



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118511103 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202280086254.2

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2022.02.15

G02B 21/36 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/006016 2022.02.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/157098 JA 2023.08.24

(71) 申请人 株式会社尼康

地址 日本东京都

(72) 发明人 照井勇辉 藤挂阳辅

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈伟 闫剑平

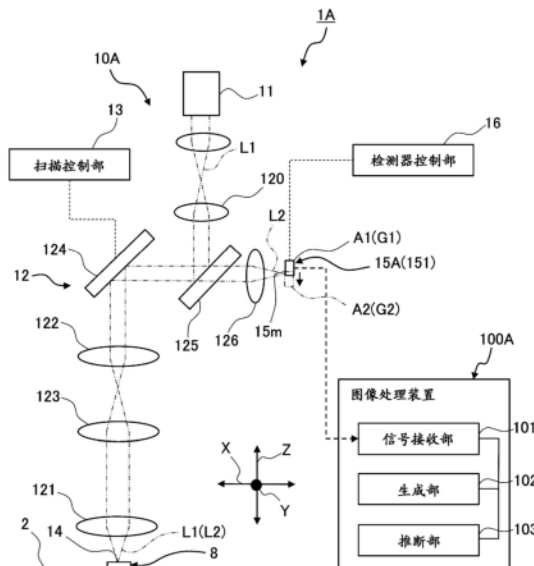
权利要求书5页 说明书26页 附图29页

(54) 发明名称

显微镜、图像处理装置、图像处理方法以及
图像处理程序

(57) 摘要

更简单地提高显微镜的光学系统的光轴方向上的分辨率/切片能力。基于第1状态的光学系统的第1三维点扩散强度分布与基于第2状态的光学系统的第2三维点扩散强度分布不同,包括:生成部,其生成包含经由第1状态的光学系统获取到的第1焦平面的第1图像、以及经由第2状态的光学系统获取到的第2焦平面的第2图像在内的图像组;以及推断部,其基于图像组以及第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布,推断包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造并输出推断图像。推断部i) 输出对推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像来作为推断图像。ii) 在相对于第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布在光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为推断图像。



1. 一种显微镜,其具备:

光学系统,其对样本照射照明光,并将来自所述样本的检测光导向检测器;以及

图像处理装置,其基于来自所述检测器的信号生成所述样本的图像,对所述图像进行处理,

基于第1状态的所述光学系统的第1三维点扩散强度分布不同于基于与所述第1状态不同的第2状态的所述光学系统的第2三维点扩散强度分布,

所述图像处理装置包括:

生成部,其生成基于不改变所述样本与所述照明光的照射位置在所述光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,所述图像组包含基于经由所述第1状态的所述光学系统获取到的所述信号的第1焦平面的第1图像、以及基于经由所述第2状态的所述光学系统获取到的所述信号的第2焦平面的第2图像,所述第2焦平面与所述第1焦平面在所述光轴方向上大致一致;以及

推断部,其基于所述图像组以及所述第1三维点扩散强度分布和所述第2三维点扩散强度分布,推断沿着所述光轴方向的、所述样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造,并输出基于推断出的构造的推断图像,

所述推断部包括如下的至少一项:

i) 输出对所述推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像,来作为所述推断图像;

ii) 在相对于所述第1三维点扩散强度分布和所述第2三维点扩散强度分布在所述光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断所述构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为所述推断图像。

2. 根据权利要求1所述的显微镜,其中,

所述第1图像是使所述样本的第1样本面与所述第1焦平面一致来获取的,

所述第2图像是使所述样本的第2样本面与所述第2焦平面一致来获取的。

3. 根据权利要求1或者2所述的显微镜,其中,

所述第1三维点扩散强度分布中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布之间的第1相对关系相对于所述第2三维点扩散强度分布中的、所述第1面的二维点扩散强度分布与所述第2面的二维点扩散强度分布的第2相对关系不同,所述第2面是与所述第1面在所述光轴方向上不同的面,

所述第1面被决定为与所述第1焦平面以及所述第2焦平面的至少一方大致一致。

4. 根据权利要求3所述的显微镜,其中,

所述第1推断样本面与所述第1面一致。

5. 根据权利要求3或者4所述的显微镜,其中,

所述推断图像具有与所述第2面一致的第2推断样本面的图像。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的显微镜,其中,

所述光学系统具有物镜,

所述第1焦平面以及所述第2焦平面为所述物镜的焦平面。

7. 根据权利要求1~5中任一项所述的显微镜,其中,

所述第1焦平面以及所述第2焦平面由如下的某一个面来规定:

在所述光轴方向上、对应的各个状态的所述光学系统的三维点扩散强度分布的最大值所在的面、

在所述光轴方向上、与所述光轴方向交叉的面中的、对应的各个状态的所述光学系统的三维点扩散强度分布的累计值的最大值所在的面、

在所述光轴方向上、在进行了求出对应的各个状态的所述光学系统的三维点扩散强度分布的近似曲线的函数的高斯拟合的情况下的所述高斯分布的中心位置所在的面。

8. 根据权利要求3~5中任一项所述的显微镜, 其中,

所述第1相对关系以及所述第2相对关系为各个所述二维点扩散强度分布的强度的关系、各个所述二维点扩散强度分布的位置的关系、各个所述二维点扩散强度分布的形状的关系的某一个。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的显微镜, 其中,

所述检测器为点检测器,

利用在所述第1状态下配置在第1位置的所述点检测器获取所述第1图像,

利用在所述第2状态下配置在与所述第1位置不同的第2位置的所述点检测器获取所述第2图像。

10. 根据权利要求9所述的显微镜, 其中,

所述点检测器在所述第1位置与所述第2位置之间移动。

11. 根据权利要求1~8中任一项所述的显微镜, 其中,

所述检测器将多个检测部二维排列而形成,

利用在所述第1状态下配置在第1位置的所述检测部获取所述第1图像,

利用在所述第2状态下配置在与所述第1位置不同的第2位置的所述检测部获取所述第2图像。

12. 根据权利要求1~8中任一项所述的显微镜, 其中,

通过使用所述光学系统所包含的光学元件, 切换为所述第1状态的所述光学系统或所述第2状态的所述光学系统。

13. 根据权利要求12所述的显微镜, 其中,

所述光学元件能够相对于所述照明光或者所述检测光进退,

利用所述光学元件的进入使所述照明光或者所述检测光向与所述光轴方向交叉的方向位移, 切换为所述第1状态的所述光学系统或所述第2状态的所述光学系统。

14. 根据权利要求12所述的显微镜, 其中,

所述光学元件为供所述检测光通过的针孔, 该针孔的大小或者形状是能够变更的,

通过变更所述针孔的大小或者形状, 切换为所述第1状态的所述光学系统或所述第2状态的所述光学系统。

15. 根据权利要求12所述的显微镜, 其中,

所述光学元件为供所述照明光或者所述检测光通过的光圈, 该光圈的孔径或者位置是能够变更的,

通过变更所述光圈的孔径或者位置, 切换为所述第1状态的所述光学系统或所述第2状态的所述光学系统。

16. 根据权利要求1~15中任一项所述的显微镜, 其中,

所述生成部还生成基于使所述样本与所述照明光的照射位置在所述光轴方向上的相对位置关系变更而获取到的所述信号的图像组,该图像组包含第3图像以及第4图像,

所述第3图像是使所述样本的第3样本面与所述第1状态的所述光学系统中的所述第1焦平面一致来获取的,

所述第4图像是使所述样本的第4样本面与所述第2状态的所述光学系统中的所述第2焦平面一致来获取的,

所述第3样本面以及所述第4样本面分别与所述样本的第1样本面以及第2样本面在所述光轴方向上不同。

17.根据权利要求16所述的显微镜,其中,

所述推断图像包括与沿着所述光轴方向的、在所述第1推断样本面到与所述第3样本面大致一致的所述第3推断样本面之间存在的面对应的二维图像。

18.根据权利要求7所述的显微镜,其中,

所述推断图像至少包括分别对应于与所述第2面一致的所述第2推断样本面、以及与所述样本的第3样本面大致一致的所述第3推断样本面的二维图像。

19.根据权利要求1~18中任一项所述的显微镜,其中,

所述推断图像的所述光轴方向上的分辨率比所述第1图像以及所述第2图像的所述光轴方向上的分辨率高。

20.一种显微镜,其具备:

光学系统,其对样本照射照明光,并将来自所述样本的检测光导向检测器;以及

图像处理装置,其基于来自所述检测器的信号生成所述样本的图像,对所述图像进行处理,

基于第1状态的所述光学系统的第1三维点扩散振幅分布不同于基于与所述第1状态不同的第2状态的所述光学系统的第2三维点扩散振幅分布,

所述图像处理装置包括:

生成部,其生成基于不改变所述样本与所述照明光的照射位置在所述光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,所述图像组包含基于经由所述第1状态的所述光学系统获取到的所述信号的第1焦平面的第1图像、以及基于经由所述第2状态的所述光学系统获取到的所述信号的第2焦平面的第2图像,所述第2焦平面与所述第1焦平面在所述光轴方向上大致一致;以及

推断部,其基于所述图像组以及所述第1三维点扩散振幅分布和所述第2三维点扩散振幅分布,推断沿着所述光轴方向的、所述样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造,并输出基于推断出的构造的推断图像,

所述推断部包括如下的至少一项:

i) 输出对所述推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像,来作为所述推断图像;

ii) 在相对于所述第1三维点扩散振幅分布和所述第2三维点扩散振幅分布在所述光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断所述构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为所述推断图像。

21.一种图像处理装置,其基于在利用光学系统向样本照射了照明光时的来自所述样

本的检测光的检测器中的检测信号生成所述样本的图像,对所述图像进行处理,

在基于第1状态的所述光学系统的第1三维点扩散强度分布不同于基于与第1状态不同的第2状态的所述光学系统的第2三维点扩散强度分布的情况下,所述图像处理装置包括:

生成部,其生成基于不改变所述样本与所述照明光的照射位置在所述光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,所述图像组包含基于在所述第1状态的所述光学系统中获取到的所述信号的第1焦平面的第1图像、以及基于在所述第2状态的所述光学系统中获取到的所述信号的第2焦平面的第2图像;以及

推断部,其基于所述图像组以及所述第1三维点扩散强度分布和所述第2三维点扩散强度分布,推断沿着所述光轴方向的、所述样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造,并输出基于推断出的构造的推断图像,

所述推断部包括如下的至少一项:

i) 输出对所述推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像,来作为所述推断图像;

ii) 在相对于所述第1三维点扩散强度分布和所述第2三维点扩散强度分布在所述光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断所述构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为所述推断图像。

22. 一种图像处理方法,是基于在利用光学系统向样本照射了照明光时的来自所述样本的检测光的检测器中的检测信号生成所述样本的图像并对所述图像进行处理的方法,

在基于第1状态的所述光学系统的第1三维点扩散强度分布不同于基于与第1状态不同的第2状态的所述光学系统的第2三维点扩散强度分布的情况下,所述图像处理方法包括如下的步骤:

生成基于不改变所述样本与所述照明光的照射位置在所述光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,所述图像组包含基于在所述第1状态的所述光学系统中获取到的所述信号的第1焦平面的第1图像、以及基于在所述第2状态的所述光学系统中获取到的所述信号的第2焦平面的第2图像;以及

基于所述图像组以及所述第1三维点扩散强度分布和所述第2三维点扩散强度分布,推断沿着所述光轴方向的、所述样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造,并输出基于推断出的构造的推断图像,

输出所述推断图像的步骤包括如下的至少一个步骤:

i) 输出对所述推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像,来作为所述推断图像;

ii) 在相对于所述第1三维点扩散强度分布和所述第2三维点扩散强度分布在所述光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断所述构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为所述推断图像。

23. 一种图像处理程序,其为了基于在利用光学系统向样本照射了照明光时的来自所述样本的检测光的检测器中的检测信号生成所述样本的图像,对所述图像进行处理,使计算机在基于第1状态的所述光学系统的第1三维点扩散强度分布不同于基于与第1状态不同的第2状态的所述光学系统的第2三维点扩散强度分布的情况下,执行如下的步骤:

生成基于不改变所述样本与所述照明光的照射位置在所述光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,所述图像组包含基于在所述第1状态的所述光学系统中获取到的所述信号的第1焦平面的第1图像、以及基于在所述第2状态的所述光学系统中获取到的所述信号的第2焦平面的第2图像;以及

基于所述图像组以及所述第1三维点扩散强度分布和所述第2三维点扩散强度分布,推断沿着所述光轴方向的、所述样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造,并输出基于推断出的构造的推断图像,

输出所述推断图像的步骤包括如下的至少一个步骤:

i) 输出对所述推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像,来作为所述推断图像;

ii) 在相对于所述第1三维点扩散强度分布和所述第2三维点扩散强度分布在所述光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断所述构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为所述推断图像。

显微镜、图像处理装置、图像处理方法以及图像处理程序

技术领域

[0001] 本发明涉及显微镜、图像处理装置、图像处理方法、以及图像处理程序。

背景技术

[0002] 作为基于在利用光学系统向样本照射了照明光时的来自样本的检测光来生成样本的图像的技术,例如有在下述非专利文献1中记载的技术。非专利文献1记载的技术基于样本的二维图像、以及光学系统的三维点扩散强度分布,来推断样本的三维构造。在非专利文献1记载的技术中,为了推断光学系统的光轴方向(以下将该方向适当称为Z方向)上的大范围的三维构造,需要使用特殊的相位板。为此,期望更简单地提高显微镜的光学系统的光轴方向上的分辨率/切片能力。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 非专利文献1:C.Roider et al.,Deconvolution approach for 3Dscanning microscopy with helical phase engineering,Biomedical Optics Express,24,14,15456(2016)

发明内容

[0006] 根据本发明的第一方面,提供一种显微镜,其具备:光学系统,其对样本照射照明光,并将来自样本的检测光导向检测器;以及图像处理装置,其基于来自检测器的信号生成样本的图像,对图像进行处理,基于第1状态的光学系统的第1三维点扩散强度分布不同于第1状态与不同的基于第2状态的光学系统的第2三维点扩散强度分布,图像处理装置包括:生成部,其生成基于不改变样本与照明光的照射位置在光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,该图像组包含基于经由第1状态的光学系统获取到的信号的第1焦平面的第1图像、以及基于经由第2状态的光学系统获取到的信号的第2焦平面的第2图像,该第2焦平面与第1焦平面在光轴方向上大致一致,图像组是基于不改变样本与照明光的照射位置在光轴方向上的相对位置关系地获取到的信号的图像组;以及推断部,其基于图像组以及第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布,推断沿着光轴方向的、样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的推断构造,并输出基于推断出的构造的推断图像。

[0007] 推断部包括如下的至少一项:

[0008] i) 输出对推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像来作为推断图像;

[0009] ii) 在相对于第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布在光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为推断图像。

[0010] 根据本发明的第二方面,提供一种显微镜,其具备:光学系统,其对样本照射照明

光,并将来自样本的检测光导向检测器;以及图像处理装置,其基于来自检测器的信号生成样本的图像,对图像进行处理,基于第1状态的光学系统的第1三维点扩散振幅分布不同于与第1状态不同的基于第2状态的光学系统的第2三维点扩散振幅分布,图像处理装置包括:生成部,其生成基于不改变样本与照明光的照射位置在光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,该图像组包含基于经由第1状态的光学系统获取到的信号的第1焦平面的第1图像、以及基于经由第2状态的光学系统获取到的信号的第2焦平面的第2图像,该第2焦平面与第1焦平面在光轴方向上大致一致;以及推断部,其基于图像组以及第1三维点扩散振幅分布和第2三维点扩散振幅分布,推断沿着光轴方向的、样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的推断构造,并输出基于推断出的构造的推断图像。

[0011] 推断部包括如下的至少一项:

[0012] i) 输出对推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像来作为推断图像;

[0013] ii) 在相对于第1三维点扩散振幅分布和所述第2三维点扩散振幅分布在所述光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断所述构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为所述推断图像。

[0014] 根据本发明的第三方面,提供一种图像处理装置,其基于在利用光学系统向样本照射了照明光时的来自样本的检测光的检测器中的检测信号生成样本的图像,对图像进行处理,图像处理装置在基于第1状态的所述光学系统的第1三维点扩散强度分布不同于与第1状态不同的基于第2状态的光学系统的第2三维点扩散强度分布的情况下,包括:生成部,其生成基于不改变样本与照明光的照射位置在光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,图像组包含基于在第1状态的光学系统中获取到的信号的第1焦平面的第1图像、以及基于在第2状态的光学系统中获取到的信号的第2焦平面的第2图像;推断部,其基于图像组以及第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布,推断沿着光轴方向的、样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造,并输出基于推断出的构造的推断图像。

[0015] 推断部包括如下的至少一项:

[0016] i) 输出对推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像来作为推断图像。

[0017] ii) 在相对于第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布在光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为推断图像。

[0018] 根据本发明的第四方面,提供图像处理方法,其基于在利用光学系统向样本照射了照明光时的来自样本的检测光的检测器中的检测信号生成样本的图像,对图像进行处理,图像处理方法在基于第1状态的光学系统的第1三维点扩散强度分布不同于与第1状态不同的基于第2状态的光学系统的第2三维点扩散强度分布的情况下,包括如下的步骤:生成基于不改变样本与照明光的照射位置在光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,图像组包含基于在第1状态的光学系统中获取到的信号的第1焦平面的第1图像、以及基于在第2状态的光学系统中获取到的信号的第2焦平面的第2图像;以及基于图像组以及所述第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布,推断沿着光轴

方向的、样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造,并输出基于推断出的构造的推断图像。

[0019] 输出推断图像的步骤包括如下的至少一个步骤:

[0020] i) 输出对推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像来作为推断图像。

[0021] ii) 在相对于第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布在光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为推断图像。

[0022] 根据本发明的第五方面,提供图像处理程序,其为了基于在利用光学系统向样本照射了照明光时的来自样本的检测光的检测器中的检测信号生成样本的图像,对图像进行处理,使计算机在基于第1状态的光学系统的第1三维点扩散强度分布不同于与第1状态不同的基于第2状态的光学系统的第2三维点扩散强度分布的情况下,执行如下的步骤:生成基于不改变样本与照明光的照射位置在光学系统的光轴方向上的相对位置关系而获取到的所述信号的图像组,图像组包含基于在第1状态的光学系统中获取到的信号的第1焦平面的第1图像、以及基于在第2状态的光学系统中获取到的信号的第2焦平面的第2图像;基于图像组以及所述第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布,推断沿着光轴方向的、样本中的包含第1推断样本面在内的多个面各自的构造,并输出基于推断出的构造的推断图像。

[0023] 输出推断图像的步骤包括如下的至少一个步骤:

[0024] i) 输出对所述推断出的多个面各自的构造进行加权处理并累计得到的图像,来作为所述推断图像;

[0025] ii) 在相对于第1三维点扩散强度分布和第2三维点扩散强度分布在光轴方向上进行了不同的加权处理之后,推断构造,输出以权重为1的状态累计得到的图像来作为所述推断图像。

附图说明

[0026] 图1是示出第1实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。

[0027] 图2是示出第1实施方式的第1状态的光学系统与第2状态的光学系统的三维点扩散强度分布在Z方向上的强度轮廓不同的例子的图。

[0028] 图3是示意性示出第1实施方式的、焦平面、样本面、第1面、第2面、以及推断样本面的关系的图。

[0029] 图4是示出第1实施方式的由生成部生成的多个图像的例子的图。

[0030] 图5是示出第1实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。

[0031] 图6是示出第1实施方式的图像处理方法的流程的流程图。

[0032] 图7是示出第1实施方式的基于由推断部推断出的构造的推断图像的一例的图。

[0033] 图8是示出第2实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。

[0034] 图9是示意性示出第2实施方式的、焦平面、样本面、第1面、第2面、以及推断样本面的关系的图。

- [0035] 图10是示出第3实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0036] 图11是示出第3实施方式的检测器的构成的图。
- [0037] 图12是示意性示出第3实施方式的、焦平面、样本面、第1面、第2面、以及推断样本面的关系的图。
- [0038] 图13是示出第4实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0039] 图14是示出第4实施方式的、第1状态的三维点扩散强度分布的XZ剖面的大概形状与第2状态的三维点扩散强度分布的XZ剖面的大概形状的图。
- [0040] 图15是示出第4实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。
- [0041] 图16是示出第5实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0042] 图17是示出第5实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。
- [0043] 图18是示出第6实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0044] 图19是示出第6实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。
- [0045] 图20是示出第7实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0046] 图21是示出第7实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。
- [0047] 图22是示出第8实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0048] 图23是示出第9实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0049] 图24是示出第9实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。
- [0050] 图25是示出第10实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0051] 图26是示出第10实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。
- [0052] 图27是示出第11实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0053] 图28是示出第11实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散振幅分布与第2面的二维点扩散振幅分布的例子的图。
- [0054] 图29是示出第12实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。
- [0055] 图30是示出第12实施方式的由生成部生成的多个图像的例子的图。
- [0056] 图31是示出第12实施方式的基于由推断部推断出的构造的推断图像的一例的图。

具体实施方式

[0057] 以下,参照附图说明实施方式。在附图中,为了说明实施方式,以放大或者突出显示一部分地表示等适当变更比例尺来表示。在附图中,有使用XYZ坐标系说明图中的方向的图。在该XYZ坐标系中,将沿着显微镜的光学系统的方向设为Z方向。将与该Z方向正交的平面设为XY平面。将该XY平面中的一个方向标记为X方向,将与X方向正交的方向标记为Y方向。

[0058] [第1实施方式]

[0059] 说明第1实施方式。图1是示出第1实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在以下的第1实施方式中,说明显微镜1A为共聚焦显微镜。如图1所示,显微镜1A具备显微镜主体10A、以及图像处理装置100A。显微镜主体10A具备光源11、光学系统12、扫描控制部13、检测器15A。

[0060] (显微镜主体的构成)

[0061] 光源11发出激光等的照明光L1。光源11可以为单色(单一波长)的光源,也可以为多色(多个波长)的光源。光源11可以为射出连续振荡光的激光器或者射出脉冲光的激光器的某一方。另外,光源11也可以不为激光器,可以为LED或灯。在作为样本8而使用发出荧光的物质的情况下,作为光源11的波长,优选激发样本8所包含的荧光物质的波长。在作为样本8使用发出荧光的物质的情况下,作为光源11的波长,可以选择对样本8所包含的荧光物质进行多光子激发的波长。光源11可以为能够更换地(能够安装且能够拆卸)设于显微镜主体10A。光源11在利用显微镜主体10A进行观察时等可以外接于显微镜主体10A。在该情况下,例如,从显微镜主体10A的外部的光源11可以经由光纤等的既存的光学构件使照明光L1入射至显微镜主体10A内。

[0062] 光学系统12将来自光源11的照明光L1照射至样本8,并且将来自样本8的检测光L2导向检测器15A。光学系统12具备准直透镜120、物镜121、光瞳投影透镜122、透镜123、偏转部124、光路分离元件125、集光透镜126等。准直透镜120将从激光器等的光源11发出的照明光L1转换成大致平行光。光路分离元件125由二向色镜等构成。光路分离元件125将从准直透镜120通过的照明光L1入射至偏转部124。

