

(43) 国際公開日
2007 年 12 月 13 日 (13.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/141903 A1

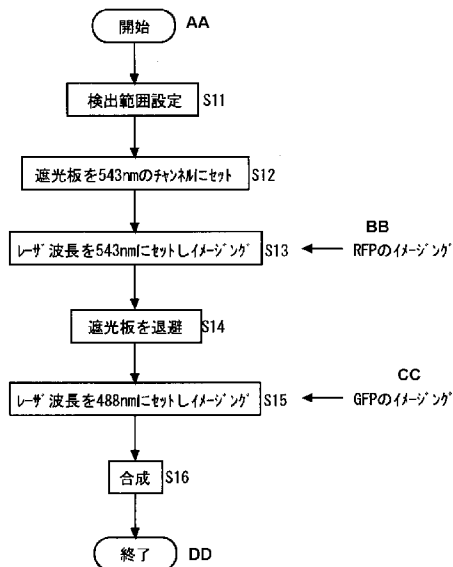
- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/000526
- (22) 国際出願日: 2007 年 5 月 16 日 (16.05.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2006-156500 2006 年 6 月 5 日 (05.06.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ニコン (NIKON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008331
東京都千代田区丸の内三丁目 2 番 3 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): 福田陽子

- (FUKUDA, Yoko) [JP/JP]; 〒1008331 東京都千代田区丸の内三丁目 2 番 3 号株式会社ニコン知的財産部内 Tokyo (JP). 奥川久 (OKUGAWA, Hisashi) [JP/JP]; 〒1008331 東京都千代田区丸の内三丁目 2 番 3 号株式会社ニコン知的財産部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 古谷史旺, 外 (FURUYA, Fumio et al.); 〒1600023 東京都新宿区西新宿 1 丁目 1 9 番 5 号第 2 明宝ビル 9 階 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: SPECTRUM OBSERVATION METHOD AND SPECTRUM OBSERVATION SYSTEM

(54) 発明の名称: スペクトル観察方法及びスペクトル観察システム



AA START
BB RFP IMAGING
CC GFP IMAGING
DD END
S11 SET DETECTION RANGE
S12 SET LIGHT SHIELDING PLATE TO 543 nm CHANNEL
S13 SET LASER WAVELENGTH TO 543 nm AND PERFORM IMAGING
S14 RETREAT LIGHT SHIELDING PLATE
S15 SET LASER WAVELENGTH TO 488 nm AND PERFORM IMAGING
S16 SYNTHESIS

(57) Abstract: It is possible to acquire necessary data without fail in observation of an object containing a plurality of materials having different excitation wavelengths. Provided is a spectrum observation method which applies light to an observation object containing a plurality of materials (such as RFP and GFP) having different excitation wavelengths and detects the spectrum of the light emitted from the observation object. The wavelength of the applied light is switched between the respective excitation wavelengths of the plurality of materials so as to successively obtain spectrum data on the materials having longer wavelengths (S13, S15). When acquiring the spectrum data on each material, the excitation wavelength of the material is excluded from the spectrum detection wavelengths (S12).

(57) 要約: 本発明は、励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物の観察において、必要なデータを欠落無く取得することを目的とする。そのために、本発明のスペクトル観察方法は、励起波長の異なる複数種類の物質 (RFP, GFP など) を含む被観察物へ光を照射すると共に、その被観察物から放射される光のスペクトルを検出するスペクトル観察方法であって、前記照射する光の波長を前記複数種類の物質の各々の励起波長の間で切り替えながら、前記励起波長の長い物質のスペクトルデータから順次取得し (S13, S15)、前記各物質のスペクトルデータ取得の際は、前記スペクトルの検出波長から、その物質の励起波長を除外する (S12)。



(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, 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 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

スペクトル観察方法及びスペクトル観察システム

技術分野

- [0001] 本発明は、複数種類の蛍光試薬で多重染色された標本など、励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物のスペクトル観察方法、及びスペクトル観察システムに関する。

背景技術

- [0002] 複数種類の蛍光試薬で多重染色された標本の観察には、スペクトルイメージング蛍光レーザ顕微鏡が有効である（特許文献1など参照）。このレーザ顕微鏡は、標本へ励起光を照射し、そこで発生した蛍光をグレーティング（回折格子）等で分光し、分光後の各波長成分の強度をスペクトルディテクタで検出する。このレーザ顕微鏡でも、他の蛍光顕微鏡と同様、標本の表面やレンズ表面などで反射する余分な励起光は、観察の妨げとならないよう何れかの箇所でカットする必要がある。
- [0003] 但し、スペクトル検出を行うこのレーザ顕微鏡では、蛍光の波長帯域を広く確保しておく必要があるので、蛍光の光路へバリアフィルタを挿入する代わりに、スペクトルディテクタのうち、励起波長に対応する特定のチャンネルをスペクトルディテクタの検出波長範囲から外す（チャンネル前に遮光板を配置（固定）する）ことになる。標本が2種類の蛍光試薬で染色されたときには、それらの励起波長に対応する2つのチャンネルの各々を検出波長範囲から外し、それらの蛍光試薬を同時に又は順次励起してスペクトルイメージングを行えばよいと考えられる。

特許文献1：特表2004-506191号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] しかし、このようなスペクトルイメージングでは、必要なデータの一部が欠落する可能性がある。なぜなら、或る蛍光試薬の励起波長が他の蛍光試薬

の放射スペクトルの波長範囲内に含まれていた場合、必要な波長が検出波長範囲から外されてしまう（欠落する）からである。

[0005] そこで本発明は、励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物の観察において、必要なデータを欠落無く取得することの可能なスペクトル観察方法及びスペクトル観察システムを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明のスペクトル観察方法は、励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物へ光を照射すると共に、その被観察物から放射される光のスペクトルを検出するスペクトル観察方法であって、前記照射する光の波長を前記複数種類の物質の各々の励起波長の間で切り替えながら、前記励起波長の長い物質のスペクトルデータから順次取得し、前記各物質のスペクトルデータ取得の際は、前記スペクトルの検出波長から、その物質の励起波長を除外することを特徴とする。

[0007] なお、前記取得した前記スペクトルデータを合成してもよい。

[0008] また、本発明のスペクトル観察システムは、励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物へ光を照射する照射手段と、前記被観察物から放射される光のスペクトルを検出する検出手段と、前記照射手段が照射する光の波長を切り替える波長切替手段と、を備えたスペクトル観察装置と、前記波長切替手段を制御することにより、前記照射する光の波長を前記複数種類の物質の各々の励起波長の間で切り替えながら、前記励起波長の長い物質のスペクトルデータから順次取得する制御装置と、前記各物質のスペクトルデータ取得の際は、前記スペクトルの検出波長から、その物質の励起波長を排除する可動式遮光機構と、を備えたことを特徴とする。

[0009] また、本発明の別のスペクトル観察システムは、励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物へ光を照射する照射手段と、前記被観察物から放射される光のスペクトルを検出する検出手段と、前記照射手段が照射する光の波長を切り替える波長切替手段と、を備えたスペクトル観察装置と、前記波長切替手段を制御することにより、前記照射する光の波長を前記複数種類の

