

(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10月5日(05.10.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/169083 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/003695
- (22) 国際出願日: 2017年2月2日(02.02.2017)
- (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 2016-070143 2016年3月31日(31.03.2016) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社(FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目26番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 金子 泰久(KANEKO Yasuhisa); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 中島 順子, 外(NAKASHIMA Junko et al.); 〒2500111 神奈川県南足柄市竹松1250番地 FFTP MO棟6F Kanagawa (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).

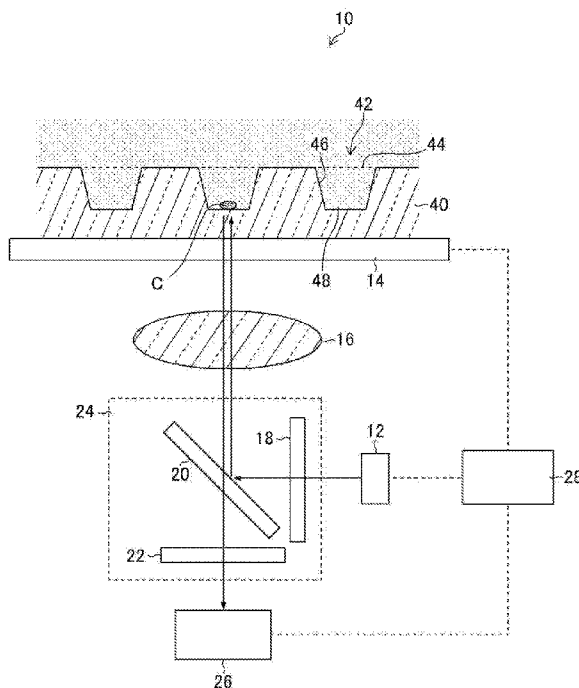
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: IMAGING DEVICE AND IMAGING METHOD

(54) 発明の名称: 画像撮像装置及び画像撮像方法

[図1]



(57) Abstract: Provided are an imaging device and imaging method with which the time for imaging a plurality of fluorescences emitted from a cell can be shortened. This imaging device has: at least one housing part that holds and houses, on a flat holding surface, a cell that has been stained with a plurality of types of fluorescent dyes that emit fluorescences of different wavelengths; a first light source that simultaneously emits lights having a plurality of wavelengths; a filter group that includes a first multi-bandpass filter, which transmits excitation lights having a plurality of wavelengths that excite the plurality of types of fluorescent dyes from among the lights having a plurality of wavelengths emitted from the first light source, a dichroic mirror, which radiates, toward the cell, the excitation lights having a plurality of wavelengths that have been transmitted through the first multi-bandpass filter and transmits fluorescences of different wavelengths emitted from the cell due to the excitation lights having a plurality of wavelengths, and a second multi-bandpass filter, which transmits the fluorescences of different wavelengths that have been transmitted through the dichroic mirror; an objective lens that condenses the excitation lights having a plurality of wavelengths and amplifies the fluorescences of different wavelengths; and an imaging element that has a plurality of sub-pixels for each pixel that images the fluorescences of different wavelengths that have been transmitted through the second multi-bandpass filter.

(57) 要約:

[続葉有]



細胞から発光される複数の蛍光を撮像する時間を短くすることができる画像撮像装置及び画像撮像方法を提供する。画像撮像装置は、異なる波長の蛍光を発光する複数の種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な保持面で保持して収納する少なくとも一つの収納部と、複数の波長の光を同時に発光する第1光源と、第1光源から発光される複数の波長の光のうち複数の種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を透過させる第1マルチバンドパスフィルターと、第1マルチバンドパスフィルターを透過した複数の波長の励起光を細胞に向けて照射させ複数の波長の励起光により細胞から発光される異なる波長の蛍光を透過させるダイクロイックミラーと、ダイクロイックミラーを透過した異なる波長の蛍光を透過させる第2マルチバンドパスフィルターと、を含むフィルター群と、複数の波長の励起光を集光し異なる波長の蛍光を拡大させる対物レンズと、第2マルチバンドパスフィルターを透過した異なる波長の蛍光を撮像する1画素に複数の副画素を有する撮像素子と、を有する。

明 細 書

発明の名称： 画像撮像装置及び画像撮像方法

技術分野

[0001] 本発明は画像撮像装置及び画像撮像方法に関する。

背景技術

[0002] 免疫染色により複数の蛍光色素が結合された細胞を観察するため、蛍光顕微鏡等が画像撮像装置として使用されている。

[0003] 特許文献 1 には、レーザ光源の光をマイクロレンズにより集光し、ダイクロイックミラーにより任意の波長の光を励起光として透過させ、ピンホールを介して励起光を試料に照射し、試料からの蛍光を C C D (charge-coupled device) カメラで撮像することが記載されている。

[0004] また、特許文献 2 には、試料から発光される複数種類の蛍光を、透過光の波長帯域が可変である波長可変液晶分光フィルターを透過させ、検出器により撮像することが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開 2 0 0 8 - 0 1 5 0 5 9 号公報

特許文献2：特開 2 0 0 9 - 0 5 8 3 0 4 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ところで、試料から発光される蛍光を撮像する画像撮像装置には、時間を短縮する観点から 1 回の撮影により異なる波長の蛍光を撮像することが求められている。

[0007] しかしながら、特許文献 1 には、蛍光を撮像するための撮像素子の具体的な構成を開示していない。また、特許文献 2 では、波長可変液晶分光フィルターを透過光の波長域を可変させながら、撮像しており、1 回の撮影で異なる波長の蛍光を撮像することも 1 回の撮影で異なる波長の蛍光を撮像する撮

像素子の具体的な構成も開示していない。

[0008] 本発明は、このような事情に鑑みてなされたもので、1回の撮影により、細胞からの複数の蛍光を撮像することのできる画像撮像装置、及び画像撮像方法を提供することを目的とする。また、1回の撮影により、細胞からの複数の蛍光と細胞からの透過光を撮像することのできる画像撮像装置、及び画像撮像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

[0009] 本発明の一態様によると、画像撮像装置は、異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な保持面で保持して収納する少なくとも一つの収納部と、複数の波長の光を同時に発光する第1光源と、第1光源から発光される複数の波長の光のうち複数種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を選択的に透過させる第1マルチバンドパスフィルターと、第1マルチバンドパスフィルターを透過した複数の波長の励起光を細胞に向けて照射させ複数の波長の励起光により細胞から発光される異なる波長の蛍光を透過させるダイクロイックミラーと、ダイクロイックミラーを透過した異なる波長の蛍光を透過させる第2マルチバンドパスフィルターと、を含むフィルター群と、複数の波長の励起光を集光し異なる波長の蛍光を拡大させる対物レンズと、第2マルチバンドパスフィルターを透過した異なる波長の蛍光を撮像する1画素に複数の副画素を有する撮像素子と、を有する。

[0010] 好ましくは、撮像素子がカラー撮像素子である。

[0011] 好ましくは、カラー撮像素子が、赤色フィルター、緑色フィルター、及び青色フィルターを有する単板式の撮像素子である。

[0012] 好ましくは、第1光源と、フィルター群と、撮像素子とが、収納部に対して保持面とは反対の側に配置される。

[0013] 好ましくは、第1マルチバンドパスフィルター、及び第2マルチバンドパスフィルターは、トリプルバンドパスフィルターで構成される。

[0014] 好ましくは、第1光源は、複数の光源により構成される。

[0015] 好ましくは、複数の光源の光量を、それぞれ独立に制御する制御部を有す

る。

[0016] 好ましくは、第1光源が、少なくとも緑色発光ダイオード、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードを含む光源である。

[0017] 好ましくは、収納部は、複数の収納部を有する容器の一つの収納部である。

[0018] 本発明の別の態様によると、画像撮像装置は、異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な保持面で保持して収納する少なくとも一つの収納部と、複数の波長の光を同時に発光する第1光源と、収納部に対して第1光源とは反対の側に配置された、一つの波長の透過光を発光する第2光源と、第1光源から発光される複数の波長の光のうち複数種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を選択的に透過させる第1マルチバンドパスフィルターと、第1マルチバンドパスフィルターを透過した複数の波長の励起光を細胞に向けて照射させ複数の波長の励起光により細胞から発光される複数の異なる波長の蛍光を透過させかつ第2光源から発光される一つの波長の透過光を透過させるダイクロイックミラーと、ダイクロイックミラーを透過した異なる波長の蛍光及び一つの波長の透過光を透過させる第2マルチバンドパスフィルターと、を含むフィルター群と、複数の波長の励起光を集光し異なる波長の蛍光及び透過光を拡大させる対物レンズと、第2マルチバンドパスフィルターを透過した異なる波長の蛍光と一つの波長の透過光を撮像する1画素に複数の副画素を有する撮像素子と、を有する。

[0019] 好ましくは、第1光源が、緑色発光ダイオード、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードの群から選択される2つの発光ダイオードを含む。

[0020] 本発明の別の態様によると、画像撮像方法は、異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な表面に保持する保持面を有する少なくとも一つの収納部に収納するステップと、第1光源から複数の波長の光を同時に発光するステップと、第1光源から発光される複数の波長の光のうち複数種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を第1マルチバンドパスフィルターに選択的に透過させ、ダイクロイックミラーにより第1マル

チバンドパスフィルターを透過した複数の波長の励起光を細胞に向けて照射させ、複数の波長の励起光により細胞から発光される異なる波長の蛍光を第1マルチバンドパスフィルターを透過させ、第1マルチバンドパスフィルターを透過した異なる波長の蛍光を第2マルチバンドパスフィルターを透過させるステップと、第2マルチバンドパスフィルターを透過した異なる波長の蛍光を1画素に複数の副画素を有する撮像素子により撮像するステップと、を有する。

[0021] 本発明の別の態様によると、画像撮像方法は、異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な表面に保持する保持面を有する少なくとも一つの収納部に収納するステップと、第1光源から複数の波長の光を同時に発光し、収納部に対して第1光源と反対の側に配置される第2光源から一つの波長の透過光を発光するステップと、第1光源から発光される複数の波長の光のうち複数種の蛍光色素を励起するの複数の波長の励起光を第1マルチバンドパスフィルターに選択的に透過し、ダイクロイックミラーにより第1マルチバンドパスフィルターを透過した複数の波長の励起光を細胞に向けて照射させ、複数の波長の励起光により細胞から発光される異なる波長の蛍光と第2光源から発光される一つの波長の透過光とをダイクロイックミラーを透過させ、ダイクロイックミラーを透過した異なる波長の蛍光と第2光源から発光される一つの波長の透過光とを第2マルチバンドパスフィルターを透過させるステップと、第2マルチバンドパスフィルターを透過した異なる波長の蛍光と第2光源から発光される一つの波長の透過光とを1画素に複数の副画素を有する撮像素子により撮像するステップと、を有する。

発明の効果

[0022] 本発明の一態様によれば、1回の撮影により、細胞からの複数の蛍光を撮像することができ、試料から発光される蛍光を撮像する時間を短縮できる。

[0023] また、本発明の別の態様によれば、1回の撮影により、細胞からの複数の蛍光と細胞の透過光とを撮像することができ、試料から発光される蛍光を撮

像する時間を短縮できる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]第1実施形態の画像撮像装置の構成図である。

[図2]撮像素子の部分拡大図である。

[図3]第1光源から同時に発光される複数の波長の光のスペクトルのグラフである。

[図4]第1マルチバンドパスフィルタの分光スペクトルのグラフである。

[図5]励起光のスペクトルのグラフである。

[図6]ダイクロイックミラーの分光スペクトルのグラフである。

[図7]蛍光のスペクトルのグラフである。

[図8]第2マルチバンドパスフィルタの分光スペクトルのグラフである。

[図9]蛍光のスペクトルのグラフである。

[図10]フィルターを有する撮像素子の感度特性のグラフである。

[図11]撮像素子により取得された細胞から発光された蛍光の画像の概念図である。

[図12]第2実施形態の画像撮像装置の構成図である。

[図13]第1光源から同時に発光される複数の波長の光のスペクトルのグラフである。

[図14]第1マルチバンドパスフィルタの分光スペクトルのグラフである。

[図15]励起光のスペクトルのグラフである。

[図16]ダイクロイックミラーの分光スペクトルのグラフである。

[図17]蛍光のスペクトルのグラフである。

[図18]第2マルチバンドパスフィルタの分光スペクトルのグラフである。

[図19]蛍光及び透過光のスペクトルのグラフである。

[図20]撮像素子により取得された細胞からの蛍光と位相差像の画像の概念図である。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、添付図面にしたがって本発明の好ましい実施形態について説明する

