

(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12日(12.10.2017)

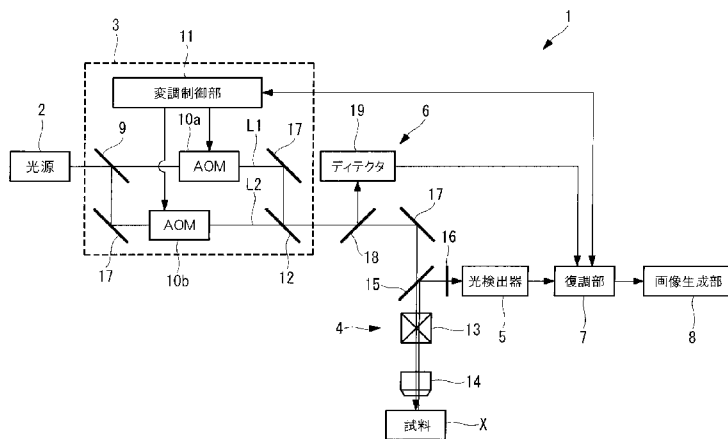


(10) 国際公開番号  
WO 2017/175374 A1

- (51) 国際特許分類:  
G02B 21/00 (2006.01) G02B 21/06 (2006.01)  
G01N 21/64 (2006.01)
  - (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061531
  - (22) 国際出願日: 2016年4月8日(08.04.2016)
  - (25) 国際出願の言語: 日本語
  - (26) 国際公開の言語: 日本語
  - (71) 出願人: オリンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1928507 東京都八王子市石川町2951番地 Tokyo (JP).
  - (72) 発明者: 井元 兼太郎 (IMOTO, Kentaro); 〒1928507 東京都八王子市石川町2951番地 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP). 土井 厚志 (DOI, Atsushi); 〒1928507 東京都八王子市石川町2951番地 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP).
  - (74) 代理人: 上田 邦生, 外 (UEDA, Kunio et al.); 〒2208137 神奈川県横浜市西区みなとみらい2-2-1 横浜ランドマークタワー37F 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, 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, KN, KP, KR, 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: IMAGE ACQUISITION DEVICE

(54) 発明の名称: 画像取得装置



- 2 Light source
- 5 Light detection device
- 7 Demodulation unit
- 8 Image generation unit
- 11 Modulation control unit
- 19 Detector
- X Sample

(57) Abstract: With the objective of accurately acquiring a signal light image regardless of environmental variation without an operator adjusting the intensity ratio of illumination light at every observation, an image acquisition device (1) according to the present invention is provided with: a modulation unit (3) for modulating light from a light source (2), thereby generating an illumination light which switches between two differing states over a time cycle; an illumination light detection unit (6) for detecting the generated illumination light (L1, L2); an illumination optical system (4) for irradiating a sample (X) with the generated illumination light (L1, L2); a signal light detection unit (5) for focusing and detecting the signal light using the illumination light (L1, L2) generated at the illumination position of the sample (X); a demodulation unit (7) for demodulating the modulation of the detected intensity signal of the signal light and the detected intensity signal of the illumination light; and an image generation unit (8) for generating a signal light image on the basis of the demodulated intensity signal of the signal light, the modulation unit (3) correcting the modulation intensity of the illumination light on the basis of the intensity signal of the illumination light demodulated by the demodulation unit (8).

light on the basis of the intensity signal of the illumination light demodulated by the demodulation unit (8).

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/175374 A1

---

作業者が観察毎に照明光の強度比率の調整を行うことなく、環境変化に関わらず、信号光画像を精度よく取得することを目的として、本発明に係る画像取得装置（１）は、光源（２）からの光を変調することにより、異なる２つの状態が時間周期的に切り替わる照明光を生成する変調部（３）と、生成された照明光（L 1, L 2）を検出する照明光検出部（６）と、生成された照明光（L 1, L 2）を試料（X）に照射する照明光学系（４）と、照明光（L 1, L 2）の試料（X）における照射位置において発生した信号光を集光して検出する信号光検出部（５）と、検出された信号光の強度信号および検出された照明光の強度信号に対し変調に対する復調を行う復調部（７）と、復調された信号光の強度信号に基づいて信号光画像を生成する画像生成部（８）とを備え、変調部（３）が、復調部（８）により復調された照明光の強度信号に基づいて照明光の変調強度を補正する。

## 明 細 書

**発明の名称**：画像取得装置

**技術分野**

[0001] 本発明は、画像取得装置に関するものである。

**背景技術**

[0002] レーザ走査顕微鏡等の画像取得装置において、変調することにより生成された2つの状態の励起光を試料に照射し、試料において発生した蛍光を検出した後に復調することにより、各状態の励起光に対応する蛍光を取得して画像を生成する技術が知られている（例えば、特許文献1参照。）。

**先行技術文献**

**特許文献**

[0003] 特許文献1：WO2015/163261号パンフレット

**発明の概要**

**発明が解決しようとする課題**

[0004] 特許文献1の顕微鏡では、2つの状態の励起光の強度が理想的には同一であることが必要であるが、光学部品の特性が温度等の環境変化によって変化するため、強度比率を一定に保持することは困難である。このため、作業者が観察に先立って励起光の強度比率を一定となるように調節する必要があり、手間がかかって煩わしいという不都合がある。

[0005] 本発明は上述した事情に鑑みてなされたものであって、作業者が観察毎に照明光の強度比率の調整を行うことなく、環境変化に関わらず、信号光画像を精度よく取得することができる画像取得装置を提供することを目的としている。

**課題を解決するための手段**

[0006] 本発明の一態様は、光源からの光を変調することにより、異なる2つの状態が時間周期的に切り替わる照明光を生成する変調部と、該変調部により生成された前記照明光を検出する照明光検出部と、前記変調部により生成され

