

(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2017-203822

(P2017-203822A)

(43) 公開日 平成29年11月16日 (2017. 11. 16)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
G O 2 B 21/06 (2006.01)	G O 2 B 21/06	2 H O 5 2
G O 2 B 21/36 (2006.01)	G O 2 B 21/36	
G O 2 B 3/06 (2006.01)	G O 2 B 3/06	

審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2016-94159 (P2016-94159)	(71) 出願人	000000376
(22) 出願日	平成28年5月9日 (2016. 5. 9)		オリンパス株式会社
			東京都八王子市石川町2951番地
		(74) 代理人	100074099
			弁理士 大菅 義之
		(72) 発明者	井口 善仁
			東京都八王子市石川町2951番地 オリ
			ンパス株式会社内
		Fターム (参考)	2H052 AA07 AA09 AB01 AC15 AC18
			AC21 AC34 AF14 AF21 AF25

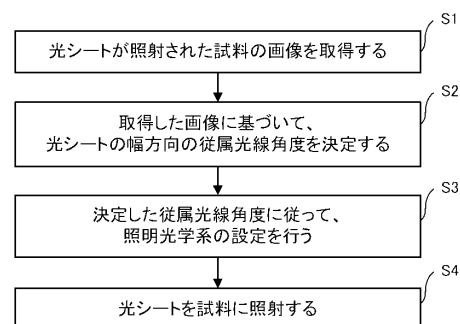
(54) 【発明の名称】 照明設定方法、シート照明顕微鏡装置、及びプログラム

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる技術を提供する。

【解決手段】 照明光学系から出射した光シートが照射された試料の画像を取得する。取得した試料の画像に基づいて、照明光学系から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する。さらに、決定した従属光線角度に従って、照明光学系の設定を行う。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

照明光学系から出射した光シートが照射された試料の画像を取得することと、
取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの幅方向
についての従属光線角度を決定することと、
決定した前記従属光線角度に従って、前記照明光学系の設定を行うことと、を含む
ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の照明設定方法において、
前記試料の画像を取得することは、
前記照明光学系から出射した前記光シートで前記試料を前記光シートの幅方向に走査
することと、
前記照明光学系から出射した光シートが照射された前記試料を撮像装置で撮像するこ
とと、を含む
ことを特徴とする照明設定方法。 10

【請求項 3】

請求項 2 に記載の照明設定方法において、
前記走査することは、前記光シートの主光線の向きを維持しながら前記光シートを前記
幅方向に平行移動することを含む
ことを特徴とする照明設定方法。 20

【請求項 4】

請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項に記載の照明設定方法において、
前記従属光線角度を決定することは、
取得した前記試料の画像に基づいて、前記試料の画像に表れる縞の幅を算出すること
と、
算出した前記縞の幅に基づいて、前記従属光線角度を決定することと、を含む
ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の照明設定方法において、
前記従属光線角度を決定することは、さらに、前記縞の幅を算出することの前に、取得
した前記試料の画像に表れる縞を特定することを含む
ことを特徴とする照明設定方法。 30

【請求項 6】

請求項 4 又は請求項 5 に記載の照明設定方法において、
前記従属光線角度は、算出した前記縞の幅と許容される縞の長さに基づいて算出される
ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 7】

請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項に記載の照明設定方法において、
前記試料の画像を取得することは、前記試料の複数の画像を取得することであり、
前記複数の画像の各々は、異なる前記従属光線角度を有する光シートが照射された前記
試料の画像であり、
前記従属光線角度を決定することは、取得した前記複数の画像を比較することを含み、
前記従属光線角度は、前記複数の画像を比較した結果に基づいて決定される
ことを特徴とする照明設定方法。 40

【請求項 8】

請求項 7 に記載の照明設定方法において、
前記従属光線角度を決定することは、さらに、前記複数の画像を比較する前に、前記試
料の画像に表れる縞を特定することを含み、
前記複数の画像を比較することは、前記複数の画像中の特定された前記縞を含む小領域
を比較することであり、 50

前記従属光線角度は、前記複数の画像中の前記小領域を比較した結果に基づいて決定される

ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 9】

請求項 5 又は請求項 8 に記載の照明設定方法において、

前記縞を特定することは、

前記試料の画像に基づいて、画像信号の強度が既定値以下の領域を特定することと、

特定した前記領域に基づいて、前記縞を特定することと、を含む

ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 10】

10

請求項 5 又は請求項 8 に記載の照明設定方法において、

前記縞を特定することは、

異なる既定の前記従属光線角度を有する光シートが照射された前記試料の複数の画像を比較することと、

前記複数の画像を比較した結果に基づいて、前記縞を特定することと、を含む

ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 11】

請求項 5 又は請求項 8 に記載の照明設定方法において、

前記縞を特定することは、前記試料の画像に対してパターンマッチング処理を行うことを含む

20

ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 12】

請求項 5 又は請求項 8 乃至請求項 11 のいずれか 1 項に記載の照明設定方法において、さらに、

特定された前記縞の位置を表示装置に表示する

ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 13】

照明光学系により光シートが照射された試料の画像を取得することと、

取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの主光線が前記試料に入射する入射角度を決定することと、

30

決定した前記入射角度に従って、前記照明光学系の設定又は前記試料の向きの設定の少なくとも一方を行うことと、を含む

ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 14】

コンピュータが、

照明光学系により光シートが照射された試料の画像を撮像装置から取得することと、

前記撮像装置から取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度を決定することと、

決定した前記従属光線角度に応じた前記照明光学系の設定を指示する制御信号を出力することと、を含む

40

ことを特徴とする照明設定方法。

【請求項 15】

試料に光シートを照射する照明光学系と、

前記照明光学系で光シートが照射された前記試料の画像を取得する撮像装置と、

前記撮像装置で取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する制御装置と、

前記制御装置で決定した前記従属光線角度に従って、前記照明光学系の設定を行う設定装置と、を備える

ことを特徴とするシート照明顕微鏡装置。

【請求項 16】

50

請求項 15 に記載のシート照明顕微鏡装置において、
前記照明光学系は、

前記光シートで前記試料を前記光シートの幅方向に走査するスキャナと、

前記スキャナが前記光シートの幅方向の前側焦点位置に位置するように配置された、
前記スキャナで偏向された光を前記試料に照射する走査光学系と、を備える
ことを特徴とするシート照明顕微鏡装置。

【請求項 17】

請求項 15 又は請求項 16 に記載のシート照明顕微鏡装置において、
前記制御装置は、

前記撮像装置で取得した前記試料の画像に基づいて、前記試料の画像に表れる縞の幅
を算出する幅算出手段と、 10

前記幅算出手段で算出した前記縞の幅に基づいて、前記従属光線角度を決定する角度
決定手段と、

前記角度決定手段で決定した前記従属光線角度に応じた前記照明光学系の設定を指示
する制御信号を前記設定装置へ出力する出力手段と、を含む
ことを特徴とするシート照明顕微鏡装置。

【請求項 18】

請求項 15 又は請求項 16 に記載のシート照明顕微鏡装置において、
前記制御装置は、

前記撮像装置で取得した、各々が異なる前記従属光線角度を有する光シートが照射さ
れた前記試料の画像である、前記試料の複数の画像を比較手段と、 20

前記比較手段で比較した結果に基づいて、前記従属光線角度を決定する角度決定手段
と、

前記角度決定手段で決定した前記従属光線角度に応じた前記照明光学系の設定を指示
する制御信号を前記設定装置へ出力する出力手段と、を含む
ことを特徴とするシート照明顕微鏡装置。

【請求項 19】

コンピュータに、

照明光学系により光シートが照射された試料の画像を撮像装置から取得する処理と、

前記撮像装置から取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される
光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する処理と、 30

決定した前記従属光線角度に応じた前記照明光学系の設定を指示する制御信号を出力す
る処理と、を実行させる
ことを特徴とするプログラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の開示は、照明設定方法、シート照明顕微鏡装置、及びプログラムに関する。

【背景技術】

【0002】

蛍光顕微鏡の分野では、検出光学系の光軸に直交する方向から試料にレーザ光を照射し
て、試料中に検出光学系の光軸と直交する光シートを形成する技術が知られている。この
技術は、試料に与えるダメージを抑えることができる、高い縦分解能を実現できるなどの
メリットがあり、近年、注目を集めている。

【0003】

上記の技術では、試料を検出光学系の光軸方向とは異なる方向から照明するため、試料
中に吸収により光が透過しにくい部分や光が散乱する部分（以降、これらをまとめて遮光
部分と記す）が含まれている場合には、その遮光部分の後方に光が入射せず、視野内に縞
状の影ができてしまう。

【0004】

関連技術は、例えば、特許文献 1 に記載されている。特許文献 1 には、ウォブル板やスイング・ミラーの振動運動により、時間によって異なる角度で標本物質にシート光の放射成分を照射する技術が記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特開 2008-250303 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

10

縞を効果的に抑制し得る照明設定は、縞の原因物質（つまり、遮光部分）の大きさによって異なる。縞を抑制する効果（以降、縞消し効果と記す）に着目すると、大きな原因物質が存在するほど大きな角度で試料が照明されるように、照明設定を行うことが望ましい。一方で、照明設定は基本的な照明性能にも当然に影響する。例えば、大きな角度で試料を照明するほど、照明効率、照明の均一性などが低下する傾向にある。従って、照明設定は、照明性能と縞消し効果のバランスを取りながら、観察対象に応じて適宜設定されることが望ましい。

【0007】

以上のような実情を踏まえ、本発明の一側面は、光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる技術を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の一側面に係る照明設定方法は、照明光学系から出射した光シートが照射された試料の画像を取得することと、取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度を決定することと、決定した前記従属光線角度に従って、前記照明光学系の設定を行うことを含む。

【0009】

本発明の別の側面に係る照明設定方法は、照明光学系により光シートが照射された試料の画像を取得することと、取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの主光線が前記試料に入射する入射角度を決定することと、決定した前記入射角度に従って、前記照明光学系の設定又は前記試料の向きの設定の少なくとも一方を行うことを含む。

30

【0010】

本発明の更に別の側面に係る照明設定方法は、コンピュータが、照明光学系により光シートが照射された試料の画像を撮像装置から取得し、前記撮像装置から取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度を決定し、決定した前記従属光線角度に応じた前記照明光学系の設定を指示する制御信号を出力する。

