

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 4 月 21 日(21.04.2011)

(10) 国際公開番号
WO 2011/046211 A1

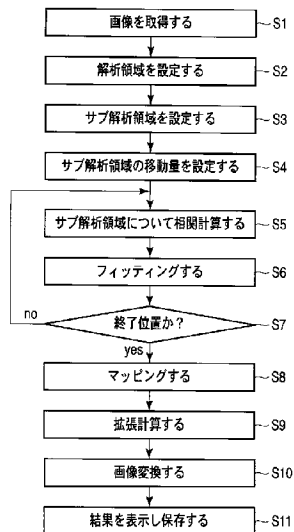
- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G06T 7/20 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/068191
- (22) 国際出願日: 2010 年 10 月 15 日(15.10.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-238441 2009 年 10 月 15 日(15.10.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリ
ンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION)
[JP/JP]; 〒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 鈴榮特許総合事務所内 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

[続葉有]

(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5]



S1 ACQUIRE IMAGE
S2 SET ANALYSIS AREA
S3 SET ANALYSIS SUBAREA
S4 SET MOVING DISTANCE OF ANALYSIS SUBAREA
S5 PERFORM CORRELATIONAL CALCULATION
OF ANALYSIS SUBAREA
S6 PERFORM FITTING
S7 END POSITION?
S8 PERFORM MAPPING
S9 PERFORM EXTENSION CALCULATION
S10 CONVERT IMAGE
S11 DISPLAY AND SAVE RESULT

(57) Abstract: Disclosed is an image analyzing method which comprises acquiring images in an observation area (S1); setting an analysis area in the images in the observation area (S2); setting an analysis subarea smaller than the analysis area (S3); estimating at least either the number of molecules or the diffusion constant of the analysis subarea by intermittently transferring the analysis subarea at pixel intervals over the entire analysis area and by performing correlational analysis using data of pixels within the analysis subarea for each transfer (S4 to S7); and forming an image of the number of molecules or of the diffusion constant by mapping the number of molecules or the diffusion constant (S8).

(57) 要約: S1: 観察領域の画像を取得する。S2: 観察領域の画像に対して解析領域を設定する。S3: 解析領域よりも小さいサブ解析領域を設定する。S4~S7: 解析領域の全体にわたりピクセル間隔をおいてサブ解析領域を断続的に移動させながら、移動のたびにサブ解析領域内のピクセルのデータを使用して相関解析を行なってサブ解析領域の少なくとも分子数または拡散定数のいずれかを推定する。S8: 分子数または拡散定数をマッピングして分子数または拡散定数の画像を形成する。

WO 2011/046211 A1

WO 2011/046211 A1



(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))

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、蛍光相関分光分析法（FCS）と呼ばれる画像解析の手法が知られている。FCSは、たとえば非特許文献1に示されている。FCSでは、試料中の一つまたは複数の測定点に対して、ある程度の時間のあいだ（たとえば10秒間）励起光を継続的に照射し、測定点から発する蛍光の強度の揺らぎを検出して相関解析を行なうことにより、分子数や拡散定数の推定を行なう。

[0003] また、ラスタイメージ相関分光法（RICS：Raster Image Correlation Spectroscopy）と呼ばれる画像解析の手法も知られている。RICSはたとえば非特許文献2に示されている。RICSでは、試料に対して励起光をラスタ走査しながら発生する蛍光を検出することによって蛍光画像を取得する。蛍光画像の各ピクセルのデータは、対応する試料中の点から発生した蛍光の強度の情報を表す。つまり、ピクセルのデータは、それぞれ、取得時間および取得位置が異なる。ピクセルのデータを用いて空間相関解析することによる、拡散定数や分子数を求める。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：「New Concept in Correlator Design」, Klaus Sch-tzel, In st. Phys. Conf. Ser. No.77, P175, 1985.

非特許文献2：「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.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 試料の多数の測定点から得られた情報は、試料内の位置と関連づけて考察するためにも、マッピングして画像化すると好ましい。
- [0006] FCSを用いて、試料に対して多数の測定点を設定して測定を行なって測定結果をマッピングした場合、最初の測定点と最後の測定点間の時間の差は大きく、マッピング結果は、経時変化の影響による大きな誤差を含んだものとなり、信頼性に欠けるものとなる。たとえば、 256×256 の測定点について分子数または拡散定数をマッピングする場合、一つ測定点における分子数または拡散定数を得るために必要な時間を10秒とすると、 $256 \times 256 \times 10$ 秒という長い測定時間を要する。このように長い時間的隔たりがある測定結果をマッピングしても、マッピング結果は実際には意味をもたないものになってしまう。
- [0007] RICSでは、試料中の多数の点から情報を得ているものの、一般的に一枚の画像について一つの情報（たとえば分子数または拡散定数）を算出しているに過ぎない。つまり、走査領域から複数の情報を取得することはしていない。このため、当然ながら、取得した情報をマッピングすることは考慮されない。
- [0008] 本発明の目的は、走査領域から複数の情報を算出してマッピングする新しいRICS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

- [0009] 本発明による画像解析方法は、時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成される観察領域の画像を取得する画像取得ステップと、前記観察領域の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、前記解析領域よりも小さいサブ解析領域を設定するサブ解析領域設定ステップと、前記解析領域の全体にわたりピクセル間隔をおいて前記サブ解析領域を断続的に移動させる移動ステップと、前記移動のたびに前記サブ解析領域内のピクセルのデータを使用して相関解析を行なって前記サ

ブ解析領域の少なくとも分子数または拡散定数のいずれかを推定する相関解析ステップと、前記分子数または拡散定数をマッピングして前記分子数または拡散定数の画像を形成する画像形成ステップとを有している。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、分子数または拡散定数をマッピングして表示するRICSの画像解析方法が提供される。

図面の簡単な説明

- [0011] [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]二次元画像の蛍光画像の例を示す。
[図4]三次元画像の蛍光画像の例を示す。
[図5]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6]二次元の解析領域に対して設定されたサブ解析領域を模式的に示している。
[図7]三次元の解析領域に対して設定されたサブ解析領域を模式的に示している。
[図8]分子数または拡散定数の画像を示している。
[図9]拡張分子数または拡張拡散定数の画像を示している。
[図10]変換前画像と変換後画像との間の座標データの変換を示している。
[図11]変換前画像と変換後画像を示している。

発明を実施するための形態

[0012] 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。

[0013] [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。

[0014] 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1

30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。

[0015] 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ピング・モーターを含んでおり、これらのステッピング・モーターによって試料Sをx y z方向に移動し得る。

[0016] 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。

[0017] 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, ..., 114nは、それぞれ、光源112a, ..., 112n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116a, ..., 116nは、それぞれ、コリメートレンズ114a, ..., 114n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116a, ..., 116n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 112a, ..., 112n 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 116a 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 116n 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。

[0018] 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 $0.6\ \mu\text{m}$ 程度、長さ $2\ \mu\text{m}$ 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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・記憶・表示、解析領域の設定・サブ解析領域の設定・サブ解析領域の移動量の設定などの入力待ち、画像の解析処理（相関値の計算や分子数・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。

[0023] 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 とサブ解析領域調整部 174 と解析処理部 176 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する。

[0024] 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 142 a, ..., 142 n 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記憶する。表示部 168 は、試料 S の蛍光画像や解析処理結果を表示する。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、観察領域や解析領域やサブ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。サブ解析領域調整部 174 は、入力部 170 からの入力情報にしたがって解析領域よりも小さいサブ解析領域を設定する。サブ解析領域調整部 174 はまた、解析領域の全体にわたりピクセル間隔をおいてサブ解析領域を断続的に移動させる。解析処理部 176 は、移動のたびにサブ解析領域内のピクセルのデータを使用して相関解析を行なってサブ解析領域の少なくとも分子数または拡散定数のいずれかを推定する。解析処理部 176 はまた、推定した分子数または拡散定数をマッピングして分子数または拡散定数の画像を形成する。解析処理部 176 はさらに、推定した分子数または拡散定数を二次元または三次元分布を有する拡張関数を用いて拡張計算して拡張分子数または拡張拡散定数を得て、拡張分子数または拡張拡散定数をマッピングして拡張分子数または拡張拡散定数の画像を形成する。さらに解析処理部 176 は、拡張分子数または拡張