[0063] 偏转部124使入射来的照明光L1经由光瞳投影透镜122、透镜123入射至物镜121。作为一例,在偏转部124设有X方向偏转镜以及Y方向偏转镜,例如,分别由电流计镜、MEMS反射镜、谐振镜(谐振型反射镜)等构成。偏转部124相对于样本8,隔着物镜121、透镜123、光瞳投影透镜122,配置在与物镜121的光瞳位置大致共轭的位置。

[0064] 物镜121将入射来的照明光L1照射至在载物台2上保持的样本8上。物镜121在样本8上形成照明光L1集光成物镜121的分辨率极限程度的大小的照明区域14。若光源11为单一波长,则样本8上的照明区域14成为基于单一波长的光的照明区域14。若光源11包含多个波长,则样本8上的照明区域14成为包含多个波长的照明区域14。通过使偏转部124在规定方向上摆动,照明区域14在与照明光L1的光轴方向正交的面内移动。

[0065] 扫描控制部13通过控制偏转部124的X方向偏转镜以及Y方向偏转镜向规定方向的摆动,使照明区域14在样本8上沿着与照明光L1的光轴方向正交的面扫描。此外,扫描控制部13也可以为如下的构成,即,通过使保持样本8的载物台2沿着与照明光L1的光轴方向正交的面移动,使照明区域14与载物台2上的样本8相对扫描。另外,也可以采用进行利用偏转部124的扫描、以及利用载物台2的扫描双方的构成。

[0066] 通过照明区域14的照射从样本8发出的光(检测光)L2入射至物镜121。检测光L2被物镜121折射,并经过透镜123、光瞳投影透镜122而到达偏转部124。检测光L2通过被偏转部124反射,向与照明光L1几乎相同的光路返回(de-scan),到达光路分离元件125。检测光L2经过光路分离元件125、集光透镜126而入射至检测器15A。

[0067] 将从光源11发出的照明光L1导向样本8的光学系统为照明光学系统。即,在从光路分离元件125到达样本8的光路上配置的各光学构件(光路分离元件125、偏转部124、光瞳投

影透镜122、透镜123、物镜121等)构成照明光学系统。另外,将从样本8发出的光导向检测器15A的光学系统为检测光学系统。即,配置在从样本8到达检测器15A的光路上的各光学构件(物镜121、光瞳投影透镜122、透镜123、偏转部124、光路分离元件125、集光透镜126等)构成检测光学系统。

[0068] 检测器15A配置在隔着检测光学系统与样本8上的照明区域14共轭的位置、即,配置在隔着检测光学系统与样本8上的照明区域14成为成像关系的位置。在检测器15A的受光面上,作为照明区域14的像,而形成有由照明区域14激发的样本8的荧光的像15m。此外,在为了使照明区域14与样本8相对扫描而驱动偏转部124的情况下,检测器15A的受光面上的像15m也与偏转部124的状态无关地是静止的。这是因为,像15m在检测光L2通过偏转部124时,向与照明光L1相反方向偏转(de-scan)。

[0069] (检测器的构成)

[0070] 检测器15A检测在检测器15A的受光面上形成的像15m。在本实施方式中,检测器15A为受光面与样本8的荧光的像15m相比足够小的点检测器151。点检测器151具备由半导体等构成的光电转换元件(未图示)。检测器15A的光电转换元件(未图示)将与检测到的光量对应的信号(电信号)输出至图像处理装置100A。在本实施方式中,通过检测器控制部16使检测器15A能够在与检测光L2的光轴方向正交的平面内在多个位置之间移动。当关注这些多个位置处的两个位置时,检测器15A能够在与检测光L2的光轴方向正交的平面内在任意的第1位置G1与第2位置G2之间移动。检测器15A被检测器控制部16控制其在与检测光L2的光轴方向正交的平面内的移动。检测器15A通过在与光轴方向正交的平面上移动,而在与光轴方向正交的平面中的多个位置分别检测像15m的光量。

[0071] (光学系统的三维点扩散强度分布)

[0072] 图2是示出实施方式的第1状态的光学系统和第2状态的光学系统的三维点扩散强度分布的Z方向的强度轮廓不同的例子的图。

[0073] 检测器15A当与光轴方向正交的平面中的位置变化时,相对于光源11的相对位置变化。若检测器15A相对于光源11的相对位置变化,则经由光学系统12的三维点扩散强度分布(3D-PSF)变化。也就是说,如图2所示,在检测器15A位于任意的第1位置G1的第1状态A1、与检测器15A在与光轴方向正交的平面内位于与第1位置G1不同的任意的第2位置G2的第2状态A2下,经由光学系统12的三维点扩散强度分布不同。在此,三维点扩散强度分布是指,定量地表示从在样本8存在的点物体发出的且由检测器15A检测到的检测光L2的强度分布的函数,第1状态的光学系统以及第2状态的光学系统根据与光源11、光学系统12、检测器15A的相对关系来分别决定。因此,第1状态的光学系统以及第2状态的光学系统包含光源11、光学系统12、检测器15A。此外,如其他实施方式那样,在光学系统12的构成、以及检测器不同的情况下也是同样的。

[0074] 图像处理装置100A基于来自检测器15A的信号生成样本8的图像,对图像进行处理。图像处理装置100A由个人计算机等的计算机构成。图像处理装置100A具备CPU、存储器等的硬件。图像处理装置100A通过使CPU或存储器等与存储在存储器或存储装置内的图像处理程序协作来执行规定的处理,在功能上具有以下示出的这种构成。

[0075] (图像处理装置的构成)

[0076] 图像处理装置100A在功能上包括信号接收部101、生成部102、推断部103。信号接

收部101接收与从检测器15A输出的、像15m的光量对应的信号。生成部102基于与来自检测器15A的光量对应的信号、以及在检测到该光量信号时的照明区域14与样本8之间的相对位置关系,生成焦平面F中的样本8的二维图像(二维图像数据)。

[0077] (关于焦平面)

[0078] 图3是示意性示出实施方式的焦平面、样本面、第1面、第2面、以及推断样本面的关系的图。

[0079] 各个状态的光学系统中的焦平面F为根据各个状态的光学系统的三维点扩散强度分布定义的面。若检测器15A相对于光源11的相对位置变化,则经由光学系统12的三维点扩散强度分布变化。因此,如图3所示,各个状态的光学系统中的焦平面F根据检测器15A相对于光源11的位置不同,光轴方向(Z方向)上的位置会变化。在图3的例子中,第1状态A1下的检测器15A的位置(第1位置G1)与第2状态A2下的检测器15A的位置(第2位置G2)不同。因此,在第1状态A1和第2状态A2下,经由光学系统的三维点扩散强度分布不同,作为第1状态A1下的焦平面的第1焦平面Fa与作为第2状态A2下的焦平面的第2焦平面Fb在光轴方向(Z方向)上的位置会不同。此外,也有第1焦平面Fa与第2焦平面Fb在光轴方向(Z方向)上的位置一致的情况,通常,若检测器15A的移动量与光学系统的点扩散强度分布的大小为同等程度以下,则第1焦平面Fa与第2焦平面Fb一致。

[0080] 在此,在本实施方式中,焦平面F例如为在进行了求出对应的各个状态的光学系统12的三维点扩散强度分布的近似函数的三维高斯拟合的情况下的分布的中心位置所在的面(XY平面)。焦平面F例如可以为在Z方向上的、对应的各个状态下的光学系统的三维点扩散强度分布的最大亮度所在的位置处的面(XY平面)、或者与轴方向(Z方向)交叉的面中的对应的各个状态下的光学系统的三维点扩散强度分布的累计值的最大值所在的面(XY平面)。在本实施方式中,焦平面F例如在对某一状态的光学系统的三维点扩散强度分布进行3D高斯拟合的情况下为分布的中心位置所在的Z坐标处的XY平面。

[0081] 检测器15A在与光轴方向正交的平面内的多个位置检测像15m。为此,生成部102基于在光轴方向正交的平面内的多个位置由检测器15A检测出的光量来生成多个样本8的图像G。如图3所示,生成部102基于由第1状态A1的检测器15A检测出的光量,生成在Z方向上与第1焦平面Fa对应的位置处的样本8的面(将该面称为第1样本面Sa)的第1图像Ga。生成部102基于由第2状态A2的检测器15A检测出的光量,生成在Z方向上与第2焦平面Fb对应的位置处的样本8的面(将该面称为第2样本面Sb)的第2图像Gb。

[0082] (关于焦平面的“大致一致”的定义)

[0083] 在此,获取由生成部102生成的多个样本的图像G的所有状态的光学系统的各焦平面F在Z方向上的位置相同或者接近。在本实施方式中,在所有焦平面F的Z坐标上的分布位于所有状态的光学系统各自的Z分辨率(三维点扩散强度分布的Z轮廓的半波宽)的10%以下的范围的情况下,表示多个焦平面F大致一致。

[0084] (生成部中的处理)

[0085] 生成部102如上所述基于与来自检测器15A的光量对应的信号、以及在检测到该光量信号时的照明区域14与样本8之间的相对位置关系,生成所有焦平面F处的样本8的二维的图像G。二维的图像G以下式(1)来表达。

[0086] [数学式1]

[0087] $I(x, y, z) = \int s(x_p, y_p, z_p) h(x - x_p, y - y_p, z - z_p) dx_p dy_p dz_p \cdots (1)$

[0088] 在此, $I(x, y, z)$ 为图像G, $h(x, y, z)$ 为光学系统12中的三维点扩散强度分布, $s(x, y, z)$ 为样本8中的荧光分子分布。

[0089] 图4是示出由生成部生成的多个图像的例子的图。

[0090] 由生成部102生成的多个图像G的图像组如图3、图4所示那样包括: 基于经由第1状态A1的光学系统12的来自检测器15A的信号的第1焦平面Fa的第1图像Ga; 以及基于经由第2状态A2的光学系统12的来自检测器15A的信号的第2焦平面Fb的第2图像Gb, 第2焦平面Fb与第1焦平面Fa在光轴方向(Z方向)上大致一致。第1图像Ga为在第1焦平面Fa与样本8的第1样本面Sa一致的状态下获取到的观察像。第2图像Gb为在第2焦平面Fb与样本8的第2样本面Sb一致的状态下获取到的观察像。此外, $m1 \sim m3$ 为样本8内的物体。

[0091] (推断部中的处理)

[0092] 向推断部103输入由生成部102生成的多张图像G的数据。多张图像G是在使检测器15A位于与光轴方向正交的平面内的多个位置来检测像15m的光量的情况下、在各状态的光学系统的焦平面F与各样本面S匹配的状态下拍摄到的。在此, 获取多张图像G的所有状态的光学系统的焦平面F的Z方向上的位置(Z坐标)基于前述的定义是彼此大致一致的。

[0093] 推断部103设定推断样本8中的构造的推断样本面。在图3的例子中, 推断部103利用在Z方向上与第1面P1对应的位置处的第1推断样本面Q1、和在Z方向上与第2面P2对应的位置处的第2推断样本面Q2分别推断样本8的构造。第1面P1与焦平面F大致一致地来决定。第1面P1在将获取多张图像G的所有状态的光学系统的各焦平面F的z坐标的最大值设为 Z_{max} 、将最小值设为 Z_{min} 的情况下, 以使第1面P1的Z坐标成为 Z_{max} 以下 Z_{min} 以上的方式选择第1面P1。另外, 若获取多张图像G的所有状态的光学系统的焦平面F的Z坐标相同, 则第1面P1的Z坐标与焦平面F的Z坐标相同。推断部103基于由生成部102生成的多张图像G, 推断沿着光学系统12的光轴方向(Z方向)的多个推断样本面各自的构造, 输出第1推断样本面Q1的推断图像Ie。

[0094] 第2面P2被设定为非焦平面。即, 第2面P2被设定在焦平面F的z坐标的范围($Z_{min} \sim Z_{max}$)之外。在此, 推断部103在将获取向推断部103输入的多个样本的图像G的所有状态的光学系统的所有Z分辨率中最小的值设为 δz 的情况下, 优选以使第2面P2的Z坐标($z = z_2$)与第1面P1的Z坐标($z = z_1$)之差比 $0.05\delta z$ 大且比 $0.5\delta z$ 以下的方式选择第2面P2。

[0095] 推断部103算出或事先存储获取多张图像G的所有状态的光学系统各自的三维点扩散强度分布中的、第1面P1、第2面P2的二维点扩散强度分布。在所述的各个状态的光学系统的三维点扩散强度分布 $h(x, y, z)$ 中, 将在将z坐标设为第1面P1的z坐标($z = z_1$)时的点扩散强度分布 $h(x, y, z_1)$ 设为第1面P1中的二维点扩散强度分布H1。另外, 将在将z坐标设为第2面P2的z坐标($z = z_2$)时的点扩散强度分布 $h(x, y, z_2)$ 设为第2面P2中的二维点扩散强度分布H2。

[0096] (关于多个面的二维点扩散强度分布的相对关系)

[0097] 图5是示出实施方式的第1状态的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散强度分布以及第2面P2的二维点扩散强度分布、和第2状态的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散强度分布以及第2面P2的二维点扩散强度分布的例子图。

[0098] 在本实施方式中, 如图5所示, 基于第1状态A1的光学系统的第1三维点扩散强度分

布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布H1a与第2面P2的二维点扩散强度分布H2a之间的第1相对关系不同于基于与第1状态A1不同的第2状态A2的光学系统的第2三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布H1b与第2面P2的二维点扩散强度分布H2b之间的第2相对关系。

[0099] 推断部103使用至少一组图像G,推断沿着光学系统12的光轴方向(Z方向)的样本8中的包含第1推断样本面Q1在内的多个面各自的构造。在图3的例子中,推断部103根据二维点扩散强度分布的相对关系不同,使用至少一组图像G,分开推断第1推断样本面Q1与第2推断样本面Q2中的样本8的构造。此外,在二维点扩散强度分布的相对关系不存在差异的情况下,无法准确地判断第1推断样本面Q1与第2推断样本面Q2中的样本8的构造。

[0100] (基于二维点扩散强度分布的相对强度的推断)

[0101] 推断部103例如能够基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对强度的差异来推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。此时,优选在第1相对强度与第2相对强度之间存在规定的差异,第1相对强度为第1状态A1的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散强度分布与第2面P2的二维点扩散强度分布的相对强度,第2相对强度为第2状态A2的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散强度分布与第2面P2的二维点扩散强度分布的相对强度。在将第1状态A1的光学系统的第1面P1的二维点扩散强度分布H1a的亮度总和设为 I_1^f ,将第1状态A1的光学系统第2面P2的二维点扩散强度分布H1b的亮度总和设为 I_1^{df} ,将第2状态A2的光学系统的第1面P1的二维点扩散强度分布H1b的亮度总和设为 I_2^f ,将第2状态A2的光学系统的第2面P2的二维点扩散强度分布H2b的亮度总和设为 I_2^{df} 时,例如优选满足下式(2)或者(3)。

[0102] [数学式2]

$$[0103] \quad I_1^{df} I_2^f / I_1^f I_2^{df} > 1.1 \cdots (2)$$

[0104] [数学式3]

$$[0105] \quad I_1^{df} I_2^f / I_1^f I_2^{df} < 0.9 \cdots (3)$$

[0106] (物体的三维分布的推断)

[0107] 推断部103中的物体的推断例如能够采用维纳滤波器、梯度法、Richardson-Lucy法等公知的各种算法。在此,例如使用基于梯度法的算法。利用配置于第m个位置的检测器15A拍摄到的、二维的图像 I_m 如下式(4)那样来表示。

[0108] [数学式4]

$$[0109] \quad I_m = A_m s \cdots (4)$$

[0110] 在此,s为表示三维的荧光分子分布的P维矢量, A_m 为用下式(5)表示的 $N \times P$ 矩阵($N = N_x \times N_y$)。

[0111] [数学式5]

$$[0112] \quad [A_m s](x_n, y_n) = \sum_{p=1}^P s(x_p, y_p, z_p) h_m(x_n - x_p, y_n - y_p, 0 - z_p) \cdots (5)$$

[0113] 在此, (x_n, y_n) 为照明光L1的照明区域14的坐标, (x_p, y_p, z_p) 为样本空间的坐标。 h_m 为表示在第m个位置配置了检测器15A的情况(状态)下的光学系统的三维点扩散强度分布。

[0114] 推断部103通过将由下式(6)表示的误差函数F(s)最小化,推断样本8内的荧光分

子分布。

[0115] [数学式6]

$$F(s) = \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N \| (I_m^{mes})_n - (A_m s)_n \|^2 \cdots (6)$$

[0117] 在此, I_{mes} 为由配置在第 m 个位置的检测器 15A 实际上获取到的图像 (N 维矢量)。为了确保 P 维矢量 s 为正值, 而设为 $s = \rho^2$, 则上式 (6) 的误差函数 $F(s)$ 用下式 (7) 来表示。

[0118] [数学式7]

$$F(s) = \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N \| (I_m^{mes})_n - (A_m \rho^2)_n \|^2 \cdots (7)$$

[0120] 推断部 103 进行发现将用上式 (7) 表示的误差函数最小化的这种 ρ 的处理。在推断部 103 中, 若使用梯度法, 则在第 i 个迭代中得到下式 (8)。

[0121] [数学式8]

$$\rho^{i+1} = \rho^i + \alpha d^i \cdots (8)$$

[0123] 在此, d^i 表示相对于误差函数 $F(s)$ 相对于 ρ 的梯度, α 为指定梯度方向上的进展量的系数。能够根据在增加了迭代次数时的 ρ 的变化率变小时、或者达到了事先指定的迭代次数时的 ρ 的值, 通过 $s = \rho^2$ 求出荧光分子分布。

[0124] 推断部 103 推断第 1 推断样本面 Q1 和第 2 推断样本面 Q2 中的荧光分子分布。

[0125] 此外, 推断部 103 分开推断第 1 推断样本面 Q1 与第 2 推断样本面 Q2 中的样本 8 的构造, 但也可以在沿着光学系统 12 的光轴方向 (Z 方向) 的不同位置设定多个第 2 推断样本面 Q2。例如, 也可以相对于第 1 推断样本面 Q1 在光轴方向 (Z 方向) 的 + 侧和 - 侧分别设定第 2 推断样本面 Q2。

[0126] (图像处理方法)

[0127] 接下来, 说明上述这种显微镜主体 10A 中的图像处理方法。在以下示出的图像处理方法中, 基于在图像处理装置 100A 内事先存储的程序, 由图像处理装置 100A 执行显微镜主体 10A 的图像处理装置 100A 要执行的各处理。该程序可以记录在可由计算机读取的存储介质 (例如非临时性的记录介质、non-transitory tangible media) 来提供。

[0128] 图 6 是示出实施方式的图像处理方法的流程的流程图。如该图 6 所示, 在步骤 S11 中, 将来自光源 11 的照明光 L1 照射至设于载物台 2 上的样本 8。从光源 11 发出的照明光 L1 经由准直透镜 120、光路分离元件 125、偏转部 124、光瞳投影透镜 122、成像透镜 123、以及物镜 121 而照射至在载物台 2 上保持的样本 8 上。由此, 将照明光 L1 被物镜 121 集光的照明区域 14 形成在样本 8 上。扫描控制部 13 通过控制偏转部 124 的摆动, 使照明区域 14 在样本 8 上沿 XY 方向二维扫描。在使照明区域 14 在样本 8 上沿 XY 方向二维扫描的期间内, 不改变 (维持固定) 样本 8 与物镜 121 在 Z 方向上的相对位置关系, 照明区域 14 在样本 8 的规定的 Z 平面内进行扫描。利用照明区域的照射从样本 8 发出的光 (检测光) L2 经由物镜 121、成像透镜 123、光瞳投影透镜 122、偏转部 124、光路分离元件 125、以及集光透镜 126 而入射至检测器 15A。

[0129] 在步骤 S12 中, 利用检测器控制部 16 使检测器 15A 在 XY 平面内向多个位置移动, 在各位置, 利用检测器 15A 检测在检测器 15A 的受光面上形成的样本 8 的荧光的像 15m 的光量。检测器 15A 的光电转换元件 (未图示) 将与接收的光的光量对应的信号 (电信号) 输出至图像处理装置 100A。即使在使检测器 15A 在 XY 平面内移动至多个位置的情况下, 也不改变 (维持固定) 样本 8 与物镜 121 在 Z 方向上的相对位置关系, 照明区域 14 在样本 8 的规定的 Z 平面内扫

描。

[0130] 在步骤S13中,图像处理装置100A基于来自检测器15A的信号生成样本8的图像G,对所生成的图像G进行处理。图像处理装置100A的信号接收部101接收从检测器15A输出的、与由光电转换元件(未图示)接收的样本8的荧光的像15m的光量对应的信号。生成部102基于与来自检测器15A的光量对应的信号、和在检测到该光量信号时的照明区域14与样本8之间的相对位置关系,生成焦平面F中的样本8的二维的图像G。在此,生成部102生成基于在XY平面内的多个位置由检测器15A检测出的光的光量的、多个图像G(图像组)。图像G为不改变样本8与物镜121(光学系统12)在Z方向上的相对位置关系而获取到的图像。生成部102所生成的多个图像G的图像组包括:基于在检测器15A位于第1位置G1的第1状态A1下经由光学系统12从检测器15A发出的信号的第1焦平面Fa的第1图像Ga;基于在检测器15A位于第2位置G2的第2状态A2下经由光学系统12从检测器15A发出的信号的第2焦平面Fb的第2图像Gb,第2焦平面Fb与第1焦平面Fa在光轴方向(Z方向)上大致一致。第1图像Ga是在使第1焦平面Fa与样本8的第1样本面Sa一致的状态下获取的。第2图像Gb是在使第2焦平面Fb与样本8的第2样本面Sb一致的状态下获取的。

[0131] 在步骤S14中,推断部103基于由生成部102生成的图像组,推断沿着光学系统的光轴方向(Z方向)的、样本8中的多个面各自的构造,输出基于推断出的构造的推断图像Ie。向推断部103输入由生成部102生成的多张图像G(图像组)的数据。推断部103分别算出或事先存储基于光学系统的三维点扩散强度分布中的、第1面P1与第2面P2的二维点扩散强度分布。第1面P1被决定为与焦平面F大致一致。第2面P2为非焦平面,与第1面P1在光学系统的光轴方向(Z方向)上不同。

[0132] 基于第1状态A1的光学系统的第1三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布与第2面P2的二维点扩散强度分布的第1相对关系不同于基于与第1状态A1不同的第2状态A2的光学系统的第2三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布与第2面P2的二维点扩散强度分布的第2相对关系。推断部103使用至少一组图像G推断沿着光学系统的光轴方向(Z方向)的样本8中的包含第1推断样本面Q1在内的多个面各自的构造。将与第1面P1对应的样本面S设为第1推断样本面Q1,将与第2面P2对应的样本面S设为第2推断样本面Q2。推断部103例如能够基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对强度,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。

