

(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
2015年8月27日(27.08.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/125311 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/27 (2006.01) G01N 21/65 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/054386
- (22) 国際出願日: 2014年2月24日(24.02.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: オリンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 佐藤 亮 (SATO, Akira); 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP). 瀧本 真一 (TAKIMOTO, Shinichi); 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリンパス株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 上田 邦生, 外 (UEDA, Kunio et al.); 〒2208137 神奈川県横浜市西区みなとみらい2-2-1 横浜ランドマークタワー37F Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

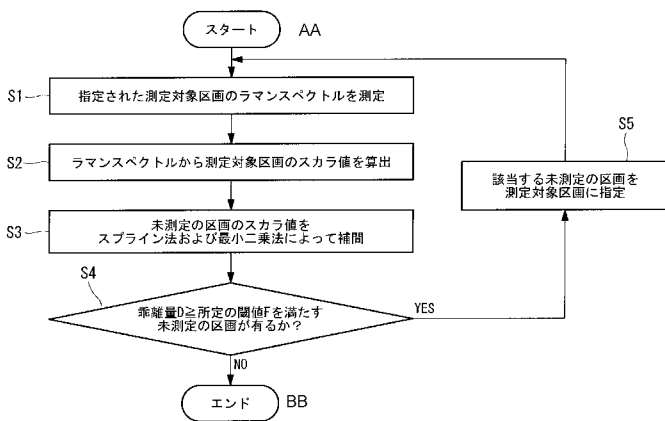
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: SPECTROSCOPIC MEASUREMENT METHOD

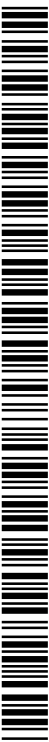
(54) 発明の名称: 分光測定方法



- S1 Measure Raman spectra of specified measurement sections
- S2 Use Raman spectra to compute scalars for measurement sections
- S3 Use spline interpolation and least-squares interpolation to interpolate scalars for unmeasured sections
- S4 Are there any unmeasured sections for which the discrepancy (D) is greater than or equal to a prescribed threshold (F)?
- S5 Specify said unmeasured sections as measurement sections
- AA Start
- BB End

(57) Abstract: This spectroscopic measurement method comprises the following steps: a measurement step (S1) in which the spectra of a specified subset of a plurality of sections of a specimen are measured; a scalar computation step (S2) in which, for each measured section, a scalar that represents information contained in the obtained spectrum is computed; an interpolation step (S3) in which the computed scalars are used to interpolate scalars for the unmeasured sections using two different interpolation methods; an extraction step (S4) in which sections for which the absolute value of the difference between the two scalars interpolated therefor using the aforementioned two different interpolation methods is greater than or equal to a prescribed threshold are extracted; and an iteration step (S5) in which the aforementioned steps, from the measurement step (S1) to the extraction step (S4), are repeated using the extracted sections as the abovementioned specified sections.

(57) 要約: 本発明の分光測定方法は、標本上の複数の区画のうち指定された一部の区画の分光スペクトルを測定する測定ステップ(S1)と、得られた分光スペクトルに含まれる情報を表すスカラー値を測定された各区画について算出するスカラー値算出ステップ(S2)と、算出されたスカラー値を用いて、未測定区画のスカラー値を2種類の補間法により補間する補間ステップ(S3)と、2種類の補間法により補間された2つのスカラー値の差の絶対値が所定の閾値以上である区画を抽出する抽出ステップ(S4)と、抽出された区画を指定して測定ステップ(S1)から抽出ステップ(S4)を再度実行させる反復ステップ(S5)とを含む。



WO 2015/125311 A1

明 細 書

発明の名称：分光測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、分光測定方法に関するものである。

背景技術

[0002] 従来、標本に含まれている成分の情報を取得するために、標本の各位置からの特定の光を検出し、検出された光を分光することによりラマンスペクトルや赤外吸収スペクトルなどの分光スペクトルを取得し、取得された分光スペクトルを解析することが行われている（例えば、特許文献1および非特許文献1参照。）。

[0003] 標本からの光が微弱である場合には1回の分光スペクトルの測定に時間を要し、十分な数の分光スペクトルが得られるまでの時間が長くなる。特許文献1および非特許文献1では、ライン状の照明光を用いて複数の位置の分光スペクトルを同時に取得したり、標本からの光を検出する検出器の電荷読出しと照明光の掃引とを同期させたりすることにより、全体の測定時間の短縮を図っている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2010-517029号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：CharleneA. Drumm 外1名、“Microscopic RamanLine-Imaging with Principal Component Analysis”，AppliedSpectroscopy, Vol. 49, Issue 9, pp. 1331-1337(1995)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、特許文献1および非特許文献1により空間的に十分に高い精度で分光スペクトルを取得するためには、少なくとも一の方向には十分に

小さい距離間隔で分光スペクトルを測定する必要がある、全体の測定時間を十分に短縮することは難しい。全体の測定時間をさらに短縮するために一部の位置における分光スペクトルの測定を省くことが考えられるが、恣意的に測定位置の一部を省いた場合には、標本の重要な情報を取得し損ねる可能性があり、空間的な測定精度が不十分となる。

[0007] 本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、空間的に十分に高い測定精度を維持しつつ全体の測定時間を短縮することができる分光測定方法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

[0008] 上記目的を達成するため、本発明は以下の手段を提供する。

本発明は、標本上の測定領域を構成する複数の区画のうち指定された一部の区画の分光スペクトルを測定する測定ステップと、該測定ステップにおいて得られた分光スペクトルを分析することにより該分光スペクトルに含まれる情報を表すスカラ値を前記測定ステップにおいて測定された各区画について算出するスカラ値算出ステップと、該スカラ値算出ステップにおいて算出されたスカラ値を用いて、前記測定ステップにおいて測定されなかった区画のスカラ値を2種類の補間法により補間する補間ステップと、該補間ステップにおいて前記2種類の補間法により補間された2つのスカラ値の差分の絶対値が所定の閾値以上である区画を抽出する抽出ステップと、該抽出ステップにおいて抽出された区画を指定して前記測定ステップ、スカラ値算出ステップ、補間ステップおよび抽出ステップを再度実行させる反復ステップとを含む分光測定方法を提供する。

