

(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
2017年6月1日(01.06.2017)

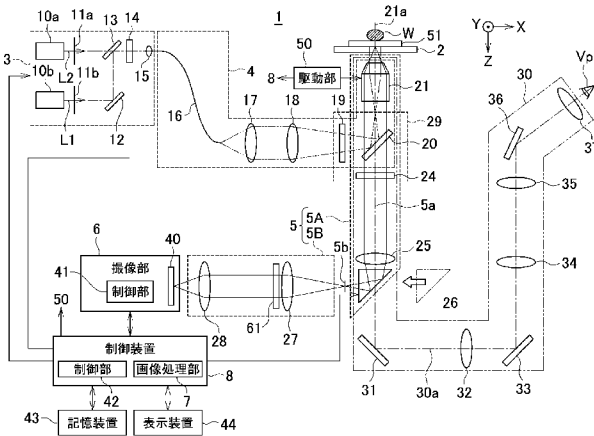


(10) 国際公開番号
WO 2017/090211 A1

- (51) 国際特許分類:
G02B 21/00 (2006.01) H04N 5/225 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/083511
 - (22) 国際出願日: 2015年11月27日(27.11.2015)
 - (25) 国際出願の言語: 日本語
 - (26) 国際公開の言語: 日本語
 - (71) 出願人: 株式会社ニコン(NIKON CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 Tokyo (JP).
 - (72) 発明者: 佐瀬 一郎(SASE Ichiro); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 金子 泰俊(KANEKO Yasutoshi); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 福井 達雄(FUKUI Tatsuo); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP).
 - (74) 代理人: 龍華国際特許業務法人(RYUKA IP LAW FIRM); 〒1631522 東京都新宿区西新宿1-6-1 新宿エルタワー22階 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, 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, ST, 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: MICROSCOPE APPARATUS

(54) 発明の名称: 顕微鏡装置



- 6 Imaging unit
- 7 Image processing unit
- 8 Control device
- 41, 42 Control unit
- 43 Storage device
- 44 Display device
- 50 Drive unit

(57) Abstract: A microscope according to the present invention has: an illumination optical system that emits activation light for activating a portion of a fluorescent material included in a sample, and excitation light for exciting at least a portion of the activated fluorescent material; an objective lens; an image forming optical system that forms an image of fluorescence and that has an astigmatic optical system that generates astigmatism with respect to at least a portion of the fluorescence from the fluorescent material; an imaging unit that captures the image formed by the image-forming optical system; a drive unit that moves an imaging position in the sample along the optical axis direction of the objective lens; and a control unit. The control unit causes the imaging unit to capture the image in a plurality of frames at a first imaging position and at a second imaging position different from the first imaging position.

(57) 要約: 試料に含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光と、活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光を照射する照明光学系と、対物レンズと、蛍光物質からの蛍光の少なくとも一部に対して非点収差を発生させる非点収差光学系を有し、蛍光の像を形成する結像光学系と、結像光学系が形成した像を撮像する撮像部と、試料における撮像位置を対物レンズの光軸方向に沿って移動する駆動部と、制御部とを有する顕微鏡であって、制御部は、撮像部に、第1の撮像位置および第1の撮像位置とは異なる第2の撮像位置において、それぞれ複数のフレーム数で撮像させる。

像部に、第1の撮像位置および第1の撮像位置とは異なる第2の撮像位置において、それぞれ複数のフレーム数で撮像させる。

WO 2017/090211 A1

明 細 書

発明の名称：顕微鏡装置

技術分野

[0001] 本発明は、顕微鏡装置、撮像方法およびプログラムに関する。

背景技術

[0002] S T O R M、P A L M等のSingle-molecule Localization Microscopy法を利用した顕微鏡装置がある（例えば、特許文献1参照）。

特許文献1 米国特許出願公開公報2008/0182336号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] 当該顕微鏡装置において、試料の厚み方向について広い範囲で試料の構造を再構成するには、試料と光学系とを光軸方向に相対的に移動して、複数の撮像位置で蛍光を撮像する必要がある。そこで、複数の撮像位置で撮像した撮像結果を用いた再構成画像の品質の向上が求められている。

課題を解決するための手段

[0004] 本発明の第1の態様においては、試料に含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光と、活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光を照射する照明光学系と、対物レンズと、蛍光物質からの蛍光の少なくとも一部に対して非点収差を発生させる非点収差光学系を有し、蛍光の像を形成する結像光学系と、結像光学系が形成した像を撮像する撮像部と、試料における撮像位置を対物レンズの光軸方向に沿って移動する駆動部と、制御部とを有する顕微鏡であって、制御部は、撮像部に、第1の撮像位置および第1の撮像位置とは異なる第2の撮像位置において、それぞれ複数のフレーム数で撮像させる。

[0005] 本発明の第2の態様においては、試料に含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光と、活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光を照射する照明光学系と、対物レンズと、蛍光物質からの蛍光の少なくとも

一部に対して非点収差を発生させる非点収差光学系を有し、蛍光の像を形成する結像光学系と、結像光学系が形成した像を撮像する撮像部と、試料における撮像位置を対物レンズの光軸方向に沿って移動する駆動部とを有する顕微鏡装置において、撮像部に、第1の撮像位置および第1の撮像位置とは異なる第2の撮像位置において、それぞれ複数のフレーム数で撮像させる撮像方法が提供される。

[0006] 本発明の第3の態様においては、試料に含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光と、活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光を照射する照明光学系と、対物レンズと、蛍光物質からの蛍光の少なくとも一部に対して非点収差を発生させる非点収差光学系を有し、蛍光の像を形成する結像光学系と、結像光学系が形成した像を撮像する撮像部と、試料における撮像位置を対物レンズの光軸方向に沿って移動する駆動部とを有する顕微鏡装置を制御するコンピュータに、撮像部に、第1の撮像位置および第1の撮像位置とは異なる第2の撮像位置において、それぞれ複数のフレーム数で撮像させる手順を実行させるプログラムが提供される。

[0007] なお、上記の発明の概要は、本発明の特徴の全てを列挙したものではない。また、これらの特徴群のサブコンビネーションもまた、発明となりうる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本実施形態に係る顕微鏡装置1を示す図である。

[図2]結像光学系5および撮像素子40を示す図である。

[図3]試料Wにおける位置Z2からの蛍光の光路および蛍光の像を示す図である。

[図4]試料Wにおける位置Z1に存在する蛍光物質からの蛍光の光路および蛍光の像を示す図である。

[図5]試料Wにおける位置Z3に存在する蛍光物質からの蛍光の光路および蛍光の像を示す図である。

[図6]画像処理部7による画像処理の一例を示す図である。

[図7]重心位置Qの3次元分布情報のデータ構成45の一例である。

- [図8]顕微鏡装置 1 の動作シーケンスの模式図である。
- [図9]顕微鏡装置 1 の撮像処理を示すフローチャートである。
- [図10]撮像処理における撮像条件を入力する画面の一例である。
- [図11]蛍光の重心位置の 3 次元分布情報を示す模式図である。
- [図12]試料 W の再構成の表示画像を設定する画面 1 5 0 の一例である。
- [図13]レイヤごとに色分けされた表示画像 C L 1 を示す。
- [図14]レイヤ間における試料の厚み方向の重なりを示す模式図である。
- [図15]重なり L w に含まれる重心位置を表示する表示画像 C L 2 を説明する模式図である。
- [図16]顕微鏡装置 1 の他の動作シーケンスの模式図である。
- [図17]撮像処理における撮像条件を入力する画面の他例である。
- [図18]蛍光の重心位置の 3 次元分布情報を示す模式図である。
- [図19]レイヤごとに色分けされた表示画像 C L 3 を示す。
- [図20]パスごとに色分けされた表示画像 C L 4 を示す。

発明を実施するための形態

- [0009] 以下、発明の実施の形態を通じて本発明を説明するが、以下の実施形態は請求の範囲にかかる発明を限定するものではない。また、実施形態の中で説明されている特徴の組み合わせの全てが発明の解決手段に必須であるとは限らない。
- [0010] 実施形態に係る顕微鏡装置は、例えば、S T O R M、P A L M等のSingle-molecule Localization Microscopy法を利用した顕微鏡装置である。本実施形態に係る顕微鏡装置は、3次元の超解像画像を生成可能である。実施形態に係る顕微鏡装置は、1種類の蛍光物質で標識（ラベル）された試料の蛍光観察、及び2種類以上の蛍光物質で標識された試料の蛍光観察のいずれにも利用できる。
- [0011] 試料は、生きた細胞（ライブセル）を含むものでもよいし、ホルムアルデヒド溶液等の組織固定液を用いて固定された細胞を含むものでもよく、組織等でもよい。蛍光物質は、シアニン（cyanine）染料等の蛍光色素で

もよいし、蛍光タンパク質でもよい。蛍光色素は、活性化された状態である活性化状態で励起光を受けた場合に蛍光を発するレポータ色素を含む。また、蛍光色素は、活性化光を受けてレポータ色素を活性化状態にするアクティベータ色素を含む場合がある。蛍光色素がアクティベータ色素を含まない場合、レポータ色素は、活性化光を受けて活性化状態になる。蛍光色素は、例えば、2種類のシアニン（cyanine）染料を結合させた染料対（例、Cy3-Cy5染料対（Cy3、Cy5は登録商標）、Cy2-Cy5染料対（Cy2、Cy5は登録商標）、Cy3-Alexa Fluor 647染料対（Cy3、Alexa Fluorは登録商標））、1種類の染料（例、Alexa Fluor 647（Alexa Fluorは登録商標））である。蛍光タンパク質は、例えばPA-GFP、Dronpaなどである。

[0012] 図1は、本実施形態に係る顕微鏡装置1を示す図である。顕微鏡装置1は、ステージ2、光源装置3と、照明光学系4と、結像光学系5と、撮像部6と、画像処理部7と、制御装置8とを備える。制御装置8は、顕微鏡装置1の各部を包括的に制御する制御部42を備える。制御装置8は、ソフトウェアプログラムを読み込むことによって、後述する手順を実行するコンピュータであってよい。

[0013] ステージ2は、カバーガラス51を保持する。カバーガラス51は、観察対象の試料Wを保持する。より具体的には、図1に示すように、ステージ2上にカバーガラス51が載置され、カバーガラス51上に試料Wが載置されている。なお、ステージ2はXY面内で移動してもよいし、しなくてもよい。

[0014] 光源装置3は、活性化光源10a、励起光源10b、シャッタ11a、及びシャッタ11bを備える。活性化光源10aは、試料Wに含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光L2を発する。ここでは、蛍光物質がレポータ色素を含み、アクティベータ色素を含まないものとする。蛍光物質のレポータ色素は、活性化光L2が照射されることで、蛍光を発することが可能な活性化状態となる。蛍光物質は、レポータ色素およびアクティベータ色素を

含むものでもよく、この場合、アクティベータ色素は、活性化光L2を受けた場合にレポータ色素を活性状態にする。なお、蛍光物質は、例えばP A - G F P、D r o n p aなどの蛍光タンパク質でもよい。

[0015] 励起光源10bは、試料Wにおいて活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光L1を発する。蛍光物質は、活性化状態において励起光L1が照射されると、蛍光を発するか、不活性化される。蛍光物質は、不活性化された状態（以下、不活性化状態という）において活性化光L2が照射されると、再度、活性化状態となる。

[0016] 活性化光源10aおよび励起光源10bは、例えば、レーザ光源などの固体光源を含み、それぞれ、蛍光物質の種類に応じた波長のレーザ光を発する。活性化光源10aの射出波長、励起光源10bの射出波長は、例えば、約405nm、約457nm、約488nm、約532nm、約561nm、約640nm、約647nmなどから選択される。ここでは、活性化光源10aの射出波長が約405nmであり、励起光源10bの射出波長が約488nm、約561nm、約647nmから選択される波長であるとする。