[0133] 推断部103如上述那样推断多个推断样本面(推断样本面)各自的构造,输出基于推断出的构造的推断图像Ie。例如,对第1推断样本面Q1中的推断图像和第2推断样本面Q2中的推断图像分别加不同的权重,并将求和得到的(累计的)图像设为Ie。

[0134] [数学式9]

[0135]
$$I_e = \sum_k w_k \times [\text{推断样本面 } Q_k \text{ 中的推断图像}]$$

[0136] 在此, w_k 为相对于第k推断样本面 Q_k 中的推断图像的权重,可取任意的实数值。在将相对于第1推断样本面Q1中的推断图像的权重设为比相对于第2推断样本面Q2中的推断图像的权重大时,由此得到的推断图像Ie与第1图像Ga以及第2图像Gb相比,非焦平面的构造相对减少,可以说光轴方向(Z方向)上的分辨率得到了提高。另外,通过调节权重,能够使推

断图像I_e的切片能力变化。

[0137] 还能够考虑针对三维点扩散强度分布的各z乘以不同的权重的、下式这种变形三维点扩散强度分布。

[0138] [数学式10]

$$[0139] \quad \tilde{h}_m(x, y, z) = \frac{1}{w_z} \times h_m(x, y, z)$$

[0140] 在此, w_z为针对三维点扩散强度分布的各z的权重, 可取0以外的任意的正的实数值。

[0141] 使用它来以如下方式重写 (5) 式。

[0142]

[0143] [数学式11]

$$[0144] \quad [\tilde{A}_m \tilde{s}](x_n, y_n) = \sum_p \tilde{s}(x_p, y_p, z_p) \tilde{h}_m(x_n - x_p, y_n - y_p, 0 - z_p)$$

[0145] 在此,

[0146] [数学式12]

$$[0147] \quad \tilde{s}(x, y, z) = w_z \times s(x, y, z)$$

[0148] 该式是针对各z乘以不同的权重的推断构造。由此, 可知若使用变形三维点扩散强度分布, 则推断出针对各z乘以了不同的权重的构造。在该情况下, 通过利用权重1 (权重为1) 累计各推断样本面中的推断图像, 得到与上述等价的推断图像I_e。

[0149] [数学式13]

$$[0150] \quad I_e = \sum_k [\text{推断样本面 } Q_k \text{ 中的推断图像}]$$

[0151] 此外, 表示图6示出的图像处理方法的流程的流程图也应用至其他实施方式。也就是说, 虽然其他实施方式的显微镜主体 (光学系统的构成、检测器的种类) 以及图像处理装置不同 (其结果为, 第1状态的光学系统、第2状态的光学系统不同), 但通过适用各实施方式的显微镜主体以及图像处理装置的构成、功能并重新理解, 来应用流程图的各步骤的内容。

[0152] 图7是示出第1实施方式的基于由推断部推断出的构造的推断图像I_e的一例的图。

[0153] 如上述那样, 推断部103通过解析在第1状态A1、第2状态A2下获取到的多张第1图像Ga、第2图像Gb (参照图4), 除去或减少不存在于第1推断样本面Q1的物体m2、m3, 输出存出于第1推断样本面Q1的物体m1被突出显示的推断图像I_e。

[0154] 根据上述这种显微镜1A、图像处理装置100A, 通过由点检测器151构成的检测器15A在多个位置进行检测, 根据包含基于第1状态A1的来自点检测器151的信号的第1焦平面Fa的第1图像Ga、和基于第2状态A2的来自点检测器151的信号的第2焦平面Fb的第2图像Gb在内的图像组, 推断样本8中的包含第1推断样本面Q1在内的多个面各自的构造。因此, 能够基于通过点检测器151在多个位置进行检测得到的、更多图像信息来进行样本构造的推断。其结果为, 能够更高精度地推断存在于第1推断样本面Q1的物体, 获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像I_e。

[0155] 在本说明书中, Z分辨率表示三维点扩散强度分布的峰值强度所在的 (x, y) 坐标中的、Z轮廓的半波宽。切片能力表示三维点扩散的xy面内的累计值的Z轮廓的半波宽。

[0156] [第2实施方式]

[0157] 说明第2实施方式。图8是示出第2实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图8所示,如显微镜1B具备显微镜主体10B、图像处理装置100B。显微镜主体10B具备光源11、光学系统12、扫描控制部13、检测器15B。

[0158] 显微镜主体10B的光学系统12将来自光源11的照明光L1照射至样本8,并且将来自样本8的检测光L2导向检测器15B。

[0159] 在本实施方式中,检测器15B具备多个点检测器152。多个点检测器152配置在与检测光L2的光轴方向正交的平面内。多个点检测器152一体地安装于未图示的基座构件等。在此,关于多个点检测器152的设置数量、配置等没有任何限定。例如,多个点检测器152可以在沿着与检测光L2的光轴方向正交的平面的一个方向上呈直线状排列。另外,多个点检测器152可以在与检测光L2的光轴方向正交的平面内离散地配置。在图8中,例如三个点检测器152沿着图8的纸面上下方向排列。

[0160] 各点检测器152具备由半导体等构成的光电转换元件(未图示)。各点检测器152的光电转换元件(未图示)分别将与接收的光的光量对应的信号(电信号)输出至图像处理装置100B。检测器15B利用多个点检测器152分别在与光轴方向正交的平面内的多个位置检测像15m的光量。

[0161] (光学系统的三维点扩散强度分布)

[0162] 构成检测器15B的多个点检测器152在与光轴方向正交的平面中的位置彼此不同。因此,多个点检测器152之间相对于光源11的相对位置变化。若相对于光源11的检测器15B的相对位置变化,则如图2所示,经由光学系统12的三维点扩散强度分布(3D-PSF)不同。如图8所示,若关注多个点检测器152中的两个点检测器152,关于位于第1位置G11的第1状态A11的检测器152、以及在与光轴方向正交的平面内位于与第1位置G11不同的任意的第2位置G12的第2状态A12的点检测器152,经由光学系统12的三维点扩散强度分布不同。

[0163] 图像处理装置100B基于来自检测器15B的多个点检测器152的信号生成多个样本8的图像,对这些图像进行处理。图像处理装置100B包括信号接收部101、生成部102、推断部103,各功能与在第1实施方式中说明的相同,也在本实施方式中应用。

[0164] 若相对于光源11的多个点检测器152的相对位置变化,则经由光学系统12的三维点扩散强度分布变化。因此,如图9所示,各个状态的光学系统中的焦平面F根据相对于光源11的多个点检测器152的位置不同,光轴方向(Z方向)上的位置会变化。在图9的例子中,关于位于第1位置G11的第1状态A11下的检测器15B、和位于第2位置G12的第2状态A12下的检测器15B,经由光学系统12的三维点扩散强度分布不同。作为第1状态A11下的焦平面的第1焦平面Fa与作为第2状态A12下的焦平面的第2焦平面Fb在光轴方向(Z方向)上的位置可以不同,但至少大致一致。

[0165] 根据上述这种显微镜1B、图像处理装置100B,由于检测器15B具备多个点检测器152,所以能够同时获取大量的图像。因此,能够基于由多个点检测器152得到的、更多的图像信息进行样本构造的推断。其结果为,能够更易于推断出存在于第1推断样本面Q1的物体,获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像Ie。另外,通过使检测器15B具备多个点检测器152,能够同时进行多个位置处的光量的检测,因此能够进行更迅速的处理。

[0166] [第3实施方式]

[0167] 说明第3实施方式。图10是示出第3实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图10所示,显微镜1C具备显微镜主体10C、图像处理装置100C。显微镜主体10C具备光源11、光学系统12、扫描控制部13、检测器15C。显微镜主体10C的光学系统12将来自光源11的照明光L1照射至样本8,并且将来自样本8的检测光L2导向检测器15C。

[0168] (检测器的构成)

[0169] 图11是示出第3实施方式的检测器的构成的图。检测器15C检测在检测器15C的受光面上形成的像15m的光。如图11所示,在本实施方式中,检测器15C为所谓的二维检测器(2D检测器),构成为二维地排列多个检测部153。也就是说,多个检测部153在沿着与光轴方向正交的平面的第1方向(图11的纸面左右方向)、以及沿着与光轴方向正交的平面且与第1方向交叉的第2方向(图11的纸面上下方向)上分别各排列有多个。在此,各检测部153检测光,受光面为与样本8的荧光的像15m相比足够小的像素。检测部153具备由半导体等构成的光电转换元件(未图示)。检测器15C的受光面接收像15m的光。构成检测器15C的多个检测部153各自将与接收到的光的光量对应的信号(电信号)输出至图像处理装置100C。

[0170] 若关注多个检测部153中的两个位置,则包含光源11、光学系统12、位于第1位置G21的检测部153在内的第1状态A21下的光学系统的三维点扩散强度分布、与包含光源11、光学系统12、位于第2位置G22的检测部153在内的第2状态A22下的光学系统的三维点扩散强度分布不同。

[0171] (光学系统的三维点扩散强度分布)

[0172] 图12是示意性示出第3实施方式的、焦平面、样本面、第1面、第2面、以及推断样本面的关系的图。在检测器15C的多个检测部153之间,若与光轴方向正交的平面中的位置不同,则相对于光源11的相对位置变化。若检测器15C的检测部153相对于光源11的相对位置变化,则如图2所示,经由光学系统12的三维点扩散强度分布(3D-PSF)不同。也就是说,如图12所示,在构成检测器15C的多个检测部153中,包含光源11、光学系统12、位于第1位置G21的检测部153在内的第1状态A21下的光学系统的三维点扩散强度分布不同于包含光源11、光学系统12、位于第2位置G22的检测部153在内的第2状态A22下的光学系统的三维点扩散强度分布。

[0173] (图像处理装置的构成)

[0174] 图像处理装置100C基于来自检测器15C的多个检测部153的信号生成多个样本8的图像,并对这些图像进行处理。图像处理装置100C包括信号接收部101、生成部102、推断部103,各功能与在第1实施方式中说明的相同,也在本实施方式中应用。

[0175] (关于焦平面,关于焦平面的“大致一致”的定义)

[0176] 各个状态的光学系统中的焦平面F为根据各个状态的光学系统的三维点扩散强度分布定义的面。在本实施方式中应用在第1实施方式中的说明。因此,所有焦平面大致一致。

[0177] 根据上述这种显微镜1C、图像处理装置100C,通过使检测器15C具备呈二维状排列的多个检测部153,能够同时进行多个位置处的光量的检测,因此能够进行更迅速的处理。另外,与第1、第2实施方式中的检测器15A、15B相比,能够利用呈二维状排列的多个检测部153以相同的扫描时间得到更大量的图像信息,因此,可得到精度更高的推断图像Ie。

[0178] [第4实施方式]

[0179] 说明第4实施方式。图13是示出第4实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图13所示,显微镜1D具有显微镜主体10D、图像处理装置100D。显微镜主体10D具有光源11、光学系统12、扫描控制部13、检测器15D。

[0180] 检测器15D检测来自样本8的检测光L2。在本实施方式中,检测器15D具备点检测器154。点检测器154具备由半导体等构成的光电转换元件(未图示)。点检测器154的光电转换元件(未图示)分别将与接收到的光的光量对应的信号(电信号)输出至图像处理装置100D。在本实施方式中,点检测器154固定设置。

[0181] 在本实施方式中,在光学系统12设有光学元件17D。光学元件17D将光学系统12切换为第1状态A31或第2状态A32。光学元件17D被设置为相对于检测光L2的光路可进退。光学元件17D构成为能够在光学元件17D位于检测光L2的光路的外部的第1状态A31、与光学元件17D进入检测光L2的光路的第2状态A32之间进行切换。在本实施方式中,作为光学元件17D而设有玻璃平行板171。玻璃平行板171例如配置在光路分离元件125与集光透镜126之间。在玻璃平行板171进入了检测光L2的光路的第2状态A32下,检测光L2向与光轴方向(Z方向)交叉的方向位移。

[0182] 图14是示出第4实施方式的第1状态的三维点扩散强度分布的XZ剖面的大概形状、和第2状态的三维点扩散强度分布的XZ剖面的大概形状的图。在第1状态A31和第2状态A32下,检测光L2在与光轴方向(Z方向)正交的面内位移,由此,经由光学系统12的三维点扩散强度分布(3D-PSF)变化。如图14所示,在玻璃平行板171位于检测光L2的光路外的第1状态A31、和玻璃平行板171位于检测光L2的光路上的第2状态A32下,经由光学系统12的三维点扩散强度分布不同,第2状态A32的三维点扩散强度分布相对于第1状态A31的三维点扩散强度分布倾斜。

[0183] 图像处理装置100D基于来自检测器15D的点检测器154的信号生成样本8的图像,对图像进行处理。生成部102基于来自点检测器154的信号,生成光学系统的焦平面F的图像。生成部102在光学元件17D位于检测光L2的光路的外部的第1状态A31、光学元件17D进入检测光L2的光路的第2状态A32下分别基于点检测器154检测出的光的光量,生成样本8的图像G。生成部102基于在第1状态A31下由检测器15D检测出的光的光量,生成在Z方向上与第1焦平面Fa对应的位置处的样本8的面(第1样本面Sa)的第1图像Ga。生成部102基于在第2状态A32下由检测器15D检测出的光的光量,生成在Z方向上与第2焦平面Fb对应的位置处的样本8的面(第2样本面Sb)的第2图像Gb。

[0184] 图15是示出第4实施方式的第1状态的光学系统、以及第2状态的光学系统各自中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的图。

[0185] 如图15所示,基于第1状态A31的光学系统的第1三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布H31a与第2面P2的二维点扩散强度分布H32a之间的第1相对关系不同于基于与第1状态A31不同的第2状态A32的光学系统的第2三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布H31b与第2面P2的二维点扩散强度分布H32b之间的第2相对关系。

[0186] (基于二维点扩散强度分布的相对位置的推断)

[0187] 推断部103基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对关系,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。在本实施方式中,推断部103例如基于第1面P1中的二维点扩散强度分布、和第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对位置,推断第1推断样本面Q1与第2推断样本面Q2中的样本8的构造。将第1状态A31的光学系统的第1面P1的二维点扩散强度分布H1a的重心位置矢量设为 r_1^f ,将第1状态A31的光学系统的第2面P2的二维点扩散强度分布H2a的重心位置矢量设为 r_1^{df} 。而且,利用下式(9)算出第1状态A31的光学系统的第2面P2的二维点扩散强度分布H2a相对于第1状态A31的光学系统的第1面P1的二维点扩散强度分布H1a的相对位置矢量 r_1^{rel} 。

$$[0188] \quad r_1^{rel} = r_1^{df} - r_1^f \quad (9)$$

[0189] 将第2状态A32的光学系统的第1面P1的二维点扩散强度分布H1b的重心位置矢量设为 r_2^f ,将第2状态A32的光学系统的第2面P2的二维点扩散强度分布H2b的重心位置矢量设为 r_2^{df} 。而且,利用下式(10)算出第2状态A32的光学系统的第2面P2的二维点扩散强度分布H2b相对于第2状态A32的光学系统的第1面P1的二维点扩散强度分布H1b的相对位置矢量。

$$[0190] \quad r_2^{rel} = r_2^{df} - r_2^f \quad (10)$$

[0191] 在此,第1状态A31下的相对位置矢量 r_1^{rel} 和第2状态A32下的相对位置矢量 r_2^{rel} 之差与第1状态A31下的第1面P1的二维点扩散强度分布H1a、以及第2状态A32下的第1面P1的二维点扩散强度分布H1b的半波宽相比,需要大一定程度。于是,在将第1状态A31下的第1面P1的二维点扩散强度分布H1a、以及第2状态A32下的第1面P1的二维点扩散强度分布H1b的半波宽中的、较小的一方设为 σ 的情况下,优选满足下式(11)。

[0192] [数学式14]

$$[0193] \quad \| r_2^{rel} - r_1^{rel} \| > 0.2\sigma \quad \dots (11)$$

[0194] 根据上述这种显微镜1D、图像处理装置100D,利用光学元件17D将光学系统12切换为第1状态A31或第2状态A32,由此,推断样本8中的包含第1推断样本面Q1在内的多个面各自的构造。推断方法应用在上面的(物体的三维分布的推断)中所述的手法。其结果为,能够更高精度地推断在第1推断样本面Q1中存在的物体,获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像。

[0195] 此外,在上述第4实施方式中,作为检测器15D而使用点检测器154,但也可以取代点检测器154,使用在上述第2实施方式中示出的那种多个点检测器152、在上述第3实施方式中示出的那种具有二维排列的多个检测部153的二维检测器。在上述第4实施方式中,作为光学元件17D而具备玻璃平行板171,但也可以取而代之地设为相位板。

[0196] [第5实施方式]

[0197] 说明第5实施方式。图16是示出第5实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图16所示,显微镜1E具备显微镜主体10E、图像处理装置100E。显微镜主体10E具备光源11、光学系统12、扫描控制部13、检测器15D。

[0198] 在本实施方式中,在光学系统12设有光学元件17E。光学元件17E将光学系统12切换为第1状态A41或第2状态A42。光学元件17E被设为相对于照明光L1的光路可进退。光学元件17E构成为能够在光学元件17E位于照明光L1的光路的外部的第1状态A41、与光学元件

17E进入照明光L1的光路的第2状态A42之间切换。在本实施方式中,作为光学元件17E而设有玻璃平行板172。玻璃平行板172配置在准直透镜120与光路分离元件125之间。在玻璃平行板172进入照明光L1的光路的第2状态A42下,照明光L1向与光轴方向(Z方向)交叉的方向位移。

[0199] 在第1状态A41和第2状态A42下,照明光L1向与光轴方向(Z方向)交叉的方向位移,由此经由光学系统12的三维点扩散强度分布(3D-PSF)不同。在本实施方式中,如图14所示,第2状态A42的三维点扩散强度分布相对于第1状态A41的三维点扩散强度分布倾斜。

[0200] 图像处理装置100E的生成部102基于在第1状态A41下由检测器15D检测出的光的光量,生成在Z方向上与第1焦平面Fa对应的位置处的样本8的面(第1样本面Sa)的第1图像Ga。生成部102基于在第2状态A42下由检测器15D检测出的光的光量,生成在Z方向上与第2焦平面Fb对应的位置处的样本8的面(第2样本面Sb)的第2图像Gb。

[0201] 图17是示出第5实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布和第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。

[0202] 推断部103与上述第4实施方式同样地,基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对关系,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。在本实施方式中,推断部103例如基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对位置,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。

[0203] 根据上述这种显微镜1E、图像处理装置100E,通过利用光学元件17E将光学系统12切换为第1状态A41或第2状态A42,推断样本8中的包含第1推断样本面Q1在内的多个面各自的构造。其结果为,能够更高精度地推断在第1推断样本面Q1存在的物体,获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像。

[0204] 此外,在上述第5实施方式中,作为检测器15D而使用了点检测器154,但也可以取代点检测器154,而使用在上述第2实施方式中示出的这种多个点检测器152、在上述第3实施方式中示出的这种具有呈二维排列的多个检测部153在内的二维检测器。在上述第5实施方式中,作为光学元件17E而具备玻璃平行板172,但也可以取而代之设为相位板。

[0205] [第6实施方式]

[0206] 说明第6实施方式。图18是示出第6实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图18所示,显微镜1G具备显微镜主体10G、和图像处理装置100G。显微镜主体10G具备光源11、光学系统12、扫描控制部13、检测器15D。

[0207] 在本实施方式中,在光学系统12设有光学元件17G。光学元件17G将光学系统12切换为第1状态A61或第2状态A62。光学元件17G被设为相对于检测光L2的光路能够进退。光学元件17G构成为能够在光学元件17G位于检测光L2的光路的外部的第1状态A61、与光学元件17G进入检测光L2的光路的第2状态A62之间切换。在本实施方式中,作为光学元件17G而设有柱面透镜174。柱面透镜174配置在光路分离元件125与集光透镜126之间。在柱面透镜174进入了检测光L2的光路的第2状态A62下,在检测器15D的受光面上形成的荧光的像15m变形。

[0208] 在本实施方式中,柱面透镜174沿着检测光L2的光路的光轴方向具备一对第1透镜

174a、第2透镜174b。

[0209] 第1透镜174a以及第2透镜174b具有呈圆筒状膨出的弯曲面w1、w2。第1透镜174a的弯曲面w1形成为以沿着与光轴方向交叉的平面的第1方向(在图18中纸面上下方向)为轴线的圆筒状。第2透镜174b的弯曲面w2形成为以沿着与光轴方向交叉的平面的第2方向(在图18中与纸面正交方向)为轴线的圆筒状。由此,抑制焦平面在光轴方向上位移,在第1状态和第2状态下焦平面大致一致。

[0210] 在第1状态A61和第2状态A62下,使柱面透镜174在检测光L2的光路上进退,由此使经由光学系统12的三维点扩散强度分布(3D-PSF)变化。在柱面透镜174位于检测光L2的光路外的第1状态A61、和柱面透镜174位于检测光L2的光路上的第2状态A62下,经由光学系统12的三维点扩散强度分布不同。

[0211] 图像处理装置100G基于来自检测器15D的点检测器154的信号生成样本8的图像,对图像进行处理。生成部102基于来自点检测器154的信号,生成光学系统的焦平面F的图像。生成部102在第1状态A61和第2状态A62下分别基于由点检测器154检测出的光的光量,生成样本8的图像G。生成部102基于在第1状态A61下由检测器15D检测出的光的光量,生成在Z方向上与第1焦平面Fa对应的位置处的样本8的面(第1样本面Sa)的第1图像Ga。生成部102基于在第2状态A62下由检测器15D检测出的光的光量,生成在Z方向上与第2焦平面Fb对应的位置处的样本8的面(第2样本面Sb)的第2图像Gb。

[0212] 图19是示出第6实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的图。如图19所示,基于第1状态A61的光学系统12的第1三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布H61a与第2面P2的二维点扩散强度分布H62a的第1相对关系不同于基于与第1状态A61不同的第2状态A62的光学系统的第2三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布H61b与第2面P2的二维点扩散强度分布H62b的第2相对关系。

[0213] (基于二维点扩散强度分布的相对形状的推断)

[0214] 推断部103与上述第1实施方式同样地,基于第1面P1中的二维点扩散强度分布和第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对关系,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。在本实施方式中,推断部103例如基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对形状,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。以使第1状态A61下的光学系统的第1面P1的二维点扩散强度分布H1a的重心位置矢量到达原点的方式位移,并进行二维傅里叶变换,由此,得到频率分布01a。以使第1状态A61下的光学系统的第2面P2的二维点扩散强度分布H2a的重心位置矢量到达原点的方式位移,并进行二维傅里叶变换,由此,得到频率分布02a。以使第2状态A62下的光学系统的第2面P2的二维点扩散强度分布H1b的重心位置矢量到达原点的方式位移,并进行二维傅里叶变换,由此,得到频率分布01b。以使第2状态A62下的光学系统的第2面P2的二维点扩散强度分布H2b的重心位置矢量到达原点的方式位移,进行二维傅里叶变换,由此,得到频率分布02b。