物質の各々の励起波長の間で切り替えながら、前記励起波長の長い物質のスペクトルデータから順次取得する制御装置と、前記検出手段の検出波長範囲を切り替える範囲切替手段とを備え、前記制御装置は、前記範囲切替手段を制御することにより、前記各物質のスペクトルデータ取得の際は、前記スペクトルの検出波長から、その物質の励起波長を排除することを特徴とする。

[0010] なお、前記制御装置は、前記取得した前記スペクトルデータを合成してもよい。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物の観察において、必要なデータを欠落無く取得することの可能なスペクトル観察方法及びスペクトル観察システムが実現する。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本システムの構成図である。

[図2] G F Pに固有の特性を示す図である。

[図3] R F Pに固有の特性を示す図である。

[図4]第1実施形態のCPU37の動作フローチャートである。

[図5]図4の各ステップの内容を可視化した図である。

[図6] C F Pに固有の特性を示す図である。

[図7]第2実施形態のCPU37の動作フローチャートである。

[図8]図7の各ステップの内容を可視化した図である。

発明を実施するための最良の形態

[0013] [第1実施形態]

以下、本発明の第1実施形態を説明する。本実施形態は、スペクトルイメージング蛍光レーザ顕微鏡システムの実施形態である。

[0014] 先ず、本システムの構成を説明する。

[0015] 図1は、本システムの構成図である。図1に示すとおり、本システムには、共焦点顕微鏡1と、スペクトル検出部2と、制御部3と、モニタ4とが備えられる。

- [0016] 共焦点顕微鏡 1 には、標本ステージ 1 1 と、レーザユニット 1 2 と、光ファイバ 1 3 と、コリメートレンズ 1 4 と、ダイクロイックミラー 1 5 と、X Y スキャナ 1 6 と、対物レンズ 1 7 と、結像レンズ 1 8 と、ピンホール板 1 9 と、光ファイバ 2 0 とが備えられる。標本ステージ 1 1 上には、複数種類の蛍光試薬で多重染色された標本 1 0 A が支持される。これら蛍光試薬の詳細については、後述する。
- [0017] レーザユニット 1 2 は、例えば、複数種類のレーザ光源 1 2 1, 1 2 2, 1 2 3 と、波長可変フィルタ (A O T F 等) 1 2 4 とを備えており、波長可変フィルタ 1 2 4 (又は各レーザシャッタ 1 0 0) の動作により、出射するレーザ光の波長 (レーザ波長) を切り替えることができる。ここでは、レーザ波長が、5 4 3 n m, 4 8 8 n m, 4 4 0 n m の 3 波長の間で切り替わるとする。
- [0018] このレーザユニット 1 2 から射出したレーザ光は、光ファイバ 1 3、コリメートレンズ 1 4、ダイクロイックミラー 1 5、X Y スキャナ 1 6、対物レンズ 1 7 を順に介して標本 1 0 A の 1 点へ集光し、そこに存在している特定の蛍光物質を励起する。その蛍光物質で発生した蛍光は、対物レンズ 1 7、X Y スキャナ 1 6、ダイクロイックミラー 1 5、結像レンズ 1 8、ピンホール板 1 9、光ファイバ 2 0 を順に介してスペクトル検出部 2 へ導かれる。ピンホール板 1 9 では、余分な光線がカットされる。
- [0019] スペクトル検出部 2 には、コリメートレンズ 2 1 と、グレーティング 2 2 と、グレーティングステージ 2 2 M と、集光レンズ 2 3 と、遮光板 3 0 と、スライド機構 3 0 M と、スペクトルディテクタ 2 4 と、サンプリング回路 2 5 とが備えられる。
- [0020] グレーティング 2 2 は、グレーティングステージ 2 2 M によって支持されており、光路に対する挿入角度が調節可能になっている。グレーティングステージ 2 2 M は、グレーティング 2 2 と共に、格子ピッチの異なるグレーティング 2 2' , 2 2'' を支持しており、光路に挿入されるグレーティングを、グレーティング 2 2, 2 2' , 2 2'' の間で切り替えることもできる。

- [0021] スペクトルディテクタ 24 は、強度の微弱な蛍光に感応する複数の光電子増倍管 (PMT) 4 A を、一次元アレイ状に配列してなる。このスペクトルディテクタ 24 に必要な電力は、制御部 3 内の高圧電源 34 P から供給される。1つの PMT 4 A がスペクトルディテクタ 24 の 1つのチャンネルを構成する。以下、PMT 4 A の配列数（すなわちスペクトルディテクタ 24 のチャンネル数）を、32 とする。
- [0022] 遮光板 30 は、スペクトルディテクタ 24 の何れか 1つのチャンネルを遮光するための短冊状のマスクであり、スライド機構 30 M によって支持されている。スライド機構 30 M は、遮光板 30 をチャンネルの配列方向へスライドさせ、それにより遮光されるチャンネルを切り替えることができる。また、スライド機構 30 M は、遮光板 30 を退避位置へ配置することで、32 個のチャンネルの全てを開放することもできる。
- [0023] このスペクトル検出部 2 に導かれた蛍光は、コリメートレンズ 21 を介してグレーティング 22 へ入射すると、各波長成分にスペクトル分解される。各波長成分は、スペクトルディテクタ 24 の 32 個のチャンネルへ個別に入射し、その強度に応じた電気信号へとそれぞれ変換される。なお、遮光板 30 の配置されたチャンネルには光が入射しないので、そのチャンネルでは強度ゼロに相当する電気信号が生成される。32 個のチャンネルで生成された 32 個の電気信号は、サンプリング回路 25 によって或るタイミングでサンプリングされ、制御部 3 へと順次送出される。このとき送出される 32 個の電気信号が、標本 10 A の 1 点（レーザ光の集光点）のスペクトルデータである。
- [0024] 制御部 3 には、画像処理回路 36 と、CPU 37 と、XY スキャナ駆動回路 38 と、グレーティング駆動回路 32 C と、遮光板駆動回路 30 C と、高圧電源 34 P とが備えられる。以下、CPU 37 には、CPU 37 の動作プログラムを格納する ROM と、CPU 37 の動作中の一次記憶に用いられる RAM とが搭載されており、画像処理回路 36 には、複数フレーム分のスペクトル画像データ（後述）を格納可能なメモリが搭載されているとして説明

する。

[0025] CPU 37は、XYスキャナ駆動回路38を介して共焦点顕微鏡1のXYスキャナ16を駆動することにより、レーザ光の集光点で標本10Aを2次元的に走査する。また、CPU 37は、この走査中にサンプリング回路25に対し繰り返しサンプリングの指示を与え、標本10Aの各点のスペクトルデータを画像処理回路36へと順次取り込む。CPU 37のこの動作によると、標本10Aの二次元走査が終了するまでに、画像処理回路36内のメモリへ、標本10Aの1フレーム分のスペクトル画像データ（個々のピクセルは、スペクトルデータとして32チャンネル分の値を持つ。）が格納されることになる。以下、このように、スペクトル画像データを取得するためのCPU 37の動作を、「スペクトルイメージング」という。画像処理回路36は、このスペクトルイメージングで取得されたスペクトル画像データに基づき、必要に応じてモニタ表示用の画像データを生成し、モニタ4へ送出する。