。本発明は以下の好ましい実施形態により説明される。本発明の範囲を逸脱すること無く、多くの手法により変更を行うことができ、実施形態以外の他の実施形態を利用することができる。したがって、本発明の範囲内における全ての変更が請求の範囲に含まれる。

[0026] ここで、図中、同一の記号で示される部分は、同様の機能を有する同様の要素である。また、本明細書中で、数値範囲を“ ～ ”を用いて表す場合は、“ ～ ”で示される上限、下限の数値も数値範囲に含むものとする。

[0027] (第1実施形態)

第1実施形態の画像撮像装置、及び画像撮像方法について、図面を参照して説明する。図1は、本実施形態の画像撮像装置10の構成図である。図1に示される、画像撮像装置10は、1回の撮影により、細胞から発光される異なる波長の蛍光を撮像することができるよう構成される。

[0028] 画像撮像装置10は、細胞Cに結合された蛍光色素を励起するための第1光源12と、細胞Cを収納する収納部42を有する容器40と、容器40を載置するためのテーブル14と、フィルター群24と、細胞Cとフィルター群24との間に配置された対物レンズ16と、細胞Cから発光される蛍光を撮像するための撮像素子26と、を備える。フィルター群24は、第1マルチバンドパスフィルター18、ダイクロイックミラー20及び第2マルチバンドパスフィルター22を含む。また、収納部42は、容器40の表面に形成される。また、図1の例では、容器40は、3つの収納部42を有する。ただし、収納部42の数は3つに限らず、2つ以下でも良いし、4つ以上でも良い。

[0029] 制御部28は、画像撮像装置10による撮像を制御する。制御部28は、テーブル14、第1光源12及び撮像素子26と電氣的に接続されている。制御部28は、テーブル14、第1光源12及び撮像素子26の動作を制御する。

[0030] 本実施形態においては、第1光源12と、フィルター群24と、撮像素子26とは、容器40の裏面側に配置される。したがって、撮像装置10は、

細胞Cから発光される異なる波長の蛍光を、容器40の裏面側から撮像することが可能である。

[0031] 但し、これに限定されることなく、第1光源12と、フィルター群24と、撮像素子26とは、容器40の表面側に配置されても良い。この場合、撮像装置10は、細胞Cから発光される複数の蛍光を、容器40の表面側から撮像することが可能である。

[0032] 画像撮像装置10により撮像される細胞Cは、抗原抗体反応により免疫染色されている。抗原抗体反応とは、抗体が相補的な構造を持つ抗原と特異的に結合することを意味する。免疫染色とは、細胞に存在する抗原に、蛍光色素を連結した抗体を結合させることを意味する。

[0033] 蛍光色素は、励起光により励起され蛍光を発光する。なお、励起光により発光する蛍光は、励起光の波長帯域に比べてより長波長側の波長帯域を有する。

[0034] 本実施形態においては、細胞Cは、免疫染色により、少なくとも複数種の蛍光色素が結合されている。複数種の蛍光色素は、それぞれ異なる波長帯域の励起光により励起され、それぞれ異なる波長の蛍光を発光する。

[0035] 免疫染色には、直接法と間接法とがある。直接法は、蛍光色素を直接抗体に結合し、抗原と反応させる方法である。一方、間接法は、検出すべき抗原に特異的に結合できる抗体（1次抗体）には蛍光色素を結合せず、その1次抗体に特異的に結合できる抗体（2次抗体）に蛍光色素を結合して検出する方法である。

[0036] 上述したように、細胞Cは、抗原抗体反応により免疫染色される。例えば、抗ヒトCD抗体として、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD14抗体、抗CD25抗体、抗CD127抗体等を例示することができる。蛍光色素として、4', 6-ジアミジノ-2'-フェニルインドールジハイドロクロライド（DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole）、ヨウ化プロピジウム（PI: Propidium iodide）、ピロニンY（Pyronin Y）、フルオレセインイソチオシアネート（

FITC: fluorescein isothiocyanate)、フィコエリスリン (PE: phycoerythrin)、アロフィコシアニン (APC: allophycocyanin)、テキサスレッド (TR (登録商標))、Hoechst 33342、7-アミノ-アクチノマイシンD (7-AAD)、Cy3 (2'-Deoxycytidine 5'-triphosphoric acid)、Cy5 (Sulfoindocyanine succinimidyl ester)、DRAQ5 (登録商標) (Biostatus社製)、Brilliant Violet 570、及びBrilliant Violet 421等を挙げることができる。

[0037] 細胞Cは、複数の収納部42を有する容器40の少なくとも一つの収納部42に収納され保持される。収納部42は、容器40を凹設して形成されている。収納部42は、開口44と側面46と平坦な保持面48を有している。平坦な保持面48は、細胞Cを保持する。収納部42の側面46は、保持面48から開口44に向かって広がる傾斜構造である。側面46を傾斜構造とすることにより、細胞Cを収納部42内に容易に収納させることができる。なお、保持面48は、細胞Cを保持する箇所が平坦であれば良い。

[0038] 収納部42の細胞Cの保持面48が平坦であるので、細胞Cを撮像する際に、細胞全体に焦点を合わせることが容易となり、細胞Cの撮像を確実に行うことが可能となる。

[0039] 容器40に用いられる材料としては、ポリメチルメタクリレートなどのポリメタクリル酸エステル、ポリカーボネート、ポリスチレン、ABS (Acrylonitrile、Butadiene、Styrene共重合剛性樹脂)、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレートなどの芳香族ポリエステル、ポリプロピレン、ポリシクロオレフィンなどの各種ポリオレフィン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリフェニレンサルファイド、ポリ乳酸、ポリパーフルオロアルコキシ樹脂のような熱可塑性剛性樹脂、ポリジメチルシロキサンなどの熱硬化性剛性樹脂、及びポリテトラフルオロエチレン等を用いること

が可能である。

[0040] 本実施形態の画像撮像装置 10 は、容器 40 を任意の位置に移動（例えば、X 方向、Y 方向、及び Z 方向）させるため、テーブル 14 と駆動装置（不図示）とを備えていることが好ましい。テーブル 14 と駆動装置とにより、容器 40 の細胞 C を収納する収納部 42 を、観察位置に移動させることができる。駆動装置は、テーブル 14 を、X 方向、Y 方向、及び Z 方向に移動させることが好ましい。

[0041] 第 1 光源 12 は、複数の波長の光を同時に発光することができる。第 1 光源 12 は、複数の波長の光を同時に発光することができれば、その構造、方式等は特に限定されない。第 1 光源 12 は、1 個の光源により構成され、1 個の光源から複数の波長の光が発光されても良い。第 1 光源 12 が波長の異なる光を発光する複数の光源により構成され、複数の光源から複数の波長の光が発光されても良い。また、同時とは、細胞 C を撮像する際に、複数の波長の光が含まれていることを意味し、複数の波長の光が同時に発光されても、別々に発光されても良い。

[0042] 第 1 光源 12 として、特に限定されないが、例えば、高圧水銀ランプ、高圧キセノンランプ、発光ダイオード、レーザダイオード、タングステンランプ、ハロゲンランプ、及び白色発光ダイオード等を用いることができる。第 1 光源 12 が複数の波長の光を同時に発光することができるので、細胞 C の複数種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を選択的に発光することが可能となる。

[0043] フィルター群 24 は、第 1 マルチバンドパスフィルター 18、ダイクロイックミラー 20 及び第 2 マルチバンドパスフィルター 22 を含んでいる。

[0044] 第 1 マルチバンドパスフィルター 18 は、第 1 光源 12 の発光側に対向する位置において、第 1 光源 12 からの光の進行方向に対して約 90° 傾けられて配置される。第 1 マルチバンドパスフィルター 18 は、励起フィルターとして機能する。励起フィルターは、第 1 光源 12 から発光される複数の波長の光のうち蛍光色素を励起する波長の光を選択的に透過させ、その他の波

長の光をカットする光学部材である。

- [0045] 励起フィルターを構成する第1マルチバンドパスフィルター18は、第1光源12から発光される複数の波長の光の中から、細胞Cに結合された蛍光色素を励起する複数の波長の励起光（少なくとも2以上の波長の励起光）のみを選択的に透過するよう構成される。第1マルチバンドパスフィルター18は、例えば、ガラス基板と、屈折率の異なる誘電体の多層膜とにより構成することが可能である。
- [0046] ダイクロイックミラー20は、第1マルチバンドパスフィルター18を透過した複数の波長の励起光の進行方向に対して約45°傾けられて配置される。ダイクロイックミラー20は、複数の波長の励起光を反射し、細胞Cに向けて照射するよう構成される。また、ダイクロイックミラー20は、複数の波長の励起光により励起された細胞Cに結合された複数種の蛍光色素が発光する異なる波長の蛍光を透過するよう構成される。すなわち、ダイクロイックミラー20は、励起光と蛍光とを分離するための光学部材である。
- [0047] 励起光により発光する蛍光は、励起光の波長帯域に比べて、長波長側の波長帯域を有するので、ダイクロイックミラー20を使用することにより、蛍光のみを透過させることが可能となる。ダイクロイックミラー20は、例えば、ガラス基板と、屈折率の異なる誘電体の多層膜とにより構成することが可能である。
- [0048] 第2マルチバンドパスフィルター22は、ダイクロイックミラー20を透過した異なる波長の蛍光の進行方向に対して約90°に傾けられて配置される。第2マルチバンドパスフィルター22は、蛍光フィルターとして機能する。蛍光フィルターは、細胞Cから発光される異なる波長の蛍光から必要な波長帯域の蛍光のみを透過し、その他の光をカットする光学部材である。
- [0049] 蛍光フィルターを構成する第2マルチバンドパスフィルター22は、励起光を透過させず、細胞Cから発光される異なる波長の蛍光のみを透過させることが可能である。第2マルチバンドパスフィルター22は、例えば、ガラス基板と、屈折率の異なる誘電体の多層膜とにより構成することが可能であ

る。

[0050] 対物レンズ16は、ダイクロイックミラー20から反射される励起光を集光し、かつ細胞Cから発光される蛍光を拡大させるため、フィルター群24と細胞Cとの間に配置される。対物レンズ16として、光学測定に使用されるレンズを用いることができる。

[0051] 撮像素子26は、第2マルチバンドパスフィルター22を透過した異なる波長の蛍光を撮像する。撮像素子26は、ダイクロイックミラー20を透過する異なる波長の蛍光の進行方向に対して約90°傾けられて配置される。撮像素子26は、受光した光を電気信号に変換する電子デバイスである。

[0052] 図2は、撮像素子26の部分拡大図である。撮像素子26は、図2に示されるように、複数の画素260を含んでいる。1個の画素260は、複数の副画素261、262、263、及び264を有している。すなわち、複数の副画素261、262、263、及び264により1個の画素260が構成される。

[0053] 本実施形態では、複数の副画素261、262、263、及び264の大きさが同じ大きさである場合を例示したが、複数の副画素261、262、263、及び264の大きさを適宜変更することができる。また、本実施形態では、1個の画素260は、4つの副画素261、262、263、及び264を有する場合を例示したが、1個の画素260は、3つの副画素を有しても良いし、5つ以上の副画素を有しても良い。

[0054] 撮像素子26の複数の副画素261、262、263、及び264により得られた蛍光の強度は、制御部28により演算処理され、1個の画素260としての蛍光の強度が算出される。

[0055] 例えば、撮像素子26を単板式のカラー撮像素子として機能させる場合、1個の画素260の上に赤色フィルター、緑色フィルター、及び青色フィルターを配列することにより、1個の画素260に複数の副画素261、262、263、及び264を含ませることができる。赤色フィルター、緑色フィルター、及び青色フィルターは、それぞれの色のみを透過させる光学フィ

ルターである。単板式のカラー撮像素子とは、赤色フィルター、緑色フィルター、及び青色フィルターを設けた１個の撮像素子において、カラー画像を取得する撮像素子である。

[0056] 赤色フィルター、緑色フィルター、及び青色フィルターを配列する際、例えば、副画素２６１、及び２６４に緑色フィルターを配列し、副画素２６２に青色フィルターを配列し、副画素２６３に赤色フィルターを配列することが好ましい。但し、これに限定されず、配列は適宜変更が可能である。

[0057] 副画素を構成する例として光学フィルターを示したが、これに限定されない。例えば、位相差画像を撮像するため、少しずつずらした回折格子を４個の副画素を１画素とする位相差カメラであっても良い。

[0058] 次に、上述のように構成された画像撮像装置１０による画像撮像方法について、第１光源１２が、緑色発光ダイオード、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードから構成される場合を例に説明する。

[0059] まず、細胞Ｃは、免疫染色により異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色される。次に、収納するステップでは、細胞Ｃは、平坦な表面に保持面４８を有する複数の収納部４２を有する容器４０の少なくとも１個の収納部４２の保持面４８に収納される。