た前記照明光を試料に照射する照明光学系と、該照明光学系による前記照明光の試料における照射位置において発生した信号光を集光して検出する信号光検出部と、該信号光検出部により検出された前記信号光の強度信号および前記照明光検出部により検出された前記照明光の強度信号に対し前記変調に対する復調を行う復調部と、該復調部により復調された前記信号光の強度信号に基づいて信号光画像を生成する画像生成部とを備え、前記変調部が、前記復調部により復調された前記照明光の強度信号に基づいて前記照明光の変調強度を補正する画像取得装置である。

[0007] 本態様によれば、光源から発せられた光が変調部に入射されると、異なる2つの状態が時間周期的に切り替わる照明光が生成され、生成された照明光が照明光学系によって試料に照射される。試料における照明光の照射位置において発生した信号光は信号光検出部により検出される。検出された信号光の強度信号が復調部において復調され、復調された信号光の強度信号に基づいて画像生成部により信号光画像が生成される。

[0008] その一方で、変調部により生成された照明光は照明光検出部により検出され、検出された照明光の強度信号が復調部において復調される。変調部により2つの状態を有する照明光の各状態における強度信号を比較することが可能となり、環境変化によって変調部による変調比率が変動した場合であっても2つの状態の照明光の強度信号が一定の比率となるように変調部において補正することができる。これにより、作業者が観察毎に照明光の強度比率の調整を行うことなく、環境変化に関わらず、信号光画像を精度よく取得することができる。

[0009] 上記態様においては、前記2つの状態は、時間積分強度が等しくなる状態であり、前記復調部が、状態毎に復調された前記照明光の時間積分強度の差分を出力し、前記変調部は、前記差分がゼロとなるように前記変調強度を補正してもよい。

このようにすることで、復調部から出力される照明光の時間積分強度の差分がゼロとなるまで変調部により変調強度が補正されることによって、2つ

の状態における照明光の時間積分強度を等しく維持することができる。2つの状態の時間積分強度が等しくなる状態には、照明光の強度が等しい場合の他、強度が異なる場合も含まれる。

[0010] また、上記態様においては、前記2つの状態が、前記照明光を試料の異なる位置に照射する状態であってもよい。

このようにすることで、例えば、走査型共焦点顕微鏡に適用し、一方の状態の照明光を検出器前のピンホールと光学的に共役な位置に集光させ、他方の状態の照明光をピンホールと光学的に非共役な位置に集光させる。

[0011] 一方の状態では集光位置からの焦点信号光および集光位置以外からの焦点外信号光がピンホールを通過し、他方の状態では焦点外信号光のみがピンホールを通過するので、その差分を取得することによって、焦点外信号光を除去することができる。

この場合において、2つの状態において試料に照射する照明光の強度を変調部において補正して精度よく一致させることにより、焦点外蛍光を精度よく除去することができる。

[0012] また、上記態様においては、前記2つの状態が、試料において発生する前記信号光が飽和する状態と飽和しない状態であってもよい。

このようにすることで、例えば、SAX (Saturated excitation) 顕微鏡に適用し、2つの状態で照明光の時間積分強度は等しいが、強度が高い方の照明光では試料において発生する信号光が飽和し、強度の低い方の照明光では信号光が飽和しない状態とする場合に、2つの状態での照明光の時間積分強度を精度よく一致させることにより、高精度の観察を行うことができる。

[0013] また、上記態様においては、前記光源からの光を2つの光路に分岐する分岐部を備え、前記変調部が、前記分岐部により分岐された各前記光路の光をそれぞれ異なる周波数で変調するとともに、前記復調部により復調された2つの前記照明光の強度比が予め設定された値となるように前記照明光の変調強度を補正してもよい。

このようにすることで、分岐部により2つの光路に分岐された光源からの光が異なる周波数で変調されて試料の2箇所照射され、検出された信号光の強度信号を復調部により復調することによって、試料の2点を同時観察することができる。

[0014] 2光子励起顕微鏡に代表される非線形顕微鏡に適用する場合には、得られる信号光強度は照明光の瞬間強度の2乗に比例するので、照明光の照射パターンが異なる場合には、照明光の強度を一致させても検出される信号光の強度に差がでる。本態様によれば、照射パターンを考慮して予め設定された強度比となるように照明光の変調強度を補正することにより、色ムラのない信号光画像を取得することができる。

[0015] また、上記態様においては、前記照明光検出部により検出された前記照明光の強度信号を予め設定された補正係数により補正する信号補正部を備えていてもよい。

このようにすることで、照明光検出部が照明光の偏光状態や周波数によって異なる特性を有する場合に、信号補正部において予め設定された補正係数によってその特性差による検出誤差をなくすることができる。

### 発明の効果

[0016] 本発明によれば、作業者が観察毎に照明光の強度比率の調整を行うことなく、環境変化に関わらず、信号光画像を精度よく取得することができるという効果を奏する。

### 図面の簡単な説明

[0017] [図1]本発明の第1の実施形態に係る画像取得装置を示す全体構成図である。

[図2]図1の画像取得装置の変調部により変調された照明光の一例を示す図である。

[図3]図1の画像取得装置の変形例に用いられる照明光の一例を示す図である。

[図4]本発明の第2の実施形態に係る画像取得装置を示す全体構成図である。

[図5A]図4の画像取得装置の第1変調器により変調された照明光の一例を示す

す図である。

[図5B]図4の画像取得装置の光源から射出されるレーザ光の一例を示す図である。

[図5C]図4の画像取得装置の第2変調器により変調された照明光の一例を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明の第1の実施形態に係る画像取得装置1について、図面を参照して以下に説明する。

本実施形態に係る画像取得装置1は、図1に示されるように、一定の強度を有するレーザ光を射出するレーザ光源(光源)2と、該レーザ光源2からのレーザ光を変調する変調部3と、該変調部3において変調された照明光を図示しない試料Xに照射する一方、試料Xにおいて発生した蛍光(信号光)を集光する顕微鏡光学系(照明光学系)4と、該顕微鏡光学系4のピンホール16を通過した蛍光を検出する光検出器(信号光検出部)5と、変調部3により変調された照明光L1, L2を検出するディテクタ(照明光検出部)6と、光検出器5により検出された蛍光の強度信号およびディテクタ6により検出された照明光L1, L2の強度信号を復調する復調部7と、該復調部7により復調された蛍光の強度信号に基づいて蛍光画像を生成する画像生成部8とを備えている。