【0011】

本発明の更に別の側面に係るシート照明顕微鏡装置は、試料に光シートを照射する照明光学系と、前記照明光学系で光シートが照射された前記試料の画像を取得する撮像装置と、前記撮像装置で取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する制御装置と、前記制御装置で決定した前記従属光線角度に従って、前記照明光学系の設定を行う設定装置と、を備える。

40

【0012】

本発明の更に別の側面に係るプログラムは、コンピュータに、照明光学系により光シートが照射された試料の画像を撮像装置から取得する処理と、前記撮像装置から取得した前記試料の画像に基づいて、前記照明光学系から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する処理と、決定した前記従属光線角度に応じた前記照明光学系の設定を指示する制御信号を出力する処理と、を実行させる。

50

【発明の効果】

【0013】

本発明の一側面によれば、光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】第1の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置の概略構成を例示した図である。

【図2】第1の実施形態に係る照明処理の手順を示すフローチャートである。

【図3】従属光線角度が小さな光シートを照射するときの走査範囲を例示した図である。

【図4】従属光線角度が大きな光シートを照射するときの走査範囲を例示した図である。

10

【図5A】第1の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置と照明光束を光シートの厚さ方向から見た図である。

【図5B】第1の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置と照明光束を光シートの幅方向から見た図である。

【図6】第1の実施形態に係る制御装置のハードウェアの構成を例示した図である。

【図7】第1の実施形態に係る制御装置の機能構成を例示した図である。

【図8】第1の実施形態に係る照明設定処理の手順を示すフローチャートである。

【図9】第1の実施形態に係る画像取得処理の手順を示すフローチャートである。

【図10】第2の実施形態に係る制御装置の機能構成を例示した図である。

【図11】第2の実施形態に係る照明設定処理の手順を示すフローチャートである。

20

【図12】第2の実施形態に係る照明設定処理の別の手順を示すフローチャートである。

【図13】第2の実施形態に係る幅算出処理の別の手順を示すフローチャートである。

【図14】第3の実施形態に係る制御装置の機能構成を例示した図である。

【図15】第3の実施形態に係る照明設定処理の手順を示すフローチャートである。

【図16】第3の実施形態に係る縞特定処理の手順を示すフローチャートである。

【図17】第3の実施形態に係る縞特定処理の別の手順を示すフローチャートである。

【図18】第4の実施形態に係る制御装置の機能構成を例示した図である。

【図19】第4の実施形態に係る照明設定処理の手順を示すフローチャートである。

【図20】第5の実施形態に係る制御装置の機能構成を例示した図である。

【図21】第5の実施形態に係る照明設定処理の手順を示すフローチャートである。

30

【図22】第5の実施形態に係る照明設定処理中に表示される画面例を示した図である。

【図23A】第6の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置と照明光束を光シートの厚さ方向から見た図である。

【図23B】第6の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置と照明光束を光シートの幅方向から見た図である。

【図24】第6の実施形態に係る照明設定処理の手順を示すフローチャートである。

【図25】第6の実施形態に係る入射角決定処理の手順を示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

[第1の実施形態]

40

図1は、第1の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置1の概略構成を例示した図である。シート照明顕微鏡装置1は、例えば、生体標本などの試料Sからの蛍光を検出する蛍光顕微鏡であり、光シートで試料Sを照明するように構成されている。

【0016】

シート照明顕微鏡装置1は、試料Sに光シートを照射する照明光学系10と、試料Sからの検出光（例えば、蛍光）を撮像装置30へ導く検出光学系20と、試料Sの画像を取得する撮像装置30と、シート照明顕微鏡装置1を制御する制御装置40と、照明光学系10の設定を行う設定装置60を備えている。試料Sは、照明光学系10の光軸と検出光学系20の光軸が交わる位置の辺りに配置される。

【0017】

50

照明光学系 10 は、検出光学系 20 の光軸と略直交するシート形状を有する光シートを形成し、その光シートを検出光学系 20 の光軸と略直交する方向から試料 S に照射するように構成されている。照明光学系 10 の詳細については、後述する。

【0018】

ここで、光シートとは、シート形状の照明領域を形成する照明光のことである。シート形状とは、照明光の進行方向（照明光学系 10 の射出側の光軸方向）に対して直交する照明光の断面（以降、光束断面と記す）が、互いに直交する一方向に長く他方向に短い二次元形状を有する形状をいう。以降では、光束断面内での長さが長い方向を光シートの幅方向、短い方向を光シートの厚さ方向と記す。また、検出光学系 20 の光軸と略直交するシート形状とは、進行方向と幅方向で定義される光シート面が検出光学系 20 の光軸と略直交するようなシート形状をいう。また、略直交するとは、直交した状態から当業者が設定上又は製造上の誤差と認識し得るような範囲をいう。本実施形態では、進行方向は x 軸方向、幅方向は y 軸方向、厚さ方向は z 軸方向と定義する。この点は他の実施形態でも同様である。

【0019】

検出光学系 20 は、試料 S からの光（例えば、蛍光など。以降、検出光と記す）を集光して、試料 S の光学像を撮像装置 30 の受光面に形成する光学系である。撮像装置 30 は、CCD（Charge Coupled Device）、CMOS（Complementary Metal Oxide Semiconductor）などの二次元イメージセンサを備えたデジタルカメラであり、照明光学系 10 によって光シートが照射された試料 S の画像を取得し、試料 S の画像データを制御装置 40 へ出力する。

【0020】

制御装置 40 は、シート照明顕微鏡装置 1 を制御する顕微鏡コントローラである。制御装置 40 は、シート照明顕微鏡装置 1 の顕微鏡本体に設けられた各種電動機構に制御信号を出力するように構成されている。設定装置 60 は、制御装置 40 からの制御信号に従って動作する顕微鏡本体の電動機構の一つであり、照明光学系 10 の設定を行う装置である。

図 2 は、第 1 の実施形態に係る照明処理の手順を示すフローチャートである。図 2 を参照しながら、シート照明顕微鏡装置 1 が行う照明処理について概説する。

【0021】

シート照明顕微鏡装置 1 は、まず、照明光学系 10 から出射した光シートが照射された試料 S の画像を取得する（ステップ S1）。ここでは、照明光学系 10 が試料 S に光シートを照射し、撮像装置 30 が試料 S を撮像し試料 S の画像データを生成する。生成された試料 S の画像データは、制御装置 40 へ出力される。

【0022】

次に、シート照明顕微鏡装置 1 は、取得した画像に基づいて、光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する（ステップ S2）。なお、従属光線角度とは、照明光学系 10 の射出側の光軸と照明光学系 10 から出射した光シートの従属光線とがなす最大角度のことである。また、幅の方向についての従属光線角度とは、光シートの幅方向と進行方向を含む断面における従属光線角度のことである。

【0023】

光シート照明では、試料 S が照明領域内に遮光部分を有していると、その後方に縞状の影ができてしまう。しかしながら、光シートの従属光線角度が 0 度以上であれば、遮光部分の後方の領域に光が回り込むことができるため、縞状の影を抑制することができる。そして、光シートが大きな従属光線角度を有しているほど、遮光部分により近い領域にまで光が回り込むことができるため、縞状の影をより効果的に抑制することができる。

【0024】

一方で、図 3 及び図 4 に示すように、観察範囲 R に対して均一な照明を実現するためには、従属光線角度が大きな光シート L2 を照射する場合には、従属光線角度が小さな光シート L1 を照射する場合に比べて、走査幅が広がってしまう。このため、照明効率が低

10

20

30

40

50

下し、画像取得に時間がかかってしまう。

【0025】

従って、従属光線角度は、縞消し効果と照明性能とのバランスを考慮して決定されることが望ましく、縞消し効果を重視する場合であっても、縞状の影を観察者が許容できる程度に抑制する限りにおいて、小さな角度に設定することが望ましい。

【0026】

ただし、縞状の影の大きさは遮光部分の大きさによって異なり、遮光部分の大きさは試料（より詳細には、試料中の観察部分）によって異なる。このため、観察者の要求を満たすことができる従属光線角度も、試料に応じて異なる。そこで、ステップS2では、制御装置40が、撮像装置30で取得した光シートが照射された試料Sの画像に基づいて、照明光学系10から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する。さらに、制御装置40は、決定した従属光線角度に応じた照明光学系10の設定を指示する制御信号を、設定装置60に出力する。なお、従属光線角度の決定方法の詳細については後述する。

【0027】

従属光線角度が決定されると、シート照明顕微鏡装置1は、決定した従属光線角度に従って、照明光学系10の設定を行い（ステップS3）、光シートを試料に照射する（ステップS4）。ここでは、設定装置60が、制御装置40から出力された制御信号に従って、照明光学系10の設定を行う。即ち、設定装置60は、制御装置40で決定した従属光線角度に従って、照明光学系10の設定を行う。

【0028】

シート照明顕微鏡装置1によれば、画像に基づいて従属光線角度を決定することで、照明性能の低下を抑制しつつ十分な縞消し効果を得る設定を行うことができる。また、制御装置40が画像に基づいて従属光線角度を決定し、設定装置60が決定した従属光線角度に従って設定を行うため、顕微鏡操作に不慣れな利用者であっても、適切な設定を容易に行うことができる。

【0029】

以下、図5Aから図9を参照しながら、本実施形態について更に詳細に説明する。図5A及び図5Bは、シート照明顕微鏡装置1の構成を例示した図である。図5A、図5Bには、光シートの厚さ方向（z軸方向）、幅方向（y軸方向）から見たシート照明顕微鏡装置1と照明光束とが示されている。

【0030】

シート照明顕微鏡装置1は、上述した、照明光学系10、検出光学系20、撮像装置30、制御装置40、及び設定装置60に加えて、制御装置40に接続された表示装置51、及び入力装置（キーボード52、マウス53）を備えている。

【0031】

照明光学系10は、レーザ11を備えている。レーザ11は、光シートに変換されるレーザ光（照明光）を出射する光源である。照明光学系10は、さらに、レーザ11側から順に、第1の光学系12と、スキャナ16と、走査光学系17を備えている。

