

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5616588号
(P5616588)

(45) 発行日 平成26年10月29日(2014.10.29)

(24) 登録日 平成26年9月19日(2014.9.19)

(51) Int.Cl.

F 1

| | | |
|------------|-----------|------------|
| GO2B 21/00 | (2006.01) | GO2B 21/00 |
| GO1N 21/64 | (2006.01) | GO1N 21/64 |
| GO2B 21/16 | (2006.01) | GO2B 21/16 |

E

請求項の数 4 (全 11 頁)

| | |
|-----------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2009-99985 (P2009-99985) |
| (22) 出願日 | 平成21年4月16日 (2009.4.16) |
| (65) 公開番号 | 特開2010-250102 (P2010-250102A) |
| (43) 公開日 | 平成22年11月4日 (2010.11.4) |
| 審査請求日 | 平成24年4月6日 (2012.4.6) |

| | |
|-----------|---|
| (73) 特許権者 | 000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 |
| (74) 代理人 | 100118913 弁理士 上田 邦生 |
| (74) 代理人 | 100112737 弁理士 藤田 考晴 |
| (72) 発明者 | 桑原 洋平 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ リンパス株式会社内 |
| (72) 発明者 | 黒谷 昭典 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オ リンパス株式会社内 |

審査官 森内 正明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標本において発生した蛍光を集光する対物レンズと、
該対物レンズにより集光された蛍光をスペクトル成分に分光する分光素子と、
該分光素子により分光されたスペクトル成分をそれぞれ検出する複数のチャネルを有する光検出器と、

観察しようとする蛍光色素の選択を受け付ける入力部と、
前記複数のチャネルのうち、前記選択された蛍光色素に対応した合算チャネルを決定する色素選択処理部と、

前記光検出器の複数のチャネルのうち前記合算チャネルにより検出されたスペクトル成分を合算して蛍光強度を算出する蛍光強度算出部と、

前記蛍光強度算出部により算出された蛍光強度に基づいて画像を生成する画像生成部と、
該画像生成部により生成された画像を表示する表示部と、

前記光検出器の各チャネルにより検出されたスペクトル成分の輝度値が所定の閾値を超えたか否かを前記蛍光強度算出部における合算の対象となるチャネルのそれについて判定する判定部と、

該判定部により前記合算の対象となるチャネルの少なくとも1つのチャネルの輝度値が所定の閾値を超えたと判定された場合に、その判定結果を報知する報知手段とを備える顕微鏡。

10

20

【請求項 2】

前記光検出器の感度を調整する感度調整手段を備える請求項 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 3】

前記蛍光を発生させるレーザ光を標本上で走査するレーザ走査手段を備え、

前記画像生成部は前記レーザ光の走査に基づいてスキャン画像を生成し、

前記判定部は、前記スキャン画像の画素毎に前記判定を行い、

前記報知手段が、前記表示部に表示されたスキャン画像において、前記合算の対象となるチャネルの少なくとも 1 つのチャネルの輝度値が所定の閾値を超えたと判定された画素を視認可能に表示する請求項 1 または請求項 2 に記載の顕微鏡。

【請求項 4】

10

前記蛍光強度算出部の合算対象とするチャネルを選択可能である請求項 3 に記載の顕微鏡。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、顕微鏡に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

従来、試料から発せられた蛍光をスペクトル成分へ波長別に分割し、多チャネル光検出器で検出を行う顕微鏡が知られている（例えば、特許文献 1 参照）。

20

この顕微鏡では、検出器の数量が多いほど波長分解能が高くなり、例えば 32ch の光検出器を用いた場合、可視領域をカバーするために、1chあたり 10nm を受け持つことになる。

【0003】

一方、色素の放射帯域は、数 100nm の波長領域に渡っているため、使用色素の蛍光帯域に相応して各チャネルの合算が行われ、GUI (Graphical User Interface) 上において合算された画像が表示される。このような顕微鏡によれば、ダイクロイックフィルタなどを用いて分光検出する場合に比べて、観測する波長範囲の切り替えを高速に行うことができる。

【先行技術文献】

30

【特許文献】**【0004】****【特許文献 1】特開 2006 - 119152 号公報****【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