[0017] シャッタ11aは、制御部42により制御され、活性化光源10aからの活性化光L2を通す状態と、活性化光L2を遮る状態とを切り替え可能である。シャッタ11bは、制御部42により制御され、励起光源10bからの励起光L1を通す状態と、励起光L1を遮る状態とを切り替え可能である。

[0018] また、光源装置3は、ミラー12、ダイクロイックミラー13、音響光学素子14、及びレンズ15を備える。ミラー12は、例えば、励起光源10bの射出側に設けられる。励起光源10bからの励起光L1は、ミラー12で反射し、ダイクロイックミラー13に入射する。

[0019] ダイクロイックミラー13は、例えば、活性化光源10aの射出側に設けられる。ダイクロイックミラー13は、活性化光L2を透過し、励起光L1を反射する特性を有する。ダイクロイックミラー13を透過した活性化光L2と、ダイクロイックミラー13で反射した励起光L1は、同じ光路を通過して音響光学素子14に入射する。

[0020] 音響光学素子 14 は、例えば音響光学フィルタなどである。音響光学素子 14 は、制御部 42 に制御され、活性化光 L2 の光強度および励起光 L1 の光強度のそれぞれを調整可能である。また、音響光学素子 14 は、制御部 42 に制御され、活性化光 L2、励起光 L1 のそれぞれについて、音響光学素子 14 を通る状態である透光状態と、音響光学素子 14 により遮られる状態または強度が低減される状態である遮光状態とを切り替え可能である。例えば、蛍光物質がレポータ色素を含みアクティベータ色素を含まない場合、制御部 42 は、試料 W に対し、活性化光 L2 および励起光 L1 が同時に照射されるように、音響光学素子 14 を制御する。また、蛍光物質がレポータ色素およびアクティベータ色素を含む場合、制御部 42 は、例えば、活性化光 L2 の照射後に励起光 L1 が試料 W に照射されるように、音響光学素子 14 を制御する。

[0021] レンズ 15 は、例えばカプラであり、音響光学素子 14 からの活性化光 L2、励起光 L1 を導光部材 16 に集光する。なお、顕微鏡装置 1 は、光源装置 3 の少なくとも一部を備えなくてもよい。例えば、光源装置 3 は、ユニット化されており、顕微鏡装置 1 に交換可能（取り付け可能、取り外し可能）に設けられていてもよい。例えば、光源装置 3 は、顕微鏡装置 1 による観察時などに、顕微鏡装置 1 に取り付けられてもよい。

[0022] 照明光学系 4 は、試料 W に含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光 L2 と、活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光 L1 とを照射する。照明光学系 4 は、光源装置 3 からの活性化光 L2 と励起光 L1 とを試料 W に照射する。照明光学系 4 は、導光部材 16、レンズ 17、レンズ 18、フィルタ 19、ダイクロイックミラー 20、及び対物レンズ 21 を備える。

[0023] 導光部材 16 は、例えば光ファイバであり、活性化光 L2、励起光 L1 をレンズ 17 へ導く。図 1 等において、導光部材 16 の射出端から試料 W までの光路を点線で示す。レンズ 17 は、例えばコリメータであり、活性化光 L2、励起光 L1 を平行光に変換する。レンズ 18 は、例えば、活性化光 L2

、励起光L 1を対物レンズ2 1の瞳面の位置に集光する。フィルタ1 9は、例えば、活性化光L 2および励起光L 1を透過し、他の波長の光の少なくとも一部を遮る特性を有する。ダイクロイックミラー2 0は、活性化光L 2および励起光L 1を反射し、試料Wの蛍光物質が発する蛍光の波長帯の光を透過する特性を有する。フィルタ1 9からの光は、ダイクロイックミラー2 0で反射し、対物レンズ2 1に入射する。試料Wは、観察時に対物レンズ2 1の前側焦点面に配置される。

[0024] 活性化光L 2、励起光L 1は、上述のような照明光学系4により、試料Wに照射される。なお、上述した照明光学系4は一例であり、適宜、変更可能である。例えば、上述した照明光学系4の一部が省略されてもよい。また、照明光学系4は、光源装置3の少なくとも一部を含んでいてもよい。また、照明光学系4は、開口絞り、照野絞りなどを備えてもよい。

[0025] 結像光学系5は、試料Wに含まれる蛍光物質からの蛍光の像を形成する。結像光学系5は、試料Wから射出された蛍光の一次像を形成する第1光学系5 Aと、第1光学系5 Aにおいて生成された一次像から、撮像部6における二次像としての蛍光の像を形成する第2光学系5 Bとを備える。第1光学系5 Aは、対物レンズ2 1、ダイクロイックミラー2 0、フィルタ2 4、レンズ2 5、光路切替部材2 6を備える。第2光学系5 Bは、レンズ2 7、レンズ2 8、及び非点収差光学系としてのシリンドリカルレンズ6 1を備える。

[0026] 結像光学系5は、対物レンズ2 1およびダイクロイックミラー2 0を照明光学系4と共用している。図1などにおいて、試料Wと撮像部6との間の光路を実線で示す。また、駆動部5 0は対物レンズ2 1を当該対物レンズ2 1の光軸方向、すなわち図1におけるZ方向に移動する。

[0027] 試料Wからの蛍光は、対物レンズ2 1およびダイクロイックミラー2 0を通過してフィルタ2 4に入射する。フィルタ2 4は、試料Wからの光のうち所定の波長帯の光が選択的に通る特性を有する。フィルタ2 4は、例えば、試料Wで反射した照明光、外光、迷光などを遮断する。フィルタ2 4は、例えば、フィルタ1 9およびダイクロイックミラー2 0とユニット化され、この

フィルタユニット29は、交換可能に設けられる。フィルタユニット29は、例えば、光源装置3から射出される光の波長（例、活性化光L2の波長、励起光L1の波長）、試料Wから放射される蛍光の波長などに応じて交換しても良いし、複数の励起、蛍光波長に対応した単一のフィルタユニットを利用しても良い。

[0028] フィルタ24を通った光は、レンズ25を介して光路切替部材26に入射する。レンズ25から射出された光は、光路切替部材26を通過した後、中間像面5bに一次像を結ぶ。光路切替部材26は、例えばプリズムであり、結像光学系5の光路に挿脱可能に設けられる。光路切替部材26は、例えば、制御部42により制御される駆動部（図示せず）によって、結像光学系5の光路に挿脱される。光路切替部材26は、結像光学系5の光路に挿入された状態において、試料Wからの蛍光を内面反射によって撮像部6へ向かう光路へ導く。

[0029] 撮像部6は、結像光学系5（第1観察光学系5）が形成した像を撮像する。撮像部6は、撮像素子40および制御部41を備える。撮像素子40は、例えばCMOSイメージセンサであるが、CCDイメージセンサなどでもよい。撮像素子40は、例えば、二次元的に配列された複数の画素を有し、各画素にフォトダイオードなどの光電変換素子が配置された構造である。撮像素子40は、例えば、光電変換素子に蓄積された電荷を、読出回路によって読み出す。撮像素子40は、読み出された電荷をデジタルデータに変換し、画素の位置と階調値とを関連付けたデジタル形式のデータ（例、画像のデータ）を出力する。制御部41は、制御装置8の制御部42から入力される制御信号に基づいて撮像素子40を動作させ、撮像画像のデータを制御装置8に出力する。また、制御部41は、電荷の蓄積期間と電荷の読み出し期間を制御装置8に出力する。

[0030] なお、上述した結像光学系5は一例であり、適宜、変更可能である。例えば、上述した結像光学系5の一部が省略されてもよい。また、結像光学系5は、開口絞り、視野絞りなどを備えてもよい。

- [0031] 本実施形態に係る顕微鏡装置 1 は、観察範囲の設定などに利用される第 2 観察光学系 30 を備える。第 2 観察光学系 30 は、試料 W から観察者の視点 V_p に向かう順に、対物レンズ 21、ダイクロイックミラー 20、フィルタ 24、レンズ 25、ミラー 31、レンズ 32、ミラー 33、レンズ 34、レンズ 35、ミラー 36、及びレンズ 37 を備える。観察光学系 30 は、対物レンズ 21 からレンズ 25 までの構成を結像光学系 5 と共用している。
- [0032] 試料 W からの光は、レンズ 25 を通った後に、光路切替部材 26 が結像光学系 5 の光路から退避した状態において、ミラー 31 に入射する。ミラー 31 で反射した光は、レンズ 32 を介してミラー 33 に入射し、ミラー 33 で反射した後に、レンズ 34 およびレンズ 35 を介してミラー 36 に入射する。ミラー 36 で反射した光は、レンズ 37 を介して、視点 V_p に入射する。第 2 観察光学系 30 は、例えば、レンズ 35 とレンズ 37 との間の光路に試料 W の中間像を形成する。レンズ 37 は、例えば接眼レンズであり、観察者は、中間像を観察することにより観察範囲の設定などを行うことができる。
- [0033] 制御装置 8 は、顕微鏡装置 1 の各部を総括して制御する。制御装置 8 は、制御部 42 および画像処理部 7 を備える。制御部 42 は、制御部 41 から供給される電荷の蓄積期間と電荷の読み出し期間を示す信号に基づいて、音響光学素子 14 に、光源装置 3 からの光を通す通光状態と、光源装置 3 からの光を遮る遮光状態とを切り替える制御信号を供給する。音響光学素子 14 は、この制御信号に基づいて、通光状態と遮光状態とを切り替える。制御部 42 は、音響光学素子 14 を制御し、試料 W に活性化光 L2 が照射される期間、及び試料 W に活性化光 L2 が照射されない期間を制御する。また、制御部 42 は、音響光学素子 14 を制御し、試料 W に励起光 L1 が照射される期間、及び、試料 W に励起光 L1 が照射されない期間を制御する。制御部 42 は、音響光学素子 14 を制御し、試料 W に照射される活性化光 L2 の光強度および励起光 L1 の光強度を制御する。制御部 42 は、撮像部 6 を制御し、撮像素子 40 に撮像を実行させる。
- [0034] なお、制御部 42 の代わりに制御部 41 は、電荷の蓄積期間と電荷の読み

出し期間を示す信号（撮像タイミングの情報）に基づいて、音響光学素子 14 に遮光状態と透光状態とを切り替える制御信号を供給し、音響光学素子 14 を制御してもよい。制御部 42 は、撮像部 6 から撮像結果としてのデータを取得する。画像処理部 7 は、撮像部 6 の撮像結果を用いて、個々の像の重心位置を求めるなどの画像処理を行う。制御部 42 は、撮像部 6 に複数のフレーム期間で撮像させ、画像処理部 7 は、複数のフレーム期間で得られた撮像結果の少なくとも一部を用いて 1 枚の画像を生成する。

[0035] 制御装置 8 は、例えば、記憶装置 43 および表示装置 44 のそれぞれと通信可能に接続される。表示装置 44 は、例えば、液晶ディスプレイなどである。表示装置 44 は、例えば、顕微鏡装置 1 の各種設定を示す画像、撮像部 6 による撮像画像、撮像画像から生成された画像などの各種画像を表示する。制御部 42 は、表示装置 44 を制御し、表示装置 44 に各種画像を表示させる。例えば、制御部 42 は、画像処理部 7 が生成した STORM 画像、PALM 画像などの超解像画像のデータを表示装置 44 に供給し、この画像を表示装置 44 に表示させる。例えば、顕微鏡装置 1 は、観察対象の試料 W の超解像画像をライブ映像で表示すること等もできる。記憶装置 43 は、例えば磁気ディスクや光学ディスクなどであり、顕微鏡装置 1 の各種設定のデータ、撮像部 6 による撮像結果のデータ、画像処理部 7 が生成した画像のデータなど各種データを記憶する。制御部 42 は、例えば、記憶装置 43 に記憶された超解像画像のデータを表示装置 44 に供給し、超解像画像を表示装置 44 に表示させることができる。制御部 42 は、記憶装置 43 を制御し、各種データを記憶装置 43 に記憶させる。

