラー12、第1の走査光学ユニット13、リレーレンズ14及びミラー15を備えて構成される。

刺激用光学系20は、第2の光源21、第2の走査光学ユニット22、リレーレンズ23及びダイクロイックミラー24を備えて構成される。ダイクロイックミラー24は、画像取得用光学系10からのレーザ光の波長より長い波長の光を透過すると共に、刺激用光学系20からのレーザ光の波長を反射する特性を有している。

【0021】

検出光学系30は、上記画像取得用光学系10のダイクロイックミラー12の分岐光路上に配置されている。この検出光学系30は、例えば、測光フィルタ、レンズ、共焦点ピンホール及び光電変換素子等を備えて構成される。

光量計測装置40は、ビームスプリッタ41、光検出器42、光量補正回路43、及び積算回路44を備えて構成されている。ビームスプリッタ41は、刺激用光学系から発せられる刺激用レーザ光の光路上に設置される。ビームスプリッタ41は、例えば、入射光の80%を透過し、20%を反射するように構成されている。

【0022】

このような走査型レーザ顕微鏡1において、上記画像取得用光学系10の光軸と、刺激用光学系20の光軸とは、ダイクロイックミラー24により合成され、結像レンズ51、対物レンズ52に導かれるようになっている。また、リレーレンズ14及び23の焦点位置は、結像レンズ51の焦点位置と一致するように配置されている。標本Aは昇降可能なステージ53上に載置されている。

【0023】

画像取得用光学系10、刺激用光学系20、検出光学系30、及び光量計測装置40は、コントロールユニット54に接続されている。走査型レーザ顕微鏡1は、コントロールユニット54を介してコンピュータ2に接続されている。

コンピュータ2は、CPU3、及びGUI4を備えているほか、図示しない記憶装置を備えて構成されている。更に、コンピュータ2は、入力装置5及び表示装置6と接続している。入力装置5は、キーボードやマウスなどを備えている。表示装置6は、フレームメモリ及びディスプレイを備えている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 4 】

具体的には、コンピュータ 2 内において、CPU 3 は、図示しない RAM (Random Access Memory) などのメモリ、HD (Hard Disk) ROM (Read Only Memory) などの補助記憶装置などに接続されている。

補助記憶装置には、例えば、各種アプリケーションプログラムが格納されており、CPU 3 が補助記憶装置からアプリケーションプログラムをメモリに読み出し、実行することにより、後述の各種処理を実現させる。

GUI 4 は、コンピュータ 2 が備える表示機能であり、後述する条件設定画面を表示装置 6 のディスプレイに表示させ、オペレータによる目標積算値等の入力処理を支援するものである。

10

## 【 0 0 2 5 】

次に、上記走査型レーザ顕微鏡装置の作動について説明する。

まず、コンピュータ 2 内の CPU 3 から走査型レーザ顕微鏡 1 内のコントロールユニット 5 4 に対して蛍光観察の開始を指示する制御指令が入力されると、コントロールユニット 5 4 により画像取得用光学系 1 0 の各部が制御されることにより、蛍光観察が開始される。この蛍光観察においては、第 1 の光源 1 1 から出射されたレーザ光が、第 1 の走査光学系へ導かれ、任意の方向に偏向走査される。このレーザ光は、更に、リレーレンズ 1 4、ミラー 1 5、ダイクロイックミラー 2 4、結像レンズ 5 1、対物レンズ 5 2 を介して、ステージ 5 3 上に固定された標本 A の断面上に集光され、断面内で二次元に走査される。

