

(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
2014年9月12日(12.09.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/136784 A1

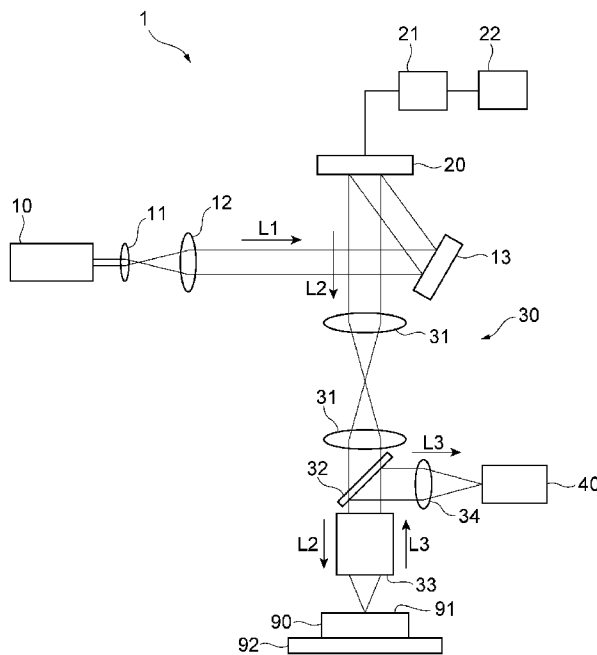
- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G03H 1/08 (2006.01)
G02B 21/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/055491
- (22) 国際出願日: 2014年3月4日(04.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-044348 2013年3月6日(06.03.2013) JP
- (71) 出願人: 浜松ホトニクス株式会社(HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) [JP/JP]; 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町1-1-26番地の1 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者: 松本 直也(MATSUMOTO Naoya); 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町1-1-26番地の1 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 MY PLAZA (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 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, 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: FLUORESCENCE DETECTION DEVICE AND FLUORESCENCE DETECTION METHOD

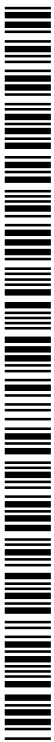
(54) 発明の名称: 蛍光受光装置および蛍光受光方法



(57) Abstract: A fluorescence detection device (1) is provided with the following: an excitation light source (10); a phase-modulating spatial light modulator (20) that can phase-modulate excitation light (L1), yielding phase-modulated light (L2); focusing optics (30) that are provided after the spatial light modulator (20) and focus the phase-modulated light (L2) onto a sample (90); a sample stage (92) onto which said sample (90) is placed; a fluorescence detector (40) that detects fluorescence (L3) produced as a result of the phase-modulated light (L2) being focused onto the sample (90); a control unit (21) that displays a first CGH on the spatial light modulator (20); and a correction unit (22) that corrects said first CGH. Said correction unit (22) is provided with the following: a detector-specific sensitivity-information storage unit (222) that, in advance, acquires and stores sensitivity information specific to the fluorescence detector (40) per detection position; and a second-hologram generation unit (223) that generates a second CGH by correcting the first CGH on the basis of the intensity of the fluorescence (L3) and the aforementioned sensitivity information. The control unit (21) displays said second CGH on the spatial light modulator (20).

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2014/136784 A1

蛍光受光装置 1 は、励起光源 10 と、励起光 L1 を位相変調し位相変調光 L2 を得る位相変調型の空間光変調器 20 と、空間光変調器 20 の後段に設けられ位相変調光 L2 を試料 90 に集光する集光光学系 30 と、試料 90 が載置される試料ステージ 92 と、位相変調光 L2 が試料 90 に集光されることにより発生する蛍光 L3 を受光する蛍光受光器 40 と、空間光変調器 20 に第 1 CGH を表示する制御部 21 と、第 1 CGH を補正する補正部 22 とを備える。補正部 22 は、蛍光受光器 40 固有の受光位置ごとの感度情報を予め取得し格納する受光器固有感度情報格納部 222 と、蛍光 L3 の強度および感度情報に基づき第 1 CGH を補正し、第 2 CGH を生成する第 2 ホログラム生成部 223 とを備える。制御部 21 は空間光変調器 20 に第 2 CGH を表示する。

明 細 書

発明の名称： 蛍光受光装置および蛍光受光方法

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光受光装置および蛍光受光方法に関するものである。

背景技術

[0002] 従来、空間光変調器 (Spatial Light Modulator、以下「SLM」) の一つである音響光学変調素子を用いて、試料上に複数のスポット光を生成する蛍光走査顕微鏡が知られている (例えば特許文献1および非特許文献1を参照)。例えば特許文献1の開示内容によれば、当該蛍光走査顕微鏡は、同時に走査する走査点の数、位置あるいは間隔等を光量ロスなく自由に変更することができ、画像取得時間の短縮だけでなく、用途に応じた観察をフレキシブルに行うことができるという効果を奏するとしている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2009-103958号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Yonghong Shao他、“Ultrafast, large-field multiphoton microscopy based on an acousto-optic deflector and aspatial light modulator”、OPTICS LETTERS、Vol. 37、No.13、July 2012

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 蛍光走査顕微鏡の光学系にSLMを導入し、SLMにCGH (Computer Generated Hologram) と呼ばれる位相分布や強度分布を示したパターンを呈示すると、対物レンズの集光点上に多点を生成させることができる。そのため、試料から励起された蛍光も複数点となる。これをマルチアノードの光電子増倍管等で受光することにより、多点計測が可能となる。しかし、集光位置における多点の光の強度の制御が大きな問題となる。これは、SLMで生成

された多点にバラツキがあること、および観測側のマルチアノードの光電子増倍管等にも感度バラツキがあることに起因する。一方で、上記の特許文献1および非特許文献1の何れの文献においても、集光位置における多点の光の強度を制御することについては言及も示唆もない。

[0006] そこで、本発明は上記に鑑みてなされたもので、集光位置における多点の光の強度を制御することが可能な蛍光受光装置および蛍光受光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

[0007] 上記課題を解決するために、本発明の一側面に係る蛍光受光装置（蛍光検出装置）は、空間光変調器によって変調された励起光により発生する蛍光を検出する装置であって、励起光を出力する励起光源と、励起光が入力され、第1ホログラムを表現すること（呈示すること）により、励起光の位相および振幅の少なくともいずれか一方を変調し、変調光を出力する空間光変調器と、空間光変調器の後段に設けられ、変調光を試料に集光する集光光学系と、試料が載置される試料ステージと、変調光が試料に集光されることにより発生する蛍光を集光光学系を介して検出する蛍光検出器と、空間光変調器に第1ホログラムを表現させること（呈示させること）により、2次元配列された複数の画素それぞれにおいて励起光の位相および振幅の少なくとも何れか一方を変調させ、且つ変調光を集光光学系により試料の集光位置に集光させる制御部と、第1ホログラムを補正する補正部と、を備え、補正部は、蛍光検出器固有の受光位置ごとの感度情報および集光位置における蛍光の強度に基づき、第1ホログラムを補正することにより、第2ホログラムを生成し、制御部は、第2ホログラムを表現するように（呈示するように）空間光変調器を制御する。

[0008] また、本発明の一側面に係る蛍光受光方法（蛍光検出方法）は、空間光変調器により変調された励起光によって生じる蛍光を受光する（検出する）方法であって、励起光源から出力された励起光を空間光変調器に入力し、空間光変調器に第1ホログラムを表現させること（呈示させること）により、励

起光の位相および振幅の少なくとも何れか一方を変調することにより得られた変調光を出力し、空間光変調器の後段に設けられた集光光学系により、変調光を試料に集光し、蛍光検出器により、変調光が試料に集光されることにより発生する蛍光を集光光学系を介して検出し、蛍光検出器固有の受光位置ごとの感度情報と集光位置における蛍光の強度に基づき、第1ホログラムを補正することにより、第2ホログラムを生成し、空間光変調器に第2ホログラムを表現させること（呈示させること）により、励起光の位相および振幅の少なくとも何れか一方を変調することにより得られた変調光を出力する。

[0009] このような本発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法によれば、制御部により最初に空間光変調器に呈示された第1ホログラムが補正部によって補正され、当該補正により新たに生成された第2ホログラムが制御部により再び空間光変調器に呈示される。つまり、補正部および制御部によりホログラムがフィードバックされることにより、当該ホログラムの補正が行われる。第2ホログラムは、集光位置における蛍光の強度および蛍光受光器固有の受光位置ごとの感度情報に基づき、第1ホログラムが補正されることにより得られ、この第2ホログラムにより、空間光変調器で生成された多点における強度バラツキが、蛍光受光器における感度バラツキが考慮された上で、例えば均一に制御される。ここで、ホログラムがフィードバック補正されることにより、試料に照射される位相変調光と試料から照射される蛍光とがそれぞれ例えば均一に制御される。特に、補正部による補正が、蛍光受光器固有の受光位置ごとの感度情報に基づき行われるため、蛍光受光器固有の受光位置ごとの場所依存の感度バラツキを認めながらも、当該感度バラツキによる影響を低減させることができる。

[0010] また、本発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法において、補正部による補正は、複数個の集光位置ごとに行われても良い。

[0011] この発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法によれば、補正部による補正が複数個の集光位置ごとに行われるため、空間光変調器およびホログラムにより生成された多点それぞれに当該補正を適用することができ

る。

[0012] この発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法では、励起光源は多光子励起を行うことができる短パルスレーザであってもよい。

[0013] この発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法は、多光子励起を行うことができる短パルスレーザを用いた場合に顕著に起こる、複数の集光位置の強度バラツキに対して特に有用である。

[0014] また、本発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法において、蛍光検出器はマルチアノード型の光電子増倍管であっても良い。

[0015] この発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法によれば、マルチアノード型の光電子増倍管のような、場所依存の感度バラツキの存在する蛍光受光器に特に有用である。

[0016] また、本発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法において、試料は、試料に集光された変調光と試料から発生する蛍光の強度の比率において、場所依存のバラツキのない均質な蛍光材料からなっても良い。

[0017] 試料への変調光および試料からの蛍光の両方を例えば均一に強度制御する際に、場所依存のバラツキのない均質な蛍光材料を試料として用いることにより、計算量を減らすことができ、当該制御を簡易且つ好適に行うことができる。

[0018] また、本発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法において、補正部による補正は、集光光学系に含まれた対物レンズの光軸方向に沿った所定の間隔の走査層ごとに行われても良い。

[0019] これによれば、ある程度の深さを有する試料に対しても本発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法を適用させることができる。

[0020] また、本発明の一側面に係る蛍光受光装置および蛍光受光方法において、走査層ごとの走査は、空間光変調器によって、対物レンズの光軸方向における集光位置が制御されることにより行われても良い。

[0021] これによれば、走査層ごとの走査を好適に行うことができる。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、集光位置における多点の光の強度を制御することが可能な蛍光受光装置および蛍光受光方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1] 蛍光受光装置 1 の全体的な構成を示す図である。

