

(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



(10) 国際公開番号

WO 2011/046212 A1

(43) 国際公開日

2011 年 4 月 21 日(21.04.2011)

PCT

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G06T 7/20 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/068192
- (22) 国際出願日: 2010 年 10 月 15 日(15.10.2010)
- (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 2009-238442 2009 年 10 月 15 日(15.10.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリ
ンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4
3 番 2 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 明美
(SUZUKI, Akemi) [JP/JP].
- (74) 代理人: 蔵田 昌俊, 外(KURATA, Masatoshi et
al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 1 丁目 1 2 番
9 号 鈴栄特許総合事務所内 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, 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, IS,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

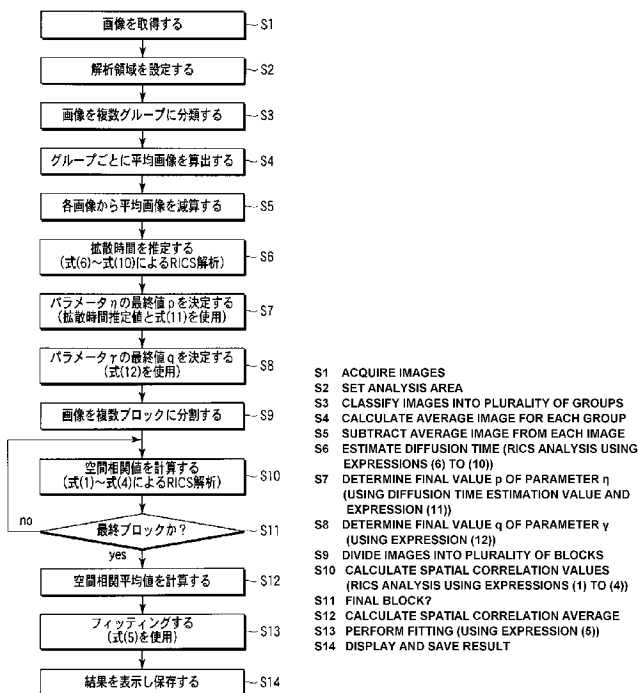
添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: IMAGE ANALYZING METHOD AND IMAGE ANALYZING DEVICE

(54) 発明の名称: 画像解析方法および画像解析装置

【図3】



(57) Abstract: Disclosed is an image analyzing method which comprises acquiring images of a plurality of frames in a chronological manner (S1), each of the images including a plurality of pixels of pixel data acquired in a chronological manner; setting an analysis area in each of the images (S2); selecting images of two or more frames to be used for analysis from the images of the plurality of frames and calculating the correlation values (S10). The correlation values are calculated by computing the sum of products of data pairs of two pixels of which acquired time intervals are the same within the analysis area of the same image of all the selected images and by computing the sum of products of data pairs of two pixels of which acquired time intervals are the same within the analysis areas of two different images of the selected images.

(57) 要約: S1: 複数フレームの画像を時系列的に取得する。各画像は、ピクセルのデータが時系列的に取得された複数のピクセルからなる。S2: 各画像に対して解析領域を設定する。S10: 複数フレームの画像の中から解析に利用する2フレーム以上の選定画像を選定し、相関値を計算する。相関値の計算は、選定画像の同一画像の解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアの積和計算を前記選定画像のすべてに対して行なうとともに、選定画像の異なる二つの画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアの積和計算を行なうことにより行な

う。

WO 2011/046212 A1

明 細 書

発明の名称： 画像解析方法および画像解析装置

技術分野

[0001] 本発明は、画像解析方法および画像解析装置に関する。

背景技術

[0002] 従来、ラスタイメージ相関分光法（R I C S : Raster Image Correlation Spectroscopy）として非特許文献 1， 2 に示すような方法が提案されている。この画像解析方法において、1 フレーム以上のラスタ走査画像からなる蛍光画像を取得する。つまり、画像解析したい試料において、興味を持っている領域を決め、その領域をラスタ走査方式で繰り返し走査し、複数フレームの蛍光強度からなる画像を取得する。フレーム中の蛍光強度はピクセル単位でデータとして表わされている。

[0003] これらのピクセル単位のデータ（ピクセルのデータ）は、それぞれ取得された時間および取得された位置が異なるため、各データに対応する取得時間および取得位置はずれている。

[0004] したがって、これらのピクセルのデータを用いて、空間相関解析することで、分子の揺らぎによる相関特性を得ることができる。ここで、分子の相関特性からは、拡散定数や分子数を求めることができる。

[0005] このように、空間相関解析することで、分子拡散時間や、分子数等を評価することができるため、分子間の相互作用を観察することが可能である。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：「Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope」，Michelle A. Digman, Claire M. Brown, Parijat Sengupta, Paul W. Wiseman, Alan R. Horwitz, and Enrico Gratton, Biophysical Journal, Vol. 89, P1317-1327, August 2005.

非特許文献2：「Fluctuation Correlation Spectroscopy with a Laser-Scan

ning Microscope: Exploiting the Hidden Time Structure」, Michelle A. Digman, Parijat Sengupta, Paul W. Wiseman, Claire M. Brown, Alan R. Horowitz, and Enrico Gratton, Biophysical Journal: Biophysical Letters, L33-36, 2005.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 従来、R I C Sの空間相関解析において、一つのR I C Sの解析結果を得るためには、1フレームの画像を構成するピクセルのデータだけを用いる。これは、1フレーム以上の画像を取得した場合であっても同様で、一つのR I C Sの解析結果を得るためには、1フレームの画像を構成するピクセルのデータだけを用いる。

[0008] しかし、細胞観察のような細胞の核、膜、質などの異なる局所的な解析領域に限定してR I C Sの解析を行なう場合、解析領域に含まれるピクセル数が少なくなり、解析結果の精度が低下するという問題が生じる。何故なら、R I C Sの空間相関演算は統計計算の一種で、データ数が多いほど精度が高く、データ数が少ないほど誤差が大きくなるためである。つまり、空間相関解析をする領域に含まれるデータ数が少なすぎると、統計計算の結果としてのR I C Sの解析精度が低下してしまう。

[0009] また、分子拡散時間が短い分子を観察するには、1ピクセルのデータを得るのに要するピクセル時間と1ラインを走査するのに要するライン時間とを小さく設定する必要がある。これは、ピクセル時間とライン時間を大きく設定すると、分子拡散時間に対するピクセル間の取得時間のずれが大きくなり、十分な回数の相関計算をすることができなくなるからである。一方、分子拡散時間が長い分子を観察するには、ピクセル時間とライン時間を大きく設定する必要がある。これは、ピクセル時間とライン時間を小さく設定すると、実際の分子拡散時間が、1フレームで観察可能な分子拡散時間の最大値を越え、分子拡散時間を算出することができなくなるからである。

[0010] ピクセル時間とライン時間は、走査速度によって決まるので、画像を取得

した後に変更することはできない。このため、分子の拡散定数等を適切に得るには、画像取得の前に、適切なピクセル時間およびライン時間を推測する必要が生じる。しかし、ほとんどのサンプルの分子拡散時間は未知数であるため、事前にピクセル時間およびライン時間の設定を推測することは難しい。

[0011] 本発明の目的は、ピクセル数の少ない解析領域に対しても高い精度で空間相関解析を行なえとともに観察可能な拡散時間を拡張可能な R I C S の画像解析方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明による画像解析方法は、各画像のピクセルのデータが時系列的に取得された複数のピクセルからなる複数フレームの画像を時系列的に取得する画像取得ステップと、前記複数フレームの各画像に対して解析領域を設定する解析領域設定ステップと、前記複数フレームの画像の中から解析に利用する 2 フレーム以上の選定画像を選定する画像選定ステップと、前記選定画像の同一画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアの積和計算を前記選定画像のすべてに対して行なうとともに、前記選定画像の異なる二つの画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアの積和計算を行なって相関値を計算する演算ステップとを有している。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、ピクセル数の少ない解析領域に対しても高い精度で空間相関解析を行なえとともに観察可能な拡散時間を拡張可能な R I C S の画像解析方法が提供される。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1] 本発明の実施形態による画像解析装置を概略的に示している。
[図2] 図 1 に示される制御部の機能ブロックを示している。
[図3] 本発明の実施形態による画像解析のフローチャートである。
[図4] 画像解析に使用する時系列的に取得された複数フレームの画像を示して

いる。

[図5] 観察領域と解析領域を示している。

[図6] 複数グループに分類された複数フレームの画像を模式的に示している。

[図7] 複数ブロックに分割された複数フレームの画像を模式的に示している。

[図8] γ フレーム目の画像内における相関計算の積和計算を模式的に示している。

[図9] γ フレーム目と $(\gamma + 1)$ フレーム目の画像間における相関計算の積和計算を模式的に示している。

[図10] γ フレーム目と $(\gamma + 2)$ フレーム目の画像間における相関計算の積和計算を模式的に示している。

[図11] γ フレーム目と p フレーム目の画像間における相関計算の積和計算を模式的に示している。

[図12] 式 (1) ~ 式 (4) における変数 ξ 、 ψ 、 η と計算に使用するフレームを示している。

[図13] 小さい分子に対する R I C S による空間相関値の計算結果を輝度で示した画像である。

[図14] 小さい分子に対する R I C S による空間相関値のフィッティング結果を示している。

[図15] 大きい分子に対する R I C S による空間相関値の計算結果を輝度で示した画像である。

[図16] 大きい分子に対する R I C S による空間相関値のフィッティング結果を示している。

[図17] E G F P 溶液の拡散定数 (D) を解析領域の R O I サイズを変えながら比較した結果を示している。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、図面を参照しながら本発明の実施形態について説明する。

[0016] [装置構成]

図 1 は、本発明の実施形態による画像解析装置を概略的に示している。こ

の画像解析装置は、試料の蛍光観察のための走査型共焦点光学顕微鏡をベースに構成されている。

[0017] 図1に示すように、画像解析装置100は、試料Sに励起光を照射する光照射部110と、試料S内の測定点から発せられる光を検出する光検出部130と、画像解析に必要な制御を行なう制御部160と、試料Sを支持する試料ステージ190とを有している。

[0018] 試料Sはマイクロプレートやスライドガラスなどの試料容器に收容され、試料ステージ190に載置される。試料ステージ190は、たとえば、試料Sを光照射部110および光検出部130に対して横方向（x y 方向）および高さ方向（z 方向）に移動可能に支持する。たとえば、試料ステージ190は、出力軸が互いに直交する三つのステップング・モーターを含んでおり、これらのステップング・モーターによって試料Sをx y z 方向に移動し得る。

[0019] 画像解析装置100は、多重光照射・多重光検出型である。このため、光照射部110はnチャンネルの光源系111を含み、これに対応して光検出部130はnチャンネルの検出系131を含んでいる。nチャンネルの検出系131は、それぞれ、nチャンネルの光源系111から射出された励起光によって生成された蛍光を検出する。ここで、nチャンネルは、チャンネル1、チャンネル2、・・・チャンネルnによって構成される。チャンネルは、励起光の種類によってそれぞれ異なる。

[0020] 光照射部110のnチャンネルの光源系111は、光源112a, ..., 112nとコリメートレンズ114a, ..., 114nとダイクロイックミラー116a, ..., 116nとを含んでいる。光源112a, ..., 112nは、試料Sに含まれる蛍光色素を励起して試料Sから光（蛍光）を発せさせるための励起光を発する。光源112a, ..., 112nから発せられる励起光の波長は、試料Sに含まれる蛍光色素の種類に対応して、互いに相違している。光源112a, ..., 112nは、たとえば、試料S中の蛍光色素に合った発振波長のレーザー光源で構成される。コリメートレンズ114a, ..., 1

14 nは、それぞれ、光源112 a, ..., 112 nから発せられた励起光をコリメートする。ダイクロイックミラー116 a, ..., 116 nは、それぞれ、コリメートレンズ114 a, ..., 114 nを通過した励起光を同じ方向に反射する。ダイクロイックミラー116 a, ..., 116 nは、それぞれ、図1の上方から入射する励起光を透過し、図1の右方から入射する励起光を反射する。その結果、光源112 a, ..., 112 nからそれぞれ射出された異なる波長の励起光は、ダイクロイックミラー116 aの通過後に一本のビームに合成される。ダイクロイックミラー116 nは、励起光を透過する必要がないので、単なるミラーに変更されてもよい。

[0021] 光照射部110はさらに、ダイクロイックミラー122とガルバノミラー124と対物レンズ126と対物レンズ駆動機構128を含んでいる。ダイクロイックミラー122は、光源系111からの励起光をガルバノミラー124に向けて反射し、試料Sから発せられる蛍光を透過する。ガルバノミラー124は、励起光を対物レンズ126に向けて反射するとともに、その反射方向を変更する。対物レンズ126は、励起光を収束して試料S内の測定点に照射するとともに、試料S内の測定点からの光を取り込む。対物レンズ126には、微小な共焦点領域（測定点）の形成のために、NA（開口数）の大きいものが使用される。これにより得られる共焦点領域の大きさは、直径0.6 μm 程度、長さ2 μm 程度の略円筒状となる。ガルバノミラー124は、測定点をx y方向に走査するx y走査機構を構成している。x y走査機構は、ガルバノミラーを使用して構成するほかに、音響光学変調素子（AOM）やポリゴンミラー、ホログラムスキャナーなどを使用して構成してもよい。対物レンズ駆動機構128は、対物レンズ126を光軸に沿って移動させる。これにより、測定点がz方向に移動される。つまり、対物レンズ駆動機構128は、測定点をz方向に走査するz走査機構を構成している。

[0022] 光検出部130は、対物レンズ126とガルバノミラー124とダイクロイックミラー122を光照射部110と共有している。光検出部130はさらに、収束レンズ132とピンホール134とコリメートレンズ136とを