[0019] 変調部3は、レーザ光源2からのレーザ光を2つの光路に分岐する第1ビームスプリッタ(分岐部)9と、各光路に配置され、各光路を通過するレーザ光を交互のタイミングでオンオフするように変調する音響光学変調器(AOM)のような変調器10a, 10bと、これらの変調器10a, 10bを制御する変調制御部11と、変調器10a, 10bから出力された照明光L1, L2を合波する第2ビームスプリッタ12とを備えている。第2ビームスプリッタ12は、一方の光路の光軸に対して45°とは微小に異なる角度をなして配置されており、合波後の2つの照明光L1, L2が異なる角度で射出されるようになっている。

[0020] 顕微鏡光学系4は、レーザ走査型蛍光顕微鏡の光学系であって、変調部3から射出されてきた2つの照明光L1、L2を走査するスキャナ13と、該スキャナ13により走査された照明光L1、L2を試料Xに集光する対物レンズ14と、対物レンズ14により集光された蛍光を照明光L1、L2の光路から分岐するダイクロイックミラー15と、ピンホール16とを備えている。

図中、符号17は光路形成用のミラーである。

[0021] 変調部3の第2ビームスプリッタ12により射出角度が異ならされた2つの照明光L1、L2は、対物レンズ14の瞳に異なる角度から入射させられることにより、試料X内の異なる位置に集光させられ、試料X内に存在する蛍光物質を励起して蛍光を発生させるようになっている。

すなわち、一方の光路を通過した照明光L1は、光検出器5の前段に配置されているピンホール16と光学的に共役な位置に集光させられる一方、他方の光路を通過した照明光L2は、ピンホール16とは光学的に非共役な位置に集光させられるようになっている。

[0022] 変調制御部11の作動により、2つの光路を通過する照明光L1、L2が交互に射出させられるので、図2に示されるように、共役な位置に集光させられる照明光L1および非共役な位置に集光させられる照明光L2の2つの状態の照明光L1、L2が時間周期的に切り替わる照明光が生成されるようになっている。変調制御部11は、復調部7に対し、変調信号を出力するようになっている。

[0023] 光検出器5は、例えば、光電子増倍管であり、対物レンズ14により集光された蛍光の強度を検出するようになっている。

復調部7は、光検出器5により検出された、2つの状態の照明光L1、L2によりそれぞれ発生した蛍光の強度信号を、変調制御部11から送られてくる変調器10a、10bの変調のタイミングに同期して復調し、それらの蛍光の強度信号の差分を出力するようになっている。

[0024] 画像生成部8は、復調部7から出力された蛍光の強度信号の差分の値を、

スキャナ13による走査位置の情報と対応づけて配列することにより、蛍光画像を生成するようになっている。ピンホール16と共役な位置に照明光L1が集光されたときに、光検出器5により検出される蛍光には、焦点位置において発生した焦点蛍光の他、試料X内の焦点までの経路で発生した焦点外蛍光が一部含まれている。

[0025] 一方、ピンホール16と非共役な位置に照明光L2が集光されたときに光検出器5により検出される蛍光には、焦点位置において発生した焦点蛍光はピンホール16を通過できないので含まれておらず、焦点外蛍光のみが含まれている。したがって、復調部7から出力される、これらの蛍光の強度信号の差分には焦点外蛍光が除去された焦点蛍光のみが含まれていることになり、ノイズが少ない鮮明な蛍光画像を生成することができるようになる。

[0026] ディテクタ6は、例えば、変調部3の後段に配置され、変調部3から出力された照明光L1, L2の一部を分離する反射率の低いハーフミラーからなるビームサンプラ18と、該ビームサンプラ18により分離された2つの状態の照明光L1, L2を検出可能な位置に配置されたシングルポイントディテクタ19とを備えている。

[0027] シングルポイントディテクタ19は、図示しないリレーレンズによって対物レンズ14の瞳面と共役な位置に配置されていてもよいし、図示しない集光レンズの焦点位置に配置されていてもよいし、2つの照明光L1, L2を広い範囲で検出可能な大口径のものを採用してもよい。

本実施形態においては、シングルポイントディテクタ19の出力は、復調部7に入力され、復調部7からの出力は変調制御部11に入力されるようになっている。

[0028] 変調制御部11は、復調部7から入力される差分の値に応じて、いずれかの変調器10a, 10bにより変調される照明光L1, L2の変調強度を補正するようになっている。すなわち、ビームサンプラ18により分離された2つの状態の照明光L1, L2の強度に基づいて、変調制御部11が、復調部7からの出力がゼロとなるようにいずれかの照明光の強度を変化させるの

で、2つの状態の照明光L1、L2の強度が精度よく一致するように調節されるようになっている。

[0029] このように構成された本実施形態に係る画像取得装置1によれば、レーザー光源2から射出されたレーザー光は変調部3において、第1ビームスプリッタ9により2つの光路に分岐され各光路を通過させられる間に、各々の光路に配置された変調器10a、10bによって変調され、第2ビームスプリッタ12によって合波されて異なる角度で射出される。

[0030] 変調部3から出力された、時間周期的に2つの状態が変化する照明光L1、L2は、顕微鏡光学系4に入射されるとともに、その一部がビームサンプラ18によって分離されてシングルポイントディテクタ19により検出される。顕微鏡光学系4内のスキャナ13によって走査され対物レンズ14によって集光された2つの状態の照明光L1、L2は試料X内の2つの異なる位置に集光させられて、各集光位置において蛍光を発生させる。

[0031] 2つの状態の照明光L1、L2が照射されることにより試料Xにおいて発生した蛍光は光検出器5によって検出され、復調部7に入力される。復調部7においては、変調部3における変調に同期した復調を受けることにより、各状態の照明光L1、L2の照射により発生した蛍光の強度信号の差分が復調部7から出力される。