[0036] 図 2 は、結像光学系 5 および撮像素子 40 を示す図である。なお、図 1 において結像光学系 5 は光路切替部材 26 で光軸 5a が折れ曲がる光学系であるが、図 2 では、結像光学系 5 をストレートな光学系として概念的に示した。また、図 2 において、対物レンズ 21 とシリンドリカルレンズ 61 との間の構成の図示を省略した。ここでは、結像光学系 5 の光軸 5a に平行な方向を Z 方向とし、Z 方向に垂直かつ互いに垂直な 2 方向を X 方向、Y 方向とす

る。X方向は、例えば、撮像素子40の水平方向であり、Y方向は例えば撮像素子40の垂直方向である。

[0037] シリンドリカルレンズ61は、垂直方向と水平方向のいずれか一方だけにパワー（屈折力）を有する光学部材である。ここでは、シリンドリカルレンズ61は、XZ面内でパワーを有し、YZ面内でパワーを有さないものとして説明する。なお、非点収差光学系は、シリンドリカルレンズ61の代わりに、垂直方向と水平方向の双方にパワーを持ち、これら2方向でパワーが異なるトロイダルレンズを使用したものでもよい。

[0038] 図3は、試料Wにおける位置Z2からの蛍光の光路および蛍光の像を示す図である。まず、XZ面における光路について説明する。シリンドリカルレンズ61には、試料Wにおいて位置Z2に存在する蛍光物質からの蛍光が平行光として入射する。この蛍光は、シリンドリカルレンズ61での屈折により集光しつつ撮像素子40へ向かう。X方向における蛍光の像の幅 W_x は、XZ面における焦点に相当する位置Z4において最小となる。また、幅 W_x は、位置Z4から、試料Wと反対側（+Z側）に離れるにつれて、大きくなる。

[0039] 次に、YZ面における光路について説明する。シリンドリカルレンズ61には、試料Wにおける位置Z2に存在する蛍光物質からの蛍光が平行光として入射する。この蛍光は、シリンドリカルレンズ61でほぼ屈折せずに、レンズ28入射する。この蛍光は、レンズ28の屈折により集光しつつ撮像素子40へ向かう。Y方向における蛍光の像の幅 W_y は、YZ面における焦点に相当する位置Z6において最小となる。幅 W_y は、位置Z6から、試料Wと同じ側（-Z側）に離れるにつれて、大きくなる。

[0040] 位置Z4と位置Z6の中間の位置Z5においては、X方向における蛍光の像の幅 W_x とX方向における蛍光の像の幅 W_y が等しくなり、蛍光の像は真円となる。したがって、位置Z5に撮像素子40を配置した場合、試料Wにおける位置Z2に存在する蛍光物質からの蛍光の像として真円の像が取得される。

[0041] 図4は、試料Wにおける位置Z1に存在する蛍光物質からの蛍光の光路および蛍光の像を示す図である。位置Z1は、位置Z2に対して、撮像素子40と反対側（-Z側）である。XZ面において、X方向における蛍光の像の幅 W_x は、位置Z4より試料W側（-Z側）に離れた位置で最小となる。一方、YZ面において、Y方向における蛍光の像の幅 W_y は、位置Z5において最小となる。したがって、位置Z5に撮像素子40を配置した場合、試料Wにおける位置Z1に存在する蛍光物質からの蛍光の像としてX方向を長軸とする楕円形の像が取得される。

[0042] 図5は、試料Wにおける位置Z3に存在する蛍光物質からの蛍光の光路および蛍光の像を示す図である。位置Z3は、位置Z2に対して、撮像素子40と同じ側（+Z側）である。XZ面において、X方向における蛍光の像の幅 W_x は、位置Z5において最小となる。一方、YZ面において、Y方向における蛍光の像の幅 W_y は、位置Z6より試料Wと反対側（+Z側）に離れた位置で最小となる。したがって、位置Z5に撮像素子40を配置した場合、試料Wにおける位置Z3に存在する蛍光物質からの蛍光の像としてY方向を長軸とする楕円形の像が取得される。

[0043] このように、蛍光の像の幅 W_x と幅 W_y との関係、例えば比率は、試料WにおけるZ方向（対物レンズ21の光軸21aと同じ方向）の位置に応じて変化する。よって、画像処理部7は、例えば、楕円ガウシアンフィッティングを行って、蛍光の像の重心位置に加えて幅 W_x および幅 W_y を特定する。これにより、画像処理部7は重心位置から蛍光の像に対応する蛍光物質のXY面内の位置を特定するとともに、幅 W_x および幅 W_y の関係に基づいてZ方向の位置を特定することができる。

[0044] 図6は、所定の撮像位置における、画像処理部7による画像処理の一例を示す図である。ここで、撮像位置とは、試料Wにおける対物レンズ21の前側焦点の位置である。

[0045] 図6において、符号P1からPnは予め定められた撮像フレーム期間で得られた撮像結果を表す。活性化光L2強度に応じた確率で活性化された蛍光

物質が、励起光L 1の照射により蛍光を発するので、1フレームにおいては当該確率に応じた数の蛍光物質が蛍光を発し、フレーム間で見ると互いに異なる蛍光物質が蛍光を発している。

[0046] 画像処理部7は、撮像画像P 1からP nのそれぞれについて、各画像に含まれる蛍光の像の重心位置およびXY方向のそれぞれの幅を算出する。画像処理部7は、例えば、この領域の画素値の分布に対して楕円ガウシアンフィッティングを行うことにより、重心のXY位置および幅 W_x 、 W_y を算出する。画像処理部7は、算出された幅 W_x 、 W_y の関係から、予め格納されたテーブル等を参照して当該重心のZ方向の位置も特定する。これにより、画像処理部7は、例えば、蛍光の像 l_m の重心位置Qが算出され、複数の撮像画像P 1からP nに含まれる複数の蛍光の像に応じた複数の重心位置Qの少なくとも一部を用いて、重心位置Qの3次元分布情報を生成する。また、3次元分布情報に基づいて、3次元超解像画像SP 1を生成し、表示する。当該超解像画像SP 1は試料Wの3次元構造を再構成したものになっている。なお、所定の撮像位置において得られた3次元分布情報をレイヤと称する。

[0047] 図6の例で、3次元超解像度画像SP 1は、見る方向をユーザが指定できるような3次元画像として示されている。これに代えてまたはこれに加えて、XY平面への投影画像SP 2およびXZ平面への投影画像SP 3が表示されてもよい。

[0048] 図7は、重心位置Qの3次元分布情報のデータ構成4 5の一例である。図7の例において、重心位置Qを識別する番号に当該重心位置QのXYZ座標が対応付けられている。さらに、輝度Bおよび幅 W_x 、 W_y が対応付けられてよい。当該構成による3次元分布情報が記憶装置4 3に記憶される。

[0049] 上記図6で説明した通り、顕微鏡装置1によれば対物レンズ2 1を光軸方向に固定した状態でも、試料Wの厚さ方向（すなわち対物レンズの光軸方向2 1 a）の構造を再構成することができる。しかしながら、対物レンズ2 1を光軸方向2 1 aについて固定した状態では、構造を再構成できる厚さ方向の範囲は、撮像位置を中心として、結像光学系5の被写界深度や蛍光の強度

、撮像素子のS/N比、シリンドリカルレンズ61の焦点距離等により制限されてしまう。試料Wを観察する場合に、構造を再構成できる厚み方向の範囲は300nm程度である。そこで、本実施形態では、対物レンズ21を駆動部50により対物レンズ21の光軸方向21aに移動させつつ撮像部6により蛍光の像を撮像することで、厚み方向に広い範囲にわたって試料Wの構造を再構成する。

[0050] 図8は顕微鏡装置1の動作シーケンスの模式図である。図9は顕微鏡装置1の撮像処理を示すフローチャートである。また、図10は撮像処理における撮像条件を入力する画面の一例である。

[0051] 撮像部6が所定の撮像位置において複数回の撮像を行うことを1の撮像処理単位とする。また、図7に示すように、予め決められた複数の撮像位置における画像取得手順をパスという。よって、パスは、例えば、撮像位置1から撮像位置8まで対物レンズ21が、対物レンズ21の光軸5aの方向に移動し、撮像することである。なお、これらの用語は説明を簡略化するために用いているものであって、権利範囲を限定するものではない。

[0052] 図9のフローチャートに示されるように、まず、撮像処理において撮像条件が設定される(S100)。この場合に、顕微鏡装置1は表示装置44に図10に示すような画面100を表示する。制御装置8は、画面100を通じて、撮像条件としての、撮像最下面の位置、撮像最上面の位置、Z方向のステップサイズ、各撮像位置で取得するフレーム数および3次元分布情報を記憶するファイル名の入力を受け付ける。

[0053] 図10の例では、ユーザにより撮像位置の番号とそれに対応するフレーム数が手動で入力される。これに代えて、あらかじめ定められたルールに基づいて、撮像位置に対するフレーム数が自動的に計算されてもよい。例えば、染色された細胞内組織の密度が細胞の下層ほど高く、上層ほど密度が低くなるような場合に、撮像位置がカバーガラス51から離れるほどフレーム数を多くすることが好ましい。

[0054] さらに各パス内における撮像順序も指定できてよい。例えば、初期設定で

は、上記のように下の撮像位置から上の撮像位置への順次移動が選択されている。この撮像順序に代えて、上から下、偶数番号の撮像位置が先で奇数番号の撮像位置が後、ランダム等の撮像順序が選択できるようになっていてもよい。

また、例えば、図8に示すZ1～Z8の撮像位置に移動する場合に、Z1、Z8、Z2、Z7、Z3、Z6、Z5の撮像順序を指定することもできる。この撮像順序により、試料の輪郭が明瞭な画像を得ることが可能となる。

[0055] 上記撮像条件が入力されて撮像開始ボタンが押されると、制御装置8は当該撮像条件から撮像位置、すなわち駆動部50による駆動量を算出する(S102)。この場合に、隣接するレイヤ間で試料Wの厚み方向の一部が重なるよう撮像位置および・または他の撮像条件が設定されることが好ましい。図8には、レイヤ数が8でパス数が1の動作シーケンスの例が示されている。

[0056] 照明光学系4は光源3からの活性化光L2および励起光L1を試料W1に照射し(S104)、撮像部6による撮像(S106)を撮像位置に対応した所定のフレーム数行う(S108:No)。

[0057] 所定のフレーム数の撮像が完了したら(S108:Yes)、駆動部50は対物レンズ21を次の撮像位置に移動させる(S109)。算出された撮像位置について上記ステップS104からS109を繰り返す(S110:No)。

[0058] 最終の撮像位置における撮像が完了したら(S110:Yes)、制御部8は最終のパスに至ったか否かを判断する(S111)。最終のパスに至っていない場合に(S111:No)、次のパスへ移行し、ステップS104からS110を繰り返す。最終のパスに至った場合に(S111:Yes)、撮像処理が終了する。

[0059] 以上、本実施形態によれば、STORM等の方法で試料の構造を再構成する場合において、シリンドリカルレンズの焦点距離等から制限される厚み方向の範囲よりも広い範囲で、試料の構造を再構成することができる。特に、

撮像位置ごとに異なるフレーム数の撮像結果を基にして試料の構造を再構成するので、試料の形状や性質に応じた再構成画像の画質の向上を見込むことができる。

[0060] 上記撮像処理中にまたは撮像処理後に、画像処理部7は各々の撮像フレームにおいて図6で説明したように、蛍光の重心位置を特定する。画像処理部7はさらに、撮像位置ごとに撮像処理単位に含まれる各々の撮像フレームで特定された重心位置の3次元分布情報を図7に示したデータ構成のファイルとして記憶装置43に記憶する。