[図2] 制御部 2 1 および補正部 2 2 のハードウェア構成図である。

[図3] 本実施形態における多点走査を例示する図である。

[図4] 補正部 2 2 の機能構成図である。

[図5] 蛍光受光器 4 0 固有の受光位置ごとの感度バラツキを説明するための図である。

[図6] フィードバック補正の手順を示すフローチャートである。

[図7] 本実施形態において、補正部 2 2 が蛍光受光器 4 0 固有の受光位置ごとの感度情報に基づきフィードバック補正を行うことにより、蛍光受光器 4 0 固有の受光位置ごとの場所依存の感度バラツキを認めながらも、当該感度バラツキによる影響を低減させ、位相変調光 L 2 および蛍光 L 3 の強度を均一にしていることを説明するための図である。

[図8] 本実施形態による効果を説明するための図である。

[図9] 本実施形態によるフィードバック補正の実施回数（横軸）と、蛍光強度のバラツキ（縦軸）との間の関係を示す図である。

符号の説明

[0024] 1…蛍光受光装置、1 0…励起光源、1 1…スペイシャルフィルタ、1 2…コリメートレンズ、1 3…ミラー、2 0…空間光変調器、2 1…制御部、2 2…補正部、2 2 1…第 1 ホログラム入力部、2 2 2…受光器固有感度情報格納部、2 2 3…第 2 ホログラム生成部、3 0…集光光学系、3 1…両側テレセントリックレンズ系、3 2…ダイクロイックミラー、3 3…対物レンズ、3 4…レンズ、9 0…試料、9 1…集光位置、9 2…試料ステージ、L 1…励起光、L 2…位相変調光、L 3…蛍光。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、添付図面を参照して本発明にかかる蛍光受光装置および蛍光受光方

法の一実施形態を詳細に説明する。なお、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

[0026] (蛍光受光装置 1 の構成)

最初に、本実施形態に係る蛍光受光装置（蛍光検出装置）1の全体構成について説明する。図1は、蛍光受光装置1の全体的な構成を示す図である。この図に示される蛍光受光装置1は、励起光L1が変調され、変調光L2が集光されることにより試料90から発生する蛍光L3を受光する装置であって、励起光源10、スペイシャルフィルタ11、コリメートレンズ12、ミラー13、空間光変調器20、制御部21、補正部22、集光光学系30、および蛍光受光器（蛍光検出器）40を備えて構成さ、例えば、蛍光走査顕微鏡装置やSTED顕微鏡装置、PALM、STORMなどである。

[0027] 励起光源10は、試料90の集光位置91に照射されるべき励起光L1を出力するものである。励起光源10は、励起光L1としてレーザ光を出力しても良く、例えばフェムト秒レーザ光源、Nd:YAGレーザ光源等のパルスレーザ光源であっても良い。これに限らず、励起光源10として、LD(Laser Diode)、SLD(Super Luminescent Diode)、ハロゲンランプ、キセノンランプ等が用いられても良い。励起光源10から出力された励起光L1は、スペイシャルフィルタ11を経た後、コリメートレンズ12によりコリメートされ、ミラー13により反射されて、空間光変調器20に入力される。なお、この構成に限らず、スペイシャルフィルタ11とコリメートレンズ12の組み合わせの代わりに、エキスパンダレンズ（図示せず）を備えても良い。この場合には、励起光源10からの励起光L1がエキスパンダレンズによって広げられ、ミラー13により反射されて、空間光変調器20に入力される。

[0028] 空間光変調器20は、位相変調型のものであって、励起光L1を入力し、当該励起光L1を位相変調することにより得られた位相変調光L2を出力するものである。すなわち、空間光変調器20は、励起光源10から出力された励起光L1を入力し、2次元配列された複数の画素それぞれにおいて励起

光L 1の位相を変調するホログラムを用いて励起光L 1を位相変調し、その位相変調後の位相変調光L 2を出力する。この空間光変調器20において用いられるホログラムは、数値計算により求められたホログラム(Computer Generated Hologram、以下「CGH」)であっても良い。

[0029] この空間光変調器20は、反射型のものであっても良く、透過型のものであっても良い。反射型の空間光変調器20としては、LCOS(Liquid Crystal on Silicon)型のもの、MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)型のもの、および光アドレス型のもの何れかが用いられても良い。また、透過型の空間光変調器20としては、LCD(Liquid Crystal Display)型のもの等が用いられても良い。更に、これに限らず、Segment Mirror型のもの、Continuous Deformable Mirror型のもので用いられても良い。

[0030] また、空間光変調器20は、振幅(強度)変調型のものであって、励起光L 1を入力し、当該励起光L 1を振幅変調することにより得られた変調光L 2を出力するものであってもよい。すなわち、空間光変調器20は、励起光源10から出力された励起光L 1を入力し、2次元配列された複数の画素それぞれにおいて励起光L 1の振幅を変調するホログラムを用いて励起光L 1を振幅変調し、その振幅変調後の振幅変調光L 2を出力する。振幅(強度)変調型の空間光変調器20は、反射型でも透過型でもよく、テキサスインスツルメンツ社のDLPを含むMEMS(MicroElectro Mechanical Systems)型およびLCD(Liquid Crystal Display)型などの空間光変調器が挙げられる。この空間光変調器20において用いられるホログラムは、数値計算により求められたホログラム(Computer Generated Hologram、以下「CGH」)であっても良い。なお、図1では、空間光変調器20として反射型で位相変調型の空間光変調器が例示され、以降、位相変調型の空間光変調器を用いた場合で説明する。

[0031] 制御部21は、空間光変調器20にCGHを表現させることにより、2次元配列された複数の画素それぞれにおいて励起光L 1を変調させ、且つ変調光L 2を集光光学系30により試料90の複数の集光位置91に集光させ

るものである。例えば、空間光変調器 20 が位相変調型の空間光変調器の場合、制御部 21 は、空間光変調器 20 に CGH を呈示させることにより、2次元配列された複数の画素それぞれにおいて励起光 L1 の位相を変調させ、且つ位相変調光 L2 を集光光学系 30 により試料 90 の複数の集光位置 91 に集光させるものである。特に、LCOS 型など液晶を用いる空間光変調器では、空間光変調器 20 に CGH を表示することで、空間光変調器 20 は CGH を表現する。なお、空間光変調器 20 が CGH を表現するとは、空間光変調器 20 が CGH を呈示することや表示することを含む。実際の動作を行うために駆動部（図示せず）を別途備え、制御部 21 が駆動部を操作することにより、上記位相変調および集光を行っても良い。この場合の駆動部は、制御部 21 の CGH を用いた制御のもとで、空間光変調器 20 の 2次元配列された複数の画素それぞれにおける位相変調量を設定し、画素ごとの位相変調量を示す信号を空間光変調器 20 に与える。

[0032] CGH の作成は、フーリエ変換型およびフレネルゾーンプレート型の何れの手法により行っても良い。CGH の作成を制御部 21 が行っても良く、別途の CGH 作成部（図示せず）を備えても良い。フーリエ変換型は GS 法等のアルゴリズムによりホログラムを作成することができ、フレネルゾーンプレート型は ORA (optimal-rotation-angle) 法等のアルゴリズムによりホログラムを作成することができる。なお、GS 法については下記の参考文献 1 に記載されており、ORA 法については下記の参考文献 2 に記載されている。

<参考文献 1> R. W. Gerchberg and W. O. Saxton, "A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures", *Optik*, Vol. 35, pp. 237-246 (1972).

<参考文献 2> Jorgen Bengtsson, "Kinoform design with an optimal-rotation-angle method", *Applied Optics*, Vol. 33, No. 29, pp. 6879-6884 (1994).

[0033] 図 2 は制御部 21 のハードウェア構成図である。図 2 に示すように、制御部 21 は、物理的には、CPU 201、ROM 202 及び RAM 203 等の

主記憶装置、キーボード及びマウス等の入力デバイス204、ディスプレイ等の出力デバイス205、空間光変調器20等との間でデータの送受信を行うためのネットワークカード等の通信モジュール206、ハードディスク等の補助記憶装置207等を含む通常のコンピュータシステムとして構成される。制御部21の各機能は、CPU201、ROM202、RAM203等のハードウェア上に所定のコンピュータソフトウェアを読み込ませることにより、CPU201の制御の元で入力デバイス204、出力デバイス205、通信モジュール206を動作させると共に、主記憶装置202、203や補助記憶装置207におけるデータの読み出し及び書き込みを行うことで実現される。

[0034] 図1に戻り、集光光学系30は、空間光変調器20の後段に設けられ、画素毎に位相変調された位相変調光L2を試料90に集光するものである。図1の例において集光光学系30は、両側テレセントリックレンズ系31、ダイクロイックミラー32、対物レンズ33、レンズ34を備えて構成される。空間光変調器20からの位相変調光L2は、両側テレセントリックレンズ系31およびダイクロイックミラー32によって対物レンズ33まで転送され、試料ステージ92上に載置された試料90を多点で照射する。染色された試料90からは、光照射によって蛍光L3が発生し、その蛍光L3の一部は対物レンズ33、ダイクロイックミラー32、レンズ34を介して蛍光受光器40に入射する。

[0035] 試料90への光照射は、ガルバノスキャナーや共振ミラー、ポリゴンミラーなどのスキャナーと光軸方向に動くステージあるいは対物レンズを用いて走査しても良く、ステージが光軸に対して垂直な面と光軸方向に動く3軸ステージを用いて走査しても良い。また、図1の対物レンズ33が走査のために動いても良い。更に、試料90へ照射するレンズは対物レンズに限らず、一般的なレンズやF θ レンズでも良い。以上のような構成により、図3に例示するような多点走査を行なうことができ、高速に画像を取得することが可能となる。図3は本実施形態における多点走査を例示する図である。図3（

a) は多点を1次元で配列したものを例示し、図3 (b) は多点を2次元で配列したものを例示する。それぞれの例において多点を用いてスキャンしており、まず、横方向をスキャンし、次に縦方向に1行移動してスキャンする(ラスタスキャン)。なお、ラスタスキャンに限らず、多点を用いた種々のスキャン手法が用いられても良い。

[0036] 図1に戻り、蛍光受光器40は、位相変調光L2が試料90に集光されることにより発生する蛍光L3を集光光学系30を介して受光するものであり、例えばマルチアノード型の光電子増倍管(PMT)により構成することができる。なお、これに限らず、蛍光受光器40として、フォトマルチプライヤーチューブ、CCDやCMOSイメージセンサ等の2次元撮像装置、アバランシェフォトダイオードアレイ、フォトダイオードアレイ等の2次元検出器を用いてもよい。蛍光受光器40は、受光器固有の場所依存の感度バラツキが存在するものであっても良い。また、蛍光受光部40の前にピンホール(図示せず)を配置し、コンフォーカル効果を持たせても良い。

