

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-139796  
(P2008-139796A)

(43) 公開日 平成20年6月19日(2008.6.19)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>GO 2 B 21/00 (2006.01)</b>	GO 2 B 21/00	2 G O 4 3
<b>GO 2 B 21/36 (2006.01)</b>	GO 2 B 21/36	2 H O 5 2
<b>GO 1 N 21/64 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/64	E
	GO 1 N 21/64	F

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2006-328619 (P2006-328619)  
(22) 出願日 平成18年12月5日 (2006.12.5)

(71) 出願人 000129253  
株式会社キーエンス  
大阪府大阪市東淀川区東中島1丁目3番1  
4号  
(74) 代理人 100104949  
弁理士 豊栖 康司  
(74) 代理人 100074354  
弁理士 豊栖 康弘  
(72) 発明者 三木 雅之  
大阪府大阪市東淀川区東中島1丁目3番1  
4号 株式会社キーエンス内  
Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA01 EA01 FA01  
FA02 FA03 GA07 GB28 HA01  
HA02 JA02 KA02 LA03 MA16  
2H052 AA09 AC07 AC14 AC27 AC28  
AC31 AF14 AF21 AF25

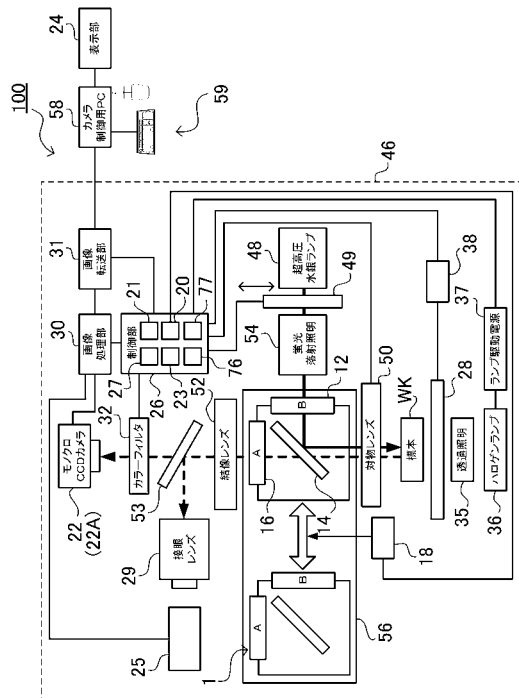
(54) 【発明の名称】 蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡の操作方法、蛍光顕微鏡操作プログラム及びコンピュータで読み取り可能な記録媒体並びに記録した機器

(57) 【要約】

【課題】カメラ設定に応じた必要最小限の蛍光励起量とすることで、試料へのダメージを軽減する。

【解決手段】観察条件を指定するための観察条件設定手段23と、試料に照射する励起光を発生させるための励起光源と、励起光源の光量を調整可能な励起光量調整部と、励起光源により得られる励起光で励起された蛍光色素の蛍光を受光し、観察条件設定手段23で指定された観察条件に応じて決定される所定のフレームレートで、任意設定可能な露光時間にて蛍光像を撮像するための蛍光撮像部と、基準となる励起光量で得られる蛍光量と同等の蛍光量を得るために、基準励起光量及び蛍光撮像部での撮像時のフレームレートに基づいて、必要な励起光量及び蛍光撮像部の露光時間を演算し、この値に近付けるよう励起光量調整部及び蛍光撮像部の露光時間を制御するための露光時間・励起光量制御手段27とを備える。

【選択図】 図2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

観察対象である試料に蛍光色素を導入し、光学系に配置して、蛍光色素を励起する励起光を試料に照射し、該励起光によって励起されて発される蛍光を受光して蛍光像を結像する蛍光観察が可能な蛍光顕微鏡であって、

観察条件を指定するための観察条件設定手段と、

試料に照射する励起光を発生させるための励起光源と、

前記励起光源の光量を調整可能な励起光量調整部と、

光路上に配置され光路に対して挿抜可能なフィルタ部であって、前記励起光源が発する光から励起光を得るための励起フィルタと、該励起光によって励起された蛍光色素より発される蛍光を透過させつつ励起光をカットする吸収フィルタを備えるフィルタ部と、

前記励起光源により得られる励起光で励起された蛍光色素の蛍光を受光し、前記観察条件設定手段で指定された観察条件に応じて決定される所定のフレームレートで、任意設定可能な露光時間にて蛍光像を撮像するための蛍光撮像部と、

基準となる励起光量で得られる蛍光量と同等の蛍光量を得るために、基準励起光量及び前記蛍光撮像部での撮像時のフレームレートに基づいて、必要な励起光量及び前記蛍光撮像部の露光時間を演算し、この値に近付けるよう前記励起光量調整部及び前記蛍光撮像部の露光時間を制御するための露光時間・励起光量制御手段と、を備えることを特徴とする蛍光顕微鏡。

10

20

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の蛍光顕微鏡であって、

前記露光時間・励起光量制御手段が、基準励起光量及びフレームレートに基づいて、設定可能な最小の励起光源の光量を演算し、演算された励起光量に基づいて最長の露光時間を演算し、これら演算された値に前記励起光量調整部及び前記蛍光撮像部をそれぞれ設定することを特徴とする蛍光顕微鏡。

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載の蛍光顕微鏡であって、

前記露光時間・励起光量制御手段が、露光時間及び励起光量を離散的に設定すると共に、露光時間の設定がフレームレートを越えないよう離散値が選択されることを特徴とする拡大観察装置。

30

## 【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一に記載の蛍光顕微鏡であって、

前記観察条件設定手段が、観察条件として通常観察、部分読み出し、ピニング、画像積算、蛍光合成観察のいずれかの観察モードの選択を含むことを特徴とする蛍光顕微鏡。

## 【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一に記載の蛍光顕微鏡であって、

前記励起光量調整部が、透過率の異なるフィルタの切り替えによって前記励起光源の光量を調整するよう構成してなることを特徴とする蛍光顕微鏡。

## 【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一に記載の蛍光顕微鏡であって、

基準励起光量をユーザが任意に指定することを特徴とする蛍光顕微鏡。

40

## 【請求項 7】

観察対象である試料に蛍光色素を導入し、光学系に配置して、蛍光色素を励起する励起光を試料に照射し、該励起光によって励起されて発される蛍光を受光して蛍光像を結像する蛍光顕微鏡の操作方法であって、

励起光源の基準となる励起光量の設定、及び蛍光観察を行う観察モードとして、通常観察、部分読み出し、ピニング、画像積算、蛍光合成撮影のいずれかをユーザに選択させる工程と、

選択された観察モードに応じて、設定された励起光量で励起された蛍光色素の蛍光像を撮像する蛍光撮像部で撮像するフレームレートを決定する工程と、

50

基準励起光量で得られる蛍光量と同等の蛍光量を得るために必要な励起光量、及び蛍光撮像部の露光時間であって、設定可能な最小の励起光量及び該励起光量を得るための最長の露光時間を演算する工程と、

演算された励起光量及び露光時間の値に近付けるよう、励起光源の光量を調整する励起光量調整部、及び蛍光撮像部の露光時間を制御する工程と、  
を含むことを特徴とする蛍光顕微鏡の操作方法。

【請求項 8】

観察対象である試料に蛍光色素を導入し、光学系に配置して、蛍光色素を励起する励起光を試料に照射し、該励起光によって励起されて発せられる蛍光を受光して蛍光像を結像する蛍光顕微鏡の操作プログラムであって、

励起光源の基準となる励起光量の設定、及び蛍光観察を行う観察モードとして、通常観察、部分読み出し、ピンング、画像積算、蛍光合成撮影のいずれかをユーザに選択させる機能と、

選択された観察モードに応じて、設定された励起光量で励起された蛍光色素の蛍光像を撮像する蛍光撮像部で撮像するフレームレートを決定する機能と、

基準励起光量で得られる蛍光量と同等の蛍光量を得るために必要な励起光量、及び蛍光撮像部の露光時間であって、設定可能な最小の励起光量及び該励起光量を得るための最長の露光時間を演算する機能と、

演算された励起光量及び露光時間の値に近付けるよう、励起光源の光量を調整する励起光量調整部、及び蛍光撮像部の露光時間を制御する機能と、  
をコンピュータに実現させることを特徴とする拡大画像観察プログラム。

【請求項 9】

請求項 8 に記載されるプログラムを格納したコンピュータで読み取り可能な記録媒体又は記録した機器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料の蛍光像を撮像して表示する機能を備えた蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡の操作方法、蛍光顕微鏡操作プログラム及びコンピュータで読み取り可能な記録媒体並びに記録した機器に関する。

【背景技術】

【0002】

顕微鏡を用いた観察は、観察対象の標本や研究目的に応じて、明視野観察、暗視野観察、位相差観察、微分干渉観察、蛍光観察、偏光観察等が利用される。明視野観察は、標本を透過又は反射した光を観察する。一方、蛍光観察は予め標本や対象物等の試料に蛍光色素を導入し、試料に特定波長の励起光を照射し、試料から発せられる蛍光を観察する。一般に、細胞の微細構造や分子の局在等を観察するには蛍光観察が行われており、蛍光顕微鏡が用いられる。蛍光顕微鏡では、試料内の注目する特定の分子に特異的に結合する蛍光分子（蛍光プローブ等と呼ばれ、例えば注目するタンパク質の抗体に蛍光分子を共有結合させたもの等が使用される）を付けて、この分子の分布や動きを観察する。

【0003】

蛍光観察用のカメラとしては、一般にモノクロ CCD 等のモノクロカメラが多用される。その理由は、(1) 近赤外光も含めてカラーカメラよりも高感度で撮像できる、(2) 色補間する必要がないので、同画素数の単板カラーカメラよりも高解像度とできる、(3) 色補間・合成する必要がないので、高速撮影（高フレームレート）が出しやすい、(4) RGB の 3CH ではなく、モノクロ 1CH で済むため、高階調データを扱いやすい、等による。一般的な蛍光顕微鏡システムとしては、図 1 に示すように蛍光顕微鏡 200 において、カメラを接続するためのカメラポートにモノクロ CCD カメラ 22A を装着し、接眼レンズ 29 で観察した後に、カメラポートに光路を切り替えて撮影している。

【特許文献 1】特開 2005 - 221704 号公報

10

20

30

40

50

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

このような蛍光観察においては、励起光を試料の蛍光分子に照射して、これを励起しエネルギーの低い、より長波長の蛍光が得られる。得られる蛍光は励起光に比して極めて微弱であり、逆にいえばある程度のエネルギーを持った励起光を試料に照射しないと、検出可能な蛍光光量すなわち蛍光像の明るさが得られない。一般には励起光は蛍光の数千倍から数万倍の光量が必要となる。

## 【0005】

一方で、このような強い光を試料に照射すると、特に生体細胞等の標本に対しては悪影響を生じる虞がある。すなわち、光毒性により生体標本の褪色や細胞死等を引き起こしてしまう虞がある。このため、必要最低限の励起光に止めるように調整する必要がある。従来、このような励起光の光量調整はユーザが手動で行っていた。しかしながら、最適な励起光量の設定は極めて困難であり、現実には最適な調整が行われているとは言い難い状況であった。

10

## 【0006】

一方で励起光を抑えるには、励起光源の光量を直接調整することに加えて、蛍光像の撮像条件として、CCDカメラのシャッタースピードを調整することも考えられる。シャッタースピードを遅くすると、CCDカメラの露光時間を長くできるので、受光光量を少なくしても蛍光像を得ることができる。しかしながら、シャッタースピードを遅くすると、蛍光像を得るのに要する時間が長くなる問題がある。特に、蛍光観察においては表示部上で表示される蛍光像に対して視野合わせやピント合わせ等の作業を行うため、リアルタイムでの表示が要求される。このようなリアルタイムで表示を更新可能な速度は、単位時間当たりの更新回数を示すフレームレートで表現できる。いいかえると、要求されるフレームレートに対応可能なシャッタースピードに設定して、蛍光像を撮像する必要がある。

20

## 【0007】

しかしながら、フレームレートは観察条件によって異なるため、ユーザが観察条件に応じた最適なシャッタースピードを一々計算して、この値に手動で設定することは困難を極める。すなわち、フレームレートに影響する要因としては、一部の領域のみを撮像する部分読み出し（パースカルスキャン、サブアレイ読み出し、ROI等とも呼ばれる）や、隣接する複数の画素で光量を加算して一画素として扱うビニング（画素数が少なくなるが、明るくできる）、複数枚の画像を重ねて光量を稼ぐ画像積算、RGB各色に対応する蛍光像を取得しこれらを合成したカラー画像とする蛍光合成観察等が挙げられる。

30

## 【0008】

例えば、フレームレートの標準を画素数1360ピクセル×1024ピクセルで15フレーム/秒とする場合、蛍光合成観察を選択すると、合成用のR、G、B各色毎の蛍光像を撮像する必要があるため、フレームレートは1/3の5フレーム/秒となる。また、このとき励起光量を80%透過、露光時間を10msとして試料の蛍光光量が十分得られているとすれば、5フレーム/秒にすることで露光時間を $1/5 = 200\text{ms}$ とすることができるので、その分、励起光量を $80\% / (200\text{ms} / 10\text{ms}) = 4\%$ まで落とすことが可能となる。逆に部分読み出しでは、蛍光像の画素数が少なくなる分、極めて高速な読み出しが求められ、例えば画素数600ピクセル×400ピクセルに設定すると、 $(1360 \times 1024) \div (600 \times 400)$ 倍 = 約5.80倍となり、87フレーム/秒となる。この場合、露光時間は $1/87 = 11.5\text{ms}$ となるので励起光量は、 $80\% / (11.5\text{ms} / 10\text{ms}) = 70\%$ まで落とすことが可能となる。このように、フレームレートを一々計算して、さらに計算されたフレームレートに基づく励起光量を計算し、この値に励起光源を設定し直すことは極めて面倒である。しかも、これらの観察手法を単独のみならず、複数を組み合わせることもあるため、このような複雑な観察条件の組み合わせに対し、ユーザが最適なフレームレート及び励起光量を一々計算することは、現実的には不可能であった。

40

50

## 【0009】

本発明は、このような問題点を解決するためになされたものである。本発明の一の目的は、撮像条件に応じたシャッタースピードを設定し、励起光量を抑制し試料を保護しつつ、十分な光量で蛍光観察が可能な蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡の操作方法、蛍光顕微鏡操作プログラム及びコンピュータで読み取り可能な記録媒体並びに記録した機器を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段及び発明の効果】

## 【0010】

上記の目的を達成するために、本発明の第1の蛍光顕微鏡は、観察対象である試料に蛍光色素を導入し、光学系に配置して、蛍光色素を励起する励起光を試料に照射し、該励起光によって励起されて発せられる蛍光を受光して蛍光像を結像する蛍光観察が可能な蛍光顕微鏡であって、観察条件を指定するための観察条件設定手段と、試料に照射する励起光を発生させるための励起光源と、励起光源の光量を調整可能な励起光量調整部と、光路上に配置され光路に対して挿抜可能なフィルタ部であって、励起光源が発する光から励起光を得るための励起フィルタと、該励起光によって励起された蛍光色素より発せられる蛍光を透過させつつ励起光をカットする吸収フィルタを備えるフィルタ部と、励起光源により得られる励起光で励起された蛍光色素の蛍光を受光し、観察条件設定手段で指定された観察条件に応じて決定される所定のフレームレートで、任意設定可能な露光時間にて蛍光像を撮像するための蛍光撮像部と、基準となる励起光量で得られる蛍光量と同等の蛍光量を得るために、基準励起光量及び蛍光撮像部での撮像時のフレームレートに基づいて、必要な励起光量及び蛍光撮像部の露光時間を演算し、この値に近付けるよう励起光量調整部及び蛍光撮像部の露光時間を制御するための露光時間・励起光量制御手段とを備えることができる。これにより、選択された観察条件で決定されるフレームレートに応じて、露光時間と励起光源の光量を調整し、必要な光量の蛍光像を得ることが可能となる。