[0026] なお、CPU 37がスペクトルイメージングを繰り返せば、スペクトル画像データの連続取得（リアルタイムイメージング）も可能である。

[0027] また、CPU 37は、スペクトルイメージングに当たり、レーザユニット12内の波長可変フィルタ124（又は各レーザシャッタ100）へ指示を与えることにより、レーザ光のオンオフ制御や、レーザ光の波長切り替え制御を行うことができる。

[0028] また、CPU 37は、スペクトルイメージングに当たり、グレーティング駆動回路32Cを介してグレーティングステージ22Mを駆動し、また、遮光板駆動回路30Cを介してスライド機構30Mを駆動することにより、スペクトルディテクタ24の検出波長範囲を変化させることができる。

[0029] 因みに、スペクトルディテクタ24の検出波長範囲を拡縮するには、光路に挿入されるグレーティングをグレーティング22、22'、22"の間で切り替えればよい。但し、スペクトルディテクタ24のチャンネル数は不変なので、その検出波長範囲を拡縮させると、それに応じて波長分解能も変化

する。例えば、グレーティング 2 2 が光路へ挿入されたときには、検出波長範囲は 80 nm、波長分解能は 2.5 nm となり、グレーティング 2 2' が光路へ挿入されたときには、検出波長範囲は 160 nm、波長分解能は 5 nm となり、グレーティング 2 2'' が挿入されたときには、検出波長範囲は 320 nm、波長分解能は 10 nm となる。

[0030] また、スペクトルディテクタ 2 4 の検出波長範囲の上限を短波長側に変更したり、検出波長範囲の下限を長波長側に変更したりするには、挿入中のグレーティングの挿入角度を変化させればよい。

[0031] また、スペクトルディテクタ 2 4 の検出波長範囲から特定の波長成分を除外するには、スペクトルディテクタ 2 4 の 32 個のチャンネルのうち、その特定の波長成分に対応するチャンネルに遮光板 30 を配置すればよい。

[0032] 次に、本システムの標本 10 A を説明する。

[0033] 標本 10 A は、GFP、RFP の 2 種類の蛍光試薬で多重染色された生体細胞の標本である。図 2 は、GFP に固有の特性を示す図であり、図 3 は、RFP に固有の特性を示す図である。図 2、図 3 において、点線で示すのは、吸収スペクトルであり、実線で示すのは、放射スペクトルであり、太い直線で示すのは、励起波長である。

[0034] 先ず、図 2 に示すとおり、GFP の励起波長は 488 nm であり、GFP の放射スペクトルの波長範囲は、約 450 nm ~ 約 650 nm である。このような GFP の標本 10 A における寄与を本システムで知るためには、488 nm のチャンネルを検出波長範囲から外し、488 nm のレーザ光で励起しながらスペクトルイメージングを行えばよい。取得されたスペクトル画像データのうち、主として 488 nm より長波長側のデータに、GFP の寄与を示すデータ（GFP データ）が反映される。

[0035] 一方、図 3 に示すとおり、RFP の励起波長は、GFP のそれよりも長い 543 nm であり、RFP の放射スペクトルの波長範囲は、約 550 ~ 約 700 nm である。このような RFP の標本 10 A における寄与を本システムで知るためには、543 nm のチャンネルを検出波長範囲から外し、543

nmのレーザ光で励起しながらスペクトルイメージングを行えばよい。取得されたスペクトル画像データのうち、主として543 nmより長波長側のデータに、RFPの寄与を示すデータ（RFPデータ）が反映される。

[0036] 但し、GFPとRFPとを同時励起してスペクトルイメージングを行おうとすると、488 nmのチャンネルと543 nmのチャンネルとの双方を検出波長範囲から外す必要があるので、GFPデータの比較的重要な部分（543 nmの近傍の部分）が欠落する。

[0037] また、GFPとRFPとを別々に励起してスペクトルイメージングを行うとしても、励起波長の短いGFPのスペクトルイメージング（つまり励起に高いエネルギーを要する）を、励起波長の長いRFPのスペクトルイメージング（つまり励起に高いエネルギーを要しない）よりも先に行うと、RFPデータの取得前にRFPが反応し、その退色が始まってしまうので、RFPデータを正確に取得することができない。このことは、GFPの励起波長（図2の太い直線）が、RFPの吸収スペクトル（図3点線）の波長範囲に含まれることから明らかである。

[0038] なお、標本10Aに添加された蛍光試薬の各々の励起波長は、本システムのCPU37が認識しているものとする。それらの励起波長の情報は、制御部3に設けられた不図示のインタフェースを介して予め外部から本システムへ入力される。

[0039] 次に、CPU37の動作手順を説明する。CPU37は、以上の問題を回避するため、以下の手順で動作する。

[0040] 図4は、CPU37の動作フローチャートである。図4中の各ステップの内容を可視化すると、図5に示すとおりになる。これらの図4、図5に示すとおり、まず、CPU37は、スペクトルディテクタ24の検出波長範囲を490～650 nm、波長分解能を5 nmに設定する（ステップS11）。この検出波長範囲（490～650 nm）は、GFPの放射スペクトルの主な波長範囲と、RFPの放射スペクトルの主な波長範囲とをカバーし、かつ、GFPの励起波長（488 nm）から外れている。

- [0041] 次に、CPU 37は、遮光板30の遮光先を、543 nmのチャンネルに設定し、そのチャンネルを検出波長範囲から外す（ステップS 12）。この波長は、RFPの励起波長である。
- [0042] その状態で、CPU 37は、レーザ波長を543 nmに設定し、スペクトルイメージングを行う（ステップS 13）。CPU 37は、取得したスペクトル画像データのうち、543 nmよりも長波長側（551 nm～上限）の全データを、有効データとみなす。因みに、この543 nmの励起光は、RFPを励起する一方で、それよりも励起波長の短いGFPを励起しないので、この有効データには、RFPデータのみが反映されていると考えられる。
- [0043] 続いて、CPU 37は、遮光板30を退避位置に配置する（ステップS 14）。これによって、490～650 nmの全チャンネルが検出波長範囲となる。
- [0044] その状態で、CPU 37は、レーザ波長を488 nmに設定し、スペクトルイメージングを行う（ステップS 15）。CPU 37は、取得したスペクトル画像データのうち、488 nmよりも長波長側の全データ（496 nm～上限）を、有効データとみなす。因みに、この488 nmの励起光は、GFPを励起するので、この有効データには、GFPデータが反映されている。また、488 nmの励起光は、RFPを少しだけ励起し、有効データの波長範囲には、RFPの放射スペクトルの波長範囲も含まれている。よって、この有効データには、RFPデータも少しだけ反映されていると考えられる。
- [0045] その後、CPU 37は、ステップS 13で取得した有効データ（551 nm～上限のスペクトル画像データ）と、ステップS 15で取得した有効データ（496 nm～上限のスペクトル画像データ）とを画像処理回路36内のメモリから読み出し、これらの有効データを合成する（ステップS 16）。この合成は、加算（積算）合成であり、これらの有効データのうち、同一チャンネルの同一ピクセルの値同士が加算（積算）される。加算（積算）後に得られるスペクトル画像データ（合成スペクトル画像データ）は、GFPと