[0215] 基于频率分布01a、02a、01b、02b,利用下式(12)、(13),算出换算后的二维点扩散强度分布H3、H4。

[0216] [数学式15]

[0217] $H_3 = FT^{-1}[O_{2a}O_{1b}/(O_{1a}+w)] \cdots (12)$

[0218] [数学式16]

[0219] $H_4 = FT^{-1}[O_{2b}O_{1a}/(O_{1b}+w)] \cdots (13)$

[0220] 在此, FT^{-1} 表示傅里叶逆变换。 w 为用于防止除以0的小数,例如设为 10^{-5} 。期望二维点扩散强度分布的相对形状有足够的差异,因此,在将H2b与H3的相关系数设为 ρ_1 ,将H2a与H4的相关系数设为 ρ_2 时,优选成立 $\rho_1 < 0.9$ 且 $\rho_2 < 0.9$ 。

[0221] 根据上述这种显微镜1G、图像处理装置100G,利用光学元件17G将光学系统12切换为第1状态A61或第2状态A62,推断样本8中的包含第1推断样本面Q1在内的多个面各自的构造。推断方法应用在上面(物体的三维构造的推断)所述的手法。其结果为,能够更高精度地推断在第1推断样本面Q1存在的物体,获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像。

[0222] 此外,在上述第6实施方式中,作为检测器15D而使用点检测器154,但可以取代点检测器154,而使用在上述第2实施方式中示出的这种多个点检测器152、在上述第3实施方式中示出的这种具备呈二维排列的多个检测部153的二维检测器。

[0223] [第7实施方式]

[0224] 说明第7实施方式。图20是示出第7实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图20所示,显微镜1H具备显微镜主体10H、图像处理装置100H。显微镜主体10H具备光源11、光学系统12、扫描控制部13、检测器15D。

[0225] 在本实施方式中,在光学系统12设有光学元件17H。光学元件17H将光学系统12切换为第1状态A71或第2状态A72。在本实施方式中,作为光学元件17H而设有针孔构件175A、175B。在针孔构件175A和针孔构件175B中,形成的针孔的尺寸(内径)不同。例如,一方的针孔构件175A的针孔的尺寸比另一方的针孔构件175B的针孔的尺寸小。这种针孔构件175A、175B在集光透镜126与检测器15D之间,能够相对于检测光L2的光路交替进退。

[0226] 光学元件17H构成为能够在针孔构件175A位于检测光L2的光路上的第1状态A71与针孔构件175B位于检测光L2的光路上的第2状态A72之间切换。在第1状态A71与第2状态A72下从针孔通过的检测光L2的光量不同。

[0227] 在针孔构件175A位于检测光L2的光路上的第1状态A71、和针孔构件175B位于检测光L2的光路上的第2状态A72下,经由光学系统12的三维点扩散强度分布不同。

[0228] 图像处理装置100H的生成部102基于在第1状态A71下由检测器15D检测出的光的光量,生成在Z方向上与第1焦平面Fa对应的位置处的样本8的面(第1样本面Sa)的第1图像Ga。生成部102基于在第2状态A72下由检测器15D检测出的光的光量,生成在Z方向上与第2焦平面Fb对应的位置处的样本8的面(第2样本面Sb)的第2图像Gb。

[0229] 图21是示出第7实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布与第2面的二维点扩散强度分布的例子的图。

[0230] 推断部103基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对关系,推断第1推断样本面Q1与第2推断样本面Q2中的样本8的构造。在本实施方式中,推断部103例如与上述第1实施方式同样地,基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对强度,推断第1推断样本面Q1与第2推断样本面Q2中的样本8的构造。

[0231] 根据上述这种显微镜1H、图像处理装置100H,利用光学元件17H将光学系统12切换为第1状态A71与第2状态A72,由此,推断样本8中的包含第1推断样本面Q1在内的多个面各自的构造。其结果为,能够更高精度地推断在第1推断样本面Q1存在的物体,获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像。

[0232] 此外,在上述第7实施方式中,作为检测器15D而使用点检测器154,但也可以取代点检测器154,使用在上述第2实施方式中示出的这种多个点检测器152、在上述第3实施方式中示出的这种具有二维排列的多个检测部153的二维检测器。

[0233] [第8实施方式]

[0234] 说明第8实施方式。图22是示出第8实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图22所示,显微镜1I具备显微镜主体10I、图像处理装置100I。显微镜主体10I具备光源11、光学系统12、扫描控制部13、检测器15D。

[0235] 在本实施方式中,在光学系统12设有光学元件17I。光学元件17I将光学系统12切换为第1状态A81或第2状态A82。在本实施方式中,作为光学元件17I而设有针孔构件176A、176B。针孔构件176A、176B在集光透镜126与检测器15D之间被设定为相对于检测光L2的光路能够交替进退。关于针孔构件176A和针孔构件176B,所形成的针孔的形状不同。例如,一方的针孔构件176A的针孔的形状例如为形成于检测光L2的光路的中心部的圆形。另一方的针孔构件176B的针孔的形状例如为相对于检测光L2的光路的中心部在径向外侧形成的圆环状(所谓的环形针孔)。此外,关于针孔构件176A和针孔构件176B,只要所形成的针孔的形状不同即可,也可以将各自的针孔形状适当变更为其他形状。

[0236] 光学元件17I构成为能够在针孔构件176A位于检测光L2的光路上的第1状态A81与针孔构件176B位于检测光L2的光路上的第2状态A82之间切换。在第1状态A81与第2状态A82下,从针孔通过的检测光L2的光量不同,经由光学系统12的三维点扩散强度分布(3D-PSF)不同。第1状态A81的三维点扩散强度分布与第2状态A82的三维点扩散强度分布在Z方向上的轮廓不同。

[0237] 在图像处理装置100I中,利用光学元件17I将光学系统12切换为第1状态A81或第2状态A82,由此,推断样本8中的包含第1推断样本面Q1在内的多个面各自的构造。其结果为,能够高精度地推断在1推断样本面Q1存在的物体,获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像。

[0238] [第9实施方式]

[0239] 说明第9实施方式。图23是示出第9实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图23所示,显微镜1J具备显微镜主体10J、图像处理装置100J。在本实施方式中,显微镜主体10J具备光源21、将来自光源21的照明光L11照射至样本8照明光学系统22、检测器25J。

[0240] (显微镜主体的构成)

[0241] 光源21发出激光等的照明光L11。光源21可以为单色(单一波长)的光源,也可以为多色(多个波长)的光源。光源21可以为射出连续振荡光的激光器、或者射出脉冲光的激光器的某一方。另外,光源21也可以不为激光器,可以为LED或灯。在作为样本8而使用发出荧

光的物质的情况下,作为光源21的波长,优选激发样本8所包含的荧光物质的波长。在作为样本8使用发出荧光的物质的情况下,作为光源21的波长,可以选择对样本8所包含的荧光物质进行多光子激发的波长。光源21能够更换地(能够安装、能够拆卸)设于显微镜主体10J。光源21可以在利用显微镜主体10J进行观察时等外接至显微镜主体10J。在该情况下,例如,也可以从显微镜主体10J的外部的光源21经由光纤等的既存的光学构件使照明光L11入射至显微镜主体10J内。

[0242] 光学系统22将来自光源21的照明光L11照射至样本8,并且将来自样本8的检测光导向检测器25J。在本实施方式中,光学系统22具备准直透镜220、物镜221、投影224、光路分离元件225、成像投影223等。准直透镜220将从激光器等的光源21发出的照明光L11转换为大致平行光。投影224一边使大致平行光集束一边导向光路分离元件225。光路分离元件225由二向色镜等构成。光路分离元件225将从投影224通过的照明光L11导向物镜221。

[0243] 物镜221将入射来的照明光L11一并照射至在载物台2上保持的样本8上。通过照明光L11的照射从样本8发出的光(检测光)L22入射至物镜221。检测光L22经由物镜221、光路分离元件225、成像投影223入射至检测器25J。

[0244] 检测器25J配置在隔着检测光学系统与样本8上的照明光L11的照明区域共轭的位置。在检测器25J的受光面上形成有由照明光L11激发的样本8的荧光的像25m。检测器25J检测在检测器25J的受光面上形成的像25m的光。在本实施方式中,检测器25J将多个检测部251二维排列来构成。检测部251具备由半导体等构成的光电转换元件(未图示)。检测器25J的受光面接收像25m的光。构成检测器25J的多个检测部251各自将与接收的光的光量对应的信号(电信号)输出至图像处理装置100J。

[0245] 在本实施方式中,在光学系统22设有光学元件27J。光学元件27J将光学系统22切换为第1状态A91或第2状态A92。在本实施方式中,作为光学元件27J而设有光圈271。光圈271在光路分离元件225与成像投影223之间,配置在物镜221的光瞳的共轭位置附近。也可以配置中继光学系统,且将其配置在光瞳共轭位置。光圈271构成为通过改变孔径,能够在第1状态A91与第2状态A92之间进行切换。在第1状态A91下,将光圈271的孔径增大至比第2状态A92大。

[0246] 若在第1状态A91和第2状态A92下光圈271的孔径不同,则经由光学系统22的三维点扩散强度分布(3D-PSF)不同。在第1状态A91与第2状态A92之间,经由光学系统22的三维点扩散强度分布不同。

[0247] 图像处理装置100J基于来自多个检测部251各自的信号生成样本8的图像,对图像进行处理。图像处理装置100J由个人计算机等的处理装置构成。图像处理装置100J具备CPU、存储器等的硬件。图像处理装置100J通过CPU或存储器等与在存储器或存储装置中存储的图像处理程序协作来执行规定的处理,在功能行具有以下示出的这种构成。

[0248] (图像处理装置的构成)

[0249] 图像处理装置100J包括信号接收部101、生成部102、推断部103,各功能与在第1实施方式中说明的相同,也在本实施方式中应用。

[0250] (关于多个面的二维点扩散强度分布的相对关系)

[0251] 图24是示出第9实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的例子的图。在本实施方

式中,在第1状态A91与第2状态A92之间,第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对关系(位置、形状、强度)不同。即,如图24所示,基于第1状态A91的光学系统22的第1三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布H91a与第2面P2的二维点扩散强度分布H92a的第1相对关系不同于基于光圈271的开度与第1状态A91不同的第2状态A92的光学系统22的第2三维点扩散强度分布中的、第1面P1的二维点扩散强度分布H91b与第2面P2的二维点扩散强度分布之间的第2相对关系。

[0252] 根据上述这种显微镜1J、图像处理装置100J,在具有宽视场的光学系统22的显微镜1J中,通过使光圈271的开度不同,也获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像。

[0253] [第10实施方式]

[0254] 说明第10实施方式。图25是示出第10实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图25所示,显微镜1K具有显微镜主体10K、与图像处理装置100K。在本实施方式中,显微镜主体10K具备光源21、将来自光源21的照明光L11一并照射至样本8的照明光学系统22、检测器25J。

[0255] 在本实施方式中,在光学系统22设有光学元件27K。光学元件27K将光学系统22切换为第1状态A93或第2状态A94。在本实施方式中,作为光学元件27K而设有光圈272。光圈272在光路分离元件225与成像投影223之间配置在物镜221的光瞳的共轭位置附近。也可以配置中继光学系统,将其配置在光瞳共轭位置。光圈272被设为能够将孔径保持固定地在与检测光L22的光轴方向(Z方向)正交的方向上移动。光圈272通过在与光轴方向正交的方向上改变位置,对第1状态A93与第2状态A94进行切换。例如,在第1状态A93下将光圈272配置在光轴中心,在第2状态A94下使光圈272从光轴中心向与光轴方向(Z方向)正交的方向错开。

[0256] 在第1状态A93和第2状态A94下,通过使光圈272的位置不同,使经由光学系统22的三维点扩散强度分布(3D-PSF)不同。在光圈272位于光轴中心的第1状态A93、和光圈272与检测光L22的光轴中心错开配置的第2状态A94下,经由光学系统22的三维点扩散强度分布不同。各检测部251在与光轴方向正交的平面中的多个位置分别检测像25m的光量。第2状态A94的三维点扩散强度分布相对于第1状态A93的三维点扩散强度分布倾斜。

[0257] 图像处理装置100K的生成部102基于在第1状态A93下由检测器25J检测出的光的光量,生成在Z方向上与第1焦平面Fa对应的位置处的样本8的面的第1图像Ga。生成部102基于在第2状态A94下由检测器25J检测出的光的光量,生成在Z方向上与第2焦平面Fb对应的位置处的样本8的面的第2图像Gb。

[0258] 图26是示出第10实施方式第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面的二维点扩散强度分布、与第2面的二维点扩散强度分布的图。

[0259] 推断部103与上述第9实施方式同样地,基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对关系,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。在本实施方式中,推断部103例如基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布的相对位置,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。

[0260] 根据上述这种显微镜1K、图像处理装置100K,在具有宽视场的光学系统22的显微

镜1K中,通过使光圈272相对于光轴的位置不同,获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像。

[0261] 此外,在上述第10实施方式中,作为光学元件27K而具备光圈272,但也可以取而代之,使棱镜、相位板、柱面透镜相对于检测光L22的光轴移动,或者相对于检测光L22的光路进退。

[0262] [第11实施方式]

[0263] 说明第11实施方式。图27是示出第11实施方式的显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图27所示,显微镜1L具有显微镜主体10L、图像处理装置100L。在本实施方式中,显微镜主体10L为全息显微镜,具备光源31、光学系统32、检测器35L。

[0264] 光源31发出激光器等的照明光L31。光学系统32将来自光源31的照明光L31照射至样本8,并且将来自样本8的透射光L33导向检测器35L。在本实施方式中,光学系统32具备分束器321、投影322、偏转部323、半反射镜324、移相镜325、合束器327、投影328等。

[0265] 光学系统32将来自光源31的照明光L31的一部分经由分束器321照射至样本8。透射了样本8的光(透射光)L33经由偏转部323而入射至合束器327。照明光L31的剩余的光经由分束器321,并作为参照光L34经由半反射镜324、移相镜325并入射至合束器327。在合束器327,因透射光L33和参照光L34而产生干涉,该干涉光作为检测光L32而入射至检测器35L。

[0266] 在检测器35L的受光面上形成有基于检测光L32的、干涉条纹图案35m。检测器35L检测在检测器35L的受光面上形成的干涉条纹图案35m的光。在本实施方式中,检测器35L构成为二维排列多个检测部351。检测部351具备由半导体等构成的光电转换元件(未图示)。检测器35L的受光面接收干涉条纹图案35m的光。构成检测器35L的多个检测部351分别将与接收的光的强度对应的信号(电信号)输出至图像处理装置100L。使移相镜在光轴方向上位移来获取多张图像,使用相位位移法等进行解析,由此,能够复原透射光L33的复振幅分布。在该分布反映了样本8的复折射率的信息,因此,也可以说是样本8的图像。

[0267] 在本实施方式中,在光学系统32设有光学元件37L。光学元件37L将光学系统32切换为第1状态A101或第2状态A102。在本实施方式中,作为光学元件37L而设有相位板371。相位板371被设为相对于检测光L32的光路能够进退。光学元件37L构成为能够在光学元件37L位于检测光L32的光路的外部的第1状态A101、与光学元件37L进入至检测光L32的光路的第2状态A102之间切换。在相位板371进入至检测光L32的光路的第2状态A102下,检测光L32的相位变化。作为相位板371,例如能够使用相对于检测光L32生成螺旋状的三维点扩散振幅分布的相位板。

[0268] 在相位板371位于检测光L32的光路外的第1状态A101、和相位板371位于检测光L32的光路上的第2状态A102下,基于光学系统32的点扩散振幅分布不同。

[0269] 图像处理装置100L基于来自多个检测部351各自的信号生成样本8的图像,对图像进行处理。图像处理装置100L由个人计算机等的处理装置构成。图像处理装置100L具备CPU、存储器等的硬件。图像处理装置100L通过CPU或存储器等与在存储器或存储装置内存储的图像处理程序协作来执行规定的处理,在功能上具有以下示出的这种构成。

[0270] (图像处理装置的构成)

[0271] 图像处理装置100L在功能上包括信号接收部101、生成部102、推断部103。信号接收部101接收从多个检测部351输出的、与干涉条纹图案35m的光的强度对应的信号。生成部102基于来自多个检测部351的信号,生成光学系统32中的焦平面F的图像。

[0272] 生成部102在第1状态A101、第2状态A102的各个状态下基于各检测部351检测出的光的强度,生成多个样本8的图像G。生成部102基于在第1状态A101下由检测部351检测出的光的强度,生成在Z方向上与焦平面F对应的位置处的样本8的第1图像Ga。生成部102基于由第2状态A102的检测部351检测出的光的强度,生成在Z方向上与第2焦平面Fb对应的位置处的样本8的第2图像Gb。

[0273] 图28是示出第11实施方式的第1状态的光学系统、第2状态的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散振幅分布与第2面P2的二维点扩散振幅分布的图。推断部103算出或者事先存储各个状态的光学系统的三维点扩散振幅分布中的、第1面P1、第2面P2的二维点扩散振幅分布来作为二维图像。如图28所示,在前述的各个状态的光学系统的三维点扩散振幅分布 $h'(x, y, z)$ 中,将在将z坐标设为第1面P1的z坐标($z = z_1$)时的点扩散振幅分布 $h'(x, y, z_1)$ 设为第1面P1的二维点扩散振幅分布H101。另外,将在将z坐标设为第2面P2的z坐标($z = z_2$)时的点扩散振幅分布 $h'(x, y, z_2)$ 设为第2面P2的二维点扩散振幅分布图像H102。

[0274] 推断部103基于第1面P1的二维点扩散振幅分布、和第2面P2的二维点扩散振幅分布的相对关系,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。在本实施方式中,推断部103例如基于第1面P1的二维点扩散振幅分布、和第2面P2的二维点扩散振幅分布的相对位置,推断第1推断样本面Q1和第2推断样本面Q2中的样本8的构造。

[0275] 根据上述这种显微镜1L、图像处理装置100L,在全息式的显微镜1L中,通过使用相位板371,获得Z分辨率/切片能力得到提高的推断图像。

[0276] [第12实施方式]

[0277] 说明第12实施方式。图29是示出第12实施方式的扫描型显微镜的构成的一例的概略图。在本实施方式中,关于与上述的实施方式同样的构成,标注相同的附图标记且有时省略或者简化对其进行的说明。如图29所示,显微镜1M具备显微镜主体10M、图像处理装置100M。显微镜主体10M具备光源11、光学系统12、扫描控制部13、载物台移动机构18、检测器15C。载物台移动机构18使保持样本8的载物台2升降。载物台移动机构18使保持样本8的载物台2在光轴方向(Z方向)上移动。此时,利用载物台移动机构18使样本8在光轴方向上移动,由此,光学系统12相对于样本8的焦平面F的位置变化,但光学系统12自身的焦平面F的位置不变。

[0278] 图30是示出第12实施方式的由生成部生成的多个图像的例子。在本实施方式的显微镜1M中,利用载物台移动机构18使光学系统12的焦平面与光轴方向的位置不同的多个样本面一致,在各自的位置进行基于检测器15C的像15m的光的检测。在显微镜1M中,在第1状态A201的光学系统中的第1焦平面Fa与样本8的第1样本面Sa(例如, $Z = 0\text{nm}$)一致的状态下,获取第1图像Ga。另外,在显微镜1M中,在第2状态A202的光学系统中的第2焦平面Fb与样本8的第2样本面Sb(例如, $Z = 0\text{nm}$)一致的状态下获取第2图像Gb。第1焦平面Fa与第2焦平面Fb在光轴方向(Z方向)中的位置大致一致。

[0279] 另外,在显微镜1M中,利用载物台移动机构18使由载物台2支承的样本8在光轴方向上移动,在第1状态A201的光学系统12中的第1焦平面Fa与样本8的第3样本面Sc(例如,Z

=+400nm)一致的状态下获取第3图像Gc。另外,在显微镜1M中,在第2状态A202的光学系统12中的第2焦平面Fb与样本8的第4样本面Sd(例如,Z=+400nm)一致的状态下获取第4图像Gd。第3样本面Sc以及第4样本面Sd分别与第1样本面Sa以及第2样本面Sb在光轴方向(Z方向)上的位置不同。第3推断样本面位于第3样本面和第4样本面附近。在第1面与第1推断样本面一致的状态时,将与第3推断样本面一致的面设为第3面。

[0280] 推断部103算出或者事先存储获取多张图像G的所有状态的经由光学系统12的三维点扩散强度分布中的、第1面P1、第2面P2、第3面P3(第2面P2位于第1面P1与第3面P3之间)的二维点扩散强度分布。例如,通过将第1推断样本面设为Z=0nm、将第2推断样本面设为Z=200nm、将第3推断样本面设为Z=400nm,能够复原与焦平面一致的样本8的构造(第2推断样本面)。

[0281] 图31是示出第12实施方式的基于由推断部推断出的构造的推断图像的一例的图。推断部103使用多个图像Ga、Gb、Gc、Gd,基于第1面P1中的二维点扩散强度分布与第2面P2中的二维点扩散强度分布之间的相对关系、或者第1面P1中的二维点扩散强度分布与第3面P3中的二维点扩散强度分布之间的相对关系,推断第1推断样本面Q1、第2推断样本面Q2、第3推断样本面Q3中的样本8的构造。

[0282] 此时,期望第1状态A201的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散强度分布和第2面P2的二维点扩散强度分布之间的相对关系、与第2状态A202的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散强度分布和第2面P2的二维点扩散强度分布之间的相对关系(强度、位置、形状)之间存在规定的差异。或者,期望在第1状态A201的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散强度分布和第3面P3的二维点扩散强度分布的相对关系、与第2状态A202的光学系统中的、第1面P1的二维点扩散强度分布和第3面P3的二维点扩散强度分布的相对关系(强度、位置、形状)之间存在规定的差异。

[0283] 与第1实施方式同样地,推断部103对物体的推断能够采用公知的各种算法。在此,例如,使用基于梯度法的算法。由配置于第m个位置的检测部153拍摄到的、三维的拍摄图像Im用下式(14)来表达。

[0284] [数学式17]

$$[0285] \quad I_m = A_m s \cdots (14)$$

[0286] 在此,s为表示三维的荧光分子分布的P维矢量, A_m 为用下式(15)表示的 $N \times P$ 矩阵($N = N_x \times N_y \times N_z$)。

[0287] [数学式18]

$$[0288] \quad [A_m s](x_n, y_n, z_n) = \sum_{p=1}^P s(x_p, y_p, z_p) h_m(x_n - x_p, y_n - y_p, z_n - z_p) \quad (15)$$

[0289] 在此, (x_n, y_n, z_n) 为照明光L1的照明区域14的坐标, (x_p, y_p, z_p) 为样本空间的坐标。 h_m 表示光学系统相对于第m个位置的检测部153的三维点扩散强度分布。