10

20

## 【0011】

第2の蛍光顕微鏡は、露光時間・励起光量制御手段が、基準励起光量及びフレームレートに基づいて、設定可能な最小の励起光源の光量を演算し、演算された励起光量に基づいて最長の露光時間を演算し、これら演算された値に励起光量調整部及び蛍光撮像部をそれぞれ設定することができる。これにより、励起光源の光量を必要最小限に抑えつつ、必要な光量の蛍光像を得ることが可能となる。

30

## 【0012】

第3の蛍光顕微鏡は、露光時間・励起光量制御手段が、露光時間及び励起光量を離散的に設定すると共に、露光時間の設定がフレームレートを越えないよう離散値が選択される。これにより、励起光量や露光時間が離散的に設定される場合でも、露光時間がフレームレートを越えることがないように離散値が選択され、フレーム落ちを回避できる。

## 【0013】

第4の蛍光顕微鏡は、観察条件設定手段が、観察条件として通常観察、部分読み出し、ピンング、画像積算、蛍光合成観察のいずれかの観察モードの選択を含むことができる。これにより、フレームレートを決定する観察条件の要因に応じて、最適な露光時間を設定できる。

40

## 【0014】

第5の蛍光顕微鏡は、励起光量調整部が、透過率の異なるフィルタの切り替えによって励起光源の光量を調整することができる。これにより、フィルタホイールやスライダを用いた機械的なフィルタの切り替えにより、励起光の光量を調整できる。特に、超高圧水銀ランプやキセノンランプのような、電圧制御による連続的な調光のできない光源を励起光源に使用する場合に、好適に光量の切り替えを行える。

## 【0015】

第6の蛍光顕微鏡は、基準励起光量をユーザが任意に指定することができる。これにより、ユーザが観察目的や観察状況等に応じて指定した所望の基準励起光量を基準として、ユーザが望む明るさの蛍光像を得るために最小の励起光量に自動的に調整され、試料への

50

ダメージを最小限に抑えることができる。

【0016】

第7の蛍光顕微鏡操作方法は、観察対象である試料に蛍光色素を導入し、光学系に配置して、蛍光色素を励起する励起光を試料に照射し、該励起光によって励起されて発せられる蛍光を受光して蛍光像を結像する蛍光顕微鏡の操作方法であって、励起光源の基準となる励起光量の設定、及び蛍光観察を行う観察モードとして、通常観察、部分読み出し、ピニング、画像積算、蛍光合成撮影のいずれかをユーザに選択させる工程と、選択された観察モードに応じて、設定された励起光量で励起された蛍光色素の蛍光像を撮像する蛍光撮像部で撮像するフレームレートを決定する工程と、基準励起光量で得られる蛍光量と同等の蛍光量を得るために必要な励起光量、及び蛍光撮像部の露光時間であって、設定可能な最小の励起光量及び該励起光量を得るための最長の露光時間を演算する工程と、演算された励起光量及び露光時間の値に近付けるよう、励起光源の光量を調整する励起光量調整部、及び蛍光撮像部の露光時間を制御する工程とを含むことができる。これにより、選択された観察条件で決定されるフレームレートに応じて、露光時間と励起光源の光量を調整し、励起光源の光量を必要最小限に抑えつつ、必要な光量の蛍光像を得ることが可能となる。

10

【0017】

第8の蛍光顕微鏡操作プログラムは、観察対象である試料に蛍光色素を導入し、光学系に配置して、蛍光色素を励起する励起光を試料に照射し、該励起光によって励起されて発せられる蛍光を受光して蛍光像を結像する蛍光顕微鏡の操作プログラムであって、励起光源の基準となる励起光量の設定、及び蛍光観察を行う観察モードとして、通常観察、部分読み出し、ピニング、画像積算、蛍光合成撮影のいずれかをユーザに選択させる機能と、選択された観察モードに応じて、設定された励起光量で励起された蛍光色素の蛍光像を撮像する蛍光撮像部で撮像するフレームレートを決定する機能と、基準励起光量で得られる蛍光量と同等の蛍光量を得るために必要な励起光量、及び蛍光撮像部の露光時間であって、設定可能な最小の励起光量及び該励起光量を得るための最長の露光時間を演算する機能と、演算された励起光量及び露光時間の値に近付けるよう、励起光源の光量を調整する励起光量調整部、及び蛍光撮像部の露光時間を制御する機能とをコンピュータに実現させることができる。これにより、選択された観察条件で決定されるフレームレートに応じて、露光時間と励起光源の光量を調整し、励起光源の光量を必要最小限に抑えつつ、必要な光量の蛍光像を得ることが可能となる。

20

30

【0018】

第9のプログラムを格納したコンピュータで読み取り可能な記録媒体又は記録した機器は、上記プログラムを格納するものである。記録媒体には、CD-ROM、CD-R、CD-RWやフレキシブルディスク、磁気テープ、MO、DVD-ROM、DVD-RAM、DVD-R、DVD+R、DVD-RW、DVD+RW、Blu-ray（登録商標）、HD-DVD等の磁気ディスク、光ディスク、光磁気ディスク、半導体メモリその他のプログラムを格納可能な媒体が含まれる。またプログラムには、上記記録媒体に格納されて配布されるものの他、インターネット等のネットワーク回線を通じてダウンロードによって配布される形態のものも含まれる。さらに記録した機器には、上記プログラムがソフトウェアやファームウェア等の形態で実行可能な状態に実装された汎用もしくは専用機器を含む。さらにまたプログラムに含まれる各処理や機能は、コンピュータで実行可能なプログラムソフトウェアにより実行してもよいし、各部の処理を所定のゲートアレイ（FPGA、ASIC）等のハードウェア、又はプログラムソフトウェアとハードウェアの一部の要素を実現する部分的ハードウェアモジュールとが混在する形式で実現してもよい。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

以下、本発明の実施の形態を図面に基づいて説明する。ただし、以下に示す実施の形態は、本発明の技術思想を具体化するための蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡の操作方法、蛍光顕微鏡操作プログラム及びコンピュータで読み取り可能な記録媒体並びに記録した機器を例示するものであって、本発明は蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡の操作方法、蛍光顕微鏡操作プログ

50

ラム及びコンピュータで読み取り可能な記録媒体並びに記録した機器を以下のものに特定しない。特に本明細書は、特許請求の範囲に示される部材を、実施の形態の部材に特定するものではない。なお、各図面が示す部材の大きさや位置関係等は、説明を明確にするため誇張していることがある。さらに以下の説明において、同一の名称、符号については同一もしくは同質の部材を示しており、詳細説明を適宜省略する。さらに、本発明を構成する各要素は、複数の要素を同一の部材で構成して一の部材で複数の要素を兼用する態様としてもよいし、逆に一の部材の機能を複数の部材で分担して実現することもできる。

#### 【0020】

本明細書において蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡の操作方法、蛍光顕微鏡操作プログラム及びコンピュータで読み取り可能な記録媒体並びに記録した機器は、蛍光顕微鏡の操作や表示、設定を行うシステムそのもの、ならびに蛍光顕微鏡の操作、表示、設定等に関連する入出力、表示、演算、通信その他の処理をハードウェア的に行う装置や方法に限定するものではない。ソフトウェア的に処理を実現する装置や方法も本発明の範囲内に包含する。例えば汎用の回路やコンピュータにソフトウェアやプログラム、プラグイン、オブジェクト、ライブラリ、アプレット、スクリプレット、コンパイラ、モジュール、特定のプログラム上で動作するマクロ等を組み込んで蛍光顕微鏡の画像表示そのものあるいはこれに関連する処理を可能とした汎用あるいは専用のコンピュータ、ワークステーション、端末、携帯型電子機器その他の電子デバイスも、本発明の蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡の操作方法、蛍光顕微鏡操作プログラム及びコンピュータで読み取り可能な記録媒体並びに記録した機器の少なくともいずれかに含まれる。また本明細書においては、プログラム自体も蛍光顕微鏡装置に含むものとする。また本プログラムは単体で使用するものに限られず、特定のコンピュータプログラムやソフトウェア、サービス等の一部として機能する態様や、必要時に呼び出されて機能する態様、OS等の環境においてサービスとして提供される態様、環境に常駐して動作する態様、バックグラウンドで動作する態様やその他の支援プログラムという位置付けで使用することもできる。

(実施の形態1)

#### 【0021】

図2に、本発明の一実施の形態に係る蛍光顕微鏡システムのブロック図を示す。なお以下の例では、蛍光顕微鏡を用いて、試料WK(標本、検体、サンプル、ワーク等とも呼ばれる)に複数の蛍光染料(蛍光色素)を導入して多色で染色、発現させる多色蛍光観察を行う例について説明する。この図に示す蛍光顕微鏡本体100は、外部接続されたコンピュータ58によって操作され、コンピュータ58の表示部24上に観察画像を表示させる。

#### 【0022】

コンピュータ58は蛍光顕微鏡本体100と有線もしくは無線で接続され、あるいはコンピュータ58と一体に構成される。各種操作や設定は、コンピュータ58に接続された入力デバイス59により行われる。入力デバイス59の例としては、マウスやキーボード、スライドパッド、トラックポイント、タブレット、ジョイスティック、コンソール、ジョグダイヤル、デジタイザ、ライトペン、テンキー、タッチパッド、アキュポイント等の各種ポインティングデバイスが挙げられる。入力デバイス59で蛍光顕微鏡操作プログラムを操作することにより、蛍光顕微鏡やその周辺機器の操作を行うこともできる。さらに、インターフェース画面を表示する表示部24自体にタッチスクリーンやタッチパネルを利用して、画面上をユーザが手で直接触れることにより入力や操作を可能としたり、又は音声入力その他の既存の入力手段を利用、あるいはこれらを併用することもできる。図2の例では、コンピュータ58は入力デバイス59としてキーボード及びマウスを備える。マウスによって、ボタンやアイコン、スライダを操作したり、画像に対して位置指定等の各種操作を行える。このように表示部24で画像と共に操作メニューや設定等を表示させ、イメージ上で操作項目を選択したり操作を行うことにより、ユーザは操作内容や状態等を正確に把握でき、操作ミスも防止でき、また感覚的で操作しやすい操作体系が実現され

10

20

30

40

50

る。

#### 【0023】

蛍光顕微鏡本体100は、光学撮像系として、励起光源を構成する落射光源48、蛍光落射照明用のコレクタレンズ54、フィルタセット1、対物レンズ50、結像レンズ52、蛍光撮像部22を備える。これらの部材は一定の光路上に配置される。落射光源48は蛍光染料を励起する励起光を発する。励起光としては紫外線が多用されるため、落射光源48には紫外光成分を含む高圧水銀ランプや高圧キセノンランプ等が用いられる。これらは、幅広い波長の光を放出する。また落射光源48等の部材はユニット化し、ユニットを組み合わせることで蛍光顕微鏡システムを構成することもできる。

#### 【0024】

落射光源48の前面には、落射照明光を遮断/透過させるための落射光量調整部49が設けられる。落射光量調整部49は光路上に配置され、透過率の異なるフィルタを切り替えることで落射光量を調整する。フィルタの切り替えには、フィルタホイールやスライダ等が利用される。図2の例では、フィルタホイールを用いて、透過率が0%、20%、40%、60%、80%、及びフィルタ無しの100%の6段階に透過光量すなわち励起光量を切り替え可能としている。また落射光量調整部を開閉式あるいは移動式の落射光シャッタとして、落射光をON/OFFする機構としてもよいし、或いはホイールとシャッタを併用することもできる。落射光量調整部49の動作は、蛍光観察時には落射光を透過させ、明視野観察時には遮断するよう、制御部26にて制御される。図2の例では、超高圧水銀ランプを励起光源として用いているため、物理的にON/OFFを制御している。ただ、光源の速やかなON/OFFが可能で、また印加電圧等により光量を変化できる落射光源を使用すれば、落射光量調整部を省略することもできる。このような落射光源としては、低消費電力で小型、高効率の発光ダイオードや半導体レーザ等の半導体発光素子が挙げられる。これらは電圧制御による光量調整が可能なので、機械的なフィルタやシャッタを使用した離散的な光量切り替えでなく連続的な調光が可能で、より高精度な励起光量の抑制制御が実現できる。半導体発光素子は発光波長の帯域が比較的狭いため、複数の励起光に対応するために、異なる波長の発光ダイオードを複数配置してもよい。

#### 【0025】

落射光源48から落射光量調整部49を透過した落射照明光は、コレクタレンズ54でほぼ平行な光束にされてフィルタセット1に励起光として導入される。コレクタレンズ54は、落射照明の場合は蛍光落射照明レンズ等が利用できる。なお以下の例では試料の照明を落射照明型とするが、同様に透過型照明や全反射照明型等他の照明方法についても本発明は適用可能である。また図2の例では蛍光撮像部22と、目視用の接眼レンズ29を、ミラー等を利用した観察切替手段53により反射、分岐させて切り替え可能としている。また目視用の機構を省略して、蛍光撮像部22で撮像された画像を表示部24でのみ確認する構成とすることもできる。さらに接眼レンズ29と共に、或いはこれに代わって、明視野像を撮像する明視野撮像部25を配置することもできる。

#### 【0026】

フィルタセット1は、特定の蛍光染料の観察に適した波長の光を選択的に透過するシングルパスのフィルタおよびミラーの組み合わせであり、図2に示すように励起フィルタ12と吸収フィルタ16とダイクロイックミラー14を備える。さらにフィルタセット1は、複数種類が切り替え可能に構成されている。各フィルタセット1は、使用する蛍光染料に応じた励起フィルタ12と吸収フィルタ16とダイクロイックミラー14の組み合わせからなり、これらを切り替えることでそれぞれ異なる単色画像を撮像できる。複数のフィルタセット1はフィルタホルダ56にセットされ、フィルタ切替部18で切り替えられる。フィルタセット1の励起フィルタ12で選択された励起光はダイクロイックミラー14で反射され、対物レンズ50を通過して試料WKに投射される。対物レンズ50は、コンデンサレンズを兼用している。対物レンズ50は観察目的に応じて交換可能であり、ネジ式等により脱着式に、あるいはレボルバ等で複数の対物レンズ50を切り替え可能に構成できる。例えば位相差観察用、微分干渉観察用、明視野観察、暗視野観察用等の専用の対

10

20

30

40

50



物レンズに交換でき、油浸対物レンズや水浸レンズ、ドライレンズ、カバースライド標本用、ノンカバースライド用等、観察目的や用途に応じて適切な対物レンズを装着、或いは切り替えできる。

(暗室空間46)

【0027】

試料WKは、試料載置部28に載置される。一般に蛍光試料等の微弱光試料の観察は、外乱光を排除する必要があるため暗室で行われる。蛍光顕微鏡本体100は、試料載置部28および光学系の光路を外乱光から遮断された暗室空間46内に配置し、この暗室空間46を暗室状態とすることにより、暗室を用意することなく蛍光観察を行え、使い勝手を改善している。試料載置部28はXYステージ等が利用でき、X軸、Y軸方向に移動可能である。また試料載置部28は上下方向(Z軸方向)にも移動可能とすることにより、光学系(対物レンズ50)との相対距離を変化させてフォーカスの調整を可能としている。試料載置部28は移動機構38により駆動され、移動機構38は制御部26により制御される。あるいは、対物レンズ50を移動させることでもフォーカスを調整できる。同様に、視野の変更においても試料載置部28をX軸、Y軸方向に移動させる他、対物レンズ側を移動させることでも視野を移動できる。