[0009] 本発明によれば、測定ステップにおいて測定した観察領域内の一部の区画の分光スペクトルから、当該一部の区画において標本に含まれている成分の情報を測定算出ステップにおいてスカラ値として取得することができる。

この場合に、測定ステップにおいて測定されなかった区画のスカラ値が補間ステップにおいて2種類の補間法によって補間される。

[0010] 異なる種類の補間法によって補間された2つのスカラ値は、算出されたス

カラ値の変動が十分に小さい領域においては略一致し、算出されたスカラ値の変動が十分に大きい領域においては互いに異なる。スカラ値の変動が大きい領域は、測定の対象としている標本内の成分の特性が大きく変化している領域であり、観察者にとって重要な領域である。このような重要な領域に該当する区画が抽出ステップにおいて抽出されて、反復ステップにおいて追加で分光スペクトルが測定され、スカラ値が追加で算出される。

[0011] このように、最初の測定ステップにおいては一部の区画を省いて分光スペクトルを測定し、観察者にとって重要な情報を含む区画であって未だ測定されていない区画については追加で分光スペクトルの測定が実行される。これにより、空間的に十分に高い測定精度を維持しつつ全体の測定時間を短縮することができる。

[0012] 上記発明においては、前記測定ステップにおいて、ライン状の照明光を一行に並ぶ複数の前記区画に照射してこれら複数の区画からの光を検出することにより、前記複数の区画の分光スペクトルを同時に測定してもよい。

このようにすることで、全体の測定時間をさらに短縮することができる。

[0013] 上記発明においては、前記測定ステップにおいて、一行に並ぶ複数の前記区画の分光スペクトルを測定し、前記補間ステップにおいて、前記一行に並ぶ複数の区画のスカラ値を用いて、当該複数の区画と同一の列に含まれる前記測定されなかった区画のスカラ値を当該複数の区画の配列方向に補間してもよい。

このようにすることで、列毎に未測定の区画のスカラ値の補間が実行されることとなり、規則的に区画が配列されている場合に好適である。

[0014] 上記発明においては、前記2種類の補間法が、スプライン補間法および最小二乗法であってもよい。

このようにすることで、スカラ値の変動が大きい領域においては2種類の補間法によって補間されたスカラ値の乖離量を十分に大きくし、観察者にとって重要な区画をより確実に抽出することができる。

[0015] 上記発明においては、前記測定ステップが、2次元方向に分布する複数

の前記区画の分光スペクトルを測定し、前記補間ステップにおいて、前記2次元方向に分布する複数の区画のスカラ値を用いて、前記測定されなかった区画のスカラ値を前記2次元方向に補間してもよい。

このようにすることで、2次元方向のスカラ値の変化を加味して未測定の区画のスカラ値をより正確に補間することができる。

[0016] 上記発明においては、前記2種類の補間法が、スプライン補間法、逆距離加重補間法およびクリギング補間法のうちの2つであってもよい。

このようにすることで、スカラ値の変動が大きい領域においては2種類の補間法によって補間されたスカラ値の乖離量を十分に大きくし、観察者にとって重要な区画をより確実に抽出することができる。

[0017] 上記発明においては、前記スカラ値が、前記複数の区画の分光スペクトルの集合を主成分分析して得られた主成分ローディングと前記分光スペクトルとの内積、前記複数の区画の分光スペクトルの集合を独立成分分析して得られた独立成分ベクトルと前記分光スペクトルとの内積、または、前記分光スペクトルの所定の周波数帯域における強度または2つの所定の周波数帯域における強度の比であってもよい。あるいは、前記スカラ値が、特異値分解やNNMF法 (Non Negative Matrix Factorization) などのクラスタリング解析法によって分類される成分ベクトルと前記分光スペクトルとの内積であってもよく、VCA法 (Vertex component analysis) で分離されたエンドメンバーベクトルと前記分光スペクトルとの内積であってもよい。

このようにすることで、標本に含まれる特定の成分の分布を解析することができる。

[0018] 上記発明においては、前記分光スペクトルが、ラマンスペクトル、近赤外吸収スペクトル、中赤外吸収スペクトル、遠赤外吸収スペクトル、可視吸収スペクトル、紫外吸収スペクトルまたは蛍光スペクトルであってもよい。

このようにすることで、標本に含まれる特定の成分の分布を解析することができる。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、空間的に十分に高い測定精度を維持しつつ全体の測定時間を短縮することができるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

- [0020] [図1]本発明の一実施形態に係る分光測定方法を示すフローチャートである。
- [図2]図1の分光測定方法によって測定される標本の観察領域を構成する区画を説明する図である。
- [図3]図1の分光測定方法の測定ステップを説明する図である。
- [図4]図1の分光測定方法の補間ステップを説明する図であり、観察面をXY軸に設定し、スカラ値をZ軸に設定したときのXYZ空間を示している。
- [図5A]図4の $Y = Y_8$ におけるXZ平面を示しており、スプライン曲線（実線）および最小二乗曲線（破線）によって未測定の区画のスカラ値を補間する処理を説明する図である。
- [図5B]図4の $Y = Y_6$ におけるXZ平面を示しており、スプライン曲線（実線）および最小二乗曲線（破線）によって未測定の区画のスカラ値を補間する処理を説明する図である。
- [図6]2回目の補間ステップにおいて新しいスカラ値が追加されたXYZ空間を示している。

発明を実施するための形態

[0021] 以下に、本発明の一実施形態に係る分光測定方法について図面を参照して説明する。

本実施形態に係る分光測定方法は、図1に示されるように、標本の観察領域内の一部の区画における分光スペクトルを顕微鏡によって測定する測定ステップS1と、該測定ステップS1により取得された分光スペクトルに基づくスカラ値を算出するスカラ値算出ステップS2と、測定ステップS1によって測定されなかった区画におけるスカラ値を2種類の補間法により補間する補間ステップS3と、該補間ステップS3において補間された2つのスカラ値の乖離量Dが所定の閾値Fより大きい未測定の区画を抽出する抽出ステップS4と、該抽出ステップS4において抽出された区画を指定して測定ス