[0060] 次に、発光するステップでは、第１光源１２を構成する緑色発光ダイオード、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードを同時に発光させる。これにより、第１光源１２から複数の波長の光を同時に発光させる。

[0061] 図３は、相対出力（％）を縦軸、波長（nm）を横軸とする、第１光源１２から同時に発光される複数の波長の光のスペクトルのグラフである。緑色発光ダイオードは４９０nm以上５６０nm以下の範囲にピーク波長を有する緑色光Ｇを発光する。また、青色発光ダイオードは４３０nm以上４９０nm以下の範囲にピーク波長を有する青色光Ｂを発光する。また、紫色発光ダイオードは３８０nm以上４３０nm以下の範囲にピーク波長を有する紫色光Ｖを発光する。

[0062] 第１光源１２から同時に発光される複数の波長の光は、緑色発光ダイオ-

ド、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードから発光される各色の光に限定されない。第1光源12から同時に発光される複数の波長の光は、細胞Cに結合される蛍光色素に対する励起光に応じて適宜選択することが可能である。

[0063] 本実施形態では、緑色光G、青色光B、及び紫色光Vの相対出力は、一定とされているが、限定されない。例えば、制御部28は、緑色発光ダイオード、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードの光量を、それぞれ独立に制御する。これにより、画像撮像装置10は、撮像対象である細胞Cから発光される蛍光の強度を変更でき、細胞Cから発光される蛍光をより精度良く撮像できる。

[0064] 次に、第1光源12から発光される複数の波長の光のうち細胞Cに結合される蛍光色素を励起する複数の波長の励起光は、第1マルチバンドパスフィルター18を透過する。図4は、透過率(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、第1マルチバンドパスフィルター18の分光スペクトルを示すグラフである。図4に示されるように、第1マルチバンドパスフィルター18は、緑色光G、青色光B、及び紫色光Vそれぞれの波長帯域より狭い波長帯域のみを透過させるF1G、F1B、及びF1Vの分光スペクトルを備え、トリプルバンドパスフィルターとして構成することができる。

[0065] 第1マルチバンドパスフィルター18は、第1光源12から発光される複数の波長の光の中から、3つの波長の励起光を透過する。図5は、相対出力(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、3つの励起光のスペクトルのグラフである。第1マルチバンドパスフィルター18は、緑色発光ダイオードから照射される緑色光Gより狭帯域の励起光EGを透過させる。また、第1マルチバンドパスフィルター18は、青色発光ダイオードから照射される青色光Bより狭帯域の励起光EBを透過させる。また、第1マルチバンドパスフィルター18は、紫色発光ダイオードから照射される紫色光Vより狭帯域の励起光EVを透過させる。

[0066] 図6は、透過率(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、ダイクロイッ

クミラー 20 の分光スペクトルを示すグラフである。図 6 に示されるように、ダイクロイックミラー 20 の分光特性によれば、励起光 E G、E B、及び E V に対応する波長帯域の透過率が低く設定されている。このため、複数の励起光 E G、E B、及び E V は、ダイクロイックミラー 20 により反射され、細胞 C に向けて照射される。

[0067] 複数の励起光 E G、E B、及び E V が、細胞 C に結合された複数種の蛍光色素を励起することにより、細胞 C に結合された複数種の蛍光色素が異なる波長の蛍光を発光する。図 7 は、相対出力 (%) を縦軸、波長 (nm) を横軸とする、3 つの励起光 E G、E B 及び E V により励起された複数種の蛍光色素から発光される 3 つの蛍光 $\lambda 1 G$ 、 $\lambda 1 B$ 及び $\lambda 1 V$ のスペクトルのグラフである。図 7 に示されるように、蛍光 $\lambda 1 G$ 、 $\lambda 1 B$ 及び $\lambda 1 V$ は、それぞれ、励起光 E G、E B 及び E V より長波長側の波長帯域を有する。

[0068] 蛍光 $\lambda 1 G$ 、 $\lambda 1 B$ 及び $\lambda 1 V$ は、対物レンズ 16、及び図 6 に示される分光特性を有するダイクロイックミラー 20 を透過し、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 に到達する。ここで、図 6 に示されるとおり、ダイクロイックミラー 20 の分光特性によれば、蛍光 $\lambda 1 G$ 、 $\lambda 1 B$ 及び $\lambda 1 V$ の波長帯域の透過率が高い。したがって、蛍光 $\lambda 1 G$ 、 $\lambda 1 B$ 及び $\lambda 1 V$ は、ダイクロイックミラー 20 を透過する。図 8 は、透過率 (%) を縦軸、波長 (nm) を横軸とする、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 の分光スペクトルを示すグラフである。図 8 に示されるように、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 は、蛍光 $\lambda 1 G$ 、 $\lambda 1 B$ 及び $\lambda 1 V$ の波長帯域より狭い波長帯域の光を透過させる F 2 G、F 2 B 及び F 2 V の分光スペクトルを備え、トリプルバンドパスフィルターとして構成することができる。

[0069] 細胞 C から発光されダイクロイックミラー 20 を透過した蛍光 $\lambda 1 G$ は、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 を透過することにより、必要ない波長帯域の光がカットされる。細胞 C から発光されダイクロイックミラー 20 を透過した蛍光 $\lambda 1 B$ は、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 を透過することにより、必要ない波長帯域の光がカットされる。細胞 C から発光されダイ

クロイックミラー 20 を透過した蛍光 $\lambda 1 V$ は、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 を透過することにより、必要ない波長帯域の光がカットされる。図 9 は、相対出力 (%) を縦軸、波長 (nm) を横軸とする、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 を透過した蛍光 $\lambda 2 G$ 、 $\lambda 2 B$ 及び $\lambda 2 V$ のスペクトルのグラフである。蛍光 $\lambda 1 G$ は、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 により不要な波長帯域がカットされ、蛍光 $\lambda 1 G$ より波長帯域が狭い蛍光 $\lambda 2 G$ が第 2 マルチバンドパスフィルター 22 から出力される。また、蛍光 $\lambda 1 B$ は、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 により不要な波長帯域がカットされ、蛍光 $\lambda 1 B$ より波長帯域が狭い蛍光 $\lambda 2 B$ が第 2 マルチバンドパスフィルター 22 から出力される。また、蛍光 $\lambda 1 V$ は、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 により不要な波長帯域がカットされ、蛍光 $\lambda 1 V$ より波長帯域が狭い蛍光 $\lambda 2 V$ が第 2 マルチバンドパスフィルター 22 から出力される。

[0070] 次に、撮像するステップでは、第 2 マルチバンドパスフィルター 22 を透過した蛍光 $\lambda 2 G$ 、 $\lambda 2 B$ 及び $\lambda 2 V$ は、1 画素に複数の副画素を有する撮像素子 26 により撮像される。本実施形態では、撮像素子 26 は、赤色フィルター、緑色フィルター及び青色フィルターにより副画素を構成する単板式のカラー撮像素子を用いることができる。図 10 は、相対出力 (%) を縦軸、波長 (nm) を横軸とする、副画素を構成する赤色フィルター、緑色フィルター及び青色フィルターを有する撮像素子 26 の感度特性のグラフである。例えば、赤色フィルターは 555 nm 以上 700 nm 以下の波長帯域の光を透過し、緑色フィルターは 470 nm 以上 605 nm 以下の波長帯域の光を透過し、青色フィルターは 375 nm 以上 510 nm 以下の波長帯域の光を透過する。但し、赤色フィルター、緑色フィルター及び青色フィルターが透過する波長帯域は、適宜選択することができる。

[0071] 撮像素子 26 により撮像された蛍光の強度が、例えば、制御部 28 に入力され、記憶される。制御部 28 により蛍光の強度が演算処理され、カラーの画像が取得される。

[0072] 図 1 1 は、撮像素子 2 6 により取得された蛍光の強度に基づいて制御部 2 8 により取得された細胞 C から発光された蛍光の画像の概念図である。例えば、白血球 6 0 と、有核赤血球 7 0 と、赤血球 8 0 が表示されている。白血球 6 0 においては、その表面 6 2 は蛍光色素により青色に発光し、内部の核 6 4 は蛍光色素により赤色に発光している。有核赤血球 7 0 においては、その表面 7 2 は蛍光色素により緑色に発光し、内部の核 7 4 は蛍光色素により赤色に発光している。赤血球（幼弱） 8 0 においては、その表面 8 2 は蛍光色素により緑色に発光している。一方、内部の核を有していないので、赤血球 8 0 は赤色に発光していない。

[0073] 本実施形態では、上述した、細胞 C から発光される異なる波長の蛍光を 1 回の撮影により、同時に撮像することができるので、細胞 C の撮像時間を短縮することができる。

[0074] （第 2 実施形態）

図 1 2 に示される第 2 実施形態の画像撮像装置、及び画像撮像方法について、図面を参照して説明する。画像撮像装置 1 0 は、1 回の撮影により、細胞からの複数の蛍光と明視野像を撮像することができるよう構成される。なお第 1 実施形態の構成と同様の構成には同一符号を付して説明を省略する場合がある。

[0075] 画像撮像装置 1 0 は、細胞 C に結合された蛍光色素を励起するための第 1 光源 1 2 と、細胞 C を収納する収納部 4 2 を有する容器 4 0 と、容器 4 0 を載置するためのテーブル 1 4 と、フィルター群 2 4 と、細胞 C とフィルター群 2 4 との間に配置された対物レンズ 1 6 と、細胞 C を透過する透過光を細胞 C に照射する第 2 光源 5 0 と、細胞 C から発光される蛍光及び細胞 C を透過した透過光を撮像するための撮像素子 2 6 と、を備える。本実施形態においても、実施形態 1 と同様に、フィルター群 2 4 は、第 1 マルチバンドパスフィルター 1 8、ダイクロイックミラー 2 0 及び第 2 マルチバンドパスフィルター 2 2 を含む。また、収納部 4 2 は、容器 4 0 の表面に形成される。また、図 1 2 の例では、容器 4 0 は、3 つの収納部 4 2 を有する。ただし、収

納部 42 の数は 3 つに限らず、2 つ以下でも良いし、4 つ以上でも良い。また、第 2 光源 50 は、容器 40 の表面側に配置され、第 1 光源 12 は、容器 40 の裏面側に配置される。すなわち、第 2 光源 50 は、容器 40 に形成される収納部 42 に対して第 1 光源とは反対側に配置される。

[0076] 制御部 28 は、画像撮像装置 10 による撮像を制御する。制御部 28 は、テーブル 14、第 1 光源 12、撮像素子 26 及び第 2 光源 50 と電氣的に接続されている。制御部 28 はテーブル 14、第 1 光源 12、撮像素子 26 及び第 2 光源 50 の動作を制御する。

[0077] 本実施形態では、第 1 実施形態と同様に異なる波長の蛍光を、容器 40 の裏面側から撮像することが可能である。さらに、明視野像も容器 40 の裏面側から撮像することが可能である。但し、これに限定されることなく、細胞 C から発光される異なる波長の蛍光、及び細胞 C の明視野像を、容器 40 の表面側から撮像することが可能である。

[0078] 第 1 実施形態と同様に、第 1 光源 12 は、複数の波長の光を同時に発光することができる。第 1 光源 12 は、複数の波長の光を同時に発光することができれば、その構造、方式等は特に限定されない。

[0079] 第 1 光源 12 は、緑色発光ダイオード、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードの群から選択される 2 つの発光ダイオードを含むことが好ましい。2 つの発光ダイオードから波長の異なる光を発光することにより、細胞 C に結合された蛍光色素から異なる 2 つの波長の蛍光を発光させることができる。

[0080] 第 2 光源 50 は、細胞 C の蛍光色素を励起させる励起光、及び蛍光色素から発光される蛍光と異なる波長の光を発光することができれば、その構造、方式等は特に限定されない。第 2 光源 50 として、特に限定されないが、例えば、高圧水銀ランプ、高圧キセノンランプ、発光ダイオード、レーザダイオード、タングステンランプ、ハロゲンランプ、白色発光ダイオード等を用いることができる。第 2 光源 50 から発光される光の波長帯域が細胞 C の蛍光色素を励起する励起光または蛍光色素から発光される蛍光と同じ波長を含

む場合、細胞Cと第2光源50との間にバンドパスフィルター（不図示）を設けることにより、細胞Cの蛍光色素を励起する励起光及び蛍光色素から発光される蛍光と異なる波長の光を細胞Cに照射することができる。

[0081] 第1実施形態と同様に、フィルター群24は、第1マルチバンドパスフィルター18、ダイクロイックミラー20及び第2マルチバンドパスフィルター22を含んでいる。