拡散定数の位置情報を重み係数として拡張分子数または拡張拡散定数の画像を解析領域と同じ画像サイズに変換する。解析処理部 176 の処理の詳細は後述する。

[0025] 図 1 において、光源 112 a, ..., 112 n から発せられた励起光は、コリメートレンズ 114 a, ..., 114 n とダイクロイックミラー 116 a, ..., 116 n 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、また必要であれば、ラスタ走査されながら、対物レンズ駆動機構 128 によって z 走査される。測定点は観察領域の全体にわたって走査される。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 138 a, ..., 138 n 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 140 a, ..., 140 n によって不所望な成分が除去される。その結果、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が光検出器 142 a, ..., 142 n にそれぞれ入射する。光検出器 142 a, ..., 142 n 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 164 に入力される。画像形成部 164 は、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 内の観察領域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。記憶部 166 に保存された蛍光画像は、そのまま表示部 168 に表示されるか、

解析処理部 176 によって処理され、解析処理結果が表示部 168 に表示される。

[0026] [空間相関計算式]

観察領域の蛍光画像は、時系列的に取得された複数のデータを有する複数のピクセルから構成される。測定点は、実際には、 x y z 方向に空間的広がりを持っており、ピクセルは、この測定点の空間的広がりに対応した大きさを有する。観察領域が二次元的領域である場合、蛍光画像は、 x y 方向に大きさを持つピクセルが二次元的に配列された二次元画像である。また観察領域が三次元的領域である場合、蛍光画像は、 x y z 方向に大きさを持つピクセルが三次元的に配列された三次元画像である。三次元画像はまた、別の見方をすれば、 z 位置の異なる複数フレームの二次元画像から構成される。

[0027] 二次元画像の例を図 3 に示す。図 3 において、 τ_p は、あるピクセルとこれに隣接する次のピクセルとの間の取得時間のずれ（ピクセル時間）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、ある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。

[0028] 次式（1）は、二次元画像に対する 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]

$$G_{sa}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_1(x, y) * I_1(x + \xi, y + \psi) / M_{11}}{(\sum I_1(x, y) / M_1)^2} \quad \dots (1)$$

[0029] ここで、 G_{sa} は R I C S の空間自己相関値、 I_1 はチャンネル 1 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 のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル 1 のデータ総数である。

[0030] また次式（２）は、二次元画像に対する使用するRICSの解析に使用する空間相互相関計算式を表している。式（２）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2]

$$G_{sc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_1(x, y) * I_2(x + \xi, y + \psi) / M_{12}}{(\sum I_1(x, y) / M_1) * (\sum I_2(x, y) / M_2)} \quad \dots(2)$$

[0031] ここで、 G_{sc} はRICSの空間相互相関値、 I_1 はチャンネル１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のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル１のデータ総数、 M_2 はチャンネル２のデータ総数である。

[0032] 次式（３）は、二次元画像に対するRICSの解析に使用するフィッティング式を表している。

[数3]

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

$$S(\xi, \psi) = \exp \left[- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi)}{W_0^2} \right)} \right] \quad \dots(3)$$

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

[0033] ここで、 G_s はRICS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RICSの解析におけるスキンの影響、 G はRICS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、 ξ, ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 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 はライン時間である。

[0034] 三次元画像の例を図4に示す。図4において、 τ_p はピクセル時間、 τ_l はライン時間、 τ_f は、ある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（フレーム時間）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。

[0035] 次式（4）は、三次元画像に対する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（4）は、チャンネル1の自己相関計算式の例である。

[数4]

$$G_{sa}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_1(x, y, z) * I_1(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{11}}{(\sum I_1(x, y, z) / M_1)^2} \quad \dots(4)$$

[0036] ここで、 G_{sa} はR I C Sの空間自己相関値、 I_1 はチャンネル1の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y, z は測定点の空間的座標、 ξ, ψ, η 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のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル1のデータ総数である。

[0037] また次式（5）は、三次元画像に対する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（5）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5]

$$G_{sc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_1(x, y, z) * I_2(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12}}{(\sum I_1(x, y, z) / M_1) \cdot (\sum I_2(x, y, z) / M_2)} \quad \dots(5)$$

[0038] ここで、 G_{sc} はR I C Sの空間相互相関値、 I_1 はチャンネル1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の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y, z は測定点の空間的座標、 ξ, ψ, η 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、 M_1 はチャンネル1のデータ総数、 M_2 はチャンネル2のデータ総数である。

[0039] 次式（６）は、三次元画像に対するRICSの解析に使用するフィッティング式を表している。

[数6]

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

$$S(\xi, \psi, \eta) = \exp \left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\eta \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_\psi \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \dots(6)$$

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

[0040] ここで、 G_s はRICSの空間相関値（空間自己相関値 $G_{s,a}$ または空間相互相関値 $G_{s,c}$ ）、 S はRICSの解析におけるスキヤンの影響、 G はRICS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、 ξ , ψ , η は空間的座標の変化量、 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_ψ はライン時間、 τ_f はフレーム時間である。

[0041] [測定手順]

以下、図５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６～図１１を参照しながら説明する。

[0042] （ステップＳ１）

試料Ｓの観察領域の蛍光画像を取得する。観察領域は二次元の領域または三次元の領域あり、それに対応して蛍光画像は二次元画像または三次元画像である。蛍光画像の各ピクセルのデータは、たとえば、対応する測定点から発せられる蛍光の強度である。

[0043] （ステップＳ２）

観察領域の蛍光画像に対して解析領域を設定する。解析領域は、二次元の観察領域に対しては二次元の領域であり、三次元の観察領域に対しては、通常、三次元の領域であるが、二次元の領域であってもよい。解析領域は、観察領域の一部であってもよく、また観察領域に一致してもよい。たとえば、解析領域は、アプリケーション的にはデフォルトで観察領域に設定されている。

[0044] (ステップS3)

解析領域よりも小さいサブ解析領域を解析領域内に設定する。たとえば図6に示すように、二次元の解析領域 R_a に対しては、サブ解析領域 R_s は二次元の領域である。また図7に示すように、三次元の解析領域 R_a に対しては、領域のサブ解析領域 R_s は三次元の解析領域である。

[0045] (ステップS4)

サブ解析領域の移動量を設定する。サブ解析領域は、解析領域の全体にわたりピクセル間隔をおいてサブ解析領域を断続的に移動される。サブ解析領域は、移動の初期位置として、解析領域の端に設定される。サブ解析領域は解析領域の範囲内で移動される。またサブ解析領域は1ピクセル以上の移動量で移動される。

[0046] サブ解析領域の移動は、たとえば図6の例では、左上の位置を初期位置として次のように行なう。まず、サブ解析領域 R_s を初期位置から x 方向に d_x の移動量で断続的に移動させる。この x 方向の移動はサブ解析領域 R_s の右端が解析領域 R_a の端に到達するまで続ける。 x 方向に1ラインの移動が終了したら、そのラインの最初の位置に対して y 方向に d_y ずれた位置にサブ解析領域 R_s を移動させる。その後、再び同様にしてサブ解析領域 R_s を x 方向に1ライン分移動させる。以降、サブ解析領域 R_s の x 方向の1ラインの移動が終了するたびに、サブ解析領域 R_s を y 方向に移動させる。 y 方向の移動はサブ解析領域 R_s の下端が解析領域 R_a の端に到達するまで続ける。最後にサブ解析領域 R_s を x 方向に1ライン分移動させて終了する。