トップS 1 から抽出ステップS 4 までを反復させる反復ステップS 5 とを含んでいる。

[0022] このような分光測定方法は、標本に照明光を照射して標本からの光を検出することにより、標本に含まれている分子の情報を含む分光スペクトルを取得する顕微鏡と、該顕微鏡によって取得された分光スペクトルを解析するとともに解析結果に基づいて顕微鏡を制御する制御装置とを備える顕微鏡システムによって実施される。例えば、制御装置は、CPU（中央処理装置）と記憶装置とを備えるコンピュータであり、本実施形態の分光測定方法は記憶装置にプログラムとして記憶されている。そして、プログラムがCPUにより記憶装置から読み出されて実行されることにより、上記の測定ステップS 1 から反復ステップS 5 までの処理が実施されるようになっている。あるいは、制御装置は、上記の工程S 1～S 5のうち、工程S 2，S 3，S 4，S 5の各々の処理を実行する専用のハードウェアとして、スカラ値算出部、補間部、抽出部および反復部を備えていてもよい。

[0023] まず、測定ステップS 1において、顕微鏡は、観察領域を構成する複数の区画のうち一部の区画の分光スペクトルを測定する。標本上の観察領域Aは、図2に示されるように、2軸方向（X方向、Y方向）に並ぶ複数の区画Bに区切られている。これらの区画Bのうち一部の区画を制御装置が測定対象区画B'として指定し、指定された測定対象区画B'についてのみ、顕微鏡は分光スペクトルを測定するようになっている。本実施形態においては、X軸方向に10、Y軸方向に8ずつ並んだ合計80の区画Bが設定され、これら80の区画BのうちX=X1，X4，X7，X10に対応する32の区画Bが測定対象区画B'に指定されていることとする。

[0024] 顕微鏡は、制御装置からの指令に基づき、図3に示されるように、X軸方向に延びるライン状の照明光Lを測定対象区画B'に照射し、該測定対象区画B'において発生した光を検出し、検出された光を分光することにより、各測定対象区画B'における分光スペクトルを取得する。そして、顕微鏡は、照明光Lの照射位置をX軸方向およびY軸方向に移動し分光スペクトルの

取得を繰り返すことにより、指定された全ての測定対象区画B'の分光スペクトルを取得する。このときに、顕微鏡は、ライン状の照明光LをY軸方向に並ぶ複数（図示する例では4）の測定対象区画B'に同時に照射することにより、複数の測定対象区画B'の分光スペクトルを同時に取得するようになっている。

[0025] なお、顕微鏡によるラマンスペクトルの測定方法は、適宜変更可能である。例えば、ライン状の照明光Lに代えて、スポット状の照明光を用いてもよい。この場合、一度の測定で1つの測定対象区画B'のラマンスペクトルが取得される。

[0026] 以下、本実施形態においては、顕微鏡によって測定される分光スペクトルとしてラマンスペクトルについて説明する。本実施形態の分光測定方法において測定される分光スペクトルは、ラマンスペクトルの他に、近赤外吸収スペクトル、中赤外吸収スペクトル、遠赤外吸収スペクトル、可視吸収スペクトル、紫外吸収スペクトルまたは蛍光スペクトルであってもよい。

[0027] 次に、スカラ値算出ステップS2において、測定ステップS1において得られたラマンスペクトルを分析することにより、各測定対象区画B'におけるラマンスペクトルに含まれている情報、例えば、特定の分子からのラマン散乱光の強度などを表すスカラ値を算出する。例えば、取得された全てのラマンスペクトルの集合であるハイパーラマンスペクトルを主成分分析することにより主成分ローディングを算出し、該主成分ローディングと各ラマンスペクトルとの内積である主成分スコアを算出し、該主成分スコアを各ラマンスペクトルが測定された測定対象区画B'のスカラ値とする。

[0028] もしくは、ハイパーラマンスペクトルを独立成分分析し、得られた独立成分ベクトルと各ラマンスペクトルとの内積を該ラマンスペクトルが測定された測定対象区画B'のスカラ値としてもよく、各ラマンスペクトルの所定の周波数帯域におけるバンド強度（ピーク強度または面積強度）をその測定対象区画B'のスカラ値としてもよい。

[0029] あるいは、ハイパーラマンスペクトルを特異値分解やNNMF法（Non Neg

ative

Matrix Factorization) などのクラスタリング解析法で分析した上で、分類された各クラスタを代表する成分ベクトルと前記分光スペクトルとの内積を測定対象区画 B' のスカラ値としてしてもよい。さらに、ハイパーラマンスペクトルを VCA (Vertex component analysis) 解析にかけて算出されたエンドメンバーベクトルと前記分光スペクトルとの内積を測定対象区画 B' のスカラ値としてしてもよい。

[0030] 次に、補間ステップ S 3 において、スカラ値算出ステップ S 2 において算出された各測定対象区画 B' のスカラ値を用いて未測定の区画 B のスカラ値を補間する。具体的には、2 種類の補間法により測定対象区画 B' のスカラ値 Z の X 軸方向の変化を近似した 2 種類の近似曲線を求める。図 4 は、測定対象区画 B' の X 軸方向の位置を横軸 (X 軸) に設定し、スカラ値 Z を縦軸 (Z 軸) に設定した X Z 平面に、各スカラ値 Z (黒点を参照。) をプロットしたものである。図 4 には、Y 軸方向に並ぶ複数の X Z 平面を同時に図示するために、X Y Z 空間が示されている。また、図 4 においては、図が複雑になることを防ぐために、一部の測定対象区画 B' のスカラ値 Z のみが示されている。

[0031] 本実施形態においては、2 種類の補間法として、多項式を用いた補間法であるスプライン法および最小二乗法について説明する。スプライン法によって、プロットされた各点を通り、該点同士を滑らかに接続するような多項式のスプライン曲線が算出される。最小二乗法によって、X 軸方向に並ぶスカラ値との誤差の 2 乗和を最小とするような多項式の最小二乗曲線が算出される。