[0082] 第1マルチバンドパスフィルター18は光学部材である励起フィルターとして機能し、ダイクロイックミラー20は、励起光と蛍光を分離するための光学部材として機能し、第2マルチバンドパスフィルター22は光学部材である蛍光フィルターとして機能する。

[0083] さらに、第2実施形態では、ダイクロイックミラー20、及び第2マルチバンドパスフィルター22は、第2光源50から照射され細胞Cを透過した透過光を透過する。細胞Cを透過した第2光源50からの透過光が明視野像を構成する。また、透過光光源である第2光源50の直前に位相差用コンデンサ（ドーナツ型スリット）を配置し、対物レンズに位相リングを追加した位相差観察用レンズに変更して、明視野像を位相差像として取得することもできる。

[0084] 対物レンズ16は、ダイクロイックミラー20から照射される励起光を集光し、かつ細胞Cから発光される蛍光、及び透過光を拡大させるため、フィルター群24と細胞Cとの間に配置される。対物レンズ16として、光学測定に使用されるレンズを用いることができる。

[0085] 撮像素子26は、第2マルチバンドパスフィルター22を透過した異なる波長の蛍光と一つの波長の透過光とを撮像する。撮像素子26は、第1実施形態と同様の構成にすることができ、図2に示されるように、複数の画素260を含んでいる。1個の画素260は、複数の副画素261、262、263、及び264を有している。すなわち、複数の副画素261、262、263、及び264により1個の画素260が構成される。なお、本実施形態にあっても、第1実施形態と同様に、複数の副画素261、262、26

3、及び264の大きさを適宜変更しても良い。また、1個の画素260は、3つの副画素を有しても良いし、5つ以上の副画素を有しても良い。

[0086] 次に、上述のように構成された画像撮像装置10による画像撮像方法について、第1光源12が、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードを含む光源であり、第2光源50が赤色発光ダイオードである場合を例に説明する。まず、細胞Cは、蛍光色素で染色され、保持面48に保持される。

[0087] 発光するステップでは、第1光源12を構成する青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードを同時に発光させることにより、第1光源12から複数の波長の光を同時に発光させる。

[0088] 図13は、相対出力(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、第1光源12から同時に発光される複数の波長の光のスペクトルのグラフである。青色発光ダイオードは470nmのピーク波長を有する青色光Bを発光する。また、紫色発光ダイオードは405nmのピーク波長を有する紫色光Vを発光する。

[0089] 第1光源12から同時に発光される複数の波長の光は、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードから発光される各色の光に限定されない。細胞Cに結合される蛍光色素に対する励起光に応じて適宜選択することが可能である。

[0090] 第1実施形態と同様に、制御部28は、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードの光量を、それぞれ独立に制御することが可能である。

[0091] 次に、第1光源12から発光される複数の波長の光のうち細胞Cに結合される蛍光色素を励起する複数の波長帯域の励起光は、第1マルチバンドパスフィルター18を透過する。図14は、透過率(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、第1マルチバンドパスフィルター18の分光スペクトルを示すグラフである。図14に示されるように、第1マルチバンドパスフィルター18は、青色光B、及び紫色光Vそれぞれの波長帯域より狭い波長帯域のみを透過させるF1B、及びF1Vの分光スペクトルを備え、デュアルバンドパスフィルターとして構成することができる。なお、後述の透過光のスペ

クトルと重なることがなければ図4のように緑光F 1 Gの分光スペクトルがあっても良い。

[0092] 第1マルチバンドパスフィルタ18は、第1光源12から発光される複数の波長の光の中から、2つの波長の励起光を透過させる。図15は、相対出力(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、2つの励起光のスペクトルのグラフである。第1マルチバンドパスフィルタ18は、青色発光ダイオードから照射される青色光Bより狭帯域の励起光EBを透過させる。また、第1マルチバンドパスフィルタ18は、紫色発光ダイオードから照射される紫色光Vより狭帯域の励起光EVを透過させる。

[0093] 図16は、透過率(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、ダイクロイックミラー20の分光スペクトルを示すグラフである。図16に示されるように、ダイクロイックミラー20の分光特性によれば、励起光EB、及びEVに対応する波長帯域の透過率が低く設定されているので、複数の励起光EB、及びEVはダイクロイックミラー20により反射され、細胞Cに向けて照射される。なお、後述の透過光のスペクトルと重なることがなければ図6のように520nm～550nmに透過しない領域があっても良い。

[0094] 複数の励起光EB、及びEVが、細胞Cに結合された複数種の蛍光色素を励起することにより、細胞Cに結合された複数種の蛍光色素が異なる波長の蛍光を発光する。図17は、相対出力(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、2つの励起光EB、及びEVにより励起された複数種の蛍光色素から発光される蛍光λ1B及びλ1Vと、第2光源50からの透過光Rのスペクトルのグラフである。図17に示されるように、蛍光λ1B及びλ1Vは、それぞれ、励起光EB及びEVより長波長側の波長帯域を有する。さらに、第2光源50からの透過光Rは、蛍光λ1B及びλ1Vとは異なる波長帯域を有することが理解できる。透過光R、蛍光λ1B及びλ1Vが異なる波長帯域を有しているので、後述するように、撮像素子26において、2つの蛍光と1つの透過光を撮像することができる。

[0095] 蛍光λ1B及びλ1V、透過光Rは、対物レンズ16、及び図16に示さ

れる分光特性を有するダイクロイックミラー20を透過し、第2マルチバンドパスフィルター22に到達する。ここで、図16に示されるとおり、ダイクロイックミラー20の分光特性よれば、蛍光 $\lambda 1B$ 、 $\lambda 1V$ 及び透過光Rの波長帯域の透過率が高い。したがって、蛍光 $\lambda 1B$ 、 $\lambda 1V$ 及び透過光Rは、ダイクロイックミラー20を透過する。図18は、透過率(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、第2マルチバンドパスフィルター22の分光スペクトルを示すグラフである。図18に示されるように、第2マルチバンドパスフィルター22は、蛍光 $\lambda 1B$ 及び $\lambda 1V$ と透過光Rの波長帯域より狭い波長帯域のみを透過させるF2B、F2V及びFRの分光スペクトルを備え、トリプルバンドパスフィルターとして構成することができる。

[0096] 細胞Cから発光されダイクロイックミラー20を透過した蛍光 $\lambda 1B$ は、第2マルチバンドパスフィルター22を透過することにより、必要ない波長帯域の光がカットされる。細胞Cから発光されダイクロイックミラー20を透過した蛍光 $\lambda 1V$ は、第2マルチバンドパスフィルター22を透過することにより、必要ない波長帯域の光がカットされる。細胞C及びダイクロイックミラー20を透過した透過光Rは、第2マルチバンドパスフィルター22を透過することにより、必要ない波長帯域の光がカットされる。図19は、相対出力(%)を縦軸、波長(nm)を横軸とする、第2マルチバンドパスフィルター22を透過した蛍光及び透過光のスペクトルのグラフである。蛍光 $\lambda 1B$ は、第2マルチバンドパスフィルター22により不要な波長帯域がカットされ、蛍光 $\lambda 1B$ より波長帯域が狭い蛍光 $\lambda 2B$ が第2マルチバンドパスフィルター22から出力される。また、蛍光 $\lambda 1V$ は、第2マルチバンドパスフィルター22により不要な波長帯域がカットされ、蛍光 $\lambda 1V$ より波長帯域が狭い蛍光 $\lambda 2V$ が第2マルチバンドパスフィルター22から出力される。また、透過光Rは、第2マルチバンドパスフィルター22により不要な波長帯域がカットされ、透過光Rより波長帯域が狭い透過光 λR が第2マルチバンドパスフィルター22から出力される。

[0097] 撮像するステップでは、第2マルチバンドパスフィルター22を透過した

蛍光 λ 2B及び λ 2Vと、透過光 λ Rは、1画素に複数の副画素を有する撮像素子26により撮像される。撮像素子26として、第1実施形態と同様の赤色フィルター、緑色フィルター及び青色フィルターとを有する単板式のカラー撮像素子を用いることができる。

[0098] 撮像素子26により撮像された蛍光の強度と透過光の強度とが、例えば、制御部28に入力され、記憶される。制御部28により蛍光の強度と透過光の強度とが演算処理され、カラーの画像が取得される。

[0099] 図20は、撮像素子26により取得された蛍光の強度に基づいて制御部28により取得された細胞Cから発光された蛍光と位相差像の画像の概念図である。図20には、有核赤血球70が表示されている。有核赤血球70では、幼弱な赤血球の蛍光は赤血球全体に均一に蛍光しないで局所的に蛍光する場合がある。この場合、蛍光では有核赤血球70の形状を把握することができない。このような場合に明視野像を撮影し重ねることで形状も知ることができる。明視野像はさらに位相差像を得ることでより形状の把握が明瞭になるので好ましい。

[0100] 図20においては、有核赤血球70の内の核74が、例えば、蛍光色素により青色に発光し、有核赤血球70の内のHbF76（胎児ヘモグロビン）が、蛍光色素により緑色に発光している。有核赤血球70の外形形状79については、透過光を利用して位相差像が撮像されている。

[0101] 本実施形態では、上述した、細胞Cから発光される異なる波長の蛍光と第2光源からの透過光を1回の撮影により、同時に撮像することができるので、細胞Cの撮像時間を短縮することができる。

符号の説明

- [0102] 10 画像撮像装置
12 第1光源
14 テーブル
16 対物レンズ
18 第1マルチバンドパスフィルター

20 ダイクロイックミラー

22 第2マルチバンドパスフィルター

24 フィルター群

26 撮像素子

28 制御部

40 容器

42 収納部

44 開口

46 側面

48 保持面

50 第2光源

60 白血球

62、72、82 表面

64、74 核

70 有核赤血球

76 HbF

78 外形形状

80 赤血球

260 画素

261、262、263、264 副画素

EB、EG、EV 励起光

R、 λR 透過光 $\lambda 1 B$ 、 $\lambda 1 G$ 、 $\lambda 1 V$ 、 $\lambda 2 B$ 、 $\lambda 2 G$ 、 $\lambda 2 V$ 蛍光

請求の範囲

- [請求項1] 異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な保持面で保持して収納する少なくとも一つの収納部と、
- 複数の波長の光を同時に発光する第1光源と、
- 前記第1光源から発光される前記複数の波長の光のうち前記複数種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を選択的に透過させる第1マルチバンドパスフィルターと、前記第1マルチバンドパスフィルターを透過した前記複数の波長の励起光を前記細胞に向けて照射させ前記複数の波長の励起光により前記細胞から発光される前記異なる波長の蛍光を透過させるダイクロイックミラーと、前記ダイクロイックミラーを透過した前記異なる波長の蛍光を透過させる第2マルチバンドパスフィルターと、を含むフィルター群と、
- 前記複数の波長の励起光を集光し前記異なる波長の蛍光を拡大させる対物レンズと、
- 前記第2マルチバンドパスフィルターを透過した前記異なる波長の蛍光を撮像する1画素に複数の副画素を有する撮像素子と、
- を有する画像撮像装置。
- [請求項2] 前記撮像素子がカラー撮像素子である請求項1に記載の画像撮像装置。
- [請求項3] 前記カラー撮像素子が、赤色フィルター、緑色フィルター、及び青色フィルターを有する単板式の撮像素子である請求項2に記載の画像撮像装置。
- [請求項4] 前記第1光源と、前記フィルター群と、前記撮像素子とが、前記収納部に対して前記保持面とは反対の側に配置される請求項1から3の何れか一項に記載の画像撮像装置。
- [請求項5] 前記第1マルチバンドパスフィルター、及び前記第2マルチバンドパスフィルターは、トリプルバンドパスフィルターで構成される請求項1から4の何れか一項に記載の画像撮像装置。

- [請求項6] 前記第1光源は、複数の光源により構成される請求項1に記載の画像撮像装置。
- [請求項7] 前記複数の光源の光量を、それぞれ独立に制御する制御部を有する請求項6に記載の画像撮像装置。
- [請求項8] 前記第1光源が、少なくとも緑色発光ダイオード、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードを含む光源である請求項6または7に記載の画像撮像装置。
- [請求項9] 前記収納部は、複数の収納部を有する容器の一つの収納部である請求項1から8の何れか一項に記載の画像撮像装置。
- [請求項10] 異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な保持面で保持して収納する少なくとも一つの収納部と、
複数の波長の光を同時に発光する第1光源と、
前記収納部に対して前記第1光源とは反対の側に配置された、一つの波長の透過光を発光する第2光源と、
前記第1光源から発光される前記複数の波長の光のうち前記複数種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を選択的に透過させる第1マルチバンドパスフィルターと、前記第1マルチバンドパスフィルターを透過した前記複数の波長の励起光を前記細胞に向けて照射させ前記複数の波長の励起光により前記細胞から発光される前記異なる波長の蛍光を透過させかつ前記第2光源から発光される前記一つの波長の透過光を透過させるダイクロイックミラーと、前記ダイクロイックミラーを透過した前記異なる波長の蛍光及び前記一つの波長の透過光を透過させる第2マルチバンドパスフィルターと、を含むフィルター群と、
前記複数の波長の励起光を集光し前記異なる波長の蛍光及び前記一つの波長の透過光を拡大させる対物レンズと、
前記第2マルチバンドパスフィルターを透過した前記異なる波長の蛍光と前記一つの波長の透過光を撮像する1画素に複数の副画素を有