ところで、合算しているチャネルのうち、あるチャネルの出力が飽和していても、合算した結果は飽和していない場合がある。この場合、特許文献 1 に開示されている顕微鏡では、合算した結果のみを表示しているため、ユーザは、チャネルの出力が飽和したことを見ることができない。そのため、光検出器の感度を上げすぎてしまい、結果として、不正確な輝度データの画像が表示されてしまうという問題がある。

40

【0006】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、多チャネル光検出器により検出した輝度データを合算して表示する顕微鏡において、標本から発せられた蛍光を正確な強度で観察することのできる顕微鏡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】**

上記目的を達成するために、本発明は以下の手段を採用する。

本発明は、標本において発生した蛍光を集光する対物レンズと、該対物レンズにより集光された蛍光をスペクトル成分に分光する分光素子と、該分光素子により分光されたスペ

50

クトル成分をそれぞれ検出する複数のチャネルを有する光検出器と、観察しようとする蛍光色素の選択を受け付ける入力部と、前記複数のチャネルのうち、前記選択された蛍光色素に対応した合算チャネルを決定する色素選択処理部と、前記光検出器の複数のチャネルのうち前記合算チャネルにより検出されたスペクトル成分を合算して蛍光強度を算出する蛍光強度算出部と、前記蛍光強度算出部により算出された蛍光強度に基づいて画像を生成する画像生成部と、該画像生成部により生成された画像を表示する表示部と、前記光検出器の各チャネルにより検出されたスペクトル成分の輝度値が所定の閾値を超えたか否かを前記蛍光強度算出部における合算の対象となるチャネルのそれぞれについて判定する判定部と、該判定部により前記合算の対象となるチャネルの少なくとも1つのチャネルの輝度値が所定の閾値を超えたと判定された場合に、その判定結果を報知する報知手段とを備える顕微鏡を提供する。

【0008】

本発明によれば、標本において発生して対物レンズにより集光された蛍光が、分光素子によりスペクトル成分に分光される。分光されたスペクトル成分は、複数のチャネルを有する光検出器によりそれぞれ検出され、蛍光強度算出部により合算されて、その蛍光強度が算出される。この場合において、判定部により、光検出器の各チャネルにより検出されたスペクトル成分の輝度値が所定の閾値を超えたか否かが判定され、少なくとも1つのチャネルの輝度値が所定の閾値を超えたと判定された場合に、その判定結果が報知手段により報知される。

【0009】

これにより、ユーザは、少なくとも1つのチャネルの輝度値が飽和したことを知ることができる。したがって、光検出器の感度を調整することによって、全てのチャネルにおけるスペクトル成分を飽和させずに正確に検出することができ、標本から発せられた蛍光の正確な強度による観察を行うことができる。

【0010】

上記発明において、前記光検出器の感度を調整する感度調整手段を備えることとしてもよい。

このようにすることで、全てのチャネルにおけるスペクトル成分が飽和しないように、感度調整手段により光検出器の感度を調整することができ、標本から発せられた蛍光の正確な強度による観察を行うことができる。

【0011】

上記発明において、前記蛍光を発生させるレーザ光を標本上で走査するレーザ走査手段を備え、前記画像生成部は前記レーザ光の走査に基づいてスキャン画像を生成し、前記判定部は、前記スキャン画像の画素毎に前記判定を行い、前記報知手段が、前記表示部に表示されたスキャン画像において、前記合算の対象となるチャネルの少なくとも1つのチャネルの輝度値が所定の閾値を超えたと判定された画素を視認可能に表示することとしてもよい。

【0012】

このようにすることで、蛍光強度算出部により算出された蛍光強度に基づいて、画像生成部により生成された画像が、表示部に表示される。この際に、報知手段により、表示部に表示された画面において、輝度値が所定の閾値を超えた領域が視認可能に表示される。これにより、画面上においてどの領域の輝度値が所定の閾値を超えているかを知ることができ、ユーザが注目する領域について、輝度値が飽和しているか否かを知ることができる。

【0013】

上記発明において、前記蛍光強度算出部により算出された蛍光強度に基づいて画像を生成する画像生成部と、該画像生成部により生成された画像を表示する表示部とを備え、前記報知手段が、前記表示部に表示された画面において、前記光検出器により検出されたスペクトル成分の輝度値が所定の閾値を超えた領域の周辺領域を視認可能に表示することとしてもよい。