[0032] 算出されたスプライン曲線 (実線) および最小二乗曲線 (破線) を X Z 平面に描くと、図 5 A および図 5 B のようになる。図 5 A は、スカラ値が X 軸方向に比較的大きく変化している $Y = Y_8$ における X Z 平面を示し、図 5 B はスカラ値 Z が X 軸方向に比較的小さく変化している $Y = Y_6$ における X Z 平面を示している。2 つの近似曲線によって未測定の区画 B のスカラ値が補

間される。図5 Aおよび図5 Bに示されるように、互いに異なる性質を有する2つの近似曲線によって補間された各位置のスカラー値Z同士は、スカラー値Zの変化が大きい領域においては大きく乖離し、スカラー値Zの変化が小さい領域においては略一致する。

[0033] 次に、抽出ステップS 4において、補間ステップS 3において算出された2つの近似曲線の、各未測定の区画Bにおける乖離量Dに基づいて、スカラー値の取得が必要な未測定の区画Bを抽出する。すなわち、未測定の区画Bに対応する $X = X_2, X_3, X_5, X_6, X_8, X_9$ における最小二乗法によるスカラー値Zとスプライン法によるスカラー値Zとの差分の絶対値を乖離量Dとして計算する。そして、得られた乖離量Dが所定の閾値Fよりも大きい未測定の区画Bを抽出する。乖離量Dが所定の閾値Fよりも大きい未測定の区画Bの抽出は、 $Y = Y_1 \sim Y_8$ における全てのXZ平面について実行される。

[0034] 次に、反復ステップS 5において、抽出ステップS 4において抽出された未測定の区画Bを測定対象区画B'に新たに指定し、当該新たに指定された測定対象区画B'のラマンスペクトルの取得を顕微鏡に実行させる。これにより、抽出ステップS 4において未測定の区画Bが抽出されなくなるまで、上記の測定ステップS 1から抽出ステップS 4までの処理が反復される。

[0035] 例えば、反復ステップS 5において、図5 Aにおいて乖離量Dが比較的大きい $X = X_2, X_3, X_5$ が抽出される。この場合、2回目の測定ステップS 1において、 $X = X_2, X_3, X_5, Y = Y_8$ の区画Bのラマンスペクトルが追加で取得され、2回目のスカラー値算出ステップS 2において、新たに取得されたラマンスペクトルからスカラー値が算出される。そして、2回目の補間ステップS 3において、新たに算出されたスカラー値Zは、図6に示されるようにXZ平面に追加され、先に算出されたスカラー値と新たに算出されたスカラー値とを含む $X = X_1 \sim X_6, X_7, X_{10}$ におけるスカラー値の変化が2種類の近似曲線によって近似され、それまでに算出された全てのスカラー値を加味した未測定の区画Bのスカラー値が補間される。

- [0036] このように、本実施形態によれば、最初に観察領域 A 内の全ての区画 B のうち一部を省いてラマンスペクトルを測定し、測定されなかった区画 B のスカラ値を 2 種類の補間法によって推定する。そして、2 種類の補間法によって推定されたスカラ値の乖離量 D が十分に大きかった場合、すなわち、その未測定の区画 B における測定対象の分子の含有量などの特性の変化が大きく、当該未測定の区画 B のラマンスペクトルが観察者にとって重要な情報を有している場合には、当該未測定の区画 B のラマンスペクトルを追加で測定する。
- [0037] ステップ S 2, S 3, S 4 のような演算処理の所要時間に比べて 1 回のラマンスペクトルの測定の所要時間は長く、このラマンスペクトルの測定の所要時間が全体の処理時間の短縮にとって障害となる。本実施形態によれば、ラマンスペクトルの測定回数を減らしつつ、観察者にとって重要な情報を含む区画 B のラマンスペクトルは確実に追加で測定することにより、空間的に十分に高い測定精度を確保しながら全体の測定時間を効果的に短縮することができるという利点がある。
- [0038] なお、本実施形態においては、補間ステップ S 3 において未測定の区画 B のスカラ値を、2 種類の補間法を用いて 2 次元的に補間することとしたが、これに代えて、3 次元的に補間することとしてもよい。この場合、2 種類の補間法によって、図 4 に示されるような X Y Z 空間にプロットされた各点の X Y 方向の変化を近似した 3 次元の近似曲面が求められる。2 種類の補間法としては、例えば、スプライン法と、逆距離加重法またはクリギング法とが用いられる。
- [0039] 図 5 A および図 5 B のように、未測定の区画 B のスカラ値を X 軸方向に 2 次元的に補間した場合には、測定対象区画 B' のスカラ値の Y 軸方向の変化は未測定の区画 B のスカラ値の補間に加味されないこととなる。これに対し、3 次元的に補間した場合には、測定されたスカラ値の 2 次元方向の変化が加味されるので、未測定の区画 B のスカラ値をより高い精度で補間することができる。

[0040] この変形例においては、抽出ステップS4において、例えば、以下のような処理が行われる。補間ステップS3において算出された2種類の近似曲面のスカラ値Zの差分の絶対値を乖離量Dとして計算し、算出された乖離量Dが所定の閾値Fよりも大きい領域を抽出する。そして、抽出された領域のXY平面における重心位置を算出する。反復ステップS5は、抽出ステップS4において算出された重心位置を含む領域を新たな測定対象区画に指定する。このように、重心位置を含む領域を追加の測定対象区画とすることで、追加で実行されるラマンスペクトルの測定回数を最小とすることができる。

[0041] もしくは、未測定の区画Bの中心位置をサンプル点として予め設定しておき、該サンプル点における乖離量Dを所定の閾値Fと比較してもよい。または、乖離量Dが所定の閾値Fよりも大きい領域を抽出し、抽出された領域を複数に分割し、分割された個々の区画を新たな測定対象区画として指定してもよい。

[0042] また、本実施形態においては、測定ステップS1において、観察領域A内に規則的に配列する区画B単位でラマンスペクトルを測定することとしたが、これに代えて、測定対象区画を不規則に指定してラマンスペクトルを測定してもよい。