する撮像素子と、

を有する画像撮像装置。

[請求項11] 前記撮像素子がカラー撮像素子である請求項10に記載の画像撮像装置。

[請求項12] 前記カラー撮像素子が、赤色フィルター、緑色フィルター、及び青色フィルターを有する単板式の撮像素子である請求項11に記載の画像撮像装置。

[請求項13] 前記第1光源が、緑色発光ダイオード、青色発光ダイオード、及び紫色発光ダイオードの群から選択される2つの発光ダイオードを含む光源である請求項10から12の何れか一項に記載の画像撮像装置。

[請求項14] 異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な表面に保持する保持面を有する少なくとも一つの収納部に収納するステップと、

第1光源から複数の波長の光を同時に発光するステップと、

前記第1光源から発光される前記複数の波長の光のうち前記複数種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を第1マルチバンドパスフィルターに選択的に透過させ、ダイクロイックミラーにより前記第1マルチバンドパスフィルターを透過した前記複数の波長の励起光を前記細胞に向けて照射させ、前記複数の波長の励起光により前記細胞から発光される前記異なる波長の蛍光を前記ダイクロイックミラーを透過させ、前記ダイクロイックミラーを透過した前記異なる波長の蛍光を第2マルチバンドパスフィルターを透過させるステップと、

前記第2マルチバンドパスフィルターを透過した前記異なる波長の蛍光を1画素に複数の副画素を有する撮像素子により撮像するステップと、

を有する画像撮像方法。

[請求項15] 異なる波長の蛍光を発光する複数種の蛍光色素で染色された細胞を平坦な表面に保持する保持面を有する少なくとも一つの収納部に収納

するステップと、

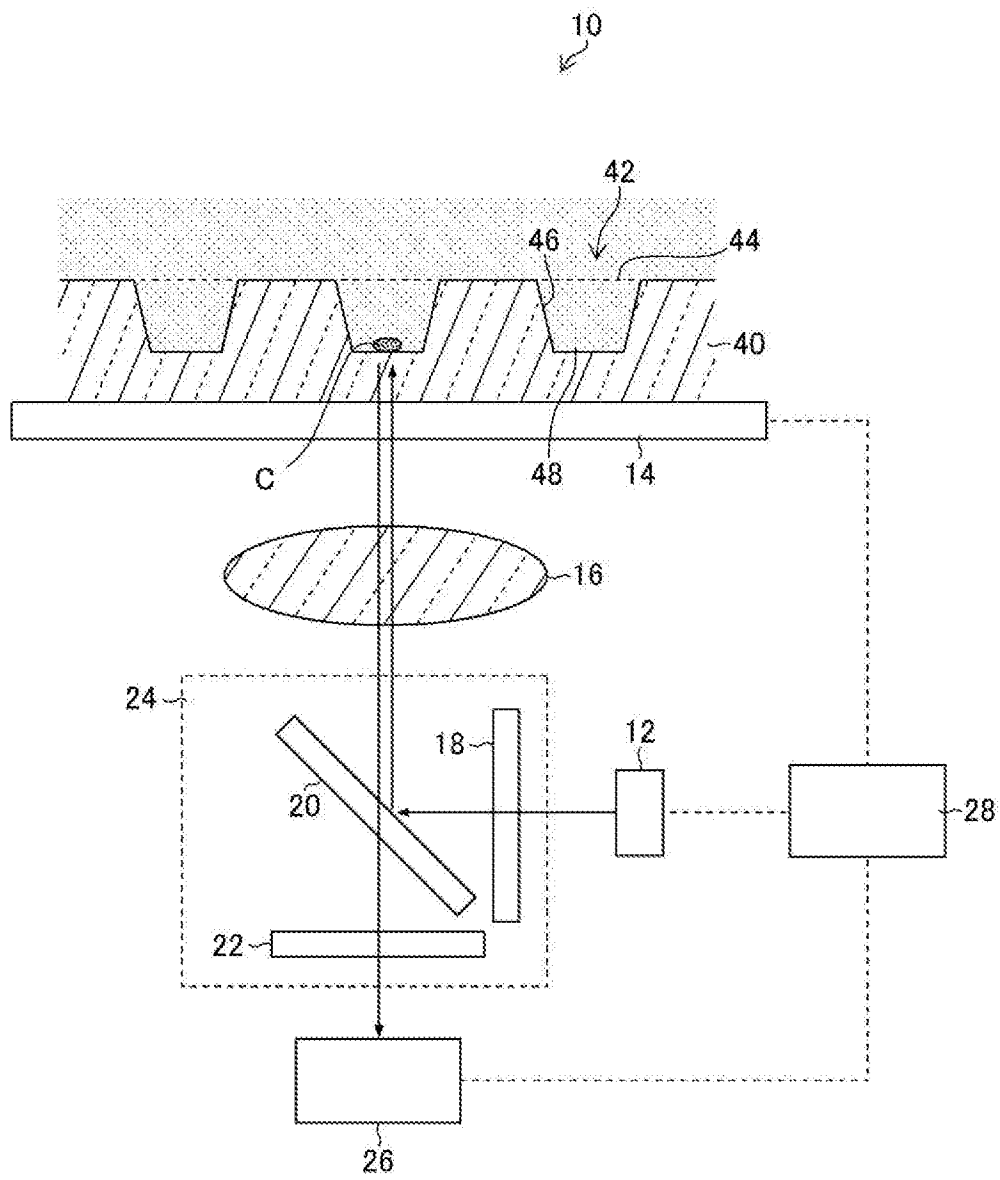
第1光源から複数の波長の光を同時に発光し、前記収納部に対して前記第1光源と反対の側に配置される第2光源から一つの波長の透過光を発光するステップと、

前記第1光源から発光される前記複数の波長の光のうち前記複数種の蛍光色素を励起する複数の波長の励起光を第1マルチバンドパスフィルターに選択的に透過し、ダイクロイックミラーにより前記第1マルチバンドパスフィルターを透過した前記複数の波長の励起光を前記細胞に向けて照射させ、前記複数の波長の励起光により前記細胞から発光される前記異なる波長の蛍光と前記第2光源から発光される前記一つの波長の透過光とを前記ダイクロイックミラーを透過させ、前記ダイクロイックミラーを透過した前記異なる波長の蛍光と前記第2光源から発光される一つの波長の透過光とを第2マルチバンドパスフィルターを透過させるステップと、

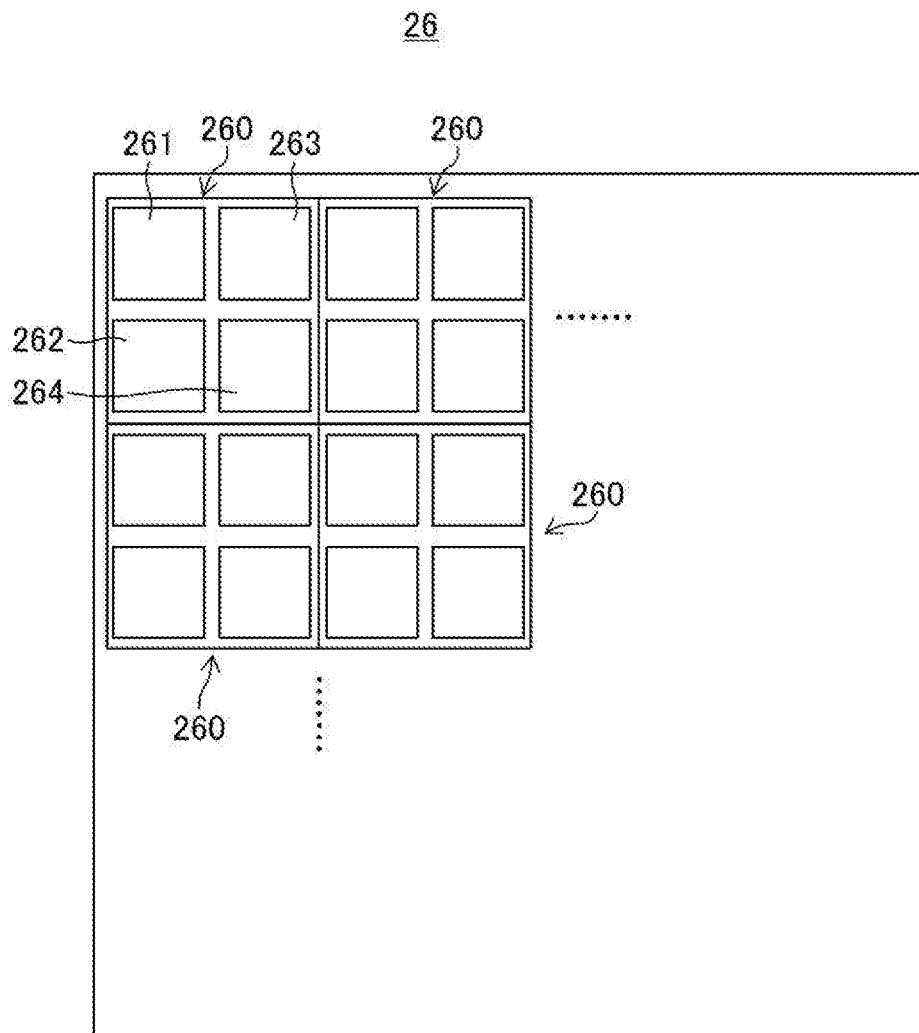
前記第2マルチバンドパスフィルターを透過した前記異なる波長の蛍光と前記第2光源から一つの波長の透過光とを1画素に複数の副画素を有する撮像素子により撮像するステップと、

を有する画像撮像方法。

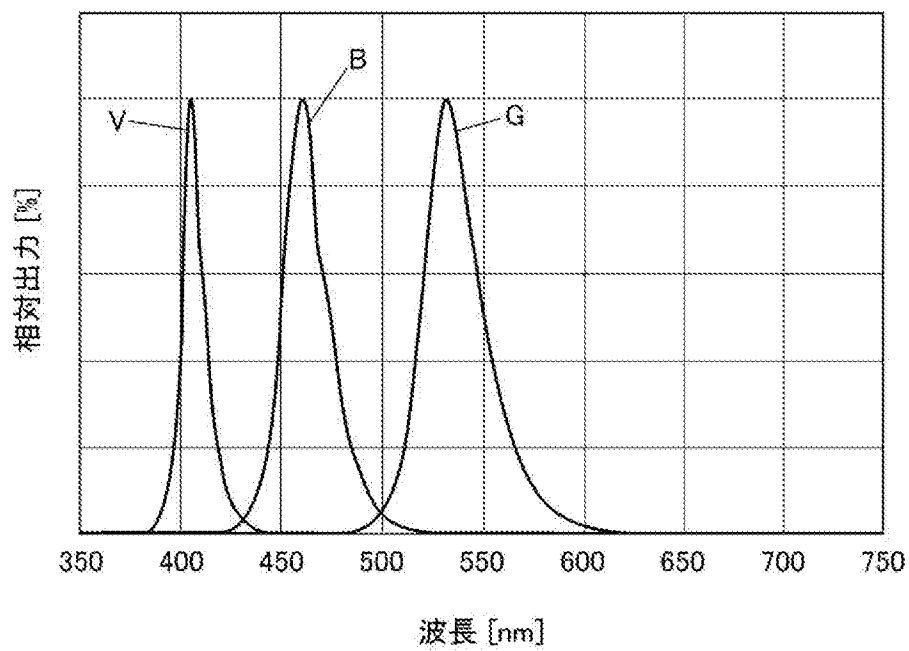
[図1]