[0047] また図7の例では、サブ解析領域 R_s の移動は、上述した x y 方向の移動

が終了するたびに、サブ解析領域 R_s を z 方向に d_z 移動させて、上述した $x-y$ 方向の移動を繰り返し行なう。 z 方向の移動はサブ解析領域 R_s の端が解析領域 R_a の端に到達するまで続ける。最後にサブ解析領域 R_s を $x-y$ 方向に 1 フレーム分移動させて終了する。

[0048] (ステップ S5 ~ S7)

解析領域の全体にわたりピクセル間隔においてサブ解析領域を断続的に移動させる。また、移動のたびにサブ解析領域について相関解析を行なう。すなわち、初期位置および各移動後のサブ解析領域について相関解析を行なう。

[0049] (ステップ S5)

サブ解析領域内のピクセルのデータを使用して相関計算を行なう。二次元画像に対しては、空間自己相関値を計算する場合は式 (1) 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 (2) の空間相互相関計算式を使用する。また三次元画像に対しては、空間自己相関値を計算する場合は式 (4) 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 (5) の空間相互相関計算式を使用する。

[0050] 相関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。

[0051] また相関計算に使用するデータは、ピクセル時間、ライン時間、フレーム時間、ピクセル位置関係、ピクセルサイズまたはそれについての統計値であってもよい。

[0052] また相関計算は、ピクセルのデータに基づいて画像をそれぞれ再構成し、再構成した画像について相関計算してもよい。たとえば、隣のピクセルのデ

一タ同士を足して、ピクセルのデータの数をも半分にします。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が増えないが、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。

[0053] (ステップS6)

ステップS5の相関計算の結果に対してフィッティングを行なって、サブ解析領域の少なくとも分子数または拡散時間のいずれかを推定をする。二次元画像に対しては式(3)のフィッティング式を使用し、三次元画像に対しては式(6)のフィッティング式を使用する。

[0054] 具体的には、式(1)と式(2)または式(3)と式(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(3)または式(6)を使用して、拡散定数と分子数を求める。

[0055] 式(3)および式(6)において、遅延時間がゼロのときはそれぞれ($\xi=0$, $\psi=0$)および($\xi=0$, $\psi=0$, $\eta=0$)、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。これを新たに、式(3)および式(6)に代入することにより、各遅延時間に対応した拡散定数を求めることができる。

[0056] 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(3)または式(6)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、二次元または三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。

[0057] 拡散定数と拡散時間との間には、次式(7)で表される関係がある。したがって、求めた拡散定数から拡散時間を求めることができる。

[数7]

$$\tau = W_0^2 / 4D \quad \dots(7)$$

[0058] (ステップS 7)

サブ解析領域の位置が終了位置であるか判断する。サブ解析領域の位置が終了位置でない場合には、サブ解析領域を次の位置に移動させてステップS 5に戻る。またサブ解析領域の位置が終了位置である場合には、次のステップS 8に進む。

[0059] ステップS 7が終了した時点で、サブ解析領域のそれぞれの位置における複数の分子数または拡散定数が得られる。

[0060] (ステップS 8)

分子数または拡散定数をマッピングして分子数または拡散定数の画像を形成する。分子数または拡散定数の画像を図8に示す。

[0061] (ステップS 9)

分子数または拡散定数を二次元または三次元分布を有する拡張関数を用いて拡張計算して拡張分子数または拡張拡散定数を得る。拡張関数は、これに限らないが、たとえば、ガウシアン関数であってよい。拡張分子数または拡張拡散定数は分子数または拡散定数の分布であり、その分布範囲はサブ解析領域よりも広い範囲となるように選ばれる。また、拡張分子数または拡張拡散定数をマッピングして拡張分子数または拡張拡散定数の画像を形成する。拡張分子数または拡張拡散定数の画像を図9に示す。このように分子数または拡散定数に対して拡張計算を行なうことによって、図8の画像に比べて輝度変化の滑らかな画像が得られる。

[0062] たとえば、図6の例において、解析領域R aの画像サイズを256ピクセル×256ピクセル、サブ解析領域R sの画像サイズを64ピクセル×64ピクセル、サブ解析領域R sの移動量d x, d yをそれぞれd x=1ピクセル, d y=1ピクセルとした場合、192×192の分子数または拡散定数が得られる。その結果、拡張分子数または拡張拡散定数の画像I aの画像サ

イズは192ピクセル×192ピクセルであり、解析領域R_aの画像サイズである256ピクセル×256ピクセルよりも小さい。

[0063] 拡張分子数または拡張拡散定数の画像I_aは、元の解析領域R_aの画像と比較検討することを考慮すると、両者の空間位置情報が一致していることが望ましい。すなわち、拡張分子数または拡張拡散定数の画像I_aは、画像サイズが元の解析領域R_aの画像と一致していることが望ましい。

[0064] (ステップS10)

拡張分子数または拡張拡散定数の位置情報を重み係数として拡張分子数または拡張拡散定数の画像を解析領域と同じ画像サイズに変換する。

[0065] たとえば、図9の例では、拡張分子数または拡張拡散定数の画像I_aを、192×192の画像サイズから256×256の画像サイズに変更する。続く説明では、192×192の画像サイズの画像を変換前画像と呼び、256×256の画像サイズの画像を変換後画像と呼ぶ。変換前画像と変換後画像との間の座標データの変換を図10に示す。

[0066] まず、図10に示すように、変換前画像の座標の単位升目の四隅に位置するピクセルデータa, b, c, dの座標をそれぞれa (X_a, Y_a), b (X_b, Y_b), c (X_c, Y_c), d (X_d, Y_d)とする。また、変換前画像の縦軸と変換後画像の横軸とが交差する点であって、a (X_a, Y_a)とb (X_b, Y_b)の間に位置する点の座標をe (X_e, Y_e)、c (X_c, Y_c)とd (X_d, Y_d)の間に位置する点の座標をf (X_f, Y_f)とする。さらにa (X_a, Y_a), b (X_b, Y_b), c (X_c, Y_c), d (X_d, Y_d)によって囲まれる変換後画像の座標をg (X_g, Y_g)とする。

[0067] aとbからe (X_e, Y_e)のピクセルデータeを算出する。ピクセルデータeは、 $e = (b(Y_b - Y_e) + a(Y_e - Y_a)) / (Y_b - Y_a)$ で求められる。また、cとdからf (X_f, Y_f)のピクセルデータfを算出する。ピクセルデータfは、 $f = (d(Y_d - Y_f) + c(Y_f - Y_c)) / (Y_d - Y_c)$ で求められる。

[0068] e と f から g (X_g, Y_g) のピクセルデータ g を算出する。ピクセルデータ g は、 $g = (e (X_e - X_g) + f (X_g - X_f)) / (X_e - X_f)$ で求められる。

[0069] この変換を変換前画像のすべてのピクセルデータに適用することにより、 256×256 の画像サイズの変換後画像が得られる。変換前画像と変換後画像を図 11 に示す。

[0070] (ステップ S 11)

分子数または拡散定数の画像または拡張分子数または拡張拡散定数の画像を表示し保存する。

符号の説明

[0071] 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…サブ解析領域調整部、176…解析処理部、180…ステージ制御部、190…試料ステージ。