[0037] 補正部22は、制御部21により空間光変調器20にすでに呈示されたCGHを補正するものである。補正部22は制御部21と同様のハードウェア構成(図2参照)を有する。制御部21と補正部22とが同じコンピュータシステム内に存在していても良い。図4は、補正部22の機能構成図である。図4に示されるように、補正部22は第1ホログラム入力部221、受光器固有感度情報格納部222、第2ホログラム生成部223を備えて構成される。

[0038] 第1ホログラム入力部221は、制御部21により空間光変調器20にすでに呈示されたCGHであって、補正前のCGHを入力する。第1ホログラム入力部221が入力するCGHが第1ホログラムである。第1ホログラム入力部221は、入力した第1CGHを第2ホログラム生成部223に出力する。

[0039] 受光器固有感度情報格納部222は、蛍光受光器固有の受光位置ごとの感度情報(以下、「受光器固有感度情報」)を予め取得し格納するものである

。図5は、2光子励起蛍光顕微鏡における受光器固有感度情報を説明するための図である。図5の例において、蛍光受光器40には受光器固有の場所依存の感度バラツキが存在する。つまり、蛍光受光器40が例えばマルチアノード型のPMTであれば、複数のアノード間で感度バラツキが存在する。図5(a)に示すような受光面の場所にかかわらず均一な光を入射したときに、アノードのユニフォミティに感度バラツキがあると、蛍光受光器40において検出された蛍光の強度情報は図5(b)のようになる。つまり、強度100の均一な蛍光L3が入射したとしても、蛍光受光器40の場所によって例えば強度82、95、97、100の異なる強度として当該蛍光L3が検出される。

[0040] また、図5(d)に示すように、蛍光受光器40において検出された蛍光L3の強度が均一であっても、実際に入射された蛍光L3は図5(c)に示すように不均一なものである場合がある。つまり、蛍光受光器40において検出された蛍光L3の強度が例えば強度100で均一な場合には、空間光変調器20は実際には例えば強度100、86、84、82の不均一な光を照射していたことになる。言い換えれば、蛍光受光器40において検出された蛍光L3の強度が均一な場合に、これは蛍光受光器40の固有の場所依存の感度バラツキを考慮しない場合には一見入射された蛍光L3が均一なものと思われがちである。しかし、蛍光受光器40の固有の場所依存の感度バラツキを考慮すると、入射された蛍光L3は実は、不均一なものであったことになる。

[0041] 受光器固有感度情報格納部222は、所定の均一な強度の蛍光を入射した場合の、蛍光受光器40固有の受光位置ごとの感度情報を予め取得し格納する。具体的には、励起光源10から射出した光をエキスパンダレンズ等で広げて、強度が略均一な平行光を2次元イメージセンサである蛍光受光器40に入射させ、蛍光受光器40の感度ムラを予め調査する。この調査によって、均一な光(蛍光)が入射したときに、蛍光受光器40で得られる多点のそれぞれの強度を「受光器固有感度情報」として記録する。なお、感度バラツ

キを観察するために、光の強度を複数回に渡って変更することにより、受光器固有感度情報の束である「受光器固有感度マップ」を作成しても良い。

[0042] 第2ホログラム生成部223は、励起状態、集光位置における蛍光L3の強度、および受光器固有感度情報格納部222に格納された受光器固有感度情報に基づき、第1CGHをフィードバック補正することにより、第2CGHを生成するものである。第2ホログラム生成部223は、生成した第2CGHを制御部21に出力する。第2ホログラム生成部223により生成され制御部21に出力されるCGHが第2ホログラムである。制御部21は、第2CGHを入力し、空間光変調器20に呈示する。つまり、制御部21が空間光変調器20に呈示したホログラムが補正部22によりフィードバック補正され、補正後のホログラムが再び制御部21により空間光変調器20に呈示される。これは、試料90に照射される多点の強度バラツキが所定の閾値以下になるまで繰り返される。または、フィードバック補正の実施回数が所定の閾値以上になるまで繰り返される。

[0043] (フィードバック補正の手順)

続いて、第1ホログラムがフィードバック補正され、第2ホログラムが生成される際の手順について詳細に説明する。図6は、この手順を示すフローチャートである。

[0044] 最初に、受光器固有感度情報格納部222が、所定の均一な強度の光を入射した場合の受光器固有感度情報を予め取得し格納しておく(ステップS1)。

[0045] 次に、制御部21の制御のもとで、第1CGHが設計される(ステップS2)。

[0046] 次に、制御部21の制御のもとで、第1CGHが空間光変調器20に呈示されることで、空間光変調器20は第1CGHを表現する。これにより、励起光L1は第1CGHに対応した位相分布を持つ位相変調光L2となり、この生成された位相変調光L2が試料90に多点照射される(ステップS3)。

- [0047] 次に、ステップS 3の照射によって生じた蛍光L 3を蛍光受光器4 0が撮像し、当該蛍光の強度情報を取得する（ステップS 4）。
- [0048] 次に、補正部2 2（第2ホログラム生成部2 2 3）が、ステップS 4で取得した蛍光L 3の強度情報におけるバラツキを算出する。強度バラツキの算出には、Peak-to-valley (PV)法やRMS (Root Mean Square error)法を用いる。このとき、ステップS 1で予め取得して格納した受光器固有感度情報を考慮して、ステップS 4で取得した蛍光L 3の強度のバラツキを算出する。例えば、ステップS 4で取得した蛍光L 3の強度情報と、ステップS 1で取得した受光器固有感度情報とが同等であれば、強度バラツキはゼロであると言える。なお、ステップS 1で取得した受光器固有感度情報を考慮する際には、Peak-to-valley (PV)法やRMS (Root Mean Square error)法の評価がある一定の範囲内にあるかないかを更に判別するようにしても良い。（ステップS 5）
- [0049] 次に、ステップS 5で算出した強度バラツキが所定の閾値以下である場合には（ステップS 6：YES）、処理を終了する。一方、ステップS 5で算出した強度バラツキが所定の閾値以下でない場合には（ステップS 6：NO）、処理の流れはステップS 7に移行し、蛍光強度を制御するために、第2ホログラム生成部2 2 3が第1CGHを再設計して第2CGHを生成する。なお、本実施形態では、蛍光強度を制御する一つの態様として、蛍光強度を均一化することとする。そして、処理の流れはステップS 3に移行され、ステップS 3～ステップS 6が繰り返される。なお、ステップS 6の判断においては、ステップS 5で算出した強度バラツキが所定の閾値以下であるか否かを判断する代わりに、フィードバック補正の実施回数が所定の閾値以上であるか否かを判断しても良い。
- [0050] （CGH再設計の手順、その1）
ここで、第1CGHを再設計して第2CGHを生成する方法（ステップS 7）について説明する。
- [0051] 最初に、第2ホログラム生成部2 2 3が、ステップS 4で取得した蛍光L

3の強度バラツキに基づき、CGH設計にフィードバックするための補正係数 V_k を下記の式(1)より導出する。

[数1]

$$v^{(k)}(m) = v^{(k-1)}(m) * \sqrt[n]{\frac{q^{(k-1)}(m)}{q^{(k)}(m)}} \dots (1)$$

ただし、 m は多点の位置、 k はフィードバック回数、 q はステップS4で取得した蛍光L3の強度、 n は光子の数である。上記式(1)からわかるように、補正部22による補正は、複数個の集光位置ごとに行われる(ステップS71)。また、上記式(1)では、 n 光子吸収過程によって補正係数 V_k が変化する。

[0052] 次に、第2ホログラム生成部223が、ステップS71で導出した補正係数 V_k を用いて、第1CGHを再設計して第2CGHを生成する。例えば、反復フーリエ変換法的一种であるOver Compensation (OC)法では、ターゲットパターン(多点の位置や強度を示したパターン)をイタレーションごとにウェイトを用いて変更するので、OC法での第2CGHにおけるターゲットパターンは下記の式(2)のようになる。

[数2]

$$T_l^{(k)}(m) = s(m)v^{(k)}(m)w_l^{(k)}(m)T_{goal}(m) \dots (2)$$

ただし、 l はOC法のイタレーション回数、

[数3]

$$w_l^{(k)}(m)$$

はOC法で用いられるウェイト、 $T_{goal}(m)$ はターゲットパターン、 $s(m)$ は受光器固有感度情報を考慮した係数である(ステップS72)。

[0053] (CGH再設計の手順、その2)

続いて、第1CGHを再設計して第2CGHを生成する別の方法(ステップS7)について説明する。

[0054] 上述のCGH再設計の手順その1においては、補正係数 V_k に係数 $s(m)$ が考慮されておらず、フィードバック時に係数 $s(m)$ が適用された。一

方で、CGH再設計の手順その2では、係数 $s(m)$ が補正係数 V_k に最初から考慮されている点で異なる。

[0055] すなわち、最初に、第2ホログラム生成部223が、ステップS4で取得した蛍光L3の強度バラツキに基づき、CGH設計にフィードバックするための補正係数 V_k を下記の式(3)より導出する。

[数4]

$$v^{(k)}(m) = s(m) * v^{(k-1)}(m) * \sqrt[2^{*k}]{\frac{q^{(k-1)}(m)}{q^{(k)}(m)}} \dots (3)$$

式(1)の場合と同様に、式(3)を用いた場合でも、補正部22による補正は、複数個の集光位置ごとに行われる(ステップS73)。

[0056] 次に、第2ホログラム生成部223が、ステップS73で導出した補正係数 V_k を用いて、第1CGHを再設計して第2CGHを生成する。例えば、反復フーリエ変換法的一种であるOver Compensation(OC)法では、ターゲットパターン(多点の位置や強度を示したパターン)をイタレーションごとにウェイトを用いて変更するので、OC法での第2CGHにおけるターゲットパターンは下記の式(4)のようになる(ステップS74)。

[数5]

$$T_i^{(k)}(m) = v^{(k)}(m) w_i^{(k)}(m) T_{goal}(m) \dots (4)$$

[0057] (係数 $s(m)$ の算出方法)

以下、ステップS72およびステップS73における2光子励起蛍光顕微鏡における係数 $s(m)$ の算出方法について詳細に説明する。以下の説明においては、ステップS1で取得した受光器固有感度情報が例えば図5(b)だったものとする。

[0058] 最初に、ステップS1で取得した受光器固有感度情報の4乗根を求める。この演算は、2光子励起蛍光顕微鏡では位相変調光L2の強度は振幅の2乗であり、蛍光L3の強度は位相変調光L2の強度の2乗であることに起因する。求めた4乗根を下記の式(5)に示す(ステップS731)。