上述したように、復調部7から出力される蛍光の強度信号の差分は、焦点外蛍光が除去された照明光の焦点位置からの蛍光のみの強度信号となっているので、この差分の値とスキャナ13による走査位置とを、画像生成部8において対応づけて配列することにより、ノイズのない鮮明な蛍光画像を取得することができる。

[0032] この場合において、復調部7において焦点外蛍光を精度よく除去するためには、2つの状態の照明光L1、L2の強度が同一であることが必要である。観察に先立って、変調部3から出力される2つの状態の照明光L1、L2の強度が同一となるように変調制御部11が設定されるが、温度等の使用環境が変動することにより、各変調器10a、10bから出力される照明光L

1, L 2の強度に差が発生する場合がある。

[0033] 本実施形態に係る画像取得装置1によれば、変調部3から出力される照明光L 1, L 2の一部がビームサンプラ18によって分離され、シングルポイントディテクタ19により検出され、検出された照明光L 1, L 2の強度信号が復調部7によって復調されることにより、2つの状態の照明光L 1, L 2の信号強度の差分が復調部7から出力される。そして、復調部7から出力された差分が変調制御部11に入力されることにより、変調制御部11が差分に応じて各変調器10a, 10bにより変調される照明光L 1, L 2の変調強度が補正される。

[0034] すなわち、2つの状態の照明光L 1, L 2の強度信号の差分がゼロであれば変調強度の補正は行われないので、2つの状態の照明光L 1, L 2の強度が精度よく一致させられる。これにより、復調部7において焦点外蛍光を精度よく除去することができ、使用環境が変動しても、作業者が観察毎に照明光L 1, L 2の強度比率の調整を行うことなく、ノイズのない鮮明な蛍光画像を取得することができるという利点がある。

[0035] 特に、本実施形態においては、蛍光の強度信号の差分を出力する復調部7を照明光L 1, L 2の強度信号の差分を求めるために利用しているので、ビームサンプラ18とシングルポイントディテクタ19とを新たに設置するだけで足り、簡易な構成で低コストに実現できるという利点がある。

なお、蛍光用の復調部7とは別に照明光用の復調部を用意してもよい。

[0036] また、本実施形態においては、焦点外蛍光を除去するために変復調を利用する画像取得装置1を例示して説明したが、これに代えて、図3に示されるように、SAX顕微鏡に適用することにしてもよい。

すなわち、変調部3が、図3に示されるように、異なるピーク値を有し、かつ、時間積分強度が等しい2つの状態の照明光L 1, L 2を生成する点で上記実施形態と相違している。

また、変調器10a, 10bは、音響光学変調器に代えて、電気光学変調器を採用してもよい。

[0037] ピーク強度が高い方の照明光L1では試料Xにおいて発生する蛍光が飽和し、ピーク強度の低い方の照明光L2では蛍光が飽和しない状態とする場合に、使用環境が変動しても、2つの状態での照明光L1, L2の時間積分強度を精度よく一致させた状態に維持することができ、高精度の観察を行うことができる。

[0038] 次に本発明の第2の実施形態に係る画像取得装置20について、図面を参照して以下に説明する。

本実施形態の説明において、上述した第1の実施形態に係る画像取得装置1と構成を共通とする箇所には同一符号を付して説明を省略する。

[0039] 本実施形態に係る画像取得装置20は、図4に示されるように、2光子励起顕微鏡に適用したものであり、極短パルスレーザー光からなる照明光を2つの光路に分岐し、各光路に配置された変調器10a, 10bにより異なる周波数で変調して、試料Xの異なる2点に集光し、各集光点から発せられた蛍光を検出して復調することにより、2点からの蛍光を別々に取得するようになっている。

[0040] 具体的には、一方の光路の第1変調器10aは、図5Aに示されるように、レーザー光源2からの極短パルスレーザー光のパルスを1つ置きに遮断して、50%デューティとなるように変調させるようになっている。

他方の第2変調器10bは、図5Bに示されるレーザー光源2からの極短パルスレーザー光の全てのパルスのピーク強度を、図5Cに示されるように、70%に低下させるようになっている。

[0041] 例えば、レーザー光源2から射出される光が80MHzである場合に、第1変調器10aは、レーザー光源2からの極短パルスレーザー光を変調して40MHzの照明光L2を生成するようになっている。これにより、照明光L2は、40MHzで強度が変化する交流パターンを有している。第2変調器10bは、レーザー光源2からの極短パルスレーザー光のピーク強度を70%に変調して80MHzの照明光L1を生成している。

[0042] そして、光検出器5により検出された試料Xからの蛍光の強度信号を2つ

の復調部21a, 21bに入力する。入力される信号は二つの焦点から来る蛍光信号の合計であり、蛍光信号は照明光L1のピーク強度の2乗に比例するので、到着パルスごとに時間関数で表現すると、 $F_{a11}(t) = [10^2 + 7^2, 7^2, 10^2 + 7^2, 7^2]$ と表現される。

[0043] 一方の第1復調部21aでは、第1変調器10aの変調信号に同期する復調信号として、 $code1(t) = (1, -1, 1, -1)$ が乗算されて積分された蛍光信号が出力される。

具体的には、L1に対応する $F1 = F_{a11}(t) \cdot code1(t) = 10^2 + 7^2 - 7^2 + 10^2 + 7^2 - 7^2 = 200$ が出力される。

[0044] また、他方の第2復調部21bでは、第2変調器10bの変調信号に同期する復調信号として $code2 = (1, 1, 1, 1)$ が乗算されて積分された後、L1に対応する蛍光信号が差分されL2に対応する蛍光信号が出力される。具体的には、蛍光信号は照明光L1のピーク強度の2乗に比例するので、 $F2 = F_{a11}(t) \cdot code2(t) - F1 = 10^2 + 7^2 + 7^2 + 10^2 + 7^2 + 7^2 - 200 = 200$ が出力される。