【0032】

第1の光学系12は、レーザ11とスキャナ16との間に配置された、レーザ光をスキャナ16に照射する光学系である。第1の光学系12は、レンズ13、レンズ14、シリンドリカルレンズ15を含んでいる。シリンドリカルレンズ15は、光軸方向に移動自在に配置された移動レンズであり、xy平面内で屈折力を有し、xz平面内で屈折力を有しないように配置されている。

【0033】

スキャナ16は、光シートで試料Sを光シートの幅方向に走査する走査手段であり、例えば、ガルバノミラー、レゾナントミラーなどの、光を偏向させる偏向面を有する回転自在なミラーである。また、スキャナ16は、例えば、AOD（Acousto-optic deflector）、EOD（Electro-optic deflector）であってもよい。なお、図5A及び図5Bでは

、図面を簡略化するために、スキャナ 16 で偏向される前後の光の光路上の光学素子を一直線上に並べて記載している。

【0034】

走査光学系 17 は、シリンドリカルレンズ 18 とシリンドリカルレンズ 19 とを含み、スキャナ 16 で偏向された光を試料に照射する。シリンドリカルレンズ 18 は、 $x y$ 平面内で屈折力を有し、 $x z$ 平面内で屈折力を有しないように配置されている。シリンドリカルレンズ 19 は、 $x z$ 平面内で屈折力を有し、 $x y$ 平面内で屈折力を有しないように配置されている。即ち、シリンドリカルレンズ 18 とシリンドリカルレンズ 19 は、シリンドリカルレンズ 18 が屈折力を有する平面とシリンドリカルレンズ 19 が屈折力を有する平面とが互いに直交するように配置されている。また、シリンドリカルレンズ 19 は、シリンドリカルレンズ 19 の後側焦点位置が検出光学系 20 の視野の範囲内に位置するように配置されることが望ましく、検出光学系 20 の光軸上に位置するように配置されることがさらに望ましい。

10

【0035】

走査光学系 17 は、さらに、スキャナ 16 が走査光学系 17 の光シート面 ($x y$ 平面) における前側焦点位置に位置するように、配置されている。これは、スキャナ 16 が走査光学系 17 の最も物体側に配置されているシリンドリカルレンズ 18 の前側焦点位置に位置するように、走査光学系 17 が配置されている、と言い換えることができる。なお、シリンドリカルレンズ 18 の前側焦点位置とは、試料側からシリンドリカルレンズ 18 に平行光束を入射したときに光が直線状に集光する位置のことである。

20

【0036】

検出光学系 20 は、試料 S 側から順に、対物レンズ 21 と、波長選択素子 22 と、結像レンズ 23 を含んでいる。波長選択素子 22 は、例えば、レーザ光が撮像装置 30 に入射することを防止するためのバリアフィルタである。

【0037】

設定装置 60 は、照明光学系 10 の設定を行う装置であり、具体的には、シリンドリカルレンズ 15 の光軸方向の位置を変更する装置である。設定装置 60 は、シリンドリカルレンズ 15 をシリンドリカルレンズ 15 の光軸方向に動かす構造として、ボールネジ 61、ボールネジ 61 に螺合したナット 62、シリンドリカルレンズ 15 を保持する保持部 63、及び、ボールネジ 61 を回転させるモータ 64 を備える。設定装置 60 がシリンドリカルレンズ 15 を光軸方向に移動することで、第 1 の光学系 12 の焦点距離が変化し、図 5 A に示すように、照明光学系 10 から出射される光シートの幅方向についての従属光線角度が変化する。

30

【0038】

以上のように構成されたシート照明顕微鏡装置 1 では、レーザ 11 から出射したレーザ光は、レンズ 13 及びレンズ 14 で光束径 (ビーム径) が調整された後、シリンドリカルレンズ 15 を介してスキャナ 16 に入射する。その後、スキャナ 16 で偏向されたレーザ光は、シリンドリカルレンズ 18 及びシリンドリカルレンズ 19 を介して試料 S に照射される。

【0039】

シリンドリカルレンズ 15 及びシリンドリカルレンズ 18 は、 $x z$ 平面内においては、屈折力を有しないためレーザ光に対して実質的に作用しない。また、幅方向に光を偏向するスキャナ 16 も、 $x z$ 平面内においてはレーザ光に対して実質的に作用しない。このため、図 5 B に示すように、幅方向 (y 軸方向) から見たとき、レーザ光は、シリンドリカルレンズ 15 の位置及びスキャナ 16 の振り角によらず、シリンドリカルレンズ 19 によって一定の位置に集光する。

40

【0040】

また、シリンドリカルレンズ 15 及びシリンドリカルレンズ 18 は、 $x y$ 平面内においては屈折力を有している。このため、図 5 A に示すように、厚さ方向 (z 軸方向) から見たとき、レーザ光は、シリンドリカルレンズ 15 の位置に応じて幅方向について異なる従

50

属光線角度を有する状態でシリンドリカルレンズ 18 から出射し、シリンドリカルレンズ 19 を介して試料 S に照射される。ただし、スキャナ 16 がシリンドリカルレンズ 18 の前側焦点位置に配置されているため、レーザ光の主光線の方向は、スキャナ 16 の角度によらず一定である。

【0041】

従って、シート照明顕微鏡装置 1 によれば、シリンドリカルレンズ 15 の位置に応じて光シートの幅の方向についての従属光線角度を変更することができる。また、主光線の方向を維持しながら試料を走査することができるため、照明範囲を均一に照明することができる。

【0042】

図 6 は、制御装置 40 のハードウェアの構成を例示した図である。制御装置 40 は、例えば、標準的なコンピュータであり、プロセッサ 41、メモリ 42、入出力インターフェース 43、ストレージ 44、及び、可搬記録媒体 46 が挿入される可搬記録媒体駆動装置 45 を備え、これらがバス 47 によって相互に接続されている。なお、図 6 は、制御装置 40 のハードウェア構成の一例であり、制御装置 40 はこの構成に限定されるものではない。

【0043】

プロセッサ 41 は、例えば、CPU (Central Processing Unit)、MPU (Micro Processing Unit)、DSP (Digital Signal Processor) などであり、プログラムを実行してプログラムされた処理を行う。メモリ 42 は、例えば、RAM (Random Access Memory) であり、プログラムの実行の際に、ストレージ 44 または可搬記録媒体 46 に記録されているプログラムまたはデータを一時的に記憶する。

【0044】

入出力インターフェース 43 は、制御装置 40 以外の装置（例えば、撮像装置 30、表示装置 51、設定装置 60 など）と信号をやり取りする回路である。ストレージ 44 は、例えば、ハードディスク、フラッシュメモリであり、主に各種データやプログラムの記録に用いられる。可搬記録媒体駆動装置 45 は、光ディスクやコンパクトフラッシュ（登録商標）等の可搬記録媒体 46 を収容するものである。可搬記録媒体 46 は、ストレージ 44 を補助する役割を有する。

【0045】

図 7 は、制御装置 40 の機能構成を例示した図である。制御装置 40 は、画像取得手段 40a、画像比較手段 40b、角度決定手段 40c、出力手段 40d を備える。これらの手段の少なくとも 1 つは、ストレージ 44 又は可搬記録媒体 46 に記録されているプログラムをプロセッサ 41 がメモリ 42 にロードして実行することで、メモリ 42 上に構成されてもよい。または、これらの手段の少なくとも 1 つは、例えば、FPGA (Field-Programmable Gate Array)、ASIC (Application Specific Integrated Circuit) などの集積回路などのハードウェアで構成されてもよい。

【0046】

画像取得手段 40a は、撮像装置 30 で取得した試料の画像を撮像装置 30 から取得する。画像比較手段 40b は、撮像装置 30 で取得した試料の複数の画像を比較する。角度決定手段 40c は、画像比較手段 40b で比較した結果に基づいて、光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する。出力手段 40d は、角度決定手段 40c で決定した従属光線角度に応じた照明光学系 10 の設定を指示する制御信号を設定装置 60 へ出力する。

【0047】

図 8 は、照明設定処理の手順を示すフローチャートである。図 9 は、画像取得処理の手順を示すフローチャートである。以下、図 8 及び図 9 を参照しながら、シート照明顕微鏡装置 1 で行われる照明設定処理について具体的に説明する。

【0048】

シート照明顕微鏡装置 1 は、まず、照明光学系 10 から出射する光シートの従属光線角

10

20

30

40

50

度の初期設定を行う（ステップ S 1 0 0）。ここでは、光シートの幅方向についての従属光線角度が既定の角度になるように、制御装置 4 0 が設定装置 6 0 へ制御信号を出力し、設定装置 6 0 が制御信号に従って照明光学系 1 0 の設定を行う。既定の角度は、遮光部分の後方に縞が生じるような角度であればよく、例えば、従属光線が光軸と平行になる 0 度である。

【0049】

次に、シート照明顕微鏡装置 1 は、ステップ S 1 0 0 で行った設定で、試料 S の画像を取得する（ステップ S 1 1 0）。この画像取得処理では、図 9 に示すように、シート照明顕微鏡装置 1 は、スキャナ 1 6 を用いて試料 S を照明光学系 1 0 から出射した光シートで光シートの幅方向に走査し（ステップ S 1 1 1）、光シートが照射された試料 S を撮像装置 3 0 で撮像する（ステップ S 1 1 2）。これにより、撮像装置 3 0 が試料 S の画像データを生成し、制御装置 4 0 へ出力し、制御装置 4 0 が試料 S の画像を取得する。ここで取得される画像は、均一な明るさに照明された試料 S の画像である。これは、スキャナ 1 6 が走査光学系 1 7 の前側焦点位置に配置されているため、走査期間中、光シートの主光線の向きが維持されて光シートが幅方向に平行移動するからである。

【0050】

その後、シート照明顕微鏡装置 1 は、光シートの従属光線角度の設定を変更し（ステップ S 1 2 0）、変更後の設定で試料 S の画像を取得する（ステップ S 1 3 0）。ステップ S 1 2 0 では、従属光線角度が現在設定されている角度（以降、現在角度）とは異なる角度になるように、制御装置 4 0 が設定装置 6 0 へ制御信号を出力し、設定装置 6 0 が制御信号に従って照明光学系 1 0 の設定を行う。ステップ S 1 2 0 で設定する角度は、縞が現在と同じ又は現在よりも小さくなるような角度であればよく、例えば、現在角度よりも既定値だけ大きな角度に設定してもよい。ステップ S 1 3 0 については、ステップ S 1 1 0 と同様である。