含んでいる。収束レンズ 132 は、ダイクロイックミラー 122 を透過した光を収束する。ピンホール 134 は、収束レンズ 132 の焦点に配置されている。つまり、ピンホール 134 は、試料 S 内の測定点に対して共役な位置にあり、測定点からの光だけを選択的に通す。コリメートレンズ 136 は、ピンホール 134 を通過した光を平行にする。コリメートレンズ 136 を通過した光は、n チャンネルの検出系 131 に入射する。

[0023] n チャンネルの検出系 131 は、ダイクロイックミラー 138 a, ..., 138 n と蛍光フィルター 140 a, ..., 140 n と光検出器 142 a, ..., 142 n とを含んでいる。

[0024] ダイクロイックミラー 138 a, ..., 138 n は、それぞれ、光源 112 a, ..., 112 n からの励起光によって試料 S から生成された蛍光の波長域付近の波長の光を選択的に反射する。ダイクロイックミラー 138 n は、光を透過する必要がないので、単なるミラーに変更されてもよい。蛍光フィルター 140 a, ..., 140 n は、それぞれ、ダイクロイックミラー 138 a, ..., 138 n によって反射された光から、不所望な波長成分の光を遮断し、光源 112 a, ..., 112 n からの励起光によって生成された蛍光だけを選択的に透過する。蛍光フィルター 140 a, ..., 140 n を透過した蛍光はそれぞれ光検出器 142 a, ..., 142 n に入射する。光検出器 142 a, ..., 142 n は、入射した光の強度に対応した信号を出力する。すなわち、光検出器 142 a, ..., 142 n は、試料 S 内の測定点からの蛍光強度信号を出力する。

[0025] 制御部 160 はたとえばパーソナルコンピュータで構成される。制御部 160 は、試料 S の観察領域の蛍光画像の取得と記憶と表示、取得する蛍光画像のフレーム数（枚数）や解析領域の設定の入力待ち、画像解析（相関値の算出）、拡散時間の推定などを行なう。また制御部 160 は、x y 走査機構であるガルバノミラー 124、z 走査機構である対物レンズ駆動機構 128、試料ステージ 190 などの制御を行なう。

[0026] 図 1 に示される制御部の機能ブロックを図 2 に示す。制御部 160 は、図

2に示すように、走査制御部162と画像形成部164と記憶部166と表示部168と入力部170と解析領域設定部172と画像選定部174とデータ抽出部176と解析部178とステージ制御部180とを含んでいる。ここで、走査制御部162と画像形成部164と記憶部166とステージ制御部180と上述したガルバノミラー124と対物レンズ駆動機構128と試料ステージ190と光検出器142とが画像取得部を構成し、データ抽出部176と解析部178とが演算部を構成する。

[0027] 走査制御部162は、試料Sの蛍光画像を取得する際、励起光の照射位置を試料Sに対してラスタ走査するようにガルバノミラー124を制御する。走査制御部162はまた、必要であれば、励起光の照射位置を試料Sに対してz走査するように対物レンズ駆動機構128を制御する。画像形成部164は、走査制御部162から入力される励起光の照射位置の情報と光検出器142a, ..., 142nの出力信号とから試料Sの蛍光画像を形成する。これにより、蛍光画像が取得される。記憶部166は、画像形成部164で形成された蛍光画像を順次記憶する。表示部168は、試料Sの蛍光画像や解析結果を表示する。入力部170は、たとえばマウスやキーボードを含み、表示部168と共同してGUIを構成する。このGUIは、取得フレーム数や観察領域や解析領域の設定などに利用される。ステージ制御部180は、たとえば観察領域を設定するために、入力部170からの入力情報にしたがって試料ステージ190を制御する。解析領域設定部172は、入力部170からの入力情報にしたがって解析領域を設定する。画像選定部174は、入力部170からの入力情報にしたがって、解析に利用する2フレーム以上の蛍光画像を選定する。データ抽出部176は、解析領域設定部172と画像選定部174からの入力情報に基づいて、記憶部166に記憶されている蛍光画像から必要なデータを抽出する。必要なデータは、画像選定部174によって選定された蛍光画像の同一画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアと、画像選定部174によって選定された選定画像の異なる二つの画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つ

のピクセルのデータペアである。これら複数のデータペアに含まれるデータは、たとえば、記憶部 166 に記憶されているすべての蛍光画像のすべてのピクセルのデータまたは一部のピクセルのデータであってよく、あるいは、記憶部 166 に記憶されている一部の蛍光画像のすべてのピクセルのデータまたは一部のピクセルのデータであってもよい。データの抽出は、後述する式 (1) ~ 式 (4) にしたがって行なわれる。解析部 178 は、データ抽出部 176 によって抽出されたデータに対して後述する相関値の演算を行なう。

[0028] 図 1 において、光源 112a, ..., 112n から発せられた励起光は、コリメートレンズ 114a, ..., 114n とダイクロイックミラー 116a, ..., 116n とダイクロイックミラー 122 とガルバノミラー 124 と対物レンズ 126 を経て試料 S 内の測定点に照射される。励起光が照射される測定点は、ガルバノミラー 124 によって x y 方向にラスタ走査される。さらに必要であれば、対物レンズ駆動機構 128 によって z 走査される。励起光を受けた試料 S は測定点から蛍光を発する。試料 S からの光（蛍光のほかにも不所望な反射光などを含む）は、対物レンズ 126 とガルバノミラー 124 とダイクロイックミラー 122 と収束レンズ 132 を経てピンホール 134 に至る。ピンホール 134 は測定点と共役な位置にあるため、試料 S 内の測定点からの光だけがピンホール 134 を通過する。ピンホール 134 を通過した光すなわち試料 S 内の測定点からの光はコリメートレンズ 136 を経て n チャンネルの検出系 131 に入射する。n チャンネルの検出系 131 に入射した光は、ダイクロイックミラー 138a, ..., 138n によって波長にしたがって分離される（つまり分光される）とともに、蛍光フィルター 140a, ..., 140n によって不所望な成分が除去される。その結果、光源 112a, ..., 112n からの励起光によって生成された蛍光だけが光検出器 142a, ..., 142n にそれぞれ入射する。光検出器 142a, ..., 142n は、それぞれ、入射光すなわち試料 S 内の測定点から発せられた蛍光の強度を示す蛍光強度信号を出力する。この蛍光強度信号は画像形成部 16

4に入力される。画像形成部164は、1回のラスタ一走査（およびz走査）ごとに、入力される蛍光強度信号をx y方向（およびz方向）の位置情報に同期させて処理して、試料S内の焦点面（測定点が移動した平面または曲面）の1フレームの蛍光画像を形成する。形成された蛍光画像は、記憶部166に保存される。ここに述べた一連の動作は、設定された取得するフレーム数だけ繰り返され、設定されたフレーム数の蛍光画像が取得される。各蛍光画像は、ピクセルのデータが時系列的に取得された複数のピクセルからなる。

[0029] 記憶部166に保存された蛍光画像は、必要に応じて処理され、表示部168に表示される。たとえば、測定点のz位置を変えて複数フレームの蛍光画像を取得し、それらを合成して三次元画像を形成し、これを表示部168に表示することも可能である。

[0030] [空間相関計算式]

本実施形態において使用する空間相関計算式は、十分なデータ数と十分な遅延時間とが得られるように、従来の空間相関計算式を拡張したものである。

[0031] 次式（1）は、本実施形態において使用するR I C Sの解析に使用する空間自己相関計算式を表している。式（1）は、チャンネル1の自己相関計算式の例である。

[数1]

$$G_s(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum_{\gamma=1}^{q-\eta} \left(\sum I_{1\gamma}(x, y) * I_{1(\gamma+\eta)}(x + \xi, y + \psi) / M_{1\gamma 1\eta} \right)}{(q - \eta) \cdot A_1} \quad \dots(1)$$

[0032] ここで、 $G_{s,a}$ はR I C Sの空間自己相関値、 $I_{1\gamma}$ はチャンネル1の γ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 $I_{1(\gamma+\eta)}$ はチャンネル1の（ $\gamma + \eta$ ）フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y は測定点の空間的座標、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 γ は1以上の整数（ $\gamma = 1, 2, \dots, q$ ）、 η は0以上 q 未満の整数（ $\eta = 0, 1, \dots$ 、

p ($< q$)、 $M_{1\gamma 1(\gamma+\eta)}$ は、チャンネル 1 の γ フレーム目とチャンネル 1 の $(\gamma + \eta)$ フレーム目との積和計算の回数、 A_1 は平均値である。

[0033] γ と $(\gamma + \eta)$ は共に積和計算の対象となるフレームを示すパラメータである。言い換えれば、 γ と η は、複数フレームの蛍光画像に対して、相関解析に利用する蛍光画像を選定するためのものである。 γ は、積和計算の対象の一方のフレームを示し、 η は、時間拡張のために導入されたパラメータであり、 γ に対するフレーム数の遅れを示している。 q は、空間相関計算に使用するフレームの総数を表している。 p は、空間相関計算における最大の遅延時間を決めるフレーム数を表している。 p の取り得る最大の値は $q - 1$ である。

[0034] 平均値 A_1 は、たとえば次式 (2) で表される。

[数2]

$$A_1 = \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q (\sum I_{1\gamma}(x, y) / M_{1\gamma})}{q} \right)^2 \quad \dots(2)$$

[0035] ここで、 $M_{1\gamma}$ は、チャンネル 1 の γ フレーム目の計算に使用するデータ数である。

[0036] 平均値 A_1 の算出式は式 (2) に限定されない。平均値 A_1 は、他の周知の任意の計算式を使用して算出されてもよい。

[0037] 次式 (3) は、本実施形態において使用する R I C S の解析に使用する空間相互相関計算式を表している。式 (3) は、チャンネル 1 とチャンネル 2 の相互相関計算式の例である。

[数3]

$$G_s(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum_{\gamma=1}^{q-\eta} (\sum I_{1\gamma}(x, y) * I_{2(\gamma+\eta)}(x + \xi, y + \psi) / M_{1\gamma 2\eta})}{(q - \eta) \cdot A_2} \quad \dots(3)$$

[0038] ここで、 G_s は R I C S の空間相互相関値、 $I_{1\gamma}$ はチャンネル 1 の γ フレーム

ム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 $I_{2(\gamma+\eta)}$ はチャンネル2の（ $\gamma+\eta$ ）フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y は測定点の空間的座標、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 γ は1以上の整数（ $\gamma=1, 2, \dots, q$ ）、 η は0以上 q 未満の整数（ $\eta=0, 1, \dots, p(<q)$ ）、 $M_{1\gamma 2(\gamma+\eta)}$ は、チャンネル1の γ フレーム目とチャンネル2の（ $\gamma+\eta$ ）フレーム目の積和計算の回数、 A_2 は平均値である。

[0039] γ と η は、式（1）の同様に、それぞれ、積和計算の対象の一方のフレームと、 γ に対するフレーム数の遅れを示している。

[0040] 平均値 A_2 は、たとえば次式（4）で表される。

[数4]

$$A_2 = \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q (\sum I_{1\gamma}(x, y) / M_{1\gamma})}{q} \right) \cdot \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q (\sum I_{2\gamma}(x, y) / M_{2\gamma})}{q} \right) \quad \dots(4)$$

[0041] ここで、 $M_{1\gamma}$ は、チャンネル1の γ フレーム目の計算に使用するデータ数、 $M_{2\gamma}$ は、チャンネル2の γ フレーム目の計算に使用するデータ数である。

[0042] 次式（5）は、本実施形態において使用するRICSの解析に使用するフィッティング式を表している。

[数5]

$$G_s(\xi, \psi, \eta) = S(\xi, \psi, \eta) * G(\xi, \psi, \eta)$$

$$S(\xi, \psi, \eta) = \exp \left[- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\eta \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_\psi \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)} \right] \quad \dots(5)$$

$$G(\xi, \psi) = \frac{1}{N} \left(\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_\psi \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)^{-1} * \left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_\psi \psi + \tau_f \eta)}{W_z^2} \right)^{-1/2} \right)$$

[0043] ここで、 G_s はR I C Sの空間相関値（空間自己相関値 G_{sa} または空間相互相関値 G_{sc} ）、 S はR I C Sの解析におけるスキヤンの影響、 G はR I C Sの解析における時間遅延の影響、 D は拡散定数、 δ_r はピクセルサイズ、 N は分子数、 W_0 は励起レーザビームの横方向の半径、 W_z は励起レーザビームの縦方向の半径、 τ_p はピクセル時間、 τ_l はライン時間、 τ_f はフレーム時間である。

[0044] ここで、 τ_p はピクセル間の取得時間のずれである。すなわち、ピクセル時間 τ_p は、1ピクセルのデータを取得するのに要する時間である。また τ_l は、任意のラインの最初のピクセルと、その次のラインの最初のピクセルとの間の取得時間のずれ（ライン時間）である。すなわち、ライン時間 τ_l は、1ラインを走査するのに要する時間を意味する。また τ_f は、任意のフレームの最初のピクセルと、その次のフレームの最初のピクセルとの間の取得時間のずれである。すなわち、フレーム時間 τ_f は、1フレームを走査するのに要する時間を意味する。

[0045] 式（1）～式（4）において、 γ は、 $\gamma = 1, 2, \dots, q$ と表され、 η は、 $\eta = 0, 1, \dots, p$ と表され、 p と q の間には、 $p < q$ の関係がある。 $q = 1$ の場合（1フレームだけのデータで空間相関計算を行なう場合）、 $p = 0$ となり、 η の取り得る値は0だけとなる。この場合、本実施形態においてR I C Sの解析に使用する空間相関計算式とフィッティング式は、 $\eta = 0$ の場合には、従来のR I C Sの解析に使用する空間相関計算式とフィッティング式と同じになる。すなわち、 $\eta = 0$ のとき、式（1）の空間自己相関計算式は次式（6）で表される。