10

【0028】

試料WKに含まれる蛍光染料の内、照射された励起光に対応する蛍光染料が蛍光を発生し、この蛍光が対物レンズ50を通過してフィルタセット1に入射され、ダイクロイックミラー14を通過する。このようにダイクロイックミラー14は、落射照明光を反射して蛍光を透過する。さらに吸収フィルタ16で蛍光を通過し、落射照明光等蛍光以外の光成分を選択的に吸収する。吸収フィルタ16はバリアフィルタとも呼ばれ、ダイクロイックミラー14よりも蛍光像の形成面側に配置される。フィルタセット1を出た光は結像レンズ52を通過して蛍光撮像部22に入射される。蛍光撮像部22は対物レンズ50の焦点面と共役な位置に配置される。この蛍光撮像部22は蛍光を電気信号に変換して画像処理部30に送出する。画像処理部30は、後述する広域画像合成手段の機能を実現する。画像処理部30で必要な画像処理を行った後、画像転送部31で外部のコンピュータ58に転送される。これらの制御は、制御部26にて行われる。制御部26は、蛍光観察モードと明視野観察モードとを切り替える観察モード切替手段21と、観察モードに応じた撮像条件を自動的に設定する等、観察条件を指定するための観察条件設定手段23と、フィルタ切替部18を制御する切替設定部20、広域画像表示領域WAに表示される広域画像を切り替える広域画像切替手段76、合成広域画像において広域画像同士を合成した位置に基づき座標位置を補正する補正座標位置演算手段77、基準励起光量及び表示部でのフレームレートに基づいて、必要な励起光量及び蛍光撮像部の露光時間を演算し、励起光量調整部及び蛍光撮像部の露光時間を制御するための露光時間・励起光量制御手段27等の機能を実現する。この制御部26は、例えばマイクロプロセッサ(MPU)やCPU、LSI、FPGAやASIC等のゲートアレイで構成される。また、蛍光顕微鏡本体100と接続されたコンピュータ58は表示部24を備えており、画像転送部31から送られる画像を、表示部24上に表示する。

20

30

【0029】

なお本明細書においては、低倍率で撮像した画像を広域画像、高倍率で撮像した画像を拡大画像と便宜上呼ぶ。ここで低倍率、高倍率とは相対的な値であって、例えば低倍率の拡大倍率が1倍~10倍程度の場合は、高倍率は20倍~100倍程度に設定できる。

40

(蛍光撮像部22)

【0030】

蛍光撮像部22は撮像素子で構成され、2次元状に配列された2次元フォトディテクタが使用される。2次元フォトディテクタは2次元状に配列されており、レーザ顕微鏡のように画面を順次走査することなく一画面を同時に撮像できる。2次元フォトディテクタとしては、CCDのほか、CMOSのイメージセンサ、フォトダイオードのイメージセンサ、フォトトランジスタのイメージセンサ等が使用可能である。本実施の形態では高解像度

50

のモノクロCCDカメラが使用される。CCDカメラを冷却することでノイズ特性を向上できるので、ペルチェ素子や液体窒素等で冷却する機構を備えるCCDカメラを使用してもよい。以上のように蛍光顕微鏡は、シングルパスのフィルタセット1をフィルタ切替部18によって自動で切り替えでき、各フィルタセット1で撮像した単色画像と、これらを重ね合わせた重ね合わせ画像を、同時に表示できる。

(カラーフィルタ32)

【0031】

蛍光撮像部22の前面にはカラーフィルタ32が設けられる。カラーフィルタ32は、図3(a)に示した機械式フィルタ33や図3(b)に示した液晶式フィルタ34が使用できる。液晶式フィルタ34は、液晶チューナブルフィルタや波長可変フィルタ等とも呼ばれ、印加電圧に応じてR、G、Bの透過分光特性をスイッチングする。このフィルタは、機械的な動作が無いので安定した切り替えが可能で、さらに高速なスイッチングが可能であり、好適に利用できる。

10

(機械式フィルタ33)

【0032】

ただ、液晶式フィルタ34に代わって、図3(a)に示す回転式のターレットを使用した機械式フィルタ33も利用できる。回転式ターレットとは、一般に複数のフィルタを速やかに交換できるような構造の回転板である。円盤状の回転板は中心軸で回転自在に支承され、回転軸を中心に周囲に複数の開口が設けられる。図3(a)の例では、4つの開口が設けられ、それぞれR、G、Bのフィルタ及びフィルタのない開口としている。各開口が、光軸と一致するようにターレットが配置されており、ターレットを回転させることで、開口を速やかに切り替えることができる。これらフィルタの切替は、制御部26の指示により行われる。またこれらのカラーフィルタ32はRGB式に限られず、CMY式としてもよい。なおCCD自体にカラーフィルタを設けたカラーフィルタ付きCCDを使用することもできる。この場合は、さらに別のカラーフィルタを設ける必要はなくなる。

20

【0033】

さらにカラーフィルタとして、上述した液晶フィルタや機械式フィルタ33の他、音響光学素子(AOTF)を用いた音響光学フィルタや、プリズムとグレーティングを組み合わせたイメージング分光器(インスペクタ)等も利用できる。

(フィルタセット1)

30

【0034】

フィルタセット1は、一般にダイクロイックキューブと呼ばれる箱状体に、励起フィルタ12と吸収フィルタ16とダイクロイックミラー14の組を含んでいる。フィルタセット1は、試料WKに導入する蛍光染料に応じて励起フィルタ12、ダイクロイックミラー14、吸収フィルタ16の組み合わせが決定される。蛍光染料で発現される色のみが正しく観察できるように、所望の波長成分の光を抽出し他の波長成分を排除するよう、シングルパスのバンドパスフィルタの組み合わせが決定される。したがって、使用される蛍光染料に応じて、使用されるフィルタセット1は決定される。一般には各々蛍光色の異なるフィルタセット1が使用され、例えばRGB、CMY等、蛍光色素に応じた色の組み合わせが適宜採用できる。複数のフィルタセット1はフィルタ切替部18により切り替え可能に構成されている。複数のフィルタセット1はフィルタホルダ56にセットされ、フィルタ切替部18により複数のフィルタセット1のいずれかを光路上にセットさせる。フィルタ切替部18は、モータ等の駆動により回転式あるいはスライド式にフィルタセット1を切り替えるターレット等が利用できる。フィルタ切替部18の制御は、制御部26の切替設定部20により設定される。フィルタセット1を使用して必要な組の励起フィルタ12、吸収フィルタ16、ダイクロイックミラー14を一括して切り替えることができ、切り替え動作部分を一箇所にまとめて高速動作やメンテナンスを容易にすることができる。ただ、励起フィルタ、吸収フィルタ、ダイクロイックミラーが組になったフィルタセットを使用することなく、複数の励起フィルタ、吸収フィルタ、ダイクロイックミラーをそれぞれ個別に切り替える個別の切替手段を設け、各切替手段を連動して制御することによって

40

50

所定の組の励起フィルタ、吸収フィルタ、ダイクロイックミラーを光路上に配置する構成としてもよい。さらには、フィルタ類を移動させることなく、ミラー等で光路を変更することでも実質的にフィルタ類を切り替えて撮像することが可能である。

(表示部24)

【0035】

表示部24は、光学系で撮像された画像を表示するディスプレイである。表示部24を構成するディスプレイは、高解像度表示が可能なモニタであり、CRTや液晶パネル等が利用される。なお表示部24を蛍光顕微鏡自体に組み込んだり、外付けしたモニタとすることもできる。

(透過照明)

【0036】

さらに図2の蛍光顕微鏡は、落射光(明視野照明)による蛍光観察に加えて、透過光(透過照明)による明視野観察も行えるよう、透過照明を備えている。試料載置部28の下面に、透過照明レンズ35と、透過光源36を配置している。また透過光源36には、透過照明をON/OFFする透過照明駆動電源37が接続され、制御部26により点灯を制御される。透過光源36は、ハロゲンランプ等が利用される。ハロゲンランプは印加電圧によって光量を変化できるので、機械式のフィルタやシャッタを使用することなくON/OFFや光量制御が可能である。ハロゲンランプから出射された透過照明光は、透過照明レンズ35であるコンデンサレンズを通して試料載置部28上の試料WKを照射する。この際、明視野観察では蛍光観察用のフィルタセット無しで撮像するため、制御部26は

10

20

(観察モード切替手段21)

【0037】

以上のように図2の蛍光顕微鏡は、蛍光観察を行う蛍光観察モードと、明視野観察を行う明視野観察モードを備え、これらを観察モード切替手段21で切り替え可能としている。さらに観察モード切替手段21で選択された観察モードに応じて、観察条件設定手段23が観察モードに適した撮像条件を自動的に設定する。これにより、観察モードをスムーズに切り替えできる。

30

【0038】

従来は、蛍光観察の際はモノクロ画像、明視野観察の際はカラー画像での観察が主であり、各々の観察方式に切り替えるには、ユーザが手でフィルタの挿抜や励起光の遮断/開放、ピントずれや視野ずれの調整を行っていた。これらの操作は煩雑である上、特に蛍光顕微鏡では操作すべき部位が点在していることが多く、極めて面倒であった。そこで本発明では、観察モードとして蛍光観察モードと明視野観察モードを選択させ、選択された観察モードに応じた撮像条件に、装置側で自動設定するように構成している。これにより、ユーザは観察モードを選択するのみで、表示部にて所望の観察像を表示させることができ、極めて使い勝手の良い顕微鏡観察が実現される。

40

(蛍光顕微鏡操作プログラム)

【0039】

次に、蛍光顕微鏡操作プログラムの操作画面60のユーザインターフェース画面を図4に示す。図4の操作画面60から、ユーザは試料WKに対して視野探しや倍率調整等、所望の観察を行うことができる。この例は一例であって、蛍光顕微鏡操作プログラムのユーザインターフェース画面において、各入力欄や各ボタン等の配置、形状、表示の仕方、サイズ、配色、模様等は適宜変更できることはいうまでもない。デザインの変更によってより見やすく、評価や判断が容易な表示としたり操作しやすいレイアウトとすることもできる。例えば画像表示領域や詳細設定画面を別ウィンドウで表示させる、複数画面を同一表示画面内で表示する等、適宜変更できる。またこれらのプログラムのユーザインターフェ

50

ース画面において、仮想的に設けられたボタン類や入力欄に対するON/OFF操作、数値や命令入力等の指定は、蛍光顕微鏡操作プログラムを組み込んだコンピュータ58に接続された入力デバイス59で行う。本明細書において「押下する」とは、ボタン類に物理的に触れて操作する他、入力デバイス59によりクリックあるいは選択して擬似的に押下することを含む。また、選択できない項目はグレーアウトして表示させることで、ユーザに設定可能な項目がそうでないかを区別し易くしている。

#### 【0040】

この図に示す操作画面60は、画面左側に画像を表示するための画像表示領域61と、右側に各種操作を行うボタン類を配置した操作領域62を設けている。ここでは、画像表示のためにCH1~CH4の4チャンネルを用意しており、画像表示領域61を4分割し、各々が独立しており異なる画像を表示可能としている。図4の例では、CH1~CH3に蛍光像、CH4に明視野像を表示させている。画像表示領域61の下側には、励起のON/OFFやプレビュー、撮影、録画等を行うためのボタン類が配置されている。またマウスのホイールに割り当てる機能の選択欄（Zフォーカス、ズーム、露光時間）や、自動保存のON/OFFの別、画像のサイズ、階調等が表示される。

10

#### 【0041】

操作領域62の上段には、「観察方法の選択」欄64が設けられ、各チャンネルで選択されている観察モードがボタン状のチャンネルボタン65として表示される。またチャンネルボタン65を選択すると、選択したチャンネルの画像が画像表示領域61で拡大表示される。図5は、CH4の明視野像を選択して、拡大画像MIとして拡大表示させた状態を示している。これにより、所望の画像を選択してより詳細に観察できる。図5の画像表示領域61では、画像表示領域61の下段に、露光時間を表示する露光時間表示欄や、露光時間の調整スライダ、オート調整ボタン等が設けられる。また、図5の例では、画像表示領域61に重ねてスケール（200μmに相当する長さ）SCを表示している。ユーザはこの画面から、所望の拡大観察を行う。

20

#### 【0042】

さらにチャンネルボタン65の下には、観察倍率表示欄66と「チャンネル設定」ボタン67が設けられる。観察倍率表示欄66では、現在の画像表示領域61における倍率を演算して表示される。さらに「チャンネル設定」ボタン67は、各チャンネルで表示される画像の観察モードの変更等、チャンネル毎の設定を行うチャンネル設定画面90（図6）を呼び出すためのボタンである。

30

（チャンネル設定画面90）

#### 【0043】

図6は、チャンネル毎の設定を行うチャンネル設定画面90の一例を示している。図4の画面から、「チャンネル設定」ボタン67を押下すると図6のチャンネル設定画面90が表示される。ここでは、各チャンネル毎の観察モードの変更や擬似カラー表示の有無等を行う。具体的には、図4に対応させてCH1~4の各チャンネルの設定欄を4分割して表示し、観察モード切替手段21を構成するプルダウンメニュー21Aで、OFF（使用しない）、明視野観察、蛍光観察、位相差観察のいずれかを選択する。ここで選択された観察モードに応じて、観察条件設定手段23により自動的に透過照明ハロゲンランプ（透過光源36）のON/OFF、蛍光励起シャッタ（励起光量調整部49に設けられた落射光シャッタ）のOPEN/CLOSEが選択され、プルダウンメニュー21A下段に設けられた透過照明ハロゲン状態表示欄91、蛍光励起シャッタ状態表示欄92に各々表示される。さらに、画像処理部30における内部処理の方法も、これら観察モードの変更に応じた設定に自動的に切り替えられる。例えば「明視野」を選択すると、明視野観察に適した顕微鏡の設定として、自動的にカラーフィルタ32が挿入され、画像処理部30でもカラー画像を作成する設定に切り替わる。このように、ユーザが選択した観察モードに応じて各項目を逐一手作業で切り替える操作を無くし、自動で必要な切替作業を行わせることにより、大幅な省力化が図られ、ユーザは各項目の切替作業を意識することなく所望の観察像を速やかに観察できるようになる。

40

50

( 擬似カラー表示機能 )

【 0 0 4 4 】

また、蛍光観察で得られたモノクロ画像を所望の色に着色する擬似カラー表示機能を備えている。擬似カラー表示は、モノクロ階調に色の濃淡を割り付ける処理であり、LUT ( ルックアップテーブル ) 割り付けとも呼ばれる。ここでは、擬似カラー表示欄 9 3 のチェックボックスを ON し、所望の表示色を表示カラー選択欄 9 4 で選択することにより、選択した色に着色された擬似カラーの蛍光像が表示されるようになる。さらに擬似カラー表示機能の ON / OFF を蛍光像に表示させることもできる。図 4 の例では、画像表示領域 6 1 において各チャンネルの画像の下段に擬似カラー ON / OFF 表示欄 9 5 が設けられ、擬似カラー表示されているものについては「擬似カラー」と表示され、さらに着色した色と同色の背景色にて表示される。これにより、ユーザは擬似カラー表示を選択したチャンネルを視認できると共に、何色に着色したかも併せて把握できる。なお擬似カラー表示機能はモノクロ画像への着色を行うものであり、既にカラー画像である明視野画像には適用されない。このため明視野画像選択時には擬似カラー ON / OFF 表示欄 9 5 をグレーアウトさせ、誤設定を防止する。