【0051】

シート照明顕微鏡装置 1 は、試料 S の複数の画像を比較する（ステップ S 1 4 0）。ここでは、制御装置 4 0 が異なる従属光線角度を有する光シートが照射された試料 S の複数の画像を比較し、画像の変化を評価する。具体的には、画像中の画素値を一軸方向（例えば、x 軸方向又は y 軸方向）に積算した値を比較することで画像の変化を評価してもよい。また、画像中の一軸方向（例えば、y 軸方向）に隣接する画素間の差分を積算した値を比較することで画像の変化を評価してもよい。さらに、画像をフーリエ変換して空間周波数分布を比較することで画像の変化を評価してもよい。

【0052】

その後、シート照明顕微鏡装置 1 は、画像の変化が小さいかどうかを判定する（ステップ S 1 5 0）。ここでは、制御装置 4 0 は、ステップ S 1 4 0 での比較結果に基づいて、画像の変化を代表する値が既定値よりも小さいか否かを判定する。画像の変化を代表する値は、例えば、ステップ S 1 4 0 において、画像間で比較した値の差分値であってもよく、又は、その差分を従属光線角度の変化量を用いて規格化した値であってもよい。

【0053】

画像の変化が小さくないと判定されると、シート照明顕微鏡装置 1 は、再びステップ S 1 2 0 からステップ S 1 5 0 の処理を行う。そして、ステップ S 1 5 0 で画像の変化が小さいと判定されるまでそれらの処理を繰り返す。

【0054】

画像の変化が小さいと判定されると、シート照明顕微鏡装置 1 は、従属光線角度を決定する（ステップ S 1 6 0）。ここでは、制御装置 4 0 は、例えば、変化が小さいと判定された複数の画像に対応する複数の角度のうちの最も小さな角度を、照明光学系 1 0 に設定すべき従属光線角度に決定する。即ち、従属光線角度は、複数の画像を比較した結果に基づいて決定される。

【0055】

最後に、シート照明顕微鏡装置 1 は、従属光線角度をステップ S 1 6 0 で決定した角度

に設定し（ステップ S 1 7 0）、照明設定処理を終了する。ここでは、従属光線角度がステップ S 1 6 0 で決定した角度になるように、制御装置 4 0 が設定装置 6 0 へ制御信号を出力し、設定装置 6 0 が制御信号に従って照明光学系 1 0 の設定を行う。

その後、観察者は、ステップ S 1 7 0 で行われた設定で光シートを試料 S に照射し、試料 S の画像を取得することで、試料 S を観察する。

【0056】

シート照明顕微鏡装置 1 が上述した照明設定処理を実行することで、それ以上大きくしても画像に変化が生じない従属光線角度が特定され、照明光学系 1 0 から出射する光シートの従属光線角度がその特定された角度になるように照明光学系 1 0 の設定が行われる。なお、従属光線角度を変更しても画像に変化が生じない状態は、遮光部分の後方に延びる縞が十分に小さくなり、目立たない状態である。上述した照明設定処理によれば、従属光線角度を過度に大きく設定することがないため、照明性能の低下を抑制しつつ十分な縞消し効果を得る設定を行うことが可能である。従って、光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる。

10

【0057】

なお、図 8 に示す照明設定処理では、画像に変化が生じなくなるまで従属光線角度を徐々に大きくする例を示したが、シート照明顕微鏡装置 1 は、画像に変化が生じるようになるまで従属光線角度を徐々に小さくしてもよい。この場合、従属光線角度の初期設定は、縞が生じないような又は縞が目立たないような十分に大きな角度であることが望ましい。

【0058】

また、図 8 に示す照明設定処理では、撮像装置 3 0 で取得した画像そのものを比較する例を示したが、蛍光物質の褪色等に起因する画像の変化を排除して従属光線角度の変化に起因する画像の変化を評価してもよい。このため、画像を比較する前に比較する画像を補正してもよい。例えば、複数の画像中における縞が生じていない同一の領域の明るさを揃えるように画像を補正してから、画像を比較してもよい。

20

【0059】

〔第 2 の実施形態〕

第 2 の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置は、制御装置 4 0 の代わりに制御装置 7 0 を備える点が、シート照明顕微鏡装置 1 とは異なる。その他の点は、シート照明顕微鏡装置 1 と同様である。

30

【0060】

図 1 0 は、制御装置 7 0 の機能構成を例示した図である。制御装置 7 0 は、画像取得手段 7 0 a、幅算出手段 7 0 b、角度決定手段 7 0 c、出力手段 7 0 d を備える。なお、制御装置 7 0 のハードウェア構成については、制御装置 4 0 と同様である。上記の手段の少なくとも 1 つは、プログラムをプロセッサ 4 1 がメモリ 4 2 にロードして実行することで、メモリ 4 2 上に構成されてもよく、例えば、FPGA、ASIC などの集積回路などのハードウェアで構成されてもよい。

【0061】

画像取得手段 7 0 a は、撮像装置 3 0 で取得した試料 S の画像を撮像装置 3 0 から取得する。幅算出手段 7 0 b は、撮像装置 3 0 で取得した試料 S の画像に基づいて、試料 S の画像に表れる縞の幅を算出する。角度決定手段 7 0 c は、幅算出手段 7 0 b で算出した縞の幅に基づいて、光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する。出力手段 7 0 d は、角度決定手段 7 0 c で決定した従属光線角度に応じた照明光学系 1 0 の設定を指示する制御信号を設定装置 6 0 へ出力する。なお、縞の幅とは、光シートの幅方向についての縞の長さのことをいう。

40

【0062】

図 1 1 は、照明設定処理の手順を示すフローチャートである。以下、図 1 1 を参照しながら、本実施形態に係るシート照明顕微鏡装置で行われる照明設定処理について、図 8 に示す照明設定処理との違いに注目して説明する。

【0063】

50

シート照明顕微鏡装置は、まず、照明光学系 10 から出射する光シートの従属光線角度の初期設定を行い（ステップ S 200）、初期設定で、試料 S の画像を取得する（ステップ S 210）。ステップ S 200 とステップ S 210 は、図 8 に示すステップ S 100 とステップ S 110 と同様である。

【0064】

画像が取得されると、シート照明顕微鏡装置は、縞の幅を算出する（ステップ S 220）。ここでは、制御装置 70 が、ステップ S 210 で取得した画像に基づいて、その画像に表れる縞の幅を算出する。具体的には、画像中の画素値を x 軸方向に積算し、積算値が所定値以下となる画像中の画素列を特定する。そして、特定された画素列のうち隣接して存在する列の数から縞の幅を算出する。この算出方法は、縞が生じた列の積算値は縞が生じていない列の積算値に比べて小さくなることを利用したものである。なお、隣接して存在する列の集合が複数存在する場合には、最も多くの列から構成される列の集合を特定し、その集合に含まれる列の数から縞の幅を算出することが望ましい。

10

【0065】

縞の幅が算出されると、シート照明顕微鏡装置は、従属光線角度を決定する（ステップ S 230）。ここでは、制御装置 70 は、ステップ S 220 で算出した縞の幅に基づいて、従属光線角度を決定する。具体的には、従属光線角度は、例えば、ステップ S 220 で算出した縞の幅と、予め設定された許容される縞の長さに基づいて、幾何学的に算出されてもよい。なお、許容される縞の長さは、照明光学系 10 の光軸方向についての縞の長さである。

20

【0066】

最後に、シート照明顕微鏡装置は、従属光線角度をステップ S 230 で決定した角度に設定し（ステップ S 240）、照明設定処理を終了する。ステップ S 240 は、図 8 に示すステップ S 170 と同様である。その後、観察者は、ステップ S 240 で行われた設定で光シートを試料 S に照射し、試料 S の画像を取得することで、試料 S を観察する。

【0067】

シート照明顕微鏡装置が図 11 に示す照明設定処理を実行することで、画像から縞の幅が算出され、縞の幅に基づいて従属光線角度が決定される。これにより、第 1 の実施形態と同様に、従属光線角度を過度に大きくすることがないため、照明性能の低下を抑制しつつ十分な縞消し効果を得る設定を行うことが可能である。従って、光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる。

30

【0068】

また、図 11 に示す照明設定処理では、画像は 1 枚あれば十分である。このため、本実施形態によれば、複数の画像を取得して比較を繰り返す第 1 の実施形態に比べて、より短時間で照明設定を行うことが可能である。また、照明設定のために試料に与えるダメージも抑えることができる。

【0069】

なお、縞の幅は遮光部分の幅に相当するため、遮光部分の近くではほとんど変化しない。しかしながら、従属光線が光軸に対して角度を持つ場合、遮光部分から離れるほど縞の幅は小さくなる。したがって、画素値を x 方向の積算した値で縞の幅を算出するような場合には、従属光線の角度が大きいと縞以外の要因による積算値の低下と縞に起因する積算値の低下とを誤認する可能性がある。これを防止するためには、ステップ S 200 で設定する従属光線角度は、より小さな角度であることが望ましい。特に、従属光線が光軸と平行になる 0 度に設定することが望ましい。

40

【0070】

図 12 は、照明設定処理の別の手順を示すフローチャートである。図 13 は、幅算出処理の別の手順を示すフローチャートである。本実施形態に係るシート照明顕微鏡装置は、図 11 に示す照明設定処理の代わりに、図 12 及び図 13 に示す照明設定処理を行ってもよい。

【0071】

50

シート照明顕微鏡装置は、まず、照明光学系 10 から出射する光シートの従属光線角度の初期設定を行い（ステップ S 300）、初期設定で、試料 S の画像を取得する（ステップ S 310）。ステップ S 300 とステップ S 310 は、図 11 に示すステップ S 200 とステップ S 210 と同様である。

【0072】

次に、シート照明顕微鏡装置は、光シートの従属光線角度の設定を変更し（ステップ S 320）、変更後の設定で試料 S の画像を取得する（ステップ S 330）。ステップ S 320 で設定される角度は、遮光部分の後方に縞が生じにくくなるような角度であればよく、比較的大きな角度に設定することが望ましい。