[0061] 図11は、複数の撮像位置での撮像により特定された複数のレイヤを示す模式図である。図11には、レイヤ数が3でパス数が1の場合が示されている。

[0062] 画像処理部7は、パスごとかつレイヤごと、すなわち、撮影処理単位ごとに特定した蛍光の重心位置を、パスおよびレイヤを識別する情報に対応付けて、記憶装置43に記憶する。試料空間における各蛍光の重心のZ位置は、駆動部50の駆動量に基づく撮像位置と、各レイヤ内での蛍光の重心のZ位置（撮像された蛍光画像から算出される重心のZ位置）とを用いて特定される。撮像位置とは、上述したように、試料における対物レンズ21の前側焦点の位置であるが、前側焦点の位置は、カバーガラス51を基準とした位置でもよい。

[0063] 図12は、試料Wの再構成の表示画像を設定する画面150の一例である。画面150は表示装置44に表示されて、パス、レイヤまたはその両方を視覚的に区別して表示するか否かの設定を受け付ける。

[0064] 図12では、視覚的に区別する方法として表示色を用いる例が示されている。この場合にパスとレイヤとで色の三属性のうちの異なるもの、例えばパスは色相、レイヤは明度、で区別してもよい。これにより、パスごとかつレイヤごとの両方を視覚的に区別することができる。

[0065] 表示色に代えてまたは表示色に加えて、ハッチングや形状、例えば丸、三角、バツ印等で視覚的に区別できるようにしてもよい。

- [0066] 画面150の領域152は、レイヤごとの色分けをするか否かを選択するものであり、領域154はパスごとの色分けをするか否かを選択するものである。領域152の右側には、白抜き各レイヤが上下方向に並んだ状態が模式的に表されており、さらにその右側には、色分けを選択した場合にレイヤごとに色分けがされる状態が模式的に表されている。領域154の右側には、白抜き各パスが左右方向に並んだ状態が模式的に表されており、さらにその右側には、色分けを選択した場合にパスごとに色分けがされる状態が模式的に表されている。また、ボックス156は表示するZ方向の範囲の下限を入力するものであり、ボックス157は上限を入力するものである。さらに、ボックス158は表示するパスの下限を入力するものであり、ボックス159は上限を入力するものである。
- [0067] 画面150にはさらに撮影処理で得られたデータ構成及びデータ範囲の情報が表示される。データ構成としては、レイヤの厚み、レイヤ数及びパス数が表示される。
- [0068] 図13は、図11の3次元分布情報を用いて、図12の設定によりレイヤごとに色分けされた表示画像CL1を示す。ただし、図中にカラーを用いることができないので、白、ハッチング、黒を用いてカラーの代用とした。
- [0069] 画像処理部7は、記憶装置43に記憶された蛍光の重心位置を呼び出し、レイヤを識別する情報に基づいて、色を割り当てる。画像処理部7は、レイヤ1の蛍光の重心位置に白を割り当て、レイヤ2の蛍光の重心位置にハッチングを割り当て、レイヤ3の蛍光の重心位置に黒を割り当て、表示画像CL1を生成して、表示装置44に表示する。
- [0070] 以上、本実施形態によれば、画像処理部7が複数のレイヤのいずれに属する重心位置であるかを視覚的に区別可能に表示するので、レイヤ間において対物レンズ21とステージ2のドリフト（例えば、位置ずれとして現れる）がどの程度あったかをユーザが容易に認識することができる。
- [0071] 図14は、レイヤ間における試料の厚み方向の重なりを示す模式図である。上記した通り、複数の撮像位置は、その結果として生成される3次元分布

情報の一部が、試料の厚み方向に重なるように設定されることが好ましい。図14においては、レイヤ1とレイヤ2との間に重なりLwがあることを示している。そこで、図12の設定画面150において、手動によりまたは自動により、重なりLwに含まれる重心位置を表示するよう設定できることが好ましい。

[0072] 図15は、重なりLwに含まれる重心位置を表示する表示画像CL2を説明する模式図である。画像処理部7は、各レイヤの3次元分布情報の中から、重なりLwに含まれるZ座標を有する重心位置を特定する。図15に示す例では、レイヤ1およびレイヤ2で破線で囲まれた重心位置が、重なりLwに含まれるものであると特定されている。

[0073] 画像処理部7は、レイヤ1における上記重心位置に白を割り当て、レイヤ2の上記重心位置にハッチングを割り当てて、表示画像CL2を生成して、表示装置44に表示する。これにより、レイヤ間における対物レンズ21とステージ2のドリフトの程度をより容易に認識することができる。

[0074] 図16は、顕微鏡装置1の他の動作シーケンスの模式図である。図17は図16に対応した撮像処理における撮像条件を入力する画面110の例である。

[0075] 図16の例において、顕微鏡装置1はパスを複数回繰り返す。具体的には、パス1からパス10まで10回のパスを繰り返す。

[0076] パスの数は、図17の画面110を用いてユーザから入力される。さらに、画面110は、図10の画面100と同様に、撮像最下面の位置、撮像最上面の位置、Z方向のステップサイズ、各パス内における撮像順序および3次元分布情報を記憶するファイル名の入力を受け付ける。画面110はさらに、各レイヤに用いる全フレーム数の入力も受け付ける。

[0077] 図16および図17の撮像処理も、図9のフローチャートに沿って実行されてよい。この場合に、ステップS102において、画面110から入力された全フレーム数をパス数で割ることにより、各パスの各撮像位置で取得するフレーム数、すなわち各撮像処理単位のフレーム数が算出される。例えば

各撮像位置について全パスの合計で用いるフレーム数が10000であり、パス数が10の場合に、各撮像位置で得るフレーム数は1000となる。なお、図8から図10の例のように、撮像位置ごとにフレーム数が異なってもよい。

[0078] これにより、図16に示すように、撮像位置1から8を順に移動する動作を1パスとして、これを10回繰り返す。言い換えると、各撮像位置にパスの回数分移動し、それぞれの撮像位置で上記撮像処理単位分のフレームが撮像される。

[0079] STORM、PALM等のSingle-molecule Localization Microscopy法を利用した顕微鏡装置では、上述したように、撮像フレーム数が多くなるため、パスを1回に設定して撮像を行うと、撮像時間が後になるにつれて蛍光物質が褪色してしまい、例えば、一番最初の撮像位置におけるレイヤと、一番最後の撮像位置におけるレイヤとで、蛍光物質の量が大きく異なってしまう場合がある。

本実施形態によれば、複数パスを設定することが出来るので、レイヤ間での褪色による蛍光物質の量の差を低減することができ、レイヤ間での画質の差を低減することができる。

[0080] 図18は、複数のパスおよび複数の撮像位置での撮像により特定された複数のレイヤを示す模式図である。図18には、レイヤ数が3でパス数が2の場合が示されている。

[0081] 図19は、図18のパスを用いて、レイヤごとに色分けされた表示画像CL3を示す。ただし、図13と同様の理由により、白、ハッチング、黒を用いてカラーの代用とした。

[0082] 画像処理部7は、記憶装置43に記憶された蛍光の像のXYZ位置を呼び出し、少なくともレイヤを識別する情報に基づいて、色を割り当てる。画像処理部7は、全パスに含まれるレイヤ1の蛍光の像に白を割り当て、全パスに含まれるレイヤ2の蛍光の像にハッチングを割り当て、全パスに含まれるレイヤ3の蛍光の像に黒を割り当てた表示画像CL3を生成し、表示装置4

4に表示する。この場合に、レイヤ1からレイヤ3まで色を凡例として示すとともに、パスごとには区別されていないことを「全パス」の文字列等で示すことが好ましい。

[0083] 以上、本実施形態によれば、画像処理部7が複数のレイヤのいずれの撮像結果に基づいて特定された3次元位置であるかを視覚的に区別可能に表示するので、レイヤ間の撮像時間の違いにより生じる試料Wと対物レンズ間において生じるドリフト（位置ずれ）がどの程度あったかをユーザが容易に認識することができる。

[0084] 図20は、図18のレイヤを用いて、パスごとに色分けされた表示画像CL4を示す。ただし、白と黒を用いてカラーの代用とした。

[0085] 画像処理部7は、記憶装置43に記憶された蛍光の像のXYZ位置を呼び出し、少なくともパスを識別する情報に基づいて、色を割り当てる。図12の例において、画像処理部7は、パス1に含まれる全レイヤの蛍光の像に白を割り当て、パス2に含まれる全レイヤの蛍光の像に黒を割り当て、表示画像CL4を生成し、表示装置44に表示する。その場合に、画像処理部7は凡例として、パス1の色とパス2の色を示すとともに、レイヤごとには区別されていないことを「全レイヤ」の文字列等で示すことが好ましい。

[0086] 以上、本実施形態によれば、画像処理部7が複数のパスのいずれの撮像結果に基づいて特定された3次元位置であるかを視覚的に区別可能に表示するので、パス間において試料Wのドリフトがどの程度あったかをユーザが容易に認識することができる。

[0087] また、各撮像位置でフレーム数を全て撮像してから次の撮像位置に移動していくと、時間的に後の撮像位置ほど蛍光が退色してしまっており、十分な画質が得られないおそれがある。これに対し、図16のシーケンスを用いた実施形態によれば、各レイヤで用いるフレーム数を複数のパスに分散して撮像するので、時間的に後の撮像位置でも良好な画質を得ることができる。

[0088] なお、図11、図15、図18から図20では、3次元分布情報が「画像」として示されているが、これは説明のためのものである。すなわち、表示

装置 4 4 に「表示画像」として表示させる場合以外においては、画像処理部 7 は画像を生成しなくてよく、図 7 に示されるようなデータのまま扱えばよい。

[0089] なお、上記実施形態においては、駆動部 5 0 が対物レンズ 2 1 を光軸方向 5 a に移動することにより撮像位置を移動させた。これに代えて、駆動部 5 0 がステージ 2 を対物レンズ 2 1 の光軸方向 5 a することにより撮像位置を移動させてもよい。

[0090] また、2 種類の蛍光物質を用いる場合には、例えば複数パスのうち奇数のパスには一の蛍光物質を励起する波長の励起光を照射し、偶数のパスに他の蛍光物質を励起する波長の励起光を照射してもよい。

[0091] 以上、本発明を実施の形態を用いて説明したが、本発明の技術的範囲は上記実施の形態に記載の範囲には限定されない。上記実施の形態に、多様な変更または改良を加えることが可能であることが当業者に明らかである。その様な変更または改良を加えた形態も本発明の技術的範囲に含まれ得ることが、請求の範囲の記載から明らかである。

[0092] 請求の範囲、明細書、および図面中において示した装置、システム、プログラム、および方法における動作、手順、ステップ、および段階等の各処理の実行順序は、特段「より前に」、「先立って」等と明示しておらず、また、前の処理の出力を後の処理で用いるのでない限り、任意の順序で実現しうることに留意すべきである。請求の範囲、明細書、および図面中の動作フローに関して、便宜上「まず、」、「次に、」等を用いて説明したとしても、この順で実施することが必須であることを意味するものではない。

符号の説明

[0093] 1 顕微鏡装置、2 ステージ、3 光源装置、4 照明光学系、5 結像光学系、6 撮像部、7 画像処理部、8 制御装置、10 a 活性化光源、10 b 励起光源、11 a シャッター、11 b シャッター、13 ダイクロイックミラー、14 音響光学素子、15 レンズ、16 導光部材、17 レンズ、18 レンズ、19 フィルタ、20 ダイクロイックミラ