符号の説明

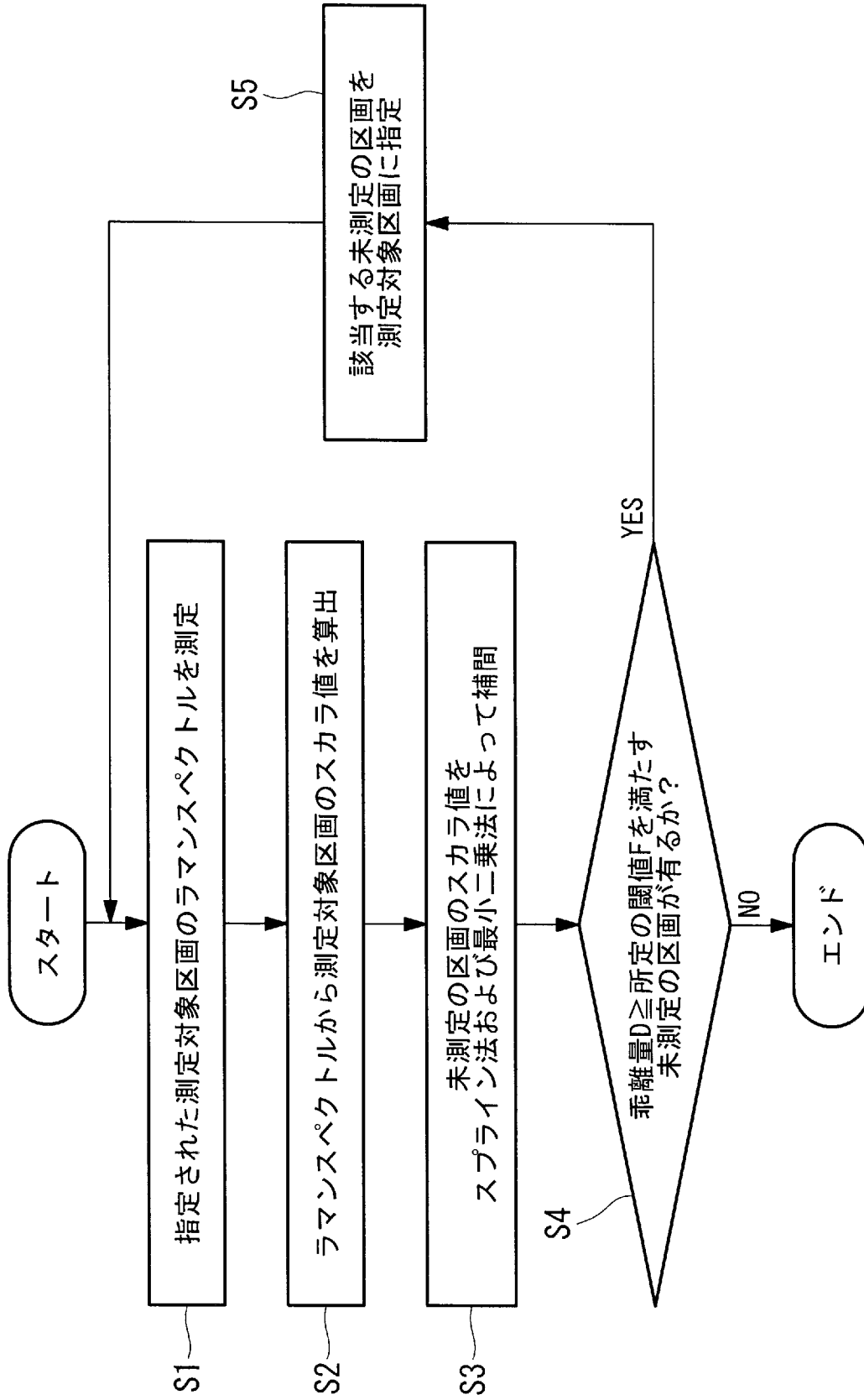
- [0043] L 照明光
A 観察領域
B 区画
B' 測定対象区画
S1 測定ステップ
S2 スカラ値算出ステップ
S3 補間ステップ
S4 抽出ステップ
S5 反復ステップ

請求の範囲

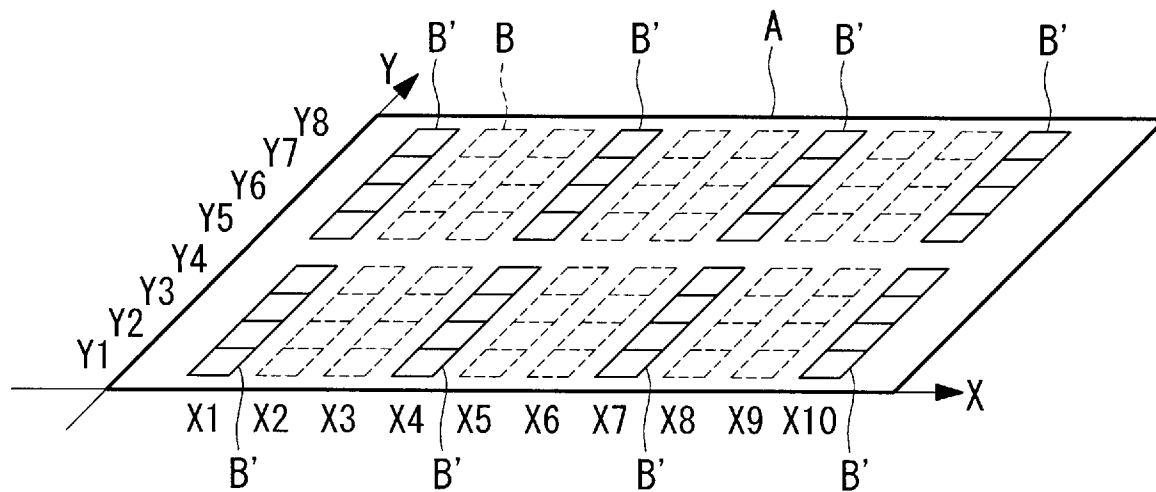
- [請求項1] 標本上の測定領域を構成する複数の区画のうち指定された一部の区画の分光スペクトルを測定する測定ステップと、
- 該測定ステップにおいて得られた分光スペクトルを分析することにより該分光スペクトルに含まれる情報を表すスカラ値を前記測定ステップにおいて測定された各区画について算出するスカラ値算出ステップと、
- 該スカラ値算出ステップにおいて算出されたスカラ値を用いて、前記測定ステップにおいて測定されなかった区画のスカラ値を2種類の補間法により補間する補間ステップと、
- 該補間ステップにおいて前記2種類の補間法により補間された2つのスカラ値の差分の絶対値が所定の閾値以上である区画を抽出する抽出ステップと、
- 該抽出ステップにおいて抽出された区画を指定して前記測定ステップ、スカラ値算出ステップ、補間ステップおよび抽出ステップを再度実行させる反復ステップとを含む分光測定方法。
- [請求項2] 前記測定ステップにおいて、ライン状の照明光を一行に並ぶ複数の前記区画に照射してこれら複数の区画からの光を検出することにより、前記複数の区画の分光スペクトルを同時に測定する請求項1に記載の分光測定方法。
- [請求項3] 前記測定ステップにおいて、一行に並ぶ複数の前記区画の分光スペクトルを測定し、
- 前記補間ステップにおいて、前記一行に並ぶ複数の区画のスカラ値を用いて、当該複数の区画と同一の列に含まれる前記測定されなかった区画のスカラ値を当該複数の区画の配列方向に補間する請求項1または請求項2に記載の分光測定方法。
- [請求項4] 前記2種類の補間法が、スプライン補間法および最小二乗法である請求項3に記載の分光測定方法。