10

20

30

40

50

【0014】

報知手段により、輝度値が所定の閾値を超えた領域の周辺領域を視認可能に表示することで、前記領域が画面上において微小な場合にも、該領域を目立つようにでき、その視認性を向上することができる。

【0015】

上記発明において、前記蛍光強度算出部の合算対象とするチャネルを選択可能であることとしてもよい。

このようにすることで、蛍光強度算出部により合算するスペクトル範囲を選択することができる。

【発明の効果】

10

【0016】

本発明によれば、多チャネル光検出器により検出した輝度データを合算して表示する顕微鏡において、標本から発せられた蛍光を正確な強度で観察することのできるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】**【0017】**

【図1】本発明の一実施形態に係る顕微鏡の概略構成図である。

【図2】図1のCPUの機能プロック図である。

【図3】図1の顕微鏡により実行される処理を示すフローチャートである。

【図4】図1の顕微鏡の効果を説明する図である。

20

【図5】図1の変形例に係る顕微鏡の効果を説明する図である。

【発明を実施するための形態】**【0018】**

本発明の一実施形態に係る顕微鏡について、図面を参照して説明する。

図1は、本実施形態の顕微鏡1の構成図である。図1に示すように、本実施形態の顕微鏡1は、レーザ光を標本Aに照射して標本Aにおいて発生した蛍光を検出するレーザ走査型顕微鏡であり、顕微鏡本体100と、レーザ光を射出する光源200と、パーソナルコンピュータ(以降では「PC」と表記する。)300と、コントローラ400とを主な構成要素として備えている。

【0019】

30

光源200は、コントローラ400により制御され、レーザ光を射出するようになっている。このレーザ光は、標本A内の蛍光指示薬を励起させ、蛍光を発生させるようになっている。

【0020】

顕微鏡本体100は、光源200からのレーザ光を標本Aに照射する照射光学系10と、照射系10によりレーザ光を照射することで標本Aにおいて発生した蛍光を検出する検出光学系20とを備えている。

【0021】

照射光学系10は、ダイクロイックミラー111、ミラー112、走査光学ユニット113、対物レンズ114、およびステージ115から構成されている。

40

検出光学系20は、共焦点ピンホール116、ミラー117、分光素子118、多チャネル光検出器(光検出器)119、增幅器120、A/D変換器121、およびCPU(蛍光強度算出部、判定部)122から構成されている。

【0022】

ダイクロイックミラー111は、光源200からのレーザ光を反射する一方、標本Aにおいて発生して対物レンズ114により集光された蛍光を透過するようになっている。このような構成を有することで、ダイクロイックミラー111は、レーザ光の光路と標本Aからの蛍光の光路とを分岐するようになっている。

【0023】

走査光学ユニット113は、例えばアルミコートされた一対のガルバノミラー113a

50

, 113bを有しており、これら一対のガルバノミラー113a, 113bの角度を変化させ、ラスタスキャン方式で駆動されるようになっている。これにより、光源200からのレーザ光を標本A上において二次元的に走査させるようになっている。

【0024】

対物レンズ114は、走査光学ユニット113により走査されたレーザ光を標本A上に照射する一方、標本Aから発生した蛍光を集光するようになっている。

【0025】

共焦点ピンホール116は、標本A上におけるレーザ光の焦点位置から発生した蛍光のみを通過させるようになっている。すなわち、対物レンズ114により集光されてダイクロイックミラー111を透過した蛍光は、共焦点ピンホール116を通過することによりレーザ光の焦点位置（測定点）から光軸方向にずれた位置からの光がカットされる。これにより、光軸方向に焦点位置と同一な面からの蛍光だけがミラー117に入射する。10

【0026】

分光素子118は、例えばプリズムや回折格子であり、標本Aにおいて発生し、ミラー117により反射された蛍光を波長毎のスペクトル成分に分光し、分光したスペクトル成分を多チャネル光検出器119に入射させるようになっている。