## 【 0 0 2 6 】

20

標本 A には第 1 の光源 1 1 の波長によって励起される蛍光指示薬が導入されており、断面内でレーザ光が 2 次元的に走査されることにより、蛍光指示薬が励起されて蛍光を生じる。対物レンズ 5 2 により捕らえられた蛍光は、上記レーザ光と同じ光路を逆向きに進み、対物レンズ 5 2、結像レンズ 5 1、ダイクロイックミラー 2 4 を透過し、ミラー 1 5、リレーレンズ 1 4、第 1 の走査光学ユニット 1 3 を介してダイクロイックミラー 1 2 へ導かれる。ダイクロイックミラー 1 2 は、第 1 の光源 1 1 から出射されるレーザ光の波長より長い波長の光を反射する特性となっており、これにより上記蛍光はダイクロイックミラー 1 2 により反射され、検出光学系 3 0 へ導入される。

## 【 0 0 2 7 】

検出光学系 3 0 において、蛍光は、測光フィルタにより特定の波長の光が選択透過され、さらにレンズ、共焦点ピンホールにより断面からの光のみが選択されて、光電変換素子へ入射され、電気信号に変換される。光電変換素子の出力信号は、A/D 変換器へ導かれ、コントロールユニット 5 4 を介してコンピュータ 2 に供給される。コンピュータ 2 内の CPU 3 は、検出光学系 3 0 からのデジタル信号に基づいて画像データを作成し、この画像データを表示装置 6 に出力する。表示装置 6 は、CPU 3 からの画像信号をディスプレイに表示させることにより、標本断面での蛍光画像（蛍光輝度の 2 次元分布）を画像としてオペレータに提供する。

30

## 【 0 0 2 8 】

このような蛍光観察が行われている最中において、CPU 3 から光刺激を指示する制御指令がコントロールユニット 5 4 に与えられると、コントロールユニット 5 4 による刺激用光学系 2 0 の各部が制御されることにより、光刺激が開始される。

40

以下、この光刺激について詳しく説明する。

まず、光刺激の開始に当たって、オペレータにより各種条件設定が行われる。この条件設定は、コンピュータ 2 の GUI 4 が表示装置 6 に表示させる条件設定画面にて行う。

図 3 に、条件設定画面の一例を示す。この図に示すように、条件設定画面には、プレスキャンした標本 A の画像 1 0 0 が表示される。

## 【 0 0 2 9 】

この条件設定画面において、オペレータは、入力装置 5 が備えるマウスなどを操作することにより、光刺激を行いたい領域、つまり、標本上において刺激用レーザを照射させたい領域（以下「照射領域」という。）B を指定する（図 2 のステップ S A 1 ）。

50

## 【 0 0 3 0 】

ユーザにより照射領域の指定が行われると、G U I 4 はプレスキャンした標本 1 0 0 上に指定領域 B を表示するとともに、更に、指定された照射領域 B に対応する条件設定パネルを画面に表示する。図 4 に条件設定パネルの一例を示す。この図に示すように、条件設定パネルには、刺激用に使用可能なレーザの種類（波長）、レーザの光強度、目標積算値の入力設定欄が表示される。

オペレータは、この条件設定パネルにおいて、刺激用に使用したいレーザを選択し（図 2 のステップ S A 2 ）、更に、レーザ光の強度を指定し（図 2 のステップ S A 3 ）、更に、指定領域に照射させる刺激用レーザ光の目標積算値を入力する（ステップ S A 4 ）。

## 【 0 0 3 1 】

上述の各種設定作業が修了すると、G U I 4 はこれらの設定情報を C P U 3 に出力する。C P U 3 は、G U I 4 から取得した刺激用レーザ光の目標積算値をコンピュータ 2 内のメモリに格納し、所定のタイミングで光刺激を開始させる（ステップ S A 5 ）。