10

【 0 0 4 5 】

さらに、コメント表示欄 9 6 を設け、画像表示領域 6 1 において、試料 W K の名前や観察条件等、所望のコメントをテキストで表示することもできる。

【 0 0 4 6 】

図 6 の例では、CH 1 ~ CH 3 が蛍光観察モード、CH 4 が明視野観察モードを選択している。明視野観察モードでは、元々カラー表示されるため擬似カラー表示欄 9 3 はグレーアウトして表示し、選択できないようにしている。また、CH 4 設定欄の下段には「オーバーレイ表示として使用」欄 9 7 が設けられる。オーバーレイ表示とは、マルチカラー撮影の 4 分割画面表示の際に、CH 1 ~ CH 3 の画像を合成したオーバーレイ画像を CH 4 で表示するモードである。図 6 に示すように「オーバーレイ表示として使用」欄 9 7 のチェックを ON することで、CH 4 での設定 ( 図 6 の例では明視野観察モード ) に拘わらず、図 4 に示すように、オーバーレイ表示を行う。この際、画像表示領域 6 1 における CH 4 の表示領域の下段のステータス表示欄 9 5 A 左側に「オーバーレイ」と表示され、オーバーレイ表示が適用されていることが確認できる。更にステータス表示欄 9 5 には、オーバーレイ画像の合成元画像である CH 1 ~ CH 3 の各画像の重み付けを調整する合成調整欄 9 5 B を設けることもできる。図 4 の例では、合成調整欄 9 5 B として各画像の透過率を 0 ~ 100 の範囲で独立して調整できる。

20

30

【 0 0 4 7 】

加えて、すべてのチャンネルでの共通の設定項目を設定するための共通設定欄 9 8 として、ゲイン / プレビュー速度、測光方式、LUT 補正 / ブラックバランス、リアルタイムフィルタ、ホワイトバランス、ノイズリダクション、励起光量等の ON / OFF を選択できる。これらの設定終了後、「設定」ボタン 9 9 を押下することで設定が反映され、観察条件設定手段 2 3 がフィルタの挿抜等を実行する。

【 0 0 4 8 】

図 4 の蛍光顕微鏡操作プログラムに戻って説明を継続すると、「観察方法の選択」欄 6 4 の下段に設けられた操作領域 6 2 では、複数のタブを切り替えて操作項目を選択する。図 4 の例では「顕微鏡操作」タブ 1 0 2 が選択されており、このとき操作領域 6 2 には「レンズ選択」欄 6 8 が設けられ、対物レンズ 5 0 を選択できる。この蛍光顕微鏡では複数の対物レンズ 5 0 を対物レンズ用ターゲット上にセットし、対物レンズ用ターゲットを回転させて切り替え可能としている。倍率の異なる対物レンズ 5 0 を切り替えることで、光学倍率を変更できる。図 4 の例では対物レンズを 6 個までセット可能で、ここでは 5 個の対物レンズをセットしている。「レンズ選択」欄 6 8 では現在セットされている対物レンズ 5 0 が、その倍率と共にアイコン状に表示されている。対物レンズがセットされていない位置は、空欄で表示され、この位置に対物レンズを追加できることが視認できる。所望の対物レンズ 5 0 のアイコンを選択すると、制御部 2 6 が指令を出し、対物レンズ用ター

40

50

レットを回転させて自動的に対物レンズ50が切り替えられる。また対物レンズ50を切り替える際には、対物レンズ50を一旦待避させて、対物レンズ用ターレット回転時に試料載置部28と接触しないようにしている。

(ナビゲーション欄70)

【0049】

さらに「レンズ選択」欄68の下段には、倍率を調整するズーム調整スライダ69が設けられる。さらにその下段には、ナビゲーション欄70が設けられる。ナビゲーション欄70は、観察可能な範囲の全域、すなわち試料載置部28の相対移動範囲SIを示す相対移動範囲表示領域を構成する。またナビゲーション欄70には、現在観察中の位置が十字状のグリッドGDで表示される。これにより、ユーザは現在観察中の位置が全体のどの辺りに位置するかを把握できる。このナビゲーション欄70では、広域画像の表示、選択を行う。ナビゲーション欄70の「ナビゲーション」ボタン71を押下すると、図7のナビゲーション画面72が別ウィンドウで開き、登録された広域画像WIが表示される。すなわちナビゲーション画面72は、広域画像WIを表示する広域画像表示領域WAとして機能する。従来、広域画像は拡大画像の脇に併設された小さな画面を使用することが多かったが、この状態では詳細が判別し辛いという問題があった。本実施の形態ではナビゲーション画面72を使って広域画像WIを大きく表示させることにより、より見易く、詳細表示を可能にして視野探し作業を容易にできる。また、図5の拡大画像表示領域MAで現在表示中の拡大画像MIに対応する領域を、広域画像WI上で矩形状の第1の枠状BX1にて表示している。これにより、現在観察中の部位を広域画像WI上で容易に把握でき、視野の移動等に役立てることができる。また図7の画面で第1の枠状BX1をマウス等の操作により移動させると、これに追従して図5の拡大画像表示領域MAの表示も対応する領域の拡大画像MIとなるよう更新される。この例では、広域画像WI、拡大画像MIのいずれも明視野像としているが、広域画像WIを明視野像、拡大画像MIを蛍光像とすることで、カラー画像で視野を探して高解像度のモノクロ画像で拡大観察するという蛍光観察に適した環境が実現できる。

10

20

【0050】

なお、この例では、広域画像表示領域WAを別ウィンドウとしているが、拡大表示領域と同一画面で分割して表示させることも可能であることはいうまでもない。例えば図5の画面において、画像表示領域を二分割して拡大画像表示領域と広域画像表示領域を並べて表示させることもできる。さらに図5の例では、ナビゲーション欄70に試料載置部28の相対移動範囲SIを表示しているが、従来のようにナビゲーション欄に広域画像を縮小表示させることも可能である。このような表示形態の設定は、ユーザの好み等に応じて任意に設計できる。

30

(広域画像切替手段76)

【0051】

さらに、複数の広域画像を切り替えることができる。図7のナビゲーション画面72の上段には、チャンネル表示欄73、ナビ画像倍率表示欄74、履歴画像表示欄75及び広域画像切替手段76が設けられている。チャンネル表示欄73は、現在表示中のチャンネル番号(図7の例ではCH4)を表示する。ナビ画像倍率表示欄74は、ナビゲーション画面72で表示される広域画像WIの倍率を表示する(図7の例では200倍)。履歴画像表示欄75は、現在登録されている広域画像の枚数と、表示中の広域画像の番号を表示している。図7の例では、3/3と表示され、登録済みの3枚の広域画像中、3番目の広域画像WIが表示されていることを示している。広域画像WIは、広域画像切替手段76を構成する矢印ボタンで切り替えることができる。図7の例では、ボタンが配置され、これを押下することで、登録済みの広域画像WIが登録番号の昇順、降順に順次切り替えられる。このように、複数枚の広域画像WIを切り替え可能とすることで、従来のように一枚のみの広域画像に制限されることなく、より柔軟な視野の選択、切り替えが可能となる。

40

【0052】

50

広域画像W Iの登録は、図7のナビゲーション画面7 2において、所望の視野や倍率に調整した後、画面右下に設けられた「画像登録」ボタン7 8を押下して行う。これにより、その時点でナビゲーション画面7 2に表示されている画像が広域画像W Iとしてメモリ部に保存される。広域画像W Iは、明視野像や蛍光像といった観察方法の種別、撮像時の倍率といった撮像条件の情報と共に記録される。またそれぞれの広域画像W Iの座標情報に基づいて、図5において広域画像W Iの登録位置を示すナビゲーション欄7 0の表示も自動更新される。

**【0053】**

広域画像W Iは、予め登録され、メモリ部に保存される。複数の登録画像を保存するメモリ部は、蛍光顕微鏡本体側の制御部や画像処理部等に備えることもできるし、あるいはコンピュータ側に備えることもできる。図2の例では、カメラ制御用PCであるコンピュータ5 8にメモリ部を備える。例えばコンピュータのハードディスク等を利用することで、蛍光顕微鏡本体側の構成を簡素化してコストダウンを図ることができる。また制御部を構成するコンピュータ5 8が各種制御を行う。さらに図7のナビゲーション画面7 2に表示中の画像を、広域画像として登録することなく、単に保存することもできる。「画像登録」ボタン7 8の右隣に配置された「保存」ボタン7 9を押すと、画像に名前を付けて保存するダイアログが現れ、所望の名前を付して保存できる。

( 相対移動範囲表示領域 )

**【0054】**

上述の通り、図5に示す蛍光顕微鏡操作プログラムの画面では、ナビゲーション欄7 0に試料載置部2 8の相対移動範囲S Iを表示しており、この相対移動範囲S I上に、登録済みの広域画像の位置が点で表示される。複数枚の広域画像が登録されている場合は、各広域画像に対応する位置に、それぞれ点が表示される。これにより、広域画像が試料載置部2 8上のどの位置に登録されているかを俯瞰でき、複数枚の広域画像が離散的に登録されている場合でも、相互の位置関係を把握してこれらを区別することが容易となる。

**【0055】**

このように、従来の1枚の広域画像のみに基づく拡大画像の視野探しに加えて、複数枚の広域画像と、これら広域画像の範囲を示す相対移動範囲S Iを付加することで、図8に示すように、より柔軟な視野移動や視野探しを可能とする。図8(a)は相対移動範囲S I( 図5のナビゲーション欄7 0 )、図8(b)は広域画像W I 2( 図7のナビゲーション画面7 2 )、図8(c)は拡大画像M I( 図5の拡大画像表示領域M A )をそれぞれ示している。この例では4つの広域画像が登録されており、図8(a)の相対移動範囲S Iには各広域画像の位置を示すW I 1 ~ 4の4点が表示される。図8(a)の画面からいずれかの広域画像W I 1 ~ 4の点を選択すると、図8(b)に示すように対応する広域画像( 図8(b)の例ではW I 2 )が図7のナビゲーション画面7 2に表示される。ナビゲーション画面7 2上から拡大画像M Iを指定すると、図5の拡大画像表示領域M Aに該当する拡大画像が表示されると共に、図7の広域画像W I上には対応する領域に矩形の第1の枠状B X 1が表示され、拡大画像M Iの位置を広域画像W I上で確認できる。

**【0056】**

以上のように、蛍光顕微鏡の視野を決定するために大領域、中領域、小領域の3段階を用意し、これらを相互にリンクさせることで、視野の相対的な位置関係の把握が容易になり、視野の移動、選択を極めて容易にできる。すなわち、一枚の広域画像のみで視野探しを行っていた従来の方法と比べ、複数枚の広域画像を登録して切り替え可能とすることでより広範な範囲で視野探しが可能となる。さらに、複数枚の広域画像が、XYステージの相対移動範囲においてどの位置にあるかを相対移動範囲表示領域で表示させることで、これら複数枚の広域画像同士の位置関係も容易に整理でき、複数枚の広域画像を混乱無く選択して、適切な視野探しが行える。

**【0057】**

また、登録済みの広域画像を表示部上に複数表示させることもできる。表示部2 4の画像表示領域6 1を複数領域に分割し( 例えば図4に示すC H 1 ~ 4 )、分割された領域に

10

20

30

40

50

登録済みの広域画像を各々表示させることで、複数の広域画像を一画面で確認できる。例えばタイムラプス機能で長時間の経時観察画像を複数並べて表示する場合のように、所望の領域の画像を複数抽出して同時に表示させることができ、視認性を高め視野探し等に資する。

(デジタルズーム)

【0058】

また蛍光顕微鏡は、光学ズーム以外に、画像処理によるデジタルズーム機能を備える。デジタルズームを行う際は、図9に示すように、現在拡大画像表示領域MAで表示される視野に対応する領域を広域画像WI上で、光学視野とデジタルズームした視野の両方を表示する。すなわち、広域画像WI上に拡大画像MIの領域を矩形状で表示させる際、図9(a)に示すように元画像である光学画像の矩形を破線(第1の枠状BX1)で表示させつつ、デジタルズームの倍率に応じて、拡大表示された領域を実線(第2の枠状BX2)で表示させる。これにより、解像度の高い元の光学像と、デジタルズームにより拡大された視野に対応する領域とを広域画像WI上で対比でき、ユーザはデジタルズームによる表示であること、すなわち光学画像に比べて解像度が低下していることを認識できる。加えて、低倍率の広域画像WI上での対応位置が正しく反映されるので、どの程度解像度が低下しているか、すなわち元データの領域と視野との相対関係も確認できる。また広域画像WI上で現在位置を変更する際は、変更位置まで試料載置部28が移動している間はデジタルズーム像を表示しておく。すなわち、XYステージの可動範囲は大きく、指定された目標位置までステージを物理的に移動し終えるまである程度の時間を要する。このため、ナビゲーション画面72に表示されている広域画像WIの中から、目標位置の視野に相当する画像を切り出し(例えば枠状BX1で表示される視野範囲画像)、ステージの移動中はこの視野範囲画像をデジタルズームで拡大表示させた視野範囲画像を一時的に表示させる。ステージ移動終了後は、得られた拡大画像MIの表示に切り替える。これにより、時間のかかるステージ移動中にも仮のデジタルズーム画像が表示されるので、ユーザにおける待ち時間のストレスを低減できる。

(広域画像合成手段)

【0059】

また複数の広域画像を離散的に登録して切り替え表示する他、隣接する広域画像同士を繋げて、より大きい広域画像に合成することもできる。このような画像を連結の手順を、図10に基づいて説明する。図10の例では、4枚の広域画像WI5~8を繋ぎ合わせて一枚の合成広域画像を生成している。先ず図10(a)に示すように、試料載置部28を移動させて、左上から時計回りに、隣接する広域画像WI5~8まで4枚撮像する。広域画像WIは、倍率の最も低い対物レンズを使用して明視野画像で撮像する。この際、隣接する広域画像WI同士が若干重なるように、視野を設定する。そして図10(b)に示すように、隣接する広域画像WI同士の重なり部分に基づいて、画像処理によりこれらを連結する。この合成処理は、画像処理部30の広域画像合成手段により行う。画像を合成するアルゴリズムとしては、画像データから特徴点を抽出してマッチングを行う等、既知の方法が適宜利用できる。これにより、一枚の大きな合成広域画像を得ることができる。従来は、最も倍率の低い対物レンズで得られる視野以上に広い広域画像を得ることができな

(補正座標位置演算手段77)

【0060】

このようにして得られた合成広域画像は、つなぎ合わせのための重なり部分によって、各広域画像の持つ位置座標が若干狂うという問題がある。そこで、広域画像合成手段が画像の合成を行う際の重なり量を保持しておき、この値に基づいて、座標位置を補正する。この補正は、制御部26の補正座標位置演算手段77により行う。具体的には、図10(b)において左上の広域画像WI5の座標を基準とし、広域画像WI6~8については各画像との重なり量を減算した座標位置に補正する。これにより、拡大画像MIの位置を合

10

20

30

40

50



成広域画像上に正しく反映させることができる。

【 0 0 6 1 】

図 1 1 に、このような広域画像合成を行うユーザインターフェース画面の一例を示す。この図に示す例では、ナビゲーション画面 7 2 において広域画像 W I 9 ~ W I 1 4 の 6 枚を指定し、広域画像合成を実行している。広域画像合成実行中は、進捗ダイアログボックス 1 2 0 に進捗を示すバーグラフが表示され、各広域画像の撮影と、撮影された広域画像の連結を実行する進捗状況が示される。

【 0 0 6 2 】

図 5 の顕微鏡操作プログラムの説明に戻ると、ナビゲーション欄 7 0 の右側には、対物レンズ 5 0 の位置を縦棒状に表示しており、視覚的に対物レンズ 5 0 の相対位置を把握できる。さらにその下段には、「ステージ位置記憶」欄 8 0 が設けられる。加えてその下段には照明の光量調整欄 8 2 が設けられる。図 4 の例では、透過光源 3 6 であるハロゲンランプは、チェックボックスにより ON / OFF が切り替えられ、また落射光源 4 8 である超高圧水銀ランプは、スライダを操作することで光量を調整できる。