[数6]

$$G_{sa}(\xi, \psi, 0) = G_{sa}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_1(x, y) * I_1(x + \xi, y + \psi) / M_{11}}{A_1} \quad \dots(6)$$

[0046] ここで、 I_1 はチャンネル1の同一フレームの蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y は測定点の空間的座標、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 M_{11} はチャンネル1の同一フレーム中の積和計算の回数である。

[0047] 平均値 A_1 は、次式 (7) で表される。

[数7]

$$A_1 = (\sum I_1(x, y) / M_1)^2 \quad \dots (7)$$

[0048] ここで、 M_1 は、チャンネル 1 の同一フレーム中の計算に使用するデータ数である。

[0049] また、式 (3) の空間相互相関計算式は次式 (8) で表される。

[数8]

$$G_{sc}(\xi, \psi, 0) = G_{sc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_1(x, y) * I_2(x + \xi, y + \psi) / M_{12}}{A_2} \quad \dots (8)$$

[0050] ここで、 I_1 はチャンネル 1 の計算に使用するフレームの蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 I_2 はチャンネル 2 の計算に使用するフレームの蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y は測定点の空間的座標、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 M_{12} はチャンネル 1 とチャンネル 2 中のデータの積和計算の回数である。

[0051] 平均値 A_2 は、次式 (9) で表される。

[数9]

$$A_2 = (\sum I_1(x, y) / M_1) \cdot (\sum I_2(x, y) / M_2) \quad \dots (9)$$

[0052] ここで、ここで、 M_1 は、チャンネル 1 の計算に使用するフレーム中の計算に使用するデータ数、 M_2 は、チャンネル 2 の計算に使用するフレーム中の計算に使用するデータ数である。

[0053] また、式 (5) のフィッティング式は次式 (10) で表される。

[数10]

$$\begin{aligned}
G_s(\xi, \psi, 0) &= S(\xi, \psi, 0) * G(\xi, \psi, 0) \\
&= G_s(\xi, \psi) = S(\xi, \psi) * G(\xi, \psi) \\
S(\xi, \psi) &= \exp \left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_{\psi} \psi)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \dots(10) \\
G(\xi, \psi) &= \frac{1}{N} \left(\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_{\psi} \psi)}{W_0^2} \right)^{-1} * \left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_{\psi} \psi)}{W_z^2} \right)^{-1/2} \right)
\end{aligned}$$

[0054] [測定手順]

以下、図3を参照しながら画像解析の手順について説明する。また、各ステップについて、適宜、図4～図12を参照しながら説明する。

[0055] (ステップS1)

試料Sの観察領域と取得する蛍光画像のフレーム数を設定する。設定した観察領域の設定したフレーム数の蛍光画像を時系列的に取得する。蛍光画像の取得は、同一の観察領域に対して同一の走査方法によって行なう。すなわち、所定の方角に向けて光を照射した後、再び当該所定の方角に向けて光を照射するまでを1セットの走査とした場合、少なくとも2セット以上、解析領域が走査される。

[0056] 画像解析に使用する複数フレームの蛍光画像を模式的に図4に示す。画像解析に使用する複数フレームの蛍光画像は、ステップS1で取得した画像の全部であってもよく、また一部であってもよい。以下では、画像解析に使用する複数フレームの蛍光画像を単に複数フレームの蛍光画像と呼ぶ。図4において、 F_k は、一つのチャンネルにおけるkフレーム目の蛍光画像を表している。各蛍光画像は、ピクセルのデータが時系列的に取得された複数のピクセルからなる。ピクセルのデータは、たとえば、2次元または3次元の観察領域から得られた蛍光強度である。

[0057] (ステップS2)

図5に示すように、画像解析に使用する蛍光画像の領域（観察領域） R_1 に対して解析する領域（解析領域） R_2 を設定する。解析領域 R_2 は、観察領域 R_1 の一部に限定されるものではなく、観察領域 R_1 に一致していてもよい。解析領域 R_2 は、アプリケーション的にはデフォルトで観察領域 R_1 すなわちステップS1における走査領域に設定されている。観察領域 R_1 の全体を解析する場合には、このステップは不要である。

[0058] （ステップS3）

複数フレームの蛍光画像をデータ情報変化に基づいて分類する。たとえば、複数フレームの蛍光画像の解析領域 R_2 の区分値をそれぞれ算出し、算出した区分値に基づいて複数フレームの蛍光画像を複数グループに分類する。区分値は、たとえば、解析領域 R_2 のピクセルのデータの統計値であり、解析領域 R_2 のピクセルのデータの最大値、最小値、平均値、相対差、相対比のいずれかである。ピクセルのデータは、たとえば、2次元または3次元の観察領域から得られた蛍光強度である。相対差は、たとえば、最大値と最小値との差である。

[0059] 複数グループに分類された複数フレームの蛍光画像の解析領域の画像を模式的に図6に示す。図6において、 $F a_k$ は k フレーム目の蛍光画像の解析領域の画像を表している。 D_a , D_b , D_c , D_d , D_e , D_f は、蛍光画像の解析領域の区分値を表している。ここでは、一例として、区分値は6種類あるとしている。図6の例では、 $F a_1$, $F a_2$, $F a_{79}$, $F a_{80}$ が同じグループに分類され、 $F a_3$, $F a_{74}$, $F a_{75}$ が同じグループに分類され、 $F a_4$, $F a_{71}$, $F a_{72}$, $F a_{73}$ が同じグループに分類され、 $F a_5$, $F a_{76}$, $F a_{77}$, $F a_{78}$ が同じグループに分類され、 $F a_6$, $F a_7$ が同じグループに分類され、 $F a_8$, $F a_9$, $F a_{10}$ が同じグループに分類されている。

[0060] （ステップS4）

グループごとに解析領域の平均画像を算出する。平均画像は、各グループに含まれる全ての画像の平均値であってもよく、または各グループに含まれる一部の画像の平均値であってもよい。たとえば、平均画像の算出は、各グ

ループに含まれる画像の数を算出し、算出した画像の数に基づいて各グループの平均画像を算出する。

[0061] より具体的には、各グループに含まれる全ての画像について、解析領域を構成するピクセルごとに、ピクセルのデータの平均値を算出する。そして、ピクセルごとに算出された各ピクセルのデータの平均値からなる画像を平均画像としてよい。

[0062] さらに、グループごとの平均画像のすべてのピクセルの平均値を算出する。

[0063] (ステップS5)

グループごとに解析領域の各画像から平均画像を減算する。これにより画像に共通に重畳する不要なデータが除去される。たとえば、大きい分子や不動分子などの影響を取り除かれる。解析領域の各画像から平均画像を減算するには、たとえば、解析領域を構成するピクセルごとに、各画像のピクセルのデータから平均画像のピクセルのデータを減算し、算出された値からなる画像を得ればよい。

[0064] さらに、グループごとに解析領域の各画像に平均値を加算する。これにより減算によって低下した輝度値の低下が補われる。ここでは、平均値を加算する例をあげたが、これに代えて、最小値を加算してもよい。

[0065] 以下、このように平均画像の減算と平均値の加算を経て算出された画像を解析領域の再構築画像と呼ぶことにする。

[0066] ここで、 k フレーム目の解析領域の再構築画像を Fb_k とする。また、区分値 $D_a, D_b, D_c, D_d, D_e, D_f$ に対応する蛍光画像の解析領域の平均画像をそれぞれ $A_a, A_b, A_c, A_d, A_e, A_f$ とする。ここで、 $A_a, A_b, A_c, A_d, A_e, A_f$ はそれぞれ相応の平均値を加算済みのものとする。このようにした場合、図6の例では、再構築画像は、 $Fb_1 = Fa_1 - A_a, Fb_2 = Fa_2 - A_a, Fb_3 = Fa_3 - A_b, Fb_4 = Fa_4 - A_c, Fb_5 = Fa_5 - A_d, Fb_6 = Fa_6 - A_e, Fb_7 = Fa_7 - A_e, Fb_8 = Fa_8 - A_f, Fb_9 = Fa_9 - A_f, Fb_{10} = Fa_{10} - A_f, \dots, Fb_{71} = Fa_{71} - A_c, Fb_{72} = Fa_7$

$F_{b_{73}} = F_{a_{73}} - A_c$, $F_{b_{74}} = F_{a_{74}} - A_b$, $F_{b_{75}} = F_{a_{75}} - A_b$, $F_{b_{76}} = F_{a_{76}} - A_d$, $F_{b_{77}} = F_{a_{77}} - A_d$, $F_{b_{78}} = F_{a_{78}} - A_d$, $F_{b_{79}} = F_{a_{79}} - A_a$, $F_{b_{80}} = F_{a_{80}} - A_a$ となる。

[0067] 画像解析に使用する蛍光画像の解析領域の画像が同種類のものであること、言い換えれば解析領域のデータ情報変化が実質的にないことがあらかじめ分かっている場合には、ステップS3, S4, S5は省略してよい。

[0068] (pとqの値について)

式(1)～(4)の空間相関計算を実施するにあたってpとqの値を決定する必要がある。前述したように、pは、空間相関計算における最大の遅延時間を決めるフレーム数を表し、qは、空間相関計算に使用するフレームの総数を表している。pとqの値が大きいほど、計算に使用するデータ数は多くなるので、計算結果の精度つまり信頼度は増加するが、計算に要する時間は長くなる。反対に、pとqの値が小さいほど、計算に使用するデータ数は少なくなるので、計算に要する時間は短くなるが、計算結果の精度つまり信頼度は低下する。このような理由から、pとqの値は、十分な精度の計算結果が得られる範囲において、なるべく小さく設定するとよい。

[0069] (ステップS6)

pの値を決定するため、まず、拡散時間を推定する。拡散時間の推定は、式(6)～(10)を使用してRICSの解析をすることにより行なう。具体的には、式(6)～式(9)を使用して、異なる遅延時間に対する相関値 G_s をそれぞれ求める。そして、遅延時間と相関値 G_s との関係から、式(10)を使用して、拡散定数と分子数を求める。

[0070] 式(10)において、遅延時間がゼロのときは($\xi = 0$ 、 $\psi = 0$)、Sは1であり、 G_s は $1/N$ で表せる。したがって、分子数を求めることができる。

[0071] 拡散定数と拡散時間との関係は次式(11)で表される。この式(11)に基づいて、先に求めた拡散定数から拡散時間を求めることができる。

[数11]

$$\tau = W_0^2 / 4D \quad \dots(11)$$

[0072] ここで、Dは拡散定数、 τ は拡散時間、 W_0 は励起レーザビームの横方向の半径を意味する。

[0073] なお、解析の対象が拡散時間の短い分子である場合には、式(6)～式(10)を使用して得られる拡散時間は適切な拡散時間を示している。最大の遅延時間が拡散時間の2倍よりも大きい場合、式(10)を用いて十分にフィッティングできるからである。しかし、解析の対象が拡散時間の長い分子である場合には、式(10)を用いてフィッティングしても、そこから得られる拡散時間は、必ずしも、実際の拡散時間と一致しない。この場合、拡散時間は推定値に過ぎない。

[0074] (ステップS7)

p の値を決定するため、次に、次式(12)を使用して p を求める。

[数12]

$$\tau_D = \frac{1}{n} (\tau_p \xi_{\max} + \tau_l \psi_{\max} + \tau_f p) \quad \dots(12)$$

[0075] ここで、 τ_D は推定拡散時間、 $\xi_{\max}$ 、 $\psi_{\max}$ は、1フレーム中の空間的座標の変化の最大値、 n は2以上の整数($n \geq 2$)である。

[0076] 一般に、相関値の算出には、最大の遅延時間が、拡散時間の2倍程度あればよいとされている。最大の遅延時間が、拡散時間の2倍よりも短いと、式(5)を用いて適切にフィッティングすることが困難となる。したがって、少なくとも $n=2$ とした上で、式(11)を用いて、 p を算出すれば、式(5)を用いて適切にフィッティングすることができると考えられる。ただし、解析結果に求められる精度に応じて、 n を3以上の整数に設定してもよい。これにより、式(11)を満足する p を用いた式(1)～式(4)を使用したRICSの解析であれば、適切な解析結果が得られると考えられる。

[0077] (ステップS8)

パラメータ γ の最終値 q を決定する。 q の値は、前述したように、 $q > p$ を満足するものでなければならない。 q の値は、たとえば、解析領域が $m \times m$ の場合、次式 (13) を満足するように決める。

[数13]

$$m \times m \times q \doteq 128 \times 128 \quad \dots (13)$$

[0078] (ステップ S 9)

ステップ S 5 において算出された再構築画像を、ステップ S 5 において決定した q の値に基づいて複数ブロックに分割する。また、複数ブロックを順序づけ、最初のブロックを、続くステップ S 10 における空間相関計算の計算対象に設定する。

[0079] 複数ブロックに分割された複数フレームの蛍光画像の解析領域の再構築画像を模式的に図 7 に示す。図 7 には、一例として、80 フレームの蛍光画像の解析領域の再構築画像 $Fb_1 \sim Fb_{80}$ が、8 フレームずつ、10 個のブロック $B_1 \sim B_{10}$ に分割された例が示されている。

[0080] (ステップ S 10)

計算対象のブロックに対して空間相関値を計算する。空間自己相関値を計算する場合は式 (1) と式 (2) の空間自己相関計算式を使用し、空間相互相関値を計算する場合は式 (3) と式 (4) の空間相互相関計算式を使用する。