[数6]

$$\begin{bmatrix} 3.009 & 3.132 \\ 3.138 & 3.162 \end{bmatrix} \dots(5)$$

[0059] 次に、式（５）における最小の要素で各要素を割る。その演算結果を下記の式（６）に示す（ステップS 7 3 2）。

[数7]

$$\begin{bmatrix} 1.000 & 1.037 \\ 1.043 & 1.051 \end{bmatrix} \dots(6)$$

[0060] 次に、式（６）における各要素の逆数を計算する。その計算結果を下記の式（７）に示す（ステップS 7 3 3）。

[数8]

$$\begin{bmatrix} 1.000 & 0.964 \\ 0.959 & 0.952 \end{bmatrix} \dots(7)$$

[0061] 次に、式（７）を規格化することにより、ステップS 7 2およびステップS 7 3における係数 s （ m ）が最終的に算出される。算出された係数 s （ m ）を下記の式（８）に示す（ステップS 7 3 4）。

[数9]

$$\begin{bmatrix} 100 & 96 \\ 96 & 95 \end{bmatrix} \dots(8)$$

[0062] 以上により算出した係数 s （ m ）をステップS 7 2およびステップS 7 3にて用いることにより、CGH再設計の手順その１およびその２を実行することができる。

[0063] なお、 n 光子励起蛍光顕微鏡の場合には、位相変調光L 2の強度は振幅の２乗であり、蛍光L 3の強度は位相変調光L 2の強度の n 乗であることを利用する。例えば、１光子励起蛍光顕微鏡の場合には、位相変調光L 2の強度は振幅の２乗であり、蛍光L 3の強度は位相変調光L 2の強度の１乗、つまり蛍光L 3の強度は位相変調光L 2の強度と同じである。また、例えば、３光子励起蛍光顕微鏡の場合には、位相変調光L 2の強度は振幅の２乗であり

、蛍光L 3の強度は位相変調光L 2の強度の3乗である。

[0064] なお、蛍光L 3の強度、すなわち q の導出方法については、受光器固有感度情報（例えば図5（b））の代わりに、蛍光受光器40によりステップS 4で取得した蛍光L 3の強度情報を用いて、上述のステップS 7 3 1～ステップS 7 3 4と同様の演算を行うことによって算出することができる。

[0065] 以上で説明したステップS 1～ステップS 7を実行することにより、試料90に照射される位相変調光L 2、および試料90から射出される蛍光L 3を両方とも例えば均一に制御することができる。ここで、試料90に照射される位相変調光L 2と試料90から照射される蛍光L 3とをそれぞれ均一にするために、どの位置に照射されても励起光強度が同じであれば、同じ強度の蛍光が得られるような均質な蛍光材料を試料90として用いても良い。つまり、試料90に集光された位相変調光L 2対試料90から発生する蛍光L 3の強度の比率において、場所依存のバラツキのない均質な蛍光材料からなるものを、本実施形態における試料90として用いても良い。

[0066] なお、蛍光受光器40固有の受光位置ごとの場所依存の感度バラツキを均一にするために、画像処理等によるシェーディング補正を更に施しても良い。これにより、フィードバック補正の実施回数を減らすことができる。

[0067] ここまでの設計方法は、OC法に従って説明をしたが、CGH設計方法は、OC法に限らない。OC法が含まれる反復フーリエ変換法や、シミュレーテッドアニーリング、Optimal rotation angle method (ORA法)や遺伝的アルゴリズムなどの1画素の変化に着目する方法、複素振幅の形で足し合わせる重ね合わせ方法などもCGH設計方法として採用できる。以上列挙した何れの手法でも、フィードバック時には上記式（1）または式（3）が用いられる。

[0068] (z-stack)

以上で説明した補正部22による補正は、集光光学系30に含まれた対物レンズ33の光軸方向に沿った所定の間隔の走査層ごとに行われても良い。以下では、走査層ごとの補正を実現するためのz-stackについて説明する。z-stackとは、試料90の奥行き方向をずらして画像を撮像す

ることで、3次元画像を得ることをいう。z-stackは、(a)空間光変調器20にフレネルレンズパターンを呈示する方法、(b)蛍光受光装置1を含む蛍光走査顕微鏡装置のZステージを移動させる方法、(c)対物レンズ33そのものを移動させる方法、(d)これらの組み合わせ、によって、対物レンズ33の光軸方向に沿った所定の間隔で走査層を移動させることにより実現される。

[0069] 以下、z-stackを行う際の処理手順について説明する。なお、以下の説明では、空間光変調器20に呈示する多点を生成するためのCGHにフレネルレンズを加えることで、つまり上記方法(a)で、対物レンズ33の光軸方向における深さ方向の制御を行い、且つ3つの深さD1、D2、D3で走査層を移動させてスキャンを行う例について説明する。

[0070] 最初に、多点を生成するためのCGHを設計する(ステップS101)。

[0071] 次に、ステップS101で設計したCGHに深さD1を観察するためのフレネルレンズを加える(ステップS102)。

[0072] 次に、ステップS102で合成されたCGHに、必要に応じて、収差補正パターンを更に加える(ステップS103)。

[0073] 次に、ステップS103で合成されたCGHを空間光変調器20に呈示することで、空間光変調器20はステップS103で合成されたCGHを表現し、生成した多点を均質な試料90に照射する(ステップS104)。

[0074] 次に、試料90から発生した蛍光像をマルチアノード型のPMT、カメラ等で撮像する(ステップS105)。

[0075] 次に、検出した蛍光強度のバラツキを調べる。バラツキの算出には、Peak-to-valley (PV)法やRMS (Root Mean Square error) 法を用いる。このとき、集光点の中心を中心とした観察領域を設け、その中の強度の合計におけるバラツキを調べても良い。また、生体を考慮した収差補正を行うために意図的に大きな収差を加えて観察する場合には、収差によって広がったスポット全体を網羅するように観察領域を設けても良い。ここで、「意図的に大きな収差」とは、媒質の屈折率を n 、媒質の入射面からレンズの焦点までの深さを

d、媒質によって発生する収差を Δs とした場合に、例えば、「 $n \times d - \Delta s$ 」以上、且つ「 $n \times d + \Delta s$ 」以下の範囲における収差をいう。なお、これに限らず、観測対象と浸液等との屈折率のミスマッチングで発生する球面収差、対象物の形状によって発生する非点収差等を予めシミュレーションまたはシャックハルトマンセンサ等を用いて測定して、これらを更に考慮した範囲における収差を上記「意図的に大きな収差」としても良い（ステップS106）。

[0076] ステップS106で算出したバラツキが許容の範囲内ならば処理を終了する（ステップS107）。

[0077] ステップS106で算出したバラツキが許容の範囲外であるならば、ステップS101で設計したCGHを初期位相としてCGHの再設計を行なう。つまり、ステップS101で設計したCGHを第1CGHとし、上述したCGH再設計の手順その1、その2、および係数 s （ m ）の算出方法を用いて第2CGHを生成する（ステップS108）。

[0078] 次に、ステップS104～ステップS108を繰り返し、ステップS106で算出したバラツキが許容の範囲内になるまで繰り返しを継続し、深さ D_1 に対する最適なCGHを設計する。この繰り返しにおいて、ステップS102およびステップS103は除外される。つまり、ステップS102およびステップS103の手順は深さごとに1回のみ行われる（ステップS109）。

[0079] 次に、深さを D_2 に変えて、ステップS101～ステップS109の処理を行う。また、深さを D_3 に変えて、ステップS101～ステップS109の処理を行う。

[0080] 最終的に、深さごとに最適化されたCGHをそれぞれの深さで呈示して z -stackにおける走査を行なう。

[0081] 以上の説明においては、 z -stackを行うための方法として上記の方法（a）の場合を説明した。つまり、空間光変調器20によって、対物レンズ33の光軸方向における集光位置が制御されることで、走査層ごとの走査

が行われる場合を説明した。これに限らず、上記の方法 (b) および (c) の場合にも以上と同様の手順を適用することができる。なお、方法 (a) ではフレネルレンズパターンを変えることにより深さを変更していたが、方法 (b) の場合にはZステージを移動させ、且つ方法 (c) の場合には対物レンズ33を移動させることにより深さを変更する。

[0082] 空間光変調器20の特性や集光光学系30の調整ミス等によって蛍光強度が均一にならなかったことから、本実施形態では、フィードバック補正を行なうことで、これらの問題が補正されたCGHを設計し、それを空間光変調器20に再呈示させている。しかし、z-stackを行なうためにZ軸を移動した場合には、集光過程にある媒質の状態が光学的に変化することによって光学系が変化するために、折角フィードバック補正によって制御された蛍光強度の均一性が崩れてしまう恐れがある。更に、フレネルレンズパターンを用いてz-stackを実現した場合には、フレネルレンズパターンが加えられることにより、折角求めた最適なCGHがこれ以上もう最適なCGHでなくなってしまうことがある。また、高NAの対物レンズ等で対象物を観察する場合には、対物レンズから対象物までの間に様々な屈折率の異なる媒質が存在し、それらにより収差が発生する。収差を補正するためには、空間光変調器20に収差補正パターンを呈示することが考えられるが、その結果最適なCGHになるための条件がまた変化してしまう。

[0083] 以上の課題に対応するために、本実施形態では、最初に設計したCGHにフレネルレンズパターンや収差補正パターンを足し合わせ、更に、フレネルレンズパターンや収差補正パターンはフィードバック補正には用いないこととしている。これにより、収差を収差補正パターンによって補正するとともに、フレネルレンズパターンや収差補正パターンが固定された上で、フィードバック補正が行われる。したがって、フレネルレンズパターンが加えられること等によりZ軸が移動し媒質の光学的な状態および光学系の変化が発生する場合や、高NAの対物レンズ等の光学系または伝搬過程に存在する媒質での屈折率の相違等により収差が発生した場合でも、当該収差を補正すると

ともに、フィードバック補正によって得られる蛍光強度の均一性を維持することができる。

[0084] また、本実施形態の蛍光受光装置 1 によれば、最初に空間光変調器 20 によって表現される第 1 CGH が補正部 22 によって補正され、当該補正により新たに生成された第 2 CGH が空間光変調器 20 によって改めて表現される。つまり、補正部 22 および制御部 21 によりホログラムがフィードバックされることにより、当該ホログラムの補正が行われる。第 2 CGH は、励起状態、集光位置における蛍光 L3 の強度および受光器固有感度情報に基づき、第 1 CGH が補正されることにより得られ、この第 2 CGH により、空間光変調器 20 で生成された多点における強度バラツキが、蛍光受光器 40 における感度バラツキが考慮された上で、例えば均一に制御される。ここで、ホログラムがフィードバック補正されることにより、試料 90 に照射される位相変調光 L2 と試料 90 から照射される蛍光 L3 とがそれぞれ例えば均一に制御される。特に、補正部 22 による補正が、受光器固有感度情報に基づき行われるため、蛍光受光器 40 固有の受光位置ごとの場所依存の感度バラツキを認めながらも、当該感度バラツキによる影響を低減させることができる。

