

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7125936号

(P7125936)

(45)発行日 令和4年8月25日(2022.8.25)

(24)登録日 令和4年8月17日(2022.8.17)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

G 0 1 N 21/64

F

G 0 2 B 21/36 (2006.01)

G 0 2 B 21/36

請求項の数 8 (全16頁)

(21)出願番号	特願2019-529455(P2019-529455)	(73)特許権者	000236436
(86)(22)出願日	平成30年4月18日(2018.4.18)		浜松ホトニクス株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2018/015972		静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の
(87)国際公開番号	WO2019/012776		1
(87)国際公開日	平成31年1月17日(2019.1.17)	(74)代理人	100088155
審査請求日	令和2年12月11日(2020.12.11)		弁理士 長谷川 芳樹
(31)優先権主張番号	特願2017-135423(P2017-135423)	(74)代理人	100113435
(32)優先日	平成29年7月11日(2017.7.11)		弁理士 黒木 義樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74)代理人	100140442
			弁理士 柴山 健一
		(74)代理人	100148013
			弁理士 中山 浩光
		(72)発明者	杉山 範和
			静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の
			1 浜松ホトニクス株式会社内
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 試料観察装置及び試料観察方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛍光を用いて試料容器に保持された試料を観察する試料観察装置であって、
 前記試料に向けて面状光を照射する照射部と、
 前記面状光の照射面に対して前記試料を一方向に走査する走査部と、
 前記面状光の照射によって前記試料で発生した蛍光及び散乱光をそれぞれ結像する結像部と、
 前記結像部によって結像された前記蛍光の光像の少なくとも一部を撮像して第1の画像データを出力し、前記結像部によって結像された前記散乱光の光像の少なくとも一部を撮像して第2の画像データを出力する撮像部と、
 前記一方向について得られた複数の前記第1の画像データに基づいて蛍光画像を生成し、前記一方向について得られた複数の前記第2の画像データに基づいて散乱光画像を生成する画像処理部と、
 前記散乱光画像に基づいて前記蛍光画像における前記試料の存在領域を特定し、前記試料の存在領域に基づいて前記蛍光画像における解析領域を設定し、前記解析領域における蛍光の強度を解析する解析部と、を備え、
前記走査部は、XZ平面内の面である前記面状光の照射面に対し、前記XZ平面に直交するY方向に前記試料を走査する試料観察装置。

【請求項 2】

前記結像部は、前記蛍光を透過する第1の光フィルタと、前記散乱光を透過する第2の

光フィルタとを結像光路上で切り替える切替部を有する請求項 1 記載の試料観察装置。

【請求項 3】

前記結像部は、前記蛍光と前記散乱光とを分割する光分割素子を有し、

前記撮像部は、前記光分割素子によって分割された前記蛍光の少なくとも一部を撮像する第 1 の光検出器と、前記光分割素子によって分割された前記散乱光の少なくとも一部を撮像する第 2 の光検出器とを有する請求項 1 記載の試料観察装置。

【請求項 4】

前記結像部は、前記蛍光と前記散乱光とを分割する光分割素子を有し、

前記撮像部は、前記光分割素子によって分割された前記蛍光の少なくとも一部を撮像する第 1 の撮像領域、及び前記光分割素子によって分割された前記散乱光の少なくとも一部を撮像する第 2 の撮像領域を含む受光面を有する光検出器を備える請求項 1 記載の試料観察装置。

10

【請求項 5】

前記結像部は、前記照射面に対して傾斜する観察軸を有する請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の試料観察装置。

【請求項 6】

前記照射面に対する前記観察軸の傾斜角度が $20^{\circ} \sim 70^{\circ}$ となっている請求項 5 記載の試料観察装置。

【請求項 7】

前記照射面に対する前記観察軸の傾斜角度が $30^{\circ} \sim 65^{\circ}$ となっている請求項 5 又は 6 記載の試料観察装置。

20

【請求項 8】

蛍光を用いて試料容器に保持された試料を観察する試料観察方法であって、

前記試料に向けて面状光を照射する照射ステップと、

前記面状光の照射面に対して前記試料を一方向に走査する走査ステップと、

前記面状光の照射によって前記試料で発生した蛍光及び散乱光をそれぞれ結像する結像ステップと、

前記結像ステップによって結像された前記蛍光の光像の少なくとも一部を撮像して第 1 の画像データを出力し、前記結像ステップによって結像された前記散乱光の光像の少なくとも一部を撮像して第 2 の画像データを出力する撮像ステップと、

30

前記一方向について得られた複数の前記第 1 の画像データに基づいて蛍光画像を生成し、前記一方向について得られた複数の前記第 2 の画像データに基づいて散乱光画像を生成する画像処理ステップと、

前記散乱光画像に基づいて前記蛍光画像における前記試料の存在領域を特定し、前記試料の存在領域に基づいて前記蛍光画像における解析領域を設定し、前記解析領域における蛍光の強度を解析する解析ステップと、を備え、

前記走査ステップでは、XZ 平面内の面である前記面状光の照射面に対し、前記 XZ 平面に直交する Y 方向に前記試料を走査する試料観察方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本開示は、試料観察装置及び試料観察方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞などの試料を観察する技術として例えば非特許文献 1 に記載の手法がある。この従来の手法では、細胞核を蛍光物質で染色し、蛍光物質を励起して得られた蛍光画像に基づいて細胞核の位置を特定している。そして、特定された細胞核の位置に基づいて試料の存在領域を推定し、解析領域を設定している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

50

【 0 0 0 3 】

【文献】Perkin Elmer APPLICATION NOTE, “ Image-based Quantification of Apoptosis using the Operetta ”

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

上述した従来の手法では、細胞核の位置に基づいて試料の存在領域を推定しているに過ぎず、解析領域を特定する精度が十分であるとは言い難い。蛍光強度に基づいて試料の分析を精度良く実施するためには、解析領域を十分な精度で特定できる技術が必要となる。

【 0 0 0 5 】

本開示は、上記課題の解決のためになされたものであり、解析領域を十分な精度で特定できる試料観察装置及び試料観察方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本開示の一側面に係る試料観察装置は、蛍光を用いて試料容器に保持された試料を観察する試料観察装置であって、試料に向けて面状光を照射する照射部と、面状光の照射面に対して試料を一方向に走査する走査部と、面状光の照射によって試料で発生した蛍光及び散乱光をそれぞれ結像する結像部と、結像部によって結像された蛍光の光像の少なくとも一部を撮像して第1の画像データを出力し、結像部によって結像された散乱光の光像の少なくとも一部を撮像して第2の画像データを出力する撮像部と、一方向について得られた複数の第1の画像データに基づいて蛍光画像を生成し、一方向について得られた複数の第2の画像データに基づいて散乱光画像を生成する画像処理部と、散乱光画像に基づいて蛍光画像における試料の存在領域を特定し、試料の存在領域に基づいて蛍光画像における解析領域を設定し、解析領域における蛍光の強度を解析する解析部と、を備える。