RFPとを同時励起したときのスペクトル画像データと同等とみなせる。そこで、CPU37は、合成スペクトル画像データに対し公知のアンミックス演算を施すよう、画像処理回路36へ指示を与える。このアンミックスにより、合成スペクトル画像データに含まれているGFPデータとRFPデータとが完全に分離され、GFPの寄与とRFPの寄与とがそれぞれ正確に既知となる。これらの取得した情報は、必要に応じてモニタ4へと出力される。

[0046] なお、アンミックスに必要な情報（GFPの放射スペクトルとRFPの放射スペクトルの情報）は、前述した励起波長の情報と共に、制御部3に設けられた不図示のインタフェースを介して予め外部から本システムへ入力される。

[0047] 以上、本システムのCPU37は、レーザ光の波長を2つの蛍光試薬（RFP、GFP）の各々の励起波長の間で切り替えながらスペクトルイメージングを2回行い、主にRFPに関するスペクトルデータ（ステップS13の有効データ）と、主にGFPに関するスペクトルデータ（ステップS15の有効データ）とをシーケンシャルに取得する。

[0048] したがって、各々のスペクトルイメージングにおいて、その励起波長に対応するチャンネルを検出波長範囲から外したにも拘わらず、RFPデータの主要部とGFPデータの主要部とを、何れも欠落無く取得することができる。

[0049] また、本システムのCPU37は、励起波長の長いスペクトルイメージング（RFPに関するスペクトルイメージング）を先に行ったので、或る蛍光試薬に関するスペクトルイメージングが他の蛍光試薬に干渉する（退色を招く）という事態は、回避される。したがって、2つの蛍光試薬のスペクトルデータは、それぞれ正確に取得される。

[0050] また、本システムのCPU37は、ステップS15で取得する有効データの波長範囲を、ステップS13で取得する有効データの波長範囲に重複させた上で、両者を合成した。そして、本システムの画像処理回路36は、合成されたスペクトルデータに対しアンミックス演算を施した。したがって、2

つの蛍光試薬のスペクトルデータを、より正確に取得することができる。

[0051] なお、本実施形態のCPU37は、ステップS15で取得する有効データの波長範囲を、ステップS13で取得する有効データの波長範囲に重複させたが、両者の波長範囲を分離させてもよい。その場合、合成の手順（ステップS16）を省略してもよい。例えば、CPU37は、ステップS13で取得した有効データに基づき、標本10におけるRFPの空間分布を示す画像を作成し、ステップS15で取得した有効データに基づき、標本10におけるGFPの空間分布を示す画像を作成し、それらをモニタ4へ表示してもよい。

[0052] [第2実施形態]

以下、本発明の第2実施形態を説明する。本実施形態もスペクトルイメージング蛍光レーザ顕微鏡システムの実施形態である。ここでは、第1実施形態との相違点のみ説明する。相違点は、標本10Aに添加された蛍光試薬と、CPU37の動作とにある。

[0053] 先ず、本実施形態の標本10Aに添加された蛍光試薬を説明する。

[0054] 標本10Aに添加された蛍光試薬は、GFP、RFP、CFPの3種類であり、GFP、RFPに固有の特性は、第1実施形態で説明したとおりである。

[0055] 図6は、CFPに固有の特性を示す図である。図6において、点線で示すのは、吸収スペクトルであり、実線で示すのは、放射スペクトルであり、太い直線で示すのは、励起波長である。図6に示すとおり、CFPの励起波長は、GFP及びRFPのそれよりも短い440nmであり、CFPの放射スペクトルの波長範囲は、約450nmから約600nmである。このようなCFPの標本10Aにおける寄与を本システムで知るためには、440nmのチャンネルを検出波長範囲から外し、440nmのレーザ光で励起しながらスペクトルイメージングを行えばよい。取得されたスペクトル画像データのうち、主として440nmより長波長側のデータに、CFPの寄与を示すデータ（CFPデータ）が現れる。

[0056] 次に、CPU 37の動作手順を説明する。

[0057] 図7は、本実施形態のCPU 37の動作フローチャートである。図7中の各ステップの内容を可視化すると、図8に示すとおりになる。これらの図7、図8に示すとおり、まず、CPU 37は、スペクトルディテクタ24の検出波長範囲を440～600 nm、波長分解能を10 nmに設定する（ステップS21）。この検出波長範囲（440～600 nm）は、CFPの放射スペクトルの主な波長範囲と、GFPの放射スペクトルの主な波長範囲と、RFPの放射スペクトルの主な波長範囲とをカバーし、かつ、CFPの励起波長440 nmから外れている。

[0058] 次に、CPU 37は、遮光板30の遮光先を、543 nmのチャンネルに設定し、そのチャンネルを検出波長範囲から外す（ステップS22）。この波長は、RFPの励起波長である。

[0059] その状態で、CPU 37は、レーザ波長を543 nmに設定し、スペクトルイメージングを行う（ステップS23）。CPU 37は、取得したスペクトル画像データのうち、543 nmよりも長波長側（558 nm～上限）の全データを有効データとみなす。因みに、この543 nmの励起光は、RFPを励起する一方で、それよりも励起波長の短いGFP、CFPを励起しないので、この有効データには、RFPデータのみが反映されていると考えられる。

[0060] 続いて、CPU 37は、遮光板30の遮光先を、488 nmのチャンネルに設定し、そのチャンネルを検出波長範囲から外す（ステップS24）。

[0061] その状態で、CPU 37は、レーザ波長を488 nmに設定し、スペクトルイメージングを行う（ステップS25）。CPU 37は、取得したスペクトル画像データのうち、488 nmよりも長波長側かつ543 nmよりも短波長側のデータ（503 nm～528 nm）を有効データとみなす。因みに、この488 nmの励起光は、GFPを励起するので、この有効データには、GFPデータが反映されている。また、488 nmの励起光は、RFPを少しだけ励起するが、この有効データの波長範囲には、RFPの放射スペク

トルの波長範囲が殆ど含まれない。よって、この有効データには、GFPデータのみが反映されていると考えられる。

[0062] 続いて、CPU37は、遮光板30を退避位置に配置する（ステップS26）。

[0063] その状態で、CPU37は、レーザ波長を440nmに設定し、スペクトルイメージングを行う（ステップS27）。CPU37は、取得したスペクトル画像データのうち、440nmよりも長波長側かつ488nmよりも短波長側のデータ（455nm～473nm）を有効データとみなす（図8参照）。因みに、この440nmの励起光は、CFPを励起するので、この有効データには、CFPデータが反映されている。また、440nmの励起光は、GFPを少しだけ励起するが、この有効データの波長範囲にはGFPの放射スペクトルの波長範囲が殆ど含まれない。よって、この有効データには、CFPデータのみが反映されていると考えられる。