## 【 0 0 3 2 】

光刺激開始時においては、C P U 3 は、上記設定条件に基づいて走査型レーザ顕微鏡 1 の刺激用光学系 2 0 の各部を走査するための制御信号を生成し、この制御信号をコントロールユニット 5 4 に出力する。これにより、刺激用光学系 2 0 の第 2 の光源 2 1 から刺激用レーザ光が射出され、第 2 の走査光学ユニット 2 2 へ導かれる。第 2 の走査光学ユニット 2 2 に導かれた刺激用レーザ光は、任意の方向に偏向走査され、その後、リレーレンズ 2 3 を介してビームスプリッタ 2 3 に導かれ、その 8 0 % が透過されてダイクロイックミラー 2 4 に導かれる。ダイクロイックミラー 2 4 に導かれた刺激用レーザ光は、画像取得用レーザ走査ユニット 2 からの光軸と合成される。そして、結像レンズ 5 1、対物レンズ 5 2 を透過して、標本 A の断面上に照射される。このときの断面内での照射位置は、第 2 の走査光学ユニット 2 2 を制御することで、第 1 のレーザ走査ユニット 1 3 の走査位置に依存しない任意の位置を選択することができる。

## 【 0 0 3 3 】

一方、ビームスプリッタ 4 1 に導かれた刺激用レーザ光の 2 0 % は、光量計測装置 4 0 の光検出器 4 2 に導かれ、その光強度が測定される。光検出器 4 2 にて検出された光強度は、光量補正回路 4 3 により補正される。光量補正回路 4 3 は、例えば、ビームスプリッタ 4 1 の特性である透過率を保有しており、この透過率を用いて光検出器 4 2 からの検出値を補正する。本実施形態では、ビームスプリッタ 4 1 の透過率は 8 0 % であり、反射率は 2 0 % であるため、光検出器 4 2 の検出値を 4 倍することにより、標本 A に照射された刺激用レーザ光の光強度を算出する。

## 【 0 0 3 4 】

なお、ビームスプリッタ 4 1 の特性は、予め光量補正回路 4 3 が保有していても良く、或いは、コンピュータ 2 内の記憶装置に格納されており、光刺激の開始と同時に、コントロールユニット 5 4 を介して光量補正回路 4 3 に送信されるようになっていても良い。

## 【 0 0 3 5 】

光量補正回路 4 3 によって補正された光強度は、積算回路 4 4 に与えられる。積算回路 4 4 は、光量補正回路 4 3 から取得した光強度を積算することにより、標本 A に照射された刺激用レーザ光の光量の積算値を求める。積算回路 4 4 により算出された積算値は、検出積算値としてコントロールユニット 5 4 を介してコンピュータ 2 内の C P U 3 に転送される。C P U 3 は、積算回路 4 4 からの検出積算値を表示装置 6 へ出力する。これにより、表示装置 6 のディスプレイには、標本 A に照射された刺激用レーザ光の検出積算値がリアルタイムで表示される（図 2 のステップ S A 6 ）。

## 【 0 0 3 6 】

更に、C P U 3 は、光量計測装置 4 0 から受信した検出積算値が目標積算値以上であるか否かを判定する（図 2 のステップ S A 7 ）。この結果、検出積算値が目標積算値以下であれば光刺激を継続させ（ステップ S A 7 において「 Y E S 」）、一方、検出積算値が目標積算値以上であれば、光刺激用光学系 2 の作動を停止させる制御信号を生成し、コンピ

10

20

30

40

50

ュータユニット54に対して出力する。これにより、光刺激用光学系2による光刺激が終了する(図2のステップSA8)。

【0037】

以上説明してきたように、本実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置によれば、標本Aに照射された刺激用レーザ光の光量を表示装置6のディスプレイに表示させるので、オペレータは標本に照射された刺激用レーザ光の光量を把握することが可能となる。これにより、刺激を定量的に行うことができる。

更に、光量計測装置40による検出積算値が、オペレータにより入力された目標積算値に達した場合には、刺激用光学系20を自動的に停止させるので、光刺激を高い精度で制御することができ、精度の高い実験を実現させることが可能となる。

10

【0038】

〔第2の実施形態〕

次に、本発明の第2の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置について説明する。上記第1の実施形態では、目標積算値を照射領域の全域に対するものとして入力していたが、本実施形態では、上記目標積算値の設定を照射領域の各ピクセルに対する値として入力する点で上述の形態とは異なる。