【 0 0 0 7 】

この試料観察装置では、試料からの蛍光に基づいて蛍光画像を生成し、試料からの散乱光に基づいて散乱光画像を生成する。散乱光画像からは、試料の輪郭形状を特定することが可能である。したがって、散乱光画像に基づいて特定された試料の輪郭形状から試料の存在領域を十分な精度で特定できる。蛍光画像において、特定された試料の存在領域に基づいて解析領域を設定し、解析領域における蛍光強度を求めることにより、試料の分析を精度良く実施することができる。

【 0 0 0 8 】

また、結像部は、蛍光を透過する第1の光フィルタと、散乱光を透過する第2の光フィルタとを結像光路上で切り替える切替部を有していてもよい。この場合、蛍光と散乱光との分割を簡単な構成で実現できる。

【 0 0 0 9 】

また、結像部は、蛍光と散乱光とを分割する光分割素子を有し、撮像部は、光分割素子によって分割された蛍光の少なくとも一部を撮像する第1の光検出器と、光分割素子によって分割された散乱光の少なくとも一部を撮像する第2の光検出器とを有していてもよい。この場合、蛍光と散乱光との分割を簡単な構成で実現できる。

【 0 0 1 0 】

また、結像部は、蛍光と散乱光とを分割する光分割素子を有し、撮像部は、光分割素子によって分割された蛍光の少なくとも一部を撮像する第1の撮像領域、及び光分割素子によって分割された散乱光の少なくとも一部を撮像する第2の撮像領域を含む受光面を有する光検出器を備えていてもよい。この場合、蛍光と散乱光との分割を簡単な構成で実現できる。

【 0 0 1 1 】

また、結像部は、照射面に対して傾斜する観察軸を有していてもよい。この場合、視野選択動作が不要となり、試料の走査と撮像とを同時進行することが可能となる。したがって、蛍光画像及び散乱光画像を得るまでのスループットの向上が図られる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

また、本開示の一側面に係る試料観察方法は、蛍光を用いて試料容器に保持された試料を観察する試料観察方法であって、試料に向けて面状光を照射する照射ステップと、面状光の照射面に対して試料を一方向に走査する走査ステップと、面状光の照射によって試料で発生した蛍光及び散乱光をそれぞれ結像する結像ステップと、結像ステップによって結像された蛍光の光像の少なくとも一部を撮像して第1の画像データを出力し、結像ステップによって結像された散乱光の光像の少なくとも一部を撮像して第2の画像データを出力する撮像ステップと、一方向について得られた複数の第1の画像データに基づいて蛍光画像を生成し、一方向について得られた複数の第2の画像データに基づいて散乱光画像を生成する画像処理ステップと、散乱光画像に基づいて蛍光画像における試料の存在領域を特定し、試料の存在領域に基づいて蛍光画像における解析領域を設定し、解析領域における蛍光の強度を解析する解析ステップと、を備える。

10

【 0 0 1 3 】

この試料観察方法では、試料からの蛍光に基づいて蛍光画像を生成し、試料からの散乱光に基づいて散乱光画像を生成する。散乱光画像からは、試料の輪郭形状を特定することが可能である。したがって、散乱光画像に基づいて特定された試料の輪郭形状から試料の存在領域を十分な精度で特定できる。蛍光画像において、特定された試料の存在領域に基づいて解析領域を設定し、解析領域における蛍光強度を求めることにより、試料の分析を精度良く実施することができる。

【 0 0 1 4 】

また、蛍光を透過する第1の光フィルタと、散乱光を透過する第2の光フィルタとを結像光路上で切り替える切替ステップをさらに有していてもよい。この場合、蛍光と散乱光との分割を簡単な構成で実現できる。

20

【 0 0 1 5 】

また、光分割素子によって、蛍光と散乱光を分割する光分割ステップをさらに有し、撮像ステップは、光分割素子によって分割された蛍光の少なくとも一部を撮像する第1の撮像ステップと、光分割素子によって分割された散乱光の少なくとも一部を撮像する第2の撮像ステップとを有していてもよい。この場合、蛍光と散乱光との分割を簡単な構成で実現できる。

【 0 0 1 6 】

また、光分割素子によって、蛍光と散乱光とを分割する光分割ステップをさらに有し、撮像ステップでは、第1の撮像領域及び第2の撮像領域を含む受光面を有する光検出器によって、光分割素子によって分割された蛍光の少なくとも一部を第1の撮像領域で撮像し、光分割素子によって分割された散乱光の少なくとも一部を第2の撮像領域で撮像していてもよい。この場合、蛍光と散乱光との分割を簡単な構成で実現できる。

30

【 0 0 1 7 】

また、結像ステップは、照射面に対して傾斜する観察軸を有する結像部を用いて、面状光の照射によって試料で発生した蛍光及び散乱光をそれぞれ結像していてもよい。この場合、視野選択動作が不要となり、試料の走査と撮像とを同時進行することが可能となる。したがって、蛍光画像及び散乱光画像を得るまでのスループットの向上が図られる。

40

【発明の効果】

【 0 0 1 8 】

本開示によれば、解析領域を十分な精度で特定できる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 9 】

【図1】試料観察装置の一実施形態を示すブロック図である。

【図2】図1に示した試料観察装置における照射部、試料容器、及び結像部の構成例を示す概略図である。

【図3】撮像部の構成例を示す図である。

【図4】試料観察装置を構成するコンピュータの機能的な構成要素の一例を示すブロック

50

図である。

【図 5】(a) は第 1 の画像データの一例を示す図であり、(b) は第 2 の画像データの一例を示す図である。

【図 6】(a) は第 1 の画像データの別例を示す図であり、(b) は第 2 の画像データの別例を示す図である。

【図 7】(a) は蛍光画像の一例を示す図であり、(b) は散乱光画像の一例を示す図である。

【図 8】蛍光画像における解析領域の設定の様子を示す図である。

【図 9】図 1 に示した試料観察装置を用いた試料観察方法の一例を示すフローチャートである。

【図 10】結像部の変形例を示す概略図である。

【図 11】結像部の更なる変形例を示す概略図である。

【図 12】蛍光画像における解析領域の設定の様子の変形例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、図面を参照しながら、本開示の一側面に係る試料観察装置及び試料観察方法の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0021】

図 1 は、試料観察装置の一実施形態を示すブロック図である。この試料観察装置 1 は、試料 S で発生した蛍光又は散乱光を結像面に結像させて試料 S の観察画像データを取得し、当該観察画像データに基づいて試料 S の解析及び評価を行う装置である。

【0022】

この種の試料観察装置としては、スライドガラスに保持される試料 S の画像を取得し表示するスライドスキャナ、あるいはマイクロプレートに保持される試料 S の画像データを取得し、画像データを解析するプレートリーダーなどがある。観察対象となる試料 S としては、例えば一或いは動物の細胞、組織などが挙げられる。試料 S は、面状光 L2 (図 2 参照) によって励起される蛍光物質によって染色されている。蛍光物質としては、例えば生きている細胞を特異的に染色するカルセイン AM、細胞の表面抗原と特異的に結合する蛍光抗体 (例えば蛍光物質フルオレセインによってラベルされた抗体) などが挙げられる。なお、試料 S は、異なる種類の複数の蛍光物質によって染色されていてもよい。