[0290] 推断部103通过将利用下式(16)表达的误差函数F(s)最小化,推断样本8内的荧光分子分布。

[0291] [数学式19]

$$[0292] \quad F(s) = \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N \| (I_m^{mes})_n - (A_m s)_n \|^2 \cdots (16)$$

[0293] 在此, I^{mes} 为利用配置于第 m 个位置的检测器 15A 实际上获取的图像 (N 维矢量)。

[0294] 根据上述这种显微镜 1M、图像处理装置 100M, 使样本 8 在光学系统 12 的光轴方向移动, 使焦平面与多个样本面 S 一致来进行观察, 由此, 能够推断样本 8 的多个推断样本面 $Q1$ 、 $Q3$ 中的构造。而且, 能够推断多个推断样本面 $Q1$ 、 $Q3$ 之间的面内的构造。因此, 能够减少三维拍摄时的拍摄张数, 从而缩短拍摄时间。

[0295] 以上说明了实施方式, 但本发明的技术范围不限于在上述实施方式等中说明的形态。有时省略在上述实施方式等中说明的 1 个以上技术特征。另外, 在上述的实施方式等中说明的技术特征能适当组合。另外, 在法律允许的范围内, 援引在本说明书中引用的所有文献的公开内容来作为本说明书的记载的一部分。

[0296] 附图标记说明

[0297] 1A ~ 1M 显微镜、8 样本、12、22、32 光学系统、15A ~ 15D、25J、35L 检测器、15m、25m、35 像、17D ~ 17I、27J、27K、37L 光学元件、100A ~ 100M 图像处理装置、102 生成部、103 推断部、121 物镜、151、152、154 点检测器、153、251、351 检测部、221 物镜、271、272 光圈、A1、A21、A31、A41、A61、A71、A81、A91、A93、A101、A201 第 1 状态、A2、A22、A32、A42、A62、A72、A82、A92、A94、A102、A202 第 2 状态、F 焦平面、Fa 第 1 焦平面、Fb 第 2 焦平面、G 图像、G1、G11、G21、G201 第 1 位置、G2、G12、G22、G202 第 2 位置、Ga、Gb、Gc、Gd 图像、Ie 推断图像、L1、L11、L31 照明光、L2、L22、L32 检测光、L33 透射光、L34 参照光、P1 第 1 面、P2 第 2 面、 $Q1$ 、 $Q2$ 、 $Q3$ 推断样本面、 S 样本面、Sa 第 1 样本面、Sb 第 2 样本面、Sc 第 3 样本面、Sd 第 4 样本面。