【0027】

多チャネル光検出器119は、分光素子118により分光されたスペクトル成分をそれぞれ検出する複数のチャネルを有しており、検出したスペクトル成分の輝度を電気信号へ変換する素子である。この場合は、波長毎に分割されたスペクトル成分が入射されるため、各チャネルにはそれぞれ異なる波長の光が入射される。この多チャネル光検出器119の具体例として、例えば浜松ホトニクス（株）製のH7260（32チャネルフォトマルチプライヤ）を用いることができる。なお、多チャネル検出器119は、外部から感度調整を行うことができるが、感度は全チャネル一括でしか調整できないものである。20

【0028】

多チャネル光検出器119の後段には、電気信号を増幅する増幅器（AMP）120がチャネル毎に設けられている。増幅器120は、多チャネル光検出器119により変換された微弱信号を増幅することができる。また、増幅器120の後段には、A/D変換器121がチャネル毎に設けられている。A/D変換器121は、増幅器120により増幅された電気信号をデジタル信号に変換するものである。30

【0029】

A/D変換器121の後段には、CPU122が接続されている。CPU122は、多チャネル光検出器119の複数のチャネルにより検出され、デジタル信号化されて送られてきた輝度信号を合算して蛍光強度を算出するようになっている。また、CPU122は、送られてきた輝度信号と閾値との比較判定を行う機能を有しており、多チャネル光検出器119の各チャネルにより検出されたスペクトル成分の輝度値が予め設定された所定の閾値を超えたか否かを判定するようになっている。

【0030】

CPU122には、PC300の内部にあるPC本体（画像生成部）301が接続されている。このPC本体301には、ディスプレイ（表示部）302および入力装置（感度調整手段）303が接続されている。40

【0031】

入力装置303は、ユーザにより感度調整、色素選択、閾値設定についての入力が行われるようになっており、その入力結果をPC本体301に送信するようになっている。

入力装置303によりユーザが感度調整を行うと、PC本体301、CPU122を介して多チャネル光検出器119の感度が調整されるようになっている。

【0032】

また、入力装置303によりユーザが色素選択についての入力を行うと、図2に示すように、その設定がPC本体301を介してCPU122に送られ、CPU122内では選択した色素に対応する合算チャネルを決定し、決定したチャネルにより検出されたスペク50

トル成分の合算処理が行われるようになっている（色素選択処理）。

【0033】

また、入力装置303によりユーザが閾値設定についての入力を行うと、図2に示すように、その設定がPC本体301を介してCPU122に送られ、CPU122内では設定した閾値と合算対象であるチャネルそれぞれとの比較が行われるようになっている（飽和検出処理）。

【0034】

PC本体301は、CPU122により算出された蛍光強度に基づいてスキャン画像を生成するようになっている。

ディスプレイ302は、PC本体301に接続されており、PC本体301により生成されたスキャン画像の表示が行われるようになっている。 10

【0035】

また、PC本体301は、ディスプレイ302に表示された画面において、多チャネル光検出器119により検出されたスペクトル成分の輝度値が所定の閾値を超えた領域（飽和部分）を視認可能に表示するようになっている。具体的には、例えば図4に示すように、所定の閾値を超えた領域を、周辺領域に対する補色で着色して表示するようになっている。

【0036】

コントローラ400は、走査ミラー113、CPU122、および光源200を制御して、これら装置間の同期をとるようになっている。 20

【0037】

上記構成を有する顕微鏡1の作用について以下に説明する。

光源200から出射されたレーザ光は、顕微鏡装置本体100内にあるダイクロイックミラー111およびミラー112によりそれぞれ反射され、走査光学ユニット113に入射し、走査光学ユニット113の動作によって偏向され、標本A上において二次元的に走査される。 30

【0038】

走査されたレーザ光は、対物レンズ114に入射し、ステージ115上に置かれた標本A上に集光されて照射される。標本Aの焦点面においては、レーザ光により標本A内の蛍光物質が励起されて蛍光が発生する。

【0039】

標本Aから発せられた蛍光は、対物レンズ114により集光され、走査光学ユニット113及びミラー112を通過して、ダイクロイックミラー111に入射する。ダイクロイックミラー111に入射した蛍光は、ダイクロイックミラー111を透過し、共焦点ピンホール116へ導光される。 40