【0023】

試料 S は、図 2 に示すように、試料容器 2 に保持されている。試料容器 2 は、例えばマイクロプレートである。試料容器 2 は、試料 S が配置される複数のウェル 3 が一直線状 (或いはマトリクス状) に配列された板状の本体部 4 と、本体部 4 の一面側においてウェル 3 の一端側を塞ぐように設けられた板状の透明部材 5 とを有している。

【0024】

透明部材 5 は、ウェル 3 内に配置された試料 S に対する面状光 L2 の入力面 5a を有している。透明部材 5 の材質は、面状光 L2 の波長に対する透過率が高い (例えば透過率が 70% 以上) 部材であれば特に限定はされないが、例えばガラス、石英、或いは合成樹脂である。なお、ウェル 3 の他端側は、外部に開放された状態となっている。ウェル 3 内への試料 S の配置にあたっては、ウェル 3 内が水などの媒体で充填されていてもよい。

【0025】

試料観察装置 1 は、図 1 に示すように、照射部 11 と、走査部 12 と、撮像部 13 と、コンピュータ 14 とを備えて構成されている。照射部 11 は、面状光 L2 を励起光として試料 S に向けて照射する。照射部 11 は、図 2 に示すように、光源 15 と、面状光形成部 16 とによって構成されている。光源 15 は、面状光 L2 の形成元となる光 L1 を出力する。光源 15 としては、例えばレーザダイオード、固体レーザ光源といったレーザ光源などが挙げられる。また、光源 15 は、発光ダイオード、スーパーluminescent diode、ランプ系光源であってもよい。光源 15 から出力された光 L1 は、面状光形成部 16 に導光される。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

面状光形成部 1 6 は、光源 1 5 から出力された光 L 1 を面状光 L 2 に整形し、整形された面状光 L 2 を光軸 P 1 に沿って試料 S に照射する。本実施形態では、面状光形成部 1 6 の光軸が面状光 L 2 の光軸 P 1 となっている。面状光形成部 1 6 は、例えばシリンドリカルレンズ、アキシコンレンズ、或いは空間光変調器などの光整形素子を含んで構成され、光源 1 5 に対して光学的に結合されている。面状光形成部 1 6 は、対物レンズ、光シャッタなどを含んで構成されていてもよい。

【 0 0 2 7 】

試料 S の厚さ方向に観察を行う場合、分解能を考慮して、面状光 L 2 は、厚さ 2 mm 以下の薄い面状光であることが好ましい。また、試料 S の厚さが非常に小さい場合、すなわち、Z 方向解像度以下の厚さの試料 S を観察する場合には、面状光 L 2 の厚さは分解能に影響しない。この場合には、厚さ 2 mm を超える面状光 L 2 を用いてもよい。照射部 1 1 によって形成された面状光 L 2 は、試料容器 2 に保持された試料 S に照射される。面状光 L 2 の照射により、面状光 L 2 の照射面 R では、観察光が発生する。観察光には、例えば面状光 L 2 によって試料 S で励起された蛍光 J 1、試料 S の表面で散乱した面状光 L 2 の散乱光 J 2 がそれぞれ含まれる。

【 0 0 2 8 】

走査部（スキャナ）1 2 は、面状光 L 2 の照射面 R に対して試料 S を走査する機構である。走査部 1 2 は、例えば試料 S を保持する試料容器 2 を移動させる移動ステージを含んで構成されている。移動ステージは、コンピュータ 1 4 からの制御信号に従い、予め設定された方向に試料容器 2 を走査する。本実施形態では、移動ステージは、面状光 L 2 の光軸 P 1 と直交する平面内の一方向に試料容器 2 を走査する。以下の説明では、図 2 に示すように、面状光 L 2 の光軸 P 1 方向を Z 軸、移動ステージによる試料容器 2 の走査方向を Y 軸、面状光 L 2 の光軸 P 1 と直交する平面内において Y 軸に直交する方向を X 軸と称する。試料 S に対する面状光 L 2 の照射面 R は、X Z 平面内の面となる。

【 0 0 2 9 】

本実施形態では、面状光 L 2 の照射によって試料 S で発生した蛍光 J 1 及び散乱光 J 2 をそれぞれ結像する結像部 1 7 が設けられている。結像部 1 7 は、例えばコリメータレンズ 1 8 と、結像レンズ 1 9 と、第 1 の光フィルタ 2 0 A と、第 2 の光フィルタ 2 0 B と、切替部 Y とによって構成されている。

【 0 0 3 0 】

コリメータレンズ 1 8 は、照射面 R で生じた蛍光 J 1 或いは散乱光 J 2 を平行光化するレンズである。また、結像レンズ 1 9 は、コリメータレンズ 1 8 によって平行光化された蛍光 J 1 或いは散乱光 J 2 を結像するレンズである。第 1 の光フィルタ 2 0 A は、蛍光 J 1 を透過し、それ以外の波長の光をカットする光フィルタである。第 2 の光フィルタ 2 0 B は、散乱光 J 2 を透過し、それ以外の波長の光をカットする光フィルタである。

【 0 0 3 1 】

切替部 Y は、例えば第 1 の光フィルタ 2 0 A 及び第 2 の光フィルタ 2 0 B が載置される切替ステージを有している。切替ステージは、コリメータレンズ 1 8 と結像レンズ 1 9 との間の結像光路上に配置されている。切替部 Y は、コンピュータ 1 4 からの制御信号に従って、光源 1 5 の駆動に同期して結像部 1 7 の光軸と交差する方向に切替ステージを駆動し、蛍光 J 1 を透過する第 1 の光フィルタ 2 0 A と、散乱光 J 2 を透過する第 2 の光フィルタ 2 0 B とを結像光路上で切り替える。切替部 Y によって第 1 の光フィルタ 2 0 A が結像光路上に進出しているときには、蛍光 J 1 のみが結像部 1 7 によって結像する。一方、切替部 Y によって第 2 の光フィルタ 2 0 B が結像光路上に進出しているときには、散乱光 J 2 のみが結像部 1 7 によって結像する。なお、切替部 Y は、第 1 の光フィルタ 2 0 A 及び第 2 の光フィルタ 2 0 B が載置されるフィルタホイールを有してもよい。

【 0 0 3 2 】

結像部 1 7 の光軸は、蛍光 J 1 及び散乱光 J 2 の観察軸 P 2 となっている。この観察軸 P 2 は、面状光 L 2 の照射面 R に対して傾斜角度 θ をもって傾斜している。傾斜角度 θ は

10

20

30

40

50

、試料Sに向かう面状光L2の光軸P1と観察軸P2とがなす角とも一致する。傾斜角度 θ は、例えば $10^{\circ} \sim 80^{\circ}$ となっている。観察画像の解像度を向上させる観点から、傾斜角度 θ は、 $20^{\circ} \sim 70^{\circ}$ であることが好ましい。また、観察画像の解像度の向上及び視野の安定性の観点から、傾斜角度 θ は、 $30^{\circ} \sim 65^{\circ}$ であることが更に好ましい。

