

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年9月21日(21.09.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/159821 A1

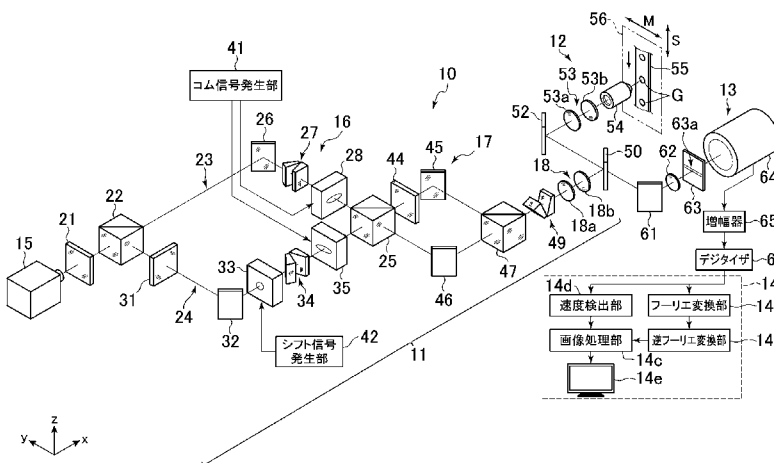
- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G02B 21/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/010785
- (22) 国際出願日: 2017年3月16日(16.03.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-053549 2016年3月17日(17.03.2016) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 三上 秀治(MIKAMI Hideharu); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 合田 圭介(GODA Keisuke); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 吉田 正義(YOSHIDA Tadanori); 〒1600023 東京都新宿区西新宿六丁目15番1号 ラ・トゥール新宿411号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: IMAGING APPARATUS AND IMAGING METHOD

(54) 発明の名称: イメージング装置及びイメージング方法



- 14a Fourier transformation unit
- 14b Reverse Fourier transformation unit
- 14c Image processing unit
- 14d Speed detection unit
- 41 Comb signal generation unit
- 42 Shift signal generation unit
- 65 Amplifier
- 66 Digitizer

(57) Abstract: Provided are an imaging apparatus and an imaging method that are capable of acquiring higher quality images. According to the present invention, a beam generation unit (11) generates first and second probe beams from laser light. Each of the first and second probe beams comprises a plurality of interference beams different in beat frequency. A beam emitting unit (12) emits the first and second probe beams separately in a sub-scanning direction. Sub-scanning is carried out while positions on a sample (G) irradiated with the first and second probe beams are shifted from each other by moving the sample (G) within a micro flow path (55). An observation image is generated by stacking the images of the sample (G) acquired by the irradiation with the first and second probe beams.

(57) 要約: より高画質な画像を得ることができるイメージング装置及びイメージング方法を提供する。ビーム生成部(11)は、レーザ光から第1、第2プローブビームを生成する。第1、第2プローブビームは、それぞれ互いにビート周波数が異なる複数の干渉光からなる。ビーム照射部(12)は、第1、第2プローブビームを副走査方向

に離して照射する。微小流路(55)内を試料(G)が移動することで、試料(G)に対する第1、第2プローブビームの照射位置がずれて副走査が行われる。第1、第2プローブビームのそれぞれの照射で得られる試料(G)の画像を重ねて観察画像を生成する。

WO 2017/159821 A1

明 細 書

発明の名称：イメージング装置及びイメージング方法

技術分野

[0001] 本発明は、イメージング装置及びイメージング方法に関する。

背景技術

[0002] イメージング装置として、例えば、共焦点光学系を用いたレーザ顕微鏡装置が知られている。このレーザ顕微鏡装置は、レーザ光を対物レンズで集光して試料に照射し、試料から放出される蛍光や反射光を集光レンズ及び集光レンズの焦点位置に配されたピンホールを介して光検出器で受光する。そして、レーザ光の照射位置を直交する2方向にそれぞれ移動することにより、試料表面を走査している。

[0003] また、周波数多重励起（F I R E : Fluorescence Imaging using Radiofrequency-tagged Emission）法と称される手法を用いたレーザ顕微鏡装置が特許文献1によって提案されている。この周波数多重励起法のレーザ顕微鏡装置は、レーザ光を第1、第2のレーザ光に分けるビームスプリッタと、第1のレーザ光から偏向角と周波数シフトの大きさが互いに異なる複数の回折光を出力する音響光学ディフレクタ（以下、A O D（Acousto-Optic Deflector）と称する）と、光検出器の応答性や蛍光の応答速度を考慮してビート周波数を低くするために第2のレーザ光の周波数をシフトする音響光学周波数シフタ（以下、A O F S（Acousto-Optic Frequency Shifter）と称する）と、A O Dからの複数の回折光にA O F Sからの第2のレーザ光を重ね合わせ、回折光と第2のレーザ光との周波数との差（ビート周波数）で強度変調された励起光を生成するビームスプリッタと、励起光を試料に照射する照射部とを備えている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2014／110290号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記のような周波数多重励起法を用いたイメージング装置では、試料に対して一方向の走査だけでよいので、高速に観察画像を取得することができ、多数の試料の観察画像を取得する際に有利である。一方で、観察画像は、試料の形状や特性などを解析するのに用いられるので、より高画質な観察画像の取得が望まれる。

[0006] 本発明は、上記事情を鑑みてなされたものであり、より高画質な画像を得ることができるイメージング装置及びイメージング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

[0007] 本発明のイメージング装置は、複数の周波数成分を空間的に配列した複数のプローブビームを生成するビーム生成部と、複数のプローブビームのそれぞれについて、周波数成分を主走査方向に沿ってライン状に配列するとともに、複数のプローブビームを互いに主走査方向と異なる副走査方向に隣接または離して試料に照射するビーム照射部と、複数のプローブビームの照射位置と試料とを副走査方向に相対的に移動する副走査部と、プローブビームを試料に照射することで生じた信号光の強度を検出して検出信号を出力する光検出部と、検出信号の周波数成分ごとの信号成分から試料の観察画像を生成する信号処理部とを備えるものである。

[0008] また、本発明のイメージング方法は、複数の周波数成分を空間的に配列した複数のプローブビームを生成するビーム生成ステップと、複数のプローブビームのそれぞれについて、周波数成分を主走査方向に沿ってライン状に配列するとともに、複数のプローブビームを互いに主走査方向と異なる副走査方向に隣接または離して試料に照射するビーム照射ステップと、複数のプローブビームの照射位置と試料とを副走査方向に相対的に移動する副走査ステップと、プローブビームを試料に照射することで生じた信号光の強度を検出して検出信号を出力する光検出ステップと、検出信号の周波数成分ごとの信

号成分から試料の観察画像を生成する信号処理ステップとを有するものである。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、副走査方向に隣接または離して、複数の周波数成分を空間的に配列した複数のプローブビームをそれぞれ試料に照射することで得られる検出信号から試料の画像を生成するので、より高画質な画像を得ることができる。

図面の簡単な説明

- [0010] [図1]第1実施形態に係るレーザ顕微鏡装置の構成を示す概略図である。
- [図2]コム信号と第1、第2回折光の周波数スペクトルを示す説明図である。
- [図3]干渉光を生成する際の第1回折光と第2回折光との組み合わせを示す説明図である。
- [図4A]プローブビームの周波数スペクトルを示す説明図である。
- [図4B]検出光の周波数スペクトルを示す説明図である。
- [図5]第1、第2プローブビームの照射状態を示す説明図である。
- [図6]1つの試料に対して得られる検出信号の波形の一例を示す波形図である。
- [図7]検出信号の自己相関関数の例を示すグラフである。
- [図8]第1プローブビームと第2プローブビームとの干渉光の各照射スポットを主走査方向にずらした例を示す説明図である。
- [図9]図8の例におけるコム信号とローブビームの周波数スペクトルを示す説明図である。
- [図10]図8の例におけるスリット板を示す斜視図である。
- [図11]第1、第2プローブビームによる照射範囲を主走査方向に分割した例を示す説明図である。
- [図12]4本のプローブビームを照射する第2実施形態のレーザ顕微鏡装置の構成を示す概略図である。
- [図13]4本のプローブビームを照射した状態を示す説明図である。

- [図14]第3実施形態の簡略化したビーム生成部の構成を示す概略図である。
- [図15]プローブビームの照射位置を副走査方向に移動させる第4実施形態のビーム照射部の構成を示す概略図である。
- [図16]第4実施形態のマスク板のアーチャとプローブビームとの関係を示す説明図である。
- [図17]第5実施形態に係るレーザ顕微鏡装置の構成を示す概略図である。
- [図18]コム信号の周波数、プローブビームの照射位置及び生成される画像の関係を説明図である。
- [図19]プローブビームの符号パターンを示すグラフである。
- [図20]周波数成分として光周波数成分をライン状に分散させて照射する第6実施形態のイメージング装置を示す概略図である。
- [図21]第6実施形態におけるプローブビームの照射状態を示す説明図である。

発明を実施するための形態

[0011] [第1実施形態]

図1に本発明を実施したイメージング装置としてのレーザ顕微鏡装置10を示す。レーザ顕微鏡装置10は、プローブビーム出力系を構成するビーム生成部11及びビーム照射部12と、光検出部13と、信号処理部14とを備えている。このレーザ顕微鏡装置10は、ビーム生成部11で生成した第1及び第2プローブビームをビーム照射部12から試料Gに照射し、試料Gから放出される信号光を光検出部13で検出して得られる検出信号を信号処理部14で処理することにより1フレーム分の画像（以下、観察画像という）を生成する。

- [0012] 第1及び第2プローブビームは、いずれも周波数成分としての複数の干渉光からなり、各干渉光を主走査方向（M方向：y軸方向）にライン状に並べた状態で試料Gに照射される。第1及び第2プローブビームの各干渉光は、励起光として試料Gに照射され、試料Gから放出される信号光としての蛍光から各副走査ラインにおける蛍光物質の分布を取得して、蛍光物質の分布を

示す観察画像を生成する。副走査ライン（S方向：z軸方向）は、主走査方向と直交する副走査方向に延びており、1フレーム分の観察画像は、複数の副走査ラインが主走査方向に並んでいる。なお、以下、x軸方向、y軸方向、z軸方向は、互いに直交した方向とする。また、副走査方向は、試料Gを走査するために、試料Gと主走査方向に沿ってライン状にされたプローブビームとの相対的な移動方向である。

[0013] この例では、干渉光が強度変調された強度変調光であり、干渉光のビートが強度変調に相当し、そのビート周波数が強度変調周波数である。この例では、強度変調光として、干渉光の例について説明するが、強度変調光は、干渉光に限定されるものではなく、例えば回転するマスクパターンを通過したライン状ビームのような、ライン状ビームがライン方向の位置によって異なる強度変調周波数を有するものであってもよい。このようなビームの生成方法は文献「Futia, G., Schlup, P., Winters, D. G., Bartels, R. A., “Spatially-chirped modulation imaging of absorption and fluorescent objects on single-element optical detector.,” Opt. Express 19(2), 1626-1640 (2011)」に詳しく記載されている。

[0014] ビーム生成部11は、レーザ光源としてのレーザ装置15、回折光生成ユニット16、合波ユニット17、リレー光学系18等で構成される。レーザ装置15は、連続発振タイプであり、直線偏光（例えば水平偏光）のレーザ光を連続的に出力する。この例では、レーザ装置15としては、波長488nmのレーザ光を出力するDPSS (Diode Pumped Solid State)レーザを用いている。

[0015] 回折光生成ユニット16は、1/2波長板21、偏光ビームスプリッタ22、第1、第2アーム23、24、無偏光ハーフビームスプリッタ25を有し、干渉光の元となる第1、第2回折光を生成する。第1アーム23は、ミラー26、アナモルフィックプリズムペア27、第1音響光学ディフレクタ（以下、AOD (Acousto-Optic Deflector) と称する) 28を備え、複数の第1回折光を生成する。第2アーム24は、1/2波長板31、ミラー32

、音響光学周波数シフタ（以下、A O F S（Acousto- Optic Frequency Shifter）と称する）33、アナモルフィックプリズムペア34、第2 A O D 35を備え、複数の第2回折光を生成する。

[0016] レーザ装置15からのレーザ光は、1/2波長板21を介して偏光ビームスプリッタ22に入射する。偏光ビームスプリッタ22は、入射するレーザ光の水平偏光成分を第1レーザ光として第1アーム23に透過し、垂直偏光成分を第2レーザ光として第2アーム24に反射する。この偏光ビームスプリッタ22は、レーザ光の偏光方向に応じた強度比でレーザ光を透過及び反射する。偏光ビームスプリッタ22に入射するレーザ光の偏光方向は、1/2波長板21の光学軸の方位によって調整することができる。これにより、第1アーム23、第2アーム24における各レーザ光の損失を考慮して、第1レーザ光と第2レーザ光との強度比を調整している。例えば、第1、第2 A O D 28、35に入射する第1レーザ光と第2レーザ光との光強度が同じになるように調整している。なお、第1、第2レーザ光の強度比を調整する必要がない場合には、偏光ビームスプリッタ22に代えて、ハーフミラーや無偏光タイプのビームスプリッタを用いることができ、この場合には1/2波長板21、31は不要である。

[0017] また、後述するように第1レーザ光から生成される第1回折光と、第2レーザ光から生成される第2回折光とを干渉させることができれば、第1レーザ光を出力するレーザ装置と第2レーザ光を出力するレーザ装置とを別々に設けてもよい。

[0018] 第1アーム23では、第1レーザ光がミラー26、アナモルフィックプリズムペア27を介して第1 A O D 28に入射する。アナモルフィックプリズムペア27は、第1レーザ光のビーム形状（断面形状）を円形から楕円形に変形させる。この変形では第1 A O D 28による第1レーザ光の回折方向（A O D内で進行波が進む方向）に沿ってビーム形状を引き延ばすことにより行う。このように、第1レーザ光のビーム形状を変形することで、第1 A O D 28から射出される各第1回折光の広がりを抑え、分解能の低下を防止して

いる。なお、この例では、アナモルフィックプリズムペア27は、x軸方向にビーム形状を引き延ばす。

[0019] 第1 AOD 28は、コム信号発生部41からの第1コム信号によって駆動され、回折によって第1レーザ光から複数(N本)の第1回折光を生成する。この第1 AOD 28からの各第1回折光は、無偏光ハーフビームスプリッタ25に入射する。コム信号発生部41は、例えば任意波形発生器で構成されている。

[0020] 第1コム信号は、互いに異なる複数の周波数の駆動信号を重ねたものであり、この第1コム信号の入力によって第1 AOD 28は、偏向角が異なるN本の第1回折光を同時に射出する。また、第1 AOD 28は、駆動信号の周波数に比例して、第1回折光の偏向角を大きくするとともに、第1回折光を第1レーザ光に対して周波数シフトする。この周波数シフトは、第1レーザ光に対して駆動信号の周波数だけ第1回折光の光周波数が高くまたは低くなる。この例では、第1レーザ光に対して駆動信号の周波数分だけ光周波数が高くなった第1回折光が第1 AOD 28から射出する。したがって、偏向角が大きい第1回折光ほど光周波数が高くなる。なお、偏向角は、0次の回折光と第1回折光とのなす角度である。また、第1レーザ光に対して駆動信号の周波数分だけ第1回折光の光周波数を低くしてもよい。

[0021] 図2に示すように、第1コム信号は、一定な周波数間隔 Δf で周波数 f_{11} から周波数 f_{1N} までのN個の駆動信号を重ねたものである。これにより、第1 AOD 28からは、周波数間隔 Δf で光周波数 f_{a1} から光周波数 f_{aN} までのN本の第1回折光が出力される。ここで、第1レーザ光、すなわちレーザ装置15から出力されるレーザ光の光周波数を f_0 、 i を1、2、 \dots 、Nとすると「 $f_{ai} = f_0 + f_{1i}$ 」となる。また、周波数間隔 Δf を一定にすることで、隣接した第1回折光同士の偏向角の差をいずれも等しくしている。

[0022] この例では、第1 AOD 28として、動作可能な駆動信号の範囲(以下、動作帯域という)が100MHz~200MHzのAODを用いている。また、第1コム信号における周波数間隔 Δf を1MHzとして、101MHz

($= f_{11}$) から 200MHz ($= f_{1(100)}$) までの駆動信号を重ね合わせており、これにより光周波数が 1MHz 間隔 ($= \Delta f$) で変化する 100 ($= N$) 本の第1回折光を生成する。

[0023] 図1において、第2アーム24では、偏光ビームスプリッタ22からの第2レーザ光は、1/2波長板31、ミラー32、AOF S 33、アナモルフィックプリズムペア34を介して第2AOD35に入射する。1/2波長板31は、第2レーザ光の偏光方向を回転して第1レーザ光の偏光方向と同じ水平偏光にする。AOF S 33は、シフト信号発生部42からのシフト信号によって駆動され、第2レーザ光の光周波数をシフト周波数 f_s だけ低くする。このAOF S 33は、第2AOD35として、第1AOD28と同じ動作帯域であり、同じ特性を持つAODを用いながら、複数の第1回折光の光周波数範囲と第2AOD35から射出される複数の第2回折光の光周波数範囲とが重ならないようにしている。このため、シフト周波数 f_s は、複数の第1回折光の光周波数範囲と複数の第2回折光の光周波数範囲とが重ならないように決められている。この例では、シフト周波数 f_s は、 100MHz としてある。また、AOF S 33によって、第2レーザ光の光周波数をシフト周波数 f_s だけ高くしてもよい。

[0024] 上記のように、AOF S 33は、複数の第1回折光の光周波数範囲と複数の第2回折光の光周波数範囲とが重ならないようにするために設けているので、第1、第2AOD28、35によって第1、第2レーザ光から直接に光周波数範囲が重ならない複数の第1回折光と複数の第2回折光とを生成することができる場合には、AOF S 33は、不要である。また、後述するように、第1AOD28からの第1回折光と第2AOD35からの第2回折光とを組み合わせることで干渉光を生成することで干渉光のビート周波数を低くできるので、光検出部13の応答性や試料Gの蛍光物質の応答速度に対応させてビート周波数を低くするためのAOF Sを不要とすることができる。

[0025] アナモルフィックプリズムペア34は、AOF S 33からの第2レーザ光のビーム形状を円形から楕円形に変形させる。この変形では第2AOD35

による第2レーザ光の回折方向に沿ってビーム形状を引き延ばすことにより行う。アナモルフィックプリズムペア34は、アナモルフィックプリズムペア27と同様に、第2AOD35から射出される各第2回折光の広がりを抑え、分解能の低下を防止している。なお、この例では、アナモルフィックプリズムペア34は、y軸方向にビーム形状を引き延ばす。

[0026] 第2AOD35は、コム信号発生部41からの第2コム信号によって駆動され、回折によって第2レーザ光からN本の第2回折光を生成する。第2AOD35からの各第2回折光は、無偏光ハーフビームスプリッタ25に入射する。第2コム信号は、第1コム信号と同様に、互いに異なる複数の周波数の駆動信号を重ねたものであり、この第2コム信号の入力によって第2AOD35は、偏向角が異なるN本の第2回折光を同時に射出し、各第2回折光は、その光周波数が周波数シフトによって駆動信号の周波数分だけ第2レーザ光よりも高くされている。

[0027] この例では、第2AOD35としては、上述のように第1AOD28と同じAODを用いている。すなわち、同一の周波数の駆動信号に対する回折光の偏向角が同じになり、駆動信号の周波数の変化量に対する第1回折光と第2回折光の偏向角の変化量が同じになる第1AOD28と第2AOD35とを用いている。また、図2に示すように、第2コム信号の各駆動信号の周波数と第1コム信号の各駆動信号の周波数とを同じにしている ($f_{1i} = f_{2i}$)。したがって、第2コム信号は、周波数間隔 Δf で周波数 f_{21} ($= f_{11}$) から周波数 f_{2N} ($= f_{1N}$) までのN個の駆動信号を重ねたものになっている。第2AOD35からは、周波数間隔 Δf で光周波数 f_{b1} から光周波数 f_{bN} までのN本の第2回折光が出力される。第2回折光の光周波数 f_{bi} は、対応する駆動信号の周波数 f_{2i} を用いて「 $f_{bi} = f_0 - f_s + f_{2i}$ 」となる。