[0064] その後、CPU37は、ステップS23で取得した有効データ（558nm～上限のスペクトル画像データ）を画像処理回路36内のメモリから読み出し、それに基づき標本10におけるRFPの空間分布を示す画像を作成し、それをモニタ4へ表示する。同様に、CPU37は、ステップS25で取得した有効データ（503nm～528nmのスペクトル画像データ）を画像処理回路36内のメモリから読み出し、それに基づき標本10におけるGFPの空間分布を示す画像を作成し、それをモニタ4へ表示する。また、同様に、CPU37は、ステップS27で取得した有効データ（455nm～473nmのスペクトル画像データ）を画像処理回路36内のメモリから読み出し、それに基づき標本10におけるCFPの空間分布を示す画像を作成し、それをモニタ4へ表示する（ステップS28）。

[0065] 以上、本システムのCPU37は、レーザ光の波長を3つの蛍光試薬（RFP、GFP、CFP）の各々の励起波長の間で切り替えながらスペクトルイメージングを3回行い、RFPに関するスペクトルデータ（ステップS23の有効データ）と、GFPに関するスペクトルデータ（ステップS25の

有効データ）と、CFPに関するスペクトルデータ（ステップS27の有効データ）とをシーケンシャルに取得する。

[0066] したがって、各々のスペクトルイメージングにおいて、その励起波長に対応するチャンネルを検出波長範囲から外したにも拘わらず、RFPデータの主要部とGFPデータの主要部とCFPデータの主要部とを、何れも欠落無く取得することができる。

[0067] また、本システムのCPU37は、励起波長の長いスペクトルイメージングを先に行ったので、或る蛍光試薬に関するスペクトルイメージングが他の蛍光試薬に干渉する（退色を招く）という事態は、回避される。したがって、3つの蛍光試薬のスペクトルデータは、正確に取得される。

[0068] なお、本実施形態のCPU37は、ステップS23で取得する有効データの波長範囲（A）と、ステップS25で取得する有効データの波長範囲（B）と、ステップS28で取得する有効データの波長範囲（C）とを分離したが、（B）を長波長側へ拡大して（A）に重複させ、（C）を長波長側へ拡大して（B）及び（A）に重複させてもよい。その場合、3つの有効データを合成し、アンミックス演算を施してもよい。

[0069] [その他]

なお、以上の各実施形態では、蛍光顕微鏡システムを説明したが、本発明は、標本で生じた蛍光のスペクトルデータを取得するときだけでなく、標本で生じた燐光のスペクトルデータを取得するときにも有効である。

[0070] また、以上の各実施形態では、イメージング機能を備えた顕微鏡システムを説明したが、本発明は、標本の代表点（複数又は単一の点）のスペクトルデータを取得するときにも有効である。

[0071] また、以上の各実施形態において、CPU37による処理の一部又は全部を、CPU以外の専用の回路に実行させてもよい。また、CPU37による処理の一部又は全部を、制御部3に接続されたコンピュータに実行させてもよい。その場合、コンピュータが実行するための処理のプログラムを、予めコンピュータへインストールしてもよい。

請求の範囲

- [1] 励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物へ光を照射すると共に、その被観察物から放射される光のスペクトルを検出するスペクトル観察方法であって、
- 前記照射する光の波長を前記複数種類の物質の各々の励起波長の間で切り替えながら、前記励起波長の長い物質のスペクトルデータから順次取得し、
- 前記各物質のスペクトルデータ取得の際は、前記スペクトルの検出波長から、その物質の励起波長を除外すること
- を特徴とするスペクトル観察方法。
- [2] 請求項 1 に記載のスペクトル観察方法において、
- 前記取得した前記スペクトルデータを合成すること
- を特徴とするスペクトル観察方法。
- [3] 励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物へ光を照射する照射手段と、
- 前記被観察物から放射される光のスペクトルを検出する検出手段と、
- 前記照射手段が照射する光の波長を切り替える波長切替手段と、
- を備えたスペクトル観察装置と、
- 前記波長切替手段を制御することにより、前記照射する光の波長を前記複数種類の物質の各々の励起波長の間で切り替えながら、前記励起波長の長い物質のスペクトルデータから順次取得する制御装置と、
- 前記各物質のスペクトルデータ取得の際は、前記スペクトルの検出波長から、その物質の励起波長を排除する可動式遮光機構と、
- を備えたことを特徴とするスペクトル観察システム。
- [4] 励起波長の異なる複数種類の物質を含む被観察物へ光を照射する照射手段と、
- 前記被観察物から放射される光のスペクトルを検出する検出手段と、
- 前記照射手段が照射する光の波長を切り替える波長切替手段と、
- を備えたスペクトル観察装置と、

前記波長切替手段を制御することにより、前記照射する光の波長を前記複数種類の物質の各々の励起波長の間で切り替えながら、前記励起波長の長い物質のスペクトルデータから順次取得する制御装置と、