10

【 0 0 6 3 】

また操作領域 6 2 の最下段には、対物レンズ 5 0 を退避させる「レンズ退避 ( P a u s e ) 」ボタン、画像上で各種の解析を行うための解析ソフトを呼び出す「解析ソフト」ボタン、顕微鏡操作プログラム起動時の初期画面を表示させる「初期メニューへ」ボタンが設けられている。

20

( 蛍光観察モードへの切替 )

【 0 0 6 4 】

観察条件設定手段 2 3 が撮像条件を切り替える手順を、図 1 2 及び図 1 3 のフローチャートに基づいて説明する。これらのフローチャートにおいて、図 1 2 は蛍光観察を選択した場合、図 1 3 は明視野観察を選択した場合、の観察モード切替手順を説明している。まず、蛍光観察モードへの切替について、図 1 2 に基づき説明する。ステップ S 1 2 0 1 で、ユーザが図 6 の画面から観察モード切替手段 2 1 で蛍光観察を指定すると、ステップ S 1 2 0 2 で透過光源 3 6 のハロゲンランプが OFF され、ステップ S 1 2 0 3 で蛍光フィルタキューブが挿入され、ステップ S 1 2 0 4 で CCD カメラの前段に配置したカラーフィルタ 3 2 が排除される。ここでカラーフィルタ 3 2 が回転式の場合はフィルタのない穴の位置が選択され、液晶式の場合は、電動挿抜機構等により機械的に退避される。次にステップ S 1 2 0 5 で蛍光観察用の蛍光撮像部 2 2 の設定を行う。例えばピーク測光や A E ( 自動露光 ) の OFF 等を設定する。さらにステップ S 1 2 0 6 で画像処理部 3 0 をモノクロ画像処理モードに切り替える。具体的には色補間や色合成等を行わない処理とする。さらにステップ S 1 2 0 7 で、蛍光励起シャッタを開放位置とする。しかし、観察が終了した後、例えば別の観察条件に移っている場合やパソコンのアプリケーションで他の演算をしている場合等は、無駄な励起を行わないようにする。

30

【 0 0 6 5 】

一方、明視野観察モードへの切替は、図 1 3 に示すようにステップ S 1 3 0 1 でユーザが明視野観察モードを選択すると、ステップ S 1 3 0 2 で蛍光励起シャッタを閉鎖位置とし、無駄な励起を行わないようにする。次にステップ S 1 3 0 3 で、透過光源 3 6 であるハロゲンランプを ON する。特にハロゲンランプはランプ光量の立ち上がりが悪いため、早めに点灯することが好ましい。次にステップ S 1 3 0 4 で透過光が蛍光フィルタを透過しないよう、蛍光フィルタキューブを退避させる。次いでステップ S 1 3 0 5 でカラーフィルタ 3 2 をカラーモードに切り替える。機械式フィルタ 3 3 を使用する場合はターレットを回転させて R G B を順次切り替え、液晶式フィルタ 3 4 の場合はフィルタを光路に挿入する。さらにステップ S 1 3 0 6 で画像処理部 3 0 をカラー画像処理モードに切り替える。機械式フィルタ 3 3 の場合はターレットの回転の制御と色合成とをリンクさせ、あるいは液晶式フィルタ 3 4 の場合は印加電圧制御と色合成をリンクさせ、カラー画像を合成する。そしてステップ S 1 3 0 7 により、明視野撮像部 2 5 の設定を行う。例えばカラー CCD カメラのアベレージ測光や A E を ON にする等の設定を行う。なお、これらの手順

40

50

は一例であり、一部の工程の順序を入れ替えることもできる。

【0066】

これによって、蛍光観察モードに際しては、高感度、高階調、高解像度のモノクロ撮影ができ、一方明視野観察に際しては、色情報を持ち3CCD並の高解像度のカラー撮影ができる。ユーザが観察モードを選択するという一操作のみで、顕微鏡、カメラ、画像処理、カラーフィルタ32等の制御を全て自動で観察条件設定手段23に行わせることにより、観察モードの切替に伴う設定変更の大幅な省力化を図ることができる。またこの構成は特別な機器を付加することなく安価に実現できる。

(位相差観察モード)

【0067】

さらにこの方法は、明視野観察に限られず、位相差観察や微分干渉観察にも適用できることはいうまでもない。位相差観察によれば、光の回折と干渉を利用して、透明な試料に明暗のコントラストを付けて観察できる。明視野観察のように試料を染色する必要がないので、生体細胞や培養細胞、血液等生きたままの状態を観察できる。

【0068】

以下、位相差観察モードの設定を行う手順を、図14のフローチャートに基づき説明する。まずステップS1401で、位相差観察を指定する。ここではユーザが観察モード切替手段21により、位相差観察モードを選択する。次にステップS1402で、蛍光励起シャッタを閉鎖位置とし、無駄な励起を行わないようにする。さらにステップS1403で、透過光源36であるハロゲンランプをONした後、ステップS1404で、透過光が蛍光フィルタを透過しないよう、蛍光フィルタキューブを退避させる。次いでステップS1405でカラーフィルタ32をカラーモードに切り替え、ステップS1406で画像処理部30をカラー画像処理モードに切り替える。これらステップS1402～ステップS1406の処理は、上述した図13とほぼ同様の手順となる。そしてステップS1407により、位相差用の撮像部の設定を行う。例えば明視野撮像部25のカラーCCDカメラのアベレージ測光やAEをONにする、エッジ強調フィルタを適用する等の設定を行う。さらにステップS1408で、蛍光顕微鏡を位相差観察を行うための物理的な構成に切り替える。ここでは、対物レンズ50の倍率に応じた位相リング絞りを挿入する。本実施の形態では、位相差リングのPhリングとしてPhL、Ph1、Ph2、Ph3の4タイプがあり、対物レンズ50の倍率に応じてこれらを使い分ける。このようにして位相差観察モードでは、透明な試料又は反射試料の位相あるいは光路差に基づき位相差像を結像することで、コントラストの高い位相差像を得ることができる。なお、これらの手順は一例であり、一部の工程の順序を入れ替えることもできる。

(微分干渉観察モード)

【0069】

微分干渉観察とは、無染色の試料を光が通過する際の屈折率の違いや、試料表面の形状による光路差(光の進み方の違い)を明暗のコントラストに変えて観察する方法である。微分干渉観察では偏光を利用して僅かに離間した平行光を生成して、無色透明の試料に透過させた後、これらの光を干渉させて立体的な結像を得る。この微分干渉観察は位相差観察と同様、生きたままの試料を観察でき、特に位相差観察よりも厚い試料に適している。用途としては神経や筋肉の繊維構造、細胞分裂紡錘体の観察や、細胞核構造、その他無染色の厚い試料、あるいはICウエハ表面、磁気ヘッドの研磨面の外観検査、結晶成長過程の観察等に利用される。

【0070】

以下、微分干渉観察モードの設定を行う手順を、図15のフローチャートに基づき説明する。まずステップS1501で、微分干渉観察を指定する。ここではユーザが観察モード切替手段21により、微分干渉観察モードを選択する。次にステップS1502で、蛍光励起シャッタを閉鎖位置とし、ステップS1503で透過光源36をONした後、ステップS1504で蛍光フィルタキューブを退避させる。これらステップS1502～ステップS1504の処理は、上述した図13、図14とほぼ同様の手順となる。次いでステ

ステップS1505でCCDカメラの前段に配置したカラーフィルタ32を排除する。ここでカラーフィルタ32が回転式の場合はフィルタのない穴の位置が選択され、液晶式の場合は、電動挿抜機構等により機械的に退避される。さらにステップS1506で画像処理部30をモノクロ画像処理モードに切り替える。具体的には色補間や色合成等を行わない処理とする。そしてステップS1507により、微分干渉用の撮像部の設定を行う。例えば蛍光撮像部22を構成するモノクロCCDカメラ22Aのアベレージ測光やAEをONにする、エンボスフィルタを適用する等の設定を行う。最後にステップS1508で、蛍光顕微鏡を微分干渉観察を行うための物理的な構成に切り替える。ここでは、投光側の光路上に光学素子(プリズム)及び偏光板(ポラライザ)を挿入し、一方結像側の光路上に光学素子(プリズム)及び偏光板(アナライザ)を、それぞれ挿入する。このようにして、

10 微分干渉観察モードへの切り替えを行った上で微分干渉観察を実行する。なお、これらの手順は一例であり、一部の工程の順序を入れ替えることもできる。

#### 【0071】

このような位相差観察や微分干渉観察を行う観察モードをさらに観察モード切替手段21に付加して選択可能とすることで、これらの観察モードへの切り替えもスムーズに行うことができる。あるいはまた、蛍光顕微鏡の構成に応じて、微分干渉観察に加えて、特殊なコンデンサを使用することで試料を斜めから照明して試料により散乱した光を観察する暗視野観察や、試料の偏光特性を明暗のコントラストや色の変化にして観察する偏光観察等への切り替えも選択肢に含めることもできる。

(蛍光合成観察モード)

#### 【0072】

また蛍光観察で得られたモノクロ画像をカラー化したい要求もある。例えば、蛍光観察をする前にまず試料内の細胞の位置を確認するためにカラー画像を利用することがある。また、得られた信号が蛍光か単なるノイズかを判断するために蛍光の色合いを見て判断することや、非蛍光標本を観察する場合、あるいは蛍光イメージングで問題となる自家蛍光(バックグラウンド)と蛍光シグナルと判別したい場合等にカラー撮影したいことがある。このような場合、モノクロCCDカメラではカラー撮影できず、カラーCCDカメラを増設するのはコストがかかる。またカメラを接続するカメラポートが1つしか備えられていない場合は、一々カメラを装着し直す必要があった。そこでモノクロカメラにカラーフィルタを挿入してカラー化する方法が開発されている。明視野観察のカラー撮影により試料の色情報を取得した後、蛍光観察により得られたモノクロ画像である蛍光像の輝度情報に色情報を重ねることで、カラー化した蛍光合成画像を結像する。これにより信号を判別しながら高感度、高解像度、高速な蛍光観察も可能となる。ただ、蛍光合成画像を結像するには、フィルタ挿抜と共にカメラ画像処理も変更する必要があり、観察方法の切り替えに応じて変更するのが手間であった。またカラーフィルタを挿入したときピントずれや視野ずれ、色ずれ、あるいはレンズの個体差によるずれ等が発生するので、これらの調整も必要となる。そこで、このような蛍光合成画像を撮像する条件を、蛍光合成観察モードとして、観察モード切替手段21に付加し、観察条件設定手段23で自動的に設定することで、このような手間を省力化し、容易に蛍光合成画像を得ることができるようになる。

#### 【0073】

蛍光合成観察モードにおいてカラーの蛍光合成画像を得る手順の一例を説明すると、先ず透過光源36のハロゲンランプがOFFされ、蛍光フィルタキューブが挿入され、カラーフィルタ32をカラーモードに切り替える。さらに蛍光観察用の蛍光撮像部22の設定を行い、画像処理部30をカラー画像処理モードに切り替え、蛍光励起シャッタを開放位置とする。このようにして、カラーの蛍光合成画像を得るための構成とできる。観察条件設定手段23は、蛍光合成観察モードが選択されると、上記の撮像条件に変更する。

#### 【0074】

さらに、蛍光顕微鏡で光軸方向に移動させながら、すなわち高さを変化させながら複数の画像を撮像し、これらの画像を合成することで3次元情報を含む立体画像(スタック画像)を取得することもできる。スタック画像は光軸方向の奥行きを持っており、試料Wの

10

20

30

40

50

表面状態を観察可能である。特に多色蛍光観察（マルチカラー）においては、多重染色試料に合致したフィルタセット1を切り替えるターレットを自動選択しながら、Z軸方向のスキャニング画像を時系列で取得し、これによって蛍光染料の発現箇所等を立体的に深度深く観察することが可能となる。

（補正作業の自動化）

【0075】

加えて、観察条件設定手段23が撮像条件を変更する際に、カラーフィルタ32を挿入したときに発生する様々なずれを自動的に補正することもできる。従来、このようなずれの修正は手作業で行っていたが、フィルタ毎の補正量を予め登録しておくことで、観察モードの切り替えと共にレンズ位置の微調整等の補正作業も併せて行わせることができ、更なる省力化と高精度な観察が実現できる。

10

（帯域）

【0076】

さらにまた、観察モードの切替の際に、画像転送の際のフレーム落ちを考慮したデータ量の調整を行わせることもできる。一般にモノクロ画像データに比べ、カラー画像データは情報量が多いため、図2において画像転送部31から外部のコンピュータ58に画像データを転送する際の転送経路の帯域の制限、転送速度やフレームレートが問題となる。すなわち、モノクロ画像の際にはデータ量が比較的少ないため、データ通信量を帯域の範囲内に抑えることができ、フレーム落ちを生じることなく画像データを転送でき、表示部24においてリアルタイムに画像が更新されていたものであっても、カラー画像に切り替えた途端、データ量が大きくなって制限された帯域内で転送されるデータ量が不足し、フレーム落ちを生じることがある。これに対応するために、画像転送部31とコンピュータ58間で行われるデータ通信経路の帯域やフレーム転送速度に応じて、画像データのビット数を調整する。例えば、モノクロ撮影時は1CHの高階調（10～16bit）で転送し、カラー撮影時はRGB毎の階調を8bit以下に低下させて画像転送することで、動画転送時の帯域を一定量に抑え、フレーム落ちや低下を防ぐことができる。この設定は、予め装置又はプログラム側で設定する。或いは、ユーザが転送速度等に応じて個別に設定可能とすることもできる。

20

（露光調整機能）

【0077】

さらに本実施の形態では、蛍光撮像部のフレームレートに応じて、可能な限り露光時間を長く調整し、必要最小限の励起光量を自動的に計算してこの値に励起光量を自動調整する機能を備える。これにより、強い励起光を試料に照射し続けることで試料に与えるダメージを軽減できる。すなわち、従来はユーザが励起光量を抑えるために、蛍光観察の目的や条件等に応じて手動で露光時間を適宜調整して励起光量を下げる作業を行っていた。しかしながら、必ずしも正確な調整がなされていたとはいえず、またこの作業が非常に面倒であるという問題があった。そこで本実施の形態では、このような作業を自動化し、ユーザが求める蛍光像の明るさを得るために、条件の範囲内で励起光量を可能な限り抑えるよう、制御部26の露光時間・励起光量制御手段27が自動的に露光時間を設定している。この手順を、図16のフローチャートに基づいて説明する。

30

40

【0078】

先ずステップS1601で、ユーザが所望の条件で適切な明るさに調整する。すなわち、所望の観察モードに観察モード切替手順で設定し、また励起光源の明るさや蛍光撮像部のシャッタースピード等を観察条件設定手段23で設定する。このときの励起光量を基準励起光量とする。図3の例では励起光量は、励起光量調整部であるフィルタの切り替えにより0～100%まで20%幅で6段階の切り替えを可能としている。実際には0%（励起光遮断）にすることはないので、20%～100%の5段階で励起光量を記憶する。次にステップS1602で、露光時間・励起光量制御手段27の露光調整機能をONにする。そしてステップS1603で、現在の蛍光撮像部の撮像条件を取得する。すなわち、モノクロCCDカメラのカメラ撮影条件として、蛍光像撮像時のフレームレート（シャッタ

50

ースピード又は露光時間)、画素数等を保持する。

【0079】

次にステップS1604で、この撮像条件から、フレームレートを演算する。フレームレートは、観察モードによって変化する。観察モードとしては、ビニング、画像積算、蛍光合成観察等が挙げられる。ビニングは、隣接する複数の画素で光量を加算して一画素として扱うことにより、画素数は少なくなるものの、画像を明るくできる観察モードである。画像積算は、連続的に撮像した複数枚の蛍光像を画素毎に重ねて光量を多くする観察モードである。蛍光合成観察は、RGB各色に対応する蛍光像を取得し、これらを合成したカラー画像を得る観察モードである。また蛍光像の一部の領域のみを撮像する読み出しの有無、すなわち蛍光像の画素数によっても変化する。一例として、画素数1360ピクセル×1024ピクセルで15フレーム/秒を標準のフレームレートとした場合の、フレームレートの変化を表1に示す。