[0028] 第1AOD28と第2AOD35として、同じAODを用いることによって、複数の干渉光を生成するための複数の第1回折光と複数の第2回折光との重ね合わせを容易にしている。すなわち、コム信号中の駆動信号の周波数の変化量に対する第1回折光と第2回折光の偏向角の変化量が同じになる第

1 A O D 2 8 と第 2 A O D 3 5 とを用いることによって、複数の第 1 回折光と複数の第 2 回折光の偏向角の角度間隔を互いに同じすることができ、それらの重ね合わせを容易にしている。例えば、後述するように無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 のように簡単な構成で複数の第 1 回折光と複数の第 2 回折光とを重ね合わせて、所望の複数の干渉光を得ることができる。

[0029] 上記第 2 A O D 3 5 は、第 1 A O D 2 8 と同じく周波数が 1 M H z 間隔 ($=\Delta f$) で変化する 1 0 0 ($=N$) 本の第 2 回折光を生成する。また、同じ周波数の駆動信号に対する第 2 回折光と第 1 回折光との各偏向角は同じであるが、各光周波数は A O F S 3 3 のシフト周波数 f_s だけ第 1 回折光の光周波数が高くなる ($f_{a_i} = f_{b_i} + f_s$)。

[0030] 重ね合わせ部としての無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 は、複数の第 1 回折光と複数の第 2 回折光とを互いに周波数が異なる同士で組み合わせて重ねることで、第 1 プロブビームと第 2 プロブビームとを生成する。例えば、第 1 プロブビームは、無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 で反射される第 1 回折光の成分と、無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 を透過する第 2 回折光の成分とを重ね合わせたものであり、無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 から x 軸方向に射出される。また、第 2 プロブビームは、無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 を透過する第 1 回折光の成分と、無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 で反射される第 2 回折光の成分とを重ね合わせたものであり、無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 から y 軸方向に射出される。

[0031] 第 1、第 2 プロブビームは、いずれも第 1 回折光と第 2 回折光とが干渉した N 本の干渉光からなる。N 本の干渉光は、無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 から等角度間隔で水平面 (x y 面) 上に並んで射出される。この例では、無偏光ハーフビームスプリッタ 2 5 から射出される第 1、第 2 プロブビームは、いずれも水平偏光であるが、第 1、第 2 プロブビームの間では、ビート周波数が同じ干渉光は、互いにビートの位相が半周期 (π) ずれている。

[0032] 図 3 に示すように、第 1 A O D 2 8 と第 2 A O D 3 5 とは、同一の水平面

(x y 平面) に各第 1 回折光、各第 2 回折光を射出するように配置され、第 1 回折光は、無偏光ハーフビームスプリッタ 25 に対して y 軸方向から入射し、第 2 回折光は、無偏光ハーフビームスプリッタ 25 に対して x 軸方向から入射する。第 1 回折光 L_{a_i} の光周波数を f_{a_i} 、第 2 回折光 L_{b_i} の光周波数を f_{b_i} としたときに、無偏光ハーフビームスプリッタ 25 によって、第 1 回折光 L_{a_i} と第 2 回折光 $L_{b_{(N-i+1)}}$ とを重ね合わせて、第 1 プローブビームの干渉光 $L_{1_{a_b i}}$ と、第 2 プローブビームの干渉光 $L_{2_{a_b i}}$ とを生成するように、その向きが調整されている。すなわち、第 1 回折光については光周波数が高くなる順番で、また第 2 回折光は光周波数が低くなる順番で、第 1 回折光と第 2 回折光とを組み合わせて、各プローブビームについて N 本の干渉光を生成する。

[0033] 第 1 回折光と第 2 回折光とを重ね合わせるにより、例えば第 1 プローブビームの干渉光 $L_{1_{a_b i}}$ のビート周波数 $f_{a_b i}$ は「 $f_{a_i} - f_{b_{(N-i+1)}}$ 」となり、干渉光 $L_{1_{a_b 1}} \sim L_{1_{a_b N}}$ はいずれも違うビート周波数となる。第 1 プローブビームでは、干渉光 $L_{1_{a_b 1}} \sim L_{1_{a_b N}}$ が y 軸方向に並んで射出される。第 2 プローブビームについても、同様であり干渉光 $L_{2_{a_b i}}$ のビート周波数 $f_{a_b i}$ は「 $f_{a_i} - f_{b_{(N-i+1)}}$ 」であり、干渉光 $L_{2_{a_b 1}} \sim L_{2_{a_b N}}$ が x 軸方向に並んで射出される。このようにして、光成分としての干渉光がそのビート周波数に応じて空間的に配列した第 1 及び第 2 プローブビームが生成される。

[0034] なお、干渉光を生成する際に、対応する第 1 回折光と第 2 回折光とが完全に重ならなくてもよい。また、第 1 アーム 23 と第 2 アーム 24 の各レーザー光の光路長は、第 1 回折光と第 2 回折光とが干渉する範囲（コヒーレント長の範囲）で一致させておく。

[0035] 上記のように、第 1 回折光と第 2 回折光とを重ね合わせるにより、図 4A に示すように、例えば第 1 プローブビームにおける隣接したビート周波数の周波数間隔 $\Delta f_{a_b} (= f_{a_b (i+1)} - f_{a_b i})$ を一定にするとともに、その周波数間隔 Δf_{a_b} を従来よりも広くしている。具体的には、特許文献 1 に

記載される手法による隣接したビート周波数の周波数間隔は、回折光を生成するAODの駆動信号の周波数間隔と同じであって、この例の周波数間隔 Δf に相当する。しかし、この例では隣接したビート周波数の周波数間隔 Δf_{ab} は、AODの駆動信号の周波数間隔 Δf の2倍($\Delta f_{ab} = 2 \cdot \Delta f$)になる。

[0036] 図4Bに示すように、各ビート周波数 f_{abi} は、それぞれ試料Gの蛍光の光強度の変化に応じて変化する光信号の搬送周波数(中心周波数)となり、搬送周波数ごとに側波として利用可能な幅、すなわち帯域幅が周波数間隔 Δf_{ab} となる。したがって、搬送周波数ごとの帯域幅と、N本の干渉光による検出で利用可能な全帯域幅が従来手法の2倍になる。具体的には、この例では周波数間隔 Δf が1MHzであるから、従来手法では搬送周波数ごとの帯域幅が1MHz、全帯域幅が100MHzであるのに対して、この例では搬送周波数ごとの帯域幅が2MHz、全帯域幅が200MHzである。

[0037] 第2プローブビームの干渉光 L_{2abi} は、第1プローブビームの干渉光 L_{1abi} と同じビート周波数 f_{abi} となるから、この第2プローブビームについても搬送周波数ごとの帯域幅と、N本の干渉光による検出で利用可能な全帯域幅が従来手法の2倍になる。

[0038] 図1において、無偏光ハーフビームスプリッタ25からの第1、第2プローブビームは、合波ユニット17に送られる。合波ユニット17は、1/2波長板44、ミラー45、46、偏光ビームスプリッタ47を有している。第1プローブビームは、1/2波長板44によって第2プローブビームと偏光方向が直交する垂直偏光にされてから、ミラー45を介して偏光ビームスプリッタ47にy軸方向から入射する。一方の第2プローブビームは、ミラー46を介して偏光ビームスプリッタ47にx軸方向から入射する。

[0039] 偏光ビームスプリッタ47は、垂直偏光の第1プローブビームをx軸方向に反射し、水平偏光の第2プローブビームをx軸方向に透過する。第1プローブビームと第2プローブビームとを副走査方向に離して試料Gに照射するために、第1プローブビームと第2プローブビームとの偏光ビームスプリッ

タ47に対するz軸方向の入射角度が互い異なるように、ミラー45、46がそれぞれ調整されている。これにより、第1プローブビームと第2プローブビームとを、わずかにz軸方向に角度をつけて、x軸方向に進むように合波している。

[0040] 偏光ビームスプリッタ47からの第1、第2プローブビームは、アナモルフィックプリズムペア49、リレー光学系18を介してダイクロイックミラー50に入射する。このときに、N本の干渉光が並ぶ方向が主走査に相当する方向であり、この主走査方向に直交する方向が副走査方向である。なお、この例では、ビーム照射部12では、主走査方向は左右方向(y軸方向)になり、副走査方向は水平方向(z軸方向)になる。

[0041] アナモルフィックプリズムペア49は、アナモルフィックプリズムペア27、34によって楕円形となっている各干渉光のビーム形状を、その短軸方向に引き延ばすことによって円形とする。アナモルフィックプリズムペア27、34、49に代えてシリンドリカルレンズ等を用いてもよい。

[0042] リレー光学系18は、アナモルフィックプリズムペア49側に配されたレンズ18aとダイクロイックミラー50側に配されたレンズ18bとから構成されており、レンズ18aの前側焦点位置が第1、第2AOD28、35の出力面に、レンズ18bの後側焦点位置が後述するリレー光学系53のレンズ53aの前側焦点位置に一致するように配されている。これにより、第1及び第2プローブビームを、それらの各干渉光を所定のビーム径を保持した状態でビーム照射部12に送る。

[0043] ダイクロイックミラー50は、リレー光学系18からの第1、第2プローブビームをビーム照射部12に向けて反射し、ビーム照射部12からの信号光を透過して光検出部13に送る。

[0044] ビーム照射部12は、ミラー52、リレー光学系53、対物レンズ54を有している。リレー光学系53は、ミラー52側に配されたレンズ52aと対物レンズ54側に配されたレンズ53bとから構成されており、レンズ53bの後側焦点位置が対物レンズ54の入射瞳に一致するように調整されて

いる。このリレー光学系53によって、第1、第2プローブビームは、対物レンズ54の入射瞳にほぼいっばいに広がって入射する。

[0045] 対物レンズ54は、第1、第2プローブビームをそれぞれ集光して、試料Gが流れる微小流路55に向けて照射する。対物レンズ54は、その焦点面が微小流路55の内に位置するように調整されている。これにより、各干渉光を絞った照射スポット（ビームウエスト）がそれぞれ微小流路55内に形成される。なお、対物レンズ54は、その光軸方向に移動自在にされており、例えばモータ（図示省略）によって移動できる。これにより、試料Gに対する対物レンズ54の焦点面の位置を変えて走査を行うことができる。

[0046] この例では、フローサイトメータに、レーザ顕微鏡装置10を適用した構成になっている。上記微小流路55は、フローサイトメータを構成する流路デバイス56に設けられたフローセル（フローサイトメトリ用セル）に形成されている。流路デバイス56は、微小流路55内に水等の流体とともに複数の試料Gを順次に流すことにより、試料Gを副走査方向に移動する。したがって、この例では、流路デバイス56が副走査部となる。

[0047] 図5に示すように、微小流路55内には、第1プローブビームの各干渉光の1番目からN番目までのN個の照射スポット $SP_{11} \sim SP_{1N}$ を主走査方向（M方向）にライン状に配列した、第1プローブビームの第1照射ラインBL1が形成される。照射スポット $SP_{11} \sim SP_{1N}$ は、それらの直径とほぼ同じピッチで主走査方向に並ぶ。同様に、微小流路55内には、第2プローブビームの各干渉光の1番目からN番目までのN個の照射スポット $SP_{21} \sim SP_{2N}$ を、それらの直径とほぼ同じピッチで主走査方向にライン状に配列した第2プローブビームの第2照射ラインBL2が形成される。このように、第1、第2プローブビームのそれぞれについて、周波数成分である干渉光が主走査方向に沿ってライン状に配列される。なお、照射スポット $SP_{11} \sim SP_{1N}$ 、 $SP_{21} \sim SP_{2N}$ の直径（半値全幅）は、この例では、約330nmである。また、照射スポット $SP_{11} \sim SP_{1N}$ を特に区別する必要がない場合には照射スポット SP_1 と称し、照射スポット $SP_{21} \sim SP_{2N}$ を特に区別する必要が

ない場合には照射スポット SP_2 と称する。

[0048] 第1照射ライン BL_1 と第2照射ライン BL_2 とでは、照射スポット $SP_{1_1} \sim SP_{1_N}$ と照射スポット $SP_{2_1} \sim SP_{2_N}$ との主走査方向における位置が同じにされている。すなわち、例えば、図5において上から j 番目（ j は、1、2・・・ N ）の照射スポット SP_{1_j} と照射スポット SP_{2_j} とは主走査方向における位置が同じである。また、偏光ビームスプリッタ47から射出されるときに、第1プローブビームの各干渉光と第2プローブビームの各干渉光とのビート周波数の並び方は同じになるので、主走査方向における位置が同じ照射スポット SP_{1_j} 、 SP_{2_j} を形成する干渉光のビート周波数は同じである。このようにして、第1、第2プローブビームは、それらの干渉光が主走査方向に沿ってライン状に配列されて、それぞれ試料 G に照射される。

[0049] また、合波ユニット17によって第1プローブビームと第2プローブビームとの間に z 軸方向に角度をつけてあるため、第1照射ライン BL_1 と第2照射ライン BL_2 とは、互いに副走査方向に離れる。第1照射ライン BL_1 と第2照射ライン BL_2 との隣接ライン間隔 DL は、試料 G の副走査方向の最大の長さ WG よりも大きくなるように調整されている。これにより、同一の試料 G に同時に第1、第2プローブビームが照射されないようにしている。

[0050] また、微小流路55の最も上流側に配された照射ラインと最も下流側に配された照射ラインとの距離（この第1実施形態では隣接ライン間隔 DL に等しい）を、微小流路55内を流れる試料 G の最小間隔 SG よりも短くすることによって、異なる試料 G に同時に第1、第2プローブビームが照射されないようにしている。

[0051] 上記のように、同一の試料 G 及び異なる試料 G に対して、同時に第1、第2プローブビームを照射しないようにすることにより、高画質な観察画像を得る際に、複雑な計算処理を必要としない。そして、複雑な計算処理を必要としないため、高速な演算処理が可能であり、多数の試料 G の観察画像を得るうえで有利である。

- [0052] 試料Gは、微小流路55内を副走査方向に流れることによって、第1照射ラインBL1を通過する。第1照射ラインBL1を通過する際には、試料Gに対して、第1プローブビームの各干渉光が照射され、その照射位置が試料Gの下流への移動でずれることによって試料Gに対する副走査が行われる。この副走査によって、試料Gが2次元的に走査される。干渉光が照射された試料Gの部分からは、蛍光が放出され、その蛍光の光強度は、照射される干渉光のビート周波数に応じて変化するとともに、蛍光物質の分布に応じて変化する。
- [0053] 第1照射ラインの通過後、試料Gは、第2照射ラインを通過する。この第2照射ラインを通過する際には、試料Gに対して、第2プローブビームの各干渉光がそれぞれ照射される。試料Gの下流への移動によって、第2プローブビームの試料Gへの照射位置がずれることによって試料Gに対する副走査が行われる。この場合にも、干渉光が照射された試料Gの部分からは、蛍光が放出され、その蛍光の光強度は、照射される干渉光のビート周波数に応じて変化するとともに、蛍光物質の分布に応じて変化する。
- [0054] 試料Gからの蛍光は、照射された干渉光のビート周波数を搬送周波数とした信号が蛍光物質の分布に応じて強度変調された光信号である。ビート周波数が、照射ライン内における主走査方向の位置に対応しているから、光信号は、蛍光物質の分布の情報とともに、照射ライン内における主走査方向の位置情報を含んだ信号になっている。後述するように、第1、第2プローブビームのそれぞれN本の干渉光によって、N本の副走査ラインのそれぞれの二次元画像が生成される。
- [0055] 第1、第2プローブビームの第1回折光と第2回折光とは、いずれも強度分布がガウシアン分布となったものであり、干渉光は、第1回折光と第2回折光とを重ね合わせたものになるので、強度分布の半値幅が狭く尖度が大きくなる。このため、第1回折光と第2回折光とを重ね合わせた干渉光を試料Gに照射する手法は、従来の手法に比べて空間分解能が高くなるという利点がある。

[0056] 図1において、上記のようにして、試料Gが第1照射ラインBL1を通過する際に放出される各蛍光は、対物レンズ54によって集光され、それら各蛍光からなる検出光が対物レンズ54からリレー光学系53に入射し、プローブビームと逆の経路を通過してダイクロイックミラー50に入射する。この後に、試料Gが第2照射ラインを通過する際に放出される各蛍光からなる検出光についても、対物レンズ54、リレー光学系53を経てダイクロイックミラー50に入射する。

[0057] ダイクロイックミラー50に入射した検出光は、ダイクロイックミラー50を透過して、光検出部13に送られる。光検出部13は、ミラー61、集光レンズ62、スリット板63、光検出器としての光電子増倍管（以下、PMT (Photomultiplier tube) という）64、増幅器65、デジタイザ66を備える。検出光は、ミラー61、集光レンズ62を介してPMT64に入射する。集光レンズ62の焦点位置には、スリット板63が配されている。スリット板63には、第1照射ラインBL1、第2照射ラインBL2に対応した2本のスリットからなるスリット部63aが設けられており、スリットを透過した検出光だけがPMT64に入射する。これにより、レーザ顕微鏡装置10を共焦点式として、対物レンズ54の焦点面からの蛍光成分だけをPMT64に入射させ、コントラストや空間分解能を向上させている。スリット部63aの各スリットの長手方向は、対物レンズ54の焦点面における主走査方向を焦点面とスリット板63との間にある光学系を通して投影した向きである。なお、スリット板63を省略してもよい。

[0058] PMT64は、入射する検出光の光強度に応じた検出信号を出力する。これにより、図6に一例を示すように、試料Gが第1照射ラインBL1と第2照射ラインBL2とを順次に通過することに対応してそれぞれ変化する1個分の試料Gに対する検出信号が得られる。なお、光検出器としては、PMT64に代えてアバランシェフォトダイオード等を用いてもよい。

[0059] PMT64からの検出信号は、増幅器65で増幅されてからデジタイザ66に送られる。デジタイザ66は、検出信号の信号レベルを所定のサンプリ

ング周波数でサンプリングして、検出信号をデジタル変換する。デジタイザ66のサンプリング周波数は、検出光の変調帯域の上限周波数の2倍よりも高くされている。検出光の変調帯域の上限周波数は、最も高いビート周波数より周波数間隔 Δf ($=\Delta f_{ab}$) だけ高いから、この例では上限周波数が200MHzであり、サンプリング周波数を例えば1GHzに設定している。

[0060] デジタイザ66でデジタル化された検出信号は、信号処理部14に送られる。この信号処理部14は、例えばPCで構成されており、検出信号から試料Gの情報、この例では蛍光物質の分布を取得して観察画像を生成する。信号処理部14は、フーリエ変換部14a、逆フーリエ変換部14b、画像処理部14c、速度検出部14d、モニタ14eを有する。

[0061] 信号処理部14は、例えば、検出信号を順次蓄積するメモリを備えており、検出信号が所定の閾値以上になった時点から所定の遡及時間だけ遡った開始点から所定の通過所用時間が経過した終了点までの期間に出力された検出信号を1個分の試料Gに対する検出信号として処理する。遡及時間は、試料Gの副走査方向の移動速度及びその変動を考慮して、試料Gが第1照射ラインBL1に達する前のタイミングに開始点が設定されるように決められている。一方、通過所用時間は、試料Gの副走査方向の移動速度、その変動及び試料Gの大きさを考慮して、開始点での位置から試料Gが第2照射ラインBL2を通過し、かつ次の試料Gが第1照射ラインBL1に達する前のタイミングが終了点となるように決められている。