【0040】

共焦点ピンホール116では、標本Aの焦点面において発生した蛍光のみを通過させ、レーザ光の焦点位置（測定点）に対して光軸方向にずれた位置からの光がカットされる。これにより、光軸方向に測定点と同一な面からの蛍光だけがミラー117に入射される。

【0041】

ミラー117で反射された蛍光は、分光素子118に入射し、波長毎のスペクトル成分に分解される。分解されたスペクトル成分は、多チャネル光検出器119の各チャネルに入射し、各チャネルによりそれぞれの波長成分についての輝度に応じた電気信号に変換される。

【0042】

これらの電気信号は、増幅器120によりそれぞれ増幅され、A/D変換器121によりアナログ信号からデジタル信号に変換される。デジタル信号となった電気信号はCPU122に送られる。ここで、階調の不足によりA/D変換器の出力が飽和する場合がある。この場合、以下のように飽和判定とその表示が行われる。

【0043】

50

この飽和判定について、図3に示すフローチャートを用いて以下に説明する。

図3において、ステップS1では、ユーザが入力装置303を操作することによって、色素の選択と閾値の設定が行われる。ここで、ユーザは、観察対象に応じて使用している色素を選択することができる。また、設定する閾値は飽和値と同じ値でもよいし、ほぼ飽和する値（例えば飽和値の90%）でもよい。

【0044】

上記の設定は、PC本体301を介してCPU122へ送られる。ステップS2以降は、CPU122内の処理である。

ステップS2では、CPU122は色素情報を受け取り、データテーブルを呼び出して合算すべきチャネルが決定される。ステップS3では、CPU122により、合算の対象となるチャネル一つ一つに対して、閾値との比較が行われる。10

【0045】

ステップS4では、合算の対象となるチャネルのうち、1つでも閾値を超えたチャネルがあったか否かが判定される。判定の結果、合算の対象となるチャネルのうち、いずれのチャネルも飽和していない場合には、後述するステップS5およびステップS6の処理が実行され、1つでも閾値を超えるチャネルがあった場合には、後述するステップS7およびステップS8の処理が実行される。

【0046】

いずれのチャネルも飽和していない場合には、ステップS5において、合算の対象となるチャネルについての合算が行われる。そして、ステップS6において、二次元画像の1画素のデータとして合算した値がPC本体301へ出力される。20

【0047】

一方、一つでも閾値を超えるチャネルがあった場合には、ステップS7において、飽和を示すためのデータが生成される。そして、ステップS8において、二次元画像の1画素データとしてPC本体301へ出力される。

【0048】

上記のステップS3～S6またはステップS3～S8までの処理が、二次元画像を得るために、画素数分繰り返される（ステップS9）。これにより、PC本体301ではCPU122から受け取ったデータに基づいてスキャン画像が生成され、ディスプレイ302にそのスキャン画像が表示される。この際、いずれのチャネルも閾値を超えていなければそのまま表示し、1つでも閾値を超えるチャネルがあった場合には、図4に示すように、飽和している画素については色を変えて表示される。30

【0049】

以上のように、本実施形態に係る顕微鏡1によれば、標本Aにおいて発生した蛍光が、分光素子118によりスペクトル成分に分光され、多チャネル光検出器119によりスペクトル成分毎に検出され、CPU122により合算されてその蛍光強度が算出される。この場合において、CPU122により、多チャネル光検出器119の各チャネルにより検出されたスペクトル成分の輝度値が所定の閾値を超えたか否かが判定され、少なくとも1つのチャネルの輝度値が所定の閾値を超えたと判定された場合に、その判定結果がユーザに報知される。40

【0050】

これにより、ユーザは、少なくとも1つのチャネルの輝度値が飽和したことを知ることができる。したがって、入力装置303により多チャネル光検出器119の感度を調整することによって、全てのチャネルにおけるスペクトル成分を飽和させずに正確に検出することができ、標本Aから発せられた蛍光の正確な強度による観察を行うことができる。

【0051】

また、本実施形態に係る顕微鏡1によれば、CPU122により算出された蛍光強度に基づいて、PC本体301により生成されたスキャン画像が、ディスプレイ302に表示される。この際に、図4に示すように、ディスプレイ302に表示されたスキャン画像において、輝度値が所定の閾値を超えた領域（飽和部分）が視認可能に表示される。これに50