【0073】

その後、シート照明顕微鏡装置は、縞の幅を算出する（ステップ S 340）。ここでは、制御装置 70 が、ステップ S 310 とステップ S 330 で取得した 2 画像に基づいて、その画像に表れる縞の幅を算出する。この幅算出処理では、制御装置 70 は、2 画像を比較し（ステップ S 341）、比較結果に基づいて縞の幅を算出する（ステップ S 342）。具体的には、画像中の各画素値の差を取り、差が既定値以上の画素の分布から縞の幅を算出してもよい。また、画像中の画素値を x 軸方向に積算し、2 画像間で積算値の差が所定値以上となる画素列を特定する。そして、特定された画素列のうち隣接して存在する列の数から縞の幅を算出してもよい。

【0074】

縞の幅が算出されると、シート照明顕微鏡装置は、従属光線角度を決定し（ステップ S 350）、決定した角度に従属光線角度を設定し（ステップ S 360）、照明設定処理を終了する。ステップ S 350、ステップ S 360 は、図 11 に示すステップ S 230、ステップ S 240 と同様である。その後、観察者は、ステップ S 350 で行われた設定で光シートを試料 S に照射し、試料 S の画像を取得することで、試料 S を観察する。

【0075】

図 12 に示す照明設定処理によっても、図 11 に示す照明設定処理と同様の効果を得ることができる。即ち、従属光線角度を過度に大きくすることなく、照明性能の低下を抑制しつつ十分な縞消し効果を得る設定を行うことができる。

【0076】

〔第 3 の実施形態〕

第 3 の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置は、制御装置 40 の代わりに制御装置 80 を備える点が、シート照明顕微鏡装置 1 とは異なる。その他の点は、シート照明顕微鏡装置 1 と同様である。

【0077】

図 14 は、制御装置 80 の機能構成を例示した図である。制御装置 80 は、画像取得手段 80 a、縞特定手段 80 b、幅算出手段 80 c、角度決定手段 80 d、出力手段 80 e を備える。なお、制御装置 80 のハードウェア構成については、制御装置 40 と同様である。上記の手段の少なくとも 1 つは、プログラムをプロセッサ 41 がメモリ 42 にロードして実行することで、メモリ 42 上に構成されてもよく、例えば、FPGA、ASIC などの集積回路などのハードウェアで構成されてもよい。

【0078】

画像取得手段 80 a、角度決定手段 80 d、出力手段 80 e は、第 2 の実施形態に係る制御装置 70 の、画像取得手段 70 a、角度決定手段 70 c、出力手段 70 d と同様である。縞特定手段 80 b は、撮像装置 30 で取得した試料 S の画像に基づいて、試料 S の画像に表れる縞を特定する。幅算出手段 80 c は、撮像装置 30 で取得した試料 S の画像に基づいて、より詳細には、縞特定手段 80 b から出力される縞情報に基づいて、試料 S の画像に表れる縞の幅を算出する。

【0079】

図 15 は、照明設定処理の手順を示すフローチャートである。図 16 は、縞特定処理の手順を示すフローチャートである。以下、図 15 及び図 16 を参照しながら、本実施形態

10

20

30

40

50

に係るシート照明顕微鏡装置で行われる照明設定処理について、図 1 1 に示す照明設定処理との違いに注目して説明する。

【0080】

シート照明顕微鏡装置は、まず、照明光学系 1 0 から出射する光シートの従属光線角度の初期設定を行う（ステップ S 4 0 0）。ここで設定される角度は、遮光部分の後方に縞が生じるような角度である点は、図 1 1 に示すステップ S 2 0 0 と同様である。ただし、0 度以外の角度に設定される。その後、シート照明顕微鏡装置は、初期設定で、試料 S の画像を取得する（ステップ S 4 1 0）。ステップ S 4 1 0 は、図 1 1 に示すステップ S 2 1 0 と同様である。

【0081】

画像が取得されると、シート照明顕微鏡装置は、縞を特定する（ステップ S 4 2 0）。ここここでは、制御装置 8 0 が、ステップ S 4 1 0 で取得した画像に基づいて、その画像に表れる縞を特定する。この縞特定処理では、図 1 6 に示すように、制御装置 8 0 は、まず、画像に基づいて、画素値（即ち、画像信号の強度）が既定値以下の画像中の領域を特定する（ステップ S 4 2 1）。さらに、ステップ S 4 2 1 で特定した領域に基づいて縞を特定する（ステップ S 4 2 2）。ステップ S 4 2 2 では、例えば、特定した領域のうち、光シートが進む向きに幅が狭くなるテーパー形状を有する領域を、縞として特定してもよい。

【0082】

縞が特定されると、シート照明顕微鏡装置は、縞の幅を算出する（ステップ S 4 3 0）。ここでは、制御装置 8 0 が、ステップ S 4 2 0 で特定された縞の幅を画像上で測定することで、縞の幅を算出する。

【0083】

縞の幅が算出されると、シート照明顕微鏡装置は、従属光線角度を決定し（ステップ S 4 4 0）、決定した角度に従属光線角度を設定し（ステップ S 4 5 0）、照明設定処理を終了する。ステップ S 4 4 0、ステップ S 4 5 0 は、図 1 1 に示すステップ S 2 3 0、ステップ S 2 4 0 と同様である。その後、観察者は、ステップ S 4 5 0 で行われた設定で光シートを試料 S に照射し、試料 S の画像を取得することで、試料 S を観察する。

【0084】

シート照明顕微鏡装置が図 1 5 に示す照明設定処理を実行することで、画像から縞の幅が算出され、縞の幅に基づいて従属光線角度が決定される。このため、第 1 の実施形態と同様に、従属光線角度を過度に大きくすることなく、照明性能の低下を抑制しつつ十分な縞消し効果を得る設定を行うことが可能である。従って、光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる。また、画像は 1 枚あれば十分であるので、第 2 の実施形態と同様に、短時間で照明設定を行うこと、及び、照明設定のために試料に与えるダメージを抑えることができる。

【0085】

なお、縞を特定する方法として、図 1 6 に示す縞特定処理を例示したが、図 1 7 に示す縞特定処理が行われてもよい。即ち、制御装置 8 0 は、予め設定されている縞パターンに基づいて、画像に対してパターンマッチング処理を行い（ステップ S 4 2 3）、パターンマッチング結果に基づいて縞を特定してもよい（ステップ S 4 2 4）。

【0086】

〔第 4 の実施形態〕

第 4 の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置は、制御装置 4 0 の代わりに制御装置 9 0 を備える点が、シート照明顕微鏡装置 1 とは異なる。その他の点は、シート照明顕微鏡装置 1 と同様である。

【0087】

図 1 8 は、制御装置 9 0 の機能構成を例示した図である。制御装置 9 0 は、画像取得手段 9 0 a、縞特定手段 9 0 b、画像比較手段 9 0 c、角度決定手段 9 0 d、出力手段 9 0 e を備える。なお、制御装置 9 0 のハードウェア構成については、制御装置 4 0 と同様で

10

20

30

40

50

ある。上記の手段の少なくとも１つは、プログラムをプロセッサ４１がメモリ４２にロードして実行することで、メモリ４２上に構成されてもよく、例えば、ＦＰＧＡ、ＡＳＩＣなどの集積回路などのハードウェアで構成されてもよい。

【００８８】

画像取得手段９０ａ、出力手段９０ｅは、第１の実施形態に係る制御装置４０の、画像取得手段４０ａ、出力手段４０ｄと同様である。縞特定手段９０ｂは、撮像装置３０で取得した試料Ｓの画像に基づいて、試料Ｓの画像に表れる縞を特定する。画像比較手段９０ｃは、撮像装置３０で取得した試料の複数の画像を、より詳細には、複数の画像中の特定された縞を含む小領域を、比較する。なお、小領域は画像全体ではなく画像の一部の領域である。角度決定手段９０ｄは、画像比較手段９０ｃで比較した結果に基づいて、より詳細には、上述した小領域を比較した結果に基づいて、光シートの幅方向についての従属光線角度を決定する。

10

【００８９】

図１９は、照明設定処理の手順を示すフローチャートである。以下、図１９を参照しながら、本実施形態に係るシート照明顕微鏡装置で行われる照明設定処理について、図８に示す照明設定処理との違いに注目して説明する。

【００９０】

シート照明顕微鏡装置は、まず、照明光学系１０から出射する光シートの従属光線角度の初期設定を行い（ステップＳ５００）、初期設定で、試料Ｓの画像を取得する（ステップＳ５１０）。ステップＳ５００とステップＳ５１０は、図８に示すステップＳ１００とステップＳ１１０と同様である。

20

【００９１】

画像が取得されると、シート照明顕微鏡装置は、縞を特定する（ステップＳ５２０）。ステップＳ５２０は、図１５に示すステップＳ４２０と同様である。その後、シート照明顕微鏡装置は、光シートの従属光線角度の設定を変更し（ステップＳ５３０）、変更後の設定で試料Ｓの画像を取得する（ステップＳ５４０）。ステップＳ５３０とステップＳ５４０は、図８に示すステップＳ１２０とステップＳ１３０と同様である。

【００９２】

次に、シート照明顕微鏡装置は、試料Ｓの複数の画像を比較する（ステップＳ５５０）。ここでは、制御装置９０が異なる従属光線角度を有する光シートが照射された試料Ｓの複数の画像のうちの、ステップＳ５２０で特定された縞を含む小領域を比較し、画像中のその小領域の変化を評価する。

30

【００９３】

その後、シート照明顕微鏡装置１は、画像の変化が小さいかどうかを判定する（ステップＳ５６０）。ここでは、制御装置９０は、ステップＳ５５０での小領域の比較結果に基づいて、小領域の変化を代表する値が既定値よりも小さいか否かを判定する。

【００９４】

画像（の小領域）の変化が小さくないと判定されると、シート照明顕微鏡装置は、再びステップＳ５３０からステップＳ５６０の処理を行う。そして、ステップＳ５６０で画像の変化が小さいと判定されるまでそれらの処理を繰り返す。

40

【００９５】

画像（の小領域）の変化が小さいと判定されると、シート照明顕微鏡装置は、従属光線角度を決定し（ステップＳ５７０）、決定した角度に従属光線角度を設定し（ステップＳ５８０）、照明設定処理を終了する。ステップＳ５７０、ステップＳ５８０は、図８に示すステップＳ１６０、ステップＳ１７０と同様である。その後、観察者は、ステップＳ５８０で行われた設定で光シートを試料Ｓに照射し、試料Ｓの画像を取得することで、試料Ｓを観察する。