前記検出手段の検出波長範囲を切り替える範囲切替手段とを備え、

前記制御装置は、

前記範囲切替手段を制御することにより、前記各物質のスペクトルデータ取得の際は、前記スペクトルの検出波長から、その物質の励起波長を排除する

ことを特徴とするスペクトル観察システム。

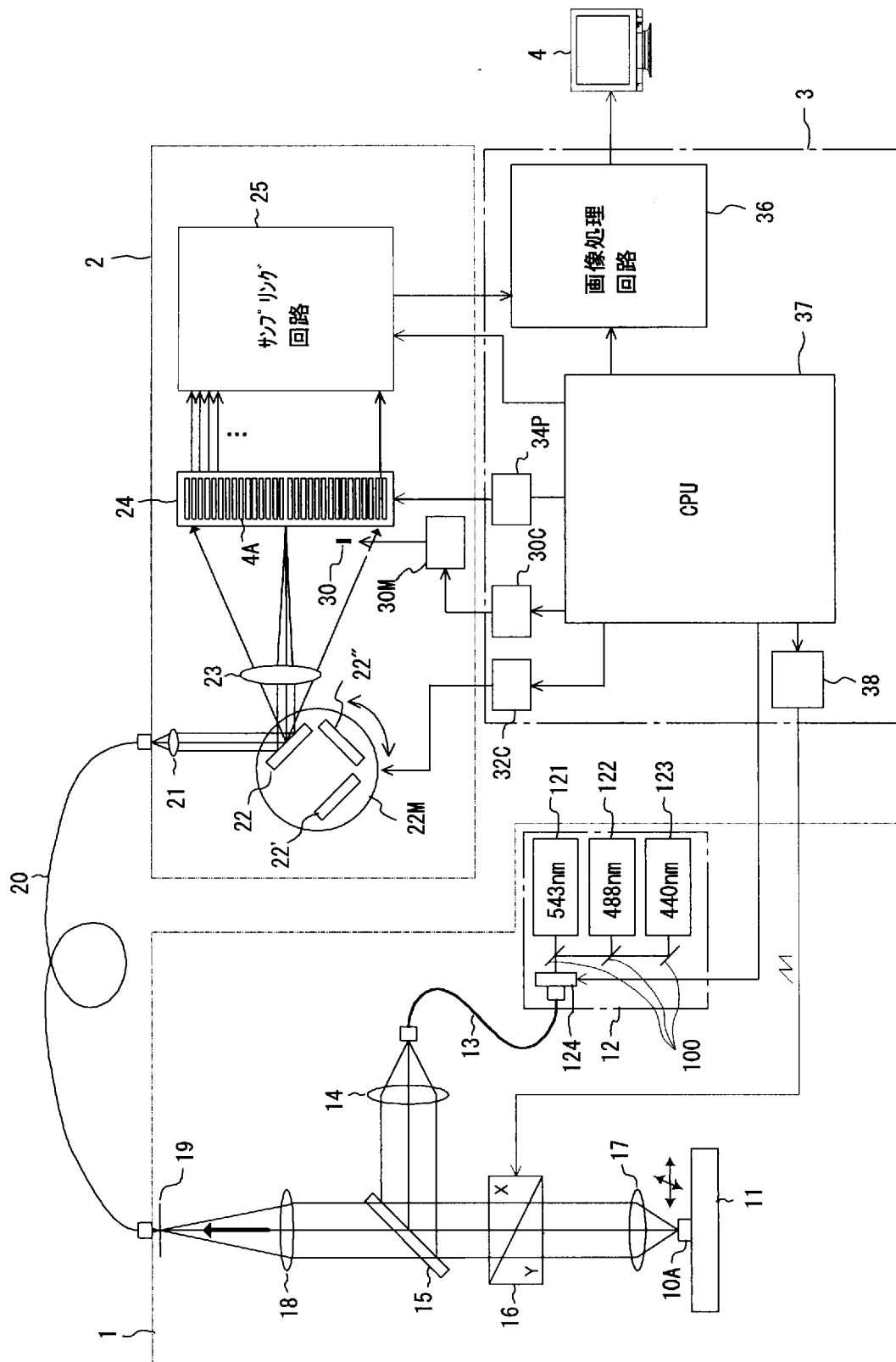
[5] 請求項 3 又は請求項 4 に記載のスペクトル観察システムにおいて、

前記制御装置は、

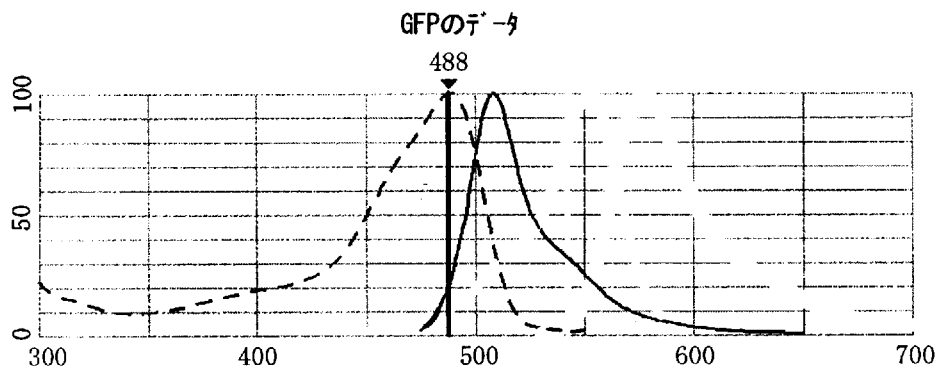
前記取得した前記スペクトルデータを合成する

ことを特徴とするスペクトル観察システム。

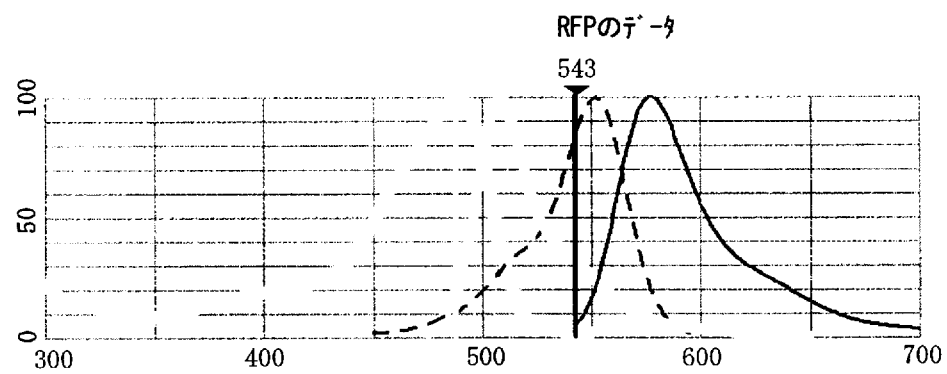
[図1]



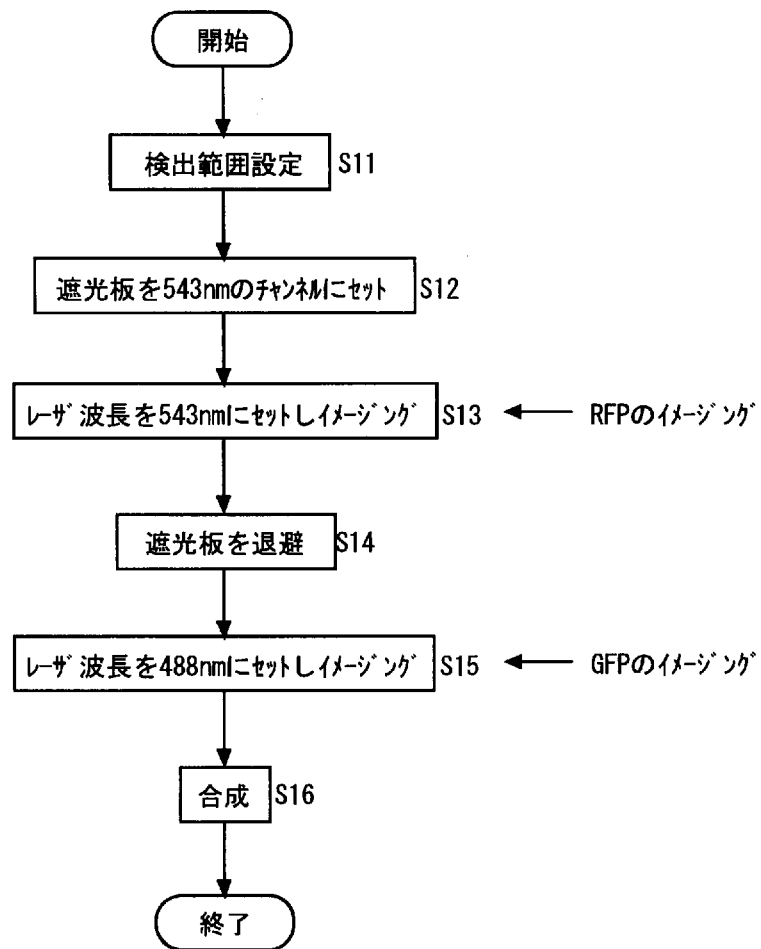
[図2]