一、 21 対物レンズ、 24 フィルタ、 25 レンズ、 26 光路切替部
材、 28 レンズ、 29 フィルタユニット、 30 観察光学系、 31 ミ
ラー、 32 レンズ、 33 ミラー、 34 レンズ、 35 レンズ、 36
ミラー、 37 レンズ、 40 撮像素子、 41 制御部、 42 制御部、 43
記憶装置、 44 表示装置、 50 駆動部、 51 カバーガラス、 61 シ
リンドリカルレンズ、 100 画面、 110 画面、 150 画面、 152
領域、 154 領域、 156 ボックス、 157 ボックス、 158 ボ
ックス、 159 ボックス

請求の範囲

- [請求項1] 試料に含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光と、前記活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光を照射する照明光学系と、
- 対物レンズと、前記蛍光物質からの蛍光の少なくとも一部に対して非点収差を発生させる非点収差光学系を有し、前記蛍光の像を形成する結像光学系と、
- 前記結像光学系が形成した像を撮像する撮像部と、
- 前記試料における撮像位置を前記対物レンズの光軸方向に沿って移動する駆動部と、
- 制御部と
- を有し、
- 前記制御部は、前記撮像部に、第1の撮像位置および前記第1の撮像位置とは異なる第2の撮像位置において、それぞれ複数のフレーム数で撮像させることを特徴とする
- 顕微鏡装置。
- [請求項2] 前記制御部は、前記撮像部に、第1の撮像位置において第1のフレーム数で撮像させ、前記第2の撮像位置において、第1のフレーム数とは異なる第2のフレーム数で撮像させることを特徴とする
- 請求項1に記載の顕微鏡装置。
- [請求項3] 前記駆動部は、前記試料を保持するステージおよび前記対物レンズの少なくとも一方を前記対物レンズの光軸方向に移動させることにより、前記撮像位置を移動させることを特徴とする
- 請求項1または2に記載の顕微鏡装置。
- [請求項4] 前記第2の撮像位置と前記ステージとの距離が、前記第1の撮像位置と前記ステージとの距離よりも大きい場合、前記第2の撮像位置のフレーム数は、前記第1の撮像位置のフレーム数よりも多いことを特徴とする

請求項3に記載の顕微鏡装置。

[請求項5]

表示装置をさらに有し、

前記制御部は、前記複数のフレーム数の撮像により得られた第1の撮像位置における撮像結果に基づいて、第1の撮像位置における3次元画像を生成し、

前記複数のフレーム数の撮像により得られた第2の撮像位置における撮像結果に基づいて、第2の撮像位置における3次元画像を生成し、

前記第1の撮像位置における3次元画像と、第2の撮像位置における3次元画像とを異なる表示色で前記表示装置に表示させることを特徴とする

請求項1から4のいずれか1項に記載の顕微鏡装置。

[請求項6]

前記制御部は、前記第1の撮像位置における撮像と、第2の撮像位置における撮像とを行う撮像動作を複数回行うことを特徴とする

請求項1から4のいずれか1項に顕微鏡装置。

[請求項7]

表示装置をさらに有し、

前記制御部は、前記複数回の撮像動作により得られた第1の撮像位置における撮像結果に基づいて、第1の撮像位置における3次元画像を生成し、

前記複数回の撮像動作により得られた第2の撮像位置における撮像結果に基づいて、第2の撮像位置における3次元画像を生成し、

前記第1の撮像位置における3次元画像と、第2の撮像位置における3次元画像とを異なる表示色で前記表示装置に表示させることを特徴とする

請求項6に記載の顕微鏡装置。

[請求項8]

前記制御部は、前記第1の撮像位置における3次元画像と、第2の撮像位置における3次元画像とを異なる表示色で前記表示装置に表示させる場合に、対物レンズの光軸方向の指定された領域のみを表示さ

せることを特徴とする

請求項 5 または 7 に記載の顕微鏡装置。

[請求項9] 前記制御部は、前記第 1 の撮像位置における 3 次元画像と、第 2 の撮像位置における 3 次元画像とを異なる表示色で前記表示装置に表示させる場合に、重複領域のみを表示させることを特徴とする

請求項 5 または 7 に記載の顕微鏡装置。

[請求項10]

表示装置をさらに有し、

前記撮像動作毎に得られた前記第 1 の撮像位置および第 2 の撮像位置における撮像結果に基づいて、撮像動作毎の 3 次元画像を生成し、

前記撮像動作毎の 3 次元画像を互いに異なる表示色で前記表示装置に表示させることを特徴とする

請求項 6 に記載の顕微鏡装置。

[請求項11]

表示装置をさらに有し、

前記制御部は、前記複数回の撮像動作により得られた第 1 の撮像位置における撮像結果に基づいて、第 1 の撮像位置における 3 次元画像を生成し、

前記複数回の撮像動作により得られた第 2 の撮像位置における撮像結果に基づいて、第 2 の撮像位置における 3 次元画像を生成し、

前記撮像動作毎に得られた前記第 1 の撮像位置および第 2 の撮像位置における撮像結果に基づいて、撮像動作毎の 3 次元画像を生成し、

前記第 1 の撮像位置における 3 次元画像と、第 2 の撮像位置における 3 次元画像とを異なる表示色で表示装置に表示させる第 1 の表示モードと、前記撮像動作毎の 3 次元画像を互いに異なる表示色で前記表示装置に表示させる第 2 の表示モードとを切り替えることを特徴とする

請求項 7 に記載の顕微鏡装置。

[請求項12]

前記 3 次元画像は、前記蛍光物質の 3 次元位置情報を含むことを特徴とする

請求項 1 から 1 1 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡装置。

[請求項13]

前記制御部は、

前記非点収差に基づいて前記蛍光物質の 3 次元位置情報を算出することを特徴とする

請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡装置。

[請求項14]

試料に含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光と、前記活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光を照射する照明光学系と、

対物レンズと、前記蛍光物質からの蛍光の少なくとも一部に対して非点収差を発生させる非点収差光学系を有し、前記蛍光の像を形成する結像光学系と、

前記結像光学系が形成した像を撮像する撮像部と、

前記試料における撮像位置を前記対物レンズの光軸方向に沿って移動する駆動部とを有する顕微鏡装置において、

前記撮像部に、第 1 の撮像位置および前記第 1 の撮像位置とは異なる第 2 の撮像位置において、それぞれ複数のフレーム数で撮像させる撮像方法。

[請求項15]

試料に含まれる蛍光物質の一部を活性化する活性化光と、前記活性化された蛍光物質の少なくとも一部を励起する励起光を照射する照明光学系と、

対物レンズと、前記蛍光物質からの蛍光の少なくとも一部に対して非点収差を発生させる非点収差光学系を有し、前記蛍光の像を形成する結像光学系と、

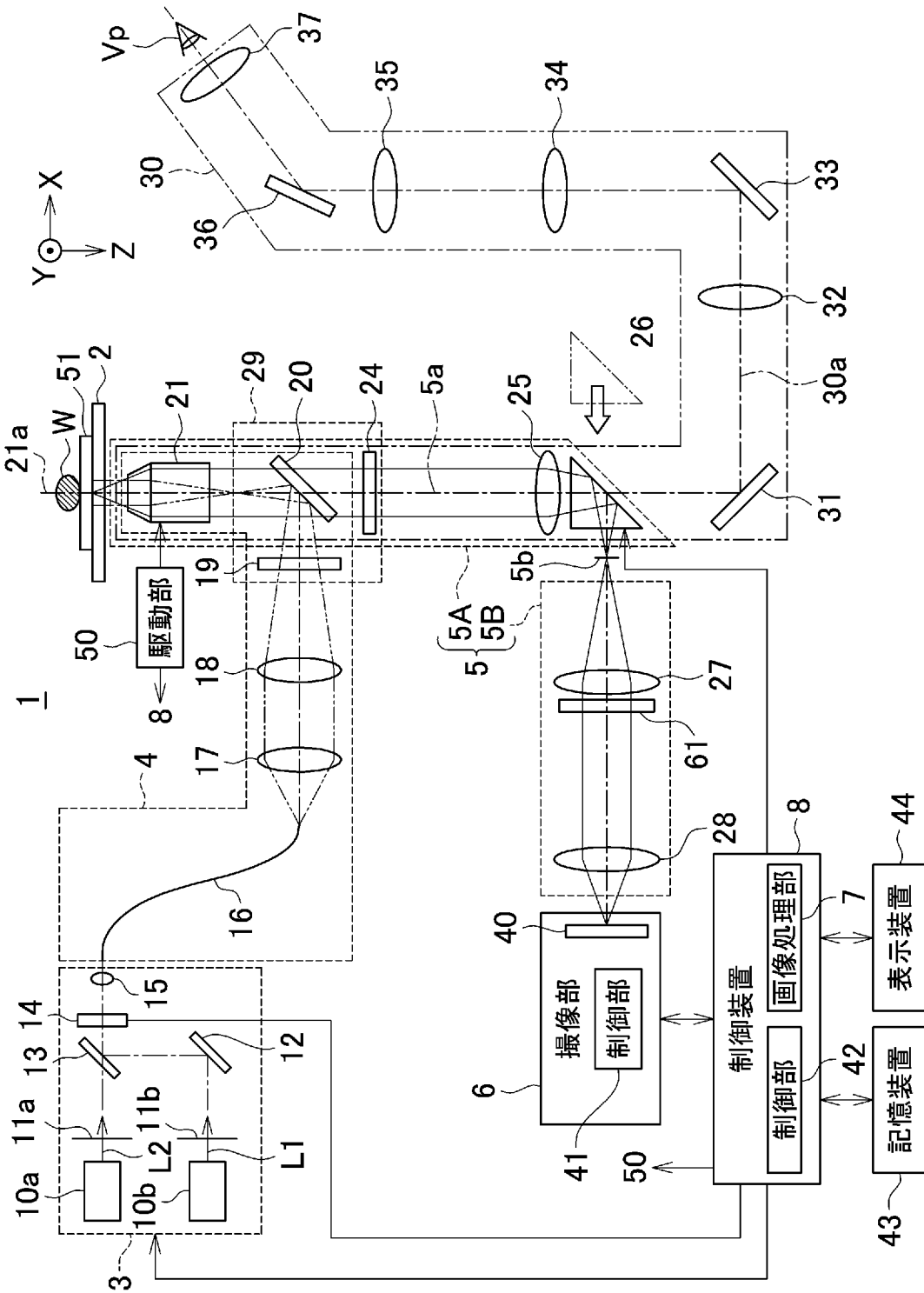
前記結像光学系が形成した像を撮像する撮像部と、

前記試料における撮像位置を前記対物レンズの光軸方向に沿って移動する駆動部とを有する顕微鏡装置を制御するコンピュータに、

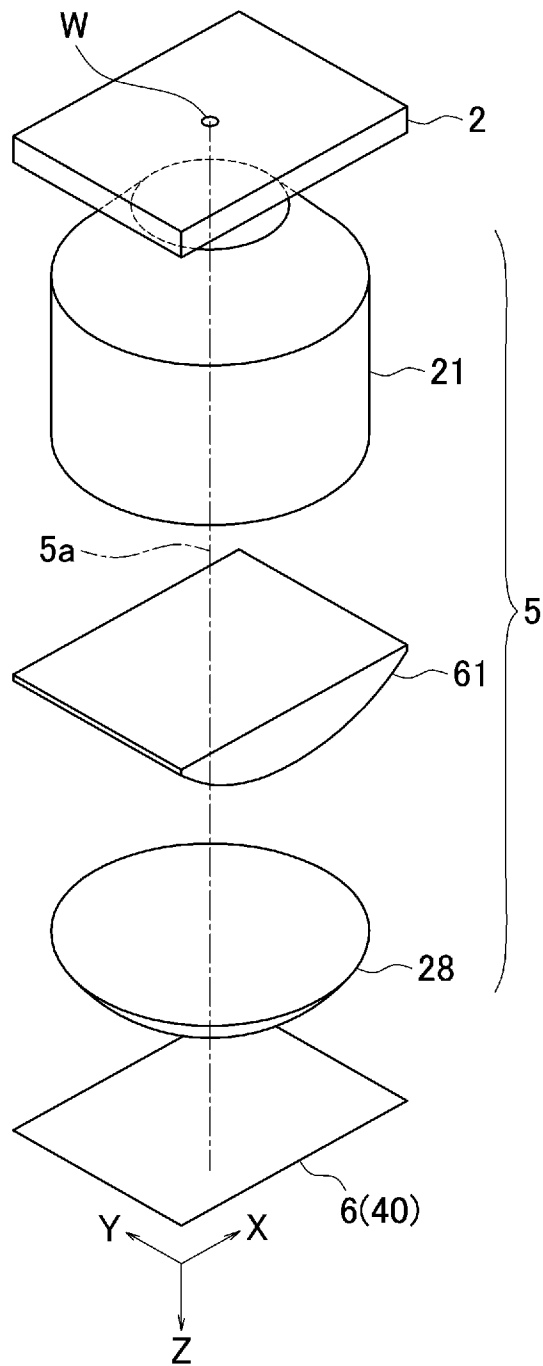
前記撮像部に、第 1 の撮像位置および前記第 1 の撮像位置とは異なる第 2 の撮像位置において、それぞれ複数のフレーム数で撮像させる