【００９６】

シート照明顕微鏡装置が図１９に示す照明設定処理を実行することで、第１の実施形態と同様に、従属光線角度を過度に大きくすることなく、照明性能の低下を抑制しつつ十分

50

な縞消し効果を得る設定を行うことが可能である。従って、光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる。また、図19に示す照明設定処理では、縞を含む小領域が比較されるため、縞の変化に起因する画像の変化を感度良く検出することが可能となる。また、画像全体を比較する場合よりも計算量を抑えることもできる。

【0097】

〔第5の実施形態〕

第5の実施形態に係るシート照明顕微鏡装置は、制御装置40の代わりに制御装置100を備える点が、シート照明顕微鏡装置1とは異なる。その他の点は、対物レンズ1と同様である。

【0098】

図20は、制御装置100の機能構成を例示した図である。制御装置100は、画像取得手段100a、縞特定手段100b、表示制御手段100c、縞指定手段100d、幅算出手段100e、角度決定手段100f、出力手段100gを備える。なお、制御装置100のハードウェア構成については、制御装置40と同様である。上記の手段の少なくとも1つは、プログラムをプロセッサ41がメモリ42にロードして実行することで、メモリ42上に構成されてもよく、例えば、FPGA、ASICなどの集積回路などのハードウェアで構成されてもよい。

【0099】

画像取得手段100a、出力手段100gは、制御装置40の、画像取得手段40a、出力手段40dと同様である。縞特定手段100bは、撮像装置30で取得した試料Sの画像に基づいて、試料Sの画像に表れる縞を特定する。表示制御手段100cは、表示装置51に、縞特定手段100bで特定された縞の部分に印を付けた試料の画像を表示させる。縞指定手段100dは、観察者からの入力に従って縞消し対象とすべき縞を指定する。幅算出手段100eは、縞指定手段100dで指定された縞の幅を算出する。角度決定手段100fは、制御装置80の角度決定手段80dと同様である。

【0100】

図21は、照明設定処理の手順を示すフローチャートである。以下、図21を参照しながら、本実施形態に係るシート照明顕微鏡装置で行われる照明設定処理について、図15に示す照明設定処理との違いに注目して説明する。

【0101】

シート照明顕微鏡装置は、まず、照明光学系10から出射する光シートの従属光線角度の初期設定を行い（ステップS600）、初期設定で、試料Sの画像を取得する（ステップS610）。さらに、取得した画像に基づいて、縞を特定する（ステップS620）。ステップS600からステップS620は、図15に示すステップS400からステップS420と同様である。

【0102】

縞が特定されると、シート照明顕微鏡装置は、ステップS620で特定された縞の部分に印を付けた画像を表示する（ステップS630）。ここでは、制御装置100は、表示装置51に、特定された縞の部分に印を付けた試料の画像を表示させる。換言すると、試料の画像とともに特定された縞の位置を表示装置51に表示する。例えば、制御装置100は、図22に示すように、表示装置51に表示中の画像を、縞部分に印が付いていない試料の画像51aから縞部分に印（マークM1、マークM2、マークM3）が付いた試料の画像51bに更新する。

【0103】

その後、観察者は、表示装置51に表示された画像を見ながら、入力装置（キーボード52、マウス53）を用いて縞消し対象とすべき縞を画面上で選択する。なお、観察者は、縞消し対象とすべき縞を全て選択してもよく、縞消し対象とすべき縞のうち最も大きな縞のみを選択してもよい。

【0104】

画像を表示している間、シート照明顕微鏡装置は、観察者によって縞の指定が行われた

10

20

30

40

50

かどうかを判定する（ステップS640）。ここでは、制御装置100は、入力装置（キーボード52、マウス53）からの信号に基づいて縞の指定が行われたか否かを判定する。

【0105】

縞の指定が行われたと判定すると、シート照明顕微鏡装置は、縞の幅を算出する（ステップS650）。ここでは、制御装置100が、ステップS640で指定された縞の幅を画像上で測定することで、縞の幅を算出する。なお、複数の縞が指定されている場合には、各縞の幅を算出する。

【0106】

縞の幅が算出されると、シート照明顕微鏡装置は、従属光線角度を決定する（ステップS660）。ここでは、制御装置90は、ステップS650で算出した縞の幅に基づいて、従属光線角度を決定する。なお、複数の縞の幅が算出されている場合には、最も大きな縞の幅に基づいて従属光線角度を決定することが望ましい。

【0107】

最後に、シート照明顕微鏡装置は、決定した角度に従属光線角度を設定し（ステップS670）、照明設定処理を終了する。ステップS670は、図15に示すステップS450と同様である。その後、観察者は、ステップS670で行われた設定で光シートを試料Sに照射し、試料Sの画像を取得することで、試料Sを観察する。

【0108】

シート照明顕微鏡装置が図21に示す照明設定処理を実行することで、画像から縞の幅が算出され、縞の幅に基づいて従属光線角度が決定される。このため、第1の実施形態と同様に、従属光線角度を過度に大きくすることなく、照明性能の低下を抑制しつつ十分な縞消し効果を得る設定を行うことが可能である。従って、光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる。また、画像は1枚あれば十分であるので、第2の実施形態と同様に、短時間で照明設定を行うこと、及び、照明設定のために試料に与えるダメージを抑えることができる。さらに、本実施形態では、少なくとも観察者が選択した縞に対して縞消し効果が得られるように、従属光線角度が決定されるため、観察者の要求を満たす縞消し効果を発揮しつつ、照明性能の低下を更に抑制し得る。

【0109】

〔第6の実施形態〕

図23A及び図23Bは、シート照明顕微鏡装置2の構成を例示した図である。シート照明顕微鏡装置2は、シート照明顕微鏡装置1と同様に、例えば、生体標本などの試料Sからの蛍光を検出する蛍光顕微鏡であり、光シートで試料Sを照明するように構成されている。

【0110】

シート照明顕微鏡装置2は、照明光学系10の代わりに照明光学系200を備える点、制御装置40の代わりに制御装置110を備える点、設定装置60の代わりに設定装置65を備える点が、シート照明顕微鏡装置1とは異なっている。

【0111】

照明光学系200は、検出光学系20の光軸と略直交するシート形状を有する光シートを形成し、その光シートを検出光学系20の光軸と略直交する方向から試料Sに照射するように構成されている。照明光学系200は、観察範囲Rを一度に照明できるように、照明光学系10に比べて幅の広い光シートを形成する。

【0112】

照明光学系200は、レーザ201を備えている。レーザ201は、光シートに変換されるレーザ光（照明光）を出射する光源である。照明光学系200は、さらに、レーザ201側から順に、レンズ202、レンズ203、シリンダリカルレンズ204、ミラー205、シリンダリカルレンズ206、シリンダリカルレンズ207を備える。

【0113】

シリンダリカルレンズ204及びシリンダリカルレンズ206は、x y 平面内で屈折力

10

20

30

40

50

を有し、 xz 平面内で屈折力を有しないように配置されている。シリンドリカルレンズ207は、 xz 平面内で屈折力を有し、 xy 平面内で屈折力を有しないように配置されている。

【0114】

ミラー205は、 z 軸周りに回転することで入射光に対する角度を変更可能な回動ミラーであり、ミラー205の角度は、設定装置65によって変更される。なお、ミラー205は、照明光学系200の瞳面内に配置されることが望ましい。

【0115】

制御装置110は、シート照明顕微鏡装置2を制御する顕微鏡コントローラである。制御装置110は、シート照明顕微鏡装置2の顕微鏡本体に設けられた各種電動機構に制御信号を出力するように構成されていて、例えば、制御装置40と同様のハードウェア構成を有している。

10

【0116】

設定装置65は、照明光学系200の設定を行う装置であり、制御装置110からの制御信号に従って動作する顕微鏡本体の電動機構の一つである。設定装置65は、具体的には、ミラー205の角度を変更するモータなどの駆動装置である。設定装置65がミラー205の角度を変更することで、照明光学系200から出射される光シートの主光線の角度が変化する。

【0117】

以上のように構成されたシート照明顕微鏡装置2では、シリンドリカルレンズ204及びシリンドリカルレンズ206は、 xz 平面内においては、屈折力を有しないためレーザー光に対して実質的に作用しない。また、 z 軸回りに回転するミラー205も、 xz 平面内においてはレーザー光に対して実質的に作用しない。このため、図23Bに示すように、幅方向(y 軸方向)から見たとき、レーザー光は、ミラー205の角度によらず、シリンドリカルレンズ207によって一定の位置に集光する。

20

【0118】

また、シリンドリカルレンズ204及びシリンドリカルレンズ206は、 xy 平面内において屈折力を有している。このため、図23Aに示すように、厚さ方向(z 軸方向)から見たとき、レーザー光は、レンズ202及びレンズ203の組み合わせで幅が調整され、さらにシリンドリカルレンズ204及びシリンドリカルレンズ206の組み合わせで更に幅が調整される。シリンドリカルレンズ207は、 xy 平面内においては屈折力を有しないため、シリンドリカルレンズ206から出射したレーザー光は、そのままの幅で試料に照射される。ただし、レーザー光の主光線の向きは、ミラー205の角度に依存する。

30

【0119】

従って、シート照明顕微鏡装置2によれば、ミラー205の角度に応じて、照明光学系200から出射する光シートの主光線の向きを変更することができる。このため、ミラー205の角度を変更することで、光シートの主光線が試料に入射する入射角度を変更することができる。そして、撮像装置30の露光時間中に入射角度を変更して様々な方向から試料を照明することで、縞消し効果を得ることができる。

【0120】

図24は、照明設定処理の手順を示すフローチャートである。図25は、入射角決定処理の手順を示すフローチャートである。以下、図24及び図25を参照しながら、シート照明顕微鏡装置2で行われる照明設定処理について具体的に説明する。

40

【0121】

シート照明顕微鏡装置2は、まず、照明光学系200から出射した光シートが照射された試料Sの画像を取得する(ステップS700)。ここでは、照明光学系200が試料Sに光シートを照射し、撮像装置30が試料Sを撮像し試料Sの画像データを生成する。生成された試料Sの画像データは、制御装置110へ出力される。