請求の範囲

- [請求項1] 時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成される観察領域の画像を取得する画像取得ステップと、
- 前記観察領域の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、
- 前記解析領域よりも小さいサブ解析領域を設定するサブ解析領域設定ステップと、
- 前記解析領域の全体にわたりピクセル間隔において前記サブ解析領域を断続的に移動させる移動ステップと、
- 前記移動のたびに前記サブ解析領域内のピクセルのデータを使用して相関解析を行なって前記サブ解析領域の少なくとも分子数または拡散定数のいずれかを推定する相関解析ステップと、
- 前記分子数または拡散定数をマッピングして前記分子数または拡散定数の画像を形成する画像形成ステップとを有している画像解析方法。
- [請求項2] 前記観察領域の画像は二次元または三次元画像である請求項1に記載の画像解析方法。
- [請求項3] 前記移動ステップは、前記解析領域の範囲内で前記サブ解析領域を移動させる請求項1に記載の画像解析方法。
- [請求項4] 前記移動ステップは、1ピクセル以上の移動量で前記サブ解析領域を移動させる請求項1に記載の画像解析方法。
- [請求項5] 前記相関解析ステップは、蛍光強度、ピクセル時間、ライン時間、フレーム時間、ピクセル位置関係、ピクセルサイズまたはそれについての統計値を使用して前記相関解析を行なう請求項1に記載の画像解析方法。
- [請求項6] 前記相関解析ステップは、前記データの平均値、最大値、最小値、相対差または絶対差のいずれかを使用して前記相関解析を行なう請求項1に記載の画像解析方法。

[請求項7] 前記相関解析ステップは、前記データを再構成して得た再構成データを使用して前記相関解析を行なう請求項1に記載の画像解析方法。

[請求項8] 前記相関解析ステップは、下記の式(1)または式(2)を用いて相関計算を行ない、前記相関計算の結果に対して下記の式(3)を用いてフィッティングを行なって二次元解析領域の前記分子数または拡散定数を推定する請求項1に記載の画像解析方法、

[数1]

$$G_{sa}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_1(x, y) * I_1(x + \xi, y + \psi) / M_{11}}{(\sum I_1(x, y) / M_1)^2} \quad \dots(1)$$

ここで、 G_{sa} はRICSの空間自己相関値、 I_1 はチャンネル1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のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル1のデータ総数である、

[数2]

$$G_{sc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_1(x, y) * I_2(x + \xi, y + \psi) / M_{12}}{(\sum I_1(x, y) / M_1) \cdot (\sum I_2(x, y) / M_2)} \quad \dots(2)$$

ここで、 G_{sc} はRICSの空間相互相関値、 I_1 はチャンネル1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のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル1のデータ総数、 M_2 はチャンネル2のデータ総数である、

[数3]

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

$$S(\xi, \psi) = \exp \left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \dots(3)$$

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

ここで、 G_s はR I C Sの空間相関値、 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、 ξ 、 ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 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 はライン時間である。

[請求項9]

前記相関解析ステップは、下記の式（４）または式（５）を用いて相関計算を行ない、前記相関計算の結果に対して下記の式（６）を用いてフィッティングを行なって三次元解析領域の前記分子数または拡散定数を推定する請求項１に記載の画像解析方法、

[数4]

$$G_{sa}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_1(x, y, z) * I_1(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{11}}{\left(\sum I_1(x, y, z) / M_1 \right)^2} \quad \dots(4)$$

ここで、 G_{sa} はR I C Sの空間自己相関値、 I_1 はチャンネル１の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x 、 y 、 z は測定点の空間的座標、 ξ 、 ψ 、 η 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のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル１のデータ総数である、

[数5]

$$G_{sc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_1(x, y, z) * I_2(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12}}{(\sum I_1(x, y, z) / M_1) \cdot (\sum I_2(x, y, z) / M_2)} \quad \dots(5)$$

ここで、 G_{sc} はR I C Sの空間相互相関値、 I_1 はチャンネル1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の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y, z は測定点の空間的座標、 ξ, ψ, η 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、 M_1 はチャンネル1のデータ総数、 M_2 はチャンネル2のデータ総数である、

[数6]

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

$$S(\xi, \psi, \eta) = \exp \left[- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\eta \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)} \right] \quad \dots(6)$$

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

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、 ξ, ψ, η は空間的座標の変化量、 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10]

前記分子数または拡散定数を二次元または三次元分布を有する拡張関数を用いて拡張計算して拡張分子数または拡張拡散定数を得る拡張

計算ステップと、

前記拡張分子数または拡張拡散定数をマッピングして前記拡張分子数または拡張拡散定数の画像を形成する拡張画像形成ステップとをさらに有している請求項 1 に記載の画像解析方法。

[請求項11] 前記拡張分子数または拡張拡散定数の位置情報を重み係数として前記拡張分子数または拡張拡散定数の画像を前記解析領域と同じ画像サイズに変換する画像変換ステップをさらに有している請求項 10 に記載の画像解析方法。

[請求項12] 前記分子数または拡散定数の画像または前記拡張分子数または拡張拡散定数の画像を表示する表示ステップをさらに有している請求項 11 に記載の画像解析方法。

[請求項13] 時系列的に取得された複数のデータをそれぞれ有する複数のピクセルから構成される観察領域の画像を取得する画像取得部と、

前記観察領域の画像に対して解析領域を設定する解析領域設定部と、

前記解析領域よりも小さいサブ解析領域を設定するとともに、前記解析領域の全体にわたりピクセル間隔をおいて前記サブ解析領域を断続的に移動させるサブ解析領域調整部と、

前記移動のたびに前記サブ解析領域内のピクセルのデータを使用して相関解析を行なって前記サブ解析領域の少なくとも分子数または拡散定数のいずれかを推定するとともに、前記分子数または拡散定数をマッピングして前記分子数または拡散定数の画像を形成する解析処理部とを有している画像解析装置。

[請求項14] 前記観察領域の画像は二次元または三次元画像である請求項 13 に記載の画像解析装置。

[請求項15] 前記サブ解析領域調整部は、前記解析領域の範囲内で前記サブ解析領域を移動させる請求項 13 に記載の画像解析装置。

[請求項16] 前記サブ解析領域調整部は、1 ピクセル以上の移動量で前記サブ解

析領域を移動させる請求項 13 に記載の画像解析装置。

[請求項17] 前記解析処理部は、蛍光強度、ピクセル時間、ライン時間、フレーム時間、ピクセル位置関係、ピクセルサイズまたはそれについての統計値を使用して前記相関解析を行なう請求項 13 に記載の画像解析装置。

[請求項18] 前記解析処理部は、前記データの平均値、最大値、最小値、相対差または絶対差のいずれかを使用して前記相関解析を行なう請求項 13 に記載の画像解析装置。

[請求項19] 前記解析処理部は、前記データを再構成して得た再構成データを使用して前記相関解析を行なう請求項 13 に記載の画像解析装置。

[請求項20] 前記解析処理部は、下記の式（1）または式（2）を用いて相関計算を行ない、前記相関計算の結果に対して下記の式（3）を用いてフィッティングを行なって二次元解析領域の前記分子数または拡散定数を推定する請求項 13 に記載の画像解析装置、

[数7]

$$G_{sa}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_1(x, y) * I_1(x + \xi, y + \psi) / M_{11}}{(\sum I_1(x, y) / M_1)^2} \quad \dots(1)$$

ここで、 G_{sa} は R I C S の空間自己相関値、 I_1 はチャンネル 1 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 のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル 1 のデータ総数である、

[数8]

$$G_{sc}(\xi, \psi) = \frac{\sum I_1(x, y) * I_2(x + \xi, y + \psi) / M_{12}}{(\sum I_1(x, y) / M_1) \cdot (\sum I_2(x, y) / M_2)} \quad \dots(2)$$

ここで、 G_{sc} は R I C S の空間相互相関値、 I_1 はチャンネル 1 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のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル1のデータ総数、 M_2 はチャンネル2のデータ総数である、

[数9]