10

【0080】

【表1】

撮影条件	画素数	フレームレート
標準	1360 x 1024	15フレーム/秒
部分読み出し	600 x 400	87フレーム/秒
部分読み出し	1000 x 400	52フレーム/秒
2x2ビニング	680 x 512	60フレーム/秒
4x4ビニング	340 x 256	120フレーム/秒
画像積算5枚	-	3フレーム/秒
色合成	-	5フレーム/秒

20

【0081】

これらフレームレートの計算は、標準観察を元にして演算される。例えば、部分読み出しであれば画素数が少なくなる分、高速な読み出しが求められ、画素数1000ピクセル×400ピクセルに設定すると、 $(1360 \times 1024) \div (1000 \times 400)$  倍 = 約3.48倍となり、 $15 \text{ フレーム/秒} \times 3.48 = 52 \text{ フレーム/秒}$ となる。この場合に、部分読み出しで励起光量を80%透過、露光時間10msにおいて十分な蛍光像が得られているとすれば、これを基準光量として露光調整機能を実行すると、露光時間は $1/52 \text{ フレーム/秒} = 19.1 \text{ ms}$ となるので、励起光量を標準観察の80%から、 $80\% / (19.1 \text{ ms} / 10 \text{ ms}) = 41.8\%$ まで落とすことが可能となる。

30

【0082】

また、ビニングにより2×2ピクセルをサブアレイ(部分領域)に設定すると、元画像の1360ピクセル×1024ピクセルが680ピクセル×512ピクセル相当となるので、上記部分読み出しと同様に計算できる。さらに画像積算では、積算枚数分だけフレームレートが低くなり、例えば5枚の画像積算では $(15 \text{ フレーム/秒}) / 5 \text{ 枚} = 3 \text{ フレーム/秒}$ となる。さらにまた蛍光合成観察では、図3に示すようにモノクロカメラにカラーフィルタを挿入してカラー化する。カラーフィルタの挿入方法には、図3(a)に示すように回転式のターゲット状にR、G、B、透過のフィルタを設け、機械的にこれらを切り替える方式と、図3(b)に示すように、液晶RGBフィルタを用いて印加電圧によってR、G、Bと透過分光特性をスイッチング、若しくは透過を切り替える方式がある。いずれの場合も、RGB各色毎の蛍光像を合成するため、フレームレートは $1/3$ となり、 $15 \text{ フレーム/秒}$ が $5 \text{ フレーム/秒}$ となる。

40

【0083】

さらに、これらの撮影条件を組み合わせることもでき、上記と同様の計算によりフレームレートを計算できる。観察条件を組み合わせた場合のフレームレートの変化の一例を、表2に示す。

【0084】

【表 2】

撮影条件	画素数	フレームレート
標準	1360 x 1024	15フレーム/秒
2x2ビニング + 色合成	680 x 512	20フレーム/秒
4x4ビニング + 画像積算5枚	340 x 256	24フレーム/秒
部分読み出し + 色合成	600 x 400	29フレーム/秒

## 【0085】

このようにしてフレームレートが決定されると、ステップ S 1 6 0 5 で、このフレームレートに応じて蛍光撮像部の露光時間を調整する。すなわち、フレームレートで許容される時間いっぱいまで、露光時間を長くする。例えばユーザが標準観察において励起光量を 80% 透過、露光時間を 10 ms に設定して蛍光観察し、蛍光像の明るさが十分得られているとしてこの値を基準励起光量に設定した場合に、観察モードを部分読み出しに変更し、画素数を 1000 ピクセル x 400 ピクセルに設定し、露光調整機能を適用すると、そのフレームレートは表 1 のように 52 フレーム / 秒となるから、露光時間は  $1 / 52 = 19.2$  ms まで延ばすことができる。ここまでの露光時間であれば、表示部のリアルタイム表示に要求されるフレームレートに十分対応できる。そしてステップ S 1 6 0 6 で、露光時間を調整した分、励起光量を調整する。上記の例では、露光時間を 10 ms から 19.2 ms に延長することで、その分だけ励起光量も 80% 透過から少なくすることができ、具体的には  $80\% / (19.2 / 10) = 41.7\%$  まで、励起光量調整部で励起光量を低減できる。図 2 の例では、励起光量は 20% 刻みで段階的に調整できるため、設定可能な励起光量に最も近い 40% に設定する。このようにして、蛍光像に必要な明るさを保ちつつ、励起光量を可能な限り抑えることができ、試料への負荷を軽減できる。

## 【0086】

なお、フレームレートで許容される範囲内で露光時間を長く設定するが、フレームレートを超えることがないように設定される。例えば励起光量を 20% 刻み等、離散的に設定する場合においては、演算された露光時間に合致する露光時間に設定できないことがある。この場合の離散値の選択方法は、露光時間がフレームレートを超えることがないように励起光量を調整する。これによってフレーム落ちを回避できる。

## 【0087】

以上のようにして、観察条件に応じてフレームレートが決まるので、ユーザが所望の観察条件にて所望の明るさに設定した基準状態から、その明るさを保つために必要で、かつフレームレートの維持に必要な励起光と露光時間すなわち CCD カメラのシャッタースピードを自動調整し、かつこれに応じて受光光量を低下させる機能を備えることで、試料に照射する励起光量を必要最小限とすることができ、安定した蛍光観察が可能となる。

(カメラ設定)

## 【0088】

以上のビニング、部分読み出し (ROI) 等の設定は、図 17 に示す設定画面から行う。図 17 は、蛍光顕微鏡操作プログラムの操作領域 62 で「カメラ設定」タブ 104 を選択した状態のユーザインターフェース画面を示している。「カメラ設定」タブ 104 を選択すると、操作領域 62 には、「カラー・モノクロ設定」欄 130、「カメラ設定」欄 140、「オートフォーカス設定」欄 150、「ホワイトバランス」欄 160 がそれぞれ表示される。「カラー・モノクロ設定」欄 130 では、モノクロ 8 bit、モノクロ 12 bit、カラーのいずれかをラジオボタンで選択する。また保存時のデータビット数を 12 ビットから 16 ビットに拡張する際の拡張方法として、上詰め (標準)、下詰め (標準) のいずれかを選択できる。

## 【0089】

「カメラ設定」欄 140 では、プレビューモード (超高速 / 高速 / 標準)、ゲイン (0 dB / 6 dB / 12 dB / 24 dB)、測光方法 (アベレージ測光 / ピーク測光、及び全画面 / 一部分) 等がプルダウンメニューで選択される。さらに「ビニング / ROI」として、「OFF」、「ビニング (2 x 2 / 4 x 4 / 8 x 8)」、「ROI (小 / 中 / 大)」

が選択できる。この例では部分読み出し（ROI）は、小／中／大のいずれかの規定値から選択する方式としているが、画面上の任意の領域を指定して部分読み出しを行うよう構成してもよい。

#### 【0090】

さらに撮影条件として、フルサイズの画素数（1360×1024 / 680×512 / 2720×2048 / 4080×3072）、マルチカラー&Zスタック撮影順序（マルチカラー Zスタック / Zスタック マルチカラー）をそれぞれ選択できる。また「オートフォーカス設定」欄150では、フォーカスエリア表示のON/OFFと、全画面／一部分の設定、「ホワイトバランス」欄160では、プッシュセット実行、初期化に加えて、プッシュセットエリア表示のON/OFFと、表示ONの場合の大／中／小、並びにマ

10

（XY座標記憶位置表示機能）

#### 【0091】

さらに、広域画像上の所望の領域をXYステージのXY座標位置として記憶し、広域画面上に表示させることもできる。このXY座標は、複数を記憶しておくこともできる。図18、図19、図20に示す例では、所望の領域を3つ記憶し、それぞれの記憶領域を細線の点線枠PX1～PX3でナビゲーション画面72の広域画像WI上に示している。複数の領域を記憶する際は、各点線枠に登録番号を添えて表示させることで、これらを容易に区別できる。XY座標記憶位置の表示は、図19～図20のナビゲーション画面72において下段に設けられた「ステージ記憶位置」欄110のチェックをON/OFFすることで切り替える。このようにして、複数登録された領域の相対位置を確認できる。特に、予め設定された複数の位置を移動しながら順次撮影する場合の位置確認に好適である。なおこれらの図において、図18は操作画面60の画像表示領域61で明視野画像の拡大画像MIを表示させつつナビゲーション画面72を開いて広域画像WIを表示させた状態、図19は図18のナビゲーション画面72を拡大した状態、図20は別のナビゲーション画面72として蛍光画像の広域画像WIを表示させた状態を、それぞれ示している。

20

（撮影履歴表示機能）

#### 【0092】

加えて、過去に表示した拡大画像に相当する領域を広域画面上に表示させることもできる。上述した図18に示す例では、画像表示領域61の拡大画像表示領域MAに現在表示される拡大画像MIを、ナビゲーション画面72に表示される広域画像WI上の対応する位置に、矩形状の第1の枠状BX1で表示すると共に、過去に表示した領域を履歴領域として、白っぽい枠状HXで表示している。撮影履歴表示機能で表示される履歴領域HXは、拡大画像表示領域MAに表示させた拡大画像の位置をすべて記憶して表示させる他、画像登録した拡大画像のみを記憶することもできる。撮影履歴の表示は、図19～図20のナビゲーション画面72において下段に設けられた「撮影履歴」欄112のチェックをON/OFFすることで切り替えることができる。このように撮影履歴表示のON/OFFを切り替えることで、過去の履歴を広域画面上から容易に確認でき、新たな視野探しの際の基準等に利用できる。また最新の履歴を削除したり、あるいはすべての履歴を削除することもできる。図19～図20のナビゲーション画面72の例では、下段に設けられた「最新履歴削除」ボタン114を押下すると、履歴が最新のものから順次削除され、また「全履歴削除」ボタン116を押下することですべての履歴が削除される。

30

40

#### 【0093】

また、枠状の線種に変えて、あるいはこれに加えて枠状の色を変更することで、視認性を高め、さらに複数種類の枠の区別も容易となる。図18、図19、図20に示す例では、細線の点線枠を黄色、太線の実線枠を赤色に、それぞれ表示している。

（簡易スケール機能）

#### 【0094】

ナビゲーション画面72で表示される拡大倍率は任意に調整でき、ナビ画像倍率表示欄74に現在の倍率が表示される。倍率はユーザが任意に指定する他、登録された広域画像

50

の倍率に応じて適切な倍率に自動調整して表示させることもできる。また、図19～図20のナビゲーション画面72の例では、ナビゲーション画面72の広域画像に重ねて、適切なスケールSCを表示する簡易スケール機能を備える。スケールSCは画像表示領域61の視野範囲、すなわち選択中の対物レンズの倍率から自動計算して、最適な長さの寸法にて画像上に表示される。図19～図20の例では、下段に設けられた「簡易スケール」欄118のチェックをONすると、選択中の広域画像の倍率に応じた最適なスケールで、ナビゲーション画面72において広域画像が表示される。

【産業上の利用可能性】

【0095】

本発明の蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡の操作方法、蛍光顕微鏡操作プログラム及びコンピュータで読み取り可能な記録媒体並びに記録した機器は、例えば患者の血清と細胞核とを反応させ、蛍光標識を加えて蛍光顕微鏡で坑核抗体を観察し、坑核抗体の蛍光により陽性、陰性を判定する蛍光抗体検査等に利用可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】一般的な蛍光顕微鏡システムの構成を示すブロック図である。