[0062] 信号処理部14では、1個分の試料Gに対する検出信号が得られると、まずフーリエ変換部14aによって、その検出信号に対して高速フーリエ変換が行われ、周波数スペクトルが求められる。この検出信号から求められた周波数スペクトルに対して、逆フーリエ変換部14bによって、逆フーリエ変換を施す。このときには、干渉光のビート周波数を搬送周波数とした所定の帯域幅 Δf_{wd} ($\leq 2\Delta f$) で周波数スペクトルを分離し、それら分離した各周波数スペクトルに逆フーリエ変換をそれぞれ行ったものに対して絶対値を取る。周波数スペクトルを分離することは、周波数スペクトルを副走査ライ

ンごとに分離することに相当し、個々に分離されるのは副走査ラインに干渉光が照射することで得られる変調された蛍光（光信号）の周波数スペクトルである。なお、逆フーリエ変換の結果の絶対値を取るのは、位相が反転している第1プローブビームの干渉光と第2プローブビームの干渉光に対応した各画素値の正負が逆になるので、これらの画素値の符号を同じ（正）にするためである。

[0063] 上記の逆フーリエ変換により、副走査方向に沿った蛍光物質の分布を示すN本分の二次元画像が算出される。二次元画像は、その長手方向が副走査方向、すなわち試料Gが通過する時間に相当し、画素値が蛍光物質の量を示している。そして、各二次元画像は、1つの照射スポット SP_1 で検出された蛍光物質の分布の画像に、隣接ライン間隔DLに相当する間隔をあけて、当該照射スポット SP_1 と主走査方向の位置が同じ照射スポット SP_2 で検出された蛍光物質の分布の画像が続くものとなっている。試料GについてのN本分の二次元画像は、画像処理部14cに送られる。

[0064] なお、上記高速フーリエ変換と逆フーリエ変換の代わりに短時間フーリエ変換（STFT）を行った画像取得も可能である。この場合、主走査方向のピクセルに相当する時間範囲でのSTFTのスペクトルが副走査方向の蛍光物質の分布に相当し、STFTのスペクトルの時間変化が画像となる。

[0065] また、デジタイザ66は、デジタル変換した検出信号を速度検出部14dにも送る。速度検出部14dは、入力される検出信号に基づいて、試料Gの副走査方向の移動速度VGを検出する。この例では、速度検出部14dは、検出信号の自己相関関数を用いて遅延時間Tdを求め、その遅延時間Tdと、既知の第1照射ラインBL1と第2照射ラインBL2の隣接ライン間隔DLとに基づいて、検出した試料Gの副走査方向の移動速度VG（ $=DL/Td$ ）を算出する。デジタイザ66から入力される検出信号の時間的な波形変化を時間tの関数 $f(t)$ としたときに、下記の式（1）の自己相関関数を計算し、図7に一例を示すような自己相関関数の絶対値（ $|I(T)|$ ）の2次ピーク（ $T=0$ 以外のピーク）となる値Tを遅延時間Tdとしている。

この遅延時間 T_d は、この例では試料 G の副走査方向への移動によって、試料 G が第 1 照射ライン BL_1 の位置に達することで第 1 プローブビームが照射されるタイミングと第 2 照射ライン BL_2 の位置に達することで第 2 プローブビームが照射されるタイミングとのずれの時間を示している。したがって、遅延時間 T_d は、例えば 1 つの試料 G が第 1 照射ライン BL_1 を通過してから第 2 照射ライン BL_2 を通過するまでの時間に相当するものである。上記のように自己相関関数を用いて求められる遅延時間 T_d は、第 1 及び第 2 プローブビームが照射される試料 G の部位を特定しておらず、1 つの試料 G に対する第 1 及び第 2 プローブビームの照射タイミングのずれを示す時間になっている。なお、上記のように生成した一次元画像、または各一次元画像を主走査方向に並べた画像の自己相関関数を計算して遅延時間 T_d を求めることもできる。この場合には、上記のように逆フーリエ変換後に絶対値をとっているため、2 次ピークを求める際に自己相関関数のそのものを用いることができる。

[0066] [数1]

$$I(T) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)f(t-T)dt \quad \dots (1)$$

[0067] なお、検出信号に、変調周波数範囲よりも低いカットオフ周波数のローパスフィルタをかけてエンベロープ波形を求め、そのエンベロープ波形のうち、試料 G が第 1 照射ライン BL_1 を通過している期間内と第 2 照射ライン BL_2 を通過している期間内のそれぞれのピーク値の時間差を遅延時間 T_d としてもよい。また、同様にして、検出信号のエンベロープ波形を求め、そのエンベロープ波形の自己相関関数を計算し、自己相関関数の 2 次ピークとなる値 T を遅延時間 T_d としてもよい。

[0068] 画像処理部 14c は、逆フーリエ変換部 14b から入力される各一次元画像の長手方向が時間軸であるから、その時間軸の値に速度検出部 14d からの移動速度 V_G を乗算する。これにより、各一次元画像の長手方向を移動速

度 V_G で伸縮し、その長手方向の時間を z 軸方向の距離に変換する。

[0069] 次に、画像処理部14cは、各一次元画像を分割位置でそれぞれ分割する。分割位置は、例えば上述の開始点から、移動速度 V_G に遅延時間 T_d を乗じた長さの位置に設定される。これにより、一次元画像は、第1プローブビームの照射によって得られる第1画像と第2プローブビームの照射によって得られる第2画像とに分割される。そして、画像処理部14cは、第1画像の開始点と、第2画像の開始点（分割位置）を一致させて、第1画像と第2画像とを重ね合わせることにより、新たな一次元画像を生成する。この一次元画像の重ね合わせは、画素値同士の加算によって行う。この後、新たな各一次元画像を対応する照射スポット SP_1 、 SP_2 の順番で並べて2次元の観察画像を生成する。このようにして、試料Gの蛍光物質の分布を2次元にマッピングした観察画像を、第1プローブビームを照射して得た画像と第2プローブビームを照射して得た画像とを合成して生成する。試料Gの蛍光物質の分布を2次元にマッピングした観察画像は、モニタ14eに表示される。

[0070] 上記のように、搬送周波数ごとの帯域幅が従来よりも広がっているので、従来よりも高い周波数の変調成分まで利用して蛍光物質の分布を示す観察画像を生成するので、画質の高い観察画像が得られる。また、帯域幅が従来よりも広がっているので、第1、第2プローブビームに対する試料Gの移動速度を高くしても、良好な画質を維持した観察画像を得ることができる。

[0071] さらに、第1プローブビームを照射することで得られる画像と、第2プローブビームの干渉光を照射することで得られる画像とを重ねあわせて観察画像を生成するので、実質的に蛍光の輝度を2倍した高画質な観察画像を得ることができる。しかも、各々の干渉光の光強度を大きくしていないので、蛍光物質の輝度の飽和を招くことがない。また、ランダムノイズの低減にも有利である。

[0072] 上記では、複数のプローブビームとして2本のプローブビームを照射する例について説明したが、後述する第2実施形態のように、3本以上のプローブビームを照射してもよい。

[0073] 上記に説明した各照射ラインBL1、BL2における照射スポットの配列は一例であり、これに限定されるものではない。例えば、図8に示すように、同じ照射ライン内の隣接した照射スポット同士の間隔をあげるとともに、照射ライン間において、照射スポットの位置を主走査方向にずらしてもよい。

[0074] 図8の例では、対物レンズ54の焦点面に、第1照射ラインBL1の照射スポット $SP_{11} \sim SP_{1N}$ と、第2照射ラインBL2の照射スポット $SP_{21} \sim SP_{2N}$ とを、それぞれ照射スポットの直径 D_s の2倍の配列ピッチ P で主走査方向に並べる。また、例えば合波ユニット17内のミラー45、46（図1参照）の z 軸を中心とした傾きを調整することによって、第1照射ラインBL1の照射スポット $SP_{11} \sim SP_{1N}$ に対して第2照射ラインBL2の照射スポット $SP_{21} \sim SP_{2N}$ を直径 D_s （ $= 1/2 \cdot P$ ）だけ主走査方向にずらしてある。これにより、主走査方向について第1プローブビームの各照射スポット SP_1 の間に第2プローブビームの照射スポット SP_2 が1個ずつ配されるように、第1、第2プローブビームを互いに主走査方向にずらして照射する。

[0075] この例では、信号処理部14は、第1照射ラインBL1の各照射スポット SP_1 から得られる一次元画像と、第2照射ラインの各照射スポット SP_2 から得られる一次元画像とを主走査方向に交互にならべることにより、1個の試料Gに対応した1枚の観察画像を得る。

[0076] 上記のような照射スポット SP_1 、 SP_2 の配列とした場合、図5に示す配列ピッチ P を照射スポット SP_1 、 SP_2 の直径 D_s とほぼ同じにした場合に比べて、主走査方向の長さが同じ照射範囲に対する照射スポット SP_1 、 SP_2 の個数が $1/2$ （例えば $N=50$ ）となる。このため、第1及び第2AOD28、35（図1参照）で生成すべき第1、第2回折光の本数がそれぞれ $1/2$ になるので、第1、第2プローブビームを構成する各干渉光の光強度、信号振幅が2倍になり、結果として検出される輝度が2倍になり、鮮明な画像を得ることができる。

- [0077] また、第1、第2 AOD 28、35で生成すべき第1、第2回折光の本数がそれぞれ1/2になることにより、図9に示すように、第1、第2 AOD 28、35に入力するコム信号の周波数間隔 Δf_w を第1実施形態の場合の周波数間隔 Δf の2倍にすることができ、結果としてビート周波数の周波数間隔 $\Delta f_{w_{ab}}$ を第1実施形態の場合の周波数間隔 Δf_{ab} の2倍、すなわち搬送周波数ごとの帯域幅を2倍にすることができ、観察画像の高画質化、あるいは試料Gの移動速度の高速化を図ることができる。さらに、同一の照射ライン内における隣接した照射スポット同士の間隔が広がるため、隣接した照射スポット同士の干渉によるクロストーク信号の発生を抑圧でき、画質の向上に寄与する。
- [0078] さらには、スリット部63aを形成したスリット板63に代えて、図10に示すように、第1、第2照射ラインBL1、BL2の各照射スポットSP₁、SP₂に対応して、ピンホール69をライン状に並べたピンホールアレイ68a、68bを形成したスリット板68を用いることにより、光学分解能の向上を図ることができ、より高画質な観察画像が得られる。
- [0079] 上記では、2本のプローブビームの場合について説明したが、プローブビームは3本以上であってもよい。2本の場合はもちろん3本以上の場合であっても、各プローブビームの照射スポットを所定の配列ピッチで並べるとともに、主走査方向について任意の1本のプローブビームの各照射スポットの間に他の各プローブビームのそれぞれ1個の照射スポットが配されるように、各プローブビームを互いに主走査方向にずらせばよい。M（Mは2以上の整数）本のプローブビームを用いる場合、プローブビームの照射スポットの配列ピッチを照射スポットの直径D_sのM倍とし、各プローブビームを照射スポットの直径D_sずつ順次に主走査方向にずらすことが好ましい。
- [0080] 図11は、主走査方向の照射範囲を分割した複数の小領域にプローブビームをそれぞれ対応させて、小領域ごとに対応するプローブビームを照射する例を示している。この例では、主走査方向について干渉光を照射すべき照射範囲71を、例えば微小流路55の中心を境界にして第1小領域71aと第

2小領域71bとに2分割し、第1小領域71aには第1プローブビームを照射し、第2小領域71bには第2プローブビームを照射する。したがって、第1小領域71aに照射スポット $SP_{11} \sim SP_{1N}$ からなる第1照射ラインBL1が形成され、第2小領域71bに照射スポット $SP_{21} \sim SP_{2N}$ からなる第2照射ラインBL2が形成される。第1プローブビームと第2プローブビームとは、それらが照射される主走査方向における範囲は重ならない。このように、第1プローブビームと第2プローブビームを照射するために、例えば合波ユニット17内のミラー45、46（図1参照）の傾きが調整されている。

[0081] 信号処理部14では、第1プローブビームの照射によって得られる複数の一次元画像からなる第1画像と、第2プローブビームの照射によって得られる複数の一次元画像からなる第2画像とを主走査方向に並べることによって1個の試料Gに対応した観察画像を得る。

[0082] この例によれば、図8の例の場合と同様に、第1、第2AOD28、35で生成すべき第1、第2回折光の本数がそれぞれ1/2になるので、検出される輝度が2倍になり鮮明な画像を得ることができる。また、搬送周波数ごとの帯域幅を2倍にすることができ、観察画像の高画質化、あるいは試料Gの移動速度の高速化を図ることができる。さらに、一定の帯域幅を確保しながら1つのAODで生成できる干渉光の本数、すなわちプローブビームを照射することができる範囲は、AODの動作帯域に制約されるが、上記のように干渉光を照射すべき照射範囲を主走査方向に分割して、分割された照射範囲を別のプローブビームで照射すれば、実質的に主走査の範囲を広くすることができる。

[0083] なお、第1プローブビームの各干渉光のうち第2小領域71b側の端部に照射される干渉光による検出信号成分と、第2プローブビームの各干渉光のうち第1小領域71a側の端部に照射される干渉光による検出信号成分とを用いて遅延時間Tdを求めることが好ましい。このようにすれば、互いに近い位置に干渉光を照射することで得られる検出信号成分であるから遅延時間

Tdの精度を高くすることができる。具体的には、検出信号の第1プローブビームが照射されている前半の期間では、第1プローブビームの第2小領域71b側の端部に照射される干渉光のビート周波数成分をバンドパスフィルタで抽出し、第2プローブビームが照射されている後半の期間では、第2プローブビームの第1小領域71a側の端部に照射される干渉光のビート周波数成分をバンドパスフィルタで抽出した信号を、遅延時間Tdを求めるための検出信号とすればよい。また、主走査方向について干渉光を照射すべき照射範囲を3以上の小領域に分割して、小領域ごとにプローブビームを照射してもよい。

[0084] 上記第1実施形態では、干渉光を生成する際に、第1、第2AOD28、35を用いて、それぞれ複数本の第1、第2回折光を生成し、これらを重ね合わせているが、特許文献1のように、複数本の回折光に幅広にした1本のレーザ光を重ね合わせることで、複数本の干渉光を生成してもよい。また、試料Gの移動速度VGを算出して、その移動速度VGで観察画像を補正する構成は、必要に応じて設ければよく、例えば副走査方向に試料Gの像が伸縮しても問題ないような解析手法に観察画像を利用する場合、移動速度VGで観察画像を補正する構成を省略することができる。

[0085] [第2実施形態]

第2実施形態のレーザ顕微鏡装置は、4本のプローブビームを照射する構成である。なお、第2実施形態のレーザ顕微鏡装置は、以下に説明する他は、第1実施形態の図1の例と同様であり、実質的に同じ構成部材には同一の符号を付してその詳細な説明を省略する。

[0086] 図12に第2実施形態のレーザ顕微鏡装置80を示す。このレーザ顕微鏡装置80では、偏光ビームスプリッタ47から射出される第1、第2プローブビーム（以下では、新たに生成されるプローブビームと区別するため、第1ビーム、第2ビームという）が1/2波長板81とウォラストンプリズム82とを介してアナモルフィックプリズムペア49に入射するように構成されている。1/2波長板81は、光学軸が垂直方向に対して22.5度傾け

られており、垂直偏光である第1ビームを -45 度直線偏光に変換し、水平偏光である第2ビームを $+45$ 度直線偏光に変換する。

[0087] ウォラストンプリズム82は、周知のように、直交する偏光面を有する光を異なる方向に偏向して分離するものである。この例では、ウォラストンプリズム82は、垂直偏光と水平偏光とを分離するように配されている。このウォラストンプリズム82に1/2波長板81からの第1、第2ビームが入射することにより、第1、第2ビームは、それぞれ垂直偏光成分と水平偏光成分とに分離され、互いにz軸方向に角度を持った第1～第4プローブビームとして射出される。光検出部13の集光レンズ62の焦点位置には、4本のスリットがz軸方向に並べられたスリット部84aを有するスリット板84が配されている。

[0088] 第1～第4プローブビームは、互いにz軸方向に角度を持って射出されるため、対物レンズ54の微小流路55内の焦点面には、図13に示すように、上流側から順番に第1～第4プローブビームの第1～第4照射ラインBL1～BL4が副走査方向に離れて形成される。第1照射ラインBL1は、第1プローブビームの各干渉光のN個の照射スポット SP_{11} ～ SP_{1N} が主走査方向にライン状に配列され、第2照射ラインBL2は、第2プローブビームの各干渉光のN個の照射スポット SP_{21} ～ SP_{2N} が主走査方向にライン状に配列されている。第3照射ラインBL3は、第3プローブビームの各干渉光のN個の照射スポット SP_{31} ～ SP_{3N} が主走査方向にライン状に配列され、第4照射ラインBL4は、第4プローブビームの各干渉光のN個の照射スポット SP_{41} ～ SP_{4N} が主走査方向にライン状に配列されている。第1～第4照射ラインBL1～BL4の各照射スポットは、主走査方向の位置が同じであれば、照射スポットを形成する干渉光のビート周波数も同じである。

[0089] なお、第1～第4照射ラインBL1～BL4の隣接した照射ライン間の各隣接ライン間隔 DL_1 ～ DL_3 は、いずれも試料Gの副走査方向の最大の長さWGよりも大きくなるように調整されている。これにより、同一の試料Gに同時に複数のプローブビームが照射されないようにしている。また、微小流

路55の最も上流側に配された第1照射ラインBL1と最も下流側に配された第4照射ラインBL4との距離 L_s を、微小流路55内を流れる試料Gの最小間隔 S_G よりも短くすることによって、異なる試料Gに同時にプローブビームが照射されないようにしている。

[0090] 試料Gが第1～第4照射ラインBL1～BL4のうちの任意の2つの照射ラインを通過している各期間の検出信号を用いて遅延時間 T_d を求めて、試料Gの移動速度 V_G を算出することができる。また、各一次元画像は、照射スポット $SP_1 \sim SP_4$ で検出された蛍光物質の分布の画像が所定の間隔をあけて繋がったものであるから、画像処理部14cは、一次元画像を4分割して重ね合わせることによって、新たな一次元画像を作成し、それらから観察画像を生成する。新たな一次元画像を作成する場合には、試料Gが第1照射ラインBL1を通過するタイミングを基準にして、第2～第4照射ラインBL2～BL4を通過するまでの遅延時間をそれぞれ求め、それら遅延時間に対応する3つの位置で一次元画像を4分割して重ね合わせればよい。なお、各遅延時間は、上述の自己相関関数 $I(T)$ の2次～4次ピークとなる値 T として求めることができる。

[0091] 上記構成によれば、搬送周波数ごとの帯域幅が従来よりも広がっているので、観察画像の画質の向上や、良好な画質を維持した観察画像の取得に有利であるとともに、実質的の蛍光の輝度を向上した高画質な観察画像を得ることができる。しかも、各々の干渉光の光強度を大きくしていないので、蛍光物質の輝度の飽和を招くことがない。さらには、ランダムノイズの低減にも有利である。

[0092] [第3実施形態]

ビーム生成部を簡易な構成とした第3実施形態について説明する。なお、第3実施形態のレーザ顕微鏡装置は、以下に説明する他は、第1実施形態と同じであり、実質的に同じ構成部材には同一の符号を付してその詳細な説明を省略する。また、この第3実施形態のレーザ顕微鏡装置は、ビーム照射部、光検出部の構成は第1実施形態と同じであるから、図14ではビーム生成

部だけを描いてある。

[0093] 図14に示すように、ビーム生成部11は、レーザ光源としてのレーザ装置15、回折光生成ユニット86、干渉光生成ユニット87、リレー光学系18等で構成される。回折光生成ユニット86は、1/2波長板21、偏光ビームスプリッタ22、第1及び第2アーム86a、86b、偏光ビームスプリッタ86cを有する。第1アーム86aは、ミラー26、アナモルフィックプリズムペア27、第1AOD28を備え、複数の第1回折光を生成する。第2アーム86bは、ミラー32、AOF S33、アナモルフィックプリズムペア34、第2AOD35を備え、複数の第2回折光を生成する。