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

$$S(\xi, \psi) = \exp \left[- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi)}{W_0^2} \right)} \right] \quad \dots(3)$$

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

ここで、 G_s はR I C Sの空間相関値、 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、 ξ 、 ψ は測定点からの空間的座標の変化量、 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 はライン時間である。

[請求項21]

前記解析処理部は、下記の式（4）または式（5）を用いて相関計算を行ない、前記相関計算の結果に対して下記の式（6）を用いてフィッティングを行なって三次元解析領域の前記分子数または拡散定数を推定する請求項13に記載の画像解析装置、

[数10]

$$G_{sa}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_1(x, y, z) * I_1(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{11}}{(\sum I_1(x, y, z) / M_1)^2} \quad \dots(4)$$

ここで、 G_{sa} はR I C Sの空間自己相関値、 I_1 はチャンネル1の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x 、 y 、 z は測定点の空間的座標、 ξ 、 ψ 、 η 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のデータの積和計算の回数、 M_1 はチャンネル1のデータ総数

である、

[数11]

$$G_{sc}(\xi, \psi, \eta) = \frac{\sum I_1(x, y, z) * I_2(x + \xi, y + \psi, z + \eta) / M_{12}}{(\sum I_1(x, y, z) / M_1) \cdot (\sum I_2(x, y, z) / M_2)} \quad \dots(5)$$

ここで、 G_{sc} はRICSの空間相互相関値、 I_1 はチャンネル1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の蛍光強度データ（ピクセルのデータ）、 x, y, z は測定点の空間的座標、 ξ, ψ, η 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、 M_1 はチャンネル1のデータ総数、 M_2 はチャンネル2のデータ総数である、

[数12]

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

$$S(\xi, \psi, \eta) = \exp \left(- \frac{\frac{1}{2} * \left[\left(\frac{2\xi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\psi \delta_r}{W_0} \right)^2 + \left(\frac{2\eta \delta_r}{W_0} \right)^2 \right]}{\left(1 + \frac{4D(\tau_p \xi + \tau_l \psi + \tau_f \eta)}{W_0^2} \right)} \right) \quad \dots(6)$$

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

ここで、 G_s はRICS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RICSの解析におけるスキンの影響、 G はRICS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、 ξ, ψ, η は空間的座標の変化量、 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22]

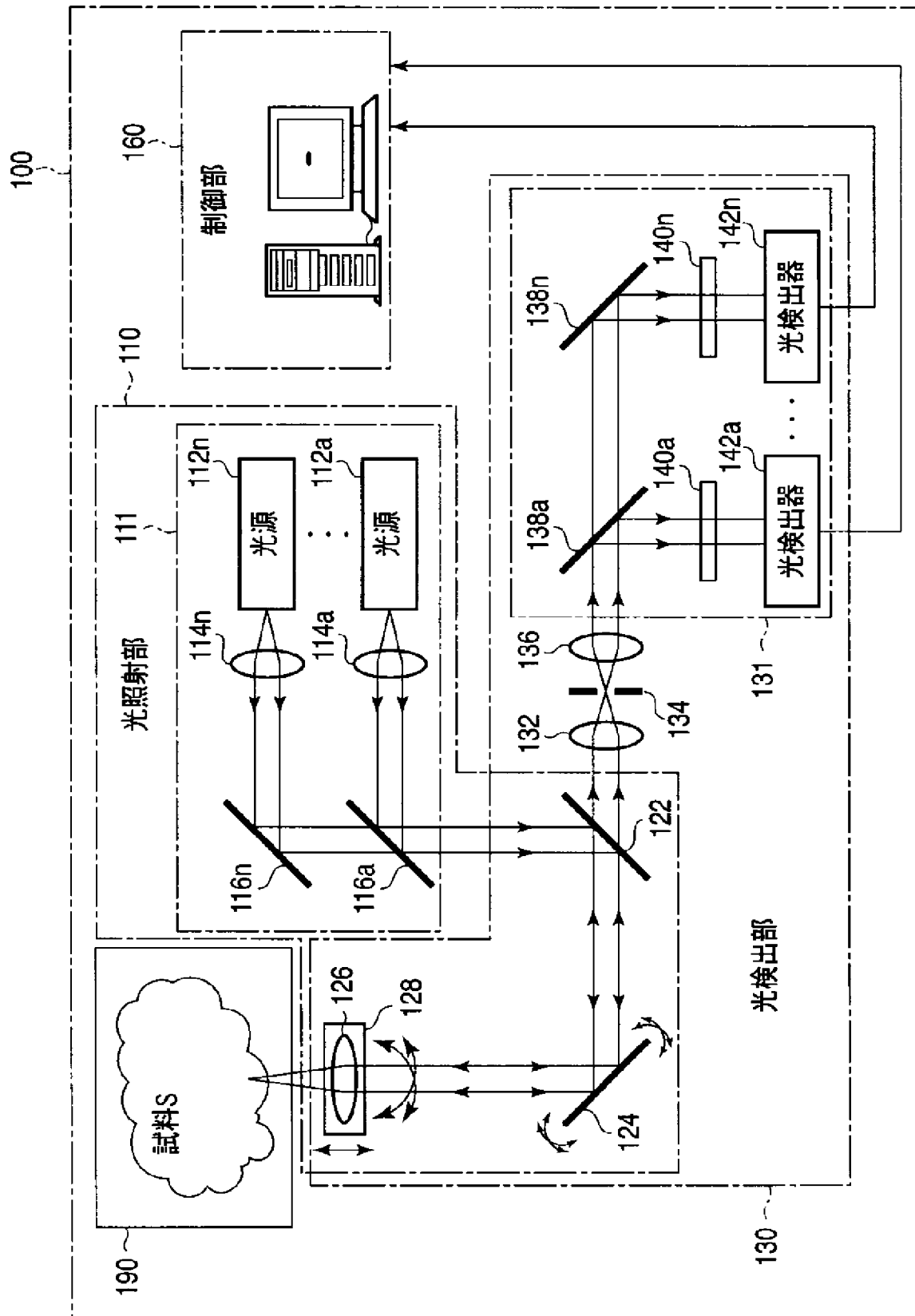
前記解析処理部はさらに、前記分子数または拡散定数を二次元また

は三次元分布を有する拡張関数を用いて拡張計算して拡張分子数または拡張拡散定数を得るとともに、前記拡張分子数または拡張拡散定数をマッピングして前記拡張分子数または拡張拡散定数の画像を形成する請求項 13 に記載の画像解析装置。