以下、本実施形態の走査型レーザ顕微鏡装置について、上述した第1の実施形態と異なる部分について説明する。

【0039】

まず、図5におけるステップSB1において、上述の図2に示したステップSA1と同様に、照射領域の指定が行われると、GUI4は、ステップSB2において、表示装置6のディスプレイに条件設定パネルを表示させる。図6に、本実施形態に係る条件設定パネルの一例を示す。この図に示すように、条件設定パネルには、レーザの種類(波長)の選択枝、レーザ光の強度入力欄のほか、1ピクセルあたりの目標積算値を入力する入力欄が設けられている。ここで、1ピクセルとは、検出光学系30にて検出された光の情報を画像化する際に、画像データの最小単位となるものであり、本実施形態においては、レーザのライン走査の幅、並びに、検出光学系30にて実施される1ライン中におけるデータサンプリングの回数によって決定される。

20

【0040】

図6に示した条件設定パネルにおいて、オペレータによりレーザの種類、レーザ強度、1ピクセルあたりの目標積算値が入力されると(図5のステップSB2乃至SB4)、GUI4はこれらの設定情報をCPU3に出力する。CPU3は、GUI4から設定条件に関する情報を取得すると、照射領域のピクセル数を検出して、検出したピクセル数を総合ピクセル数P<sub>tot</sub>として保持する。

30

【0041】

続いて、CPU3は、カウンタの初期化を行う(図5のステップSB5)。このカウンタの初期化では、光刺激用レーザ光を照射したピクセル数をカウントするためのピクセルカウンタの値をゼロにリセットし、更に、走査型レーザ顕微鏡1内の光量計測装置40が備える積算回路44の積算値をリセットする。

上記初期化が終了すると、CPU3は、照射領域を構成する1ピクセルに対して光刺激を行うべく、上記GUI4からの条件設定に基づいて制御信号を生成し、コントロールユニット54へ出力する。これにより、照射領域のうちの1ピクセルに対して集中的に刺激用レーザ光の照射が行われる(図5のステップSB6)。

40

【0042】

また、上記刺激用レーザ光の照射に伴い、光量計測装置40による刺激用レーザ光の検出が開始され、積算回路44から検出積算値がコントロールユニット54を介してCPU3に転送される。CPU3は、この検出積算値を表示装置4に表示させる(ステップSB7)。この結果、図6の下段に示された積算量表示欄の検出値には、光量計測装置により測定された積算値がリアルタイムで表示されることとなる。

【0043】

50

更に、CPU 3 は、この検出積算値がステップ S B 4 にて設定された目標積算値に達したか否かを判定する（ステップ S B 8）。この結果、検出積算値が目標積算値に達していなかった場合には、当該ピクセルに対する光刺激を継続させ、一方、検出積算値が目標積算値に達していた場合には、光刺激用光学系 2 の作動を停止させる制御信号を生成し、コンピュータユニット 5 4 に対して出力する。これにより、光刺激用光学系 2 による光刺激を停止させる（ステップ S B 9）。

#### 【 0 0 4 4 】

次に、CPU 3 は、光刺激用レーザ光を照射する位置を隣のピクセルに移動させ（ステップ S B 1 0）、ピクセルカウンタの値を「1」インクリメントする（ステップ S B 1 1）。続いて、CPU 3 は、ピクセルカウンタの値が総合ピクセル数 P t o 以下であるか否かを判定する（ステップ S B 1 2）。この結果、ピクセルカウンタの値が総合ピクセル数 P t o 未満であった場合には、積算回路 4 4 のリセットを行い（ステップ S B 1 3）、ステップ S B 6 へ戻り、現在の対象ピクセルに対して目標積算値に達するまで光刺激を行う。