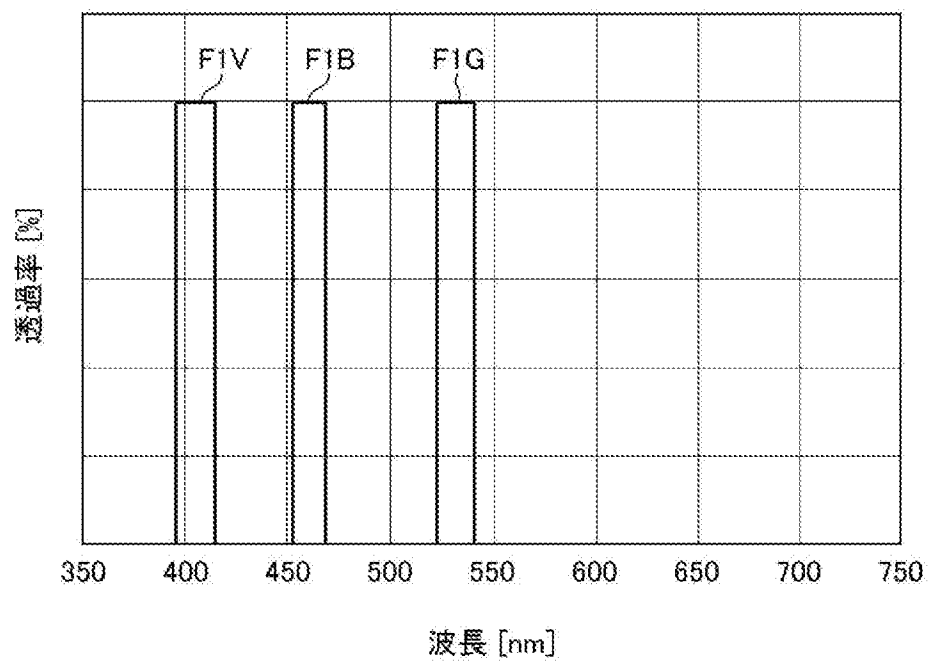
[図2]



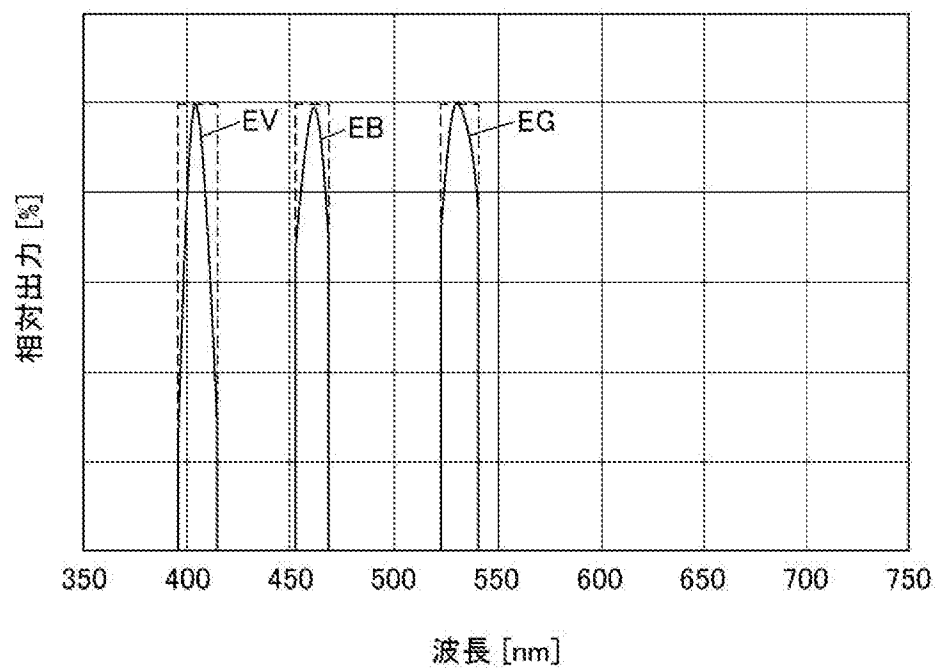
[図3]



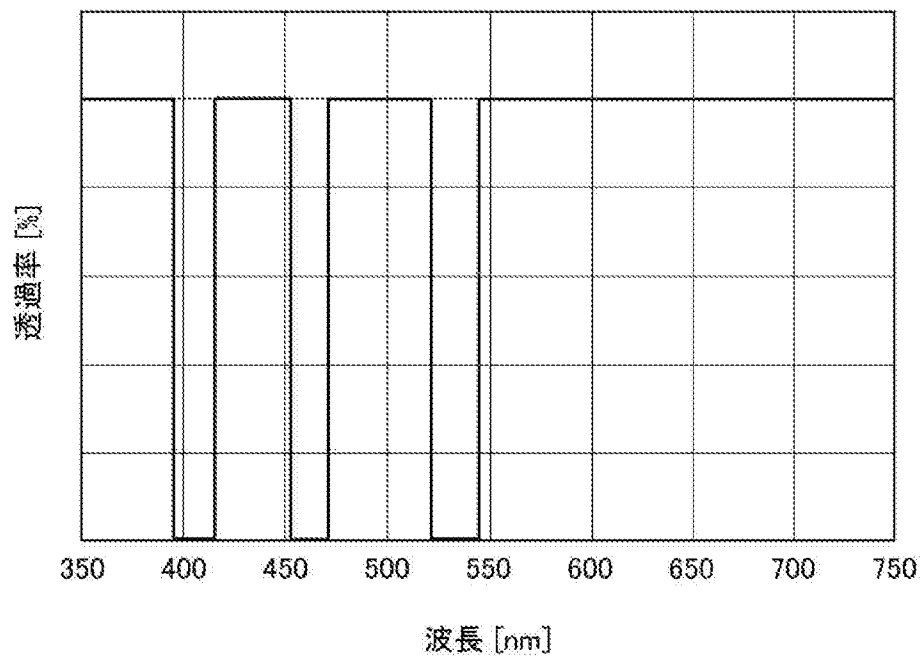
[図4]



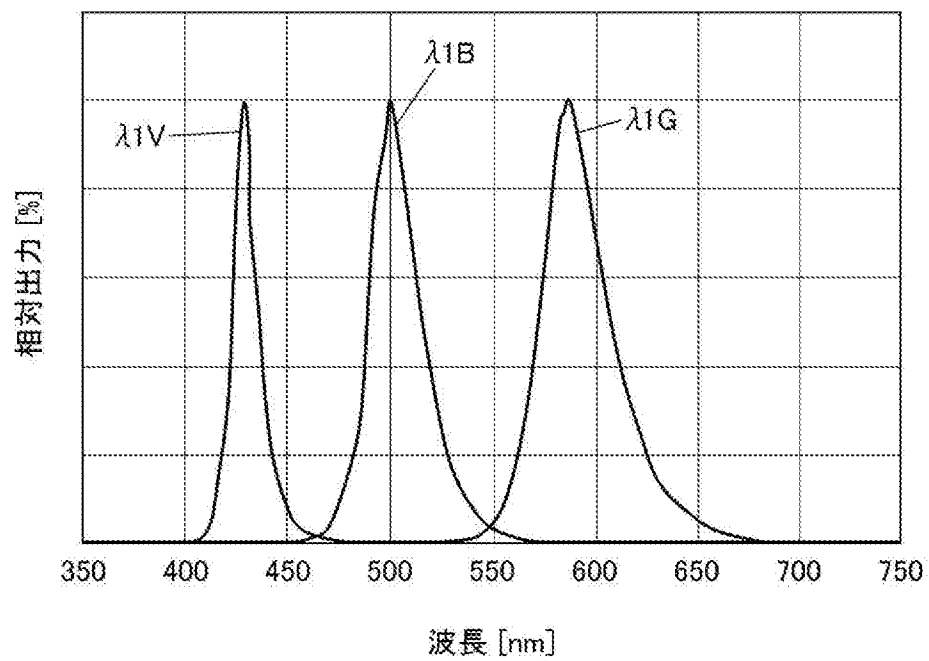
[図5]



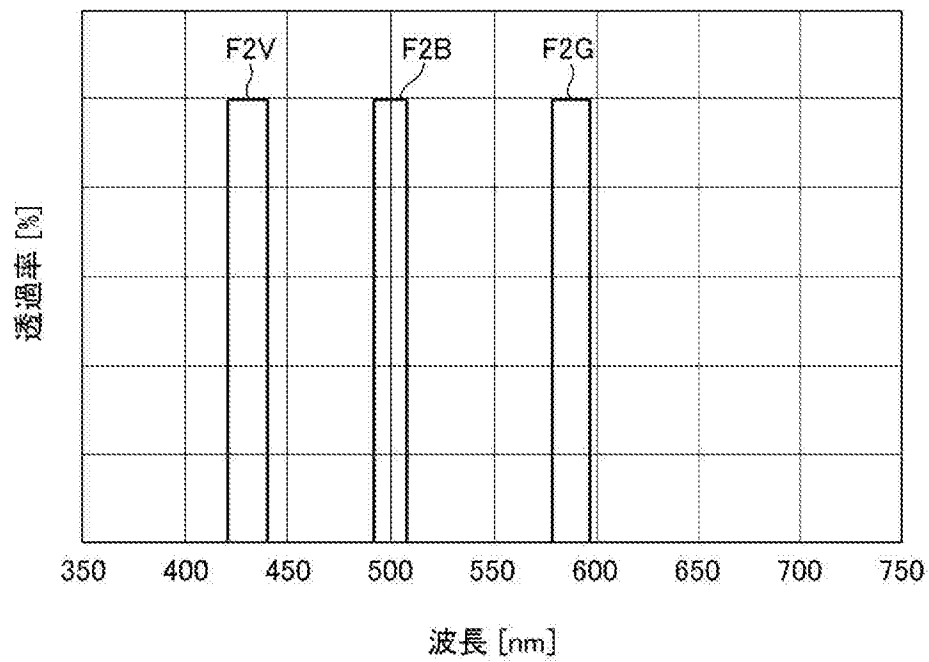
[図6]



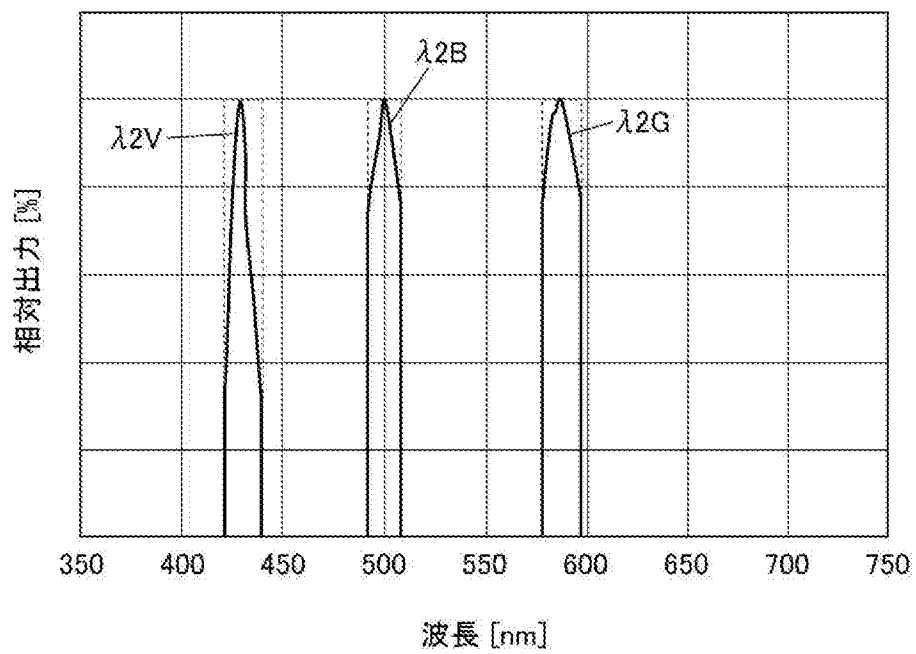
[図7]



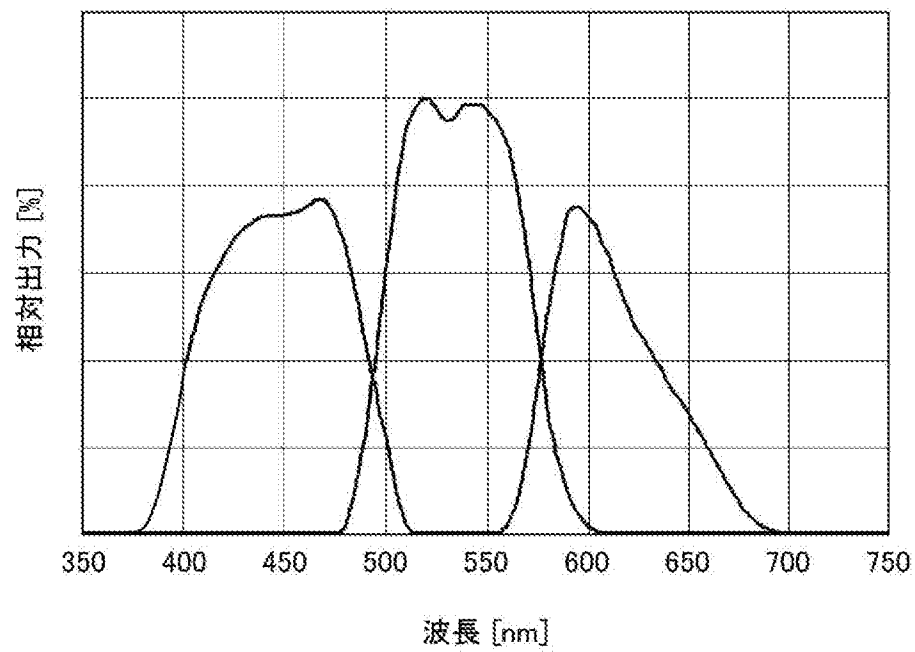
[図8]