[0085] 図 7 は、本実施形態における思想を別の側面で説明するための図である。図 7 (a) は、図 5 (a) および (b) を用いて上記説明したように、入射された蛍光 L3 が均一なものの一見思われがちであるものの、蛍光受光器 40 の固有の場所依存の感度バラツキを考慮すると、入射された蛍光 L3 は実は、不均一なものであったことをイメージする。図 7 (a) においては、試料 90 の集光位置 91 および蛍光受光器 40 の受光位置 41 における丸の大きさを強度の度合いを示している。すなわち、試料 90 の集光位置 91 においては丸の大きさが異なっており、これは集光位置 91 における光の強度が不均一であることを示す。一方、蛍光受光器 40 の受光位置 41 においては丸の大きさが同一であり、これは受光位置 41 において光の強度が一見均一に見えることを示す。

[0086] 一方、図7(b)は、図5(c)および(d)を用いて上記説明したように、蛍光受光器40にて検出される蛍光の強度は不均一であるものの、試料90に入射する位相変調光L2および蛍光L3の強度は均一であることをイメージする。これは、本実施形態の補正部22が受光器固有感度情報に基づきフィードバック補正を行うことにより、蛍光受光器40固有の受光位置ごとの場所依存の感度バラツキを認めながらも、当該感度バラツキによる影響を低減させ、位相変調光L2および蛍光L3の強度を均一にしていることを意味する。

[0087] 以下、本実施形態による効果について実例を示して説明する。すなわち、この実例においては試料90としてrAcGFP1溶液を用い、蛍光受光装置1による多点照射を行った。その結果を図8に示す。図8(a)は、フィードバック補正を行う前の蛍光画像を示す。図8(a)では中心部に比べて右上部の蛍光強度が低くなっており、また目視では確認しにくいものの、場所に依存する強度バラツキが中央付近にも存在する。なお、図8においては、蛍光の強度を明るさで示している。図8(b)は、本実施形態にかかるフィードバック補正を行った蛍光画像を示す。図8(a)とは異なり、場所に依存する強度バラツキが低減されていることがわかる。なお、図8は、受光器固有感度情報を考慮した上で、各受光位置で検出した蛍光の強度を示している。

[0088] 図9は、本実施形態によるフィードバック補正の実施回数(横軸)と、蛍光強度のバラツキ(縦軸)との間の関係を示す図である。バラツキの評価関数としては、上述したようにPeak-to-valley(PV)法やRMS(Root Mean Square error)法を用いた。なお、PV法とRMS法における算出バラツキはそれぞれ下記の式(9)、(10)でそれぞれ表すことができる。

[数10]

$$PV = \frac{(q_{\max} - q_{\min})}{2 * q_{\text{desired}}} \dots (9)$$

[数11]

$$RMS = \sum_{m=1}^M \sqrt{\frac{[q(m) - q_{\text{desired}}]^2}{M}} \dots (10)$$

ただし、 $q(m)$ は m 番目の蛍光の観察領域における蛍光の総和であり、 q_{max} 、 q_{min} 、 $q_{desired}$ はそれぞれ最大、最小、所望の蛍光強度である。図9に示されるように、補正前（フィードバック補正の実施回数=0）に $PV=26\%$ 、 $RMS=10\%$ だったものが、6回のフィードバック補正後には $PV=3\%$ 、 $RMS=1\%$ と大幅に改善していることが確認できる。

[0089] また、本実施形態では、試料90を置いて蛍光L3を検出している。ここで、試料90を置いて蛍光を検出するメリットは以下の通りである。すなわち、rACGFP溶液やクマリンエタノール等の蛍光強度が均一に得られる媒質を試料90として用いて、一度補正を行えば、その後、細胞等を試料として用いた場合でも均一なデータが得られることが一つ目のメリットである。二つ目のメリットとしては、試料を用いることで、実際に計測する光学系を用いることができるので、光学系全体の補正が可能であるということが挙げられる。三つ目のメリットとしては、観察する条件に近い屈折率を持つ均質媒質を用意することで、球面収差補正やレンズパターンを適用した状態で均一化が可能であるということが挙げられる。なお、試料90と観察媒質の屈折率が極端に異なると集光像がボケてしまい、SNが下がるため、均一化の精度が低下する恐れがある。したがって、試料90の屈折率を観察媒質の屈折率にある程度合わせるようにしても良い。更に、OC法は最適化法であり、局所解に陥るのを防ぐために初期位相にランダム位相が用いられることが多い。その結果、第1ホログラムごとに、生成される多点のバラツキの分布が異なる。または、同じ初期位相を用いてもターゲットパターンにおける多点の位置や強度が変化すると、第1ホログラムによって生成される多点のバラツキの分布が異なる。蛍光強度が均一に得られる媒質を試料90として用いることで、ホログラム起因のバラツキを明確に把握できることが四つ目のメリットである。

[0090] また、本実施形態によれば、補正部22による補正が複数個の集光位置ごとに行われるため、空間光変調器20およびホログラムにより生成された多

点それぞれに当該補正を適用することができる。

[0091] この発明は、多光子励起を行うことができる短パルスレーザを励起光源 10 に用いた場合に起こる、複数個の集光位置の強度バラツキに対して特に有用である。このような励起光源 10 としては、ナノ秒以下のパルス幅を有し、波長が 650 nm 以上の短パルスレーザを出射できる光源が好ましい。

[0092] また、本実施形態は、マルチアノード型の光電子増倍管のような、場所依存の感度バラツキの存在する蛍光受光器 40 に特に有用である。

[0093] また、本実施形態によれば、試料 90 への位相変調光 L2 および試料 90 からの蛍光 L3 の両方を例えば均一に強度制御する際に、場所依存のバラツキのない均質な蛍光材料を試料 90 として用いることにより、計算量を減らすことができ、当該制御を簡易且つ好適に行うことができる。

[0094] また、本実施形態によれば、補正部 22 による補正は、集光光学系 30 に含まれた対物レンズ 33 の光軸方向に沿った所定の間隔の走査層ごとに行われるため、ある程度の深さを有する試料 90 に対しても本実施形態を適用させることができる。

[0095] また、本実施形態によれば、空間光変調器 20 が対物レンズ 33 の光軸方向における集光位置を制御することで走査層ごとの走査を行うため、走査層ごとの走査を好適に行うことができる。

[0096] なお、試料として、実際の測定試料の屈折率に近い屈折率を有し、蛍光物質などの溶質の濃度が均一なキャリブレーション試料を用いてもよい。このようなキャリブレーション試料を用いると、蛍光強度の均一性を保つことができる。

産業上の利用可能性

[0097] 本発明は、集光位置における多点の蛍光の強度を制御することができる蛍光受光装置および蛍光受光方法を提供する。

請求の範囲

- [請求項1] 位相変調された励起光が集光されることにより試料から発生する蛍光を受光する蛍光受光装置であって、
- 前記励起光を出力する励起光源と、
 - 前記励起光を入力し、前記励起光を位相変調することにより得られた位相変調光を出力する位相変調型の空間光変調器と、
 - 前記空間光変調器の後段に設けられ、前記位相変調光を前記試料に集光する集光光学系と、
 - 前記試料が載置される試料ステージと、
 - 前記位相変調光が前記試料に集光されることにより発生する蛍光を前記集光光学系を介して受光する蛍光受光器と、
 - 前記空間光変調器に第1ホログラムを表示することにより、2次元配列された複数の画素それぞれにおいて前記励起光の位相を変調させ、且つ前記位相変調光を前記集光光学系により前記試料の複数の集光位置に集光させる制御部と、
 - 前記第1ホログラムを補正する補正部と、
 - を備え、
 - 前記補正部は、
 - 前記第1ホログラムを入力する第1ホログラム入力部と、
 - 前記蛍光受光器固有の受光位置ごとの感度情報を予め取得し格納する受光器固有感度情報格納部と、
 - 前記集光位置における前記蛍光の強度および前記受光器固有感度情報格納部に格納された前記感度情報に基づき、前記第1ホログラムを補正することにより、第2ホログラムを生成する第2ホログラム生成部と、
 - を備え、
 - 前記制御部は前記空間光変調器に前記第2ホログラムを表示する、
- 蛍光受光装置。

- [請求項2] 前記補正部による前記補正は、前記複数個の集光位置ごとに行われる、請求項1に記載の蛍光受光装置。
- [請求項3] 前記励起光源は、多光子励起を行うことができる短パルスレーザである、請求項1または2に記載の蛍光受光装置。
- [請求項4] 前記蛍光受光器はマルチアノード型の光電子増倍管である、請求項1～3の何れか1項に記載の蛍光受光装置。
- [請求項5] 前記試料は、前記試料に集光された前記位相変調光対前記試料から発生する前記蛍光の強度の比率において、場所依存のバラツキのない均質な蛍光材料からなる、請求項1～4の何れか1項に記載の蛍光受光装置。
- [請求項6] 前記補正部による前記補正は、前記集光光学系に含まれた対物レンズの光軸方向に沿った所定の間隔の走査層ごとに行われる、請求項1～5の何れか1項に記載の蛍光受光装置。
- [請求項7] 前記走査層ごとの走査は、前記空間光変調器によって、前記対物レンズの前記光軸方向における集光位置が制御されることにより行われる、請求項6に記載の蛍光受光装置。
- [請求項8] 位相変調された励起光が集光されることにより、試料ステージに載置された試料から発生する蛍光を受光する蛍光受光装置における蛍光受光方法であって、
励起光源が、前記励起光を出力するステップと、
位相変調型の空間光変調器が、前記励起光を入力し、前記励起光を位相変調することにより得られた位相変調光を出力するステップと、
前記空間光変調器の後段に設けられた集光光学系が、前記位相変調光を前記試料に集光するステップと、
蛍光受光器が、前記位相変調光が前記試料に集光されることにより発生する蛍光を前記集光光学系を介して受光するステップと、
制御部が、前記空間光変調器に第1ホログラムを表示することにより、2次元配列された複数の画素それぞれにおいて前記励起光の位相