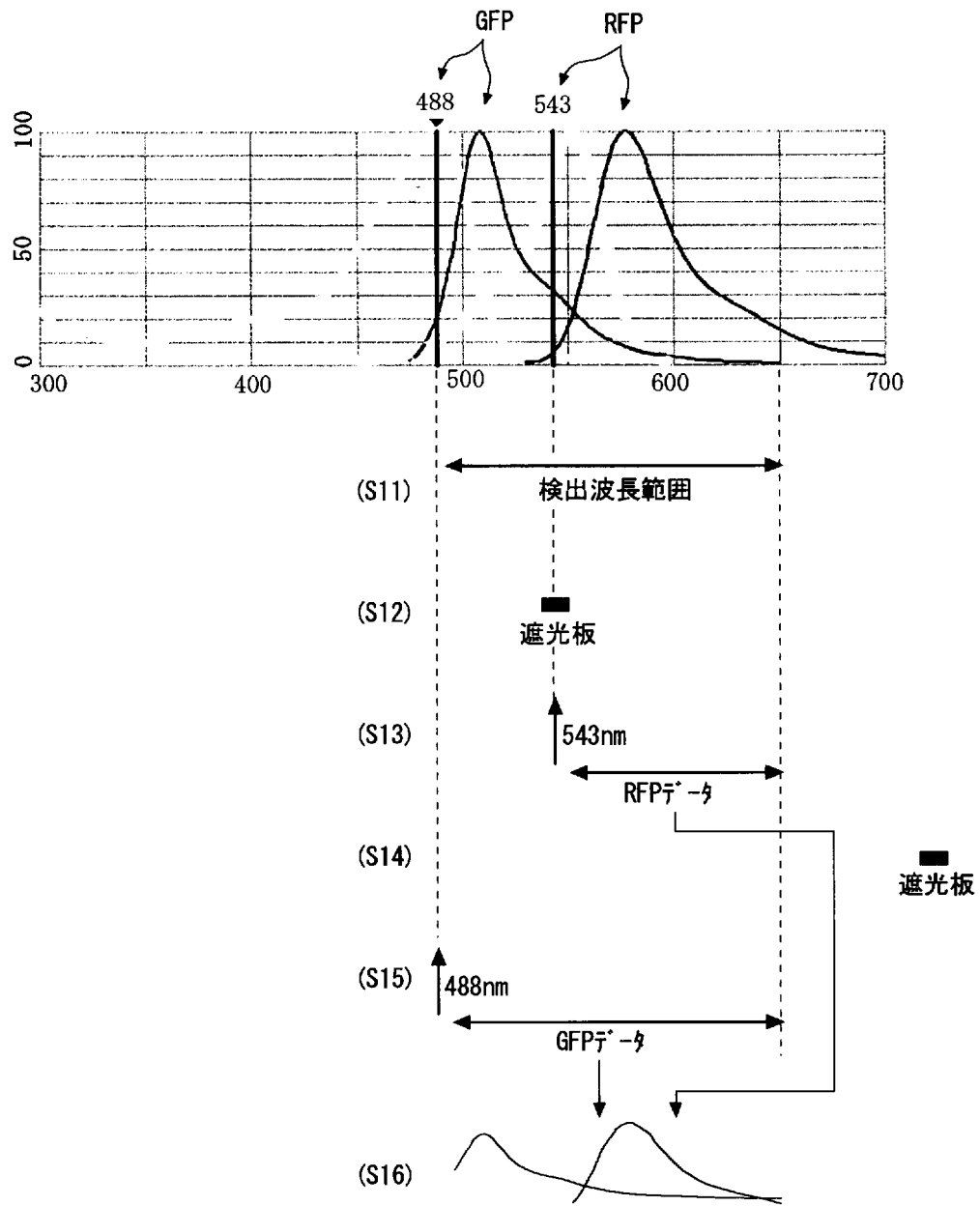
[図3]



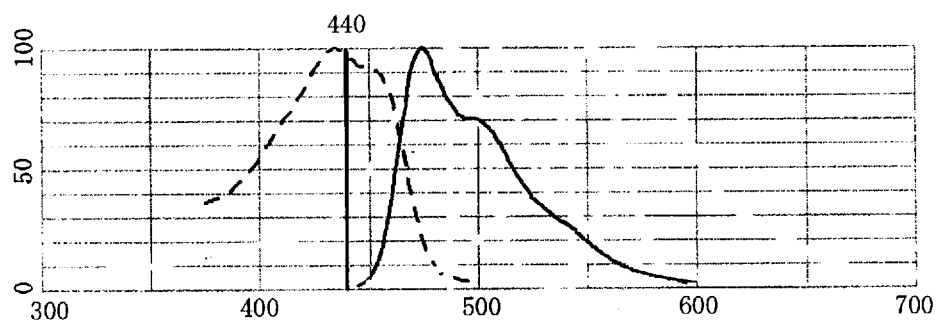
[図4]



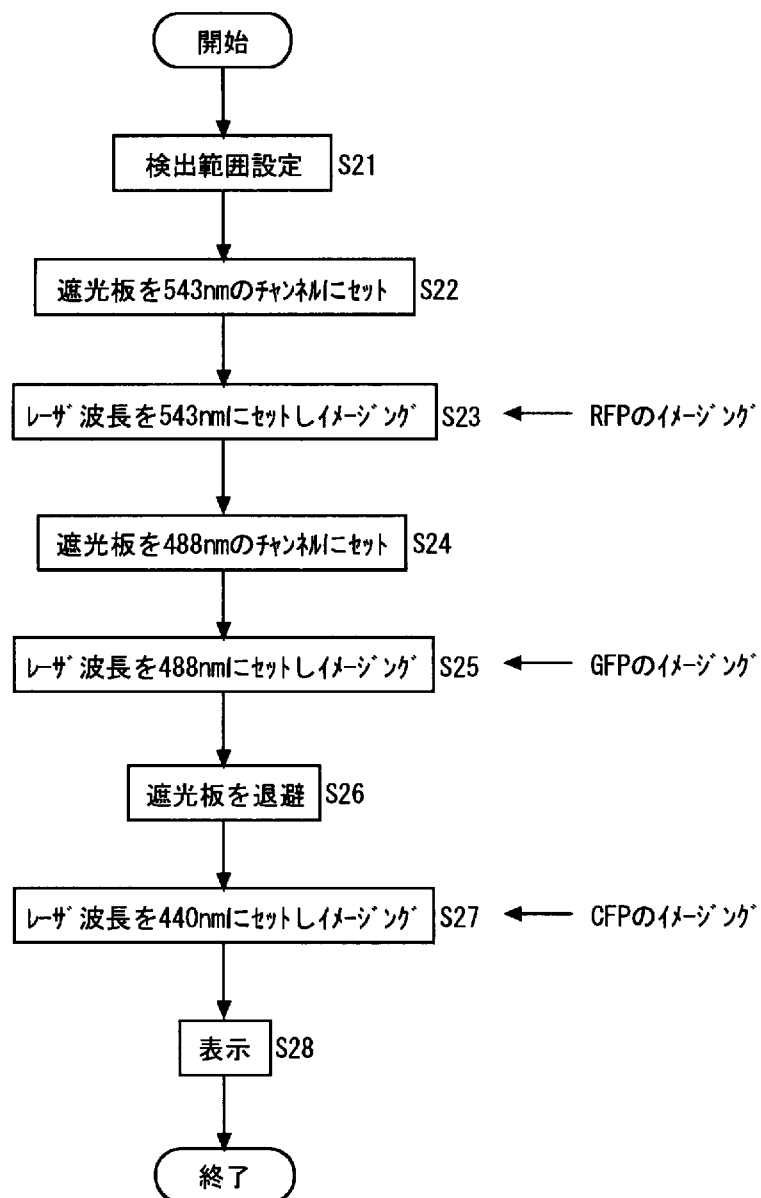
[図5]