【0033】

撮像部13は、結像部17によって結像された蛍光J1の光像の少なくとも一部及び散乱光J2の光像の少なくとも一部を撮像する。撮像部13を構成する光検出器としては、例えばCMOSイメージセンサ、CCDイメージセンサといったエリアイメージセンサが挙げられる。これらのエリアイメージセンサは、結像部17による結像面に配置され、例えばグローバルシャッタ或いはローリングシャッタによって光像を撮像し、二次元画像データを生成する。

10

【0034】

撮像部13は、蛍光J1の光像の少なくとも一部に基づく第1の画像データ、及び散乱光J2の光像の少なくとも一部に基づく第2の画像データをコンピュータ14にそれぞれ出力する。上述したように、試料観察装置1では、照射面Rに対して試料容器2がY軸方向（一方向）に走査されると共に、照射面Rからの蛍光J1の光像及び散乱光J2の光像が撮像部13によって撮像される。すなわち、撮像部13では、Y軸方向について複数の第1の画像データ（XZ画像）及び複数の第2の画像データ（XZ画像）が生成される。

【0035】

撮像部13では、光検出器にラインスキャン方式を適用し、照射面Rからの蛍光J1及び散乱光J2を部分的に撮像してもよい。例えば図3（a）に示すように、エリアイメージセンサ21の撮像面においてサブアレイを設定してもよい。この場合、サブアレイに含まれる画素列21aのみを読み出すことができるので、蛍光J1或いは散乱光J2による光像を部分的に撮像できる。また、図3（b）に示すように、エリアイメージセンサ21の全ての画素列を読み出しエリアとし、その後の画像処理によって二次元画像の一部を抽出してもよい。

20

【0036】

さらに、図3（c）に示すように、エリアイメージセンサ21に代えてラインセンサ22などの光検出器を用い、撮像面自体を一の画素列に限定して部分的な撮像を行ってもよい。図3（d）に示すように、蛍光J1或いは散乱光J2の一部のみを透過させるスリット23をエリアイメージセンサ21の前面に配置し、スリット23に対応する画素列21aの画像データを取得してもよい。スリット23を用いる場合、エリアイメージセンサに代えて光電子増倍管などのポイントセンサなどの光検出器を用いてもよい。

30

【0037】

コンピュータ14は、物理的には、RAM、ROM等のメモリ、及びCPU等のプロセッサ（演算回路）、通信インターフェイス、ハードディスク等の格納部、ディスプレイ等の表示部を備えて構成されている。かかるコンピュータ14としては、例えばパーソナルコンピュータ、マイクロコンピュータ、クラウドサーバ、スマートデバイス（スマートフォン、タブレット端末など）などが挙げられる。コンピュータ14は、メモリに格納されるプログラムをコンピュータシステムのCPUで実行することにより、光源15、走査部12、切替部Y、及び撮像部13の動作を制御するコントローラとして機能する。

40

【0038】

コントローラとしてのコンピュータ14は、ユーザによる測定開始の操作の入力を受け、光源15、走査部12、及び撮像部13を同期させて駆動する。これにより、面状光L2の照射面Rに対して試料容器2がY方向に走査され、照射面Rからの蛍光J1及び散乱光J2の複数のXZ画像が撮像部13によって撮像される。コンピュータ14は、走査部12による試料容器2の移動中に、光源15が光L1を連続的に出力するように光源15を制御してもよく、撮像部13による撮像に合わせて光源15による光L1の出力のON/OFFを制御してもよい。また、照射部11が光シャッタを備えている場合、コンピュータ14は、当該光シャッタの制御によって光L1の照射をON/OFFさせてもよい。

50

【 0 0 3 9 】

また、コンピュータ 1 4 は、機能的な構成要素として、図 4 に示すように、撮像結果受信部 3 1 と、画像処理部 3 2 と、解析部 3 3 とを備えている。撮像結果受信部 3 1 は、撮像部 1 3 から撮像データを受信する部分である。すなわち、撮像結果受信部 3 1 は、撮像部 1 3 から蛍光 J 1 の光像の少なくとも一部に基づく第 1 の画像データ、及び散乱光 J 2 の光像の少なくとも一部に基づく第 2 の画像データを受信し、画像処理部 3 2 に出力する。

【 0 0 4 0 】

図 5 (a) は、第 1 の画像データの一例を示す図である。第 1 の画像データ G 1 は、試料 S で生じた蛍光 J 1 の X Z 像に対応する。蛍光 J 1 は、試料 S を染色する蛍光物質が面状光 L 2 によって励起されて生じる。したがって、第 1 の画像データ G 1 には、試料 S に対応する蛍光像 M 1 が出現し得る。図 5 (b) は、第 2 の画像データの一例を示す図である。第 2 の画像データ G 2 は、試料 S で生じた散乱光 J 2 の X Z 像に対応する。散乱光 J 2 は、試料 S の表面で面状光が散乱して生じる。したがって、第 2 の画像データ G 2 には、主として試料 S の輪郭形状に対応する散乱光像 M 2 が出現し得る。

【 0 0 4 1 】

図 6 (a) は、第 1 の画像データの別例を示す図である。この例では、試料 S の一部で蛍光 J 1 が生じている。また、蛍光 J 1 が生じない試料 S も存在する。このため、この別例では、第 1 の画像データ G 1 において、試料の一部に対応する蛍光像 M 1 が出現し得る。図 6 (b) は、第 2 の画像データの別例を示す図である。試料 S の一部で蛍光 J 1 が生じている場合であっても、散乱光 J 2 は、試料 S の表面で面状光が散乱することにより、図 5 (b) と同様に生じる。したがって、この別例では、第 1 の画像データ G 1 における蛍光像 M 1 と、第 2 の画像データ G 2 における散乱光像 M 2 とが一致しない状態となっている。

【 0 0 4 2 】

画像処理部 3 2 は、蛍光画像及び散乱光画像を生成する。画像処理部 3 2 は、Y 軸方向について得られた複数の第 1 の画像データ G 1 と、Y 軸方向について得られた複数の第 2 の画像データ G 2 とを撮像結果受信部 3 1 から受信する。画像処理部 3 2 は、受信した複数の第 1 の画像データ G 1 及び複数の第 2 の画像データ G 2 を Z 方向に圧縮する。Z 軸方向に圧縮された複数の第 1 の画像データ G 1 は、X 軸方向についての蛍光輝度を示し、Z 軸方向に圧縮された複数の第 2 の画像データ G 2 は、X 軸方向についての散乱光輝度を示す。画像処理部 3 2 は、第 1 の画像データ G 1 及び第 2 の画像データ G 2 のそれぞれについて、Z 軸方向に圧縮された複数の画像データを Y 軸方向に合成し、各画像データにおける蛍光輝度及び散乱光強度を積算することで、蛍光画像及び散乱光画像を生成する。画像処理部 3 2 は、生成した蛍光画像及び散乱光画像を解析部 3 3 に出力する。