[0094] レーザ装置15からのレーザ光は、1/2波長板21を介して偏光ビームスプリッタ22に入射する。偏光ビームスプリッタ22は、レーザ光の垂直偏光成分を第1レーザ光として第1アーム86aに反射し、水平偏光成分を第2レーザ光として第2アーム86bに透過する。第1アーム86aでは、第1レーザ光がミラー26、アナモルフィックプリズムペア27を介して第1AOD28に入射することで、複数の第1回折光が生成される。また、第2アーム86bでは、第2レーザ光がミラー32、AOF S33、アナモルフィックプリズムペア34を介して第2AOD35に入射することで、複数の第2回折光が生成される。第1回折光は、垂直偏光であり、第2回折光は水平偏光である。

[0095] 重ね合わせ部としての偏光ビームスプリッタ86cは、第1アーム86aからの複数の第1回折光を反射し、第2アーム86bからの複数の第2回折光を透過することにより、第1回折光と第2回折光とを互いに光周波数が異なる同士で組み合わせて重ねる。この偏光ビームスプリッタ86cによって、重ねられる第1回折光と第2回折光の組み合わせは、第1実施形態の無偏光ハーフビームスプリッタ25（図1参照）によるものと同じであるが、第1回折光と第2回折光とは、偏光方向が互いに直交しているため、偏光ビームスプリッタ86cで重ねられても干渉しない。したがって、偏光ビームスプリッタ86cからは、空間的に重なった第1回折光と第2回折光とが射出

される。

[0096] 干渉光生成ユニット87は、1/2波長板87aと、ウォラストンプリズム87bとを有している。偏光ビームスプリッタ86cからの複数の第1回折光と複数の第2回折光は、1/2波長板87aを介して、ウォラストンプリズム82bに入射する。1/2波長板82aは、光学軸が垂直方向に対して22.5度傾けられており、垂直偏光の第1回折光を-45度の直線偏光に変換し、水平偏光の第2回折光を+45度の直線偏光に変換する。

[0097] ウォラストンプリズム87bは、垂直偏光と水平偏光とを分離するように配されている。このウォラストンプリズム87bに1/2波長板87aからの第1回折光と第2回折光とが入射することにより、第1回折光及び第2回折光は、それぞれ垂直偏光成分と水平偏光成分とに分離され、第1回折光と第2回折光の各垂直偏光成分とが互いに同方向に、また第1回折光と第2回折光の各水平偏光成分とが互いに同方向に射出される。これにより、空間的に重なっている第1回折光と第2回折光の各垂直偏光成分が重なり合うことで干渉光が生成され、また第1回折光と第2回折光の各水平偏光成分が重なり合うことで干渉光が生成される。結果として、複数の第1回折光と複数の第2回折光とから、例えば垂直偏光の複数の干渉光からなる第1プローブビームと、水平偏光の複数の干渉光からなる第2プローブビームとが生成される。第1及び第2プローブビームは、アナモルフィックプリズムペア49、リレー光学系18を介してビーム照射部に送られる。

[0098] 上記のような構成であっても、第1実施形態と同じ効果を得ることができる。

[0099] [第4実施形態]

第4実施形態は、静止した試料に対してプローブビームの照射位置を副走査方向に移動することによって副走査を行う構成としたものである。なお、第4実施形態のレーザ顕微鏡装置は、以下に説明する他は、第1実施形態と同じであり、実質的に同じ構成部材には同一の符号を付してその詳細な説明を省略する。また、この第4実施形態のレーザ顕微鏡装置は、ビーム照射部

以外の構成は第1実施形態と同じであるから、図15ではビーム照射部だけを描いてある。

[0100] 図15に示すように、ビーム照射部90は、走査ミラー91aを備えた副走査部としてのレゾナントスキャナ91、ミラー92、リレー光学系53、マスク板93、対物レンズ54、試料Gを載置するステージ（図示省略）等で構成されている。ダイクロイックミラー50からの第1、第2プローブビームは、走査ミラー91a、ミラー92、リレー光学系53を介して対物レンズ54に入射し、試料Gに照射される。

[0101] レゾナントスキャナ91は、光偏向器であり、干渉光の入射方向と直交する水平方向（x軸方向）に平行な回転軸91bを中心に走査ミラー91aを揺動させることによって、第1、第2プローブビームを副走査方向に周期的に偏向して等角度走査する。この例においては、主走査方向は、z軸方向であり、副走査方向はy軸方向である。なお、レゾナントスキャナ91の代わりに、ガルバノミラーやポリゴンミラーなどの他の光偏向器を用いてもよい。

[0102] マスク板93は、アパーチャ93aが形成されており、リレー光学系53の間の各レンズ53a、53bの焦点位置に配されている。図16に示すように、マスク板93のアパーチャ93aは、観測視野範囲、すなわち第1、第2プローブビームPB1、PB2を照射すべき範囲に設けられている。これにより、マスク板93により第1、第2プローブビームが照射される副走査方向の範囲を制限し、観測視野範囲外に第1、第2プローブビームPB1、PB2が照射されることを阻止して、検出対象の試料G以外からの不要な光信号の混入を防止している。なお、観測視野範囲外に不要な光信号を発生させるものがない場合には、マスク板93を省略してもよい。

[0103] 上記構成によれば、静止した試料Gに対して、第1実施形態と同様な効果を得ることができる。また、上記構成は、同じ試料Gから複数の観察画像を得る場合にも利用でき、プローブビームが1本の場合と比べて実質的にフレームレートが2倍になるので有利である。

[0104] なお、プローブビーム照射位置を副走査方向に移動する構成は、他の実施形態におけるビーム生成部、光検出部と組み合わせて利用することができる。

[0105] [第5実施形態]

第5実施形態は、複数のプローブビームの照射位置情報を用いて、検出信号から得られる取得画像をデコンボリューションすることにより観察画像を生成するものである。なお、第5実施形態のレーザ顕微鏡装置は、以下に説明する他は、第1実施形態と同じであり、実質的に同じ構成部材には同一の符号を付してその詳細な説明を省略する。また、この例では、試料が一定の速度で副走査方向に移動するものとする。

[0106] 図17にレーザ顕微鏡装置97の構成を示す。なお、ビーム生成部98の合波ユニット99の無偏光ハーフビームスプリッタ25から射出される第1、第2プローブビームを、以下では、新たに生成されるプローブビームと区別するため、第1ビーム、第2ビームという。第1ビーム、第2ビームは、いずれも水平偏光であるが、ビート周波数が同じ干渉光は、互いにビートの位相が半周期(π)ずれている。

[0107] 合波ユニット99は、第1ビームの通る光路上の1/2波長板44と偏光ビームスプリッタ47との間に、アナモルフィックプリズムペア101、102と、第3AOD103とを配してある。また、第2ビームの通る光路上の無偏光ハーフビームスプリッタ25と偏光ビームスプリッタ47との間にアナモルフィックプリズムペア104、105と、第4AOD106とを配してある。さらに、偏光ビームスプリッタ47とリレー光学系18との間にアナモルフィックプリズムペア107を配してある。

[0108] コム信号発生部41は、第3、第4コム信号を生成する。この例では、第3、第4コム信号は、それぞれ互いに周波数が異なる3つの駆動信号を重ね合わせたものである。第3AOD103は、第3コム信号で駆動され、第1ビームを回折させることによって第1～第3プローブビームを生成する。また、第4AOD104は、第4コム信号で駆動され、第2ビームを回折させ

ることによって第4～第6プローブビームを生成する。第3、第4 A O D 1 0 3、1 0 6の回折方向は、いずれもz軸方向である。

[0109] 第1～第6プローブビームは、それぞれN本の干渉光からなる。また、第1～第6プローブビームのN本の干渉光のビート周波数は、元になった第1または第2ビームの干渉光と同じビート周波数になっている。第1ビームの各干渉光と第2ビームの各干渉光は、同じビート周波数同士では互いに位相が半周期ずれているので、第1～第3プローブビームの各干渉光と、第4～第6プローブビームの各干渉光との間においても、同じビート周波数同士では互いにビートの位相が半周期ずれている。

[0110] なお、アナモルフィックプリズムペア1 0 1、1 0 4は、いずれもアナモルフィックプリズムペア2 7、3 4によって楕円形となっている第1、第2ビームのビーム形状を、その長軸方向に縮めることによって円形とする。一方、アナモルフィックプリズムペア1 0 2、1 0 5は、第1、第2ビームのビーム形状をz軸方向に引き延ばすことにより円形から楕円形に変形させることによって、第3、第4 A O D 1 0 3、1 0 6から射出される第1～第3、第4～第6プローブビームのビーム形状の広がりを抑え、分解能の低下を防止する。

[0111] 偏光ビームスプリッタ4 7は、垂直偏光の第1～第3プローブビームをx軸方向に反射し、水平偏光の第4～第6プローブビームをx軸方向に透過する。これにより、第1～第3プローブビームと第4～第6プローブビームとを合波する。偏光ビームスプリッタ4 7からの第1～第6プローブビームは、アナモルフィックプリズムペア1 0 7、リレー光学系1 8、ダイクロイックミラー5 0を介してビーム照射部1 2に送られる。アナモルフィックプリズムペア1 0 7は、第1～第6プローブビームの各干渉光のビーム形状をy軸方向に引き延ばすことによって円形にする。また、この例では、第3 A O D 1 0 3、第4 A O D 1 0 6によって、副走査方向における第1～第6プローブビームの照射位置を調整している。光検出部1 3の集光レンズ6 2の焦点位置には、後述する第1～第6照射ラインB L 1～B L 6（図1 8参照）

に対応した6本のスリットがz軸方向に並べられたスリット部109aを有するスリット板109が配されている。

[0112] 図18に一例を示すように、第3コム信号は、100MHz、140MHz、180MHzの3種類の駆動信号を重ね合わせたものになっている。一方、第4コム信号は、110MHz、160MHz、170MHzの3種類の駆動信号を重ね合わせたものになっている。これにより、微小流路55内には、その上流側（左側）から順番に第1プローブビームの第1照射ラインBL1、第4プローブビームの第4照射ラインBL4、第2プローブビームの第2照射ラインBL2、第5プローブビームの第5照射ラインBL5、第6プローブビームの第6照射ラインBL6、第3プローブビームの第3照射ラインBL3が同時に形成される。PMT64は、第1～第6プローブビームが照射されることによって放出される蛍光を同時に検出する。なお、この例においても、照射スポットの主走査方向の位置が同じであれば、対応する各干渉光のビート周波数は同じである。

[0113] 上記のように第1～第6照射ラインBL1～BL6を形成することにより、第1～第6プローブビームを符号化して試料Gに照射する。この例においては、試料Gが移動する方向に等間隔に「1、-1、0、0、1、0、-1、-1、1」の符号パターンで符号化している。符号（1、-1、0）とその符号の位置、すなわちz軸方向における各プローブビームの照射位置を示す符号パターンは、照射位置情報になっている。

[0114] 符号パターンのうち「1」及び「-1」がプローブビームを照射することを意味し、「1」は、第1～第3プローブビームに対応し、「-1」は、第2～第6プローブビームに対応する。符号パターンの符号の間隔は、第3、第4コム信号の駆動信号の周波数の間隔に対応しており、「1」及び「-1」に対応させて、第3、第4コム信号の各駆動信号の周波数を上記のように設定している。

[0115] 符号パターンにおいて、第1～第3プローブビームと第4～第6プローブビームとの符号の正負が異なるのは、第1～第3プローブビームの干渉光に

対して第4～第6プローブビームの対応する干渉光のビートの位相が半周期ずれていることを意味している。そして、信号処理部14のフーリエ変換、逆フーリエ変換によって仮想的に第4～第6プローブビームの各干渉光から得られる画像 I_m2 の画素値が第1～第3プローブビームの各干渉光から得られる画像 I_m1 の画素値に対して正負が反転することを意味する。

[0116] ビートの位相が半周期ずれている干渉光同士では、一方の干渉によって光強度が大きくなっているときに、他方の光強度が小さくなる。そして、それらにより励起される蛍光も同様であるので、検出光が過剰に大きくなることなく、PMT64が飽和しづらくなる。これにより、PMT64のダイナミックレンジを大きくしたのと同等の効果が得られる。

[0117] 図17において、信号処理部14は、試料Gが第1～第6照射ラインBL1～BL6を通過することにより得られる検出信号から観察画像 I_m （図18参照）を生成する。フーリエ変換部14aは、試料Gが第1～第6照射ラインBL1～BL6を通過することにより得られる検出信号に対して、フーリエ変換部14aがフーリエ変換を行い、逆フーリエ変換部14bは、そのフーリエ変換で得られる各周波数スペクトルにそれぞれ逆フーリエ変換を行うことで、N本の一次元画像を生成する。そして、画像処理部14cは、N本の一次元画像を主走査方向に並べた画像（以下、取得画像という）をデコンボリューションすることによって観察画像 I_m を生成する。

[0118] ところで、第1～第6プローブビームが照射されることによって試料Gから放出される蛍光をPMT64が同時に検出するので、取得画像は、第1～第6照射ラインBL1～BL6の副走査方向への位置のずれに対応して、試料Gに対応した6個の像（蛍光の分布を示す像）を副走査方向にずらして多重に形成したものとなる。すなわち、第1～第3プローブビームの照射によって得られる画像 I_m1 と、第4～第6プローブビームの照射によって得られる画像 I_m2 とを重ね合わせた取得画像が生成される。画像 I_m1 、 I_m2 は、いずれも試料Gの3個に対応する像が副走査方向にずれて多重に形成されている。また、上記のように第1～第3プローブビームの各干渉光の位

相と第4～第6プローブビームの各干渉光の位相とが半波長ずれているから、画像1m2の画素値の正負は、画像1m1の画素値とは逆であるから、画像1m1の画素値に対して、画像1m2の画素値の大きさ（絶対値）を減算した各画素値を有する取得画像が生成される。

[0119] 上記取得画像は、1つのプローブビームの照射で取得される試料Gの画像（以下、原画像という）と上述するとともに図19に示す符号パターンとの畳み込み（コンボリューション）の結果とみなすことができる。したがって、取得画像を $f(z, y)$ 、原画像を $f_0(z, y)$ とすると、符号デルタ関数 $c(z)$ を用いて、次の式（2）のように表すことができる。なお、式（2）中の「*」は、コンボリューションの演算子とする。

[0120] [数2]

$$f(z, y) = f_0(z, y) * c(z) \dots (2)$$

[0121] 上記式中の値 z は、試料Gが移動する副走査方向の位置（ z 座標）であり、値 y は、主走査方向の位置（ y 座標）であって、主走査方向における各干渉光の照射位置に対応する。また、符号デルタ関数 $c(z)$ は、符号パターンに応じたデルタ関数の和であり、デルタ関数を δ 、符号パターンの符号の個数を k （この例では $k=9$ ）とし、 n 番目の符号（1、-1または0）を a_n 、符号と符号の副走査方向の間隔を Δz としたときに、次の式（3）のように表すことができる。

[0122] [数3]

$$c(z) = \sum_{n=1}^k a_n \delta(z - n\Delta z) \dots (3)$$

[0123] 上記式（2）をフーリエ変換すると、次の式（4）のように表すことができる。なお、 $f(z, y)$ 、 $f_0(z, y)$ 、 $c(z)$ をフーリエ変換した関数を $F(z, y)$ 、 $F_0(z, y)$ 、 $C(z)$ とする。式（4）中において、

$F_0(z, y)$ は、取得画像をフーリエ変換することにより得られ、 $C(z)$ は、符号デルタ関数 $c(z)$ をフーリエ変換したものとして予め用意しておくことができる。したがって、次の式 (5) に示されるように、取得画像をフーリエ変換した $F_0(z, y)$ が得られることがわかる。

[0124] [数4]

$$F(z, y) = F_0(z, y) C(z) \quad \dots (4)$$

$$F_0(z, y) = F(z, y) / C(z) \quad \dots (5)$$

[0125] 画像処理部 14c は、取得画像 $f(z, y)$ をフーリエ変換し、そのフーリエ変換した取得画像 $F(z, y)$ と既知の $C(z)$ を用いて $F_0(z, y)$ を求め、得られる $F_0(z, y)$ を逆フーリエ変換する。このようにして、原画像、すなわち観察画像 I_m を得る。

[0126] 上記構成によれば、上記他の実施形態と同様に、複数のプローブビームを照射することにより、蛍光物質の輝度の飽和を招くことなく、実質的の蛍光の輝度を向上した高画質な観察画像を得ることができる。試料 G の大きさが未知で複数のプローブビームが同時に試料 G を照射する可能性が排除できない場合にも、上記のような演算により安定的に観察画像 I_m を取得できるため有効である。また、ランダムノイズの低減にも有利である。また、この例では、上記の他の実施形態と異なり、複数のプローブビームの間隔を試料 G の大きさよりも必ずしも大きくする必要が無く、またある試料 G からの検出信号と次の試料 G の検出信号との重なりも許容される。さらに、第 5 実施形態の特殊な場合として、例えば第 1 実施形態のように 2 つのプローブビームを照射する場合も含まれ、信号取得後の演算処理を上記のごとく変更することでプローブビーム間の距離の制約を排除することが可能である。

[0127] 上記の例では、6 本のプローブビームを試料 G に照射するが、プローブビームの本数はこれに限るものではなく、2 本以上であれば実質的に同等の効果が得られる。また、それぞれのプローブビームの強度を等しくする必要は

ない。この場合は、符号 1、-1 に代えてそれぞれのプローブビームの相対強度に正負を付したものをを用いて $c(z)$ を定義し、デコンボリューションの演算を行えばよい。試料 G の蛍光体の応答が遅い場合などに、干渉光のビートによる信号光として放出される蛍光の変調に位相遅れが発生する場合がある。この場合は位相遅れ ϕ を符号にも反映させればよく、1、-1 に代えて例えば $\exp(i\phi)$ 、 $-\exp(i\phi)$ と置き換えればよい。この場合に、プローブビームの強度が一定でないときには、これら符号 ($\exp(i\phi)$ 、 $-\exp(i\phi)$) にさらにプローブビームの相対強度を掛けて $c(z)$ を定義すればよい。

[0128] 上記の例では、いわゆる逆フィルタを用いてデコンボリューションする例について説明したが、デコンボリューションは、それに限られるものではない。例えば、次の式 (6) を用いたウィナー (Wiener) フィルタを用いてデコンボリューションを行ってもよい。また、他の一般的なデコンボリューション手法、例えばリチャードソン・ルーシー (Richardson-Lucy) アルゴリズム等を用いてもよい。なお、式 (6) 中の「*」は複素共役を意味する。また、値 Γ は、所定の定数である。

[0129] [数5]

$$F_0(z,y) = F(z,y) \frac{C^*(z,y)}{|C(z,y)|^2 + \Gamma} \dots (6)$$

[0130] また、上記演算の変わりに行列演算により観察画像を構築しても良い。これは、原画像を X、上記のデコンボリューションを実施する前の取得画像を Y として行列で表現すると、ある行列 A を用いて「 $Y = AX$ 」と表されることを利用したものである。行列 A の擬似逆行列を B とすると、Y から所望の原画像 (観察画像) X が「 $X = BY$ 」として得られるというものである。この方法の詳細については、文献「Ramesh Raskar, Amit Agrawal, and Jack Tumblin, "Coded exposure photography: motion deblurring using fluttere

d shutter,” ACM Transactions on Graphics (TOG) – Proceedings of ACM SIGGRAPH 2006 Volume 25 Issue 3, July 2006 Pages 795–804.」に詳しく記載されている。