【0122】

次に、シート照明顕微鏡装置2は、取得した画像に基づいて、光シートの主光線が試料

50

に入射する入射角度を決定する（ステップS710）。ここでは、制御装置110は、図25に示す入射角度設定処理を実行し、撮像装置30から取得した画像に基づいて、照明光学系200から出射される光シートの主光線が試料に入射する入射角度を決定する。なお、図25のステップS711からステップS714は、図21のステップS620からステップS650と同様である。制御装置110は、算出された縞の幅に基づいて、入射角度を決定する（ステップS715）。入射角度は、例えば、ステップS714で算出した縞の幅と、予め設定された許容される縞の長さに基づいて、幾何学的に決定されてもよい。

【0123】

入射角度が決定されると、シート照明顕微鏡装置2は、決定した入射角度に従って、照明光学系200の設定を行い（ステップS720）、光シートを試料に照射する（ステップS730）。ここでは、シート照明顕微鏡装置2は、設定装置65が制御装置110から出力された制御信号に従って、照明光学系200の設定を繰り返し行いながら、光シートを試料に照射する。具体的には、シート照明顕微鏡装置2は、0度からステップS710で決定した角度まで入射角度を変更しながら、光シートを照射する。

【0124】

シート照明顕微鏡装置2が図24に示す照明設定処理を実行することによっても、従属光線角度を過度に大きくすることなく、照明性能の低下を抑制しつつ十分な縞消し効果を得る設定を行うことが可能である。従って、光シート照明のための適切な照明設定を容易に行うことができる。

【0125】

なお、図24に示す照明設定処理では、決定した入射角度に従って照明光学系200の設定を行う例を示したが、入射角度が制御されればよい。このため、照明光学系200の設定を行う代わりに、試料を載せたステージ等を回転させることによって、試料の向きの設定を行ってもよい。また、これらの少なくとも一方を行えばよい。また、照明光学系200の設定と試料の向きの設定の両方を行ってもよい。

【0126】

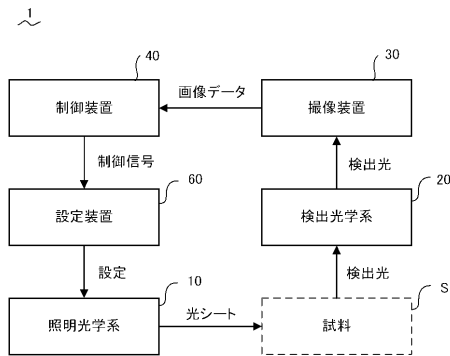
上述した実施形態は、発明の理解を容易にするための具体例を示したものであり、本発明の実施形態はこれらに限定されるものではない。照明設定方法、シート照明顕微鏡装置、及びプログラムは、特許請求の範囲に記載された発明を逸脱しない範囲において、さまざまな変形、変更が可能である。

【符号の説明】

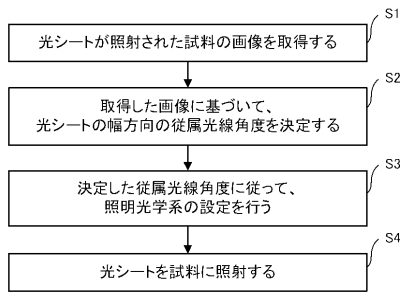
【0127】

1、2・・・シート照明顕微鏡装置、10、200・・・照明光学系、11、201・・・レーザ、12・・・第1の光学系、13、14、202、203・・・レンズ、15、18、19、204、206、207・・・シリンドリカルレンズ、16・・・スキャナ、17・・・走査光学系、20・・・検出光学系、21・・・対物レンズ、22・・・波長選択素子、23・・・結像レンズ、30・・・撮像装置、40、70、80、90、100、110・・・制御装置、41・・・プロセッサ、42・・・メモリ、43・・・入出力インターフェース、44・・・記憶装置、45・・・可搬記録媒体駆動装置、46・・・可搬記録媒体、47・・・バス、40a、70a、80a、90a、100a・・・画像取得手段、40b、90c・・・画像比較手段、40c、70c、80d、90d、100f・・・角度決定手段、40d、70d、80e、90e、100g・・・出力手段、51・・・表示装置、51a、51b・・・画像、52・・・キーボード、53・・・マウス、60、65・・・設定装置、61・・・ボールネジ、62・・・ナット、63・・・保持部、64・・・モータ、70b、80c、100e・・・幅算出手段、80b、90b、100b・・・縞特定手段、100c・・・表示制御手段、100d・・・縞指定手段、205・・・ミラー、S・・・試料、L1、L2・・・光シート、R・・・観察範囲、M1、M2、M3・・・マーク