[0081] 相関値の計算に使用する各ピクセルのデータは、そのピクセルのデータそのものであってもよいし、そのピクセルを含む複数のピクセルのデータの統計値であってもよい。複数のピクセルは、たとえば、注目のピクセルおよびこれに隣接するピクセルであってよい。統計値は、たとえば、ピクセルのデータの平均値、最大値、最小値、相対差、絶対差、相対比のいずれかであってよい。どのような統計値を使用するかは、RICS の解析によってどのような情報を得たいかによって決める。

[0082] また相関値の計算は、ピクセルのデータに基づいて画像をそれぞれ構成し直し、構成し直した画像について相関値を計算してもよい。たとえば、隣の

ピクセルのデータ同士を足して、ピクセルのデータの数を半分にする。または、一つのピクセルのデータを複数に分割する。本来ならば、一度画像を取得するとピクセルのデータの数は増えないが、取得したピクセルのデータの強度がそのピクセルのデータの周囲にガウシアン分布で広がっていると仮定して、本来取得できていないピクセルのデータを補う。本質的にピクセルのデータの数が増えている訳ではないが、見た目が良くなる。

[0083] 式(1)～式(4)を使用する計算は、 η の値を0, 1, 2, ..., p と順に変えつつ、 η の各値に対して、さらに γ の値を1, 2, ..., $p - \eta$ と順に変えつつ、さらに γ の各値に対して、 ξ , ψ を順に変えつつ行なう。たとえば、解析領域 R^2 が256ピクセル×256ピクセルの領域である場合、 ξ , ψ をそれぞれ0, 1, 2, ..., 255と順に変える。

[0084] たとえば、 $\eta = 0$, $\gamma = 1$, $\psi = 0$ に対して、 ξ を0, 1, 2, ..., 255と1ずつ増やしながら、 ξ の各値について計算処理を行ない、次に ψ を1増やし、 $\eta = 0$, $\gamma = 1$, $\psi = 1$ に対して、 ξ を0, 1, 2, ..., 255と1ずつ増やしながら、 ξ の各値について計算処理を行ない、この計算処理を $\psi = 255$ になるまで繰り返す。その後、 γ を1増やし、 $\eta = 0$, $\gamma = 2$, $\psi = 0$ に対して、 ξ を0, 1, 2, ..., 255と1ずつ増やしながら、 ξ の各値について計算処理を行ない、次に、 $\eta = 0$, $\gamma = 2$, $\psi = 1$ に対して、 ξ を0, 1, 2, ..., 255と1ずつ増やしながら、 ξ の各値について計算処理を行ない、この計算処理を $\psi = 255$ になるまで繰り返す。この計算処理を $\psi = 255$ になるまで繰り返す。この計算処理は γ を1ずつ増やしながら、 $\gamma = q$ になるまで繰り返す。

[0085] その後、 η を1増やし、 $\eta = 1$, $\gamma = 1$, $\psi = 0$ に対して、 ξ を0, 1, 2, ..., 255と1ずつ増やしながら、 ξ の各値について計算処理を行ない、次に ψ を1増やし、 $\eta = 1$, $\gamma = 1$, $\psi = 1$ に対して、 ξ を0, 1, 2, ..., 255と1ずつ増やしながら、 ξ の各値について計算処理を行ない、この計算処理を $\psi = 255$ になるまで繰り返す。その後、 γ を1増やし、 $\eta = 1$, $\gamma = 2$, $\psi = 0$ に対して、 ξ を0, 1, 2, ..., 255と1ずつ増やし

ながら、 ξ の各値について計算処理を行ない、次に、 $\eta = 1$, $\gamma = 2$, $\psi = 1$ に対して、 ξ を0, 1, 2, ..., 255と1ずつ増やしながら、 ξ の各値について計算処理を行ない、この計算処理を $\psi = 255$ になるまで繰り返す。この計算処理を $\psi = 255$ になるまで繰り返す。この計算処理は γ を1ずつ増やしながら、 $\gamma = q - 1$ になるまで繰り返す。

[0086] 以降、 η を1ずつ増やしながら η の各値に対して、 γ を1ずつ増やしながら、同様の計算処理を、 $\gamma = q - \eta$ になるまで繰り返す。この計算処理は、 η を1ずつ増やしながら、 $\eta = p$ になるまで繰り返す。

[0087] 図8は、 $G_s(2, 4, 0)$ 中の積和計算を模式的に示している。この計算は、同一フレーム(γ フレーム目)の再構築画像の解析領域 R^2 内のピクセルのデータ間の相関計算である。この計算において、 γ の取り得る最終値は q である。

[0088] 図9は、 $G_s(2, 4, 1)$ 中の積和計算を模式的に示している。この計算は、異なるフレームの画像の解析領域 R^2 内のピクセルのデータの間の相関計算である。具体的には、 γ フレーム目の再構築画像の解析領域 R^2 内のピクセルのデータと $(\gamma + 1)$ フレーム目の再構築画像の解析領域 R^2 内のピクセルのデータとの間の相関計算である。この計算において、 γ の取り得る最終値は $q - 1$ である。

[0089] 図10は、 $G_s(2, 4, 2)$ 中の積和計算を模式的に示している。つまり、 γ フレーム目の再構築画像の解析領域 R^2 内のピクセルのデータと $(\gamma + 2)$ フレーム目の再構築画像の解析領域 R^2 内のピクセルのデータとの間の相関計算を示している。この計算において、 γ の取り得る最終値は $q - 2$ である。

[0090] 図11は、 $G_s(2, 4, p)$ 中の積和計算を模式的に示している。つまり、 γ フレーム目の再構築画像の解析領域 R^2 内のピクセルのデータと p フレーム目の再構築画像の解析領域 R^2 内のピクセルのデータとの間の相関計算を示している。この計算において、 γ の取り得る最終値は $q - p$ である。

[0091] 図12は、式(1)～式(4)における変数 ξ , ψ , η と計算に使用する

フレームを示している。図 12 から、本実施形態による式 (1) ~ 式 (4) を使用した計算では、遅延時間が拡張されていることがわかる。具体的には、遅延時間は、 $256\tau_p + 255\tau_l$ を超えて、 $256\tau_p + 255\tau_l + p\tau_f$ まで拡大されている。

[0092] ここで、遅延時間とは、一つのピクセルの取得時間と別のピクセルの取得時間との差を意味している。たとえば、 $(\xi, \psi, \eta) = (1, 1, 0)$ と、 $(\xi, \psi, \eta) = (4, 2, 0)$ との遅延時間は、 $(4-1)\tau_p + (2-1)\tau_l + (0-0)\tau_f$ で表される。

[0093] そして、一つの遅延時間に対して、一つの相関値 G_s が得られる。ここで、理想的には、遅延時間が小さいほど、相関値 G_s は大きくなり、遅延時間が大きいほど、相関値 G_s は小さくなる。

[0094] (ステップ S 11)

計算対象のブロックが最終ブロックであるかを判断する。計算対象のブロックが最終ブロックでない場合には、計算対象のブロックを次のブロックに変更してステップ S 10 に戻る。また計算対象のブロックが最終ブロックでない場合には、次のステップ S 12 に進む。

[0095] (ステップ S 12)

ステップ S 11 において計算された複数の空間相関値の平均値を計算する。

[0096] (ステップ S 13)

ステップ S 12 において計算された空間相関値を式 (5) によってフィッティングする。

[0097] 式 (5) によってフィッティングすることにより拡散時間の推定をする。具体的には、式 (1) ~ 式 (4) を使用して、異なる遅延時間に対する自己相関値 G_{ss} または相互相関値 G_{sc} をそれぞれ求める。そして、自己相関値 G_{ss} または相互相関値 G_{sc} と遅延時間との関係から、式 (5) を使用して、拡散定数と分子数を求める。

[0098] 式 (5) において、遅延時間がゼロのときは $(\xi = 0, \psi = 0, \eta = 0)$

、 S は1であり、自己相関値 G_{ss} または相互相関値 G_{sc} は $1/N$ で表せる。
したがって、分子数を求めることができる。

[0099] 未知数である拡散定数 D と分子数 N を変動させながら、測定値として得られる相関値 G_{ss} または相関値 G_{sc} と理論値として得られる G_s との差が最小となるように、適切な拡散定数 D と分子数 N を求める。このように、式(5)によるフィッティングとは、拡散定数 D と分子数 N を変動させながら、2次元または3次元の観察領域における、最適な、分子数または拡散定数を推定することである。

[0100] 拡散定数と拡散時間との関係を示す式(11)に基づいて、求めた拡散定数から拡散時間を求めることができる。

[0101] (ステップS14)

計算結果を表示し保存する。具体的には、ステップS12で得た空間相関平均値と、ステップS14で得た空間相関値のフィッティング結果を表示する。解析結果の一例を図13～図16に示す。図13は、小さい分子に対する空間相関値の計算結果を輝度で示した画像であり、図14は、そのフィッティング結果を示している。また図15は、大きい分子に対する空間相関値の計算結果を輝度で示した画像であり、図16は、そのフィッティング結果を示している。

[0102] RICSのような画像データを計算の元とする空間的相関解析において、本実施形態では、ステップS3～S5において、複数フレームの画像をフレームデータの変化に応じていくつかのグループに分類し、グループごとに平均画像の減算処理を行なっている。つまり、異なる大きい分子や不動分子の影響が混在するフレームから一つの平均画像を算出して減算処理することを避け、大きい分子や不動分子の影響を事前に分類し、分類したグループごとに平均画像を算出して減算処理している。これにより、フレームデータの変化に応じたグループごとに、大きい分子や不動分子の影響が適材適所に除去される。

[0103] 従来、RICSのような画像データを計算の元とする空間的相関解析では

、1フレームの画像の解析領域中のピクセルのデータを用いて一つの相関値を計算する。しかし、細胞観察のような細胞の核、膜、質などの異なる局所的な解析領域に限定してR I C Sの解析を行なう場合、解析領域が小さくなる。解析領域が小さくなると、積和計算に利用できるピクセルデータの数（たとえば 8×8 ）が減少する。このため、解析領域が非常に小さくなると、相関値が適切に算出できなくなる。図17は、EGFP溶液（色素液を蒸留水で希釈したもの）の拡散定数（D）を解析領域のROIサイズを変えながら比較した結果を示している。図17において、ROIサイズ=256は、解析領域内に 256×256 のピクセル数が含まれていることを意味する。図17から分かるように、解析領域のROIサイズが大きいほど、EGFP溶液の拡散定数90（理論値）に近い値を示し、解析領域のROIサイズが小さいほど、EGFP溶液の拡散定数90（理論値）から遠い値を示している。すなわち、ピクセルのデータが多いほど、正しい結果（理論値）に近い値（測定値）が得られることが分かる。

[0104] これに対して本実施形態では、ステップS10における空間相関値計算において、1フレームの画像の解析領域内の二つのピクセルに対する積和計算によって一つの相関値を計算するのではなく、複数フレーム（qフレーム）の画像の解析領域内の二つのピクセルに対して積和計算を継続的行なって一つの相関値を計算する。このように複数フレームの画像のデータを使用して一つの相関値を計算するので、相関値の計算に使用するデータが1フレームの画像中のデータに制限されず、一つの相関値の計算に使用するデータの数が増大する。このため、高い精度でR I C Sの解析を行なえる。

[0105] さらに本実施形態では、ステップS10における空間相関値計算において使用する式（1）～（4）は、パラメータ η によって遅延時間の拡張が図られている。これにより、ピクセル時間とライン時間を調整することなく、観察可能な拡散時間を拡張できる。このため、データ収集をし直さなくても、すでに取得したデータを用いて試料に適した拡散時間を推測することができる。これにより、大きい拡散時間の分子についても、小さい拡散時間の分子

についても、適切な拡散時間を算出することが可能となる。

[0106] これまで、図面を参照しながら本発明の実施形態を述べたが、本発明は、これらの実施形態に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において様々な変形や変更が施されてもよい。

[0107] また実施形態では、ラスタ走査によって取得された画像について説明したが、画像は、ラスタ走査によって取得されたものに限定されるものではなく、ピクセルのデータが時系列的に取得された複数のピクセルからなる画像であればよく、他の走査方法によって取得されたものであってもよい。

符号の説明

[0108] 100…画像解析装置、110…光照射部、112a, …, 112n…光源、114a, …, 114n…コリメートレンズ、116a, …, 116n…ダイクロイックミラー、122…ダイクロイックミラー、124…ガルバノミラー、126…対物レンズ、128…対物レンズ駆動機構、130…光検出部、132…収束レンズ、134…ピンホール、136…コリメートレンズ、138a, …, 138n…ダイクロイックミラー、140a, …, 140n…蛍光フィルター、142a, …, 142n…光検出器、160…制御部、162…走査制御部、164…画像形成部、166…記憶部、168…表示部、170…入力部、172…解析領域設定部、174…画像選定部、176…データ抽出部、178…解析部、180…ステージ制御部、190…試料ステージ、R1…観察領域、R2…解析領域。

請求の範囲

- [請求項1] 各画像のピクセルのデータが時系列的に取得された複数のピクセルからなる複数フレームの画像を時系列的に取得する画像取得ステップと、
- 前記複数フレームの各画像に対して解析領域を設定する解析領域設定ステップと、
- 前記複数フレームの画像の中から解析に利用する2フレーム以上の選定画像を選定する画像選定ステップと、
- 前記選定画像の同一画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアの積和計算を前記選定画像のすべてに対して行なうとともに、前記選定画像の異なる二つの画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアの積和計算を行なって相関値を計算する演算ステップとを有している画像解析方法。
- [請求項2] 前記解析領域の区分値を算出する区分値算出ステップと、
- 前記複数フレームの画像を前記区分値に基づいて複数グループに分類する分類ステップと、
- 前記グループごとに前記解析領域の平均画像を算出する平均画像算出ステップと、
- 前記グループごとに前記解析領域の各画像から前記平均画像を減算して前記解析領域の再構築画像を算出する再構築画像算出ステップとをさらに有し、
- 前記演算ステップは、再構築画像に対して相関値を計算する、請求項1に記載の画像解析方法。
- [請求項3] 前記複数フレームの画像を複数ブロックに分割するステップをさらに有し、
- 前記演算ステップは、前記複数ブロックごとに相関値を計算し、
- 前記複数ブロックごとに計算された相関値の平均値を計算するステップをさらに有している、請求項1または2に記載の画像解析方法。