[0131] 上記の例では、正負両方の符号を含む符号パターンを用いているが、いずれか一方（正または負）だけの符号パターンを用いてもよい。また、上記の符号パターンは、符号「0」を含めて各符号を等間隔に配しているが等間隔でなくてもよく、各プローブビームの照射位置が離散的になるように符号パターンを決めればよい。各プローブビームの照射位置が離散的であるとは、異なるプローブビームが副走査方向に隣接または離れている状態である。より具体的には、異なるプローブビームの干渉光の照射スポットが互いに重ならないようにすることであり、照射スポットが隣接または離れた状態（照射スポットの中心間隔がスポット径（直径）以上）であればよい。したがって、異なるプローブビームの干渉光の照射スポットが接していてもよい。照射スポットのスポット径は、例えばレーザ顕微鏡装置97の感度や精度等を考慮して、例えば照度が照射スポットの中心部の e の2乗分の1に低下する直径、半値全幅、あるいはエアリーディスクの直径等と定義することができる。

[0132] 上記第1～第5実施形態では、プローブビームを照射することにより試料Gがプローブビームの照射側に放出される蛍光を検出光として検出しているが、対物レンズとは反対側に放出される試料Gからの蛍光を検出するようにレーザ顕微鏡装置を構成してもよい。また、プローブビームを試料Gに照射したときに、試料Gで反射した反射光や後方散乱した光、試料Gを透過した透過光を検出光として検出して観察画像を取得してもよい。

[0133] [第6実施形態]

次に、周波数成分を光周波数成分とした第6実施形態について説明する。以下では、2本のプローブビームを照射する構成について説明するが、3本以上のプローブビームを照射する構成としてもよい。

[0134] 図20に示すように、第6実施形態のイメージング装置130は、ビーム

生成部131と、ビーム照射部としての第1対物レンズ132と、光検出部133、信号処理部134とを備えている。ビーム生成部131は、光源としてのレーザ装置141、シングルモードの光ファイバ142、第1回折格子143、ミラー144、1/2波長板145、第1ウォラストンプリズム146とを備える。また、光検出部133は、第2対物レンズ151、第2ウォラストンプリズム152、第2回折格子153、集光レンズ154、光検出器155、増幅器156、デジタイザ157を備えている。

[0135] レーザ装置141は、広帯域なレーザ光を一定の間隔で繰返し出力する、例えばチタンサファイア ($\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$) フェムト秒パルスレーザーが用いられている。レーザ装置141としては、光通信に一般的に用いられるものであってもよい。この例では、レーザ装置141は、水平偏光のレーザ光を出力する。

[0136] レーザ装置141からのレーザ光は、光ファイバ142の一端に入射する。光ファイバ142内では、光の伝搬速度が光周波数(波長)によって異なるため、レーザ光が透過する過程で、そのレーザ光に群速度分散が生じる。このため、レーザ光は、光ファイバ142内を進むほど各波長成分の遅延の時間の差が大きくなってパルス幅がその進行方向に大きく広がり、各周波数成分が時間軸上で分離(レーザ光の分光スペクトルを時間領域にマッピング)した状態で光ファイバ142の他端から射出される。すなわち、レーザ光は、レーザ光の進行方向に沿って、この例における周波数成分である各光周波数成分が光周波数に応じて分散した状態に変換される。

[0137] 光ファイバ142からのレーザ光は、第1回折格子143に入射する。レーザ光は、波長成分ごとに第1回折格子143での回折角が異なるため、第1回折格子143に入射したレーザ光は、空間的に1次元に広がったビームとなり、各光周波数成分が1次元に空間的に分散した状態にされる。このときのビームの広がる方向、すなわちレーザ光の各光周波数成分が分散する方向は、レーザ光の進行方向と直交する方向に対して傾いている。

[0138] 第1回折格子143で回折されたレーザ光は、ミラー144、1/2波長

板145を介して、第1ウォラストンプリズム146に入射する。1/2波長板145は、水平偏光のレーザ光を45度直線偏光に変換する。第1ウォラストンプリズム146は、1/2波長板145からのレーザ光が入射することにより、そのレーザ光を垂直偏光成分と水平偏光成分とに分離し、例えば垂直偏光成分を第1プローブビームとして、また水平偏光成分を第2プローブビームとして射出する。このときに、第1プローブビームと第2プローブビームとは、z軸方向に互いに角度を持って第1ウォラストンプリズム146からx軸方向に射出される。このようにして、レーザ光の各光周波数成分が空間的に1次元に分散された第1プローブビームと第2プローブビームとが生成される。第1、第2プローブビームは、パルス状であり、レーザ装置141からのレーザ光が出力されるごとに生成される。

[0139] 第1、第2プローブビームは、第1対物レンズ132で集光されて、微小流路165a内の試料Gに向けて照射される。微小流路165aは、第1実施形態と同様にフローサイトメータを構成する流路デバイス56のフローセルに形成されており、微小流路165a内には流体とともに複数の試料Gが順次に副走査方向に流される。したがって、この例では、流路デバイス165が副走査部となる。

[0140] 第1対物レンズ132に入射する第1、第2プローブビームは、上記のように1次元に空間的に分散されている。このため、図21に示すように、第1、第2プローブビームは、微小流路165a内の第1対物レンズ132の焦点面に、主走査方向(M方向)に沿ったライン状の第1、第2照射ラインBLa、BLbを形成する。ここで、第1、第2プローブビームは、それらの元となったレーザ光と同じく、各光周波数成分の分散する方向がレーザ光の進行方向と直交する方向に傾いている。このため、第1、第2照射ラインBLa、BLbは、それぞれ一端側から他端側に向かって光周波数成分が高くなるとともに、光周波数成分に応じて照射タイミングがずれる。例えば光周波数が高くなるほど照射タイミングが遅くなる。

[0141] また、第1ウォラストンプリズム146から射出される第1、第2プローブ

プローブビームは、z軸方向に互いに角度を持っているので、第1、第2照射ラインBL a、BL bは、副走査方向に互いに離れる。第1照射ラインBL aと第2照射ラインBL bとの隣接ライン間隔DLは、試料Gの副走査方向の最大の長さWGよりも大きくなるように調整されている。また、微小流路165 aの最も上流側に配された照射ラインと最も下流側に配された照射ラインとの距離（この第6実施形態では隣接ライン間隔DLに等しい）が、微小流路165 a内を流れる試料Gの最小間隔SGよりも短くしてある。これにより、同じ試料G及び、異なる試料Gに同時に第1、第2プローブビームが照射されないようにしている。

[0142] 第1照射ラインBL aに位置する試料Gの部分に第1プローブビームが照射され、試料Gが微小流路165 a内を流れることによって、第1プローブビームが照射される部分が副走査方向にずれる。試料Gは、第1照射ラインBL aを通過した後に、第2照射ラインBL bに達し第2プローブビームが照射される。この場合にも、試料Gが微小流路165 a内を流れることによって、第2プローブビームが照射される部分が副走査方向にずれる。

[0143] 微小流路55を挟んで第1対物レンズ132の反対側に、第2対物レンズ151が配されている。第2対物レンズ151は、第1対物レンズ132と同じ対物レンズであり、焦点位置が第1対物レンズ132の焦点位置と一致するように配されており、微小流路55からの第1、第2プローブビームを集光する。

[0144] 上記のように第1対物レンズ132から照射される第1、第2プローブビームは、微小流路165 a中の流体や試料Gを透過する。このときに、試料Gに照射された第1、第2プローブビームは、試料Gの構造等に応じて散乱、回折、吸収されるため、その光強度が減衰する。これにより、試料Gの構造等に応じて強度変調された第1、第2プローブビームが透過する。この透過する第1、第2プローブビームが、この例では信号光となる。

[0145] これら第1、第2プローブビームは、光周波数成分が空間的にマッピングされている。したがって、試料Gを透過した第1、第2プローブビームの各

光周波数成分の光強度は、光周波数成分が照射された位置、すなわち試料Gの主走査方向の各位置の構造等に対応したものとなる。なお、微小流路165a中の流体や微小流路165aを形成するフローセルを透過する際にも、第1、第2プローブビームの光強度は減衰するが、説明を簡単にするため、第1、第2プローブビームは、試料Gだけによって光強度が減衰するものとする。

[0146] 第2対物レンズ151で集光された第1、第2プローブビームは、第2ウォラストンプリズム152に入射し、この第2ウォラストンプリズム152によって合波されて検出ビームとして射出される。第1、第2プローブビームは、互いに直交する直線偏光なので合波しても干渉することはない。第2ウォラストンプリズム152からの検出ビームは、第2回折格子153に入射し、空間的な分散が小さくされる。この第2回折格子153からの検出ビームが集光レンズ154を介して光検出器155に入射する。このとき、例えば光周波数の低い光周波数成分から順番に光検出器155に入射する。そして、この光検出器155から入射する検出ビームの光強度に応じた検出信号が出力される。

[0147] 光検出器155からの検出信号は、増幅器156、デジタイザ157を介してデジタル変換される。信号処理部134は、例えばPCで構成されており、検出信号から試料Gの観察画像を生成する。信号処理部134は、画像処理部134a、モニタ134bを備えている。画像処理部134aは、デジタイザ157から得られる検出信号から、主走査方向における第1、第2プローブビームの光強度分布を示す1次元画像を生成する。この1次元画像の生成は、第1、第2プローブビームの照射ごとに行われる。なお、この例においては、1次元画像は、例えばプローブビームの減衰あるいは透過の大きさの主走査方向の分布を示すものである。

[0148] 光検出器155で検出される第1プローブビームは、光周波数が主走査方向における位置に対応し、しかも光周波数の高低で光検出器155への入射タイミングに時間差が生じるので、主走査方向における位置と時間とが対応

している。光検出器 155 で検出される第 2 プロブビームについても同様である。したがって、検出信号の波形は、第 1 プロブビームが透過した光強度と第 2 プロブビームが透過した光強度とを重ね合わせた合成強度の変化を主走査方向について示す。また、上述のように、第 1、第 2 プロブビームが、同じ試料 G 及び異なる試料 G に同時に照射されることがない。このため、検出信号は、第 1、第 2 プロブビームの両方が試料 G に対して照射されていない状態のときに得られる信号レベルを基準にして、第 1、第 2 プロブビームのいずれか一方だけを試料 G に照射しているときの光周波数成分の減衰あるいは透過の大きさを示している。したがって、試料 G の構造等に応じた上記のような二次元画像を得ることができる。

[0149] 信号処理部 134 は、例えば、第 1 実施形態の信号処理部 14 と同様に、検出信号が所定の閾値以上になった時点から所定の遡及時間だけ遡った開始点から所定の通過所用時間が経過した終了点までの期間に出力された検出信号を 1 個分の試料 G に対する検出信号として処理する。そして、画像処理部 134 a は、1 個分の試料 G の全ての二次元画像を蓄積すると、蓄積した複数の二次元画像を取得した順番で並べて二次元画像を生成する。生成される二次元画像は、二次元画像を並べた方向、すなわち副走査方向が時間軸になる。また、二次元画像は、第 1、第 2 プロブビームの照射に対応して試料 G に対応した 2 個の像が形成されている。

[0150] 次に、画像処理部 134 a は、二次元画像を副走査方向に 2 分割し、これら画像を重ねあわせて観察画像を生成する。このときには、例えば、二次元画像中の副走査方向に伸びた 1 ラインについて自己相関関数を計算して、2 次ピークとなる値 T を遅延時間 T d として取得する。そして、この取得した遅延時間 T d を分割位置とし、第 1 実施形態の場合と同様な手順で観察画像を生成すればよい。このようにして、試料 G の透過状態の分布を二次元にマッピングした観察画像を生成し、モニタ 134 b に表示する。

[0151] 上記各実施形態では、副走査方向、すなわち、試料を走査するために、試料と主走査方向に沿ってライン状にされたプロブビームとの相対的な移動

方向を、主走査方向と直交する方向とした例について説明したが、本発明は、これに限定されるものではない。副走査方向は、主走査方向と異なる方向、すなわち主走査方向と平行にならなければよく各プローブビームの照射ラインと試料との相対的な移動方向（副走査方向）とのなす角度を θ としたときに、「 $0^\circ < \theta \leq 90^\circ$ 」を満たせばよい。このため、例えば、微小流路内を流れる試料の移動方向が各プローブビームの照射ライン及び照射ラインと直交する方向に対してそれぞれ傾いてもよい。

符号の説明

- [0152] 10 レーザ顕微鏡装置
11、131 ビーム生成部
12 ビーム照射部
13、133 光検出部
14、134 信号処理部
55、165a 微小流路
56、165 流路デバイス
91 レゾナントスキャナ
BL 照射ライン
G 試料

請求の範囲

- [請求項1] 複数の周波数成分を空間的に配列した複数のプローブビームを生成するビーム生成部と、
- 複数の前記プローブビームのそれぞれについて、前記周波数成分を主走査方向に沿ってライン状に配列するとともに、複数の前記プローブビームを互いに主走査方向と異なる副走査方向に隣接または離して試料に照射するビーム照射部と、
- 複数の前記プローブビームの照射位置と前記試料とを副走査方向に相対的に移動する副走査部と、
- 前記プローブビームを前記試料に照射することで生じた信号光の強度を検出して検出信号を出力する光検出部と、
- 前記検出信号の前記周波数成分ごとの信号成分から前記試料の観察画像を生成する信号処理部と
- を備えることを特徴とするイメージング装置。
- [請求項2] 前記ビーム生成部は、前記周波数成分として強度変調周波数が互いに異なる複数の変調光からなる複数の前記プローブビームを生成することを特徴とする請求項1に記載のイメージング装置。
- [請求項3] 前記信号処理部は、複数の前記プローブビームの照射位置情報を用いて、前記検出信号から得られる取得画像をデコンボリューションすることにより前記観察画像を生成することを特徴とする請求項1または2に記載のイメージング装置。
- [請求項4] 複数の前記プローブビームは、変調光のビートの位相が他の前記プローブビームの変調光に対して半周期ずれた前記プローブビームを含むことを特徴とする請求項3に記載のイメージング装置。
- [請求項5] 前記副走査部は、複数の前記プローブビームの照射位置に対して複数の前記試料を副走査方向に相対的に移動し、
- 前記ビーム照射部は、隣接した前記プローブビームの副走査方向における間隔を前記試料の副走査方向のサイズよりも大きくし、かつ副

走査方向の両端の前記プローブビームの間隔を前記試料の副走査方向の間隔の最小値よりも小さくして、複数の前記プローブビームを照射することを特徴とする請求項1または2に記載のイメージング装置。

[請求項6] 前記ビーム照射部は、複数の前記プローブビームの各変調光の照射スポットを所定の配列ピッチで並べるとともに、主走査方向について一の前記プローブビームの各照射スポットの間に他の各前記プローブビームのそれぞれ1個の照射スポットが配されるように、複数の前記プローブビームを互いに主走査方向にずらして照射することを特徴とする請求項2に記載のイメージング装置。

[請求項7] 前記ビーム照射部は、主走査方向の照射範囲を分割した複数の小領域に前記プローブビームをそれぞれ対応させ、前記小領域ごとに対応する前記プローブビームを照射することを特徴とする請求項2に記載のイメージング装置。

[請求項8] 前記ビーム生成部は、複数の光周波数成分を空間的に配列した複数の前記プローブビームを生成することを特徴とする請求項1に記載のイメージング装置。

[請求項9] 前記副走査部は、副走査方向に沿って前記試料が流体と共に流れる流路を有する流路デバイスであり、

前記ビーム照射部は、前記流路内に複数の前記プローブビームを照射する

ことを特徴とする請求項1ないし8のいずれか1項に記載のイメージング装置。

[請求項10] 前記信号処理部は、前記検出信号に基づいて得られる前記試料に対する前記プローブビームの照射タイミングのずれから、前記試料の移動速度を検出する速度検出部を有し、前記速度検出部で検出された前記移動速度に基づいて副走査方向について前記観察画像を補正することを特徴とする請求項9に記載のイメージング装置。

[請求項11] 前記副走査部は、複数の前記プローブビームの照射位置を副走査方

向に移動させる光偏向器であることを特徴とする請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載のイメージング装置。

[請求項12] 複数の前記プローブビームが照射される副走査方向の範囲を制限するマスク板を備えることを特徴とする請求項 1 1 に記載のイメージング装置。

[請求項13] 複数の周波数成分を空間的に配列した複数のプローブビームを生成するビーム生成ステップと、

複数の前記プローブビームのそれぞれについて、前記周波数成分を主走査方向に沿ってライン状に配列するとともに、複数の前記プローブビームを互いに主走査方向と異なる副走査方向に隣接または離して試料に照射するビーム照射ステップと、

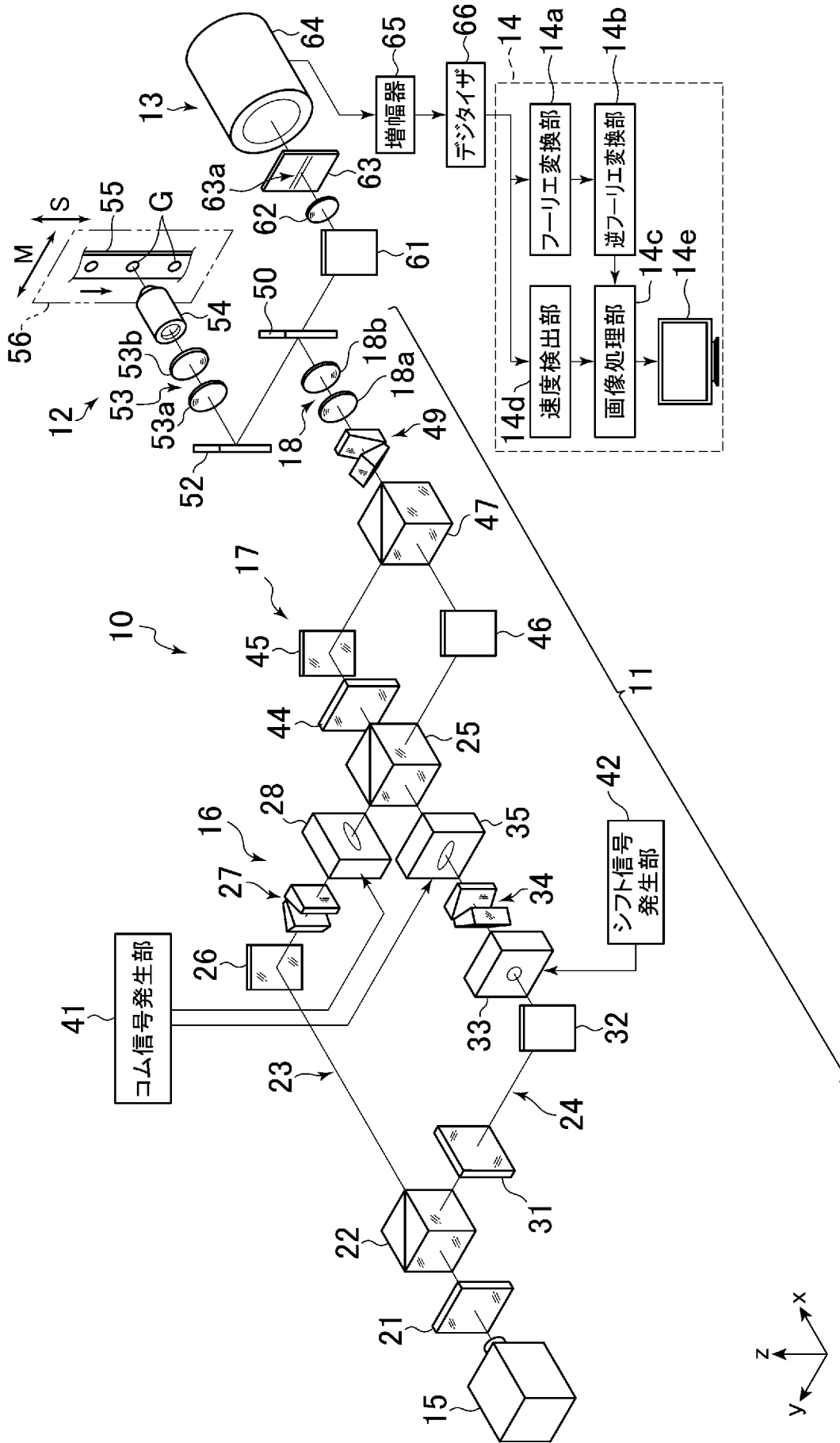
複数の前記プローブビームの照射位置と前記試料とを副走査方向に相対的に移動する副走査ステップと、