を変調させ、且つ前記位相変調光を前記集光光学系により前記試料の複数個の集光位置に集光させるステップと、

補正部が、前記第1ホログラムを補正するステップと、

を備え、

前記補正部が前記第1ホログラムを補正するステップは、

第1ホログラム入力部が、前記第1ホログラムを入力するステップと、

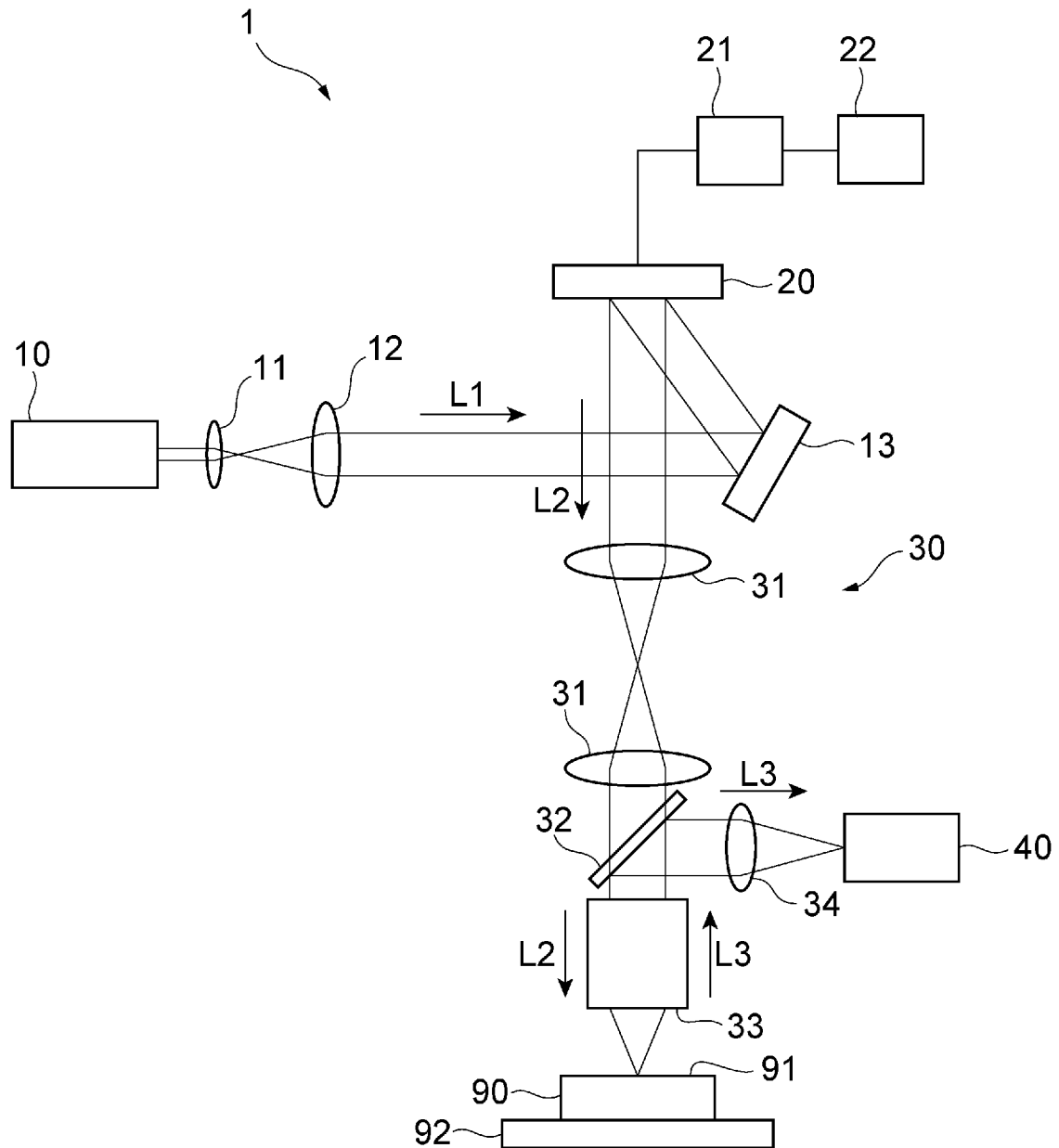
受光器固有感度情報格納部が、前記蛍光受光器固有の受光位置ごとの感度情報を予め取得し格納するステップと、

第2ホログラム生成部が、前記集光位置における前記蛍光の強度および前記受光器固有感度情報格納部に格納された前記感度情報に基づき、前記第1ホログラムを補正することにより、第2ホログラムを生成するステップと、

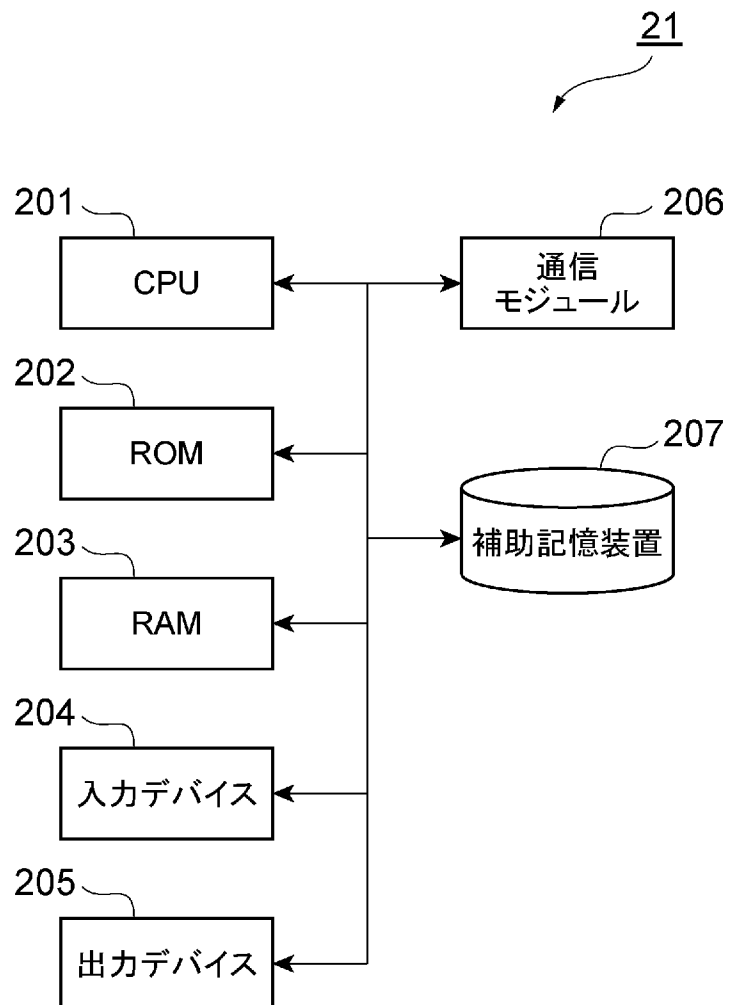
を備え、

前記制御部が、前記空間光変調器に前記第2ホログラムを表示するステップを更に備える、蛍光受光方法。

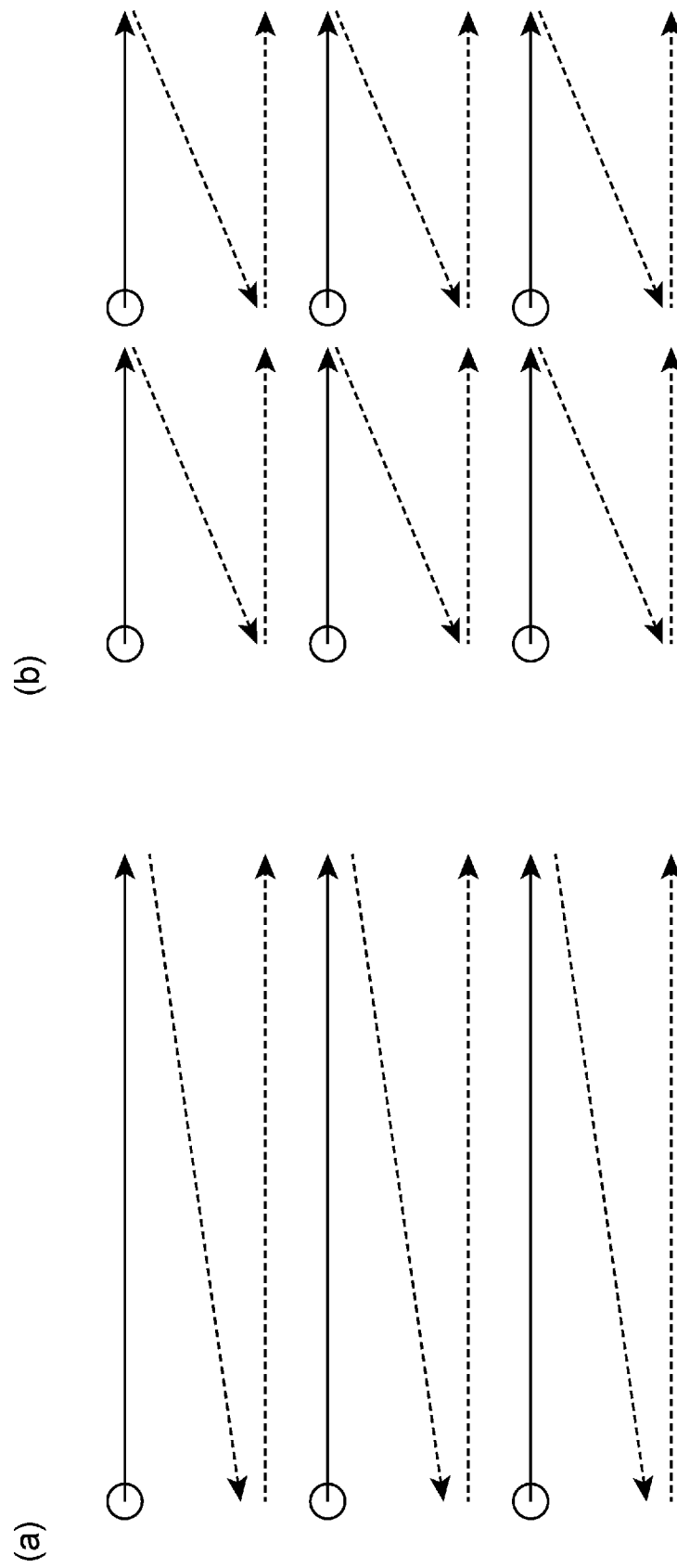
[図1]



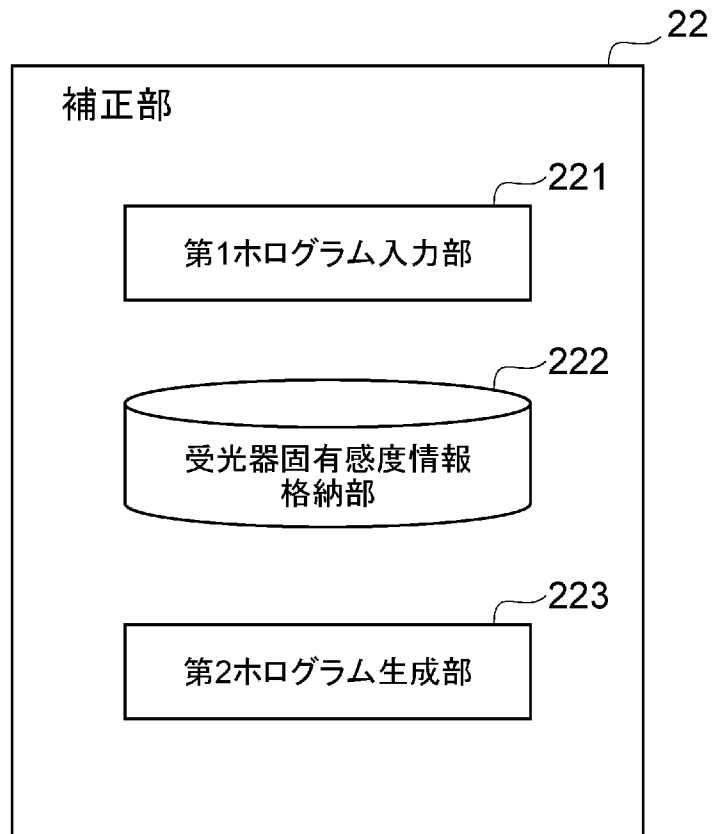
[図2]