[請求項4] 前記データペアの各々は、前記ピクセルのデータの統計値であり、前記統計値は、前記ピクセルのデータの平均値、最大値、最小値、相対差、絶対差、相対比のいずれかである、請求項1ないし請求項3のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

[請求項5] 前記ピクセルのデータは、2次元または3次元の観察領域から得られた蛍光強度である、請求項1ないし請求項4のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

[請求項6] 前記演算ステップは、前記ピクセルのデータに基づいて、前記複数の画像をそれぞれ構成し直し、構成し直した画像について相関値を演算する、請求項1ないし5のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

[請求項7] 前記画像は、走査型顕微鏡によって得られたものである、請求項1ないし6のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

[請求項8] 前記演算ステップは、次式(1)を用いて、2次元または3次元の観察領域の自己相関の計算を行なう、

[数1]

$$G_s(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum_{\gamma=1}^{q-\eta} (\sum I_{1\gamma}(x, y) * I_{1(\gamma+\eta)}(x + \xi, y + \psi) / M_{1\gamma 1(\gamma+\eta)})}{(q - \eta) \cdot A_1} \quad \dots(1)$$

ここで、 $G_{s,a}$ はRICSの空間自己相関値、 $I_{1\gamma}$ はチャンネル1の γ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 $I_{1(\gamma+\eta)}$ はチャンネル1の $(\gamma+\eta)$ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y は測定点の空間的座標、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 γ は1以上の整数（ $\gamma = 1, 2, \dots, q$ ）、 η は0以上 q 未満の整数（ $\eta = 0, 1, \dots, p (< q)$ ）、 $M_{1\gamma 1(\gamma+\eta)}$ は、チャンネル1の γ フレーム目とチャンネル1の $(\gamma+\eta)$ フレーム目との積和計算の回数、 A_1 は平均値である、請求項1ないし請求項7のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

[請求項9] 前記平均値 A_1 は次式(2)で表される、

[数2]

$$A_1 = \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q \left(\sum l_{1\gamma}(x, y) / M_{1\gamma} \right)}{q} \right)^2 \quad \dots(2)$$

ここで、 $M_{1\gamma}$ は、チャンネル1の γ フレーム目の計算に使用するデータ数である、請求項8に記載の画像解析方法。

[請求項10] 前記演算ステップは、次式(3)を用いて、2次元または3次元の観察領域の相互相関値の計算を行なう、

[数3]

$$G_s(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum_{\gamma=1}^{q-\eta} \left(\sum l_{1\gamma}(x, y) * l_{2(\gamma+\eta)}(x + \xi, y + \psi) / M_{1\gamma 2\eta} \right)}{(q - \eta) \cdot A_2} \quad \dots(3)$$

ここで、 G_{sc} はR I C Sの空間相互相関値、 $I_{1\gamma}$ はチャンネル1の γ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 $I_{2(\gamma+\eta)}$ はチャンネル2の $(\gamma + \eta)$ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y は測定点の空間的座標、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 γ は1以上の整数（ $\gamma = 1, 2, \dots, q$ ）、 η は0以上 q 未満の整数（ $\eta = 0, 1, \dots, p (< q)$ ）、 $M_{1\gamma 2(\gamma+\eta)}$ は、チャンネル1の γ フレーム目とチャンネル2の $(\gamma + \eta)$ フレーム目の積和計算の回数、 A_2 は平均値である、請求項1ないし請求項7のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

[請求項11] 平均値 A_2 は、たとえば次式(4)で表される、

[数4]

$$A_2 = \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q \left(\sum l_{1\gamma}(x, y) / M_{1\gamma} \right)}{q} \right) \cdot \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q \left(\sum l_{2\gamma}(x, y) / M_{2\gamma} \right)}{q} \right) \quad \dots(4)$$

ここで、 $M_{1\gamma}$ は、チャンネル1の γ フレーム目の計算に使用するデータ数、 $M_{2\gamma}$ は、チャンネル2の γ フレーム目の計算に使用するデータ数である、請求項10に記載の画像解析方法。

[請求項12] 前記演算ステップは、次式(5)を用いて、前記空間相関値の計算結果をフィッティングし、分子数または拡散定数を推定する、
[数5]

$$G_s(\xi, \psi, \eta) = S(\xi, \psi, \eta) * G(\xi, \psi, \eta)$$

$$S(\xi, \psi, \eta) = \exp \left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\eta \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \dots (5)$$

$$G(\xi, \psi) = \frac{1}{N} \left(\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)^{-1} * \left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_z^2} \right)^{-1/2} \right)$$

ここで、 G_s はR I C Sの空間相関値（空間自己相関値 G_{ss} または空間相互相関値 G_{sc} ）、 S はR I C Sの解析におけるスキンの影響、 G はR I C Sの解析における時間遅延の影響、 D は拡散定数、 δ_r はピクセルサイズ、 N は分子数、 W_0 は励起レーザビームの横方向の半径、 W_z は励起レーザビームの縦方向の半径、 τ_p はピクセル時間、 τ_l はライン時間、 τ_f はフレーム時間である、請求項8ないし11のいずれかひとつに記載の画像解析方法。

[請求項13] 各画像のピクセルのデータが時系列的に取得された複数のピクセルからなる複数フレームの画像を時系列的に取得する画像取得部と、
前記複数フレームの各画像に対して解析領域を設定する解析領域設定部と、
前記複数フレームの画像の中から解析に利用する2フレーム以上の選定画像を選定する画像選定部と、

前記選定画像の同一画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアの積和計算を前記選定画像のすべてに対して行なうとともに、前記選定画像の異なる二つの画像の前記解析領域内の取得時間間隔が同じ二つのピクセルのデータペアの積和計算を行なって相関値を計算する演算部とを有している画像解析装置。

[請求項14]

前記演算部は、
前記解析領域の区分値を算出し、
前記複数フレームの画像を前記区分値に基づいて複数グループに分類し、
前記グループごとに前記解析領域の平均画像を算出し、
前記グループごとに前記解析領域の各画像から前記平均画像を減算して前記解析領域の再構築画像を算出し、
再構築画像に対して相関値を計算する、請求項13に記載の画像解析装置。

[請求項15]

前記演算部は、
前記複数フレームの画像を複数ブロックに分割し、
前記複数ブロックごとに相関値を計算し、
前記複数ブロックごとに計算された相関値の平均値を計算する、請求項13または14に記載の画像解析装置。

[請求項16]

前記データペアの各々は、前記ピクセルのデータの統計値であり、前記統計値は、前記ピクセルのデータの平均値、最大値、最小値、相対差、絶対差、相対比のいずれかである、請求項13ないし15のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

[請求項17]

前記ピクセルのデータは、2次元または3次元の観察領域から得られた蛍光強度である、請求項13ないし16のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

[請求項18]

前記演算部は、前記ピクセルのデータに基づいて、前記複数の画像をそれぞれ構成し直し、構成し直した画像について相関値を演算する

、請求項 13 ないし 17 のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

[請求項19] 前記画像は、走査型顕微鏡によって得られたものである、請求項 13 ないし 18 のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

[請求項20] 前記演算部は、次式（1）を用いて、2次元または3次元の観察領域の自己相関の計算を行なう、

[数6]

$$G_s(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum_{\gamma=1}^{q-\eta} (\sum I_{1\gamma}(x, y) * I_{1(\gamma+\eta)}(x + \xi, y + \psi) / M_{1\gamma 1(\gamma+\eta)})}{(q - \eta) \cdot A_1} \quad \dots(1)$$

ここで、 G_{sa} はRICSの空間自己相関値、 $I_{1\gamma}$ はチャンネル1の γ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 $I_{1(\gamma+\eta)}$ はチャンネル1の $(\gamma+\eta)$ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y は測定点の空間的座標、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 γ は1以上の整数（ $\gamma = 1, 2, \dots, q$ ）、 η は0以上 q 未満の整数（ $\eta = 0, 1, \dots, p (< q)$ ）、 $M_{1\gamma 1(\gamma+\eta)}$ は、チャンネル1の γ フレーム目とチャンネル1の $(\gamma+\eta)$ フレーム目との積和計算の回数、 A_1 は平均値である、請求項 13 ないし 19 のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

[請求項21] 前記平均値 A_1 は次式（2）で表される、

[数7]

$$A_1 = \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q (\sum I_{1\gamma}(x, y) / M_{1\gamma})}{q} \right)^2 \quad \dots(2)$$

ここで、 $M_{1\gamma}$ は、チャンネル1の γ フレーム目の計算に使用するデータ数である、請求項 20 に記載の画像解析装置。

[請求項22] 前記演算部は、次式（3）を用いて、2次元または3次元の観察領域の相互相関値の計算を行なう、

[数8]

$$G_s(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum_{\gamma=1}^{q-\eta} \left(\sum l_{1\gamma}(x, y) * l_{2(\gamma+\eta)}(x + \xi, y + \psi) / M_{1\gamma 2\eta} \right)}{(q - \eta) \cdot A_2} \quad \dots(3)$$

ここで、 $G_{s.c}$ はRICSの空間相互相関値、 $I_{1\gamma}$ はチャンネル1の γ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 $I_{2(\gamma+\eta)}$ はチャンネル2の $(\gamma + \eta)$ フレーム目の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y は測定点の空間的座標、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 γ は1以上の整数（ $\gamma = 1, 2, \dots, q$ ）、 η は0以上 q 未満の整数（ $\eta = 0, 1, \dots, p (< q)$ ）、 $M_{1\gamma 2(\gamma+\eta)}$ は、チャンネル1の γ フレーム目とチャンネル2の $(\gamma + \eta)$ フレーム目の積和計算の回数、 A_2 は平均値である、請求項13ないし19のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

[請求項23] 平均値 A_2 は、たとえば次式（4）で表される、

[数9]

$$A_2 = \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q \left(\sum l_{1\gamma}(x, y) / M_{1\gamma} \right)}{q} \right) \cdot \left(\frac{\sum_{\gamma=1}^q \left(\sum l_{2\gamma}(x, y) / M_{2\gamma} \right)}{q} \right) \quad \dots(4)$$

ここで、 $M_{1\gamma}$ は、チャンネル1の γ フレーム目の計算に使用するデータ数、 $M_{2\gamma}$ は、チャンネル2の γ フレーム目の計算に使用するデータ数である、請求項22に記載の画像解析装置。

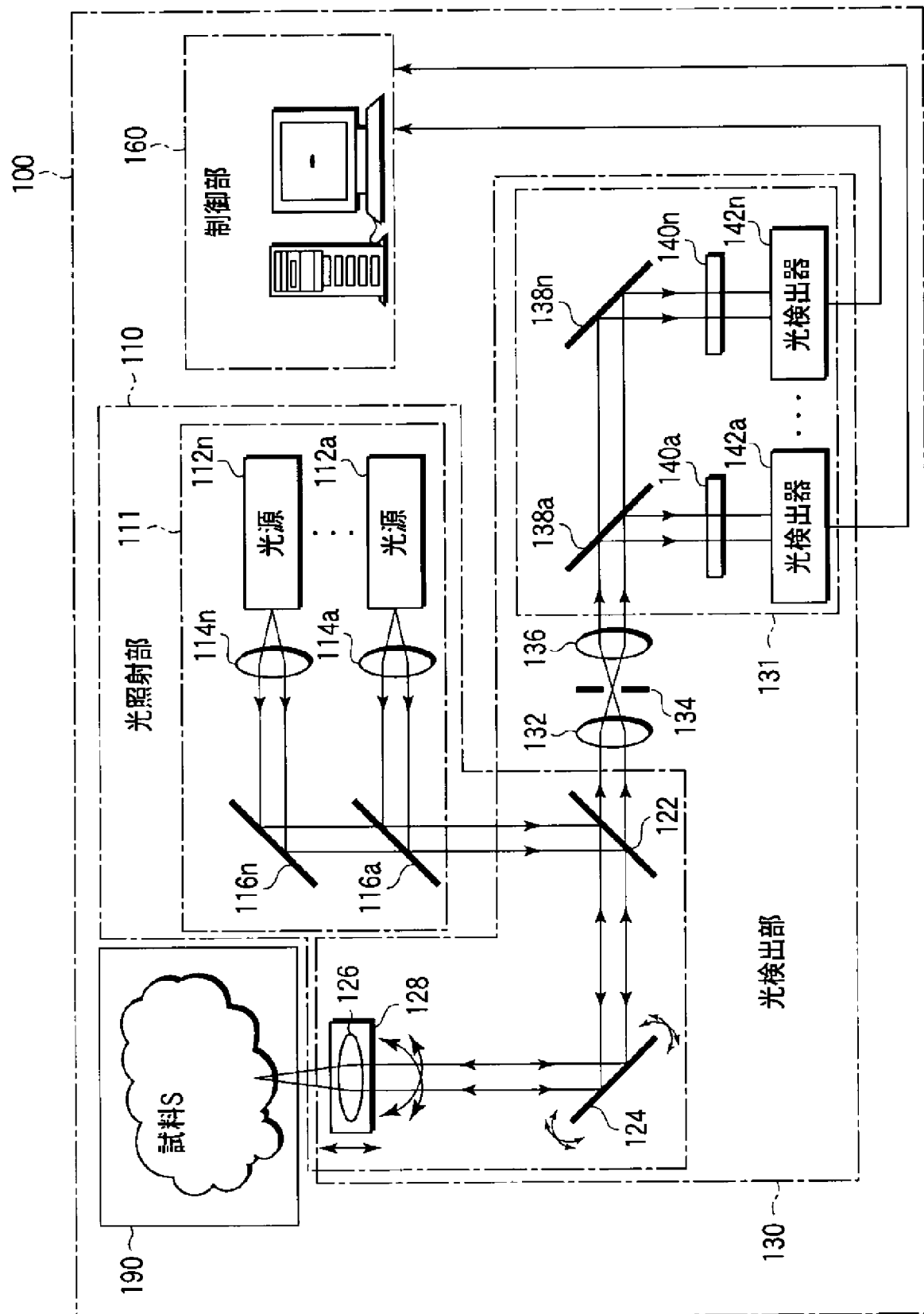
[請求項24] 前記演算部は、次式（5）を用いて、前記空間相関値の計算結果をフィッティングし、分子数または拡散定数を推定する、