より、ユーザは、スキャン画像上において標本 A のどの領域で輝度値が飽和しているか分かるため、自分が注目している領域に関して飽和しているか知ることができる。なお、この表示を行うか否かは、G U I 等によりユーザが選択することが可能としてもよい。

【 0 0 5 2 】

つまり、もし注目していない領域において飽和していれば、見たいところに感度を合わせて観察を行い、後に注目領域だけ切り出せばよい。例えば、図 4 において、領域 R O I 2 の中では飽和している部分があるが、領域 R O I 1 に注目しているのであれば、そのまま領域 R O I 1 に感度を合わせて観察を続行すればよい。

【 0 0 5 3 】

なお、本実施形態に係る顕微鏡 1 の変形例として、図 5 に示すように、ディスプレイ 3 0 2 に表示されたスキャン画面において、多チャネル光検出器 1 1 9 により検出されたスペクトル成分の輝度値が所定の閾値を超えた領域（飽和部分）の周辺領域を視認可能に表示することとしてもよい。10

このようにすることで、飽和部分がスキャン画像において微小な場合にも、該飽和部分を目立つようにでき、その視認性を向上することができる。

【 0 0 5 4 】

以上、本発明の実施形態について図面を参照して詳述してきたが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲の設計変更等も含まれる。

例えば、本実施形態において、スペクトル成分の輝度値が所定の閾値を超えたことをディスプレイ 3 0 2 に表示することでユーザに報知することとして説明したが、これに代えて、例えばアラーム等によってユーザに報知することとしてもよい。20

【 0 0 5 5 】

また、ディスプレイ 3 0 2 において飽和部分を表示する方法として、周辺領域に対する補色で飽和部分を着色することとして説明したが、飽和部分を視認可能に表示することができればよく、例えば、飽和部分を点滅あるいは拡大することとしてもよい。

【 0 0 5 6 】

また、図 3 で説明した処理方法は一例であり、異なる構成で処理を行ってもよい。例えば、ステップ S 7 においては、ステップ S 5 と同様に合算処理を行うこととしてもよい。その場合、次のステップ S 8 において、飽和を示すためのデータを生成し、合算した結果と置き換える処理が行われる。30