[0045] これにより、2つの復調部21a, 21bから出力される蛍光の強度信号は略同等となり、これらの蛍光強度を用いて生成される蛍光画像の輝度ムラの発生を防止することができる。

この場合において、シングルポイントディテクタ19により検出され復調部21a, 21bにより復調された2つの状態の照明光L1, L2の強度信号は、第1の実施形態とは異なって、差分として出力されることなく、別々の強度信号として出力される。

[0046] したがって、各復調部21a, 21bから出力された各状態の照明光L1, L2の強度信号が、上記の例では $L1 : L2 = 7 : 10$ の場合に、各変調器10a, 10bにおける変調強度の補正が行われなくなるように、変調制御部11が制御するようになっている。すなわち、変調制御部11は、第1復調部21aから出力されてきた照明光L1の強度信号に、予め設定された比率、上記の例では $10/7$ を乗算して得られた値と第2復調部21bから

出力されてきた照明光L 2の強度信号との差分がゼロとなるように、2つの変調器10 a, 10 bを制御する。

[0047] このように、本実施形態に係る画像取得装置20によれば、使用環境が変動しても、作業者が観察毎に照明光L 1, L 2の強度比率の調整を行うことなく、2点同時検出によるフレームレートの向上を図りながら、輝度ムラの少ない蛍光画像を取得することができるという利点がある。

[0048] なお、本実施形態においては、照明光L 1, L 2を試料Xに同時に2点で集光させて蛍光を検出する場合について説明したが、3点以上を同時に集光することにしてもよい。また、スキャナ13によるポイントスキャン方式のものを例示したが、対物レンズ14の光軸に沿う方向に異なる位置に入射されるシート状の照明光により発生する蛍光をカメラによって撮影するライトシート顕微鏡に適用してもよい。

[0049] また、2つの変調器10 a, 10 bによって別々に変調される結果、2つの照明光L 1, L 2の偏光状態が異なる場合に、ビームサンプラ18によるサンプリング比率が照明光L 1, L 2毎に異なる場合が発生し得る。このような場合には、2つの照明光L 1, L 2が同じ強度を有していてもシングルポイントディテクタ19において異なる強度を有するものとして検出されてしまうので、事前に求めた補正係数によってシングルポイントディテクタ19により検出された照明光L 1, L 2の強度信号を補正する信号補正部（図示略）を設けてもよい。

また、変調制御部11において2つの変調器10 a, 10 bによる変調強度を補正することとしたが、一方の変調器10 aのみにおいて変調強度を補正することにしてもよい。

[0050] また、上記各実施形態においては、照明光L 1, L 2の変調強度の補正のタイミングは、特に限定されるものではないが、例えば、試料Xの蛍光観察を行う前に自動的に実施することにすればよい。照明光L 1, L 2の強度補正は試料Xを用いることなく実施でき、試料Xにダメージを与えずに行うことができる。

## 符号の説明

- [0051] 1, 20 画像取得装置
- 2 レーザ光源 (光源)
- 3 変調部
- 4 顕微鏡光学系 (照明光学系)
- 5 光検出器 (信号光検出部)
- 6 ディテクタ (照明光検出部)
- 7, 21a, 21b 復調部
- 8 画像生成部
- 9 第1ビームスプリッタ (分岐部)
- L1, L2 照明光
- X 試料