前記プローブビームを前記試料に照射することで生じた信号光の強度を検出して検出信号を出力する光検出ステップと、

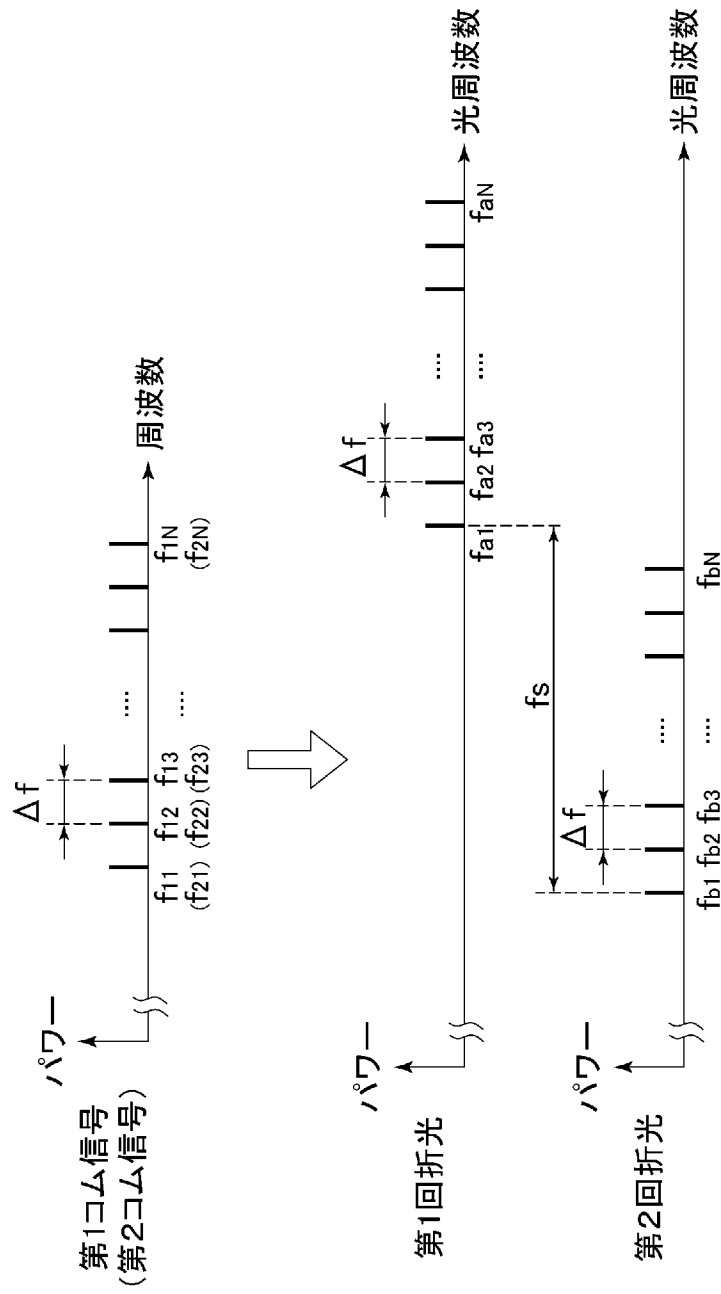
前記検出信号の前記周波数成分ごとの信号成分から前記試料の観察画像を生成する信号処理ステップと

を有することを特徴とするイメージング方法。

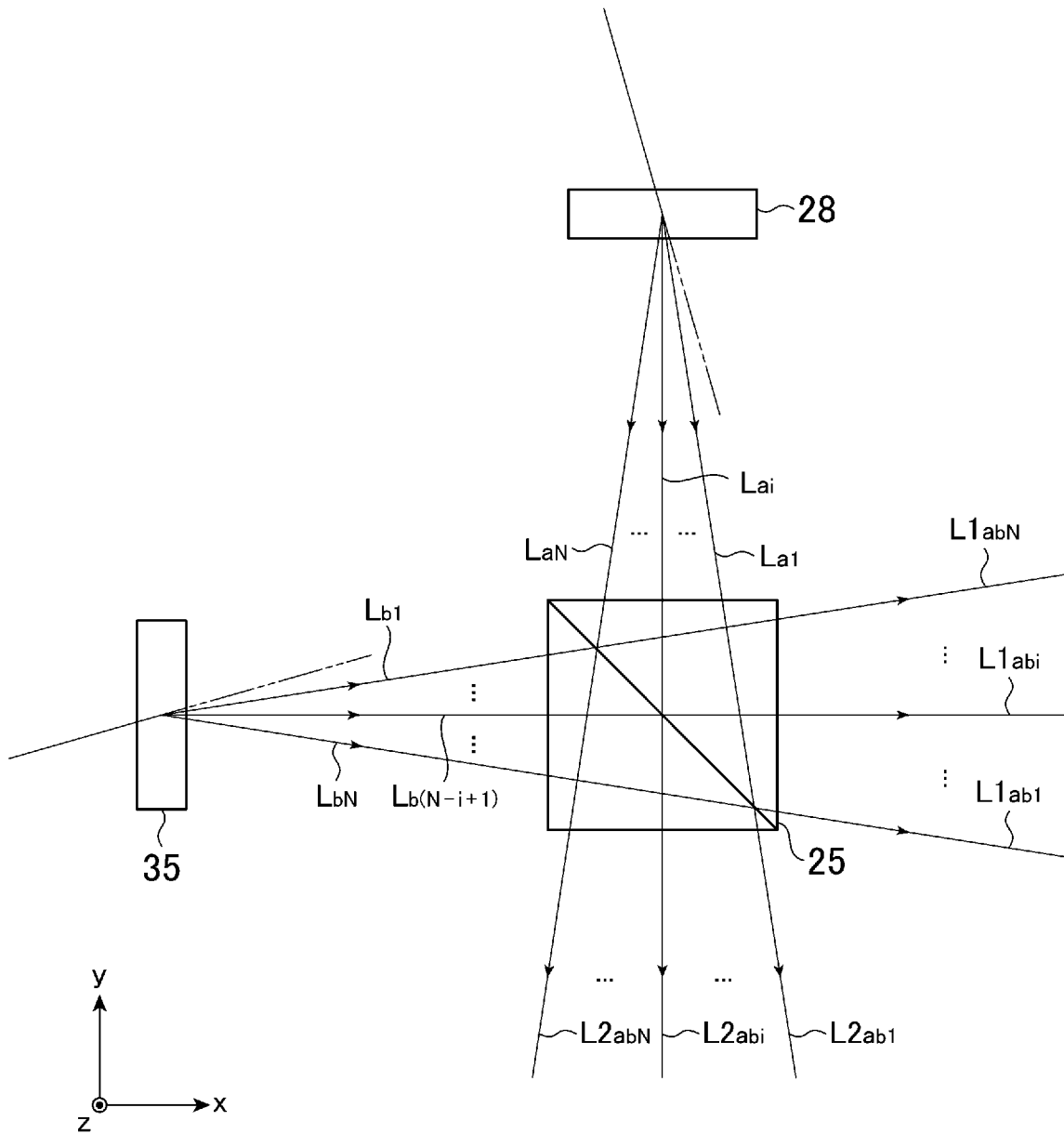
[図1]



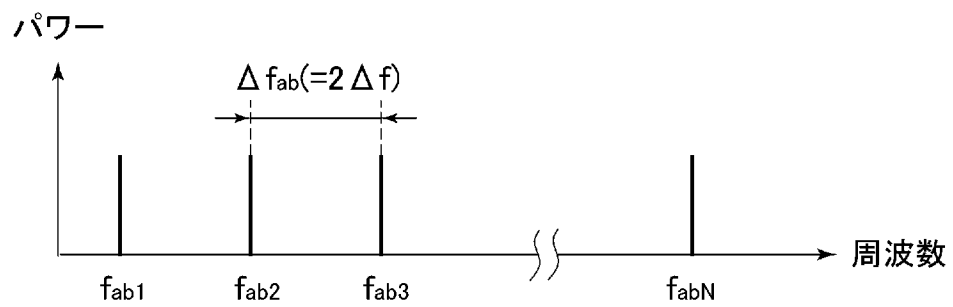
[図2]



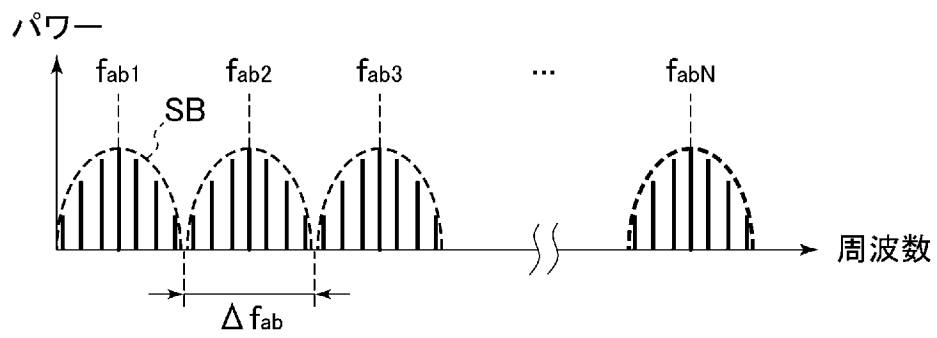
[図3]



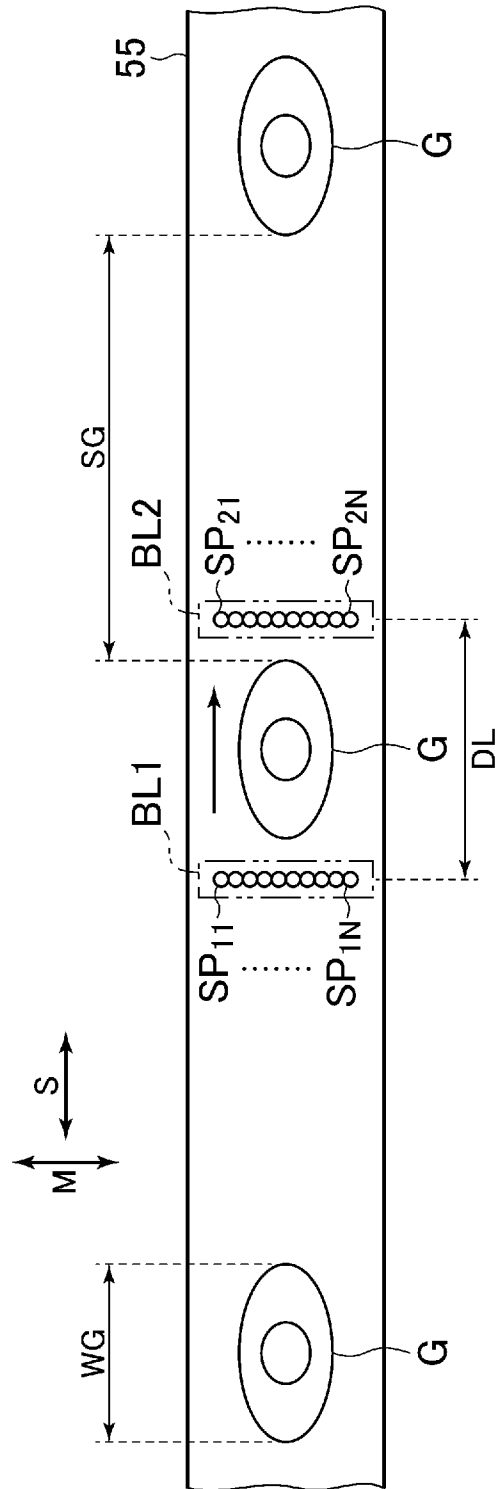
[図4A]



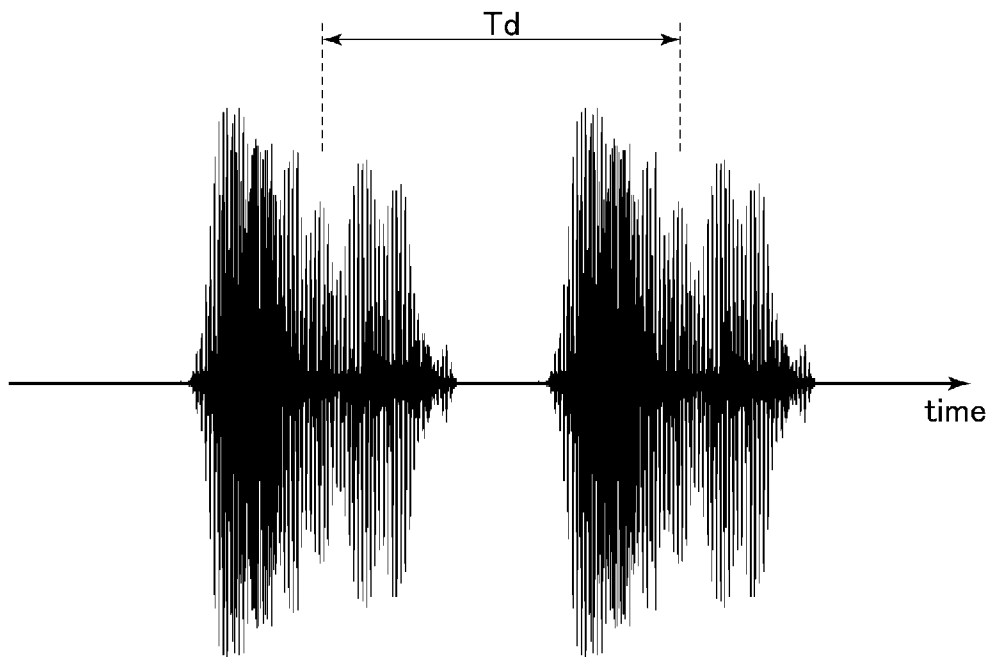
[図4B]



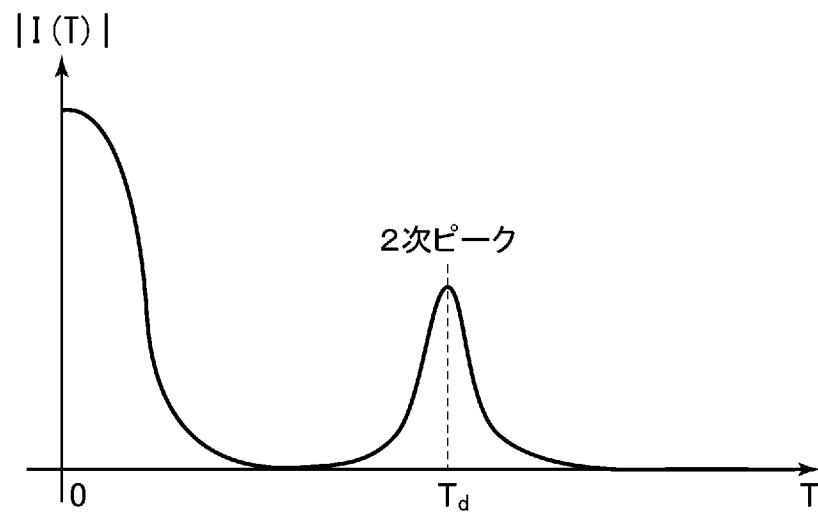
[図5]



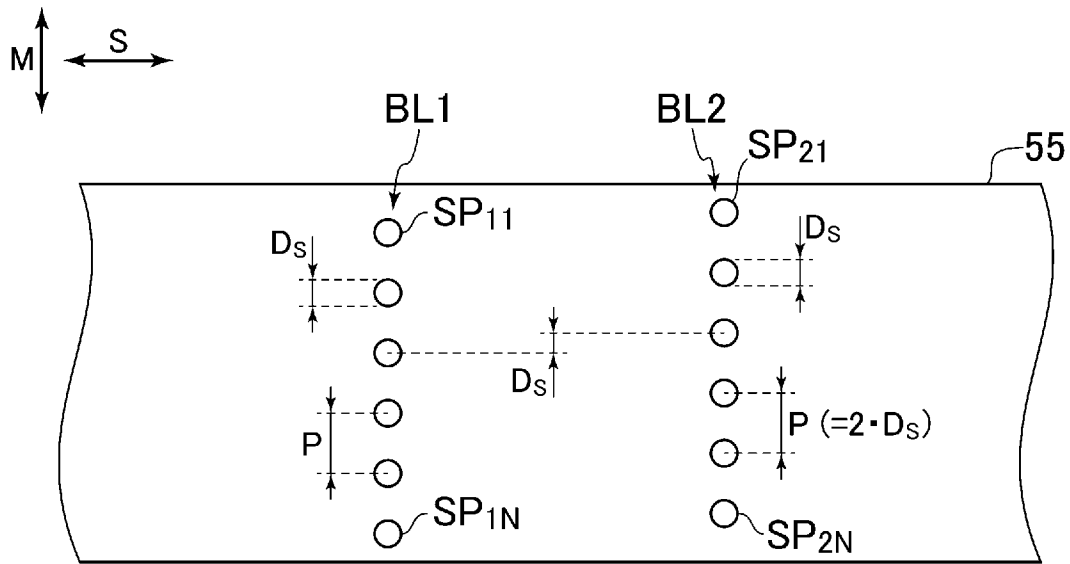
[図6]



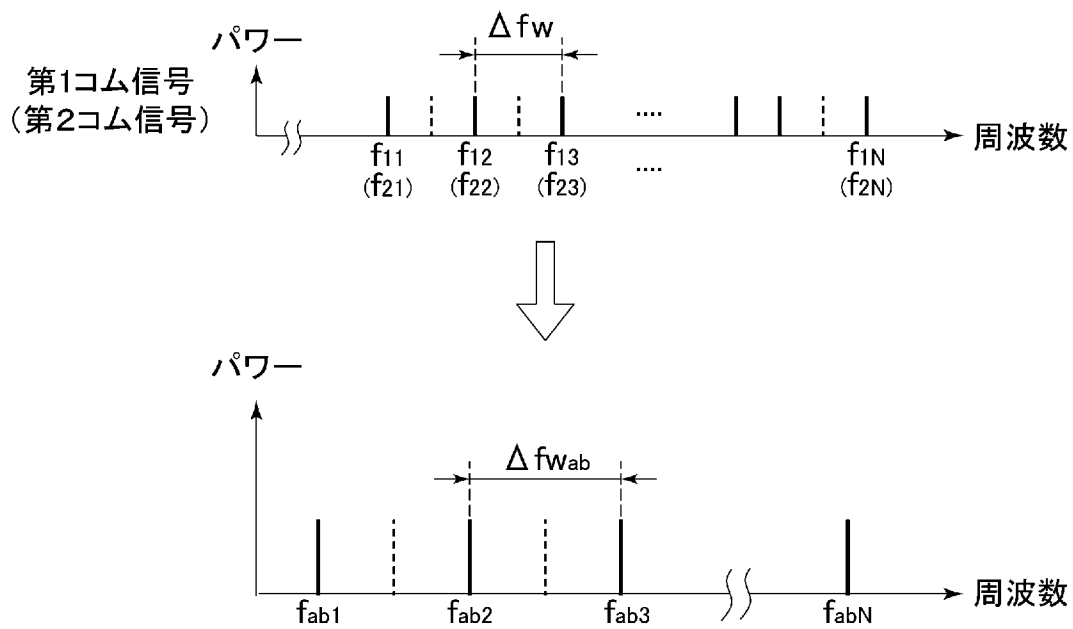
[図7]