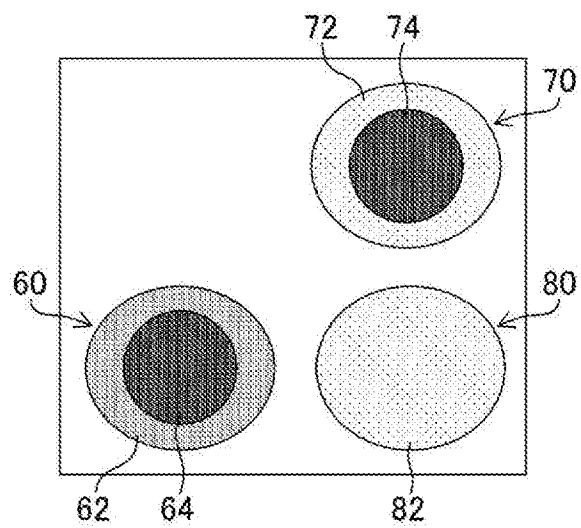
[図9]



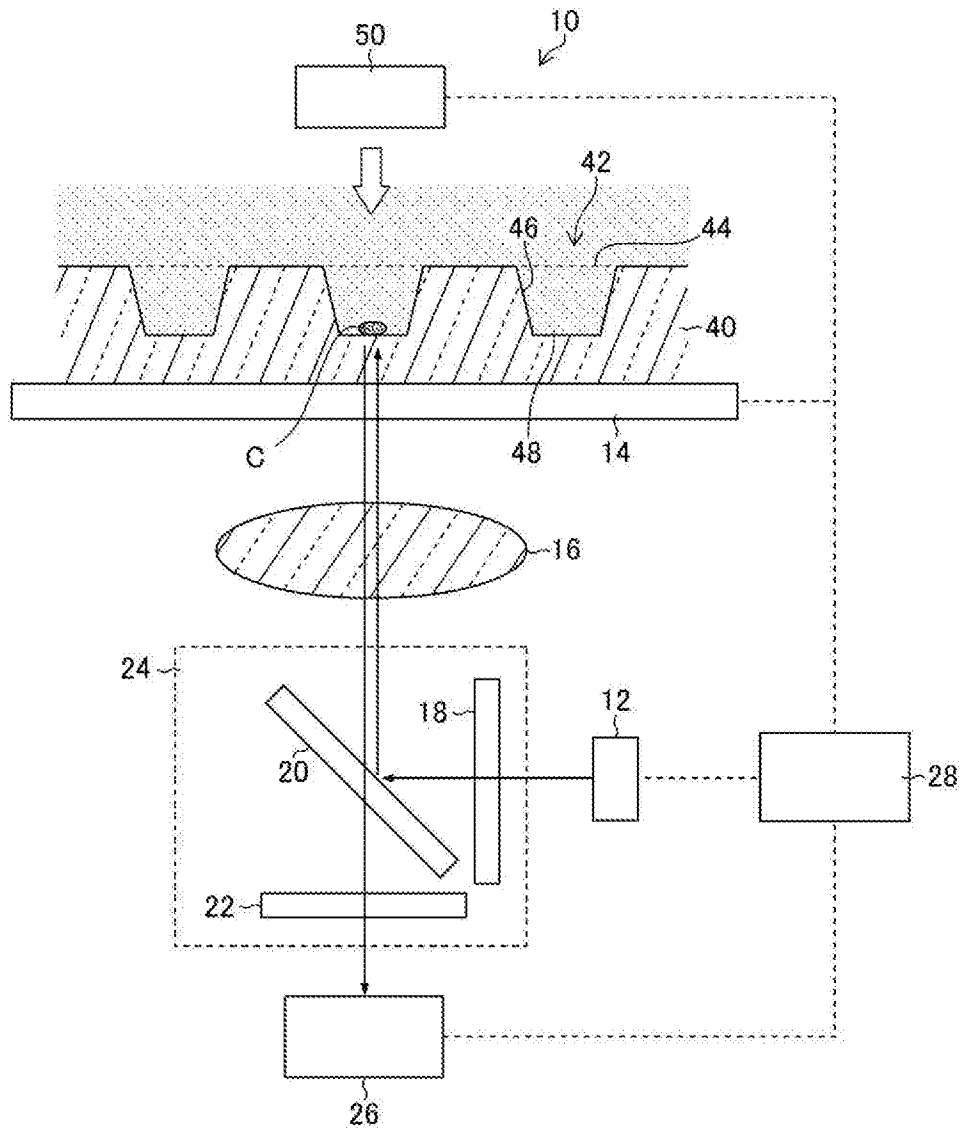
[図10]



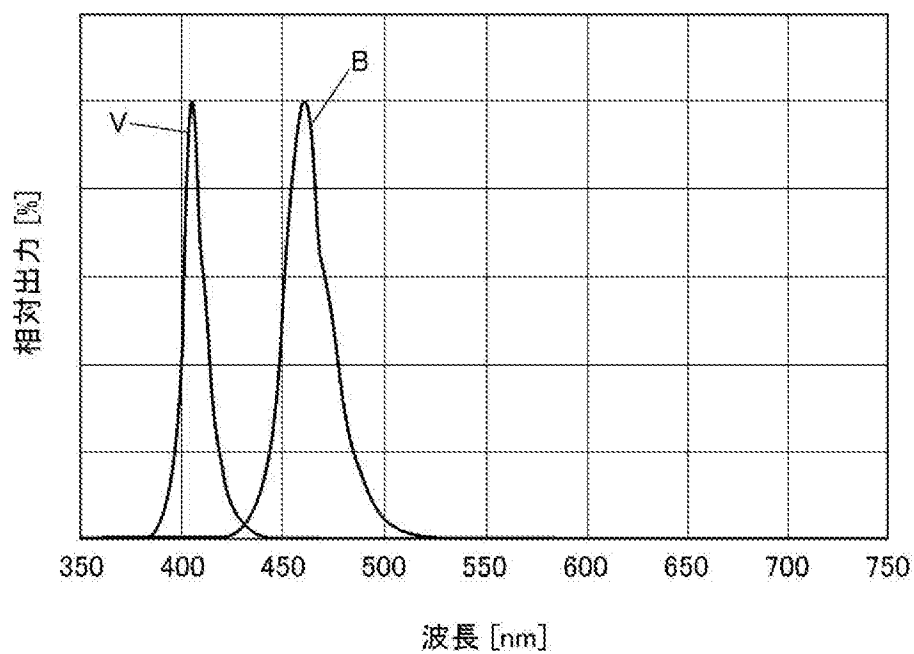
[図11]



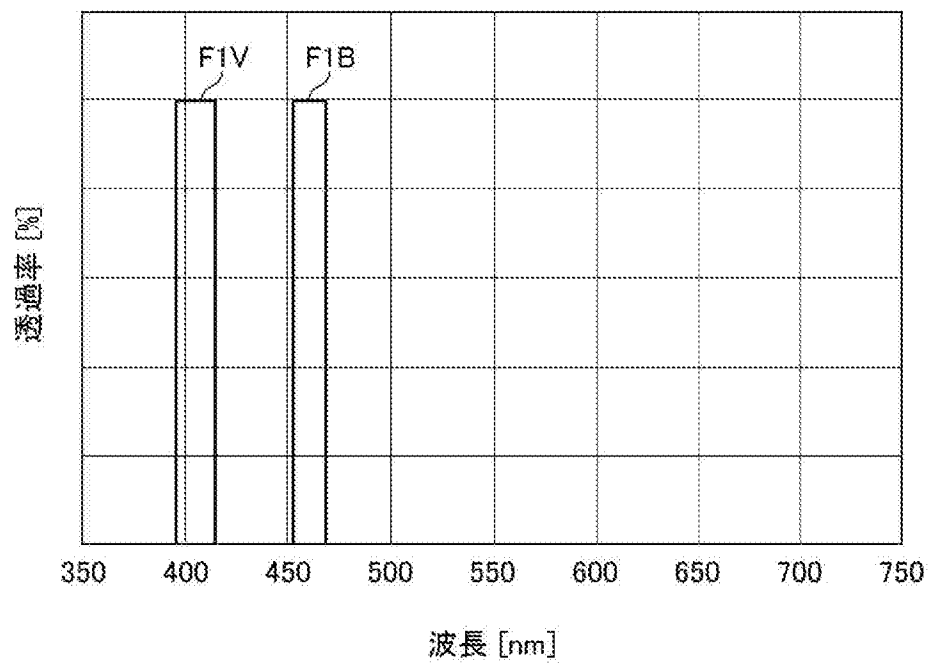
[図12]



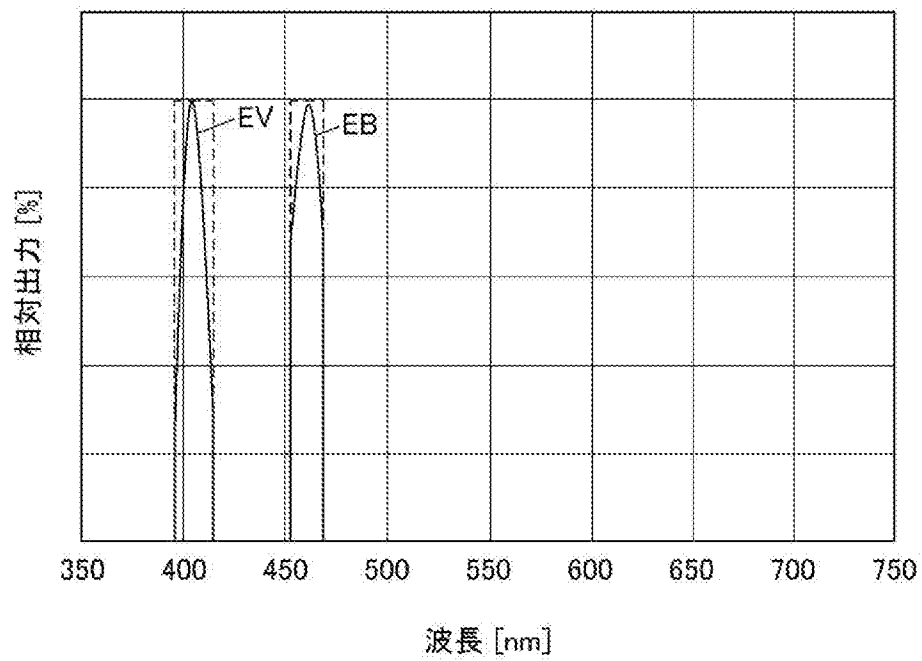
[図13]



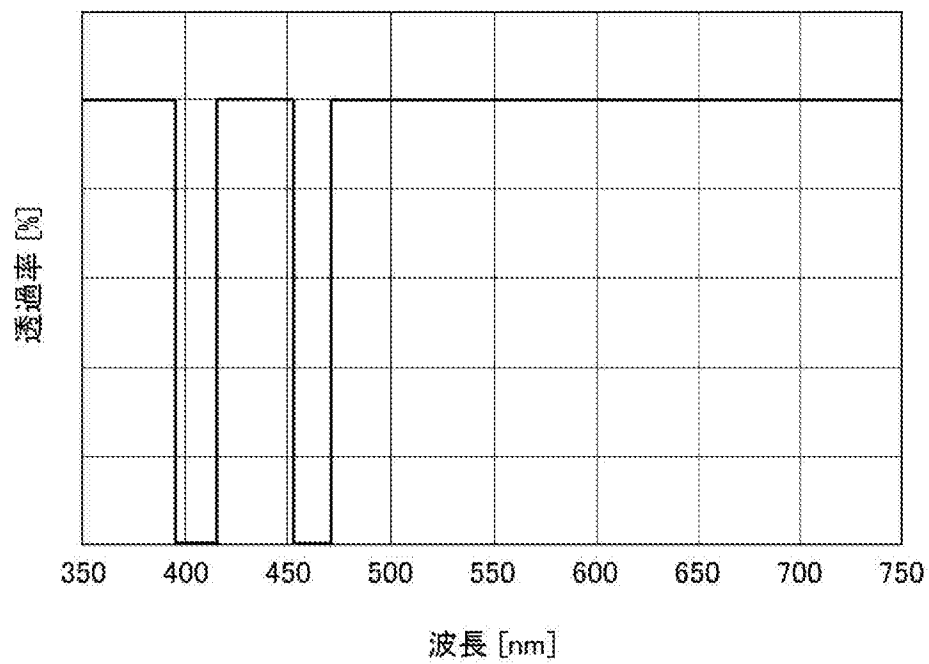
[図14]