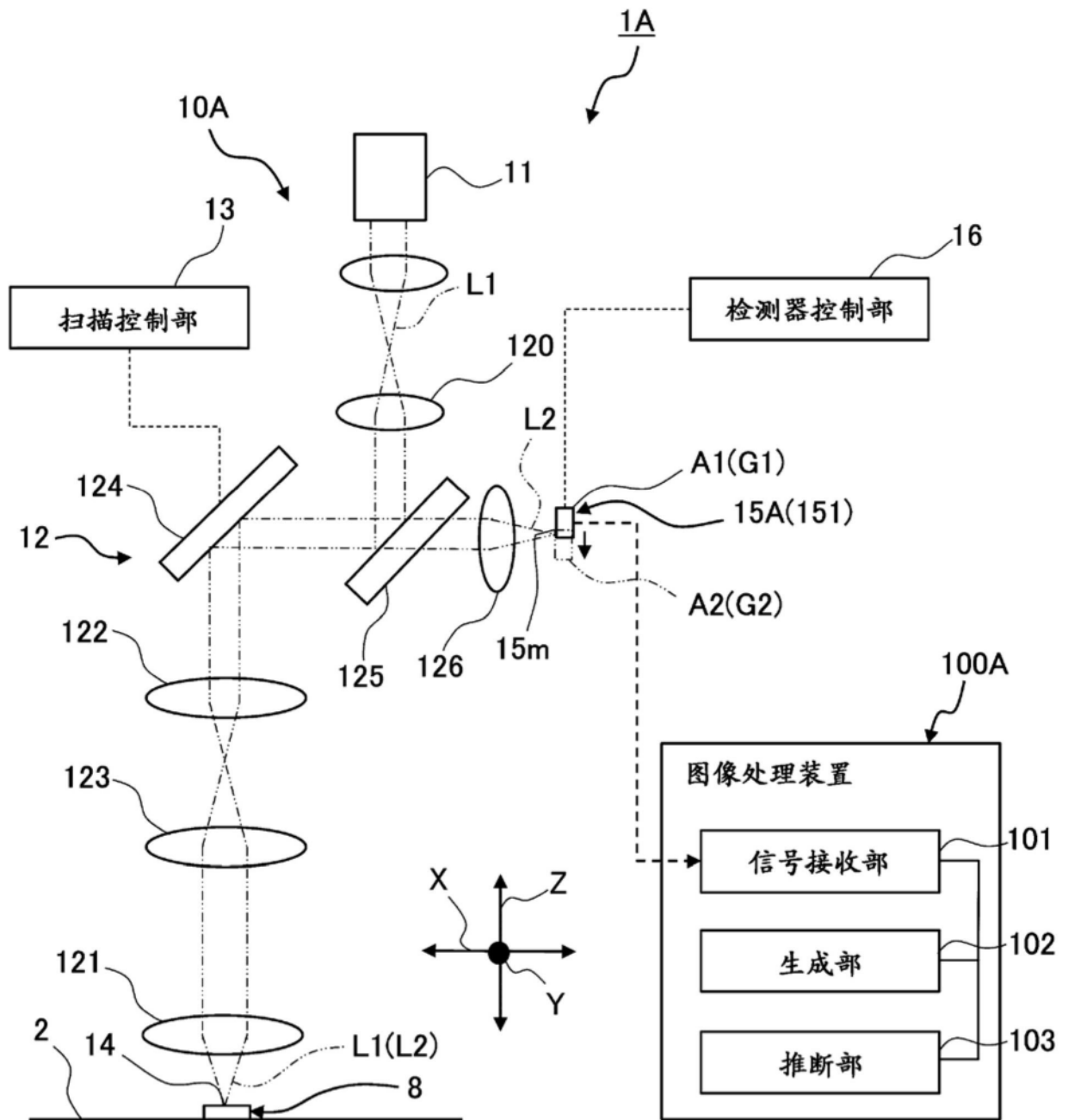


图1

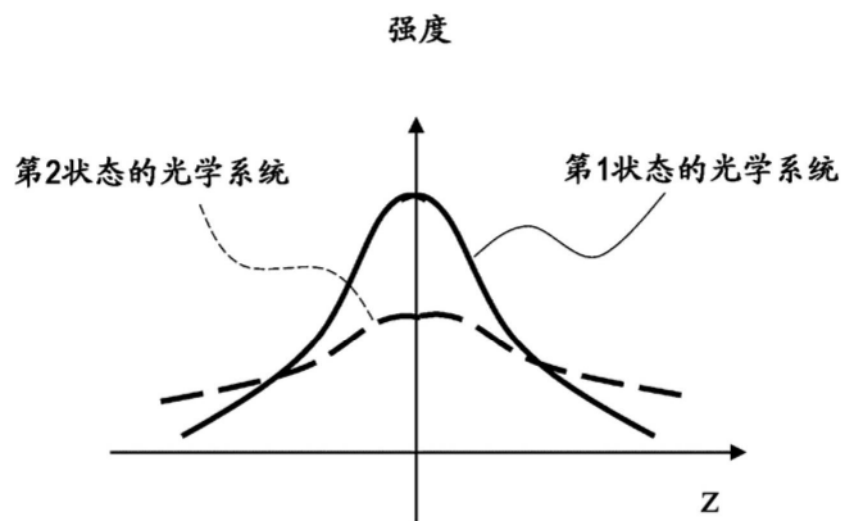


图2

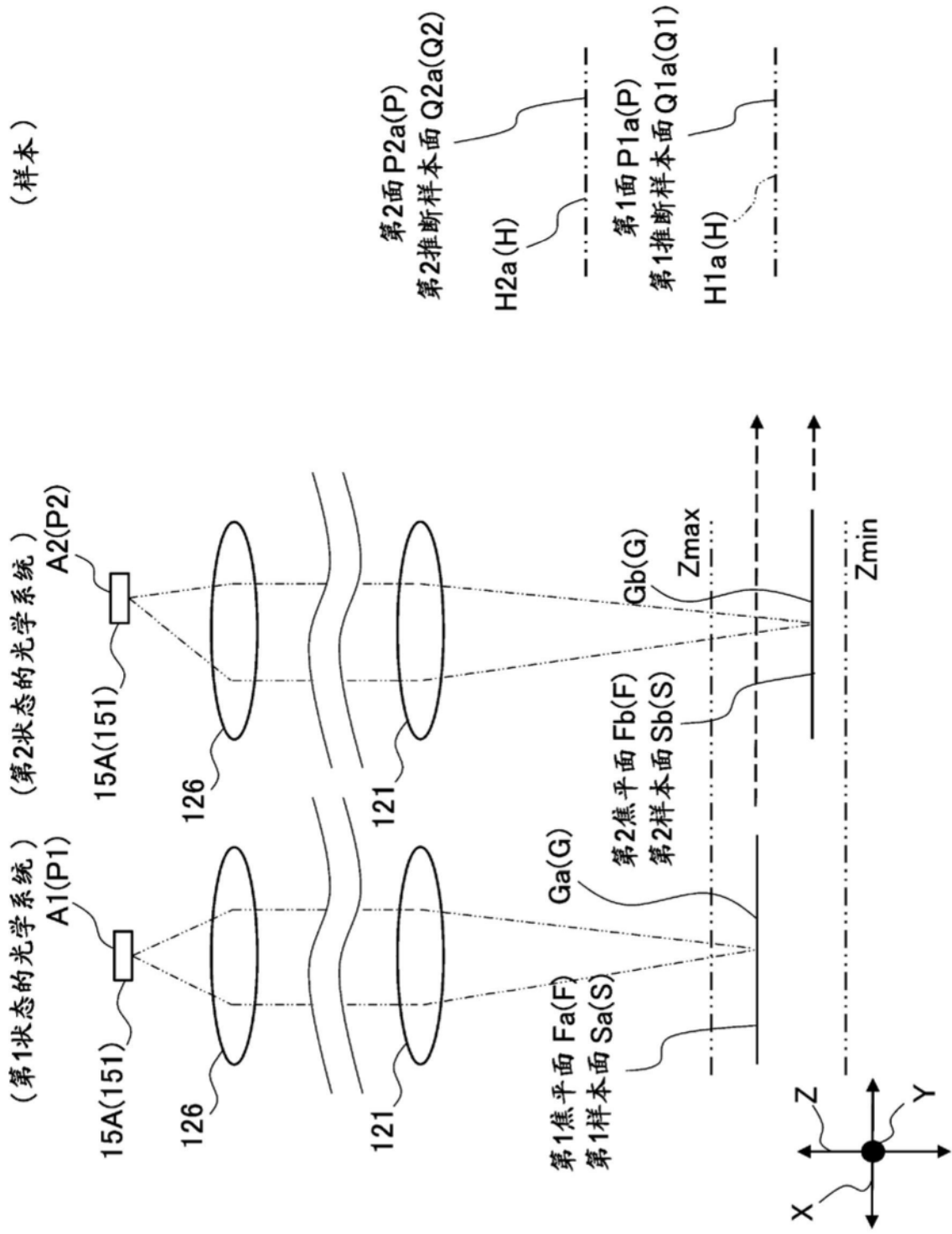


图3

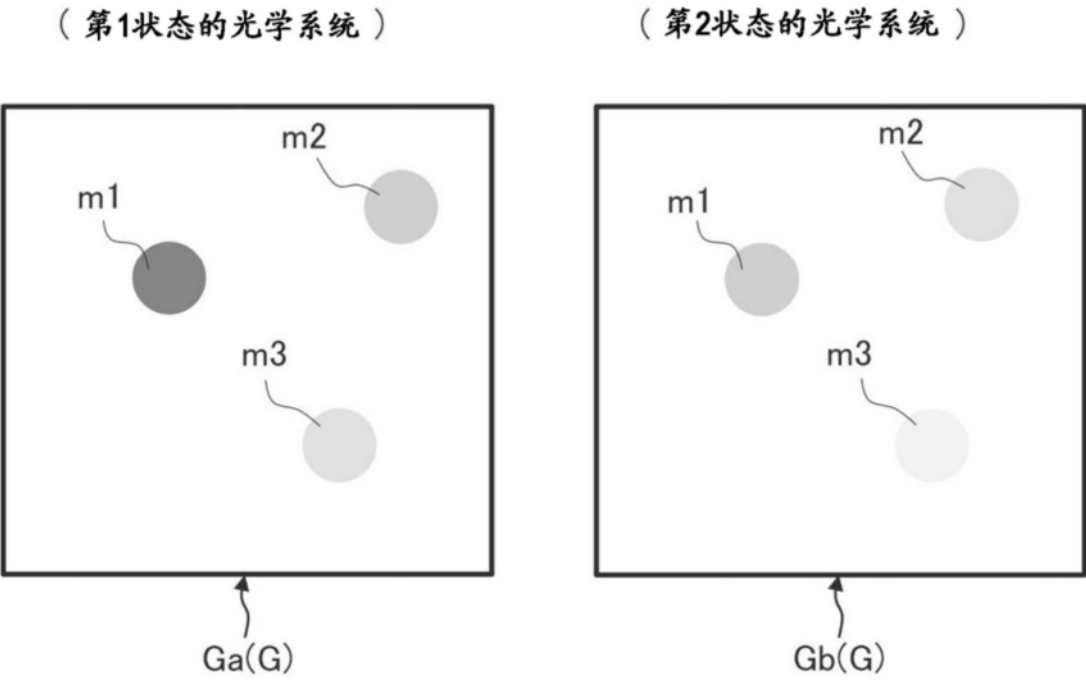


图4

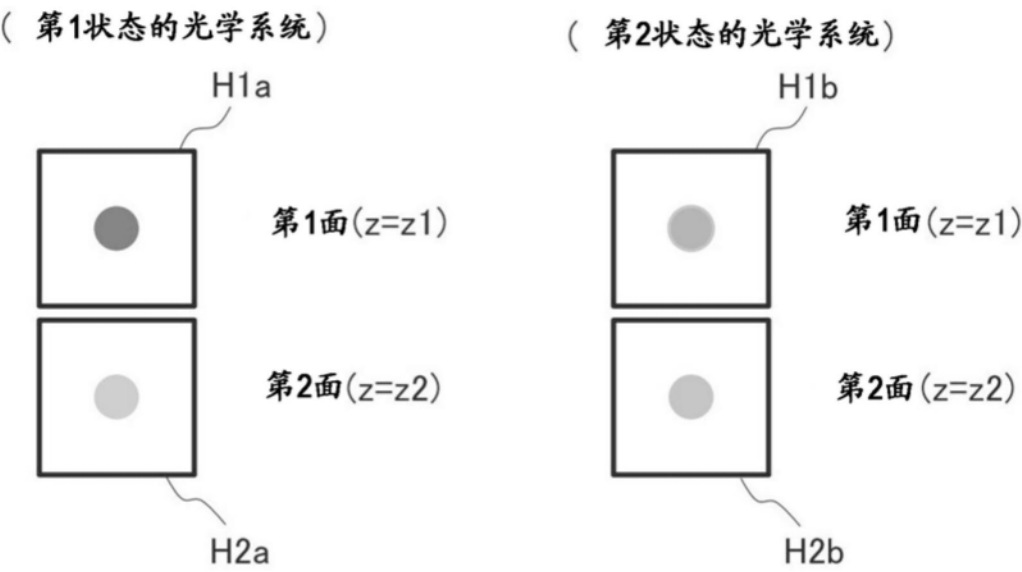


图5

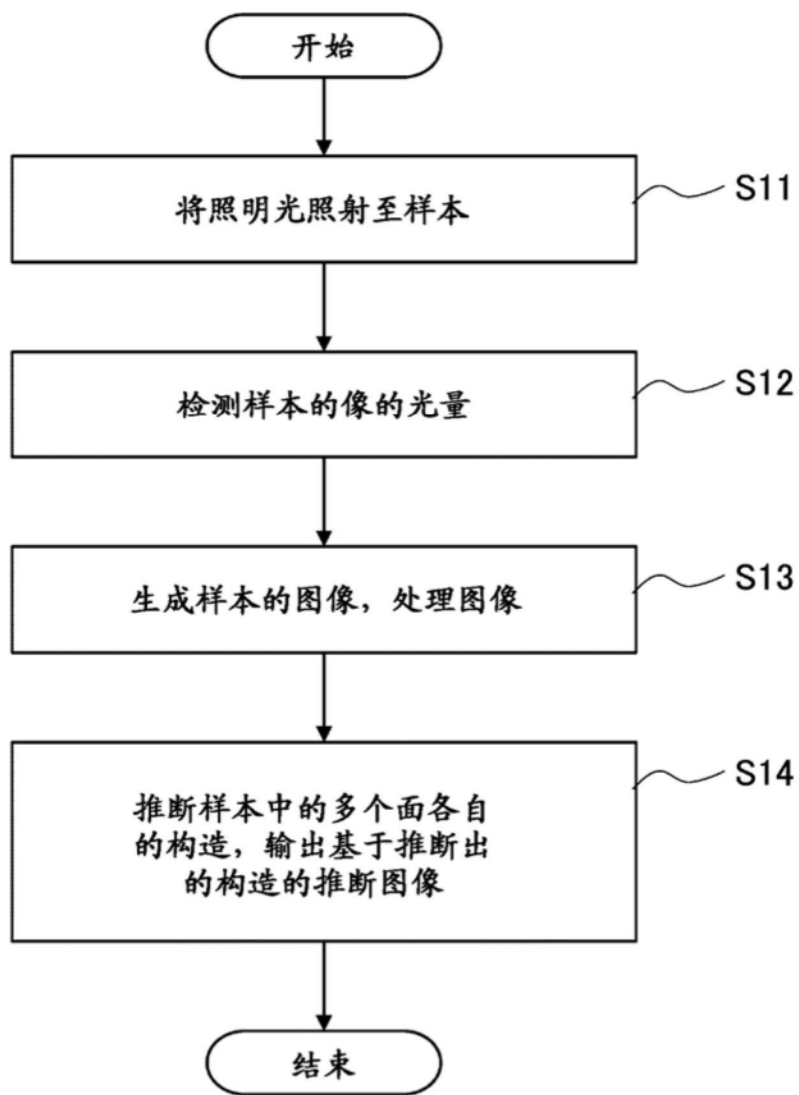


图6

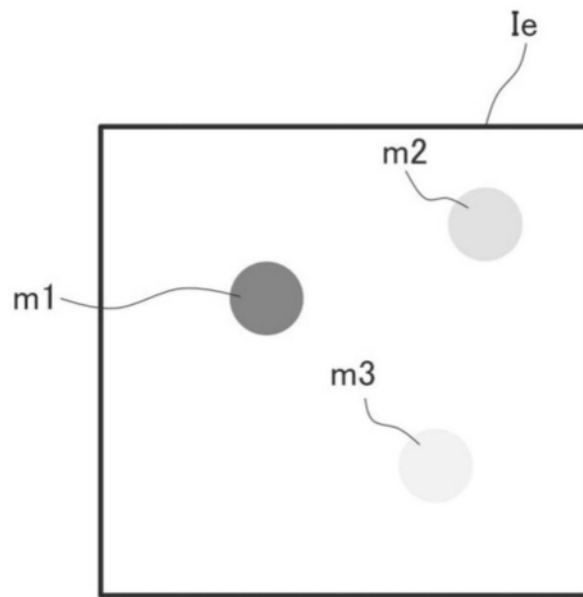


图7

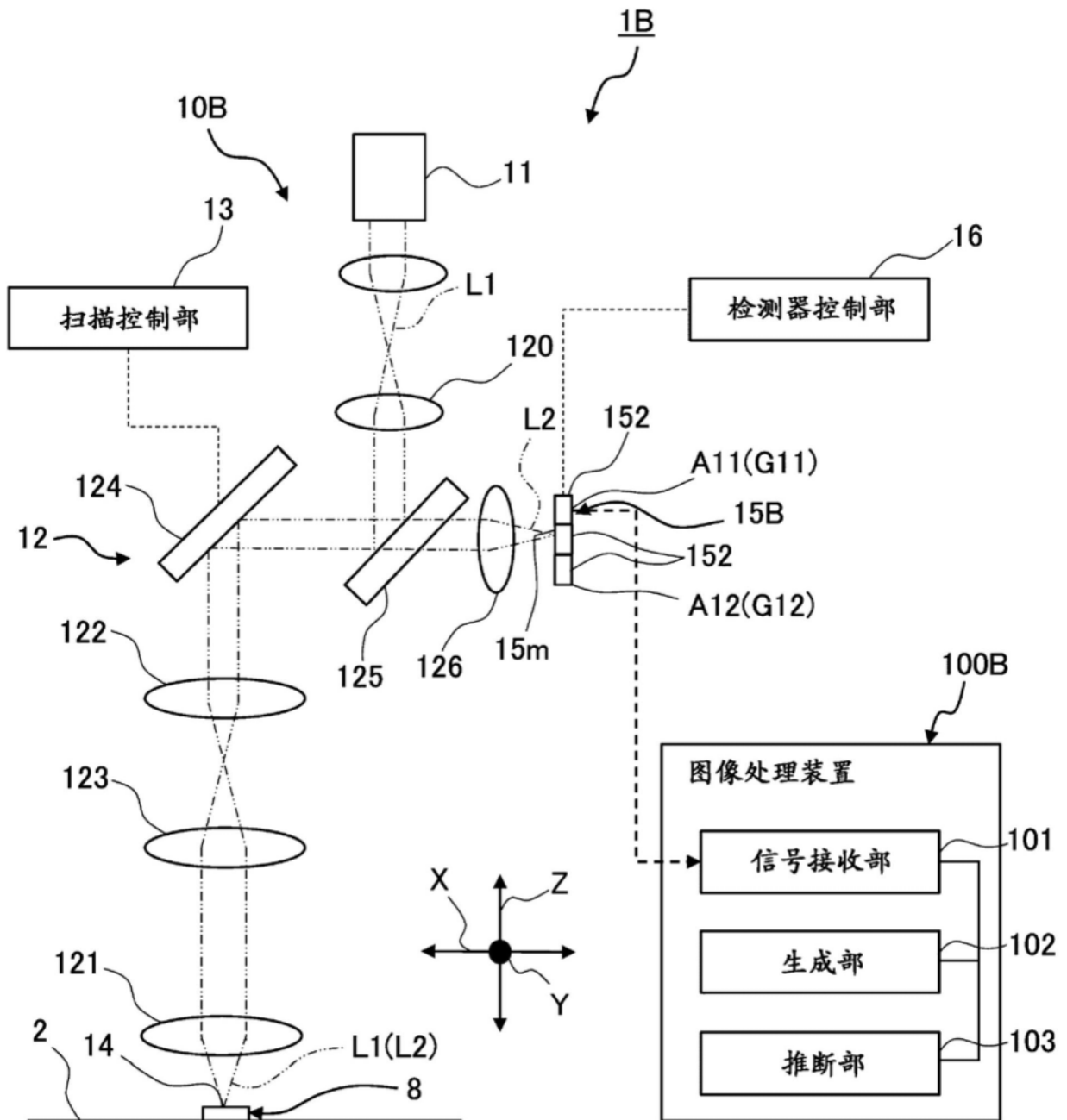


图8

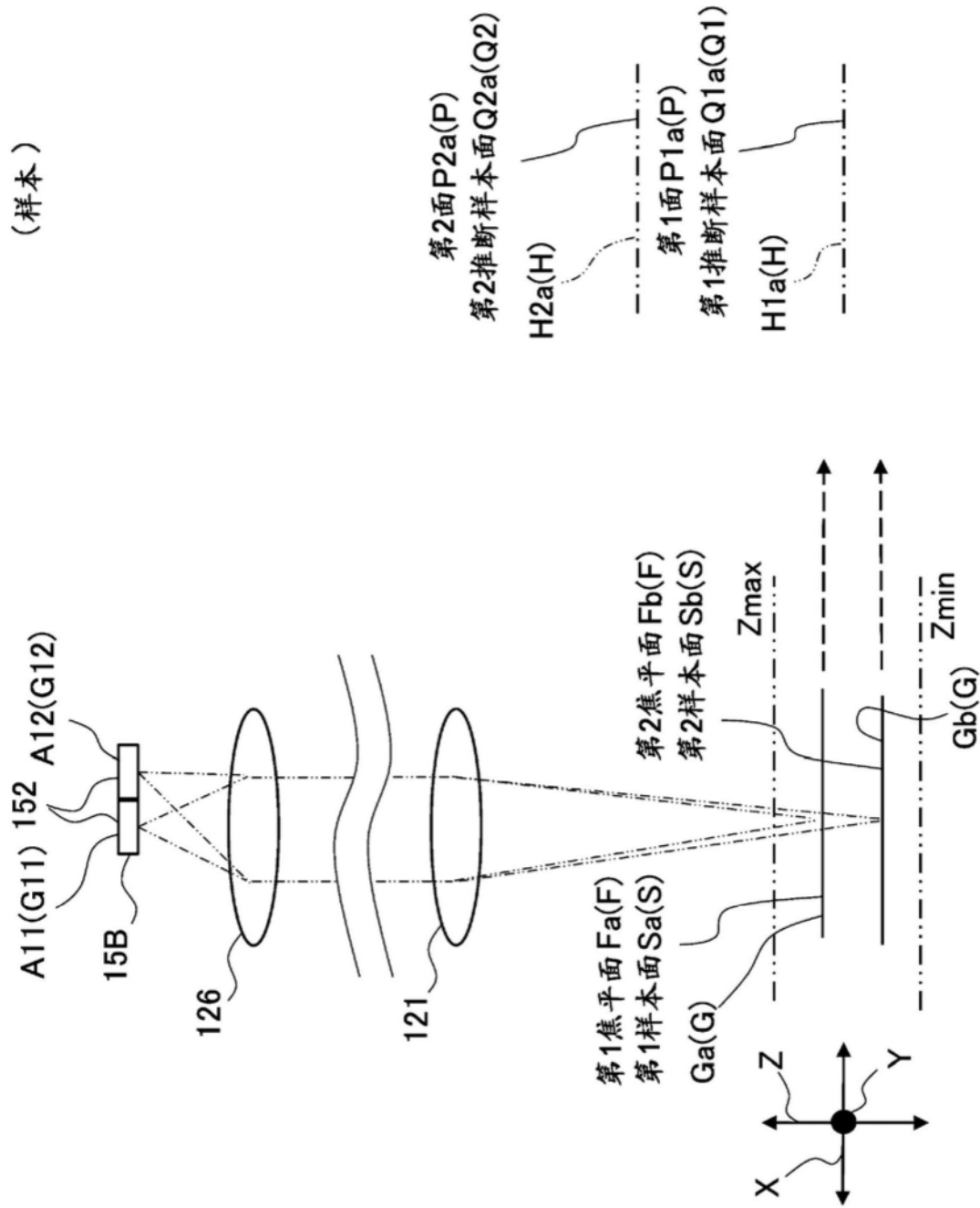


图9

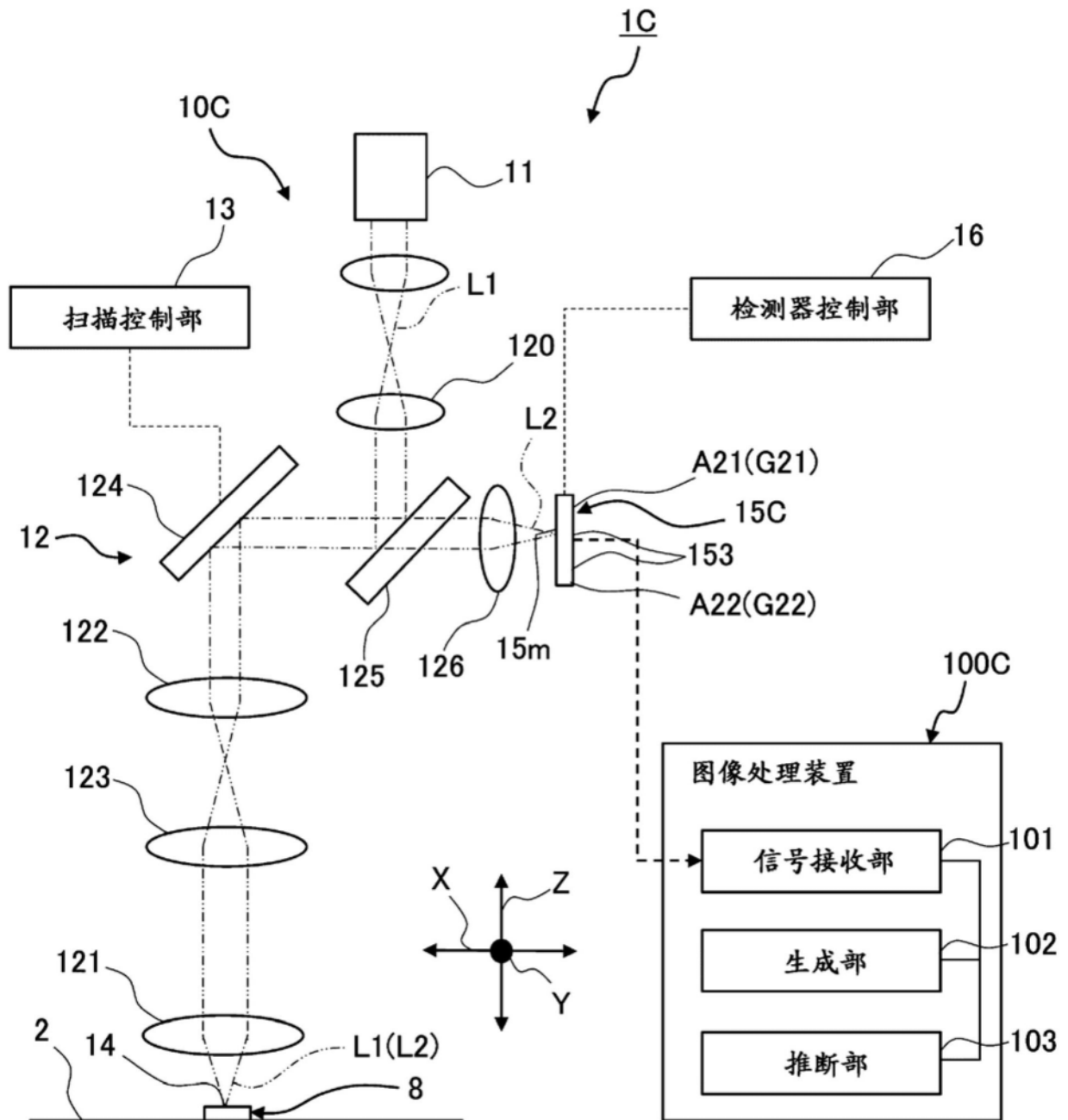


图10

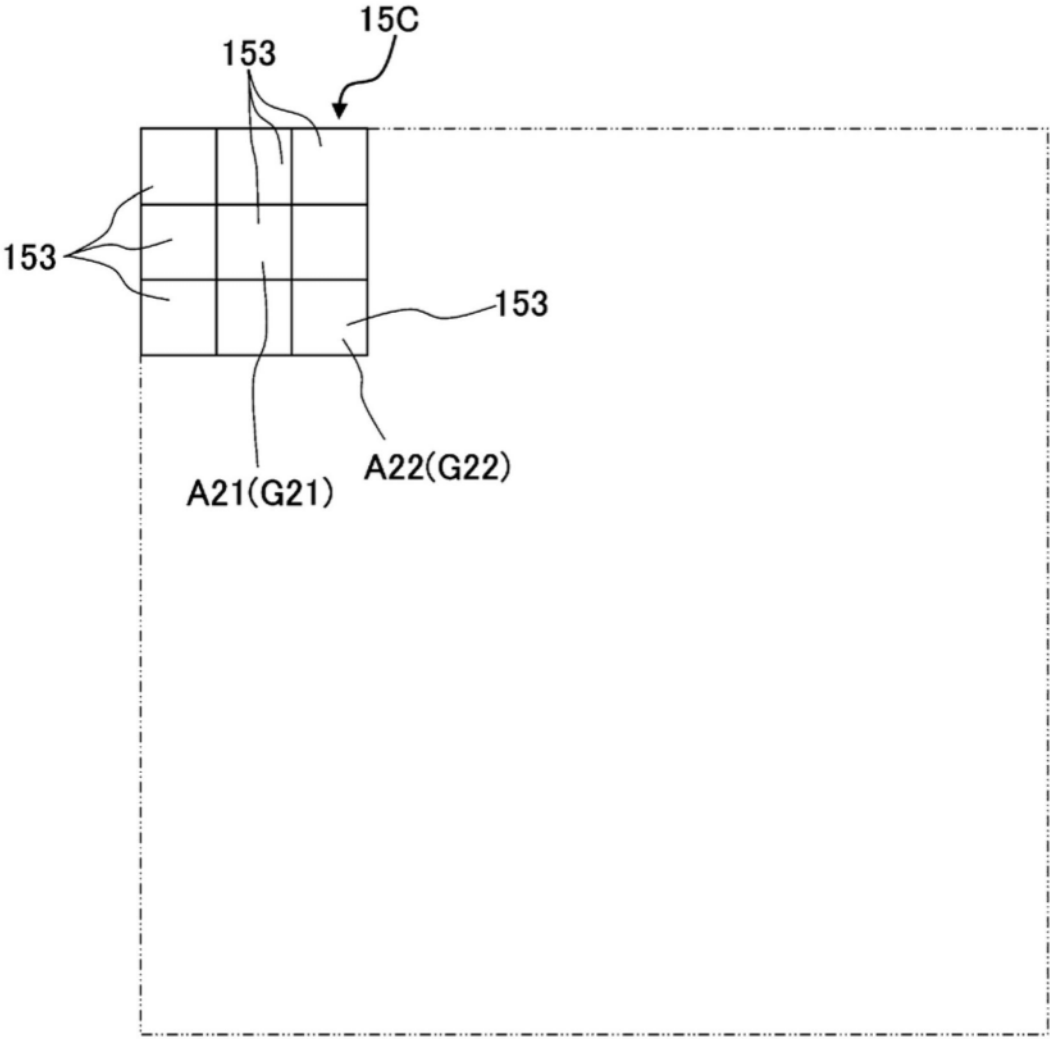