【 0 0 4 3 】

図 7 (a) は、蛍光画像の一例を示す図である。蛍光画像 F 1 は、Z 軸方向に圧縮された複数の第 1 の画像データ G 1 を Y 軸方向に合成したものであり、蛍光画像 F 1 に出現する蛍光像 N 1 は、試料 S に対応する蛍光の X Y 像となる。図 7 (a) 中には、試料 S の一部で蛍光 J 1 が生じているもの及び試料 S で蛍光 J 1 が生じないものも含まれている。また、図 7 (b) は、散乱光画像の一例を示す図である。散乱光画像 F 2 は、Z 軸方向に圧縮された複数の第 2 の画像データ G 2 を Y 軸方向に合成したものであり、散乱光画像 F 2 に出現する散乱光像 N 2 は、試料 S の輪郭形状に対応する散乱光の X Y 像となる。

【 0 0 4 4 】

解析部 3 3 は、解析領域 N 5 における蛍光の強度を解析する。解析部 3 3 は、画像処理部 3 2 から蛍光画像 F 1 及び散乱光画像 F 2 を受信すると、まず、散乱光画像 F 2 に出現する散乱光像 N 2 の輪郭形状を試料 S の存在領域 N 4 として抽出する (図 7 (b) 参照) 。次に、解析部 3 3 は、図 8 に示すように、試料 S の存在領域 N 4 を解析領域 N 5 として蛍光画像 F 1 に割り当て、蛍光画像 F 1 における解析領域 N 5 を設定する。そして、解析部 3 3 は、設定した解析領域 N 5 における蛍光の強度を蛍光画像 F 1 に基づいて解析する。

【 0 0 4 5 】

次に、上述した試料観察装置 1 を用いた試料観察方法について説明する。図 9 は、図 1 に示した試料観察装置 1 を用いた試料観察方法の一例を示すフローチャートである。

【0046】

この試料観察方法は、図 9 に示すように、準備ステップ（ステップ S 0 1）と、照射ステップ（ステップ S 0 2）と、走査ステップ（ステップ S 0 3）と、結像ステップ（ステップ S 0 4）、撮像ステップ（ステップ S 0 5）と、画像処理ステップ（ステップ S 0 6）と、解析ステップ（ステップ S 0 7）とを備えて構成されている。

【0047】

準備ステップでは、試料容器 2 への試料 S の保持を行う。ここでは、蛍光物質によって試料 S を染色し、ウェル 3 内に保持する。ウェル 3 への試料 S の保持の後、試料容器 2 を走査部 1 2 にセットする。

10

【0048】

照射ステップでは、試料容器 2 のウェル 3 に向けて面状光 L 2 を照射する。ユーザによって測定開始の操作が試料観察装置 1 に入力されると、コンピュータ 1 4 からの制御信号に基づいて光源 1 5 が駆動し、面状光 L 2 の形成元である光 L 1 が照射される。光源 1 5 から出力した光 L 1 は、面状光形成部 1 6 によって整形されて面状光 L 2 となり、試料容器 2 に保持された試料 S に照射される。

【0049】

走査ステップでは、面状光 L 2 の照射面 R に対して試料容器 2 を走査する。ユーザによって測定開始の操作が入力されると、コンピュータ 1 4 からの制御信号に基づいて、光源 1 5 の駆動と同期して走査部 1 2 が駆動する。これにより、試料容器 2 が Y 軸方向に一定の速度で直線的に駆動し、面状光 L 2 の照射面 R に対してウェル 3 内の試料 S が走査される。

20

【0050】

結像ステップでは、面状光 L 2 の照射によって試料 S で発生した蛍光 J 1 及び散乱光 J 2 を結像する。結像ステップでは、照射面 R に対して傾斜する観察軸 P 2 により、蛍光 J 1 及び散乱光 J 2 を光検出器の受光面に対して結像する。結像ステップでは、コンピュータ 1 4 からの制御信号に従って切替部 Y を駆動し、結像光路上の第 1 の光フィルタ 2 0 A 及び第 2 の光フィルタ 2 0 B の切り替えを行ってもよい（切替ステップ）。第 1 の光フィルタ 2 0 A が結像光路上に進出しているときには、蛍光 J 1 のみが結像部 1 7 によって結像する。一方、第 2 の光フィルタ 2 0 B が結像光路上に進出しているときには、散乱光 J 2 のみが結像部 1 7 によって結像する。

30

【0051】

撮像ステップでは、結像部 1 7 によって結像された蛍光 J 1 の光像の少なくとも一部及び散乱光 J 2 の光像の少なくとも一部を撮像する。撮像ステップでは、蛍光 J 1 の光像の少なくとも一部に基づく第 1 の画像データ G 1、及び散乱光 J 2 の光像の少なくとも一部に基づく第 2 の画像データ G 2 を Y 軸方向についてそれぞれ複数生成し、コンピュータ 1 4 にそれぞれ出力する。

【0052】

画像処理ステップでは、蛍光画像 F 1 及び散乱光画像 F 2 を生成する。画像処理ステップでは、まず、撮像ステップで得られた複数の第 1 の画像データ G 1 及び複数の第 2 の画像データ G 2 を Z 方向に圧縮する。次に、第 1 の画像データ G 1 及び第 2 の画像データ G 2 のそれぞれについて、Z 軸方向に圧縮された複数の画像データを Y 軸方向に合成し、各画像データにおける蛍光輝度或いは散乱光輝度を積算する。これにより、試料 S に対応する蛍光の X Y 像である蛍光画像 F 1 と、試料 S の輪郭形状に対応する散乱光の X Y 像である散乱光画像 F 2 とが生成される。

40

【0053】

解析ステップでは、解析領域 N 5 における蛍光の強度を解析する。解析ステップでは、まず、散乱光画像 F 2 に出現する散乱光像 N 2 の輪郭形状を試料 S の存在領域 N 4 として抽出する。次に、試料 S の存在領域 N 4 を解析領域 N 5 として蛍光画像 F 1 に割り当て、

50

蛍光画像 F 1 における解析領域 N 5 を設定する。そして、設定した解析領域 N 5 における蛍光の強度を蛍光画像 F 1 に基づいて解析する。

【 0 0 5 4 】

試料観察装置 1 では、試料 S からの蛍光 J 1 に基づいて蛍光画像 F 1 を生成し、試料 S からの散乱光 J 2 に基づいて散乱光画像 F 2 を生成する。散乱光画像 F 2 からは、試料 S の輪郭形状を特定することが可能である。したがって、散乱光画像 F 2 に基づいて特定した試料 S の輪郭形状を蛍光画像 F 1 に適用することにより、蛍光画像 F 1 において試料 S の存在領域 N 4 を十分な精度で特定できる。蛍光画像 F 1 において、特定された試料 S の存在領域 N 4 の蛍光強度を求めることにより、試料 S の分析を精度良く実施することができる。