このようにして、照射領域を構成する全てのピクセルについて光刺激が終了すると、ステップ S B 1 2 において「YES」と判断し、当該光刺激の処理を終了する。

#### 【 0 0 4 5 】

以上説明してきたように、本実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置によれば、光刺激の光量調節をピクセル単位で行うことができるので、高い精度で光刺激を行うことが可能となる。更に、光刺激の走査は全て自動で行われるため、オペレータの負担を軽減させることができる。

なお、上記実施形態では、1ピクセル毎に検出積算値が目標積算値に達したか否かの判定を行っていたが、判定を行うタイミングは、必ずしも1ピクセルに限定される必要はない。例えば、照射領域を所定の条件にて分割し、各分割された領域毎に判定を行うようにしても良い。

#### 【 0 0 4 6 】

##### 〔第3の実施形態〕

次に、本発明の第3の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置について説明する。上記第2の実施形態では、1ピクセル毎に検出積算値が目標積算値に達しているか否かの判定を行っていたが、本実施形態では、照射領域の全域に対して刺激用レーザ光を走査して照射させた後に、検出積算値が目標積算値に達しているか否かの判定を行う点で、上述の形態とは異なる。

以下、本実施形態の走査型レーザ顕微鏡装置について、上述した第2の実施形態と異なる部分について説明する。

#### 【 0 0 4 7 】

図7におけるステップ S C 1 において、上述の図5に示したステップ S B 1 と同様に、照射領域の指定が行われると、GUI 4 は、ステップ S C 2 において、表示装置 6 のディスプレイに条件設定パネルを表示させる。図8に、本実施形態に係る条件設定パネルの一例を示す。この図に示すように、条件設定パネルには、レーザの種類（波長）の選択枝、レーザ光の強度入力欄、1ピクセルあたりの目標積算値を入力する入力欄のほか、1ピクセルあたりの照射時間を入力する照射時間入力欄が設けられている。

#### 【 0 0 4 8 】

この条件設定パネルにおいて、オペレータによりレーザの種類、レーザ強度、1ピクセルあたりの目標積算値、1ピクセルあたりの照射時間が入力されると（図5のステップ S C 2 乃至 S C 5）、GUI 4 はこれらの設定情報を CPU 3 に出力する。CPU 3 は、GUI 4 から設定条件に関する情報を取得すると、照射領域として指定された部位のピクセル数を検出して、検出したピクセル数を総合ピクセル数 P t o として保持するとともに、積算回路のリセットを行う（ステップ S C 6）。

更に、CPU 3 は、照射領域に対する光刺激を開始すべく、上記条件設定に基づいて制御信号を生成し、コントロールユニット 5 4 へ出力する。これにより、照射領域の全域に

10

20

30

40

50

刺激用レーザ光が２次元的に走査されて連続的に照射される（ステップＳＣ７）。このときの各ピクセルのレーザ照射時間は、上述のステップＳＣ５にて設定された時間に制御される。

【００４９】

この照射開始とともに、光量計測装置４０による刺激用レーザ光の検出が開始され、検出積算値がコントロールユニット５４を介してＣＰＵ３に転送される。ＣＰＵ３は、この検出積算値を上記総合ピクセル数Ｐｔｏで割ることにより、１ピクセル当たりの検出積算値を算出し、この算出結果を表示装置６に表示させる。この結果、図８の中段に示された積算量表示欄には、１ピクセル当たりの検出積算値が表示される。

【００５０】

更に、ＣＰＵ３は、１ピクセル当たりの検出積算値が目標積算値に達したか否かを判定する（ステップＳＣ１０）。この結果、検出積算値が目標積算値に達していなかった場合には（ステップＳＣ１０において「ＹＥＳ」）、ステップＳＣ８に戻り、光刺激を継続して行う。このようにして、ＣＰＵ３は、検出算出値が目標積算値に達するまで、当該照射領域に対する光刺激を継続して行う。

そして、検出積算値が目標積算値に達した場合には（ステップＳＣ１０において「ＮＯ」）、光刺激用光学系２の作動を停止させる制御信号を生成し、コンピュータユニット５４に対して出力する。これにより、光刺激用光学系２による光刺激を終了する（ステップＳＣ１１）。