[数10]

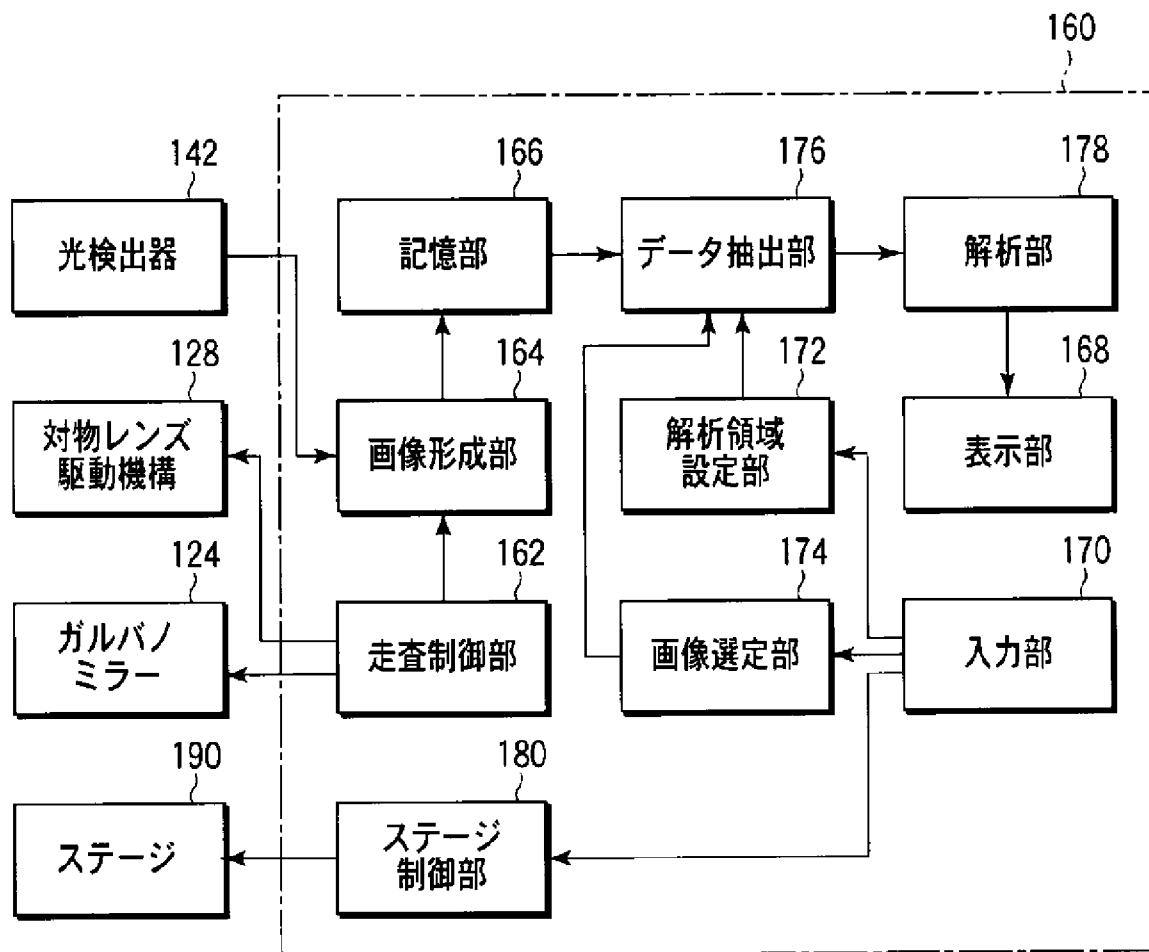
$$\begin{aligned}
 G_s(\xi, \psi, \eta) &= S(\xi, \psi, \eta) * G(\xi, \psi, \eta) \\
 S(\xi, \psi, \eta) &= \exp \left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\eta \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \dots (5) \\
 G(\xi, \psi) &= \frac{1}{N} \left(\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)^{-1} \right. \\
 &\quad \left. * \left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_z^2} \right)^{-1/2} \right)
 \end{aligned}$$

ここで、 G_s はR I C Sの空間相関値（空間自己相関値 $G_{s,s}$ または空間相互相関値 $G_{s,c}$ ）、 S はR I C Sの解析におけるスキンの影響、 G はR I C Sの解析における時間遅延の影響、 D は拡散定数、 δ_r はピクセルサイズ、 N は分子数、 W_0 は励起レーザービームの横方向の半径、 W_z は励起レーザービームの縦方向の半径、 τ_p はピクセル時間、 τ_l はライン時間、 τ_f はフレーム時間である、請求項20ないし23のいずれかひとつに記載の画像解析装置。

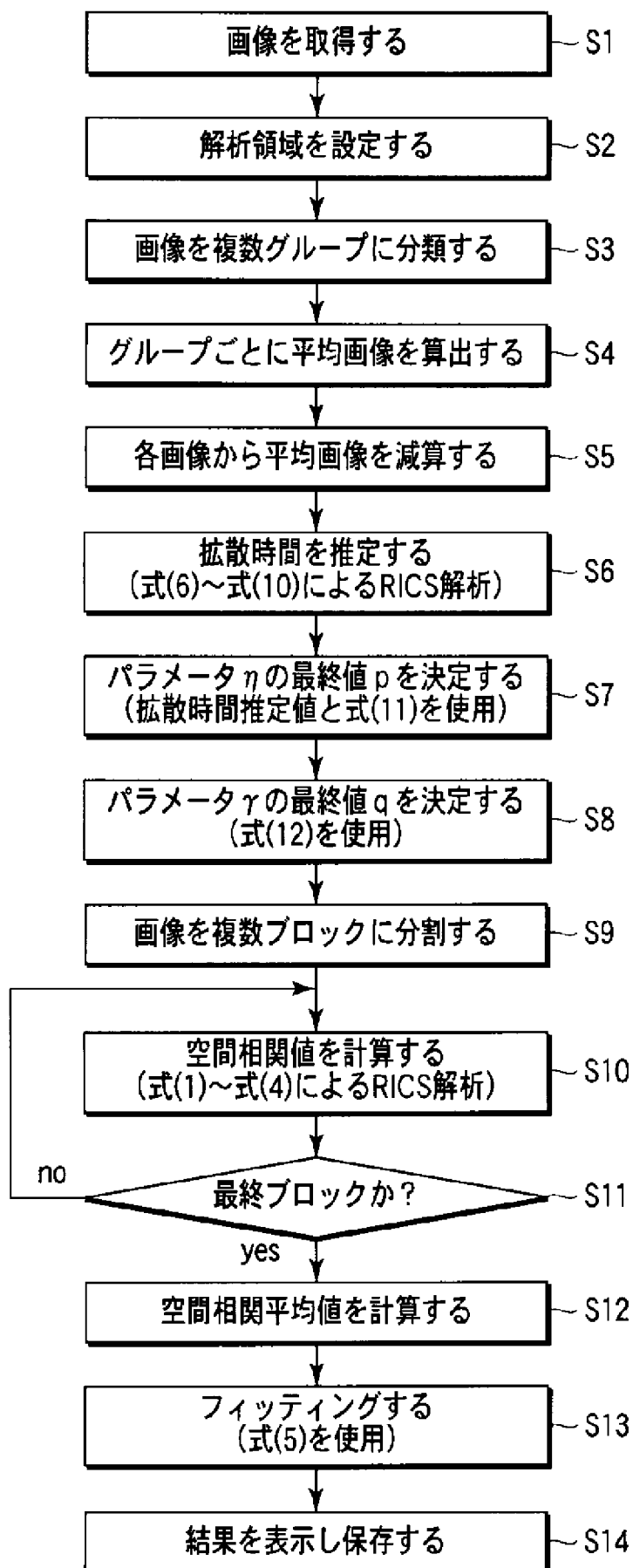
[図1]



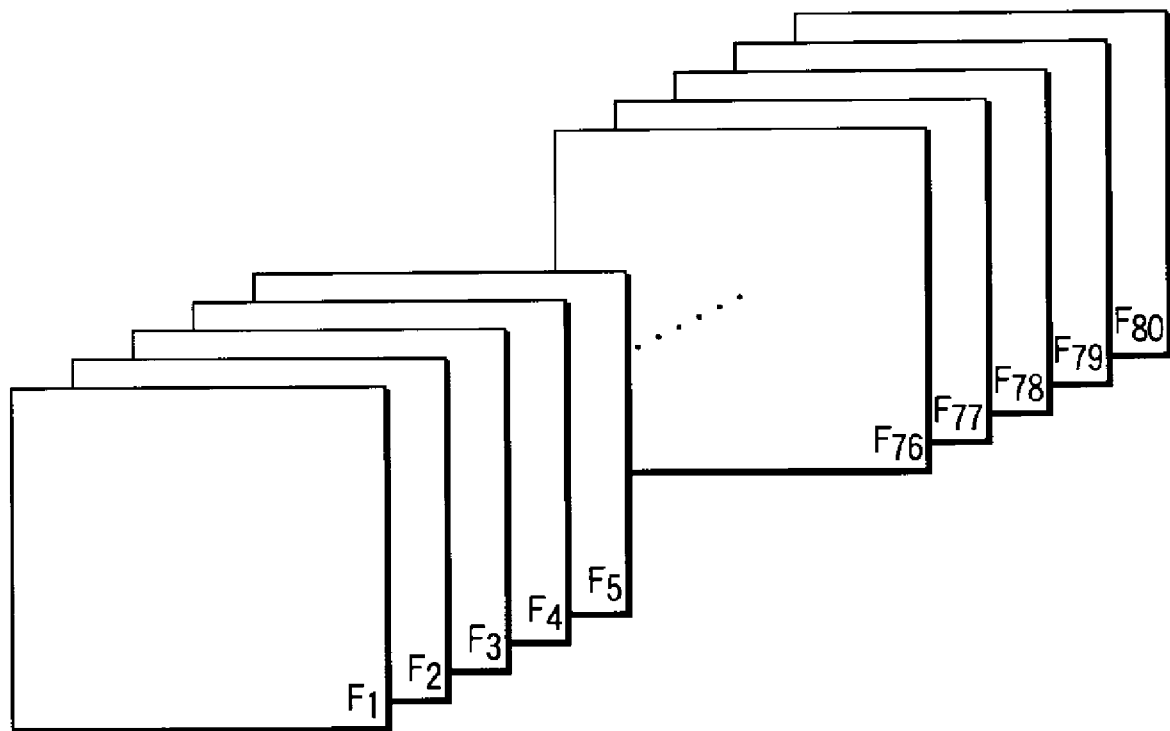
[図2]



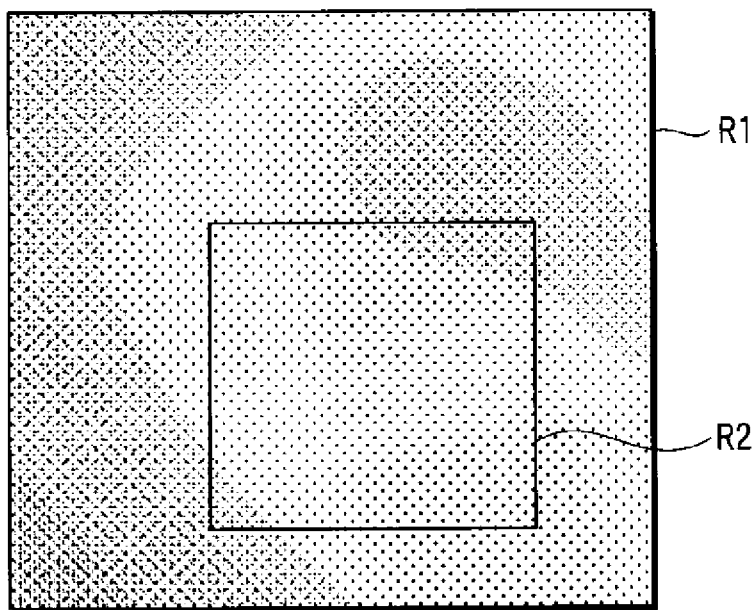
[図3]