10

【 0 0 5 5 】

また、試料観察装置 1 では、結像部 1 7 において、蛍光 J 1 を透過する第 1 の光フィルタ 2 0 A と、散乱光 J 2 を透過する第 2 の光フィルタ 2 0 B とを結像光路上で切り替える切替部 Y が設けられている。これにより、蛍光 J 1 と散乱光 J 2 との分割を簡単な構成で実現できる。

【 0 0 5 6 】

また、試料観察装置 1 では、光源 1 5 からの光 L 1 が面状光形成部 1 6 によって面状光 L 2 に整形される。これにより、撮像部 1 3 において、第 1 の画像データ G 1 及び第 2 の画像データ G 2 を 2 次元データとして取得することが可能となる。さらに、試料観察装置 1 では、結像部 1 7 が面状光 L 2 の照射面 R に対して傾斜する観察軸 P 2 を有している。これにより、視野選択動作が不要となり、試料 S の走査と撮像とを同時進行することが可能となる。したがって、蛍光画像 F 1 及び散乱光画像 F 2 を得るまでのスループットの向上が図られる。

20

【 0 0 5 7 】

本開示は、上記実施形態に限られるものではない。例えば結像ステップでは、面状光 L 2 の照射によって試料 S で発生した蛍光 J 1 及び散乱光 J 2 を光分割素子によって分割してもよい（光分割ステップ）。この場合、結像部 1 7 は、図 1 0 に示すように、コリメータレンズ 1 8 と、結像レンズ 1 9 A , 1 9 B と、ビームスプリッタ（光分割素子） 4 1 と、ミラー 4 2 と、第 1 の光フィルタ 2 0 A と、第 2 の光フィルタ 2 0 B とによって構成されていてもよい。同図の例では、撮像部 1 3 は、第 1 の光検出器 4 3 A と、第 2 の光検出器 4 3 B とを備えている。ビームスプリッタ 4 1 としては、例えばダイクロイックミラーを用いることができる。

30

【 0 0 5 8 】

ビームスプリッタ 4 1 及び第 1 の光フィルタ 2 0 A は、コリメータレンズ 1 8 と結像レンズ 1 9 A との間の結像光路上に配置されている。蛍光 J 1 は、コリメータレンズ 1 8 によって平行光化され、ビームスプリッタ 4 1 及び第 1 の光フィルタ 2 0 A を透過する。第 1 の光フィルタ 2 0 A を透過した蛍光 J 1 は、結像レンズ 1 9 A によって第 1 の光検出器 4 3 A の受光面に結像する。第 1 の光検出器 4 3 A は、蛍光 J 1 の光像の少なくとも一部を撮像し、第 1 の画像データ G 1 をコンピュータ 1 4 に出力する。

【 0 0 5 9 】

第 2 の光フィルタ 2 0 B 及びミラー 4 2 は、コリメータレンズ 1 8 と結像レンズ 1 9 B との間の結像光路上に配置されている。散乱光 J 2 は、コリメータレンズ 1 8 によって平行光化され、ビームスプリッタ 4 1 で反射した後、第 2 の光フィルタ 2 0 B を透過する。第 2 の光フィルタ 2 0 B を透過した散乱光 J 2 は、ミラー 4 2 で反射し、結像レンズ 1 9 B によって第 2 の光検出器 4 3 B の受光面に結像する。第 2 の光検出器 4 3 B は、散乱光 J 2 の光像の少なくとも一部を撮像し、第 2 の画像データ G 2 をコンピュータ 1 4 に出力する。このような構成においても、蛍光 J 1 と散乱光 J 2 との分割を簡単な構成で実現できる。

40

【 0 0 6 0 】

また、結像部は、図 1 1 に示すような光分割装置 5 1 によって構成されていてもよい。

50

この光分割装置 5 1 は、筐体 5 2 内に、コリメータレンズ 5 3 と、結像レンズ 5 4 と、ビームスプリッタ（光分割素子）5 5 と、ミラー 5 6 と、第 1 の光フィルタ 2 0 A と、第 2 の光フィルタ 2 0 B と、結像レンズ移動機構 5 7 とを備えて構成されている。筐体 5 2 における光の入射端には、視野絞り 5 8 が設けられている。視野絞り 5 8 は、観察軸 P 2 に対して垂直な方向の幅が可変となっている。ビームスプリッタ 5 5 としては、例えばダイクロイックミラーを用いることができる。

【 0 0 6 1 】

ビームスプリッタ 5 5 及び第 1 の光フィルタ 2 0 A は、コリメータレンズ 5 3 と結像レンズ 5 4 との間の結像光路上に配置されている。視野絞り 5 8 を通って筐体 5 2 内に入射した蛍光 J 1 は、コリメータレンズ 5 3 によって平行光化され、ビームスプリッタ 5 5 及び第 1 の光フィルタ 2 0 A を透過して結像レンズ 5 4 に導光される。また、第 2 の光フィルタ 2 0 B 及びミラー 5 6 は、コリメータレンズ 5 3 と結像レンズ 5 4 との間の結像光路上に配置されている。視野絞り 5 8 を通って筐体 5 2 内に入射した散乱光 J 2 は、コリメータレンズ 5 3 によって平行光化され、ビームスプリッタ 5 5 で反射した後、第 2 の光フィルタ 2 0 B を透過する。第 2 の光フィルタ 2 0 B を透過した散乱光 J 2 は、ミラー 5 6 で反射して結像レンズ 5 4 に導光される。

【 0 0 6 2 】

ここで、結像レンズ 5 4 は、結像レンズ移動機構 5 7 により、蛍光 J 1 の光軸に対して所定距離だけずれた状態となっている。また、撮像部 1 3 における光検出器 5 9 は、第 1 の撮像領域（図 1 0 における光検出器 5 9 の下半分領域）5 9 A 及び第 2 の撮像領域（図 1 0 における光検出器 5 9 の上半分領域）5 9 B を含む受光面を有する。これにより、結像レンズ 5 4 で結像した蛍光 J 1 は、撮像部 1 3 における光検出器 5 9 の第 1 の撮像領域 5 9 A に結像するのに対し、結像レンズ 5 4 で結像した散乱光 J 2 は、撮像部 1 3 における光検出器 5 9 の第 2 の撮像領域 5 9 B に結像する。光検出器 5 9 は、第 1 の撮像領域 5 9 A において蛍光 J 1 の光像の少なくとも一部を撮像し、第 2 の撮像領域 5 9 B において散乱光 J 2 の光像の少なくとも一部を撮像する。このような構成においても、蛍光 J 1 と散乱光 J 2 との分割を簡単な構成で実現できる。

【 0 0 6 3 】

また、例えば上記実施形態では、面状光 L 2 を出力する照射部 1 1 とラインスキャン方式を採用した撮像部 1 3 とを組み合わせているが、試料容器 2 におけるウェル 3 の深さ方向の断面を一度に測定できるものであれば他の方式を採用してもよい。例えば米国特許第 8 5 8 2 2 0 3 号に記載の Oblique Plane Microscopy の光学系を採用することも可能である。