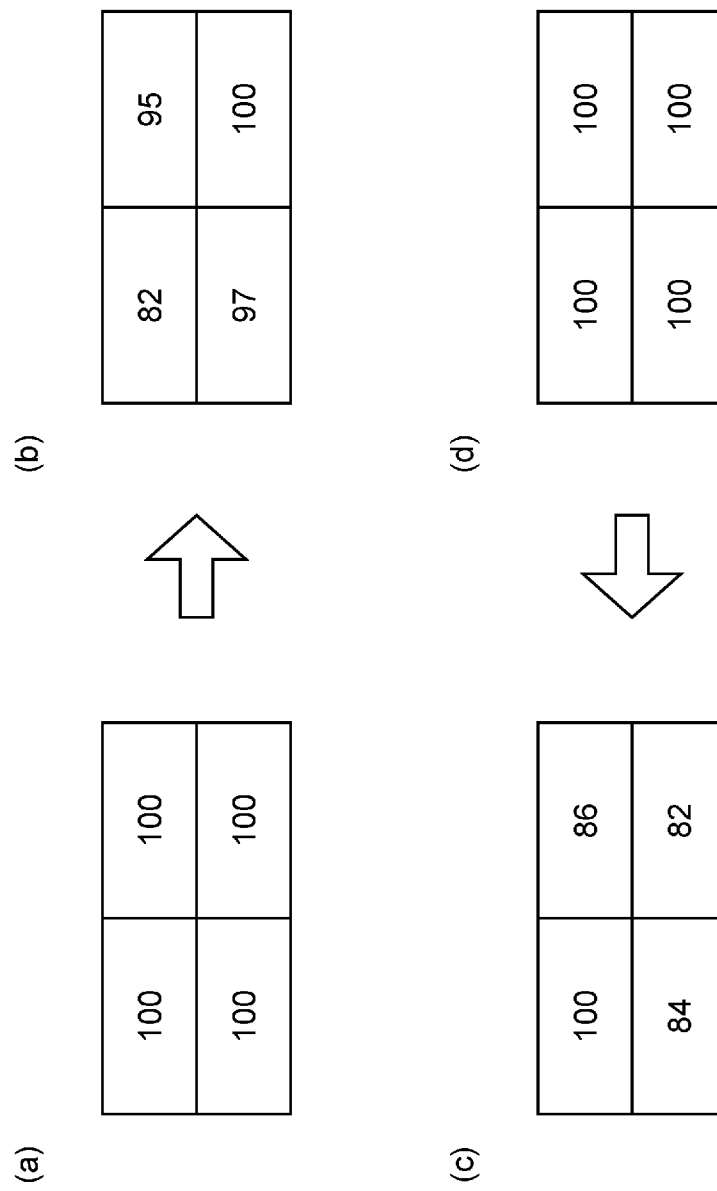
[図3]



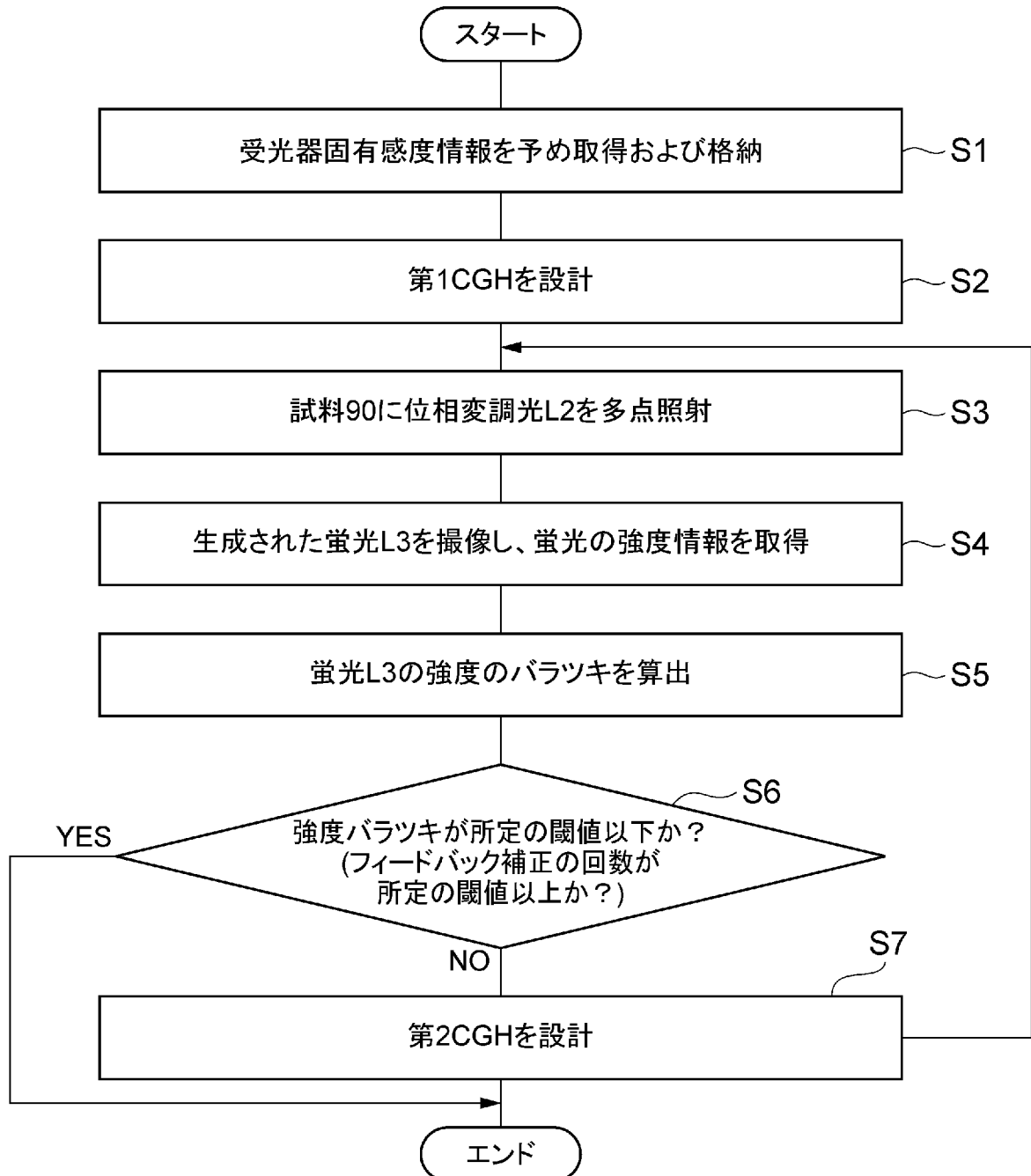
[図4]



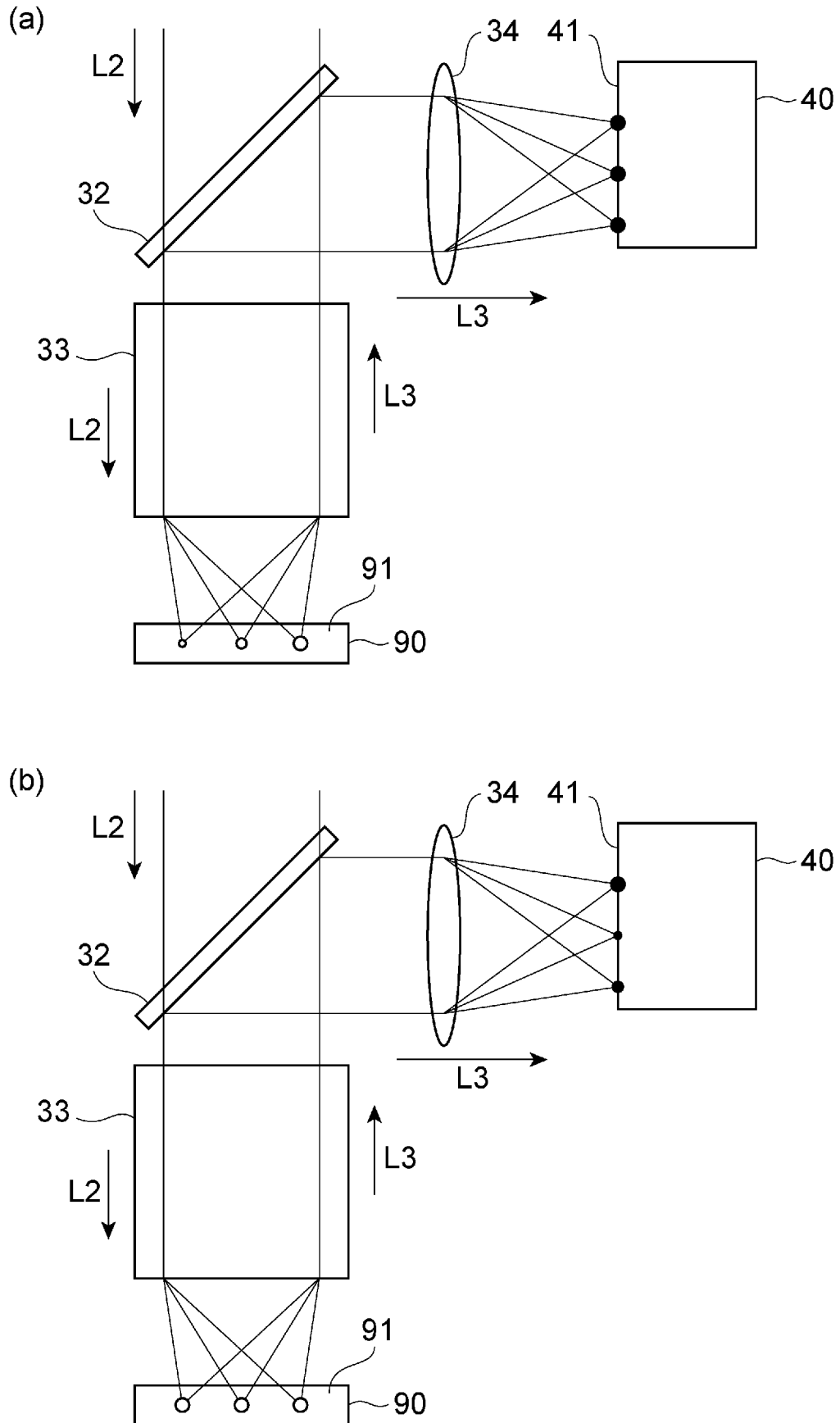
[図5]