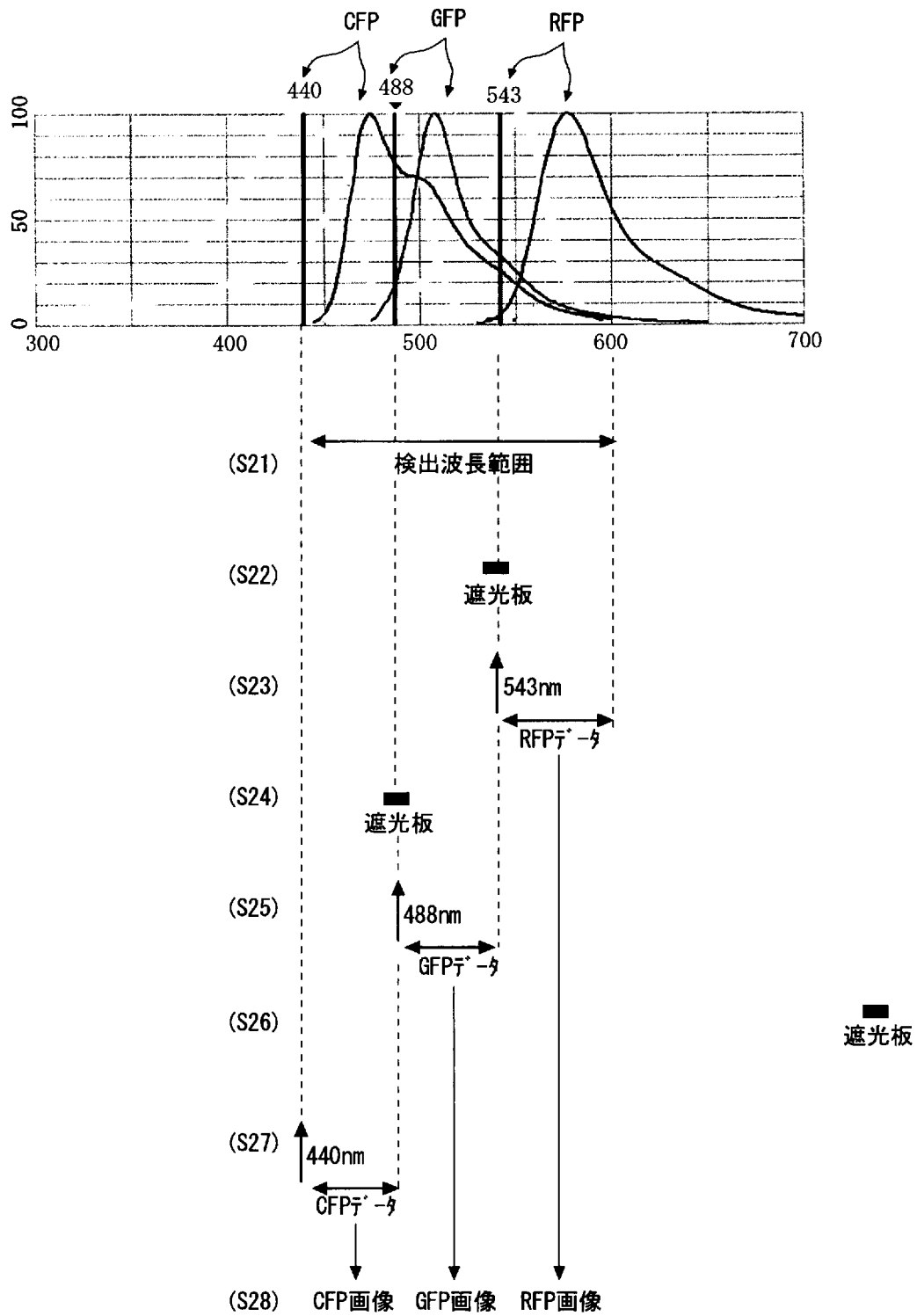
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/000526

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(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-G01N21/74, G01J3/00-G01J3/52, G02B21/00

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

JSTPlus (JDream2), JMEDPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2002-287034 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 03 October, 2002 (03.10.02), Full text; Figs. 1, 3, 6 (Family: none)	1, 3, 4 2, 5
Y	JP 2004-93286 A (Toa DKK Kabushiki Kaisha), 25 March, 2004 (25.03.04), Claim 1; Par. No. [0025] (Family: none)	2, 5
A	JP 2005-524051 A (Beilar Collage of Medisin), 11 August, 2005 (11.08.05), Par. No. [0134] & US 2003/0058440 A1 & WO 2003/021212 A1 & EP 1432966 A	1-5

☐ 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
19 July, 2007 (19.07.07)

Date of mailing of the international search report
31 July, 2007 (31.07.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N21/64(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 (I P C))

Int.Cl. G01N21/62-G01N21/74, G01J3/00-G01J3/52, G02B21/00

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	1971-2007年
日本国実用新案登録公報	1996-2007年
日本国登録実用新案公報	1994-2007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)

JSTPlus(JDream2), JMEDPlus(JDream2)

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 請求の範囲の番号
X Y	JP 2002-287034 A (オリンパス光学工業株式会社) 2002. 10. 03 全文、第 1, 3, 6 図 (ファミリー無し)	1, 3, 4 2, 5
Y	JP 2004-93286 A (東亜ディーケーケー株式会社) 2004. 03. 25 【請求項 1】、【0025】 (ファミリー無し)	2, 5
A	JP 2005-524051 A (ベイラー カレッジ オブ メディシン) 2005. 08. 11, 【0134】 & US 2003/0058440 A1 & WO 2003/021212 A1 & EP 1432966 A	1-5

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

19.07.2007

国際調査報告の発送日

31.07.2007

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A/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)

横井 亜矢子

2W

9706

電話番号 03-3581-1101 内線 3292