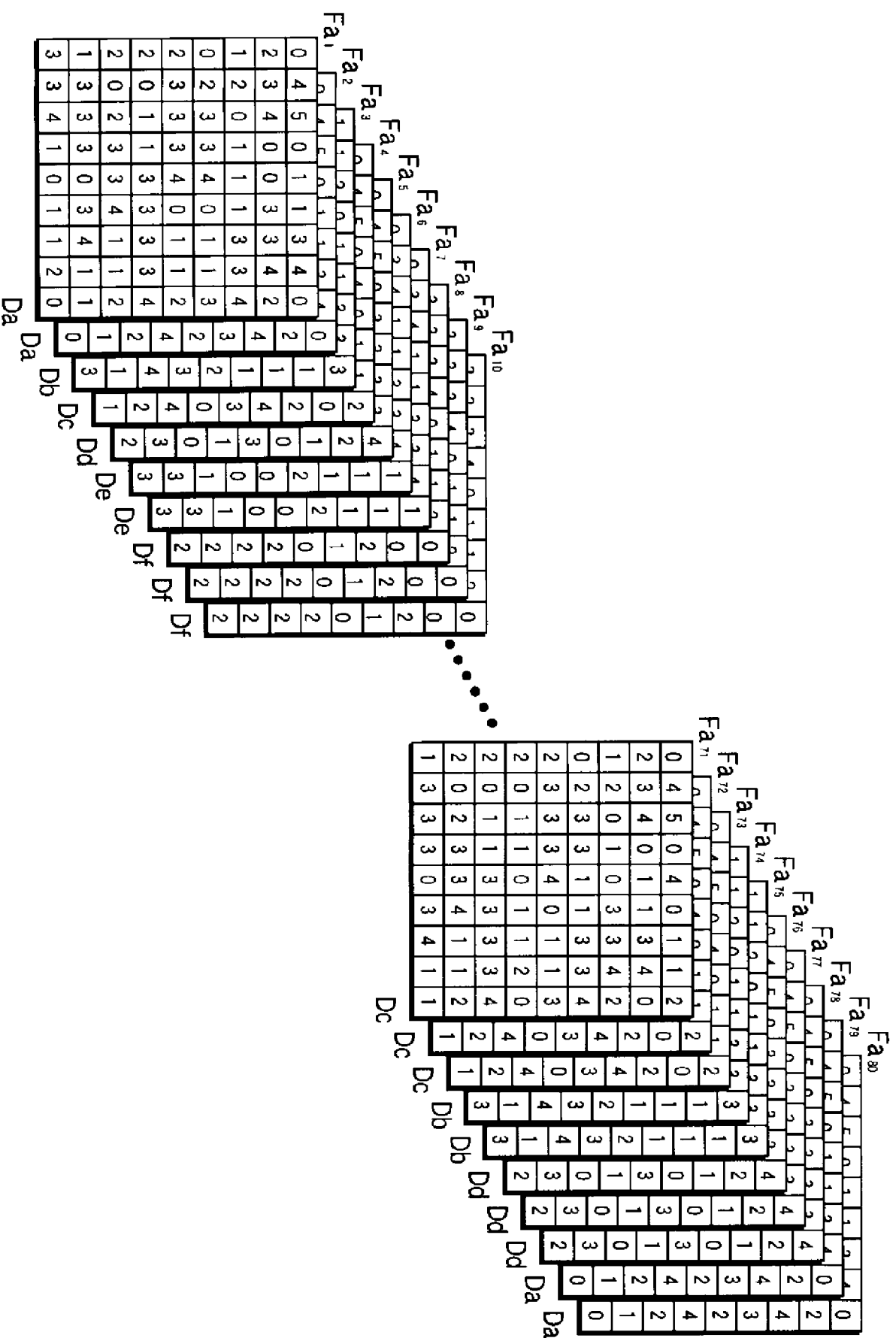


[図4]

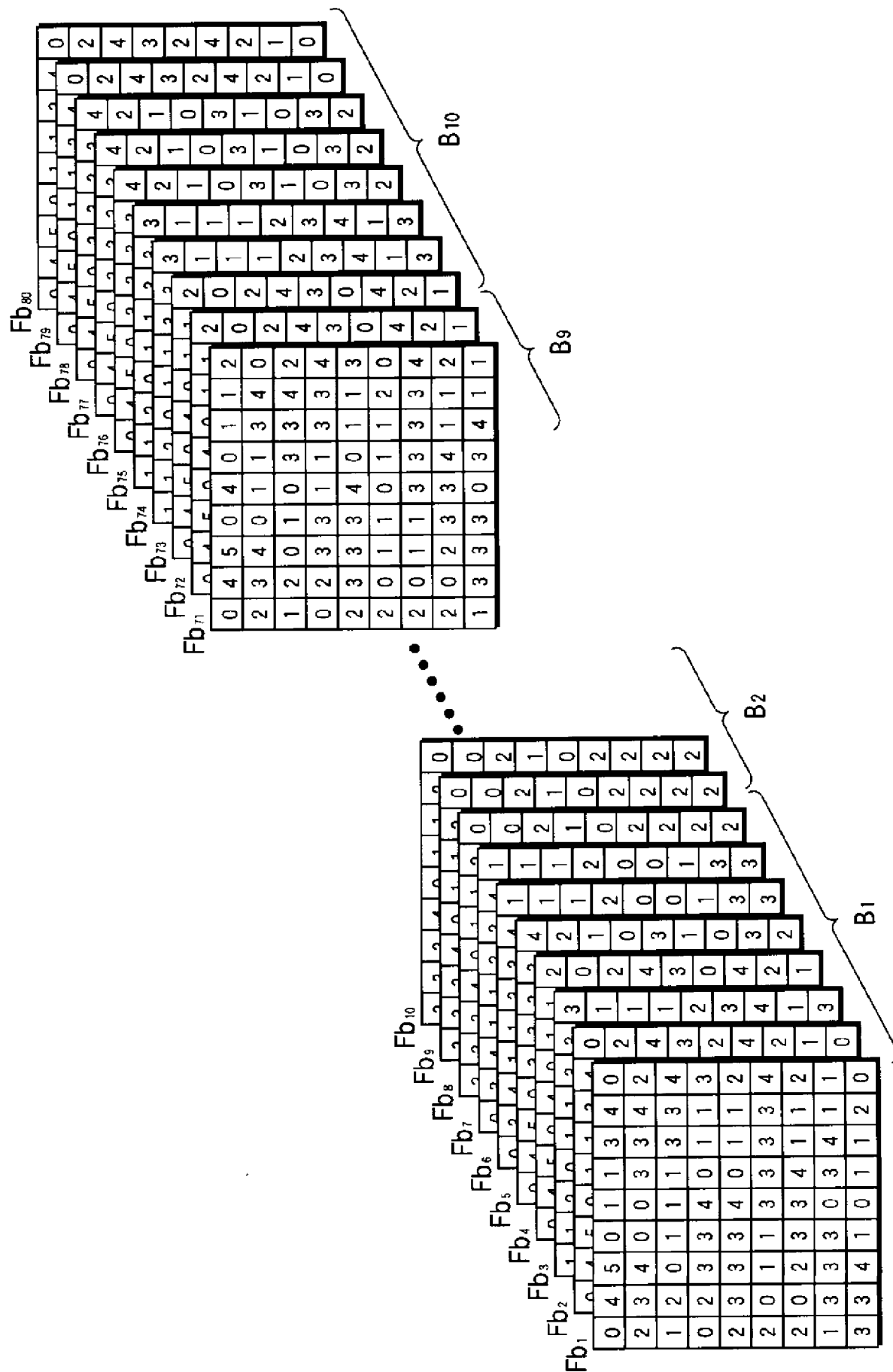


[図5]





[図7]



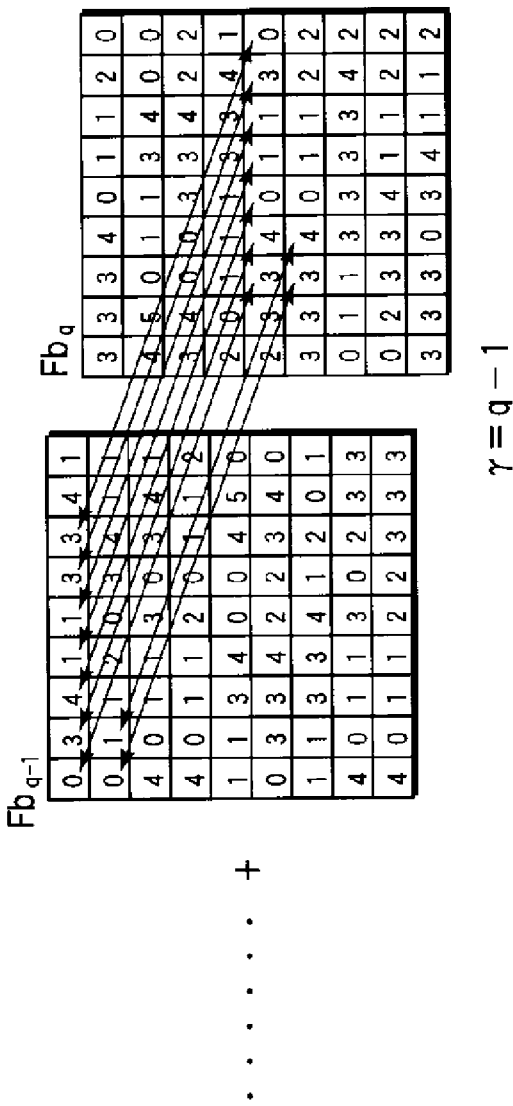
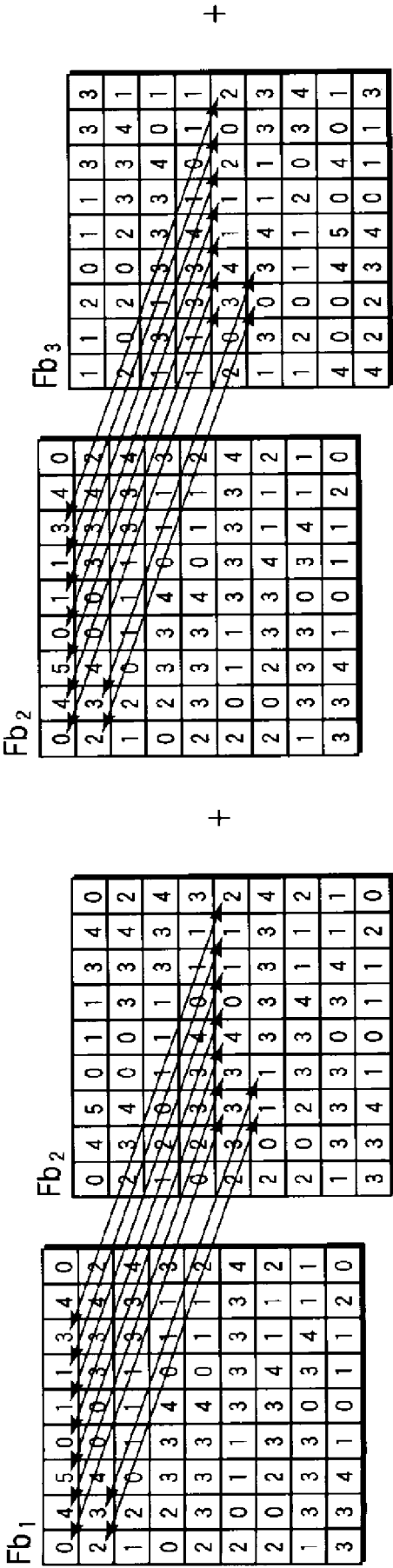
$$\gamma = 1$$

$\gamma = 2$

$\gamma = q$

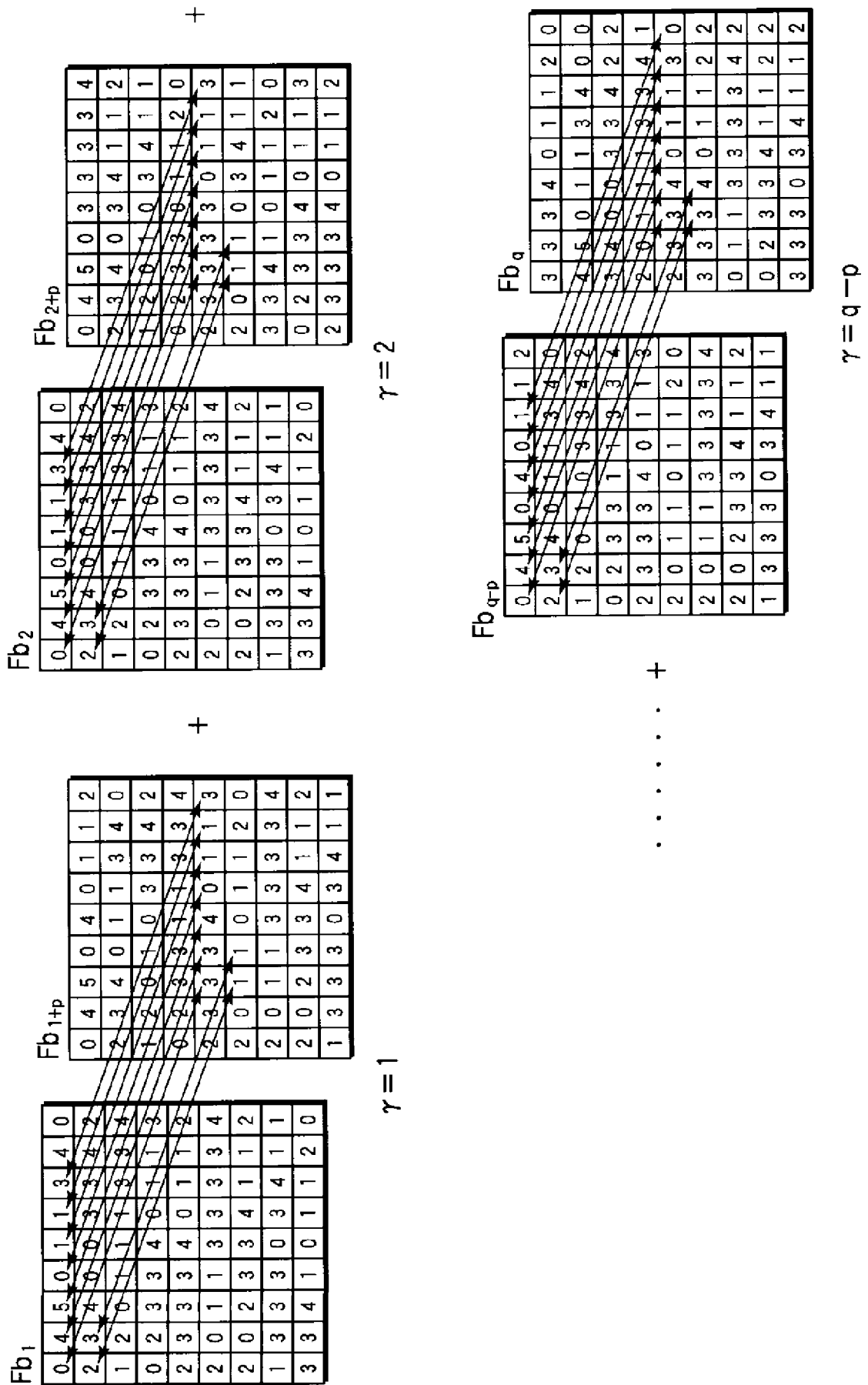
[図9]