[図6]

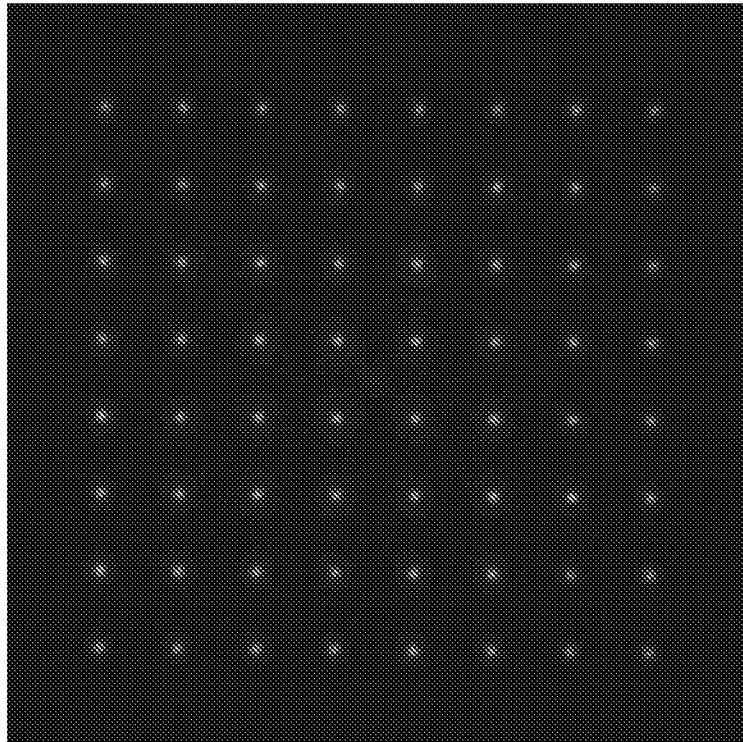


[図7]

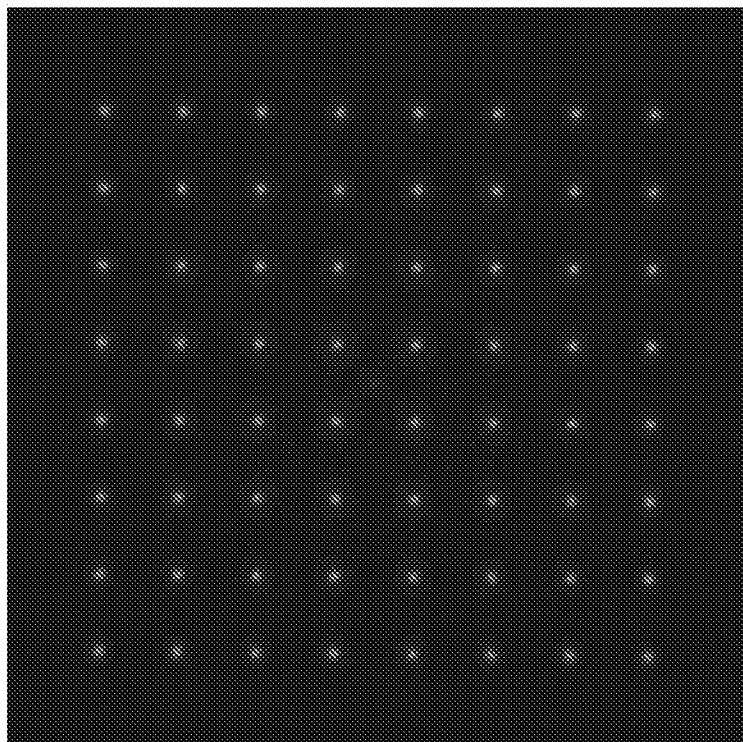


[図8]

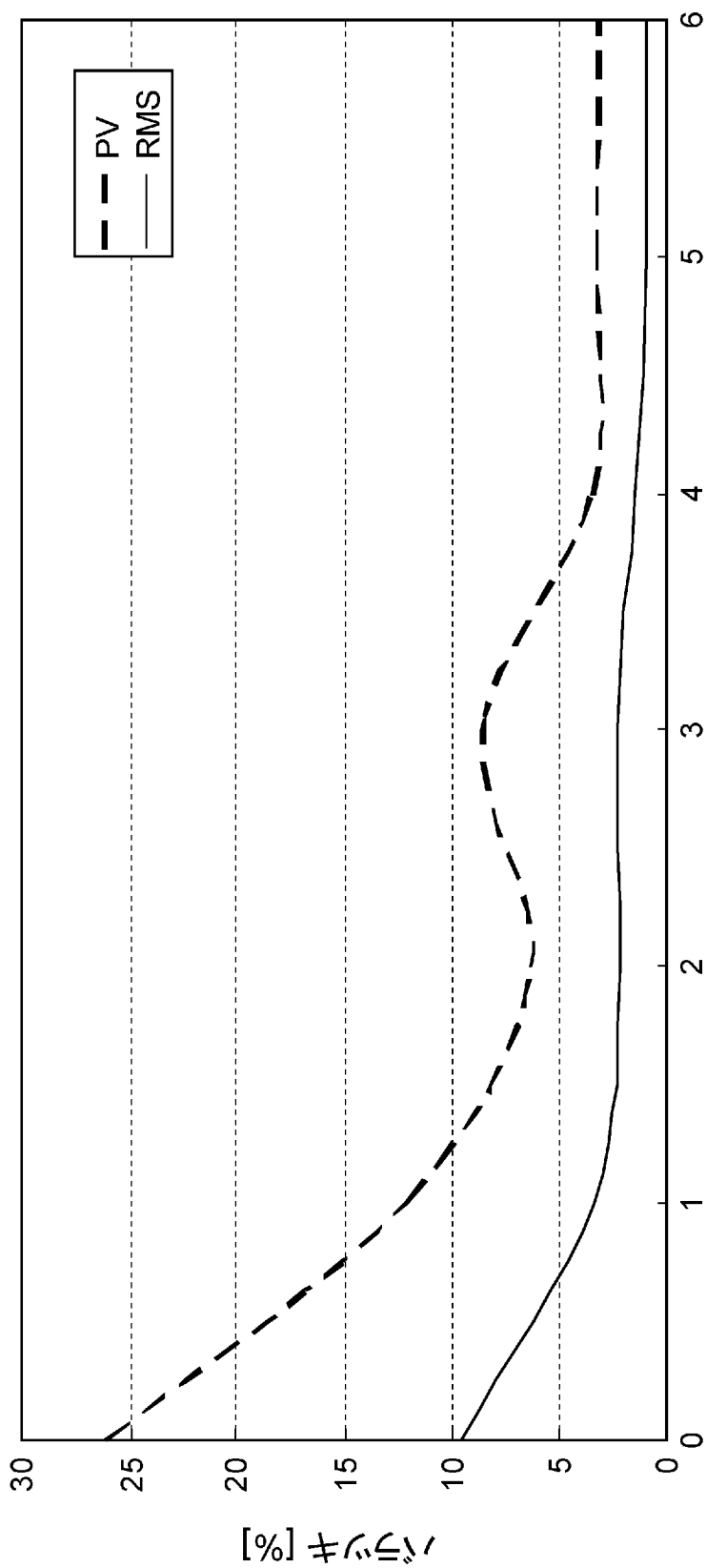
(a)



(b)



[図9]



フィードバック補正の実施回数

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/055491

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N21/64(2006.01)i, G02B21/06(2006.01)i, G03H1/08(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)
G01N21/17-21/74, G02B21/06-21/22, G03H1/04-1/20

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/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-128572 A (Olympus Corp.), 30 June 2011 (30.06.2011), paragraphs [0022] to [0047]; fig. 1 to 2 & US 2011/0267663 A1	1-8
A	WO 2004/017069 A1 (Hayashi Creative Lab. Co., Ltd.), 26 February 2004 (26.02.2004), pages 8 to 17; fig. 1 to 2 (Family: none)	1-8
A	JP 2009-300589 A (Nikon Corp.), 24 December 2009 (24.12.2009), paragraphs [0009] to [0049]; fig. 1 to 4 (Family: none)	1-8

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 28 May, 2014 (28.05.14)	Date of mailing of the international search report 10 June, 2014 (10.06.14)
--	--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/055491

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-186283 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 14 July 1998 (14.07.1998), paragraphs [0046] to [0049] & US 6021223 A & EP 840159 A2 & EP 1498766 A1 & DE 69732209 D & DE 69740084 D	1-8
A	JP 2005-292662 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 20 October 2005 (20.10.2005), paragraphs [0010] to [0013] (Family: none)	1-8
A	Nikolenko V et al., SLM microscopy: scanless two-photon imaging and photostimulation with spatial light modulators, <i>Frontiers in Neural Circuits</i> , 2008.12.19, Vol.2, No.5, pp.1-14	1-8
A	Shao Y et al., Ultrafast, large-field multiphoton microscopy based on anacousto-optic deflector and a spatial light modulator, <i>Optics Letters</i> , Vol.37, No.13, 2012.07.01, pp.2532-2534	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, G02B21/06(2006.01)i, G03H1/08(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N21/17-21/74, G02B21/06-21/22, G03H1/04-1/20		
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） J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)		
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 2011-128572 A（オリンパス株式会社）2011.06.30, 【0022】-【0047】、図1-図2 & US 2011/0267663 A1	1-8
A	WO 2004/017069 A1（株式会社林創研）2004.02.26, 8-17ページ、図1-図2（ファミリーなし）	1-8
A	JP 2009-300589 A（株式会社ニコン）2009.12.24, 【0009】-【0049】、図1-図4（ファミリーなし）	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 28.05.2014	国際調査報告の発送日 10.06.2014	
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） 波多江 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3250	2W 9508

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	JP 10-186283 A (浜松ホトニクス株式会社) 1998.07.14, 【0046】 - 【0049】 & US 6021223 A & EP 840159 A2 & EP 1498766 A1 & DE 69732209 D & DE 69740084 D	1-8
A	JP 2005-292662 A (浜松ホトニクス株式会社) 2005.10.20, 【0010】 - 【0013】 (ファミリーなし)	1-8
A	Nikolenko V et al., SLM microscopy: scanless two-photon imaging and photostimulation with spatial light modulators, Frontiers in Neural Circuits, 2008.12.19, Vol.2, No.5, pp.1-14	1-8
A	Shao Y et al., Ultrafast, large-field multiphoton microscopy based on anacousto-optic deflector and a spatial light modulator, Optics Letters, Vol.37, No.13, 2012.07.01, pp.2532-2534	1-8