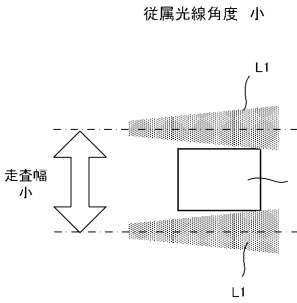
【図 1】



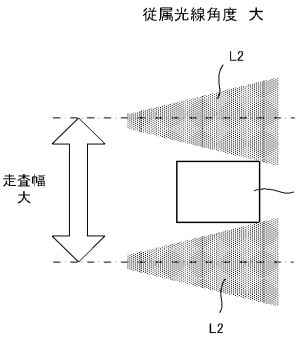
【図 2】



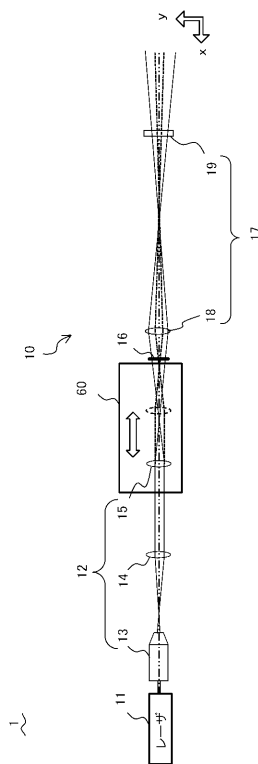
【図 3】



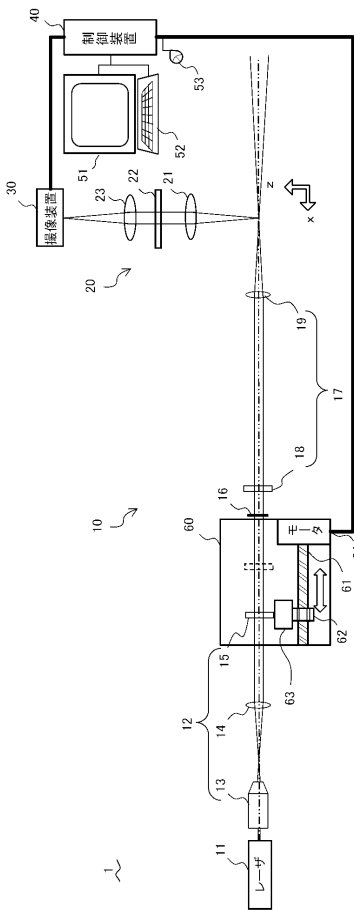
【図 4】



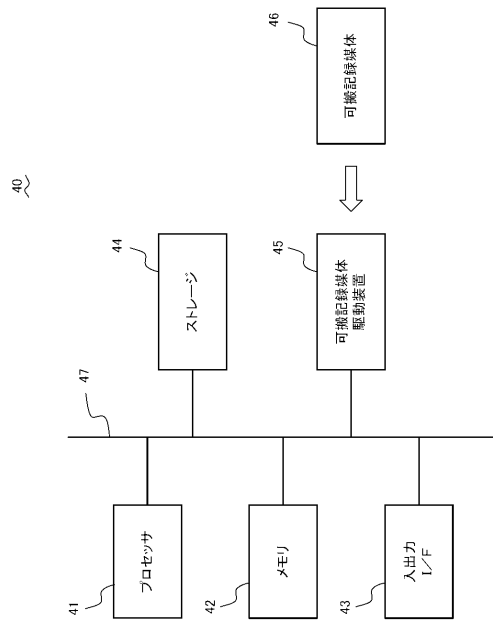
【図 5 A】



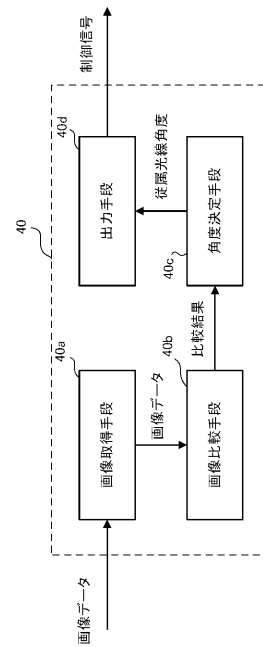
【図 5 B】



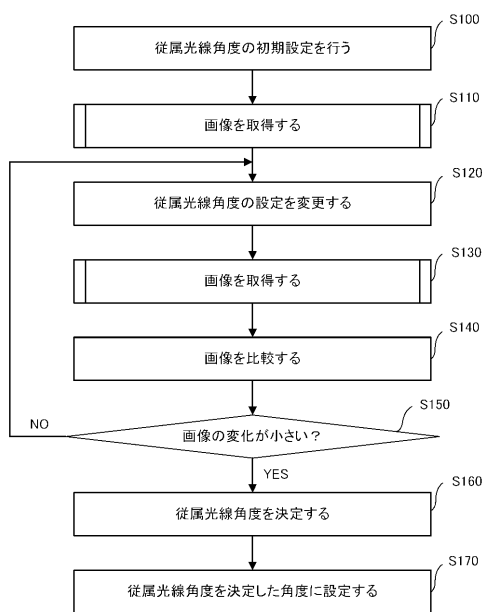
【図 6】



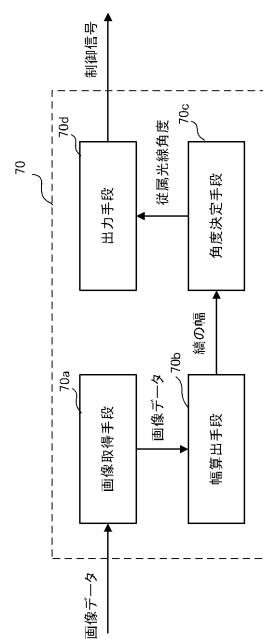
【図 7】



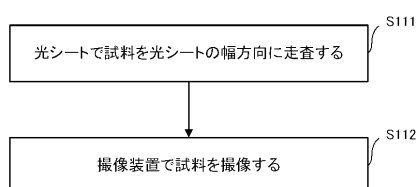
【図 8】



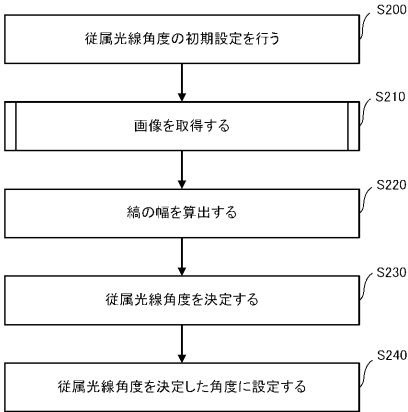
【図 10】



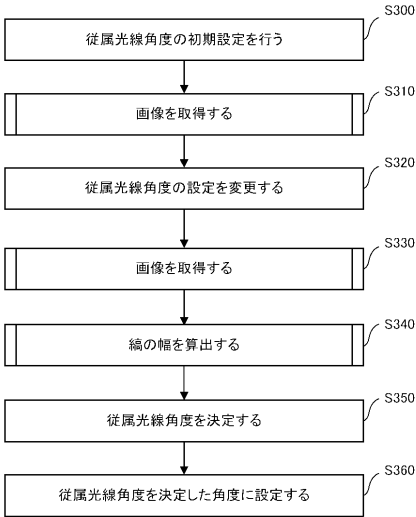
【図 9】



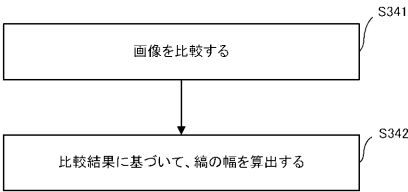
【図 1 1】



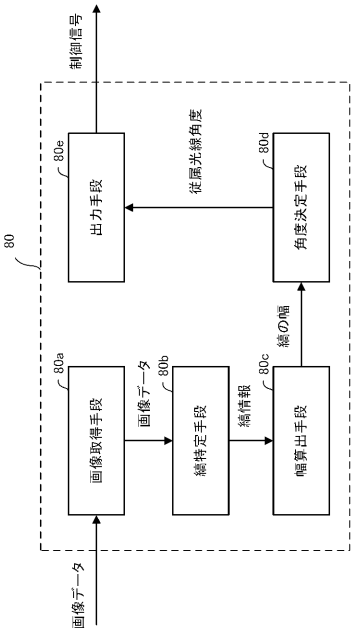
【図 1 2】



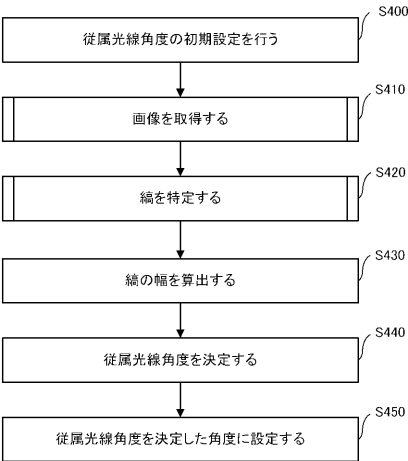
【図 1 3】



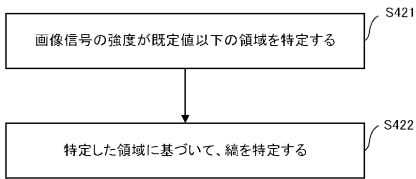
【図 1 4】



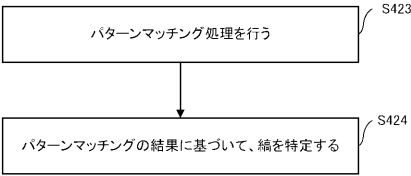
【図 1 5】



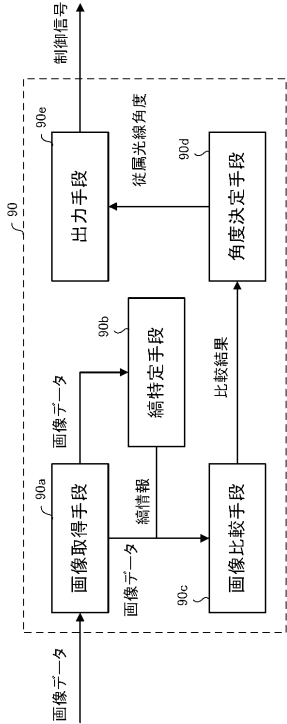
【図 1 6】



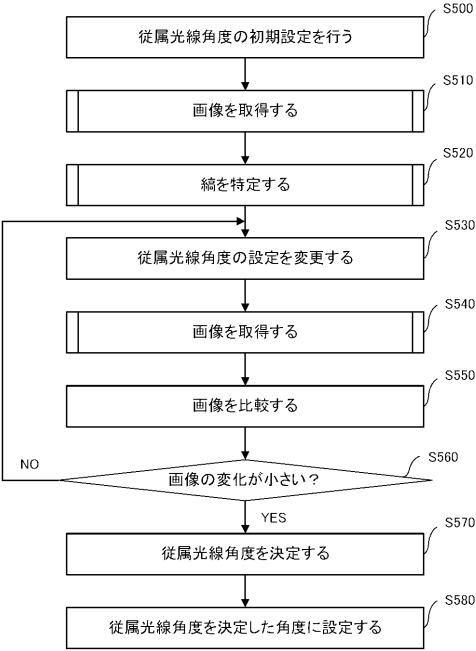
【図 1 7】



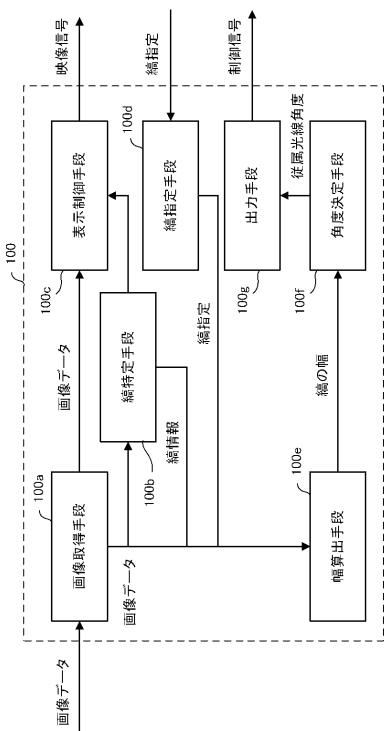
【図 1 8】



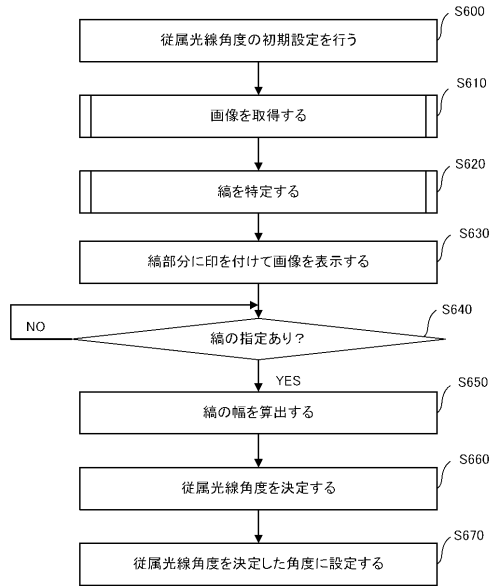
【図 1 9】



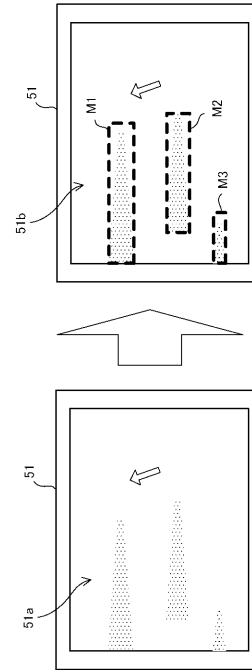
【図 2 0】



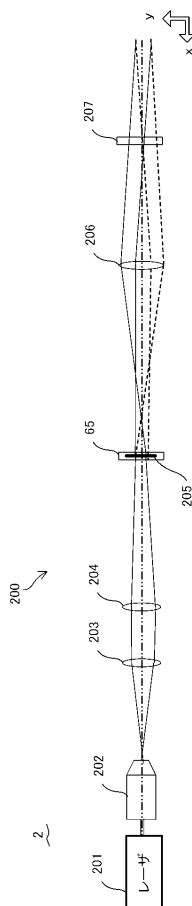
【図 2 1】



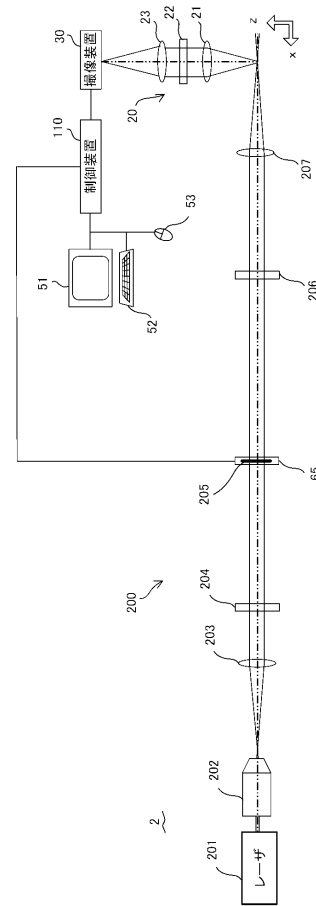
【図 2 2】



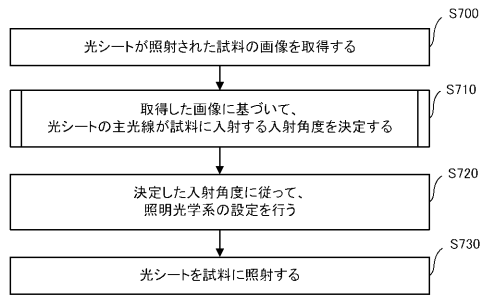
【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



【図 2 4】



【図 2 5】