手順を実行させるプログラム。

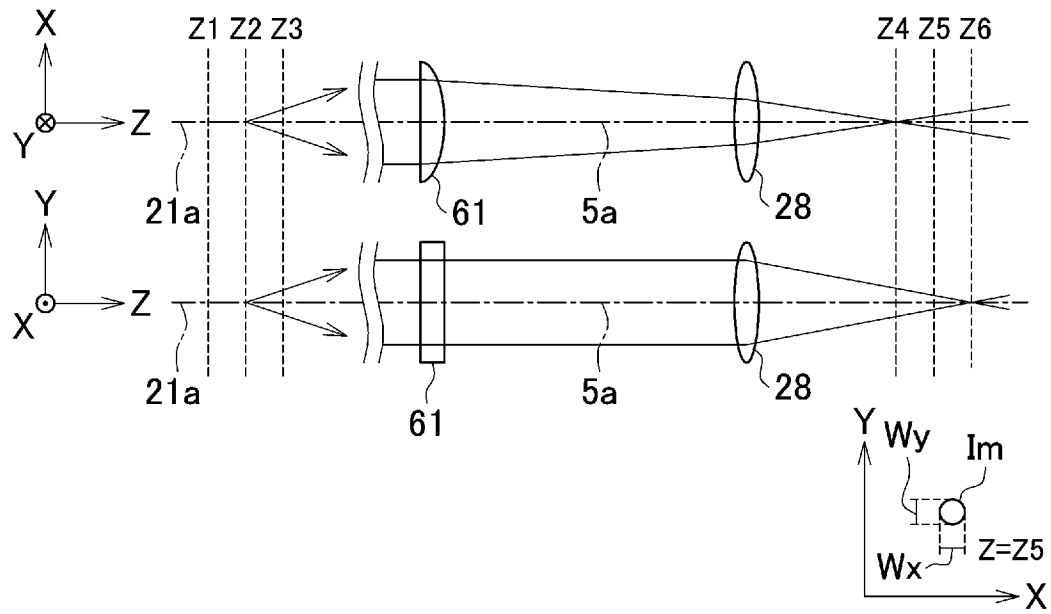
[図1]



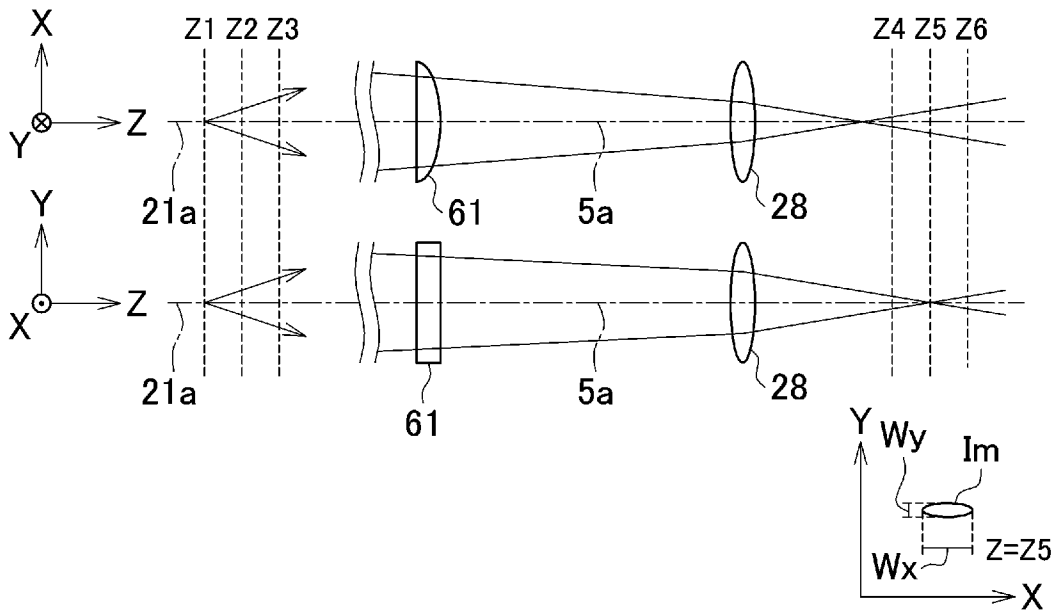
[図2]



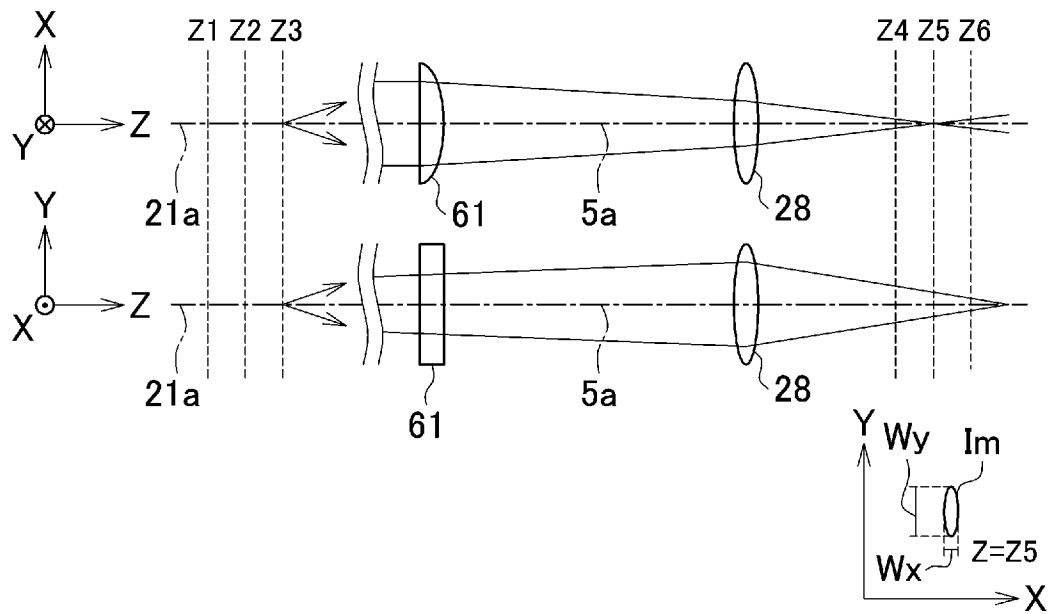
[図3]



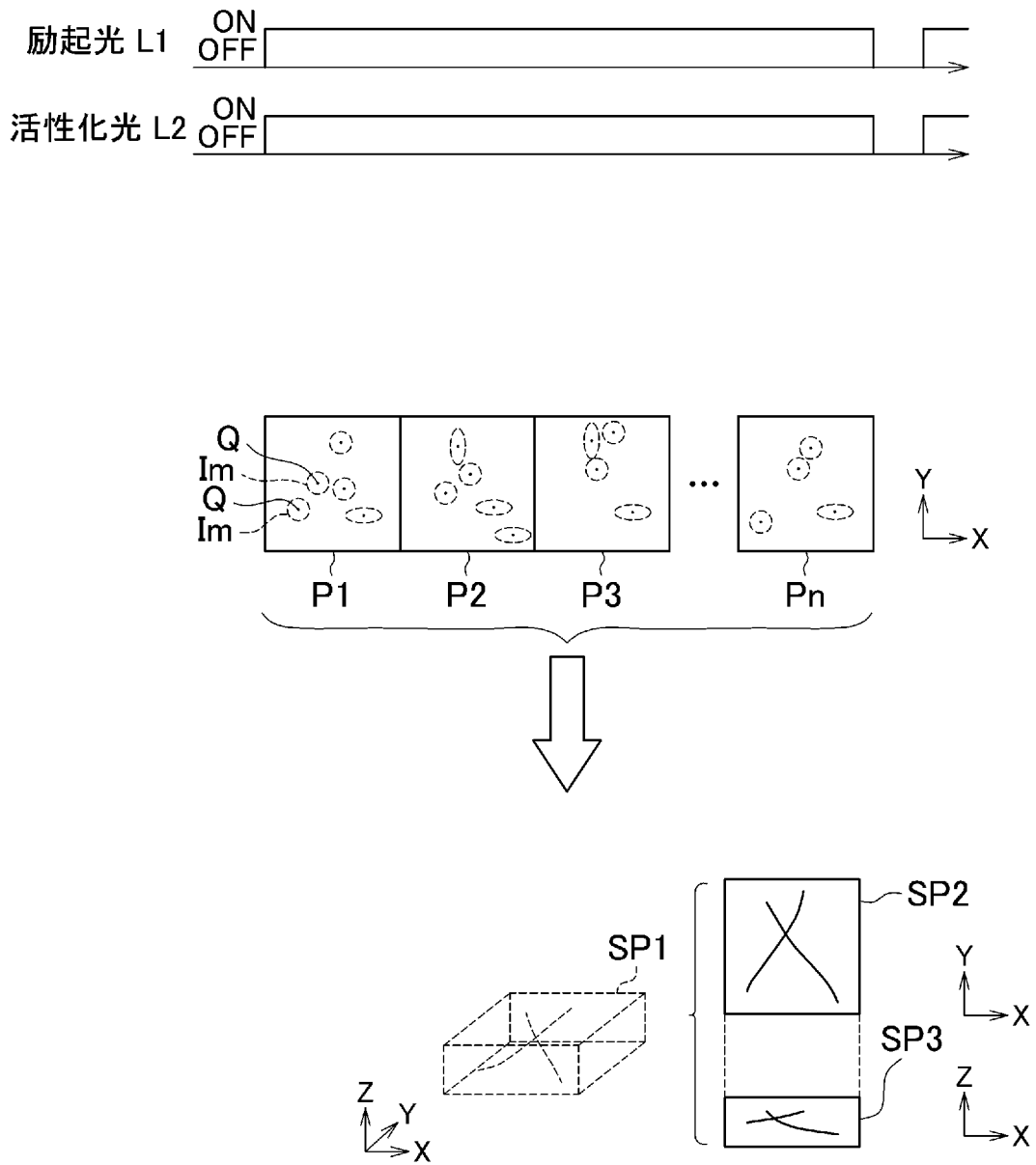
[図4]



[図5]



[図6]