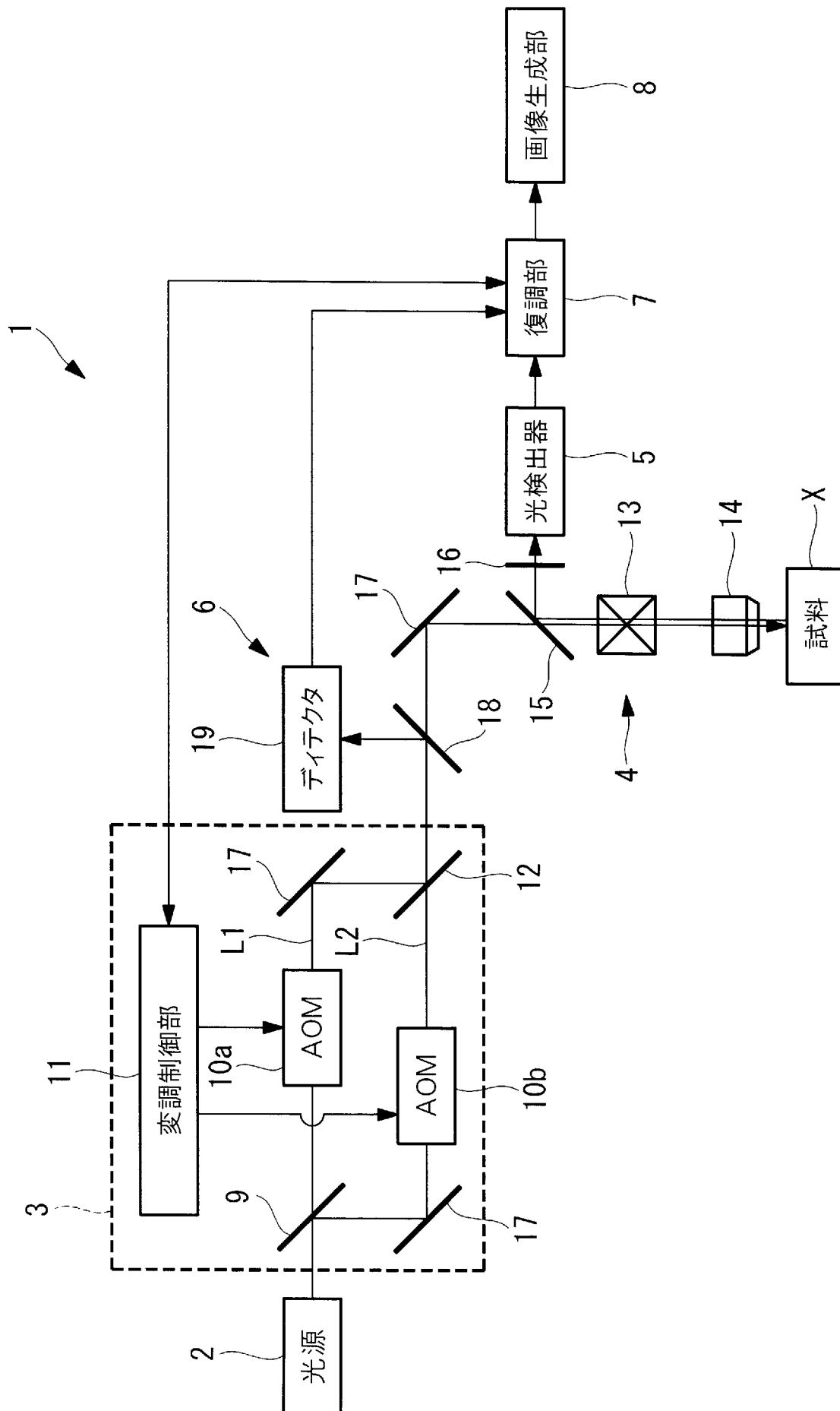
## 請求の範囲

- [請求項1] 光源からの光を変調することにより、異なる2つの状態が時間周期的に切り替わる照明光を生成する変調部と、  
該変調部により生成された前記照明光を検出する照明光検出部と、  
前記変調部により生成された前記照明光を試料に照射する照明光学系と、  
該照明光学系による前記照明光の試料における照射位置において発生した信号光を集光して検出する信号光検出部と、  
該信号光検出部により検出された前記信号光の強度信号および前記照明光検出部により検出された前記照明光の強度信号に対し前記変調に対する復調を行う復調部と、  
該復調部により復調された前記信号光の強度信号に基づいて信号光画像を生成する画像生成部とを備え、  
前記変調部が、前記復調部により復調された前記照明光の強度信号に基づいて前記照明光の変調強度を補正する画像取得装置。
- [請求項2] 前記2つの状態は、時間積分強度が等しくなる状態であり、  
前記復調部が、状態毎に復調された前記照明光の時間積分強度の差分を出力し、  
前記変調部は、前記差分がゼロとなるように前記変調強度を補正する請求項1に記載の画像取得装置。
- [請求項3] 前記2つの状態が、前記照明光を試料の異なる位置に照射する状態である請求項1または請求項2に記載の画像取得装置。
- [請求項4] 前記2つの状態が、試料において発生する前記信号光が飽和する状態と飽和しない状態である請求項1または請求項2に記載の画像取得装置。
- [請求項5] 前記光源からの光を2つの光路に分岐する分岐部を備え、  
前記変調部が、前記分岐部により分岐された各前記光路の光をそれぞれ異なる周波数で変調するとともに、前記復調部により復調された

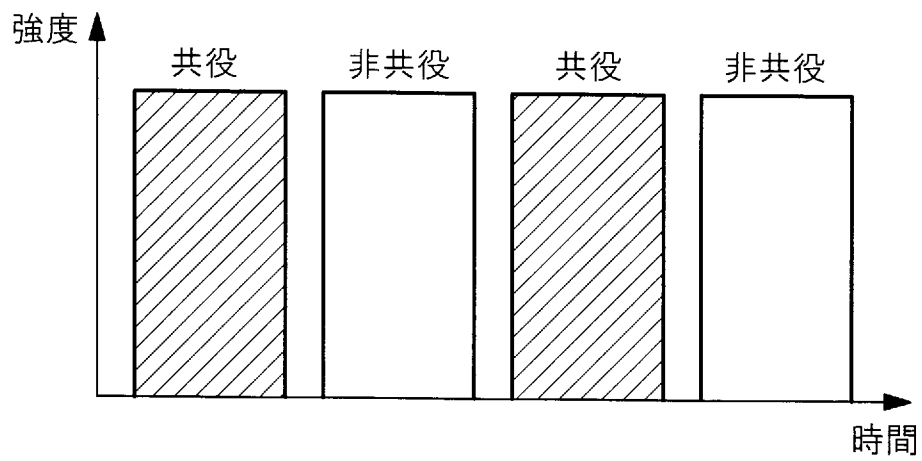
2つの前記照明光の強度比が予め設定された値となるように前記照明光の変調強度を補正する請求項1に記載の画像取得装置。

[請求項6] 前記照明光検出部により検出された前記照明光の強度信号を予め設定された補正係数により補正する信号補正部を備える請求項1から請求項5のいずれかに記載の画像取得装置。

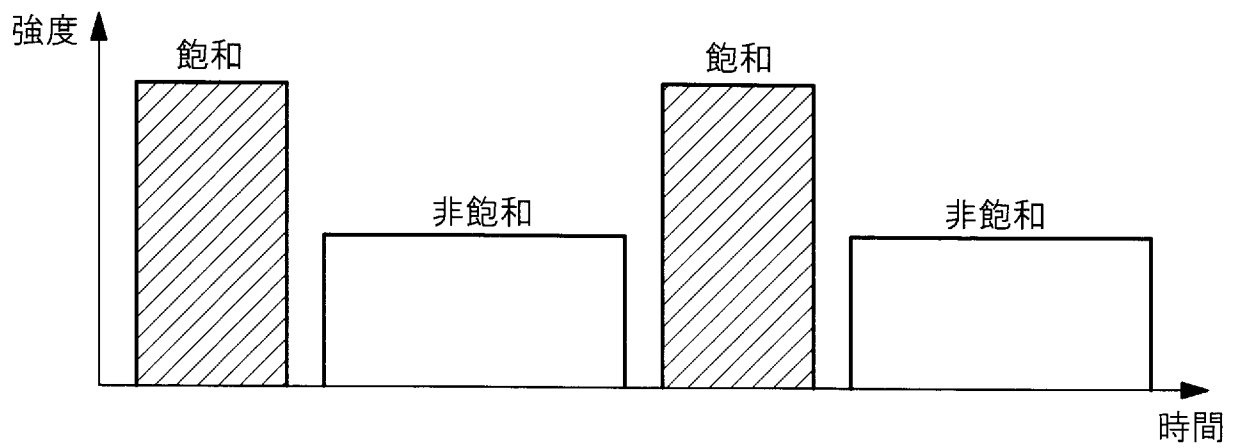
[図1]