$G(2, 4, 1)$ の計算



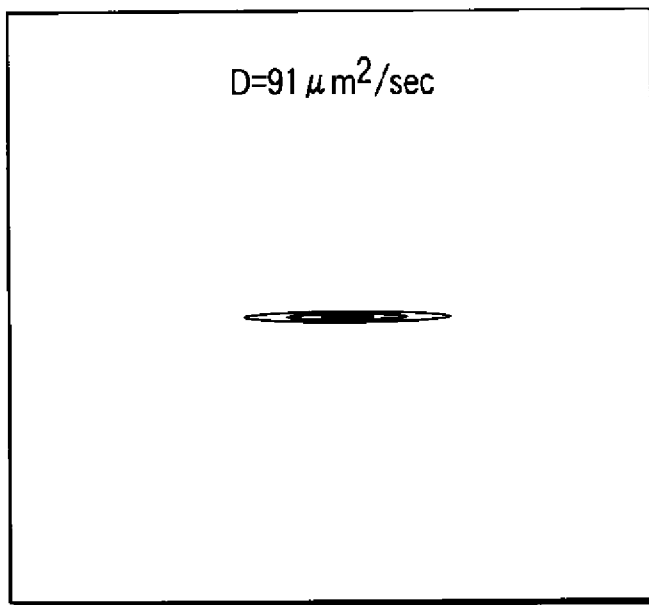
[図11]

G(2, 4, p) の計算

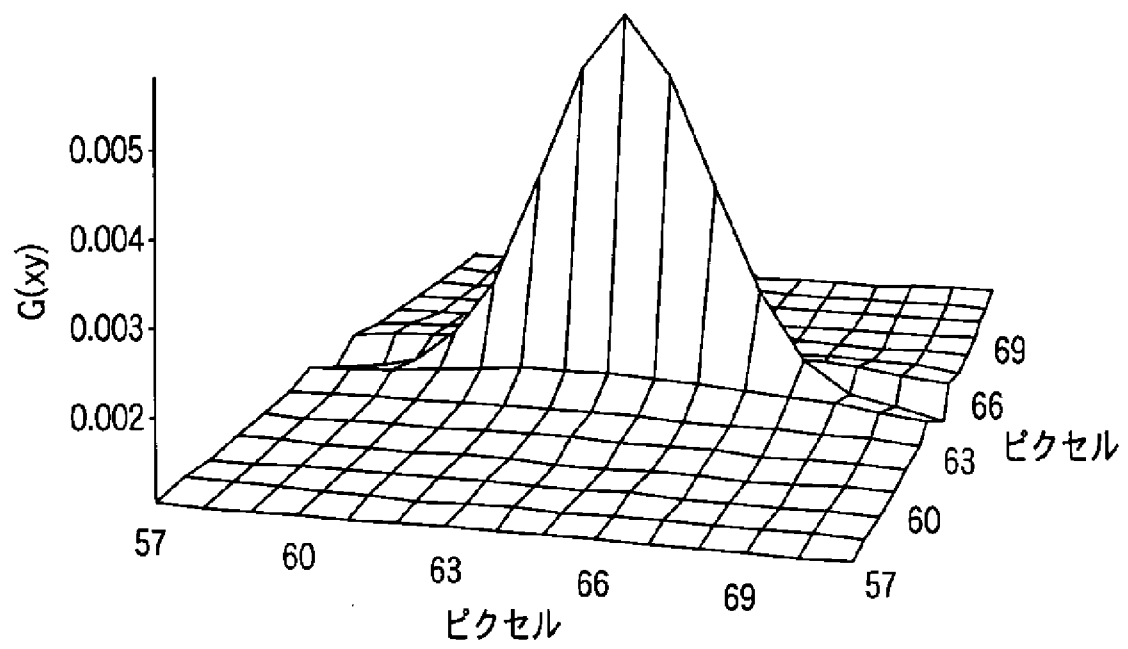


空間相関値 $G(\xi, \psi, \eta)$	ξ	ψ	η	遅延時間 τ	積和計算に使用するフレーム	kの最終値	計算例
$G(0, 0, 0)$	0	0	0	0	Fb_k	q	図 8
$G(1, 0, 0)$	1	0	0	τ_p	Fb_k	q	
.....							
$G(255, 255, 0)$	255	255	0	$255\tau_p + 255\tau_l$	Fb_k	q	
$G(0, 0, 1)$	0	0	1	τ_f	Fb_k と Fb_{k+1}	q-1	図 9
$G(1, 0, 1)$	1	0	1	$\tau_p + \tau_f$	Fb_k と Fb_{k+1}	q-1	
.....							
$G(255, 255, 1)$	255	255	1	$255\tau_p + 255\tau_l + \tau_f$	Fb_k と Fb_{k+1}	q-1	
$G(0, 0, 2)$	0	0	2	$2\tau_f$	Fb_k と Fb_{k+2}	q-2	図 10
$G(1, 0, 2)$	1	0	2	$\tau_p + 2\tau_f$	Fb_k と Fb_{k+2}	q-2	
.....							
$G(255, 255, 2)$	255	255	2	$255\tau_p + 255\tau_l + 2\tau_f$	Fb_k と Fb_{k+2}	q-2	
.....							図 11
$G(0, 0, p)$	0	0	p	$p\tau_f$	Fb_k と Fb_{k+p}	q-p	
$G(1, 0, p)$	1	0	p	$\tau_p + p\tau_f$	Fb_k と Fb_{k+p}	q-p	
.....							
$G(255, 255, p)$	255	255	p	$255\tau_p + 255\tau_l + p\tau_f$	Fb_k と Fb_{k+p}	q-p	

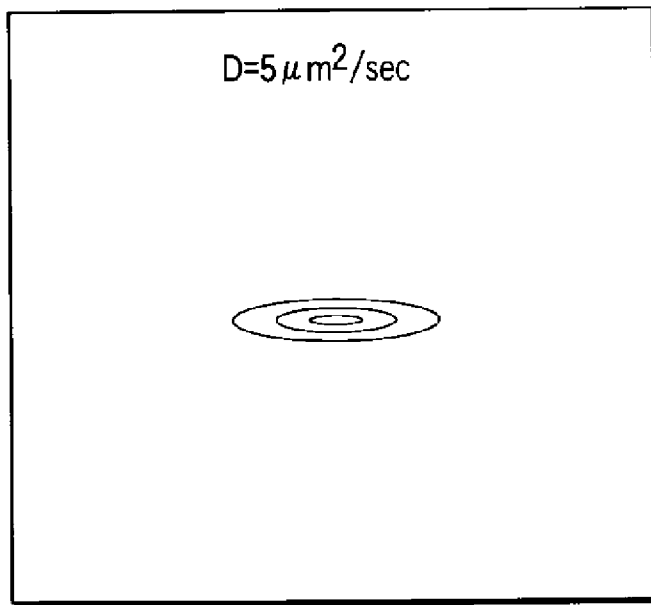
[図13]



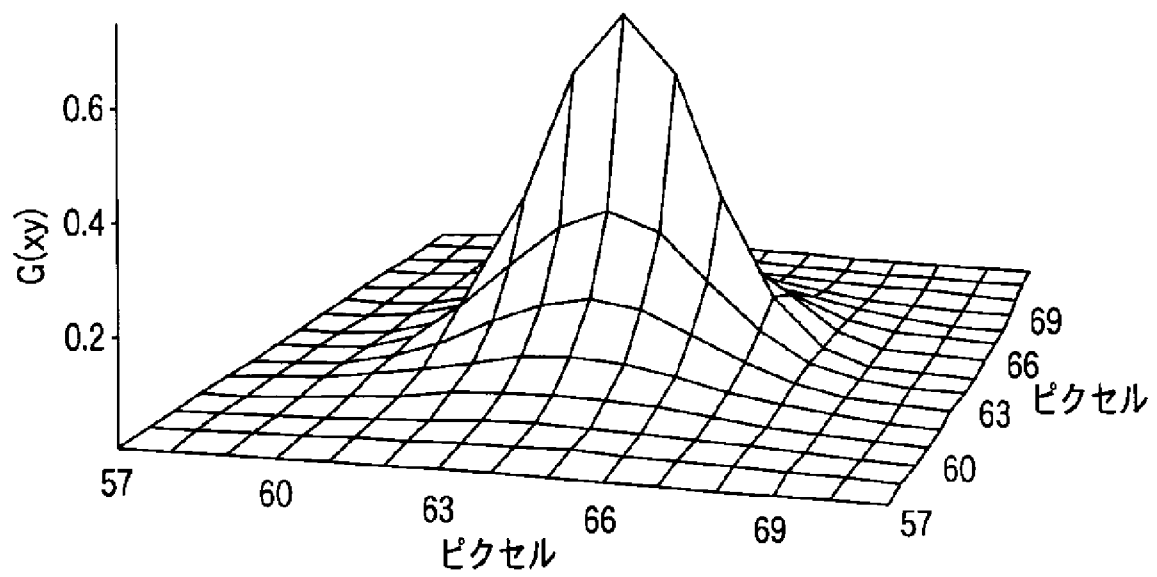
[図14]



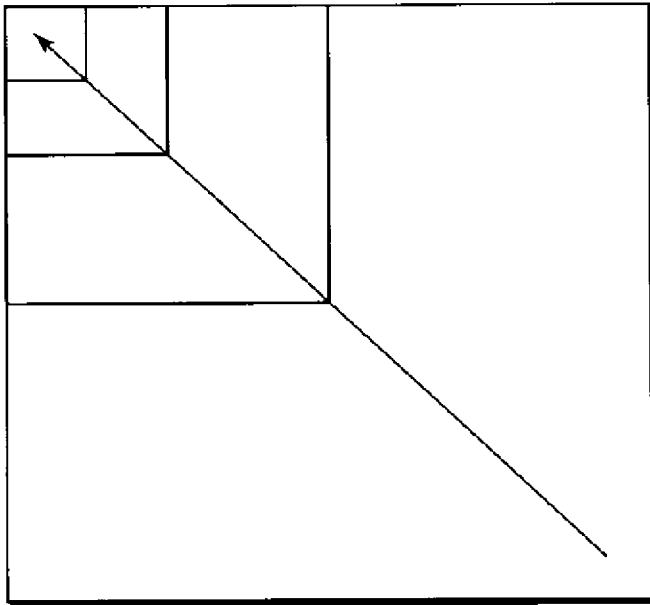
[図15]



[図16]



[図17]



ROI サイズ	D
256	83.9497
128	81.94913
64	80.10671
32	68.03626

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/068192

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01) i, G06T7/20(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)

G01N21/62-74, G06T7/00, G06T7/20-7/60

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 1996-2010

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JMEDPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-108892 A (Olympus Corp.), 08 April 2004 (08.04.2004), claims (Family: none)	1-24
A	JP 2006-78377 A (Olympus Corp.), 23 March 2006 (23.03.2006), claims (Family: none)	1-24
A	JP 2008-276191 A (Olympus Corp.), 13 November 2008 (13.11.2008), claims & US 2008/0290293 A1 & EP 2037309 A2	1-24



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

18 November, 2010 (18.11.10)

Date of mailing of the international search report

30 November, 2010 (30.11.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/068192

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Michelle A. Digman et al., Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope, Biophysical Journal, 2005.08, Vol.89, P1317-1327	1-24
E,X	JP 2010-237116 A (Olympus Corp.), 21 October 2010 (21.10.2010),	1, 4-12, 13, 16-24
E,A	entire text; all drawings (Family: none)	2, 3, 14, 15
P,A	JP 2010-217716 A (Olympus Corp.), 30 September 2010 (30.09.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-24

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, G06T7/20(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. G01N21/62-74, G06T7/00, G06T7/20-7/60

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	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010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)

JMEDPlus(JDreamII)

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
A	JP 2004-108892 A (オリンパス株式会社) 2004.04.08, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-24
A	JP 2006-78377 A (オリンパス株式会社) 2006.03.23, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-24
A	JP 2008-276191 A (オリンパス株式会社) 2008.11.13, 特許請求の範囲 & US 2008/0290293 A1 & EP 2037309 A2	1-24

☒ 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

18.11.2010

国際調査報告の発送日

30.11.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

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 3292

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
A	Michelle A. Digman et al., Measuring Fast Dynamics in Solutions and Cells with a Laser Scanning Microscope, Biophysical Journal, 2005.08, Vol.89, P1317-1327	1-24
E, X	JP 2010-237116 A (オリンパス株式会社) 2010.10.21, 全文、全図 (ファミリーなし)	1, 4-12, 13, 16 -24
E, A		2, 3, 14, 15
P, A	JP 2010-217761 A (オリンパス株式会社) 2010.09.30, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-24