图11

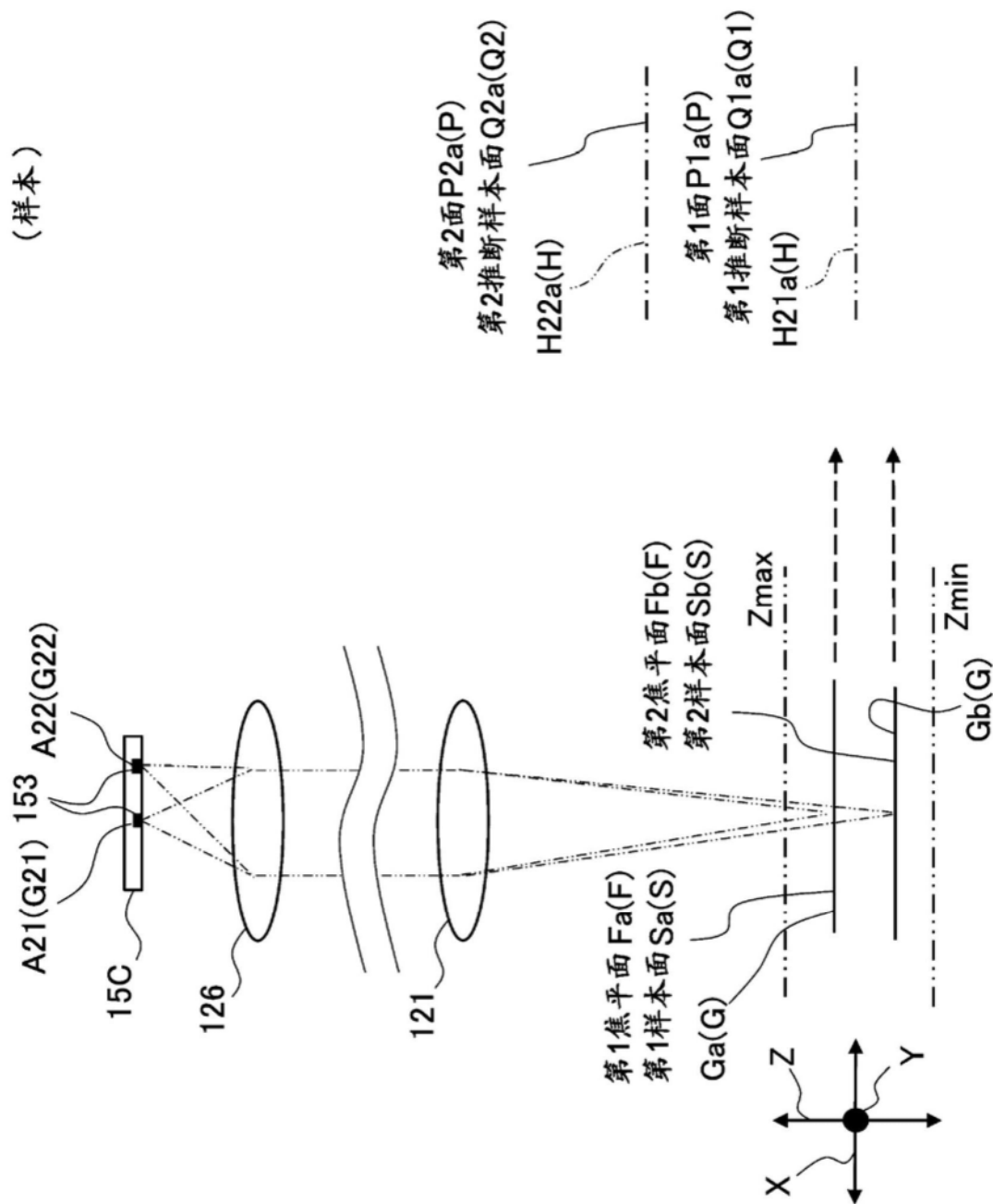


图12

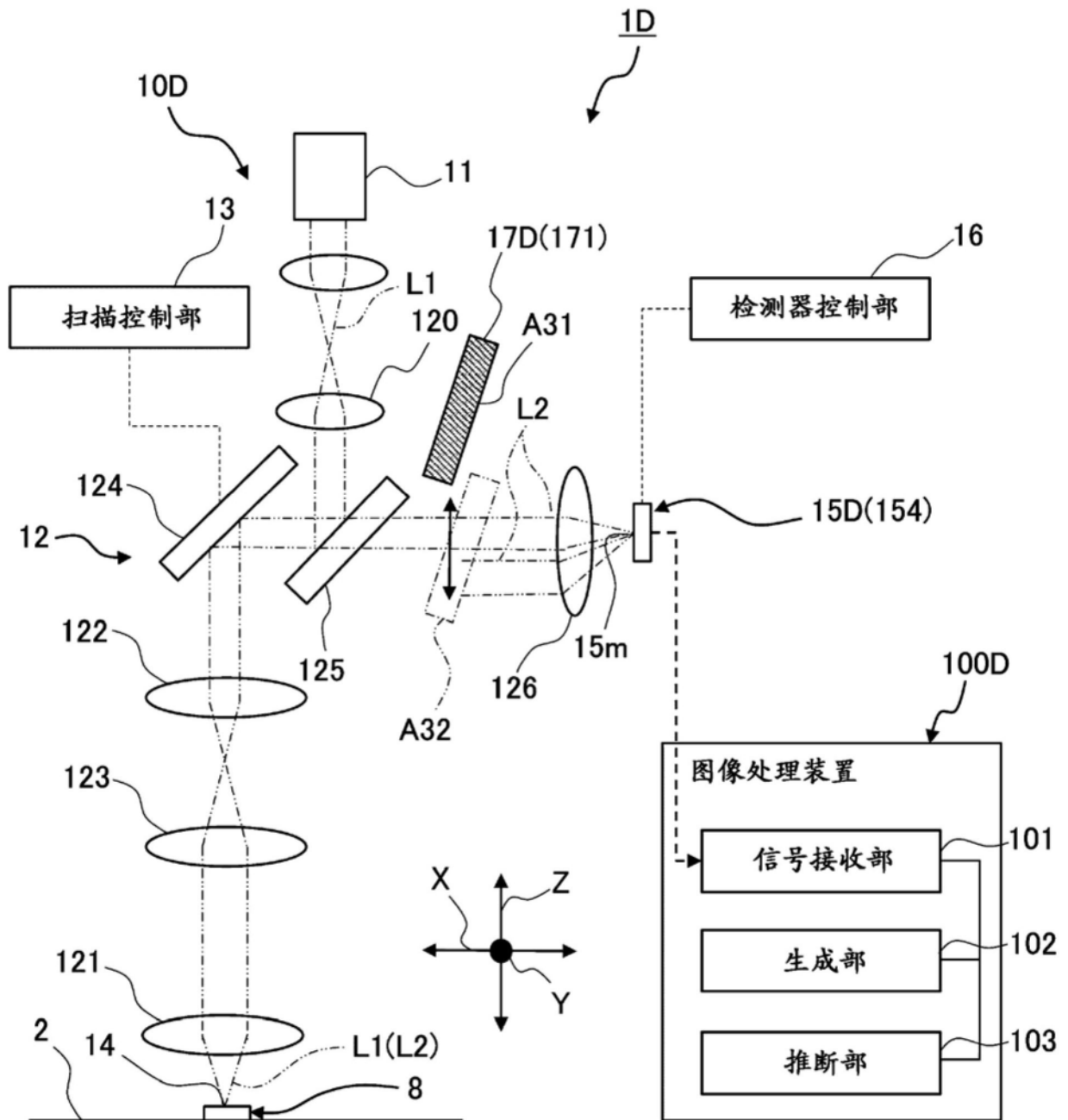


图13

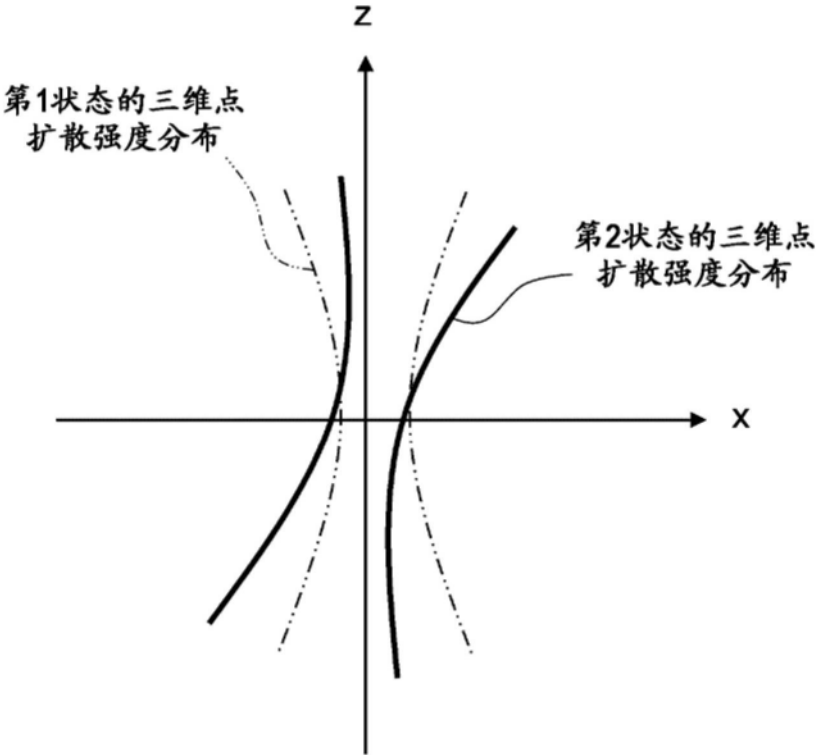


图14

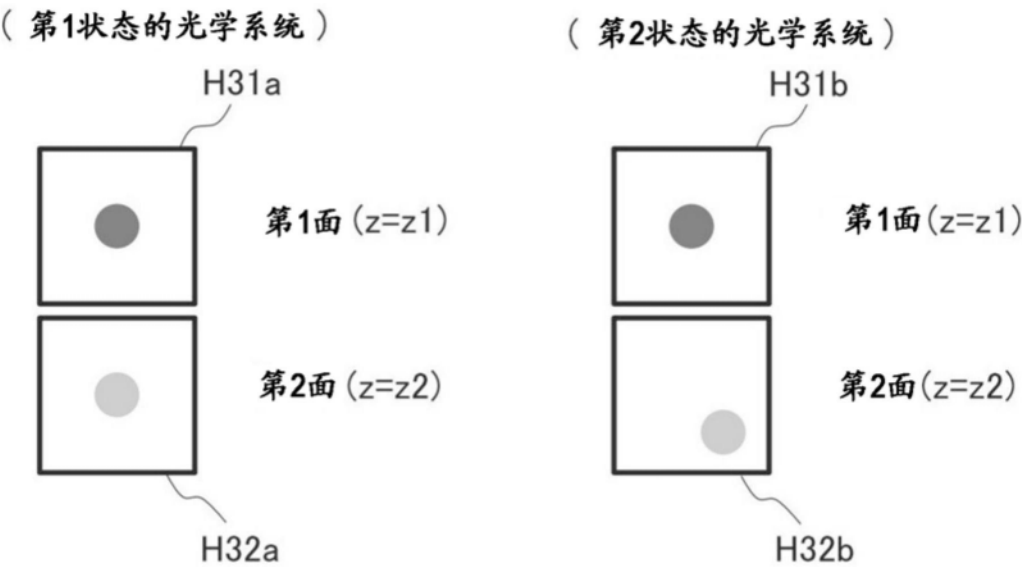


图15

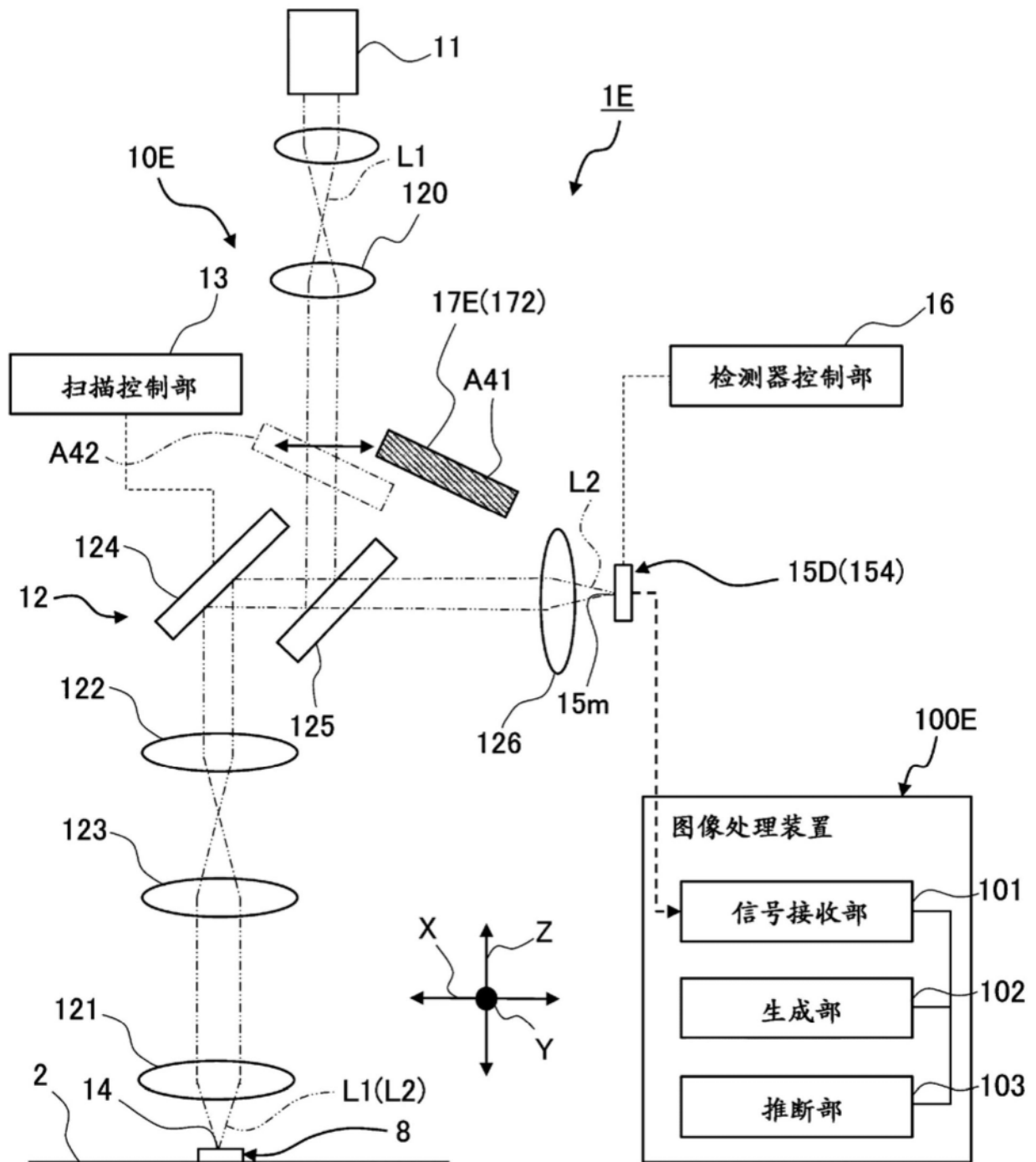


图16

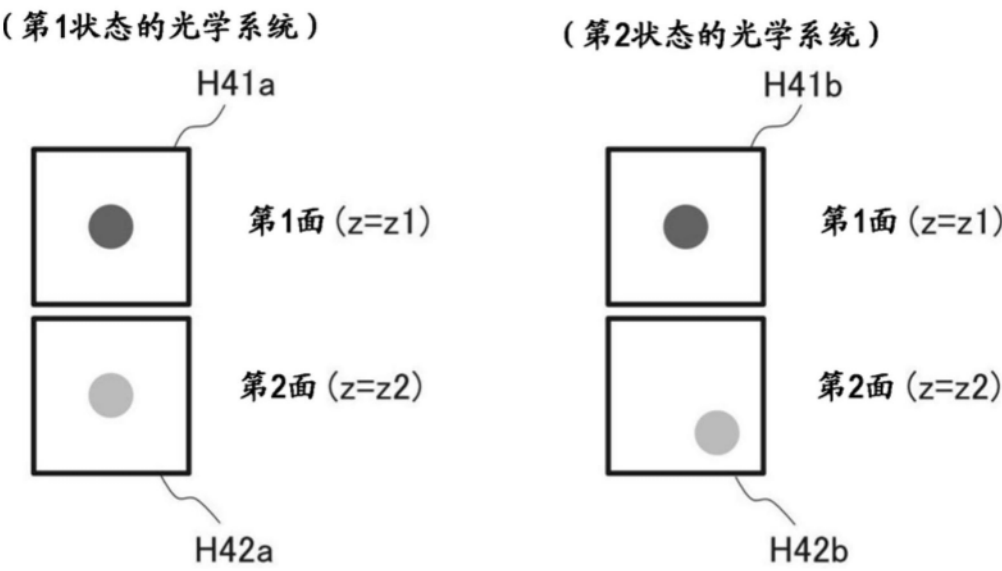


图17

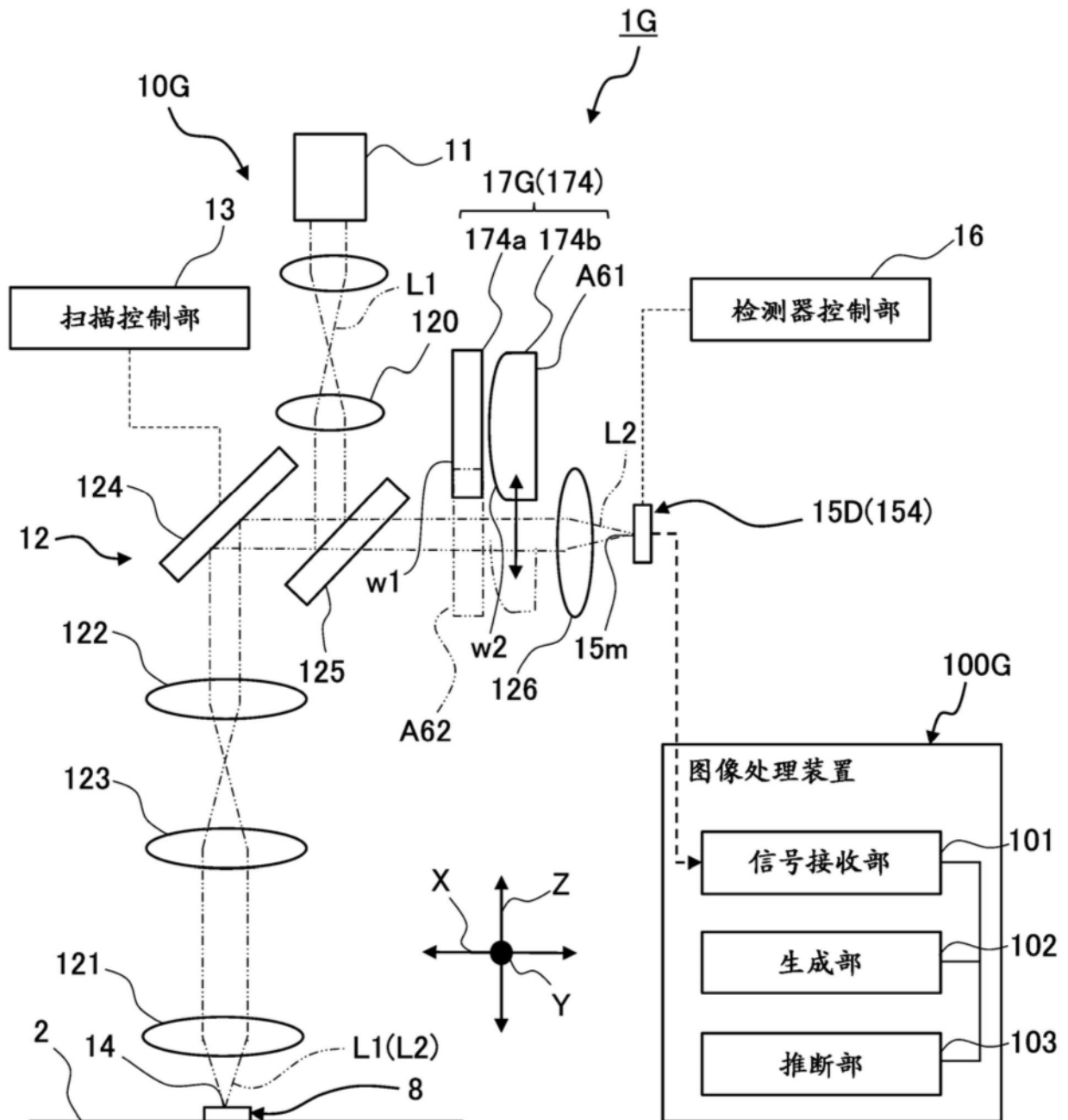


图18

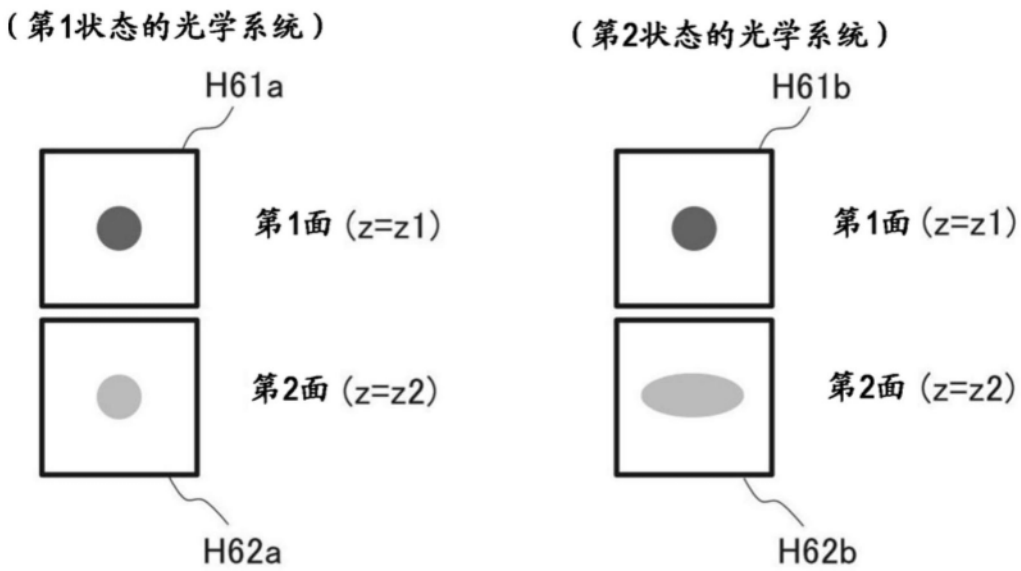


图19

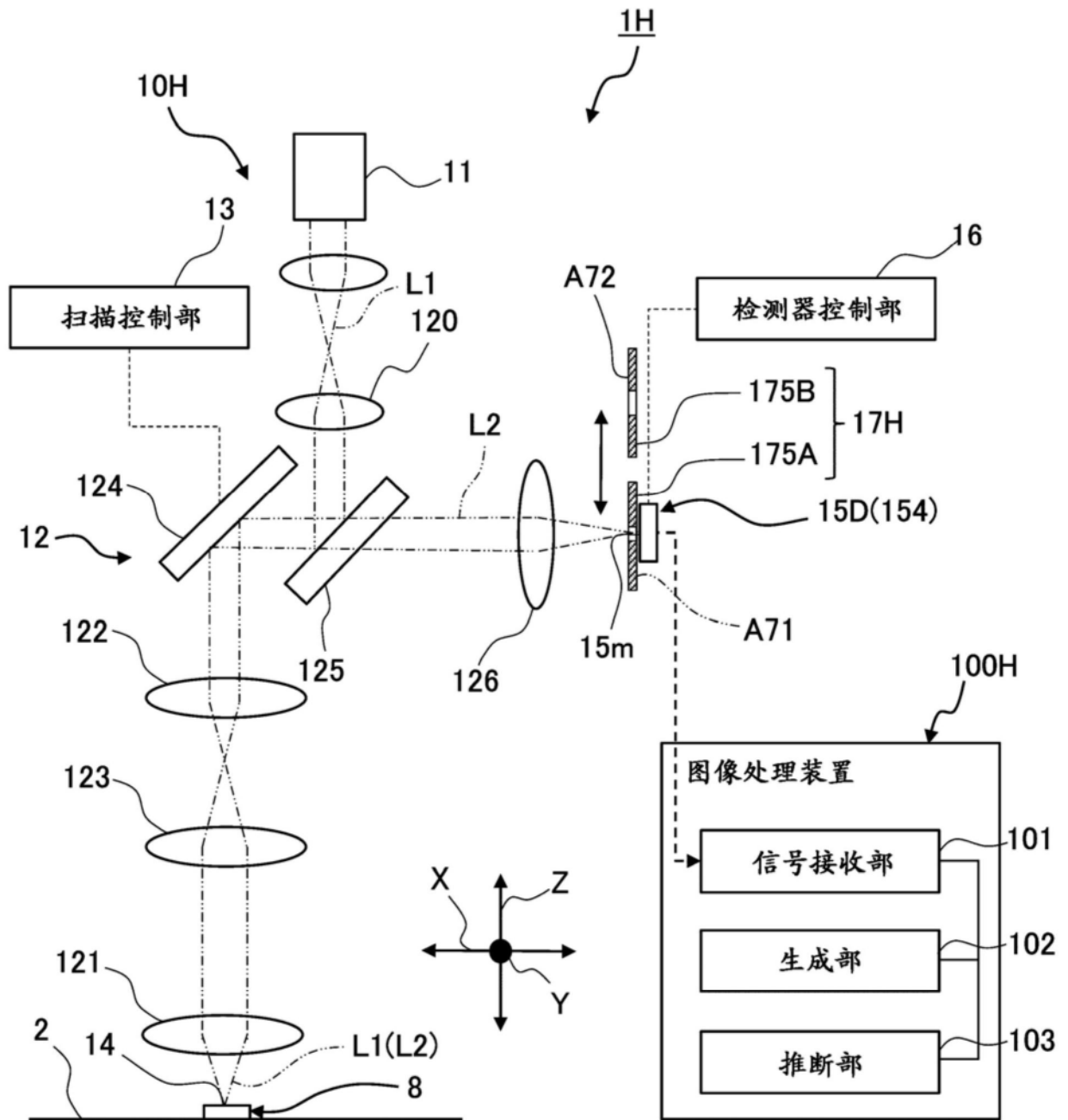


图20

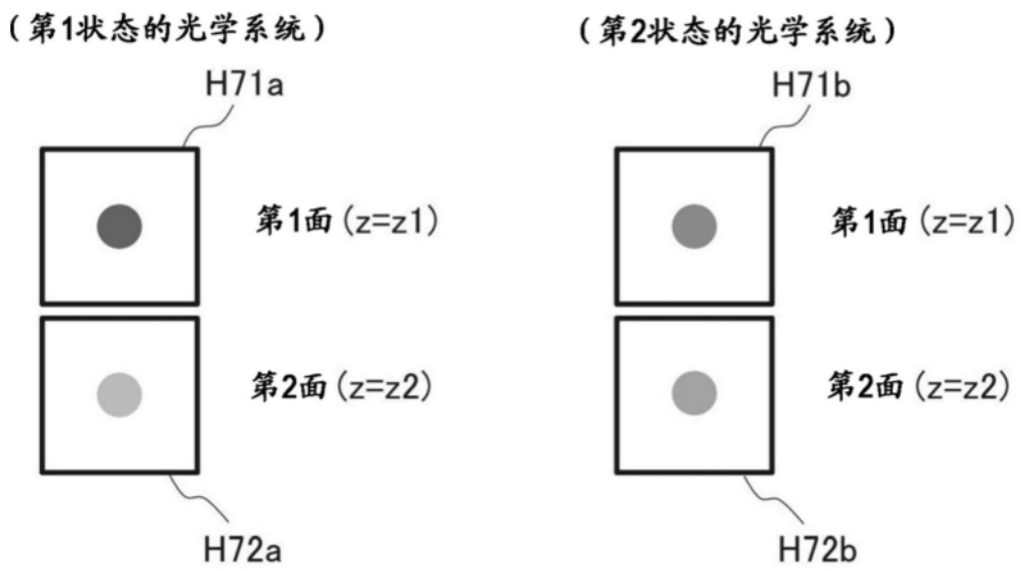


图21