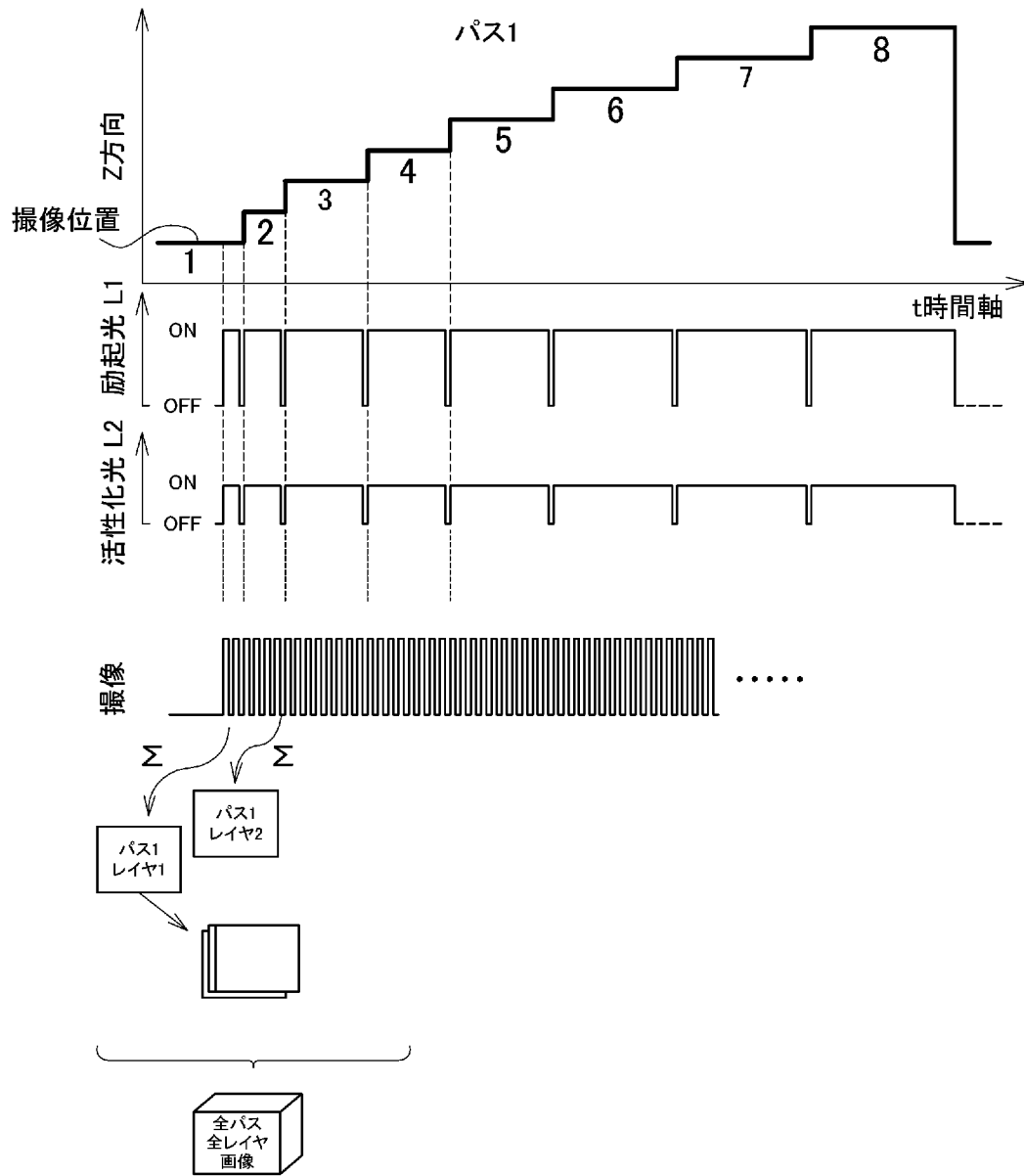


[図7]

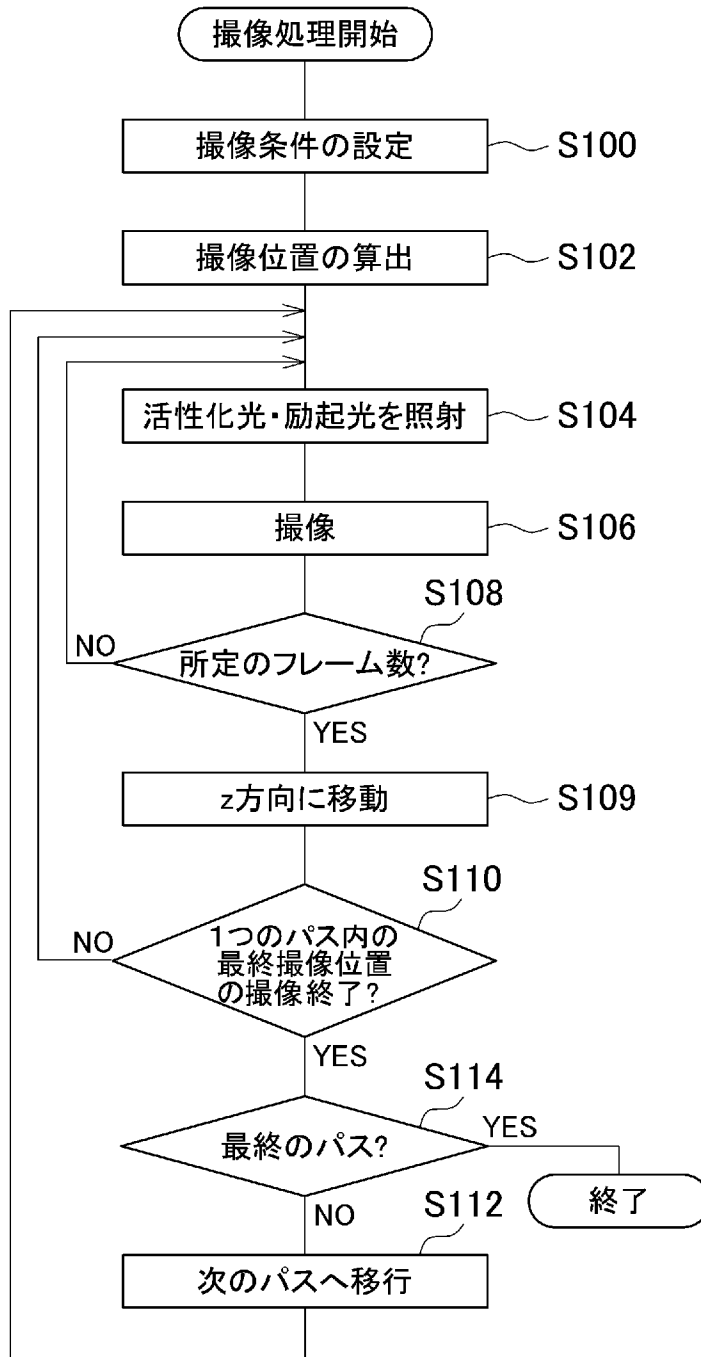
45

番号	X	Y	Z	B	W _x	W _y
1	x ₁	y ₁	z ₁	B ₁	W _{x1}	W _{y1}
2	x ₂	y ₂	z ₂	B ₂	W _{x2}	W _{y2}
• • •						

[図8]



[図9]



[図10]

100

撮像条件の設定

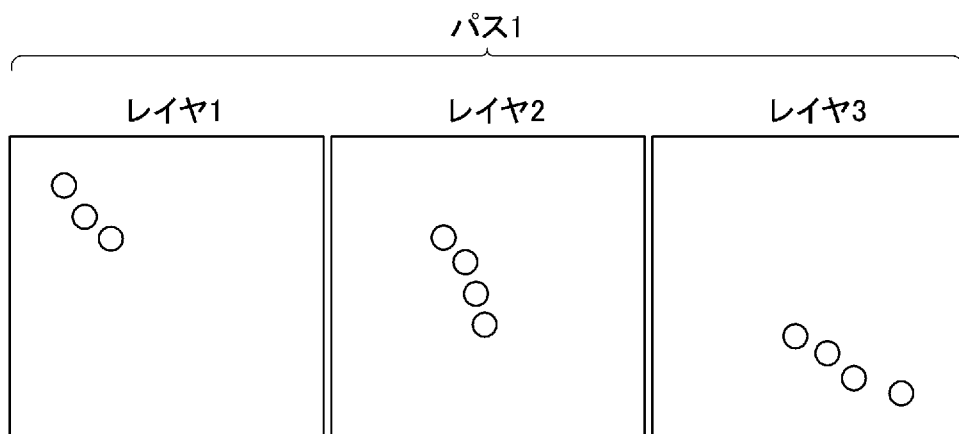
撮像位置

上端	<input type="text" value="1050"/>	nm	<input type="button" value="Set"/>
下端	<input type="text" value="0"/>	nm	<input type="button" value="Set"/>
Zステップサイズ	<input type="text" value="150"/>	nm	

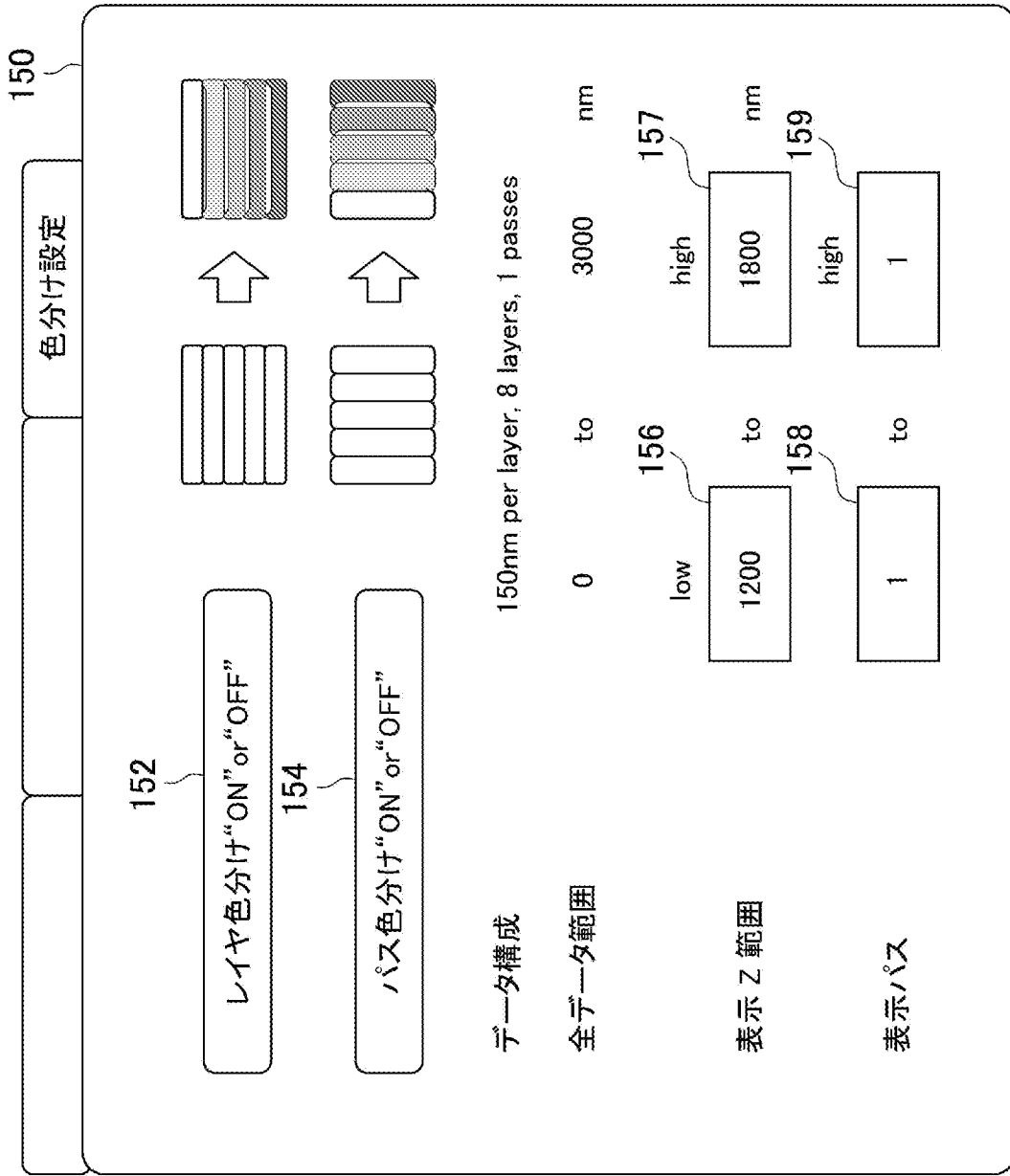
撮像位置	フレーム数
1~3	3000
4~5	4000
6~7	5000
8	6000