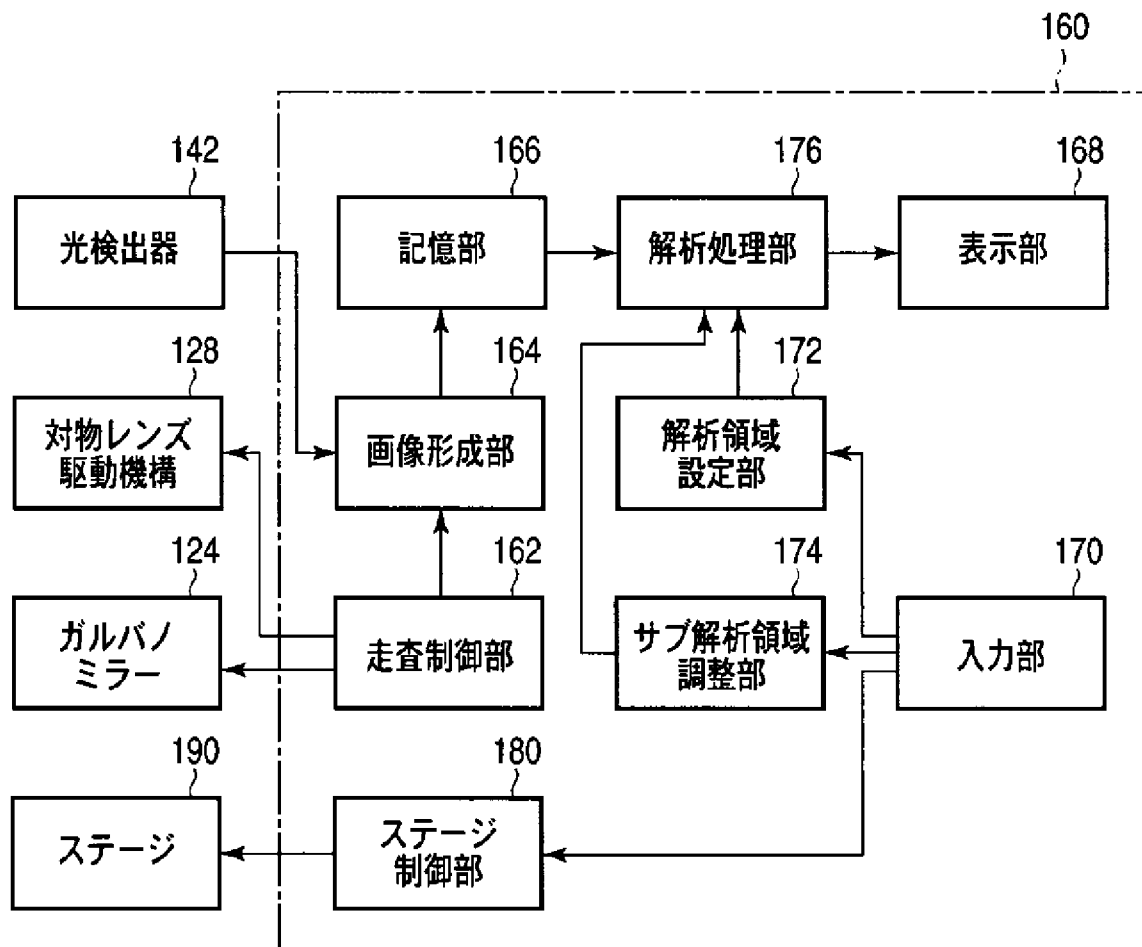
[請求項23] 前記解析処理部はさらに、前記拡張分子数または拡張拡散定数の位置情報を重み係数として前記拡張分子数または拡張拡散定数の画像を前記解析領域と同じ画像サイズに変換する請求項 22 に記載の画像解析装置。

[請求項24] 前記分子数または拡散定数の画像または前記拡張分子数または拡張拡散定数の画像を表示する表示部をさらに有している請求項 23 に記載の画像解析装置。

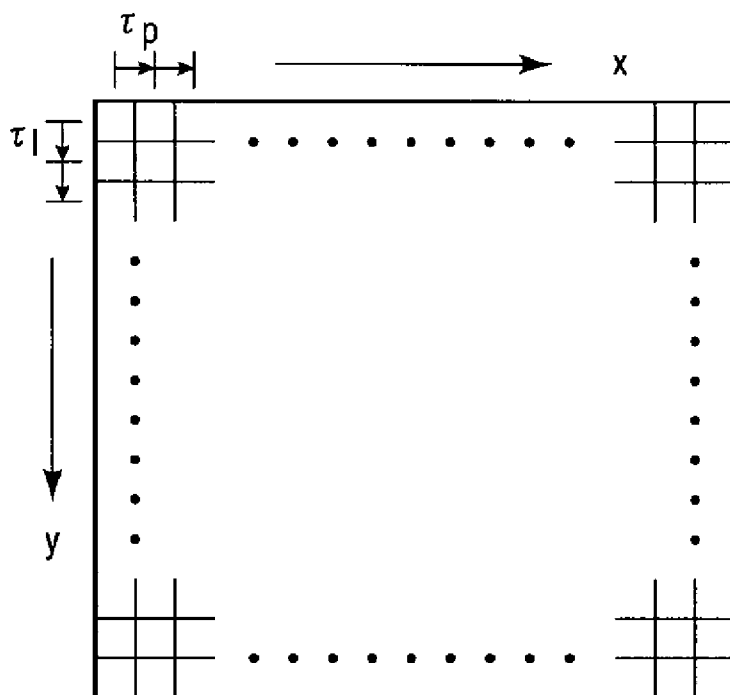
[図1]



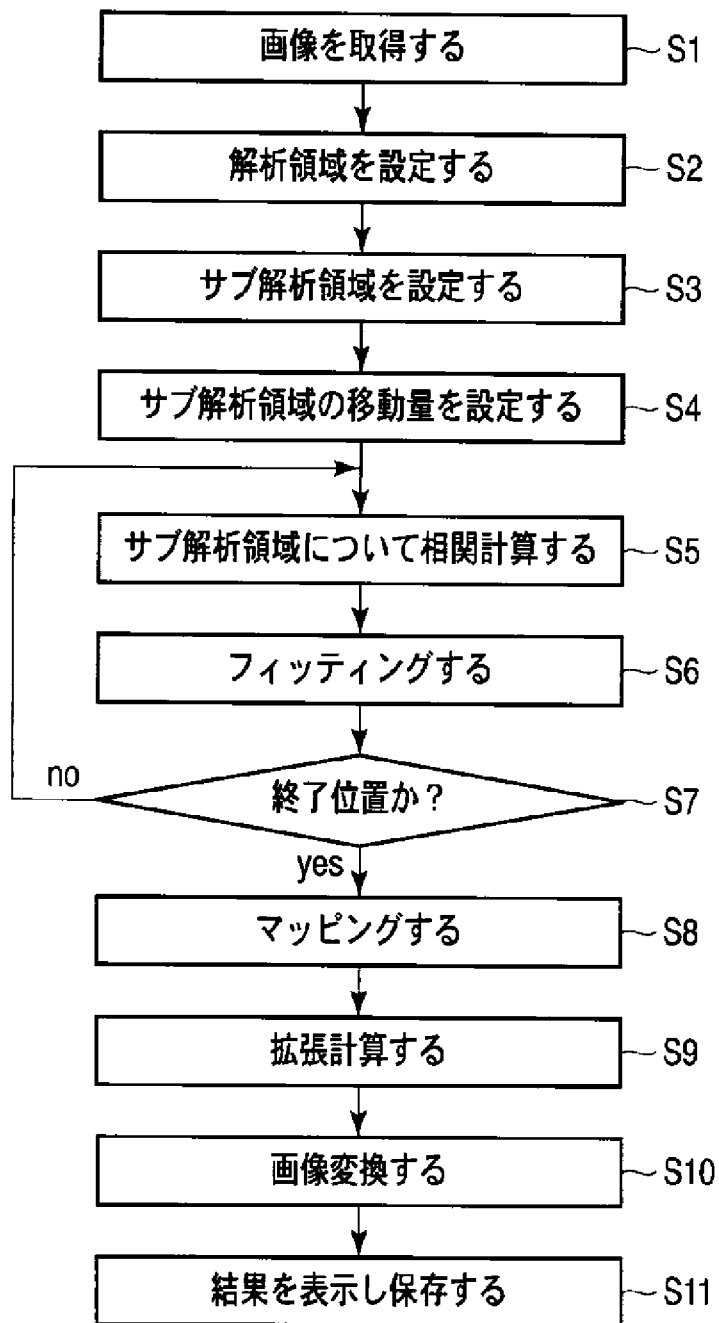
[図2]