【００５１】

以上説明してきたように、本実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置によれば、刺激用レーザを連続的に走査させることにより、光刺激を連続的に実施することができるので、時間的定量性を確保しつつ、目標積算値になるまで光刺激を継続的に行うことが可能となる。

【００５２】

なお、上述した第３の実施形態においては、レーザ強度及び各ピクセルに対するレーザ光の照射時間をオペレータが設定していたが、１ピクセル当たりの目標積算値に応じて、自動的に照射時間及びレーザ強度を設定するような構成としても良い。

例えば、コンピュータ２は、図９に示すような目標積算量、レーザ強度、及び照射時間とを関連付けたテーブルを備えており、このテーブルを用いて、ＣＰＵ３が目標積算値に応じた好適なレーザ強度及び照射時間とを決定するようにしても良い。

【００５３】

図９に示すテーブルにおいて、横軸は目標積算値、縦軸はレーザ強度、照射時間のそれぞれを示している。図９では、レーザ照射時間よりもレーザ強度を優先させて調節している。つまり、目標積算値が比較的小さい領域については、レーザ照射時間を第２の走査光学ユニット２２の走査限界速度に基づいて決定される最小時間に設定しておき、レーザ強度を除々に増加させる。一方、目標積算値が大きい領域においては、レーザ強度を１００％にしても所望の目標積算量が得られなくなるため、この場合には、除々にレーザ照射時間を増加させることにより、目標積算量を満足するように調節する。

【００５４】

このように、目標積算値に応じてレーザ強度とレーザ照射時間とを決定することにより、好適なレーザ照射条件で刺激用レーザ光の照射を行うことが可能となる。これにより、実験効率の向上を図ることができる。

【００５５】

なお、上述した第１乃至第３の実施形態においては、光量計測装置４０のビームスプリッタ４１を刺激用レーザ光の光路におけるリレーレンズ２３とダイクロイックミラー２４との間に設けていたが、このビームスプリッタ４１の配置については、刺激用レーザ光の光路であれば特に限定されない。例えば、第２の光源２１と第２の走査光学ユニット２２との間に配置しても良く、第２の走査光学ユニット２２とリレーレンズ２３との間に配置しても良い。更に、図１０に示すように、画像取得用レーザ光と刺激用レーザ光とが合成

10

20

30

40

50

された光の光路、つまり、ダイクロイックミラー 2 4 と対物レンズ 5 2 との間に設けても良い。図 1 0 では、結像レンズ 5 1 と対物レンズ 5 2 との間にビームスプリッタ 4 1 を配置した場合を示している。

【 0 0 5 6 】

なお、図 1 0 に示すように、画像取得用レーザ光と刺激用レーザ光とが合成された光の光路にビームスプリッタ 4 1 を配置する場合には、ビームスプリッタ 4 1 と検出器 4 2 との間に、刺激用レーザ光の波長のみを選択して透過させるフィルタ 4 5 を設ける必要がある。また、ビームスプリッタ 4 1 の代わりに、刺激用レーザ光の波長のみを反射するダイクロイックミラーを用いることにより、上述のフィルタ 4 5 を不要とすることも可能である。

10

このように、刺激用レーザ光の検出位置を標本 A に更に近づけることにより、ノイズによる光の減衰等の影響を排除することができるので、検出精度を高めることができる。

【 0 0 5 7 】

また、本発明の走査型レーザ顕微鏡 1 は、図 1 や図 1 0 に示したように 2 つの走査光学系を備える構成に限定されることはない。例えば、図 1 1、図 1 2 に示すように、1 つの走査光学系により、上述の画像取得用レーザ光と刺激用レーザ光との照射を行うような構成としても良い。この場合においても刺激用レーザ光の光路上にビームスプリッタ 4 1 を配置し、その光を検出することで、上述した第 1 乃至第 3 の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置と同様の効果を得ることができる。なお、図 1 1 では、ビームスプリッタ 4 1 を第 1 の走査光学ユニット 1 3 とリレーレンズ 1 4 との間に配置しており、図 1 2 ではビームスプリッタを結像レンズ 5 1 と対物レンズ 5 2 との間に配置している場合について示しているが、ビームスプリッタの配置箇所については特に限定されない。