- [請求項5] 前記測定ステップが、2次元方向に分布する複数の前記区画の分光スペクトルを測定し、
前記補間ステップにおいて、前記2次元方向に分布する複数の区画のスカラ値を用いて、前記測定されなかった区画のスカラ値を前記2次元方向に補間する請求項1または請求項2に記載の分光測定方法。
- [請求項6] 前記2種類の補間法が、スプライン補間法、逆距離加重補間法およびクリギング補間法のうちの2つである請求項5に記載の分光測定方法。
- [請求項7] 前記スカラ値が、前記複数の区画の分光スペクトルの集合を主成分分析して得られた主成分ローディングと前記分光スペクトルとの内積である請求項1から請求項6のいずれかに記載の分光測定方法。
- [請求項8] 前記スカラ値が、前記複数の区画の分光スペクトルの集合を独立成分分析して得られた独立成分ベクトルと前記分光スペクトルとの内積である請求項1から請求項6のいずれかに記載の分光測定方法。
- [請求項9] 前記スカラ値が、前記分光スペクトルの所定の周波数帯域における強度または2つの所定の周波数帯域における強度の比である請求項1から請求項6のいずれかに記載の分光測定方法。
- [請求項10] 前記スカラ値が、特異値分解またはNNMF (Nonnegative matrix factorization) によるクラスタリング分析によって取得された、各クラスタを代表するスペクトルに対応するベクトルと前記分光スペクトルとの内積である請求項1から請求項6のいずれかに記載の分光測定方法。
- [請求項11] 前記分光スペクトルが、ラマンスペクトル、近赤外吸収スペクトル、中赤外吸収スペクトル、遠赤外吸収スペクトル、可視吸収スペクトル、紫外吸収スペクトルまたは蛍光スペクトルである請求項1から請求項10のいずれかに記載の分光測定方法。

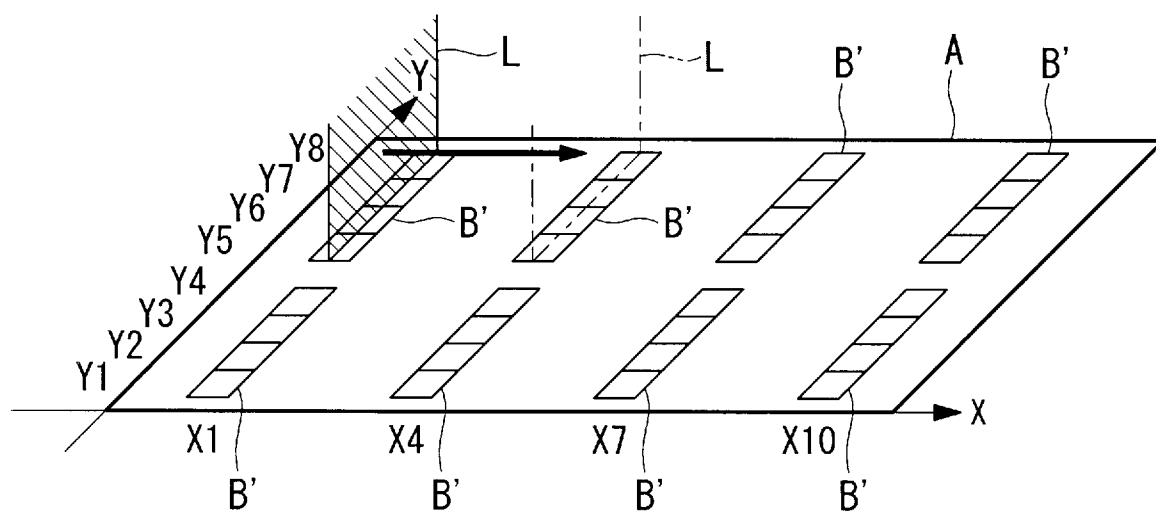
[図1]