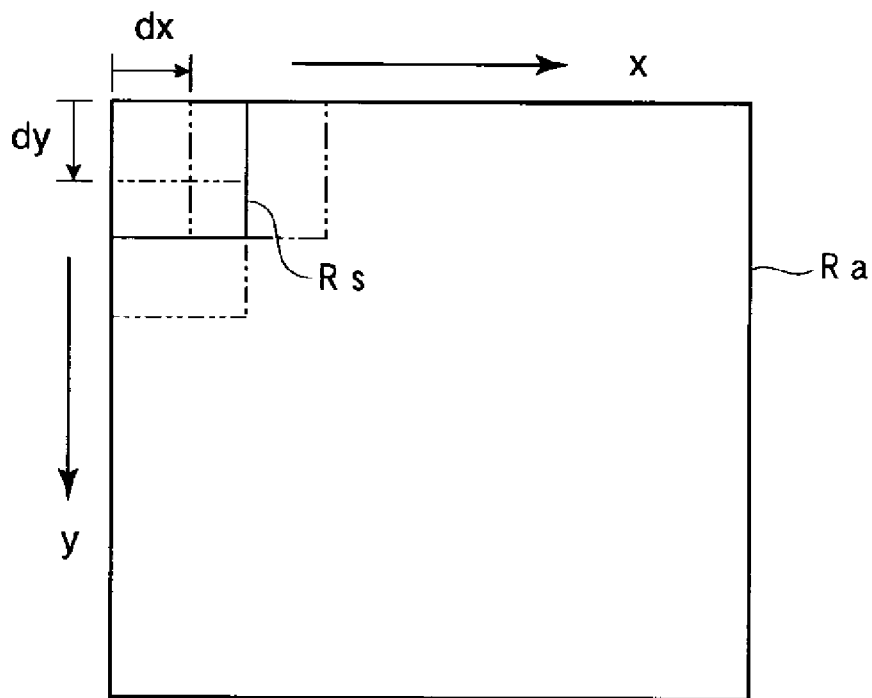
[図3]



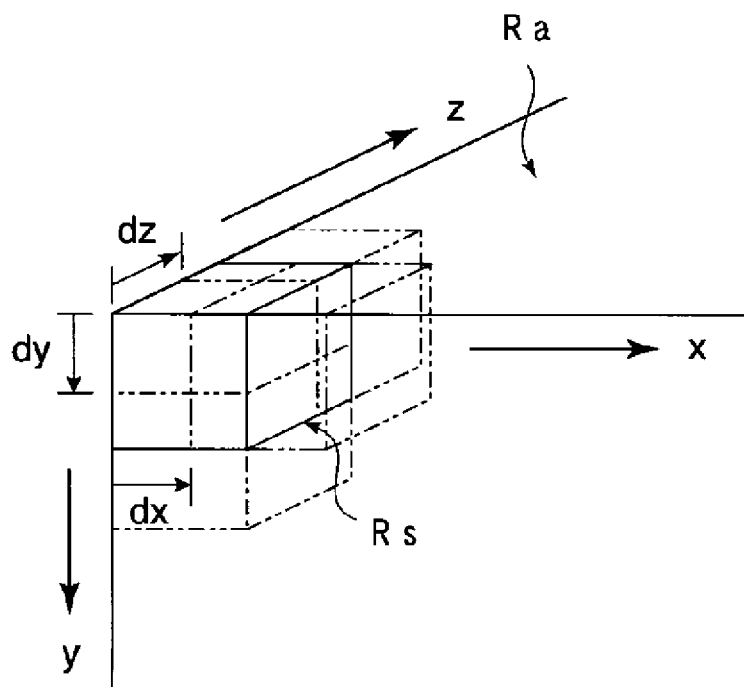
[図5]



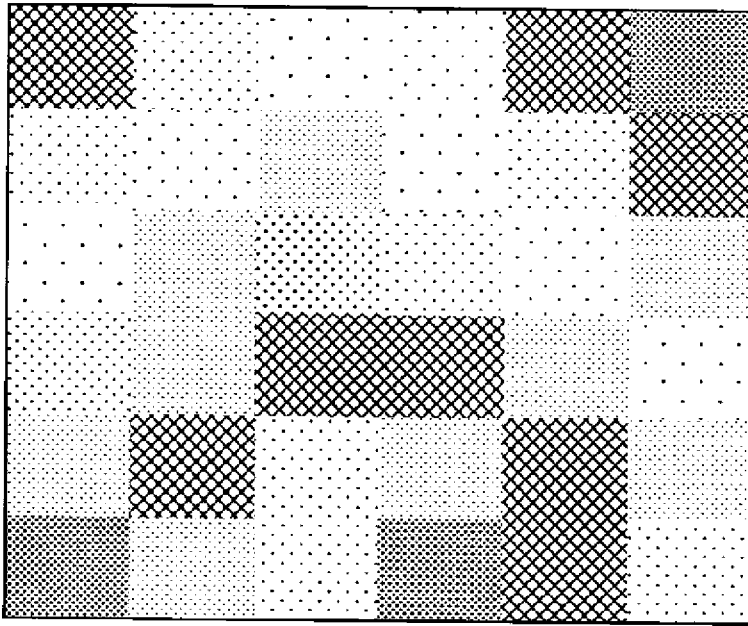
[図6]



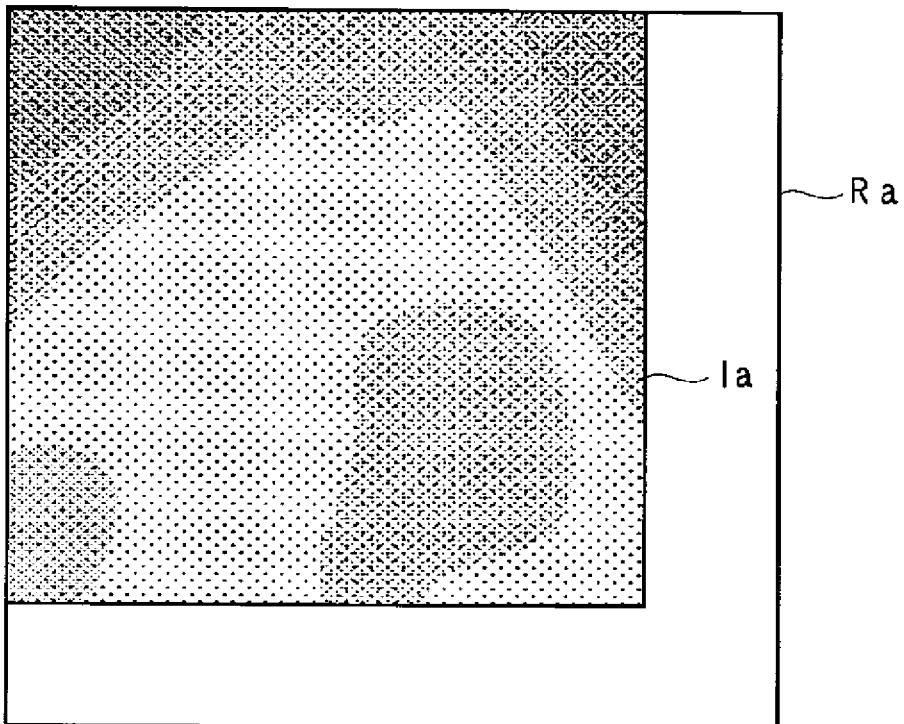
[図7]