20

【 0 0 5 8 】

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。

【 0 0 5 9 】

第 1 に、上記第 1 乃至第 3 の実施形態において、照射領域は、標本 A 上に複数箇所、設定されていても良い。このように複数箇所の照射領域が設定されている場合には、各照射領域に対して目標積算値を設定することが可能である。

30

第 2 に、照射領域は、面積を有する所定の範囲として設定されてもよいし、一点（ポイント）或いは、線状（ライン状）に設定されても良い。

第 3 に、刺激用光学系 2 0 は、1 台に限られず、2 台以上設けられていても良い。

第 4 に、上記第 1 の光源 1 1、第 2 の光源 2 1 として、パルスレーザを用いることも可能である。

第 5 に、上記画像取得用光学系は、走査光学系を備えていないものでも良く、例えば、CCD カメラなどにより蛍光観察を行うようなレーザ顕微鏡であっても本発明を適用することが可能である。更に、刺激用光学系についても、走査光学系を必ずしも備えている必要はなく、一点のみを集中的に照射するような構成を備えている光学系であっても良い。

【図面の簡単な説明】

40

【 0 0 6 0 】

【図 1】本発明の第 1 の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置の概略構成を示すブロック図である。

【図 2】本発明の第 1 の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置の作用を示すフローチャートである。