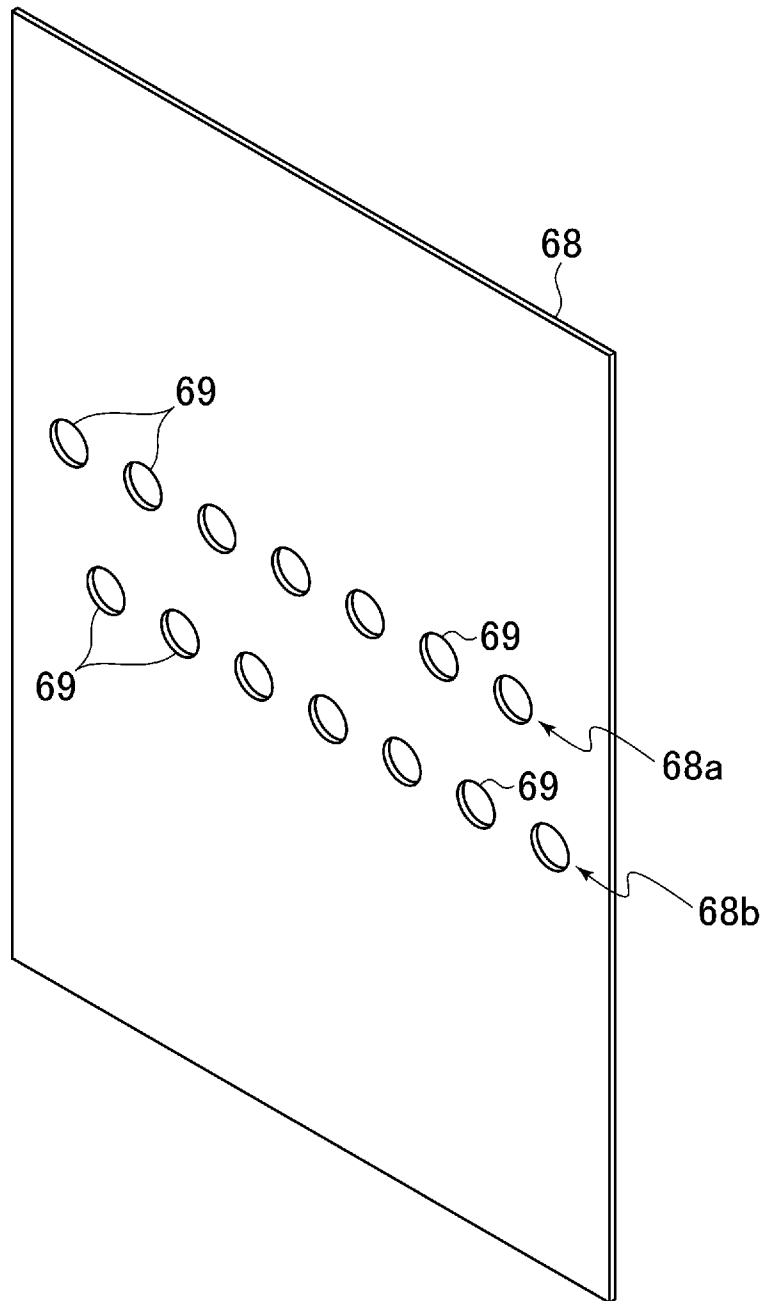
[図8]



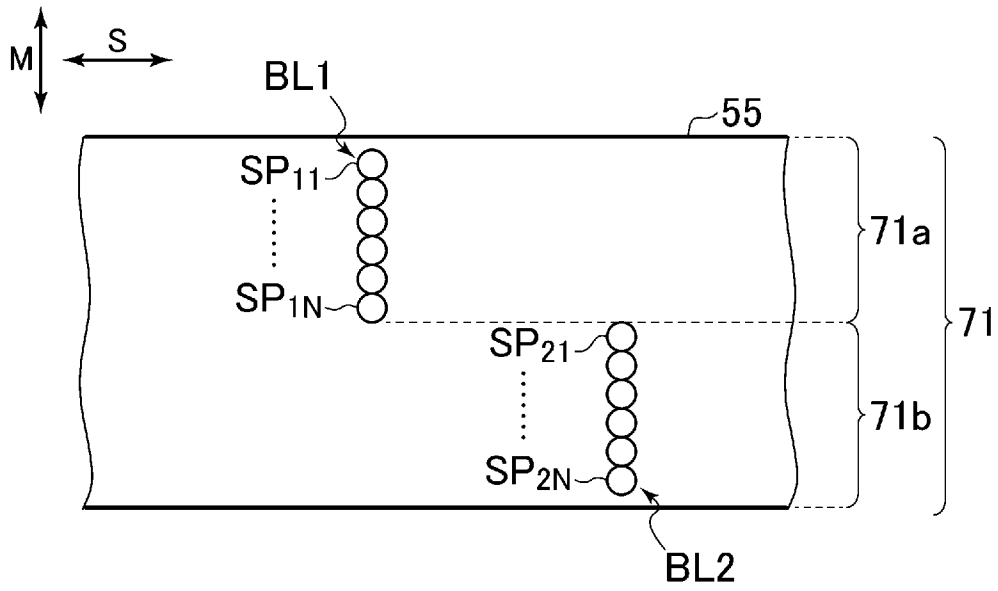
[図9]



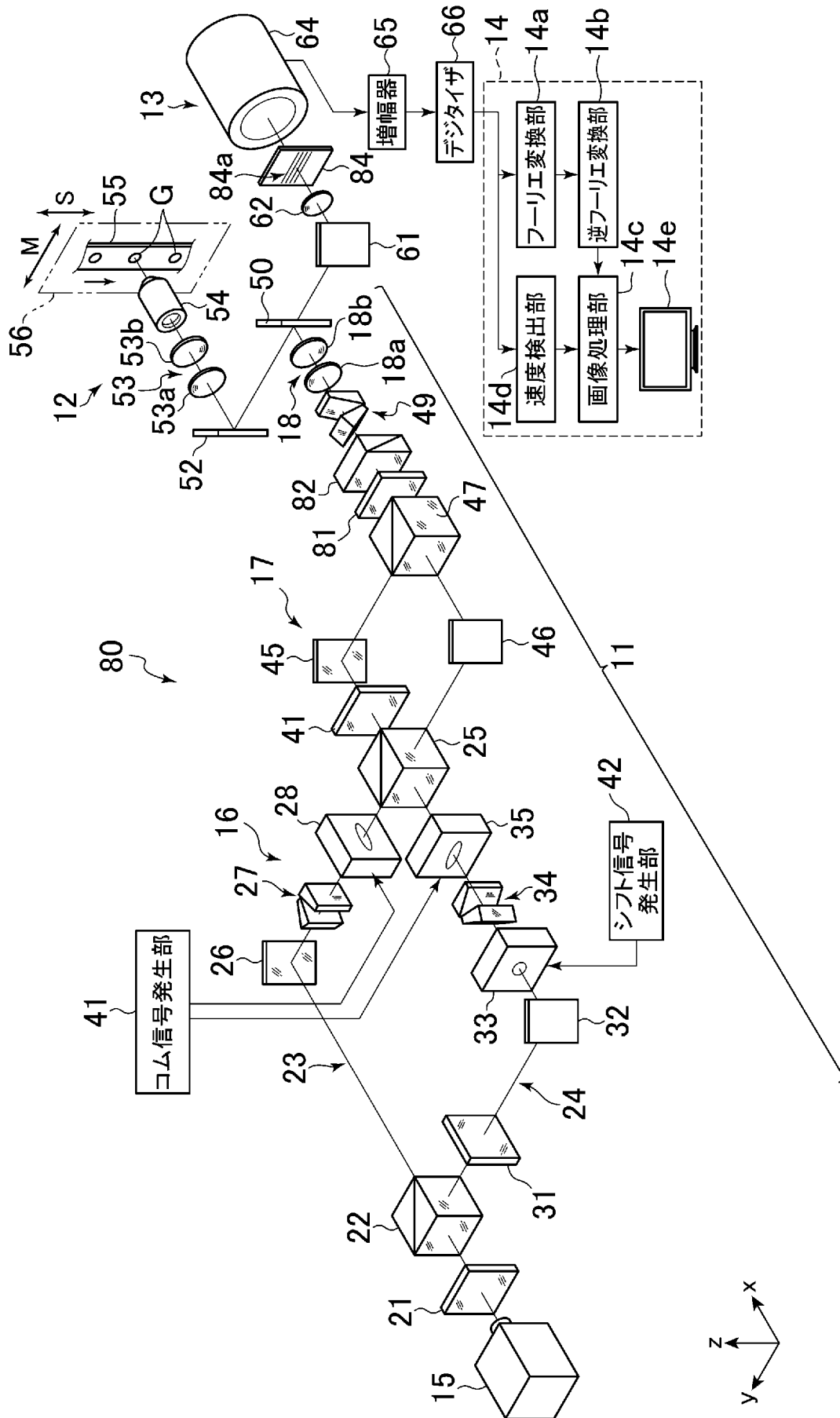
[図10]



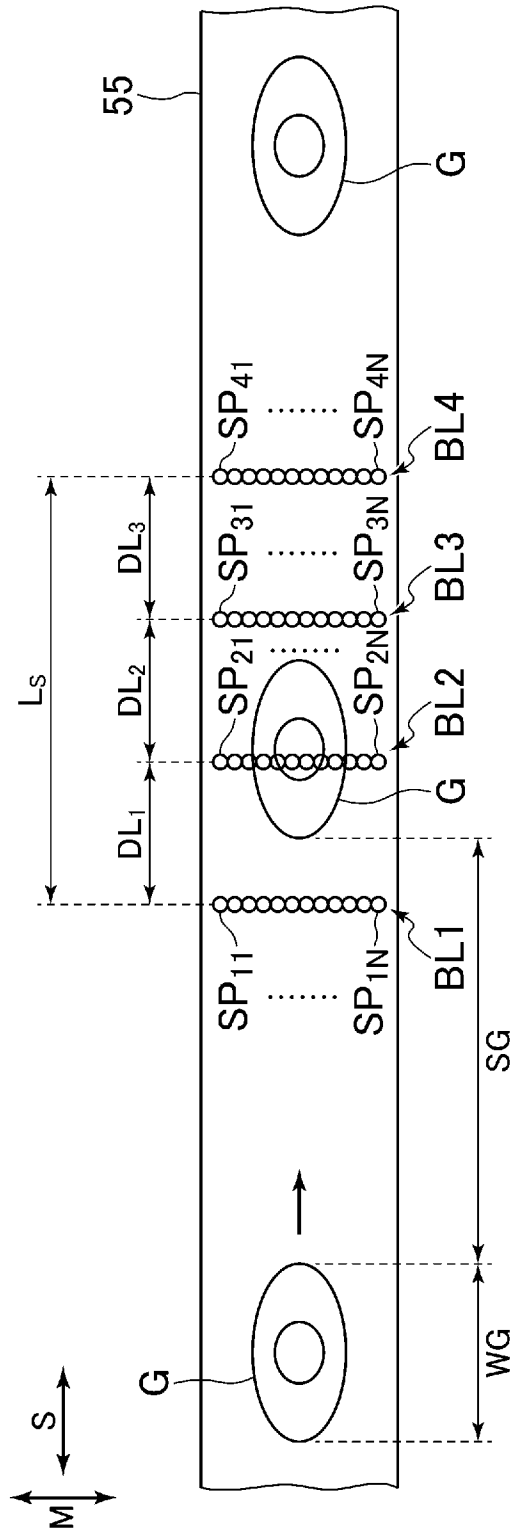
[図11]



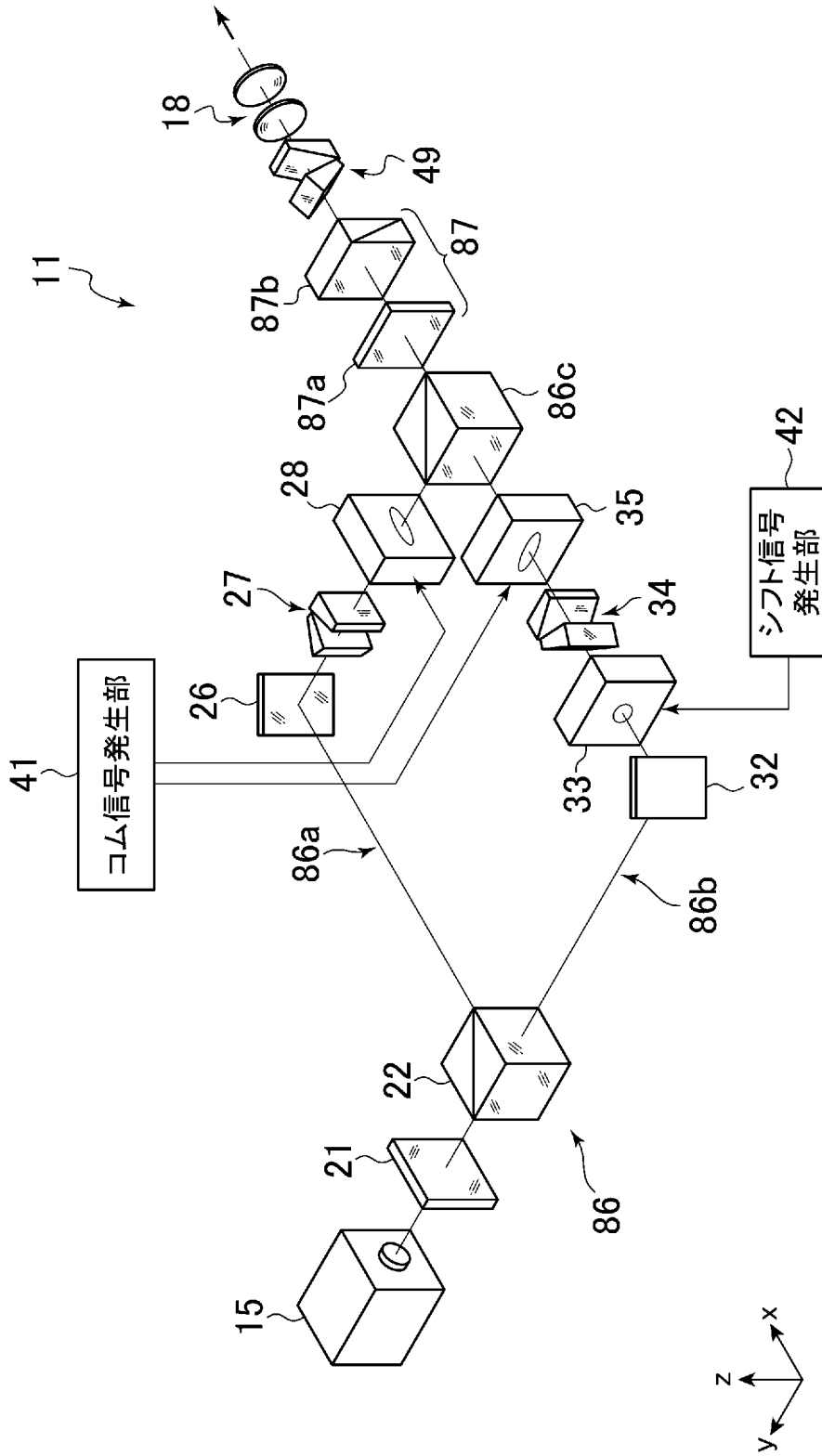
[図12]



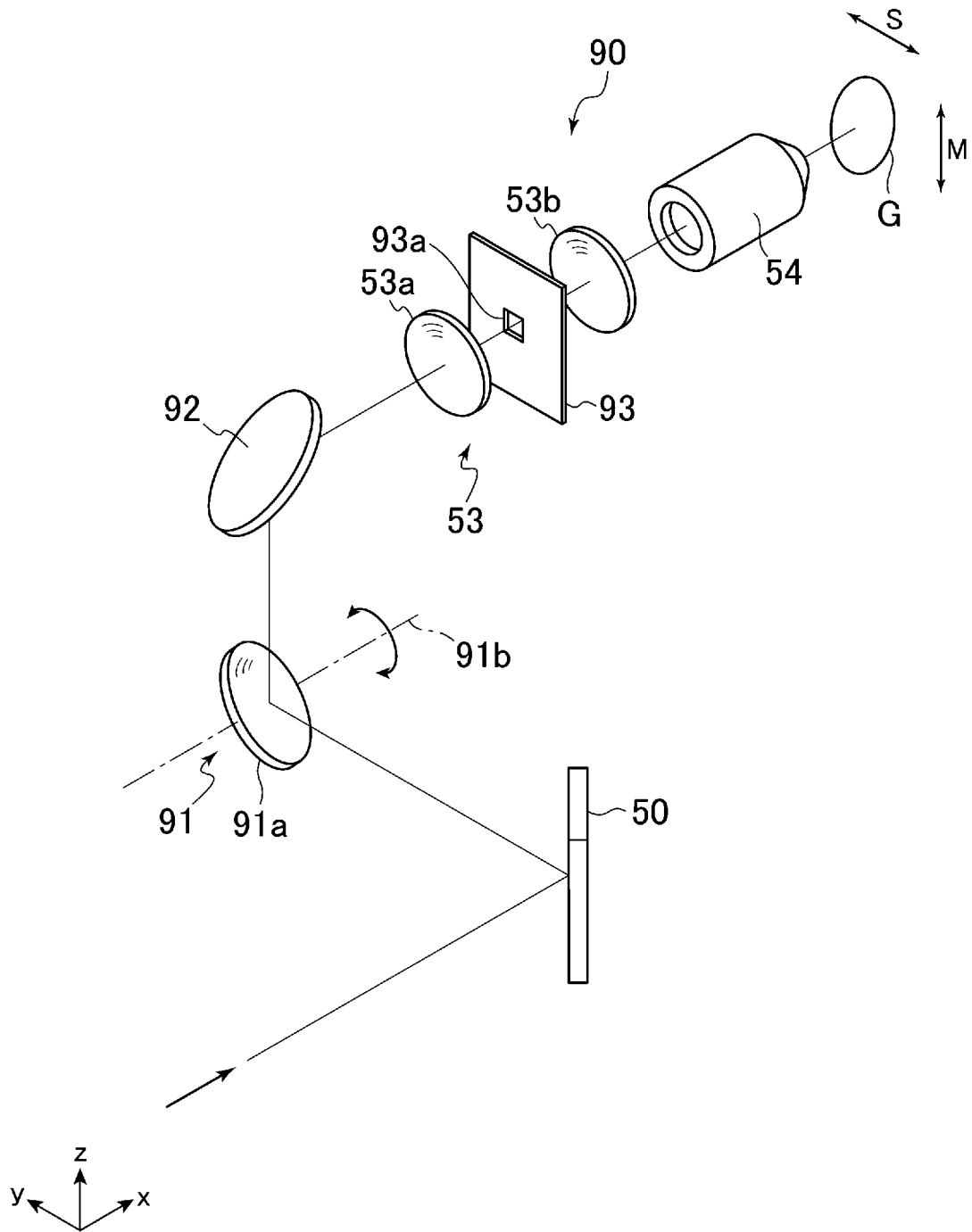
[図13]