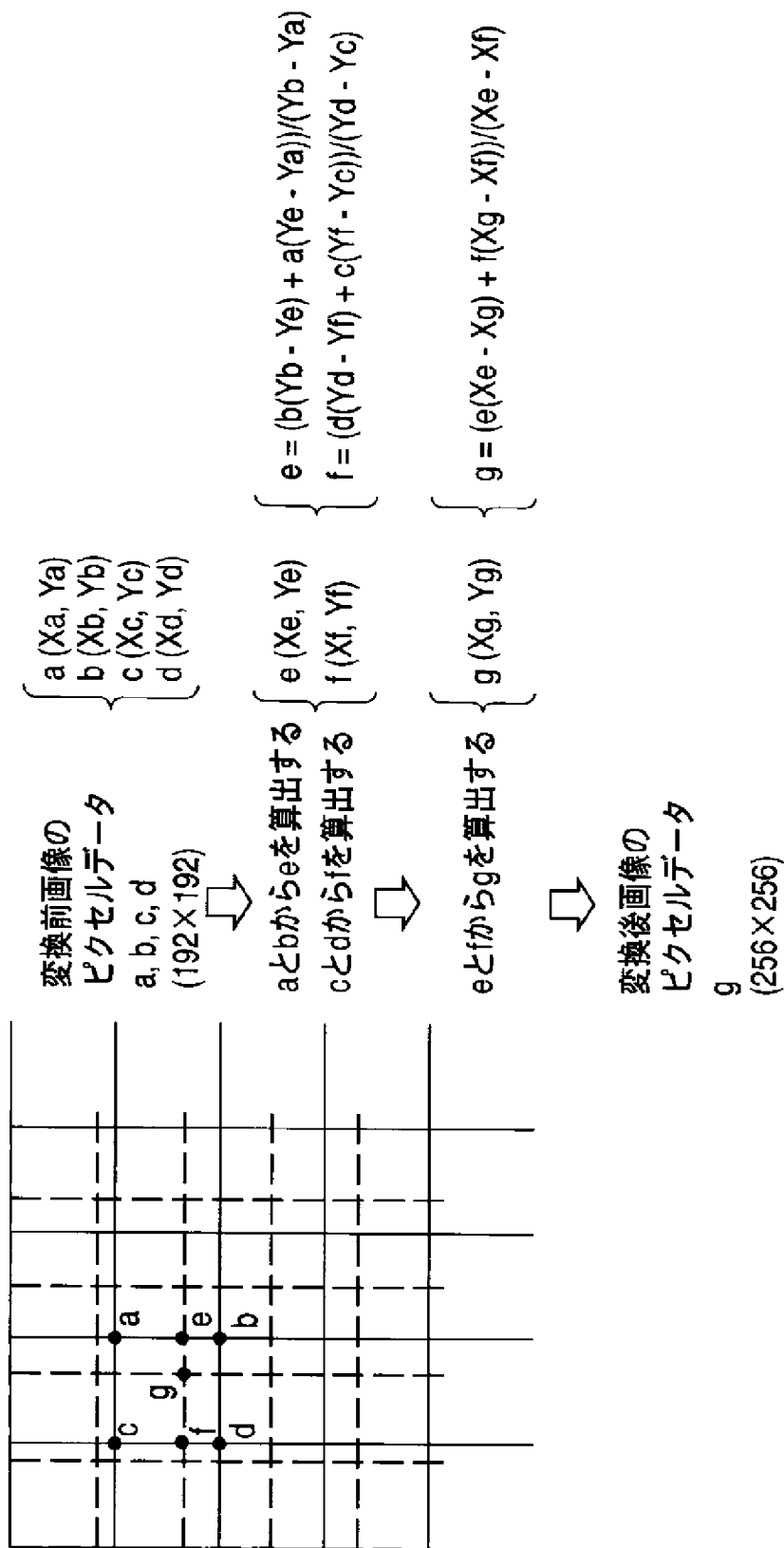
[図8]



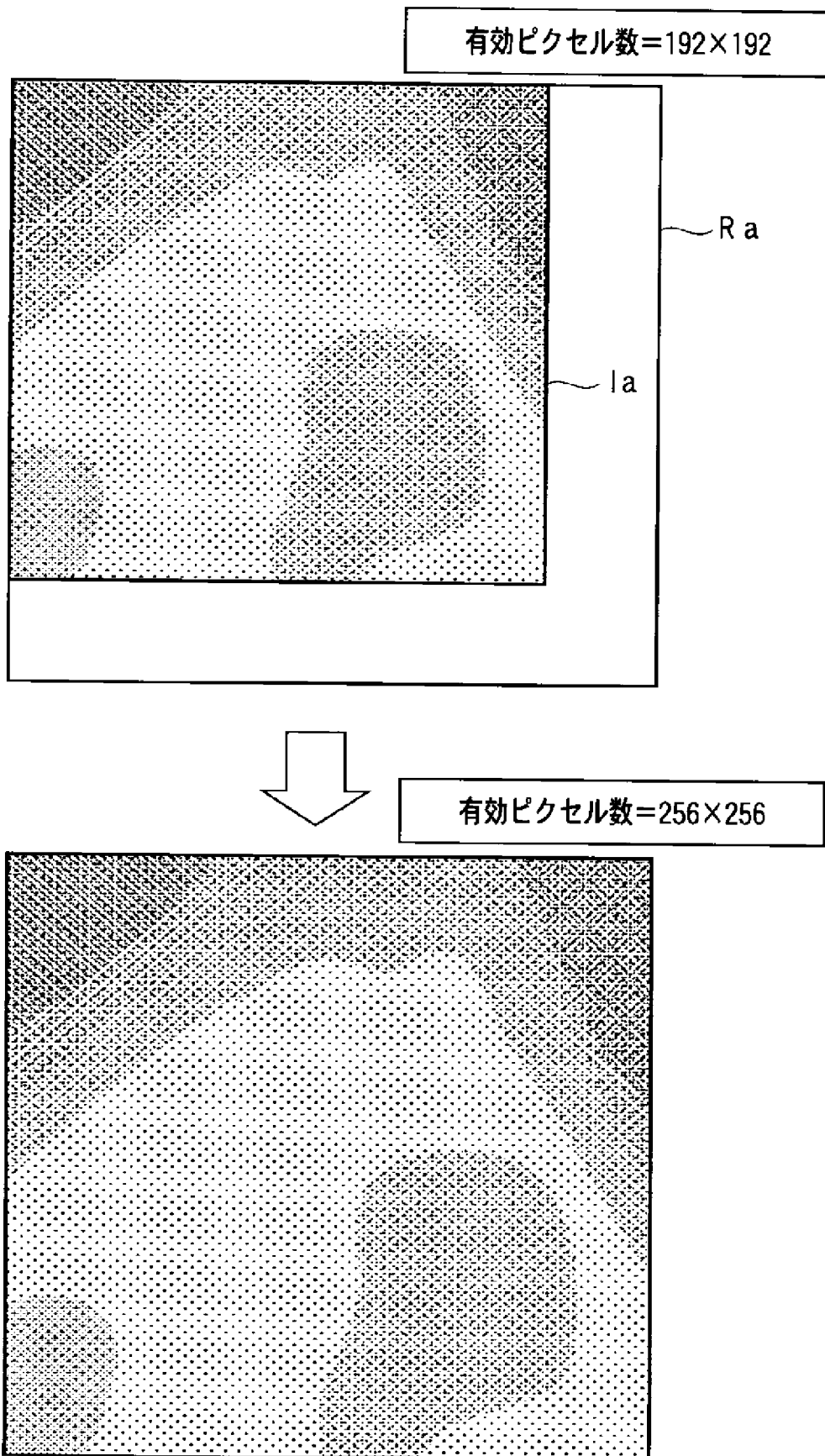
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/068191

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)

JSTPlus (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/JP2010/068191

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,A	JP 2010-237116 A (Olympus Corp.), 21 October 2010 (21.10.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-24
P,A	JP 2010-217761 A (Olympus Corp.), 30 September 2010 (30.09.2010), claims (Family: none)	1-24

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, 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 (I P C))

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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(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

1 8 . 1 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

3 0 . 1 1 . 2 0 1 0

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 1 0 0 - 8 9 1 5

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

9 5 1 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 9 2

C (続き) . 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	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, A	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)	1-24
P, A	JP 2010-217761 A (オリンパス株式会社) 2010. 09. 30, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-24