【図2】本発明の一実施の形態に係る蛍光顕微鏡システムを示すブロック図である。

【図3】モノクロカメラに使用するカラーフィルタの構成例を示す模式図である。

【図4】蛍光顕微鏡操作プログラムの操作画面のユーザインターフェースを示すイメージ図である。

20

【図5】図4におけるCH4の明視野像を拡大表示させた状態を示すイメージ図である。

【図6】チャンネル毎の設定を行うチャンネル設定画面を示すイメージ図である。

【図7】ナビゲーション画面で広域画像を表示する例を示すイメージ図である。

【図8】相対移動範囲と拡大画像、広域画像の表示の対応関係を示す概念図である。

【図9】デジタルズームによる拡大画像の領域を広域画像に表示させる様子を示す概念図である。

【図10】複数の広域画像を合成する様子を示す概念図である。

【図11】広域画像合成を行うユーザインターフェース画面の一例を示すイメージ図である。

【図12】蛍光観察を選択した場合に撮像条件を切り替える手順を示すフローチャートである。

30

【図13】明視野観察を選択した場合に撮像条件を切り替える手順を示すフローチャートである。

【図14】位相差観察モードの設定を行う手順を示すフローチャートである。

【図15】微分干渉観察モードの設定を行う手順を示すフローチャートである。

【図16】露光時間を自動的に調整する手順を示すフローチャートである。

【図17】蛍光顕微鏡操作プログラムの設定画面のユーザインターフェースを示すイメージ図である。

【図18】蛍光顕微鏡操作プログラムの操作画面からナビゲーション画面を開いた状態を示すイメージ図である。

40

【図19】図18のナビゲーション画面を拡大した状態を示すイメージ図である。

【図20】他のナビゲーション画面の例を示すイメージ図である。

【符号の説明】

【0097】

1...フィルタセット

12...励起フィルタ；14...ダイクロイックミラー

16...吸収フィルタ；18...フィルタ切替部；20...切替設定部

21...観察モード切替手段；21A...プルダウンメニュー

22...蛍光撮像部；22A...モノクロCCDカメラ

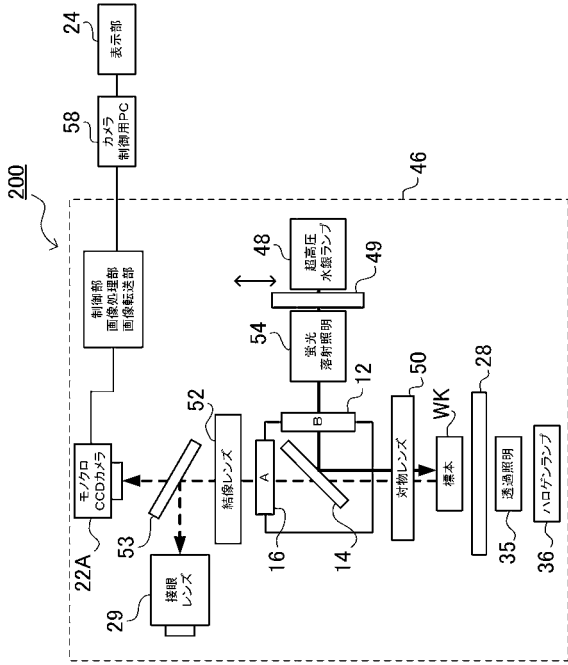
23...観察条件設定手段；24...表示部

50

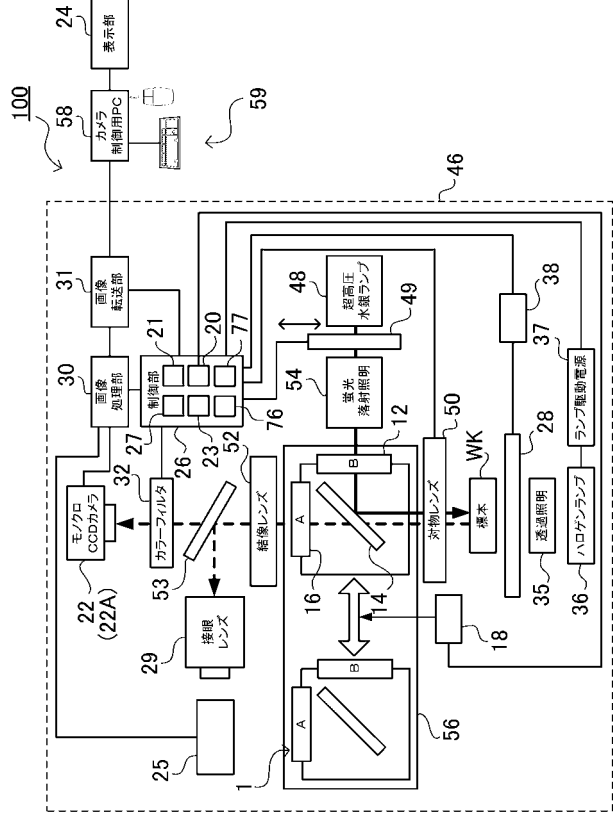


2 5 ... 明視野撮像部 ; 2 6 ... 制御部 ; 2 7 ... 露光時間・励起光量制御手段	
2 8 ... 試料載置部 ; 2 9 ... 接眼レンズ	
3 0 ... 画像処理部 ; 3 1 ... 画像転送部	
3 2 ... カラーフィルタ ; 3 3 ... 機械式フィルタ ; 3 4 ... 液晶式フィルタ	
3 5 ... 透過照明レンズ ; 3 6 ... 透過光源	
3 8 ... 移動機構 ; 3 7 ... 透過照明駆動電源	
4 6 ... 暗室空間 ; 4 8 ... 落射光源 ; 4 9 ... 励起光量調整部	
5 0 ... 対物レンズ ; 5 2 ... 結像レンズ ; 5 3 ... 観察切替手段	
5 4 ... コレクタレンズ ; 5 6 ... フィルタホルダ	
5 8 ... コンピュータ ; 5 9 ... 入力デバイス	10
6 0 ... 操作画面 ; 6 1 ... 画像表示領域 ; 6 2 ... 操作領域	
6 4 ... 「観察方法の選択」欄 ; 6 5 ... チャンネルボタン	
6 6 ... 観察倍率表示欄 ; 6 7 ... 「チャンネル設定」ボタン	
6 8 ... 「レンズ選択」欄 ; 6 9 ... ズーム調整スライダ	
7 0 ... ナビゲーション欄 ; 7 1 ... 「ナビゲーション」ボタン	
7 2 ... ナビゲーション画面 ; 7 3 ... チャンネル表示欄	
7 4 ... ナビ画像倍率表示欄 ; 7 5 ... 履歴画像表示欄	
7 6 ... 広域画像切替手段 ; 7 7 ... 補正座標位置演算手段	
7 8 ... 「画像登録」ボタン ; 7 9 ... 「保存」ボタン	
8 0 ... 「ステージ位置記憶」欄 ; 8 2 ... 光量調整欄	20
9 0 ... チャンネル設定画面	
9 1 ... 透過照明ハロゲン状態表示欄 ; 9 2 ... 蛍光励起シャッタ状態表示欄	
9 3 ... 擬似カラー表示欄 ; 9 4 ... 表示カラー選択欄	
9 5 ... 擬似カラーON/OFF表示欄 ; 9 6 ... コメント表示欄	
9 5 A ... ステータス表示欄 ; 9 5 B ... 合成調整欄	
9 7 ... 「オーバーレイ表示として使用」欄 ; 9 8 ... 共通設定欄	
9 9 ... 「設定」ボタン	
1 0 0 ... 蛍光顕微鏡本体	
1 0 2 ... 「顕微鏡操作」タブ ; 1 0 4 ... 「カメラ設定」タブ	
1 1 0 ... 「ステージ記憶位置」欄 ; 1 1 2 ... 「撮影履歴」欄	30
1 1 4 ... 「最新履歴削除」ボタン ; 1 1 6 ... 「全履歴削除」ボタン	
1 1 8 ... 「簡易スケール」欄	
1 2 0 ... 進捗ダイアログボックス ; 1 3 0 ... 「カラー・モノクロ設定」欄	
1 4 0 ... 「カメラ設定」欄 ; 1 5 0 ... 「オートフォーカス設定」欄	
1 6 0 ... 「ホワイトバランス」欄	
W I、W I 1 ~ W I 1 4 ... 広域画像	
M I ... 拡大画像 ; W A ... 広域画像表示領域 ; M A ... 拡大画像表示領域	
S I ... 相対移動範囲 ; B X 1 ... 第1の枠状 ; B X 2 ... 第2の枠状	
P X 1 ~ P X 3 ... 記憶領域 ; H X ... 履歴領域 ;	
W K ... 試料 ; S C ... スケール ; G D ... グリッド	40