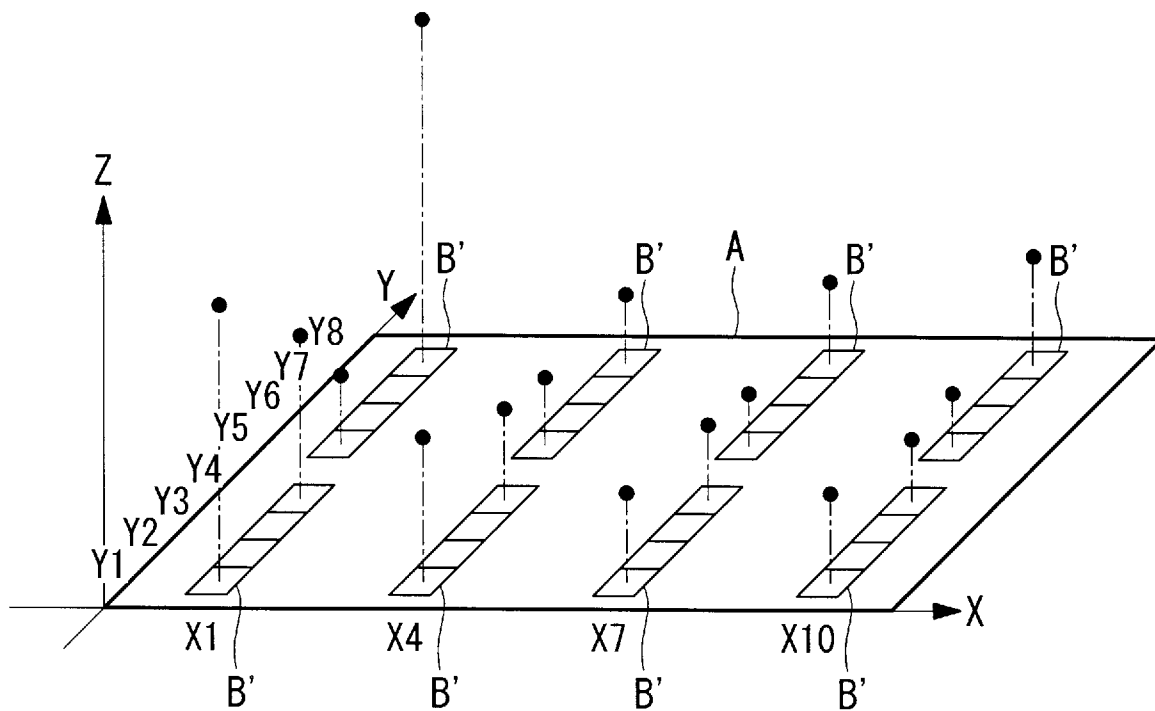
[図2]



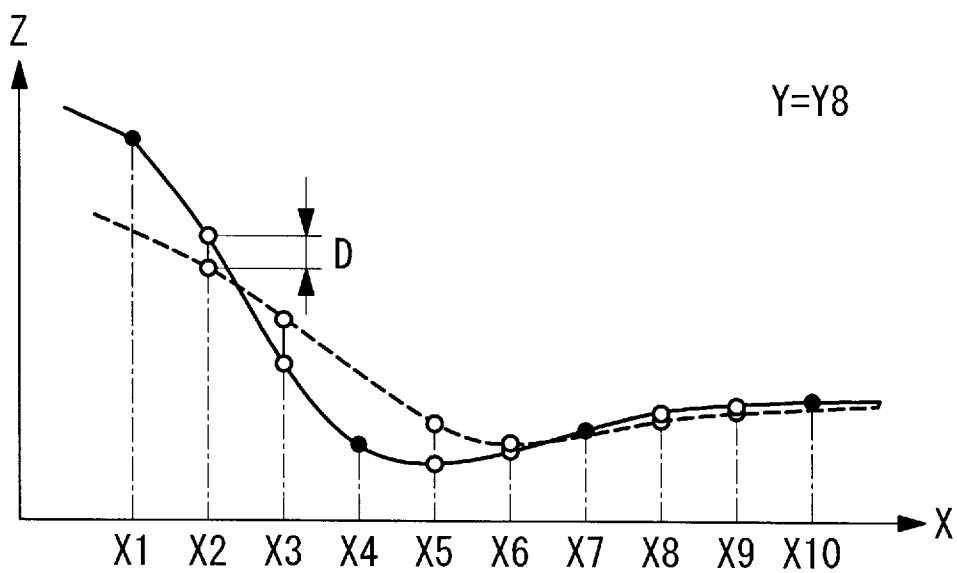
[図3]



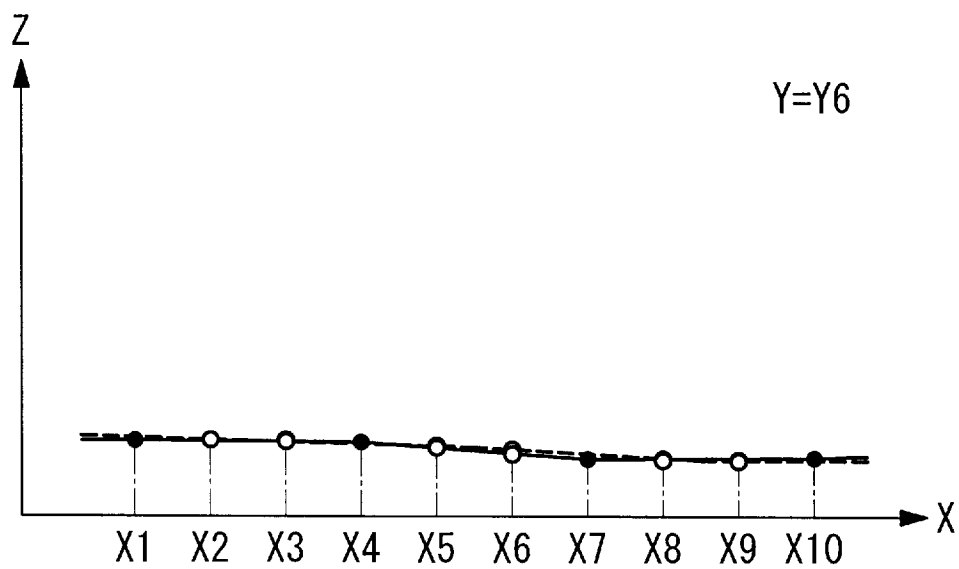
[図4]