【 0 0 6 4 】

試料 S が異なる種類の複数の蛍光物質で染色されている場合、照射部 1 1 から各蛍光物質を励起する複数の面状光 L 2 を出力してもよく、撮像部 1 3 は、それぞれの蛍光物質から発せられた複数の蛍光の像をそれぞれ撮像してもよい。この場合、解析部 3 3 は、散乱光画像 F 2 に基づいて試料 S の存在領域 N 4 を特定した後、複数の蛍光の像から得られた各蛍光画像 F 1 に対し、試料 S の存在領域 N 4 に基づく解析領域 N 5 をそれぞれ設定する。これにより、試料 S に染色された各蛍光物質から発せられる蛍光強度等を精度良く解析できる。なお、試料 S が異なる種類の複数の蛍光物質で染色されている場合においても、複数の蛍光物質が同じ波長で励起される場合には、照射部 1 1 から単一の面状光 L 2 を出力してもよい。また、試料 S が異なる種類の複数の蛍光物質で染色されている場合においても、複数の蛍光物質が同じ波長の蛍光を発する場合は、複数回の撮像により、各蛍光物質から発せられた蛍光を撮像してもよい。

【 0 0 6 5 】

また、試料 S の存在領域 N 4 と解析領域 N 5 とは、必ずしも一致していなくてもよい。例えば図 1 2 に示すように、蛍光画像 F 1 に出現する蛍光像 N 1 の内側（試料 S の存在領域 N 4 の内側）に部分的に解析領域 N 5 が設定されていてもよい。

【 符号の説明 】

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

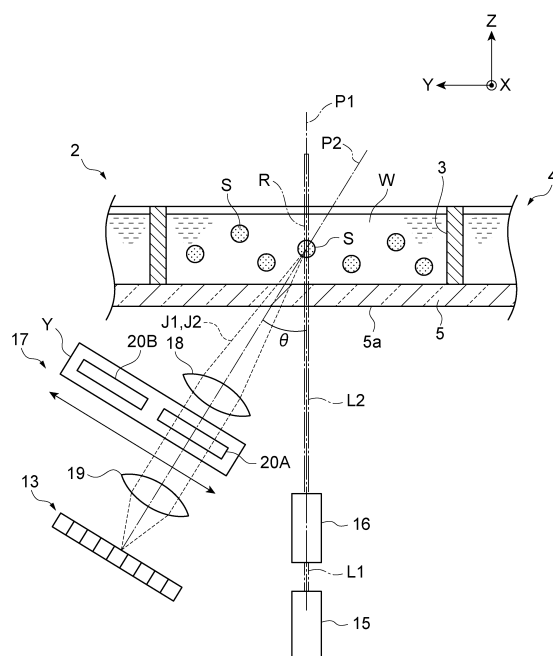
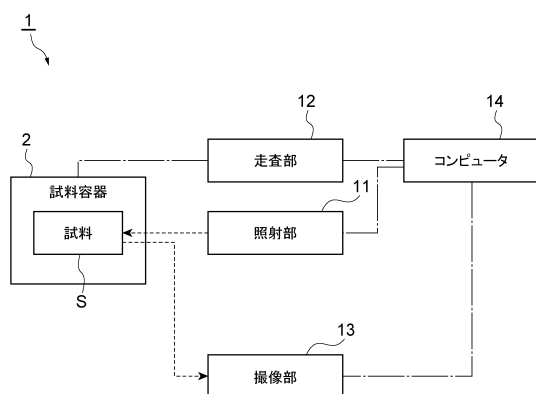
1 ... 試料観察装置、2 ... 試料容器、3 ... ウェル、1 1 ... 照射部、1 2 ... 走査部、1 3 ... 撮像部、1 7 ... 結像部、2 0 A ... 第 1 の光フィルタ、2 0 B ... 第 2 の光フィルタ、3 2 ... 画像処理部、3 3 ... 解析部、4 1 ... ビームスプリッタ（光分割素子）、4 3 A ... 第 1 の光検出器、4 3 B ... 第 2 の光検出器、5 1 ... 光分割装置（結像部）、5 5 ... ビームスプリッタ（光分割素子）、5 9 ... 光検出器、5 9 A ... 第 1 の撮像領域、5 9 B ... 第 2 の撮像領域、L 2 ... 面状光、J 1 ... 蛍光、J 2 ... 散乱光、G 1 ... 第 1 の画像データ、G 2 ... 第 2 の画像データ、F 1 ... 蛍光画像、F 2 ... 散乱光画像、N 4 ... 試料の存在領域、N 5 ... 解析領域、S ... 試料、R ... 照射面、P 2 ... 観察軸、Y ... 切替部。