【図 3】本発明の第 1 の実施形態に係る条件設定画面において、刺激用レーザ光の照射領域を指定するための画面の一例を示した図である。

【図 4】本発明の第 1 の実施形態に係る条件設定画面に表示される条件設定パネルの一例を示した図である。

【図 5】本発明の第 2 の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置の作用を示すフローチャ

50

ートである。

【図 6】本発明の第 2 の実施形態に係る条件設定画面に表示される条件設定パネルの一例を示した図である。

【図 7】本発明の第 3 の実施形態に係る走査型レーザ顕微鏡装置の作用を示すフローチャートである。

【図 8】本発明の第 3 の実施形態に係る条件設定画面に表示される条件設定パネルの一例を示した図である。

【図 9】目標積算値に基づいて好適なレーザ照射時間及びレーザ強度を設定するために用いられるテーブルの一例を示した図である。

【図 10】図 1 に示した走査型レーザ顕微鏡装置において、ビームスプリッタの配置を変更した場合の一構成例を示した図である。

10

【図 11】1 つの走査光学系により画像取得用レーザ光と刺激用レーザ光とを標本に照射させる場合の走査型レーザ顕微鏡装置の一構成例を示した図である。

【図 12】1 つの走査光学系により画像取得用レーザ光と刺激用レーザ光とを標本に照射させる場合の走査型レーザ顕微鏡装置の一構成例を示した図である。

【符号の説明】

【 0 0 6 1 】

1 走査型レーザ顕微鏡

2 コンピュータ

3 C P U

20

4 G U I

5 入力装置

6 表示装置

2 0 刺激用光学系

2 1 第 2 の光源

2 2 第 2 の走査光学ユニット

4 0 光量計測装置

4 1 ビームスプリッタ

4 2 光検出器

4 3 光量補正回路

30

4 4 積算回路

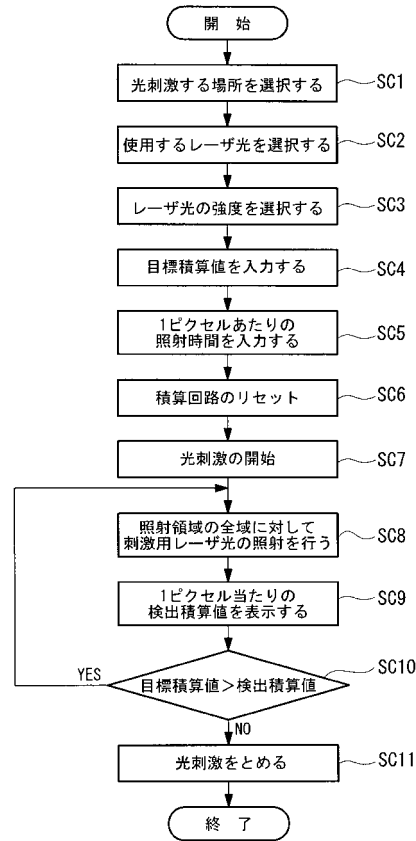
5 4 コントロールユニット



【図 6】

レーザー	
<input checked="" type="checkbox"/> 405nm	100 %
<input type="checkbox"/> 488nm	5 %
<input type="checkbox"/> 543nm	10 %
積算量	
目標値	10 J/pix
検出値	0 J/pix

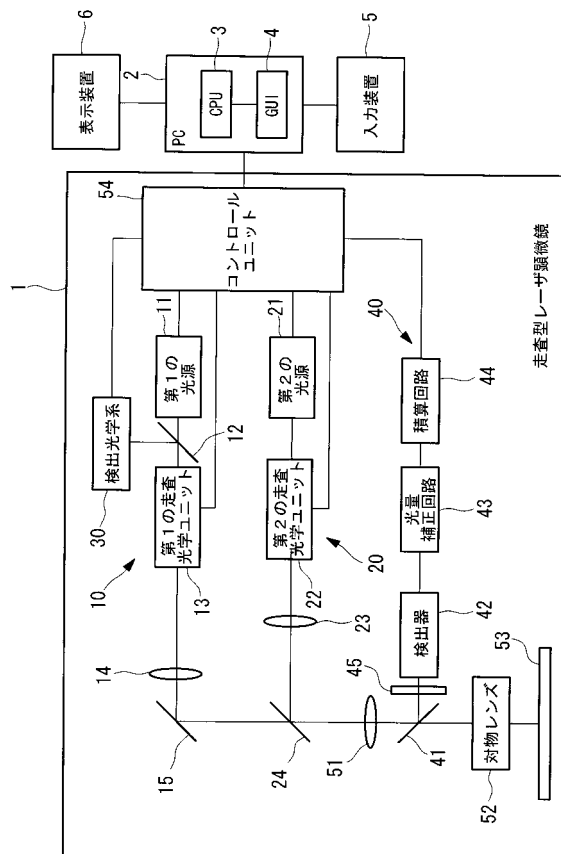
【図 7】



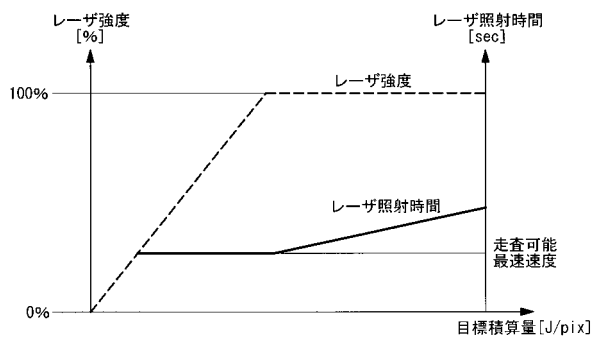
【図 8】

レーザー	
<input checked="" type="checkbox"/> 405nm	100 %
<input type="checkbox"/> 488nm	5 %
<input type="checkbox"/> 543nm	10 %
積算量	
目標値	10 J/pix
検出値	0 J/pix
照射時間/1Pixel	
0.1	sec

【図 10】



【図 9】





---

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 2 B      2 1 / 0 0

G 0 1 N      2 1 / 6 4