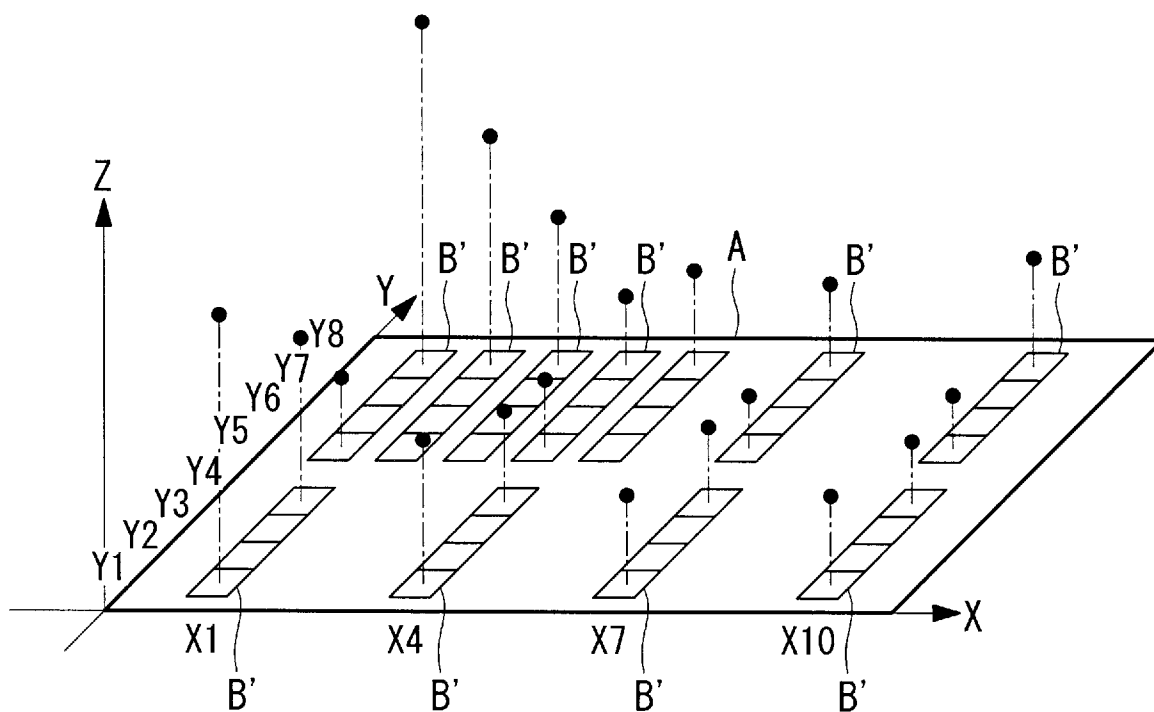
[図5A]



[図5B]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/054386

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N21/27(2006.01) i, G01N21/65(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)
G01N21/00-G01N21/83, G01J3/00-G01J3/52

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	JP 2014-038043 A (Olympus Corp.), 27 February 2014 (27.02.2014), entire text; fig. 1 to 6	1-11
A	JP 2010-025622 A (Pola Chemical Industries Inc.), 04 February 2010 (04.02.2010), paragraph [0024]	1-11
A	JP 2010-517029 A (RENISHAW PLC), 20 May 2010 (20.05.2010), fig. 1 to 5	1-11
A	JP 2013-525035 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY), 20 June 2013 (20.06.2013), paragraph [0117]	6

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 05 March, 2014 (05.03.14)	Date of mailing of the international search report 18 March, 2014 (18.03.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2014/054386

JP 2014-038043 A	2014.02.27	(Family: none)	
JP 2010-025622 A	2010.02.04	(Family: none)	
JP 2010-517029 A	2010.05.20	AT 467104 T	2010.05.15
		CN 101589297 A	2009.11.25
		CN 101589297 B	2011.06.29
		CN 101925806 A	2010.12.22
		CN 101925806 B	2011.11.09
		EP 2106538 A1	2009.10.07
		EP 2106538 B1	2010.05.05
		EP 2243008 A1	2010.10.27
		JP 2011-510317 A	2011.03.31
		US 2009/310132 A1	2009.12.17
		US 8179526 B2	2012.05.15
		WO 2008/090350 A1	2008.07.31
		WO 2009/093050 A1	2009.07.30
JP 2013-525035 A	2013.06.20	CA 2797725 A1	2011.11.10
		CN 103025229 A	2013.04.03
		EP 2563206 A1	2013.03.06
		US 2011/267340 A1	2011.11.03
		WO 2011/139895 A1	2011.11.10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N21/27(2006.01)i, G01N21/65(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N 21/00 - G01N 21/83, G01J 3/00 - G01J 3/52

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 1971-2014年
 日本国実用新案登録公報 1996-2014年
 日本国登録実用新案公報 1994-2014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(JDreamIII)

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
E, X	JP 2014-038043 A (オリンパス株式会社) 2014.02.27, 全文, 図1-6	1-11
A	JP 2010-025622 A (ポーラ化成工業株式会社) 2010.02.04, [0024]	1-11
A	JP 2010-517029 A (RENISHAW PLC) 2010.05.20, 図1-5	1-11
A	JP 2013-525035 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2013.06.20 [0117]	6

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 05.03.2014	国際調査報告の発送日 18.03.2014
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高場 正光 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

JP 2014-038043 A	2014. 02. 27	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 2010-025622 A	2010. 02. 04	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 2010-517029 A	2010. 05. 20	AT 467104 T	2010. 05. 15
		CN 101589297 A	2009. 11. 25
		CN 101589297 B	2011. 06. 29
		CN 101925806 A	2010. 12. 22
		CN 101925806 B	2011. 11. 09
		EP 2106538 A1	2009. 10. 07
		EP 2106538 B1	2010. 05. 05
		EP 2243008 A1	2010. 10. 27
		JP 2011-510317 A	2011. 03. 31
		US 2009/310132 A1	2009. 12. 17
		US 8179526 B2	2012. 05. 15
		WO 2008/090350 A1	2008. 07. 31
		WO 2009/093050 A1	2009. 07. 30
-----	-----	-----	-----
JP 2013-525035 A	2013. 06. 20	CA 2797725 A1	2011. 11. 10
		CN 103025229 A	2013. 04. 03
		EP 2563206 A1	2013. 03. 06
		US 2011/267340 A1	2011. 11. 03
		WO 2011/139895 A1	2011. 11. 10
-----	-----	-----	-----