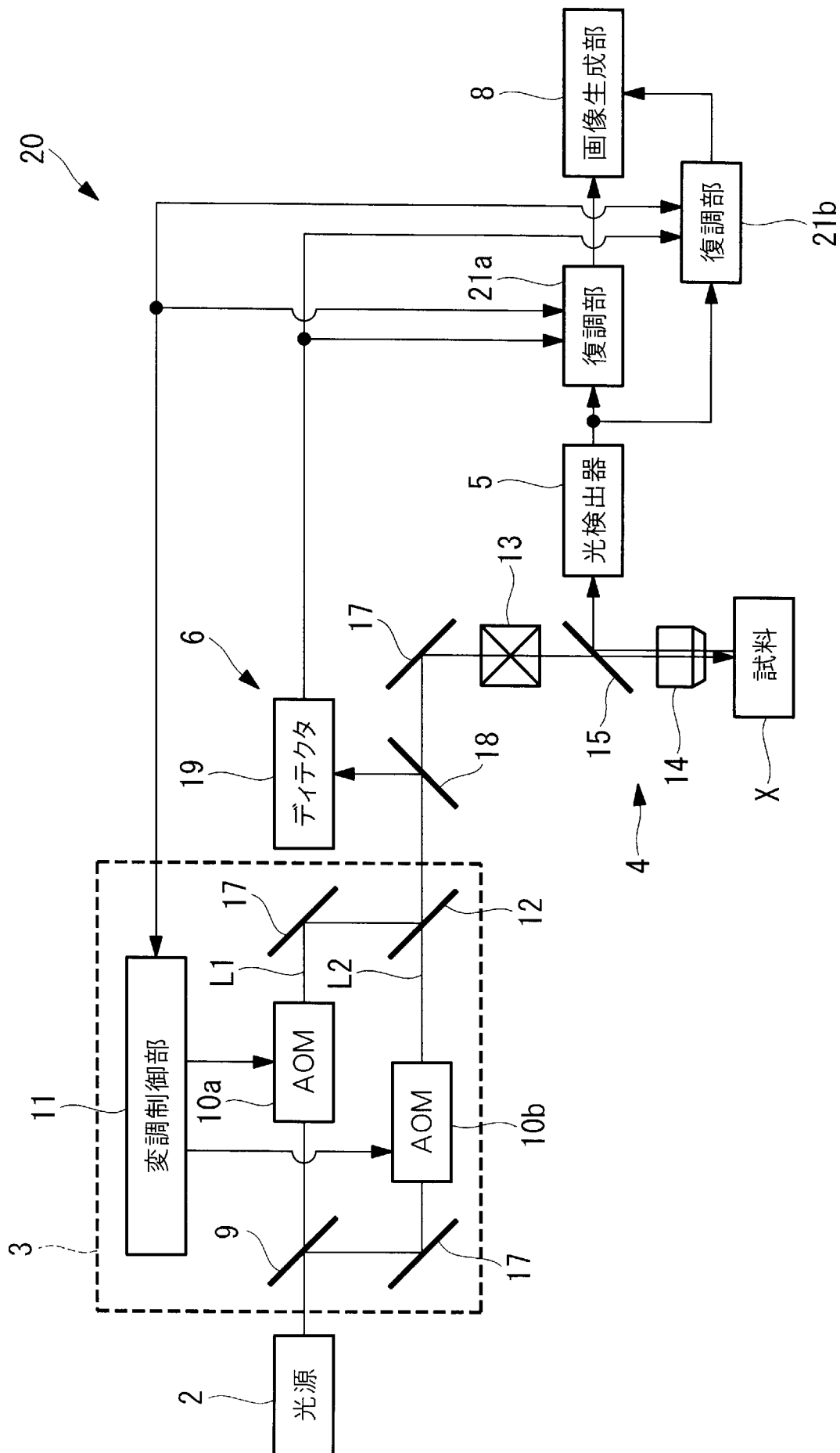
[図2]



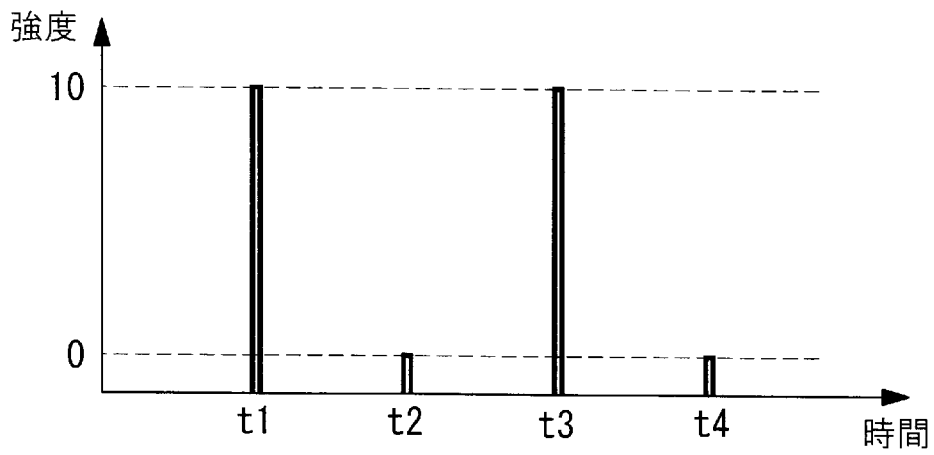
[図3]