【 符号の説明 】

【 0 0 5 7 】

A 標本

1 顕微鏡

1 0 照射光学系

2 0 検出光学系

1 0 0 顕微鏡本体

1 1 1 ダイクロイックミラー

1 1 2 ミラー

1 1 3 走査光学ユニット

1 1 4 対物レンズ

1 1 5 ステージ

1 1 6 共焦点ピンホール

1 1 7 ミラー

1 1 8 分光素子

1 1 9 多チャネル光検出器

1 2 0 増幅器

1 2 1 A / D 変換器

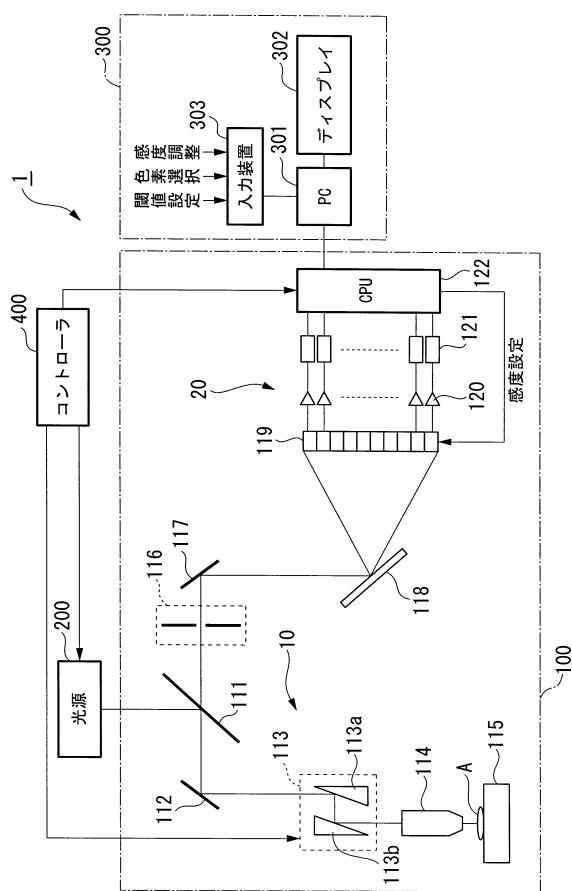
1 2 2 C P U

40

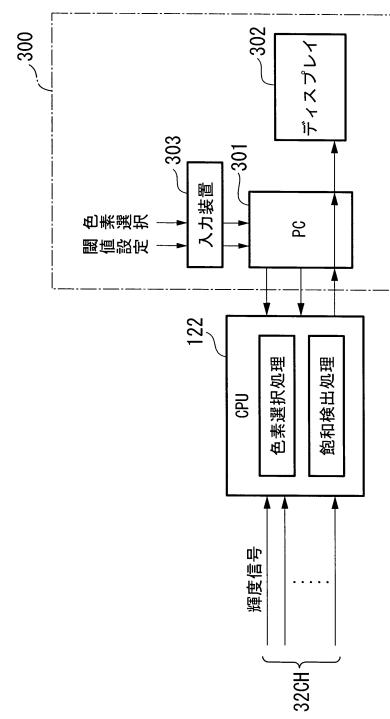
50

200 光源
 300 パーソナルコンピュータ(PC)
 400 コントローラ

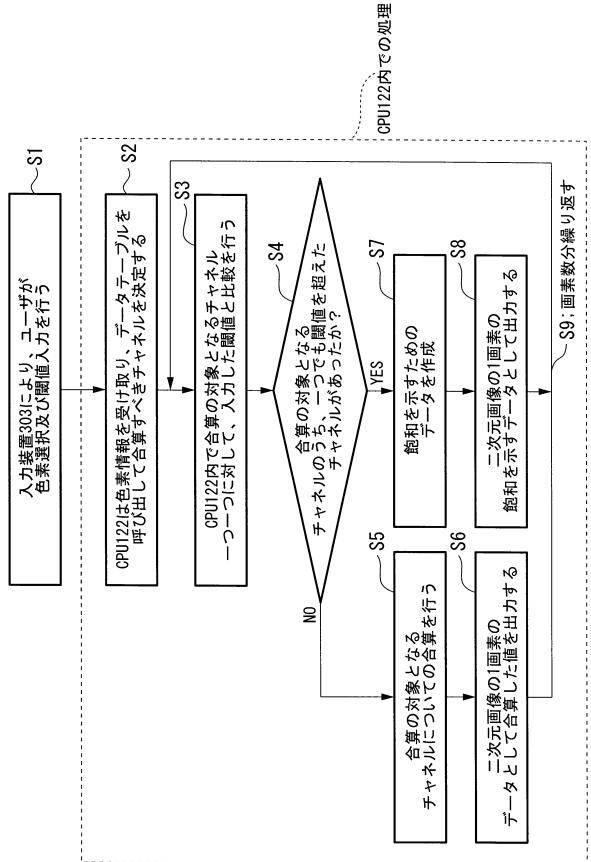
【図1】



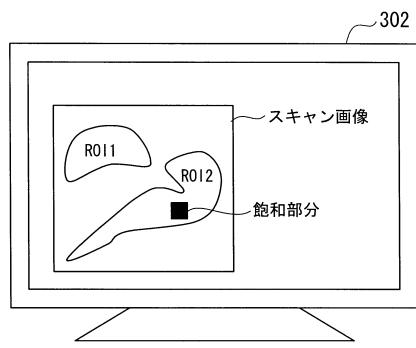
【図2】



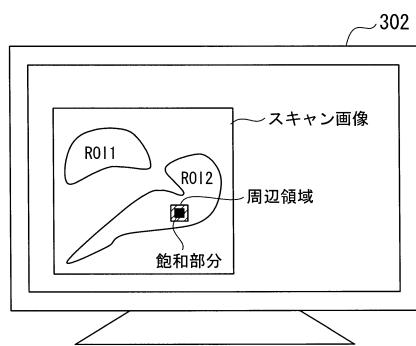
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開2003-057555(JP,A)
特開2006-058237(JP,A)
特開2004-145153(JP,A)
特開2008-281708(JP,A)
特開平10-300896(JP,A)
特開2003-057551(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62 - 21/74
G02B 19/00
G02B 21/00 - 21/36