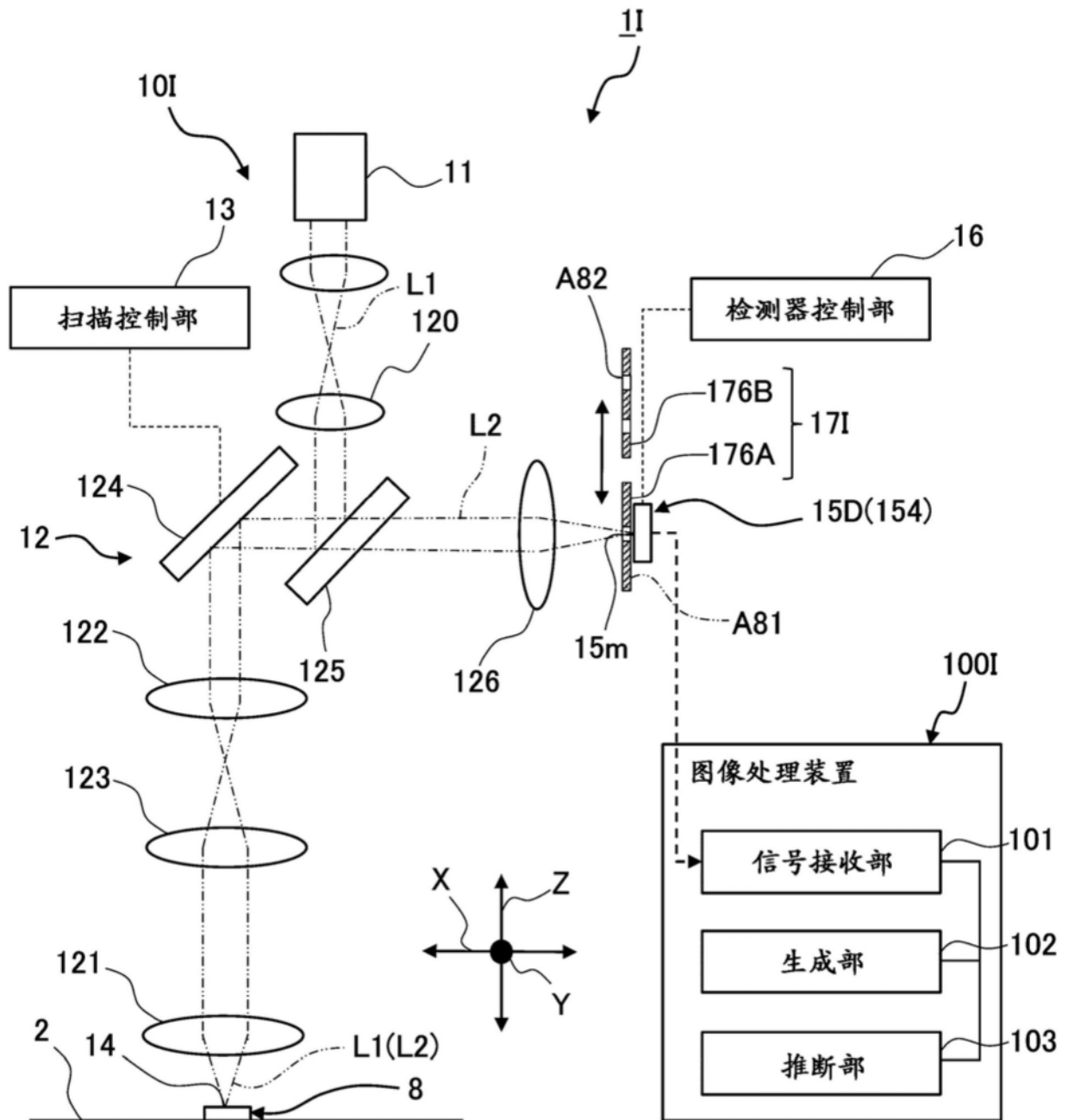


图22

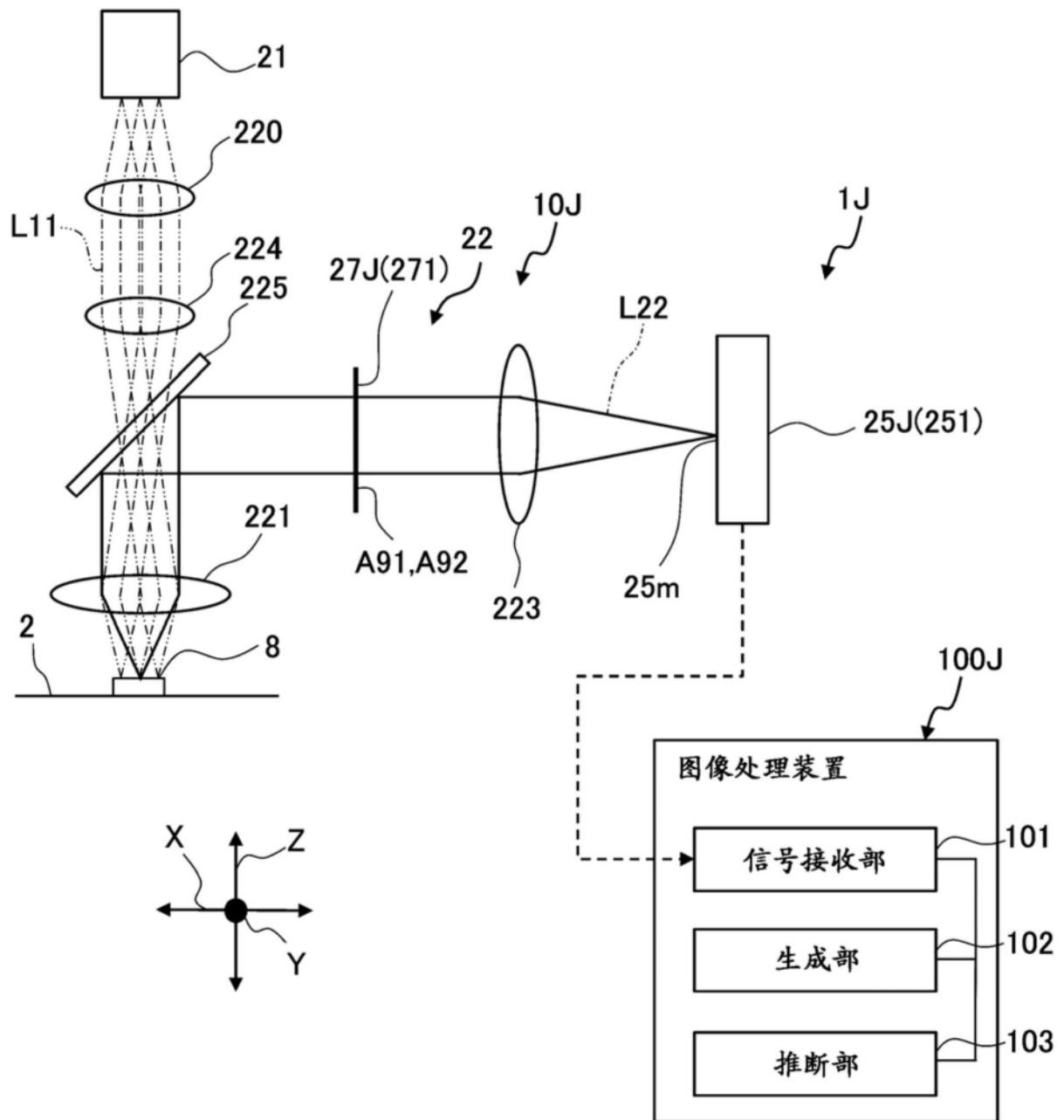


图23

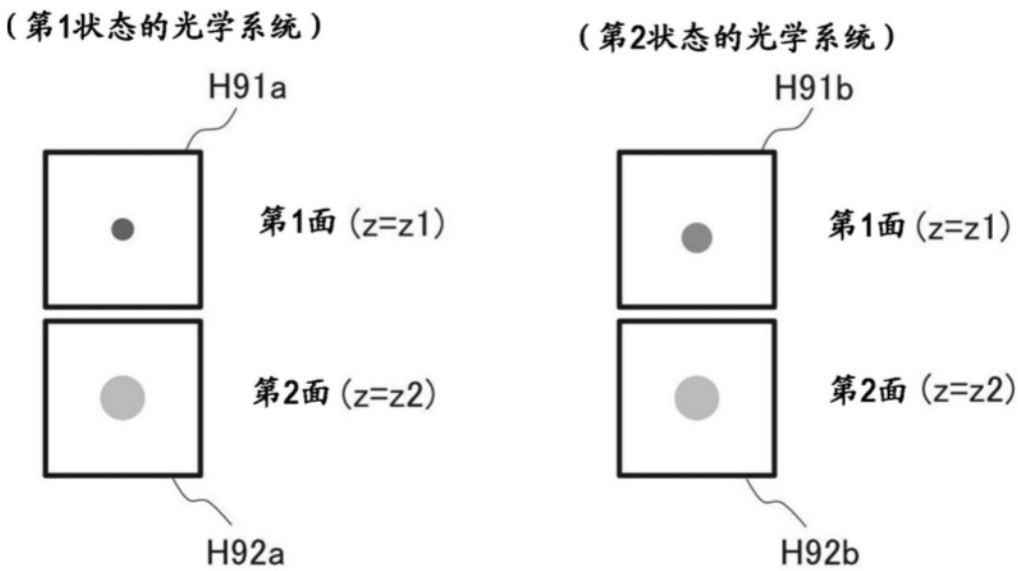


图24

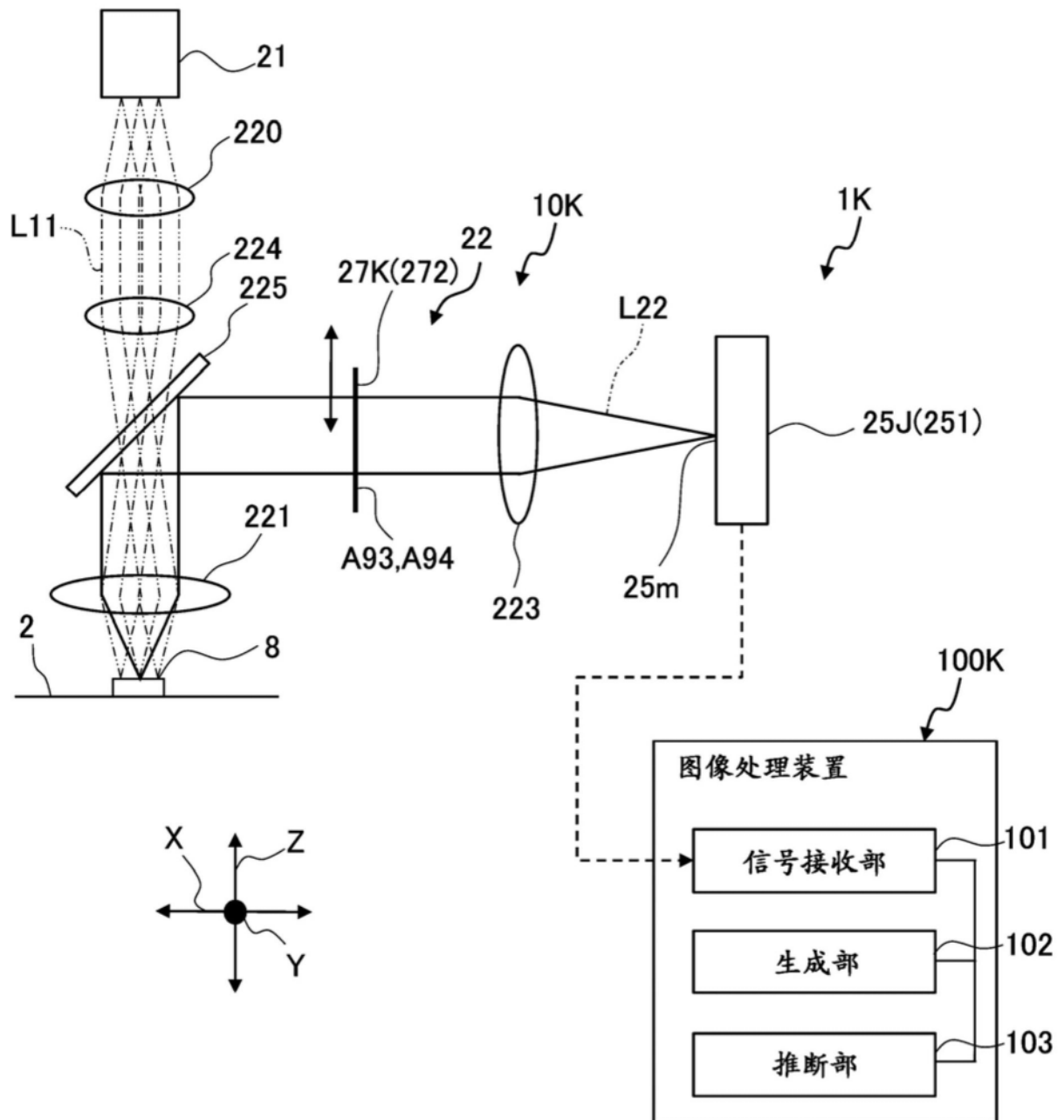


图25

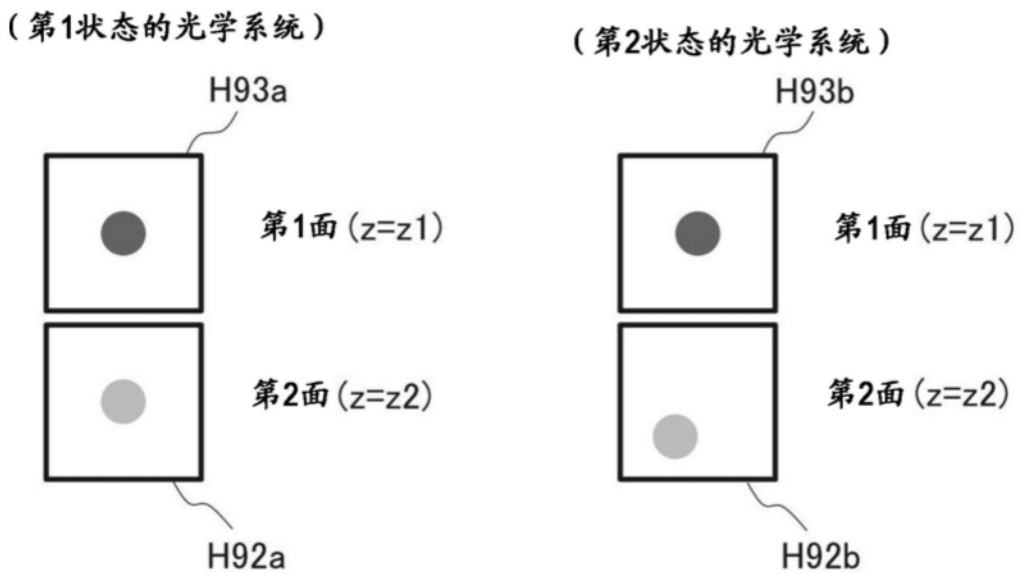


图26

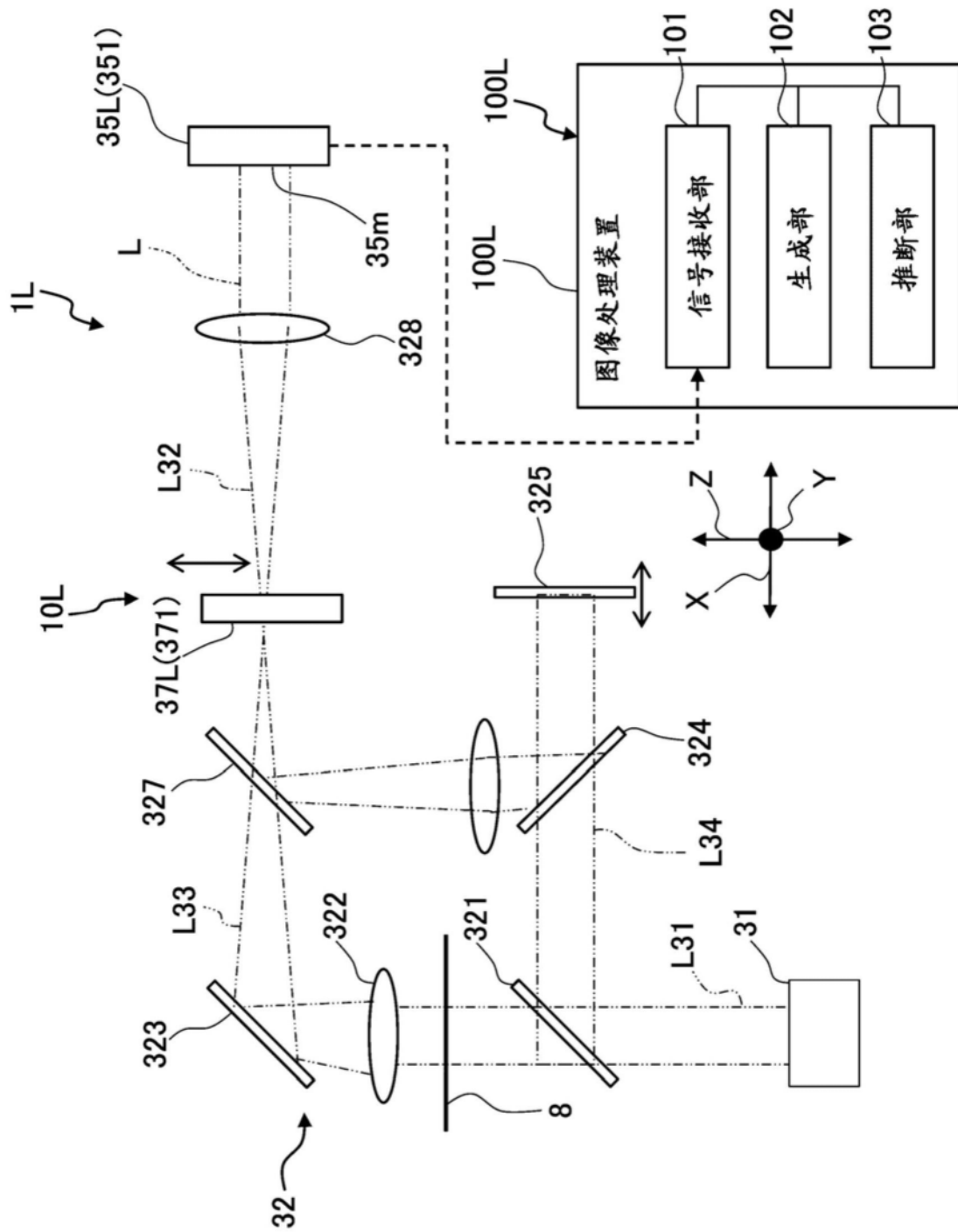


图27

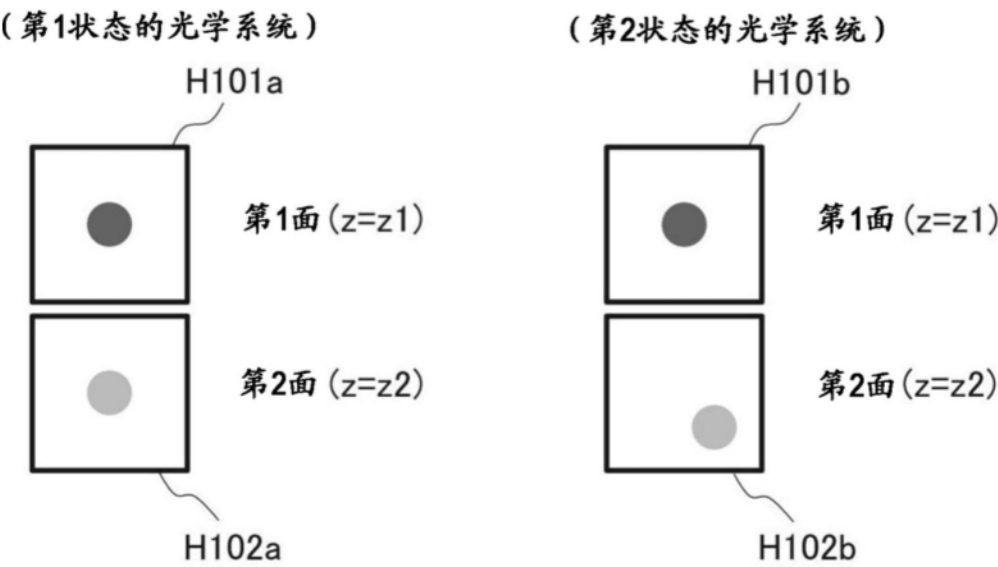


图28

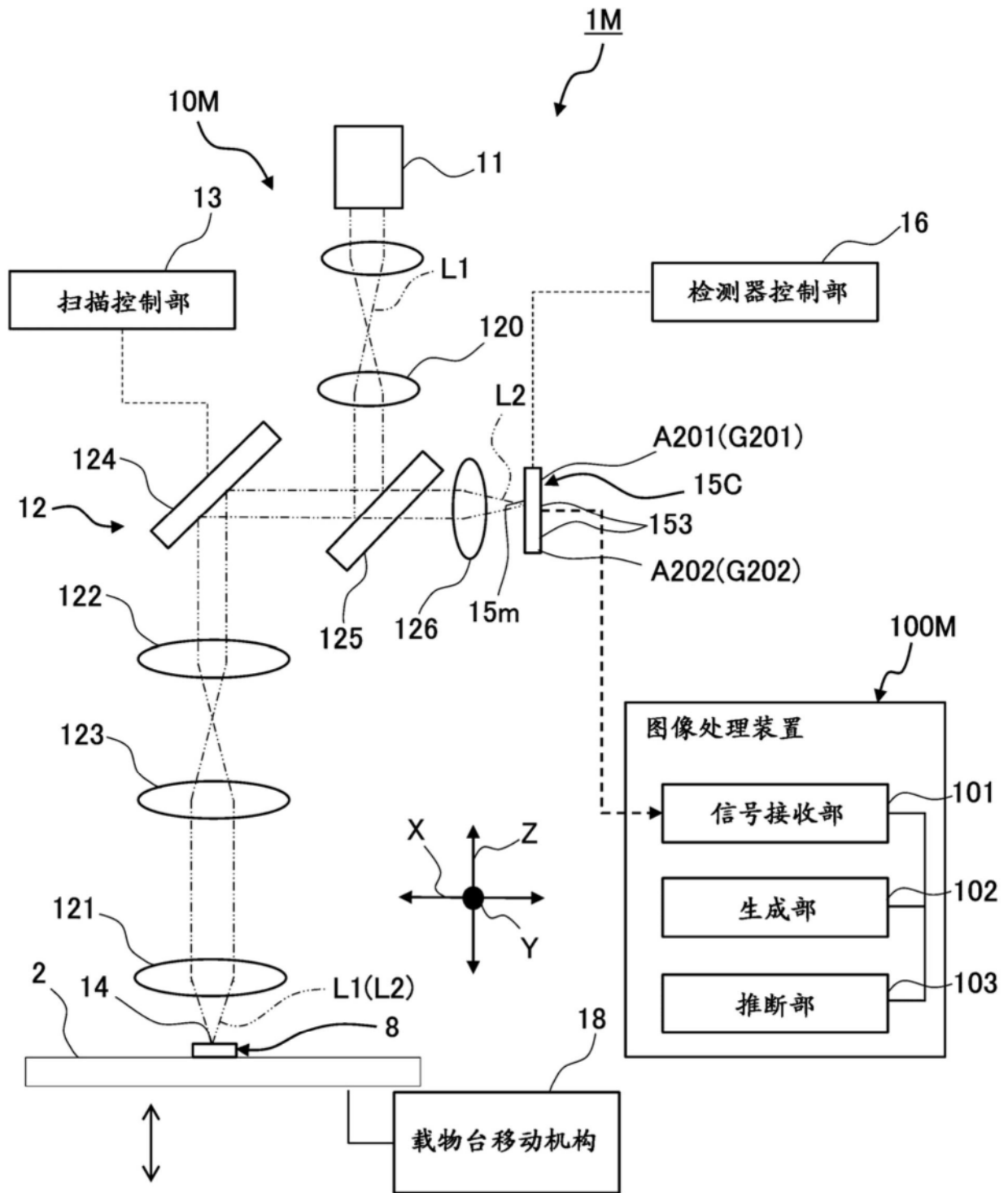


图29

(第1状态的光学系统)

(第2状态的光学系统)

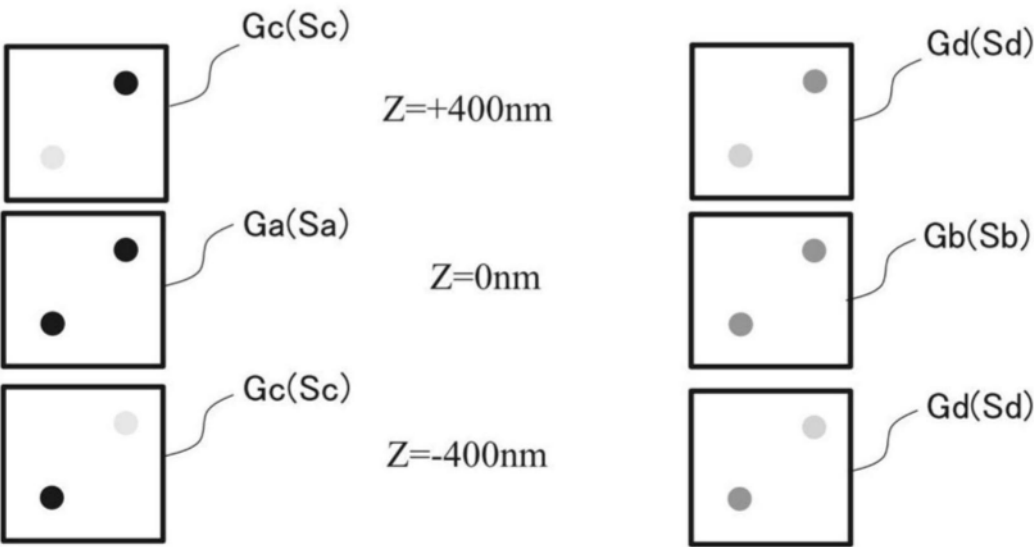


图30

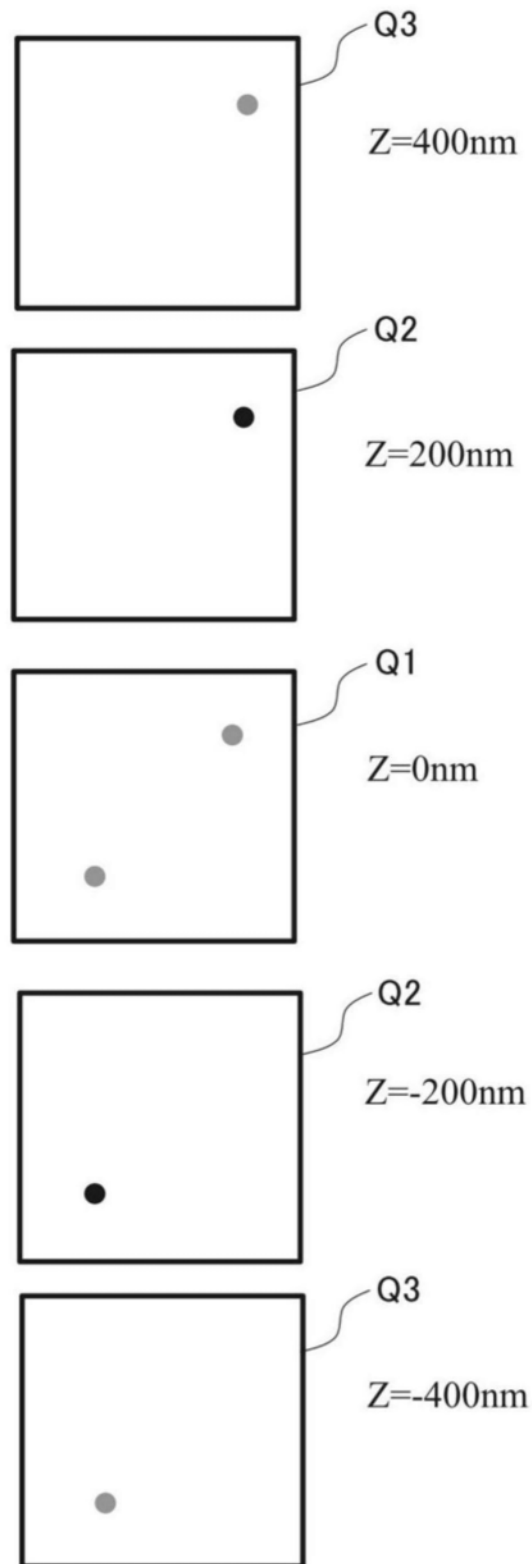


图31