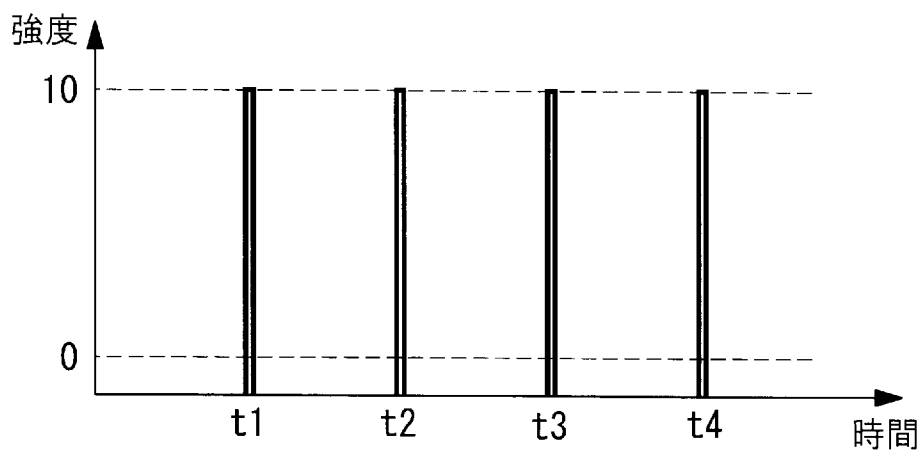
[図4]



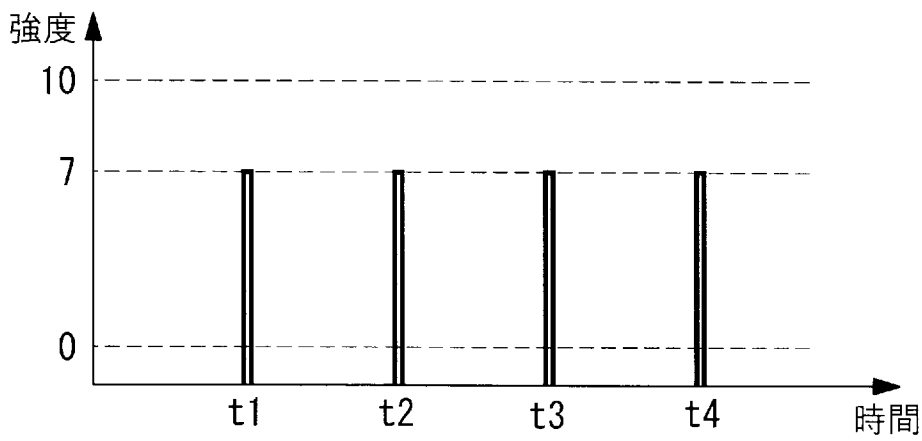
[図5A]



[図5B]



[図5C]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/061531

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>  <i>G02B21/00(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G02B21/06(2006.01)i</i></p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  <i>G02B21/00, G01N21/64, G02B21/06</i></p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:33%;"><i>Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td style="width:33%;"><i>1922-1996</i></td> <td style="width:33%;"><i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i></td> <td style="width:33%;"><i>1996-2016</i></td> </tr> <tr> <td><i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1971-2016</i></td> <td><i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1994-2016</i></td> </tr> </table> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p>			<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2016</i>	<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2016</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2016</i>				
<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2016</i>											
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2016</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2016</i>											
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">Y</td> <td><i>WO 2015/163261 A1 (Olympus Corp.), 29 October 2015 (29.10.2015), claims; entire text; all drawings (Family: none)</i></td> <td align="center">1-6</td> </tr> <tr> <td align="center">Y</td> <td><i>JP 2015-168184 A (Ricoh Co., Ltd.), 28 September 2015 (28.09.2015), claims; paragraph [0009] (Family: none)</i></td> <td align="center">1-6</td> </tr> <tr> <td align="center">Y</td> <td><i>JP 2011-141427 A (Seiko Epson Corp.), 21 July 2011 (21.07.2011), claims; paragraph [0108] (Family: none)</i></td> <td align="center">1-6</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	<i>WO 2015/163261 A1 (Olympus Corp.), 29 October 2015 (29.10.2015), claims; entire text; all drawings (Family: none)</i>	1-6	Y	<i>JP 2015-168184 A (Ricoh Co., Ltd.), 28 September 2015 (28.09.2015), claims; paragraph [0009] (Family: none)</i>	1-6	Y	<i>JP 2011-141427 A (Seiko Epson Corp.), 21 July 2011 (21.07.2011), claims; paragraph [0108] (Family: none)</i>	1-6
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	<i>WO 2015/163261 A1 (Olympus Corp.), 29 October 2015 (29.10.2015), claims; entire text; all drawings (Family: none)</i>	1-6												
Y	<i>JP 2015-168184 A (Ricoh Co., Ltd.), 28 September 2015 (28.09.2015), claims; paragraph [0009] (Family: none)</i>	1-6												
Y	<i>JP 2011-141427 A (Seiko Epson Corp.), 21 July 2011 (21.07.2011), claims; paragraph [0108] (Family: none)</i>	1-6												
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.      <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>														
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>										
<p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>													
<p>Date of the actual completion of the international search 30 June 2016 (30.06.16)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 12 July 2016 (12.07.16)</p>												
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan</p>		<p>Authorized officer</p> <p>Telephone No.</p>												

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/061531

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-012852 A (Konica Minolta Business Technologies, Inc.), 24 January 2008 (24.01.2008), claims; paragraphs [0004] to [0005] (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G02B21/00(2006.01)i, 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. G02B21/00, G01N21/64, G02B21/06		
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 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年		
国際調査で利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	WO 2015/163261 A1 (オリンパス株式会社) 2015. 10. 29, 特許請求の 範囲、全文、全図 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2015-168184 A (株式会社リコー) 2015. 09. 28, 特許請求の範囲、 段落 [0009] (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2011-141427 A (セイコーエプソン株式会社) 2011. 07. 21, 特許 請求の範囲、段落 [0108] (ファミリーなし)	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 30. 06. 2016	国際調査報告の発送日 12. 07. 2016	
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) 越河 勉 電話番号 03-3581-1101 内線 3271	2V 9313

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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 2008-012852 A (コニカミノルタビジネステクノロジーズ株式会社) 2008.01.24, 特許請求の範囲、段落 [0004] - [0005] (ファミリーなし)	1-6