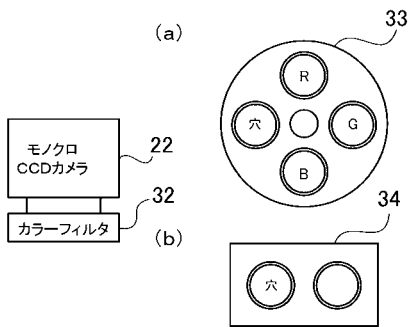
【図1】



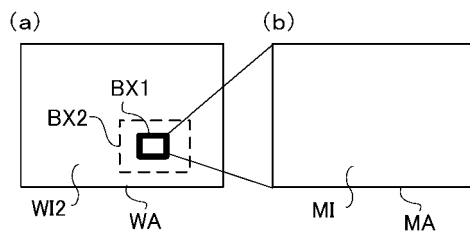
【図2】



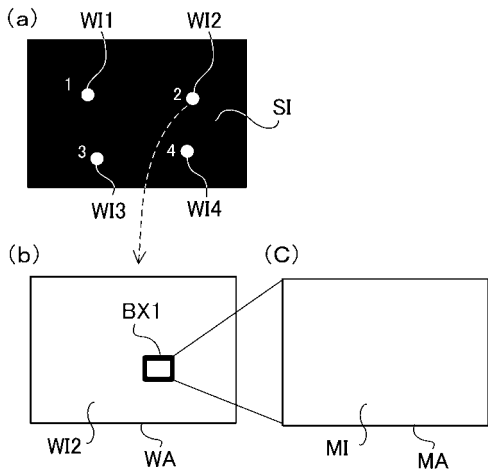
【図3】



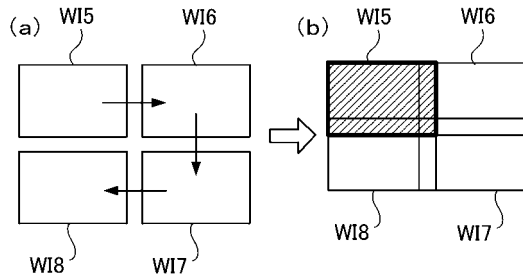
【図9】



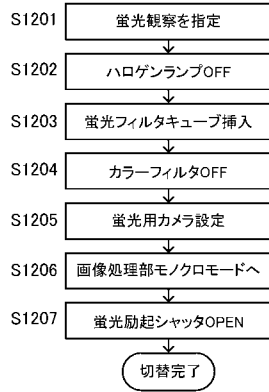
【図8】



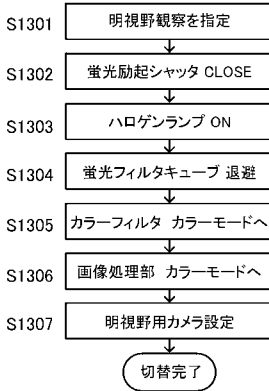
【図10】



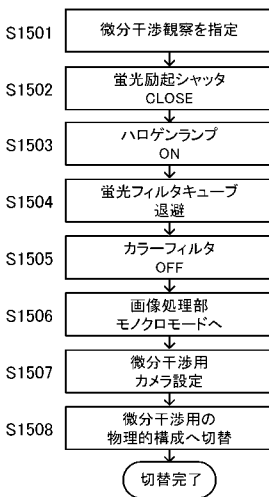
【 図 1 2 】



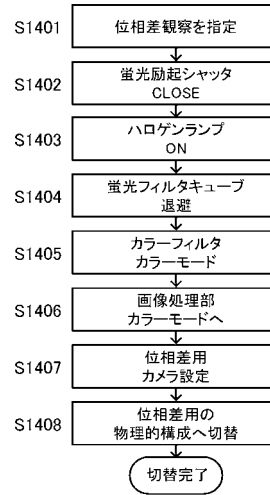
【 図 1 3 】



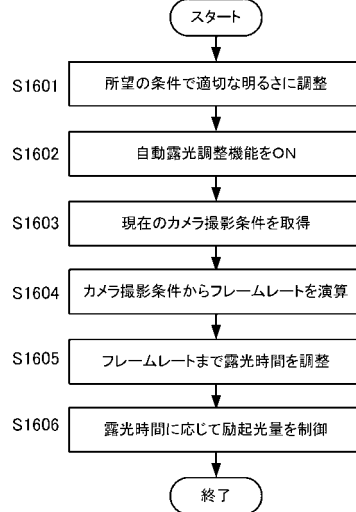
【 図 1 5 】



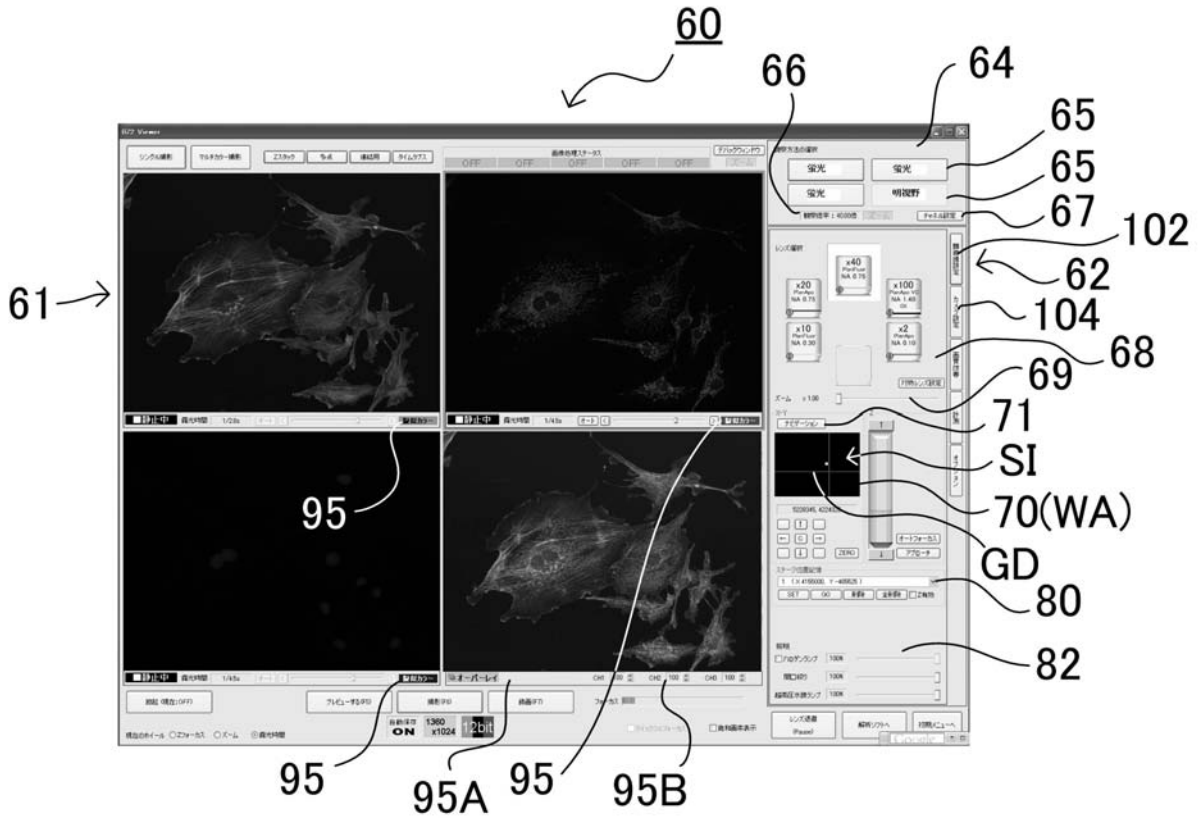
【 図 1 4 】



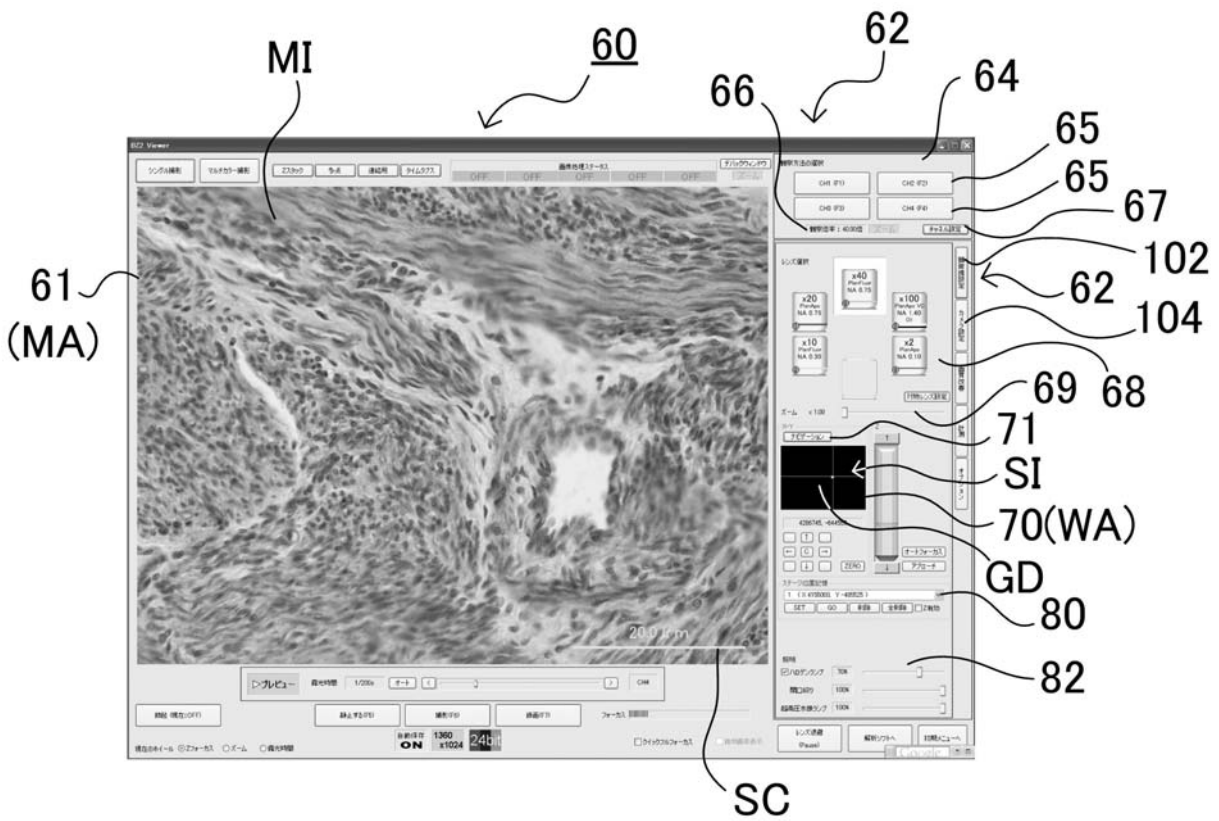
【 図 1 6 】



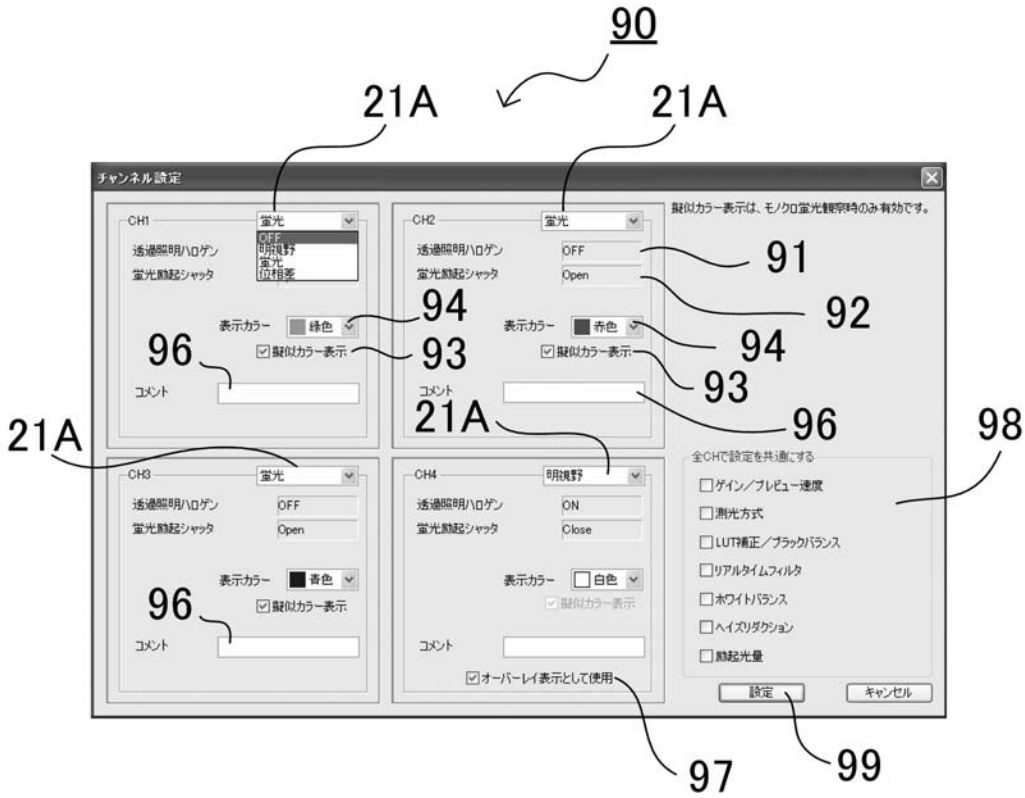
【 図 4 】



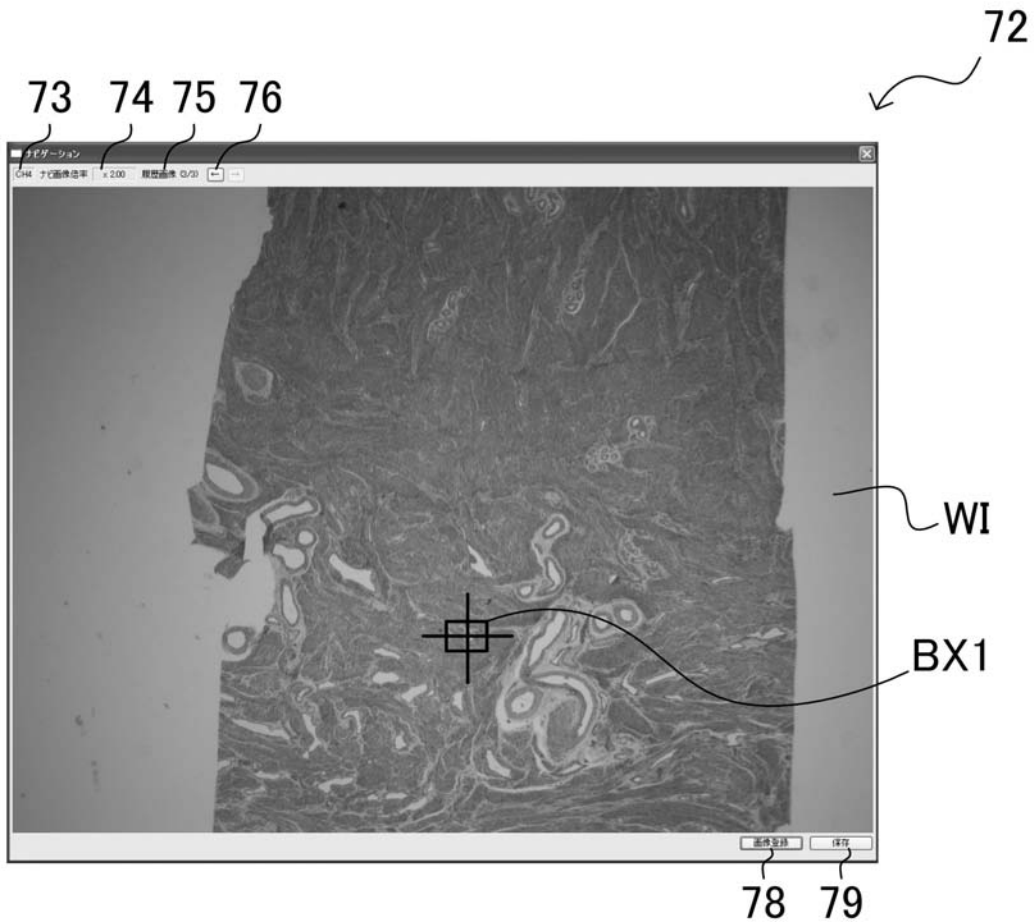
【 図 5 】



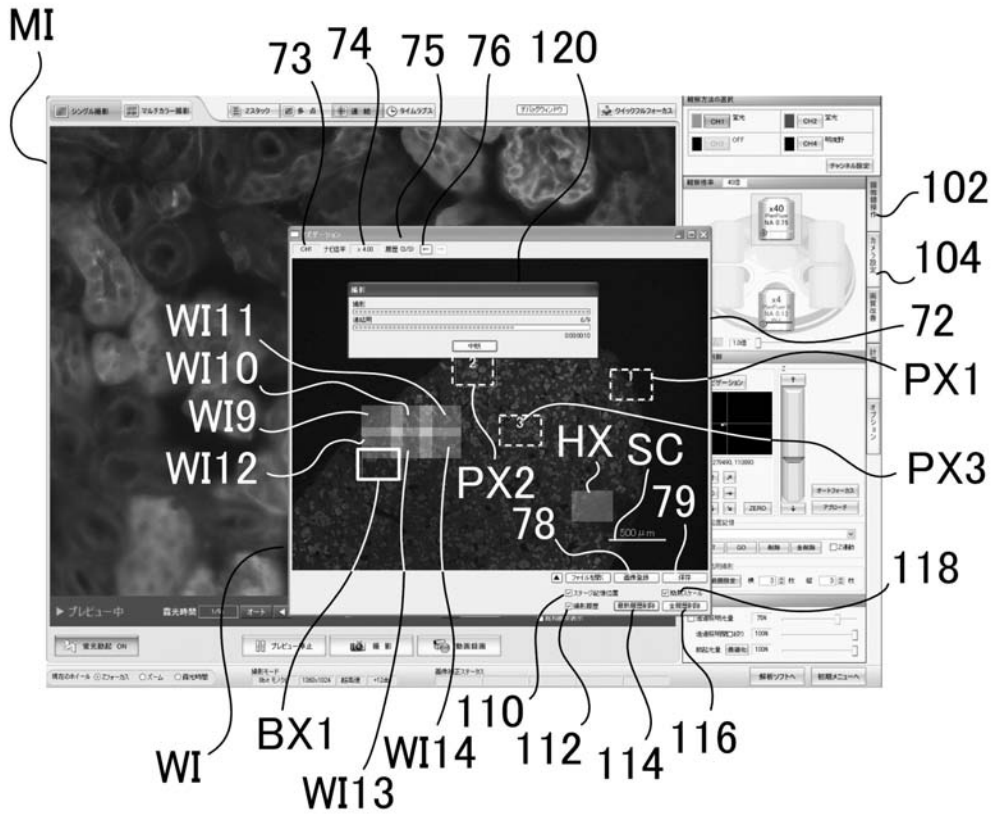
【 図 6 】



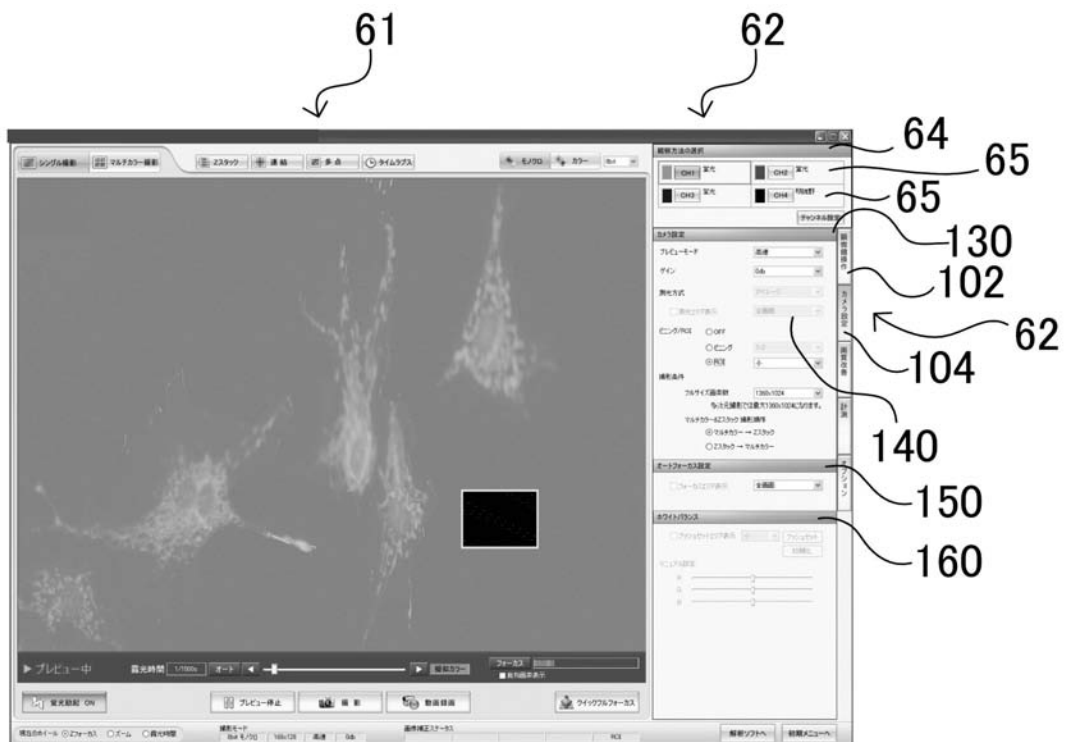
【 図 7 】



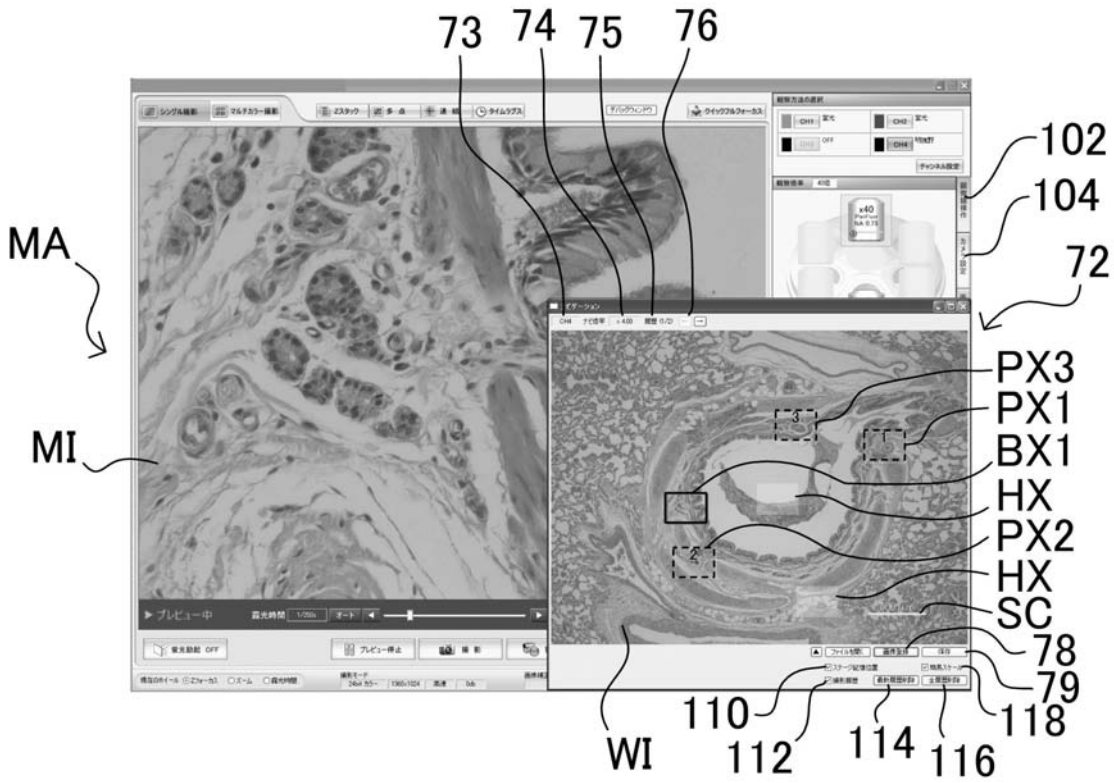
【図11】



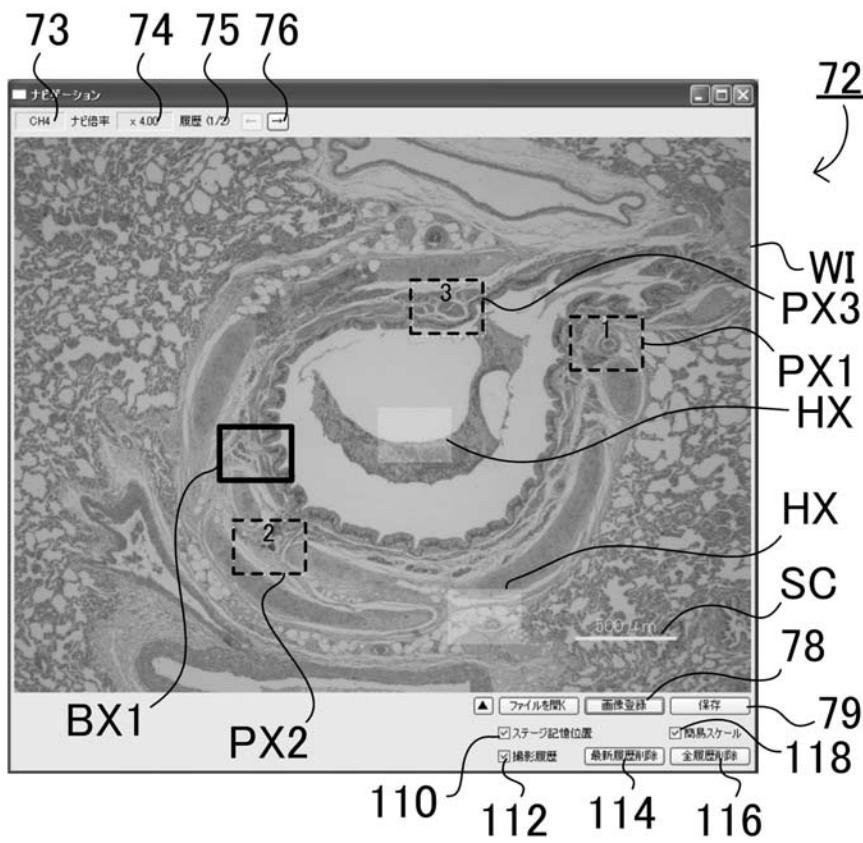
【図17】



【図18】



【図19】



【図 20】