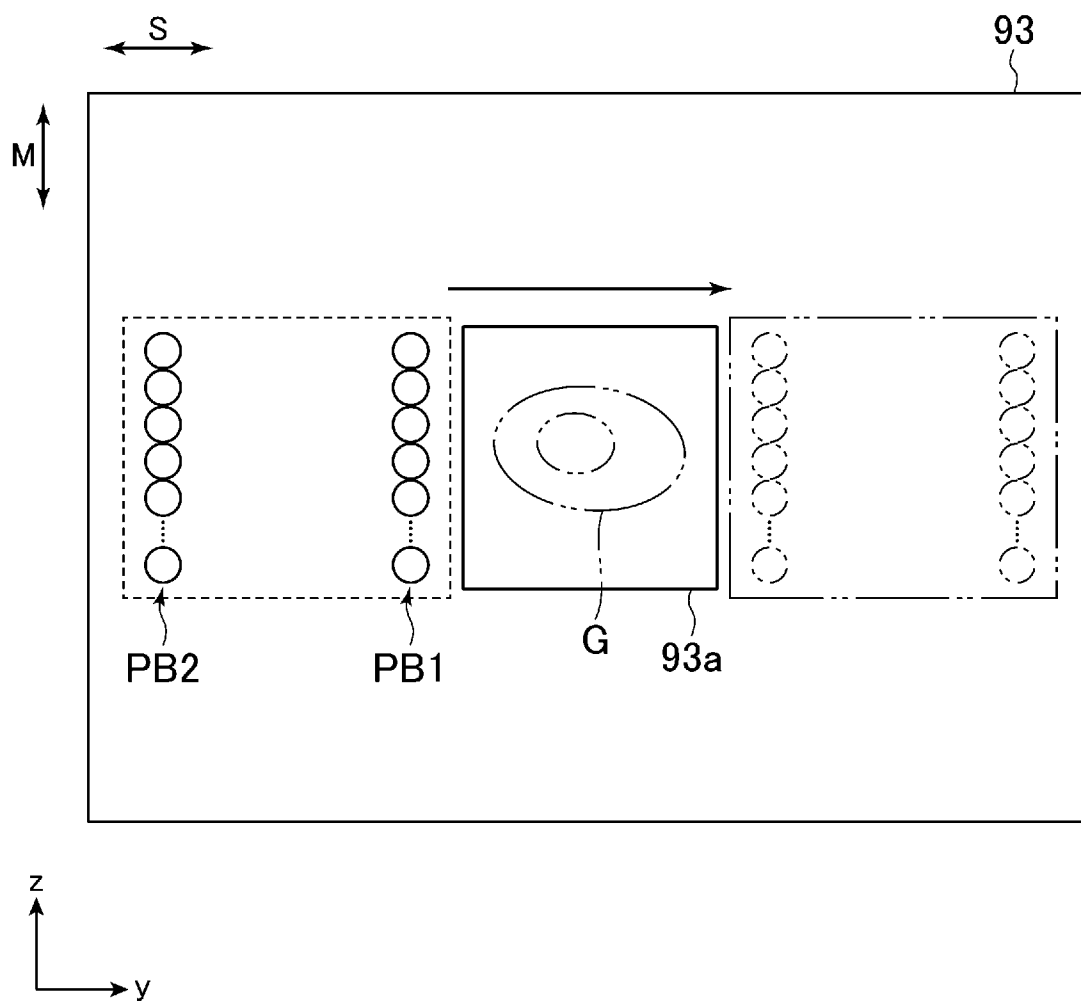
[図14]



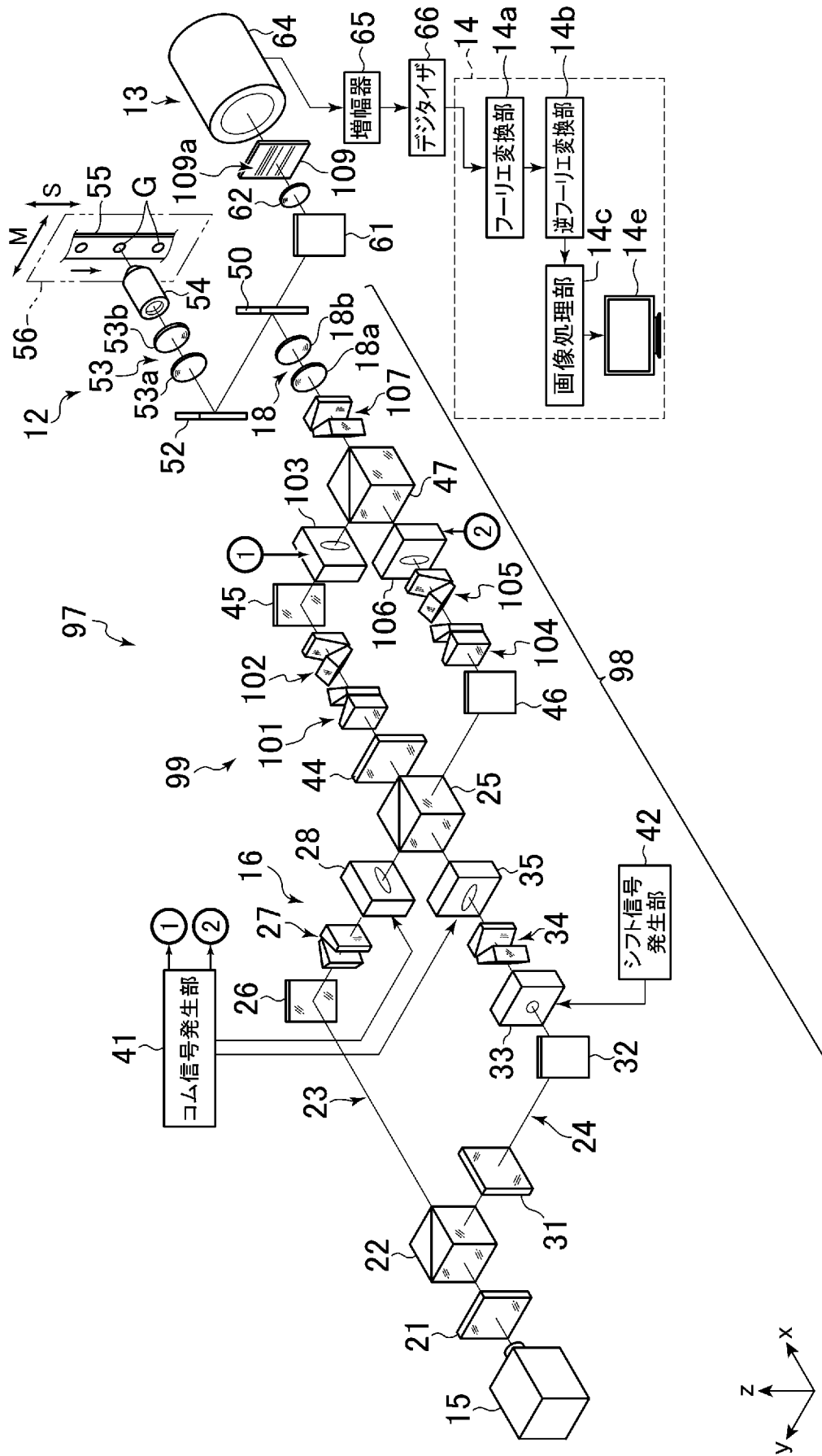
[図15]



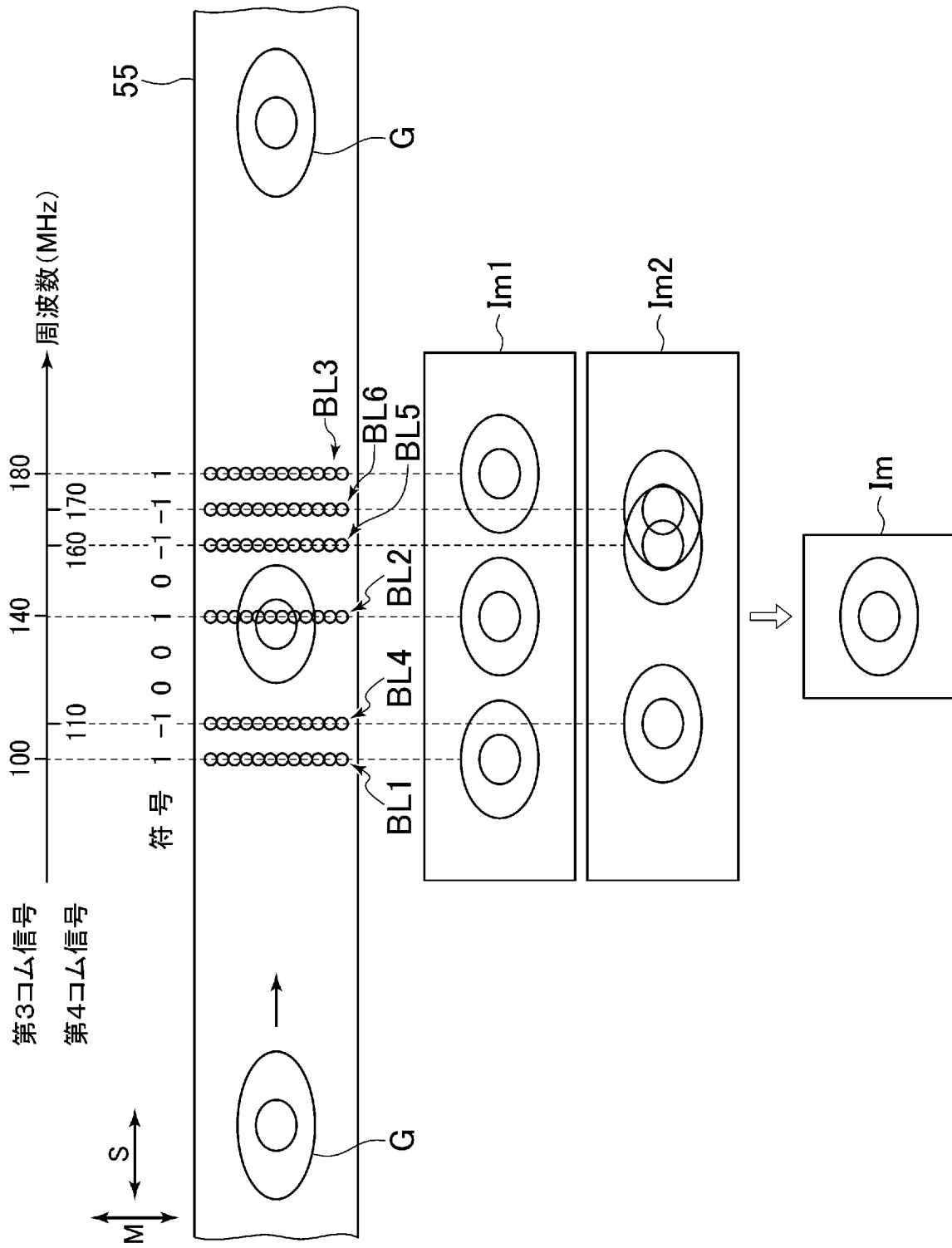
[図16]



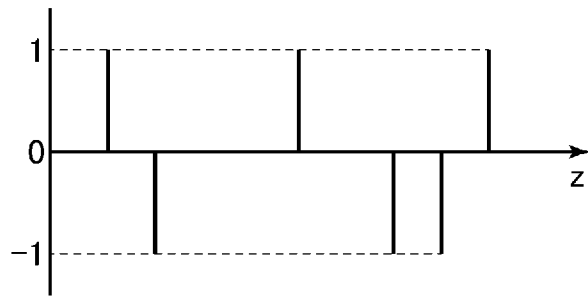
[図17]



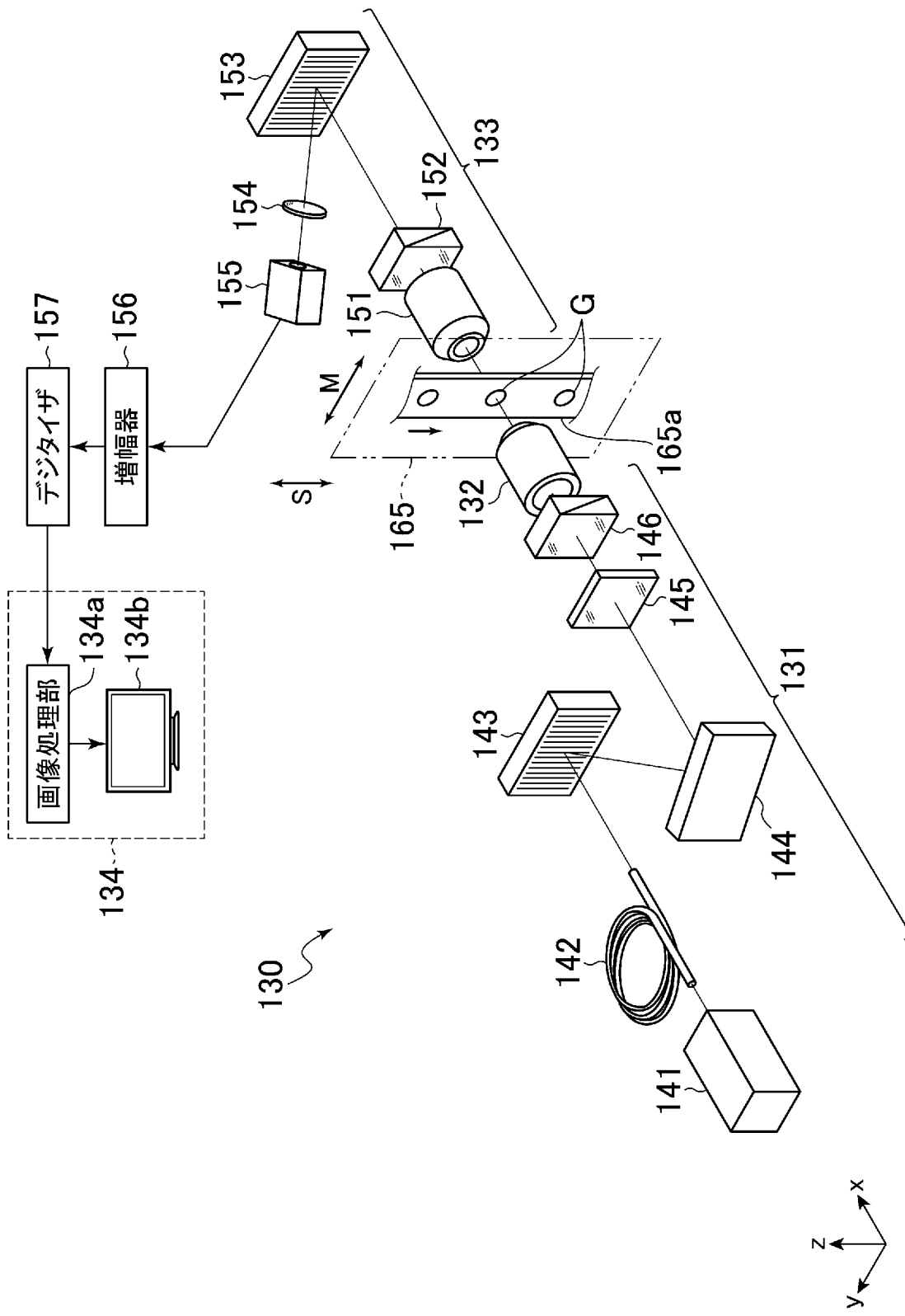
[図18]



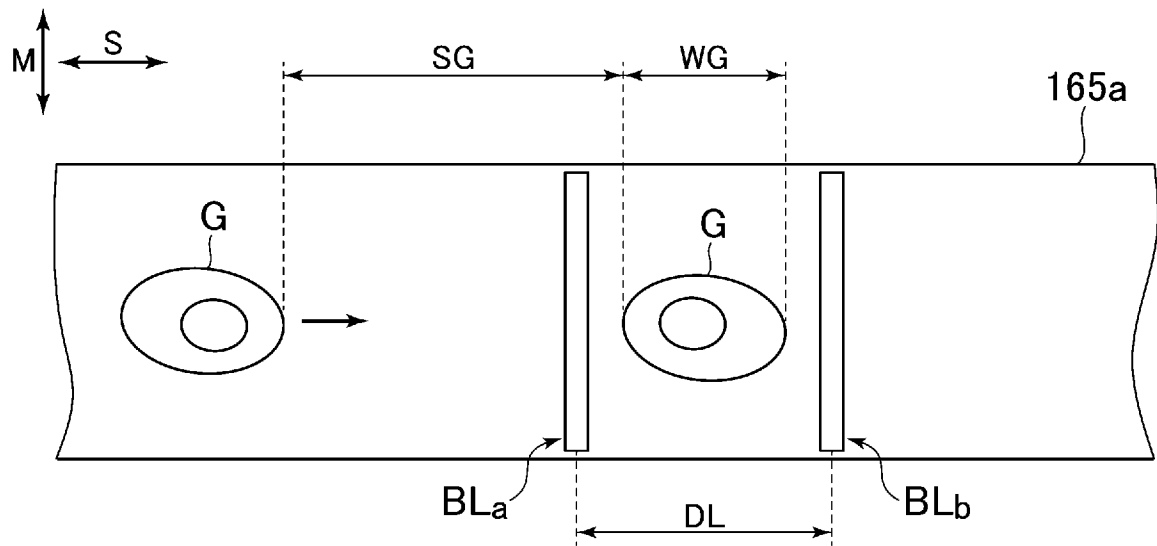
[図19]



[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/010785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N21/64(2006.01) i, G02B21/06(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N21/00-21/74, G02B21/00, G02B21/06, G01J3/00-3/52, G01N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	MIKAMI H, et al, Enhanced speed in fluorescence imaging using beat frequency multiplexing, Proc. of SPIE, 2016.03.07, Vol.9720, pp. 97200T-1 - 97200T-6, doi: 10.1117/12.2211836	1-3, 5, 7-9, 11-13 4, 6, 10
Y	JP 2002-323660 A (Carl Zeiss Jena GmbH), 08 November 2002 (08.11.2002), paragraphs [0102] to [0109]; fig. 15, 16 & US 2003/0132394 A1 paragraphs [0124] to [0126]; fig. 15 to 16B & EP 1248132 A2 & DE 10118463 A & DE 10155002 A	1-3, 5, 7-9, 11-13
Y	JP 2006-317261 A (Olympus Corp.), 24 November 2006 (24.11.2006), paragraphs [0035] to [0040]; fig. 5, 6 (Family: none)	3, 9, 11-12

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26 May 2017 (26.05.17)	Date of mailing of the international search report 06 June 2017 (06.06.17)
---	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/010785

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/110290 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 17 July 2014 (17.07.2014), paragraphs [0082] to [0084] & JP 2016-504598 A & US 2016/0003741 A1 & EP 2943778 A1	12
A	UGAWA M, et.al., High-throughput optofluidic particle profiling with morphological and chemical specificity, Optics Letters, 2015.10.15, Vol. 40, No. 20, p.4803-4806	1-13
A	WO 2014/147590 A1 (FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA), 25 September 2014 (25.09.2014), & JP 2016-516219 A & US 2016/0274439 A1 & EP 2976670 A1	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, G02B21/06(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/00-21/74, G02B21/00, G02B21/06, G01J3/00-3/52, G01N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	MIKAMI H, et al, Enhanced speed in fluorescence imaging using beat frequency multiplexing, Proc. of SPIE, 2016.03.07,	1-3, 5, 7-9, 11-13
A	Vol.9720, pp. 97200T-1 - 97200T-6, doi: 10.1117/12.2211836	4, 6, 10
Y	JP 2002-323660 A (カール ツァイス イエナ ゲゼルシャフト ミ ット ベシユレンクテル ハフツング) 2002.11.08, [0102] - [0109]、図15、図16 & US 2003/0132394 A1, [0124]-[0126], FIG.15-FIG.16B & EP 1248132 A2 & DE 10118463 A & DE 10155002 A	1-3, 5, 7-9, 11-13

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- | | |
|--|---|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

国際調査を完了した日

26.05.2017

国際調査報告の発送日

06.06.2017

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横尾 雅一

2W

3716

電話番号 03-3581-1101 内線 3258

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-317261 A (オリンパス株式会社) 2006.11.24, [0035] - [0040]、図5、図6 (ファミリーなし)	3, 9, 11-12
Y	WO 2014/110290 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2014.07.17, [0082] - [0084] & JP 2016-504598 A & US 2016/0003741 A1 & EP 2943778 A1	12
A	UGAWA M, et. al., High-throughput optofluidic particle profiling with morphological and chemical specificity, Optics Letters, 2015.10.15, Vol. 40, No. 20, p.4803-4806	1-13
A	WO 2014/147590 A1 (FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA) 2014.09.25, & JP 2016-516219 A & US 2016/0274439 A1 & EP 2976670 A1	1-13