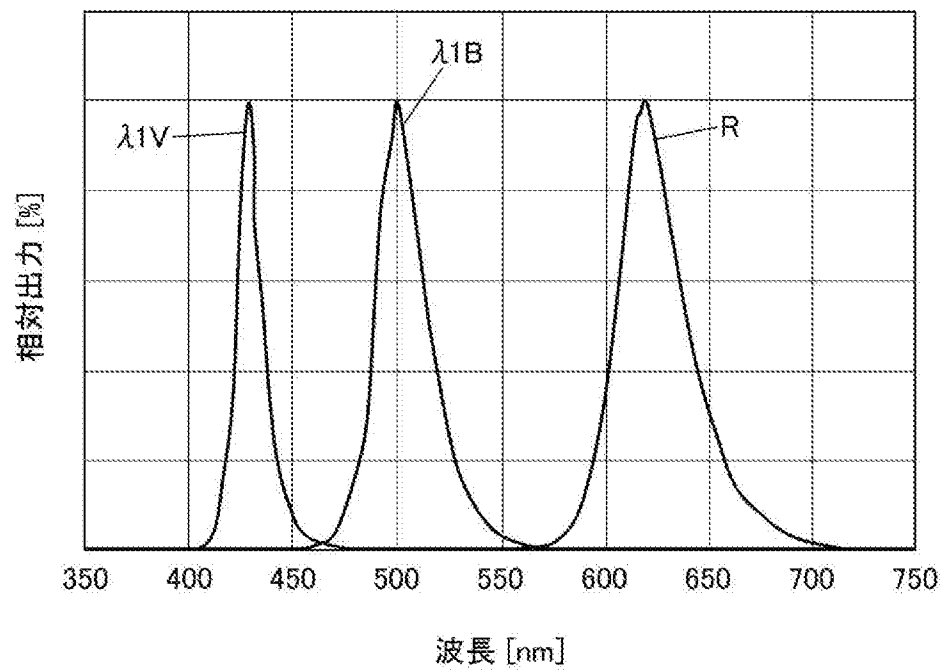
[図15]



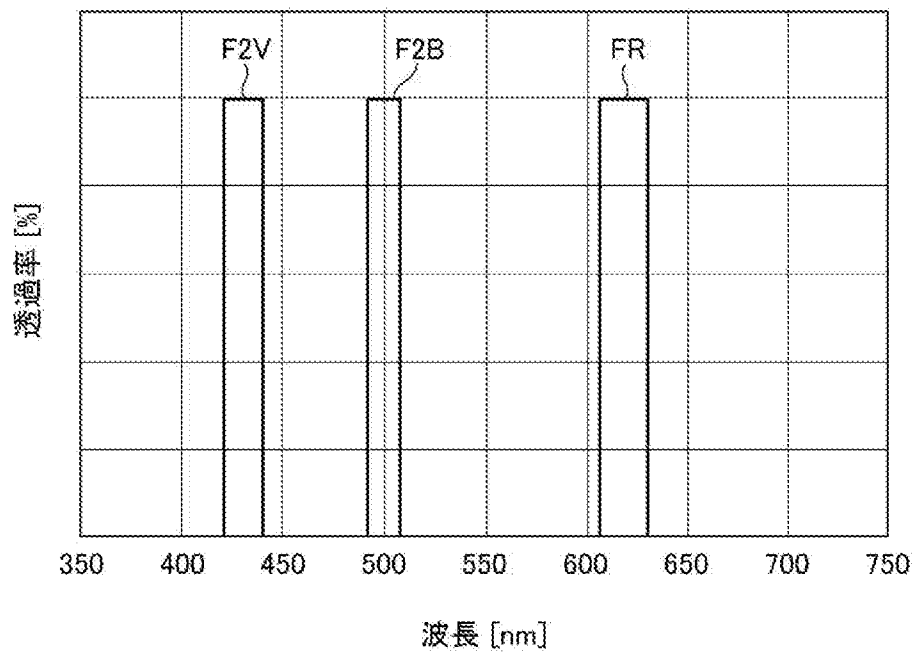
[図16]



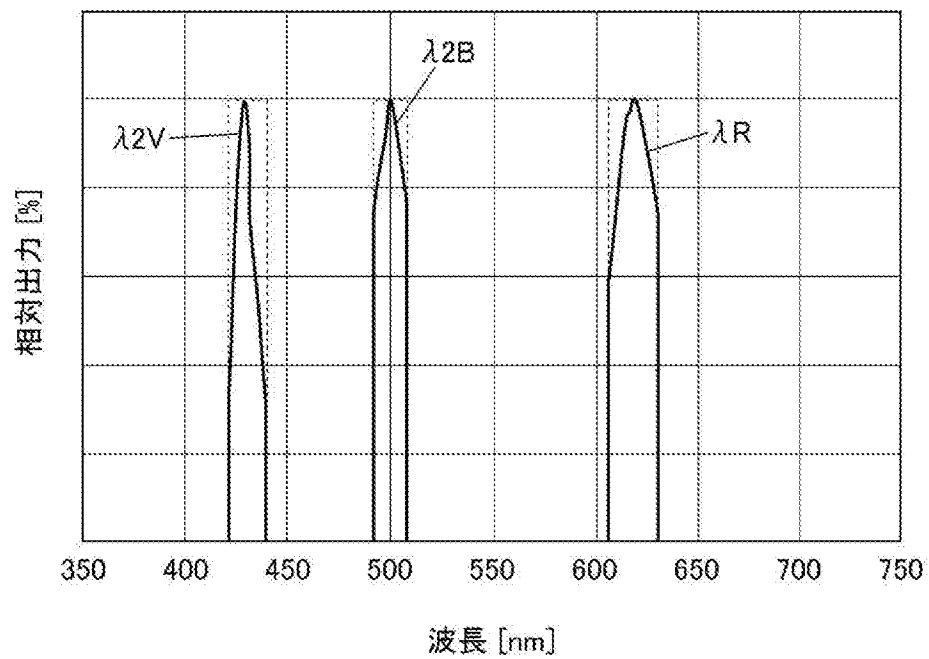
[図17]



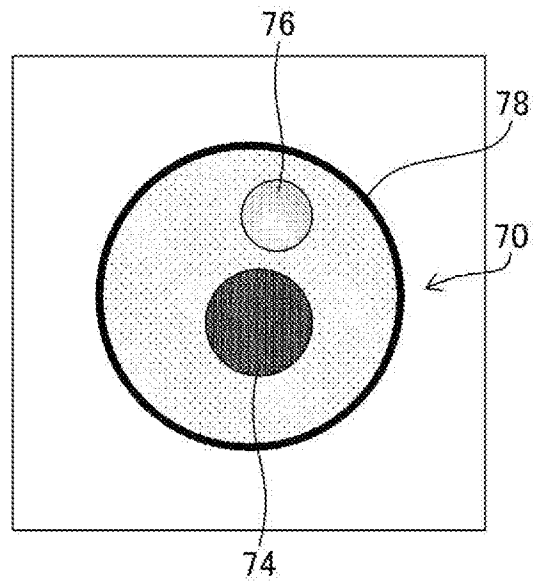
[図18]



[図19]



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/003695

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i, G01N33/48(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)

G01N21/64, G01N33/48-33/543, C12M1/34, C12Q1/00-1/04

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-4221 A (Leica Mycrosystems Wetzlar GmbH), 06 January 2005 (06.01.2005), paragraphs [0002], [0014], [0018], [0023] to [0025]; fig. 2 & US 2004/0252379 A1 fig. 2; paragraphs [0003], [0012], [0022] to [0024] & EP 1486811 A1	1-15
Y	JP 2009-58304 A (Saitama University), 19 March 2009 (19.03.2009), claims 1, 8, 9, 11; paragraphs [0017], [0030] to [0032], [0039]; fig. 1, 2, 5 (Family: none)	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 March 2017 (29.03.17)

Date of mailing of the international search report
11 April 2017 (11.04.17)

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/JP2017/003695

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 2015/093420 A1 (Konica Minolta, Inc.), 25 June 2015 (25.06.2015), claims 1, 7, 10; abstract; paragraph [0051]; fig. 1, 7 (Family: none)	1-15
Y	WO 2011/132587 A1 (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 27 October 2011 (27.10.2011), paragraph [0139]; fig. 24 & EP 2562246 A1 paragraph [0140]; fig. 24 & JP 5775069 B2 & US 2013/0288286 A1	1-15
Y	JP 2008-15059 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 24 January 2008 (24.01.2008), claims 1, 4; paragraphs [0005], [0015] to [0018], [0026] to [0031]; fig. 1 to 3, 6 to 10 (Family: none)	1-15
Y	JP 2004-13128 A (Olympus Corp.), 15 January 2004 (15.01.2004), paragraphs [0016], [0023]; fig. 4, 5 (Family: none)	5
Y	JP 2005-331887 A (Keyence Corp.), 02 December 2005 (02.12.2005), paragraph [0003]; fig. 1 & US 2005/0270639 A1 fig. 1; paragraph [0006] & EP 1598688 A2 & CN 1707245 A	5
Y	JP 2013-178290 A (JVC Kenwood Corp.), 09 September 2013 (09.09.2013), claims 1, 2; paragraph [0025]; fig. 8 & WO 2012/002254 A1	6-8, 13
Y	WO 2012/149555 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.), 01 November 2012 (01.11.2012), claims 1 to 14; paragraph [0011] & JP 2014-512548 A & US 2013/0102481 A1 & EP 2702394 A1 & CA 2833299 A1	6-8, 13
Y	JP 2010-256623 A (Olympus Corp.), 11 November 2010 (11.11.2010), paragraph [0018] (Family: none)	6-8, 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, G01N33/48(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. G01N21/64, G01N33/48-33/543, C12M1/34, C12Q1/00-1/04

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）

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	JP 2005-4221 A（ライカ ミクロジュステムス ヴェツラー ゲーエム ベーハー）2005.01.06, [0002][0014][0018][0023]-[0025], 図2 & US 2004/0252379 A1 Fig. 2, [0003][0012][0022]-[0024] & EP 1486811 A1	1-15
Y	JP 2009-58304 A（国立大学法人埼玉大学）2009.03.19, 請求項1, 8, 9, 11, [0017][0030]-[0032][0039], 図1, 2, 5 （ファミリーなし）	1-15

☒ 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
「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
「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）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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
「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
「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
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.03.2017

国際調査報告の発送日

11.04.2017

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）

伊藤 裕美

2W

9515

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	WO 2015/093420 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2015. 06. 25, 請求項 1, 7, 10, [要約][0051], 図 1, 7 (ファミリーなし)	1-15
Y	WO 2011/132587 A1 (浜松ホトニクス株式会社) 2011. 10. 27, [0139], 図 24 & EP 2562246 A1, [0140], Fig. 24 & JP 5775069 B2 & US 2013/0288286 A1	1-15
Y	JP 2008-15059 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008. 01. 24, 請求項 1, 4, [0005][0015]-[0018][0026]-[0031], 図 1-3, 図 6-10 (ファミリーなし)	1-15
Y	JP 2004-13128 A (オリンパス株式会社) 2004. 01. 15, [0016][0023], 図 4, 5 (ファミリーなし)	5
Y	JP 2005-331887 A (株式会社キーエンス) 2005. 12. 02, [0003], 図 1 & US 2005/0270639 A1, Fig. 1, [0006] & EP 1598688 A2 & CN 1707245 A	5
Y	JP 2013-178290 A (株式会社 J V C ケンウッド) 2013. 09. 09, 請求項 1, 2, [0025], 図 8 & WO 2012/002254 A1	6-8, 13
Y	WO 2012/149555 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 2012. 11. 01, cls. 1-14, [0011] & JP 2014-512548 A & US 2013/0102481 A1 & EP 2702394 A1 & CA 2833299 A1	6-8, 13
Y	JP 2010-256623 A (オリンパス株式会社) 2010. 11. 11, [0018] (ファミリーなし)	6-8, 13