【図面】

10

【图 1】

【圖 2】



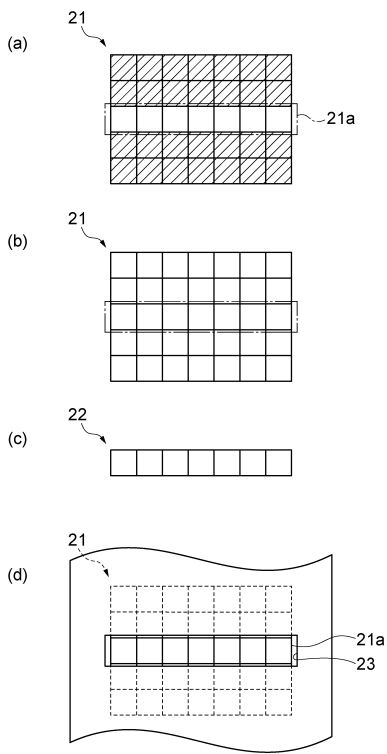
20

30

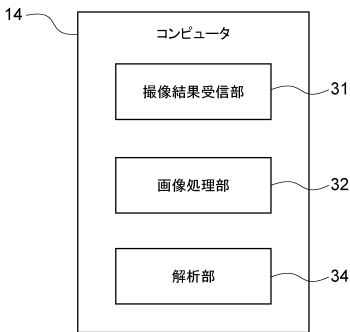
40

50

【図 3】



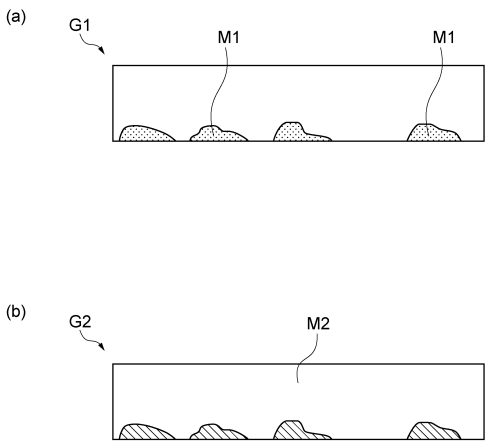
【図 4】



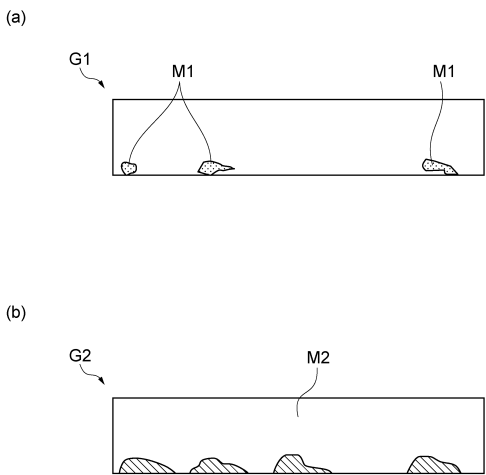
10

20

【図 5】



【図 6】

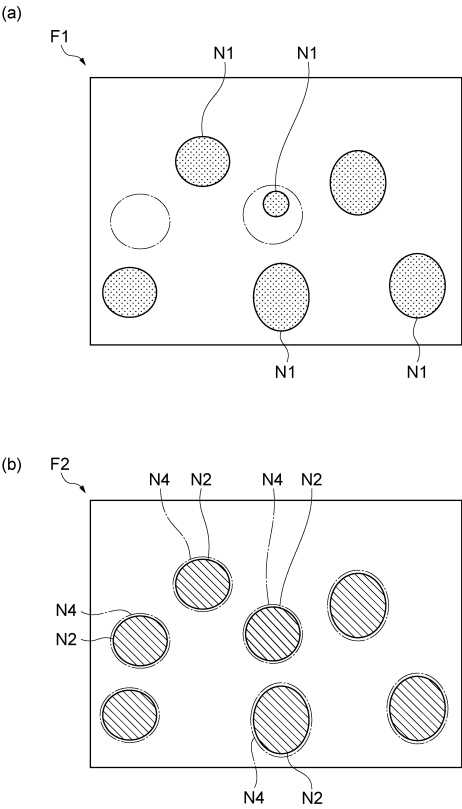


30

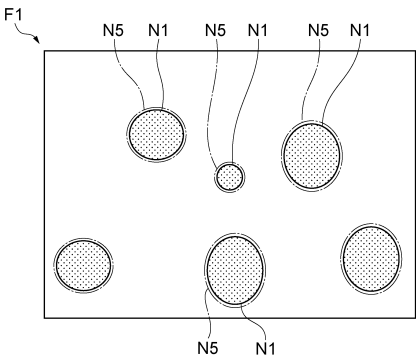
40

50

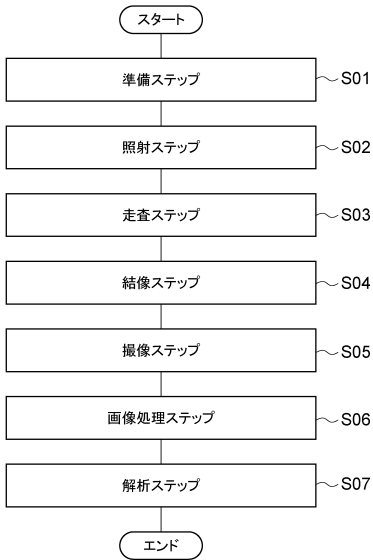
【図 7】



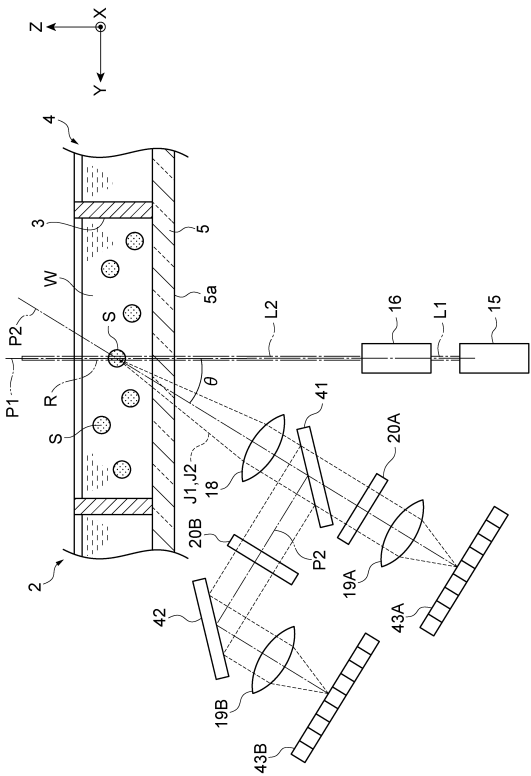
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

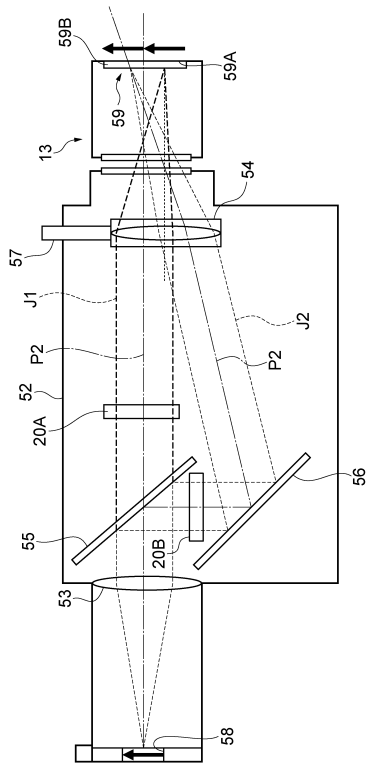
20

30

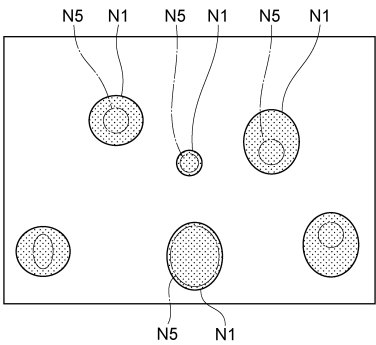
40

50

【図 1 1】



【図 1 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 松原 正典

静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内

(72)発明者 山本 諭

静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内

審査官 横尾 雅一

(56)参考文献

特開 2 0 0 5 - 0 2 4 5 3 2 (J P , A)

特開 2 0 1 0 - 0 7 2 0 1 4 (J P , A)

特開 2 0 0 5 - 1 8 1 1 4 5 (J P , A)

特表 2 0 1 3 - 5 0 7 6 1 2 (J P , A)

特表 2 0 0 6 - 5 0 9 2 4 6 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 2 9 1 8 1 (U S , A 1)

CARUCCI J A , et al. , Line-scanning, stage scanning confocal microscope , PROCEEDINGS OF SPIE , 2016年03月11日 , Vol.9703 , pp.97030F-1 - 97030F-7 , doi: 10.1117/12.2218302

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 2 1 / 0 0 - G 0 1 N 2 1 / 7 4

G 0 2 B 2 1 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - G 0 1 N 3 3 / 9 8

C 1 2 M 1 / 0 0 - C 1 2 M 3 / 1 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)