撮像順序	<input type="text" value="下から上"/>
ファイル名	<input type="text" value="C001"/>

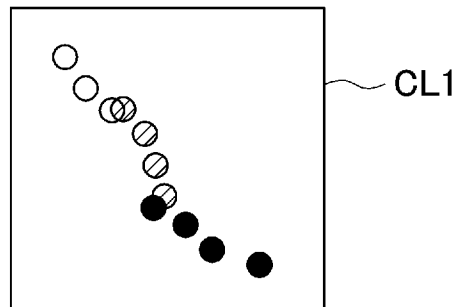
[図11]



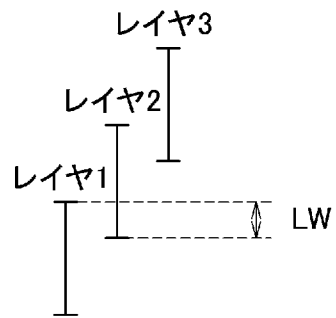
[図12]



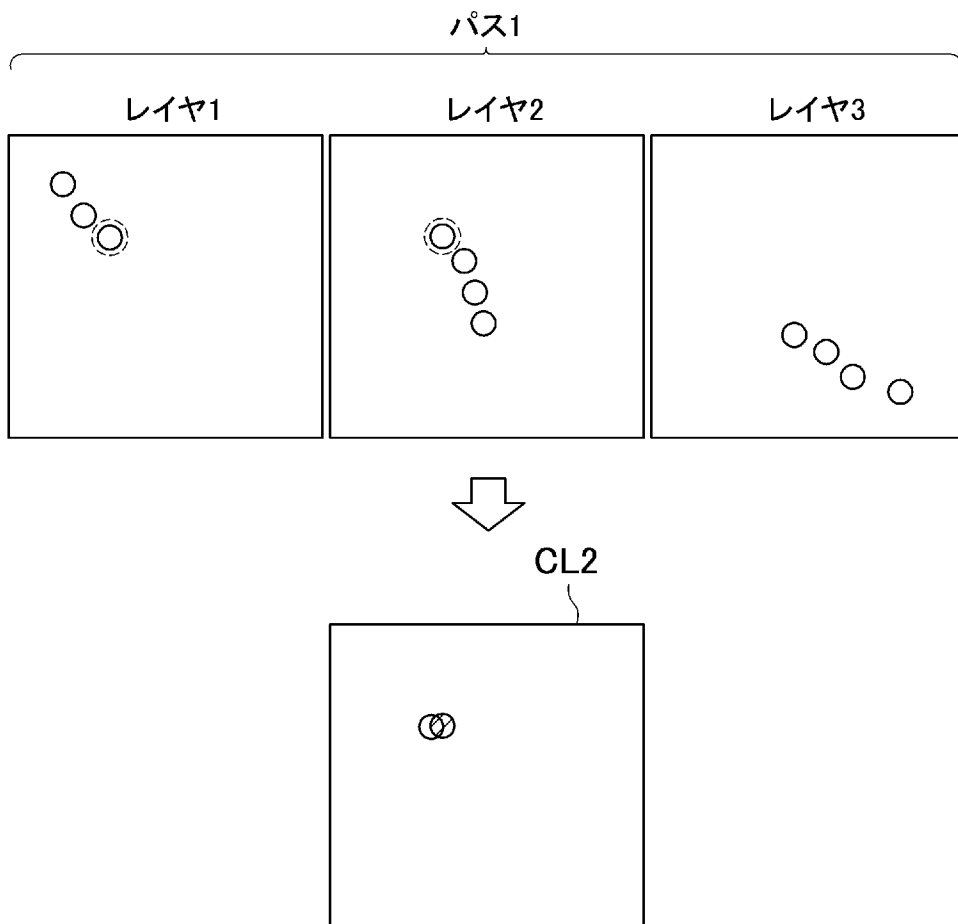
[図13]



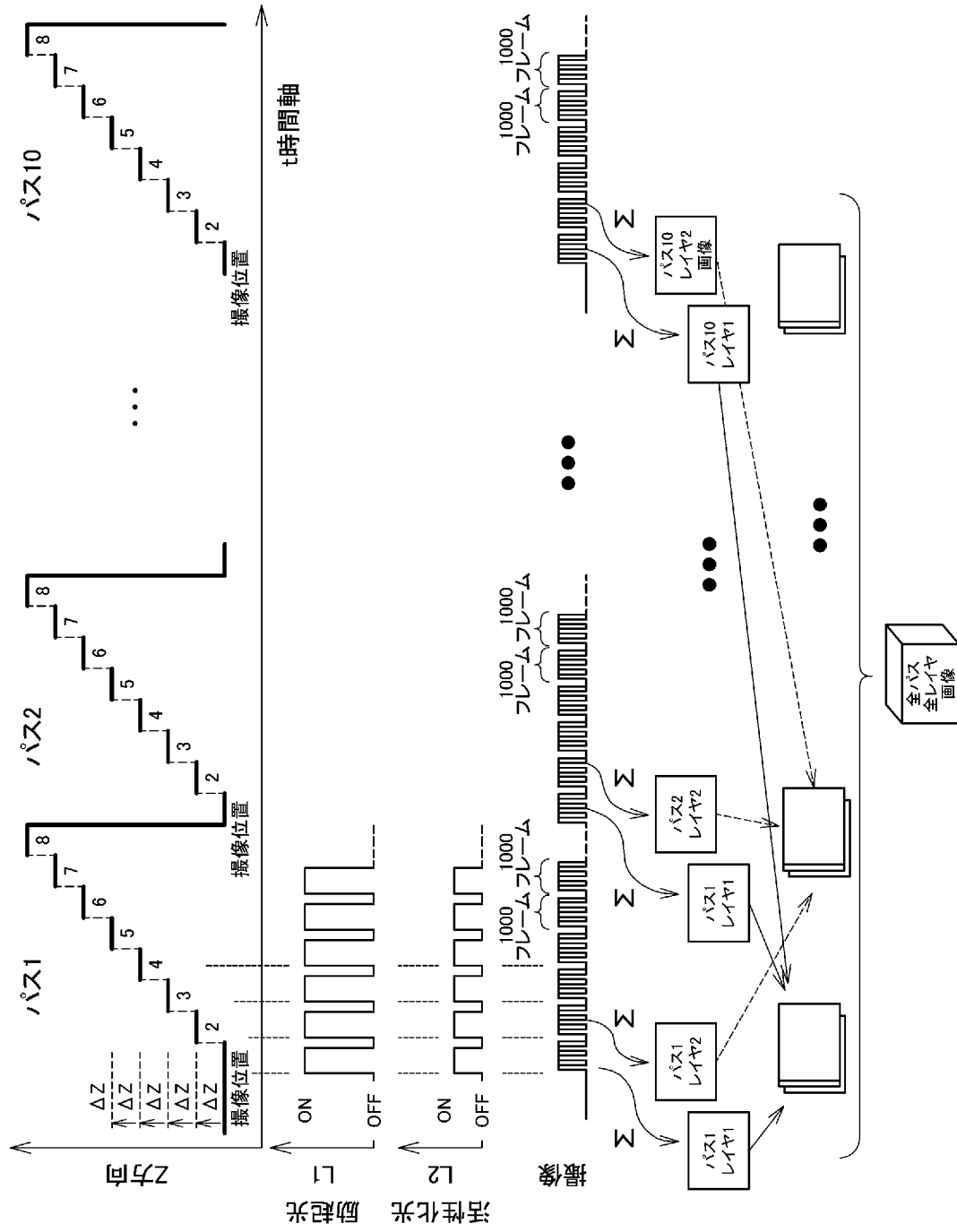
[図14]



[図15]



[図16]



[図17]

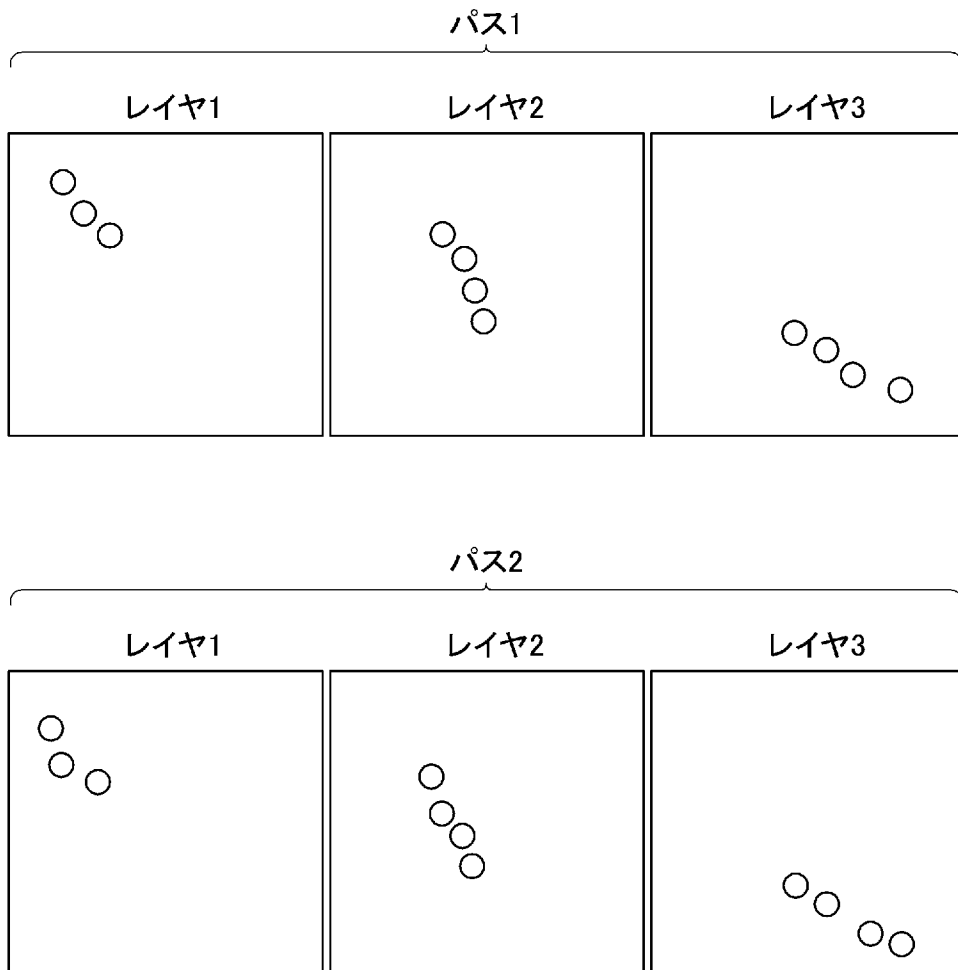
110

撮像条件の設定

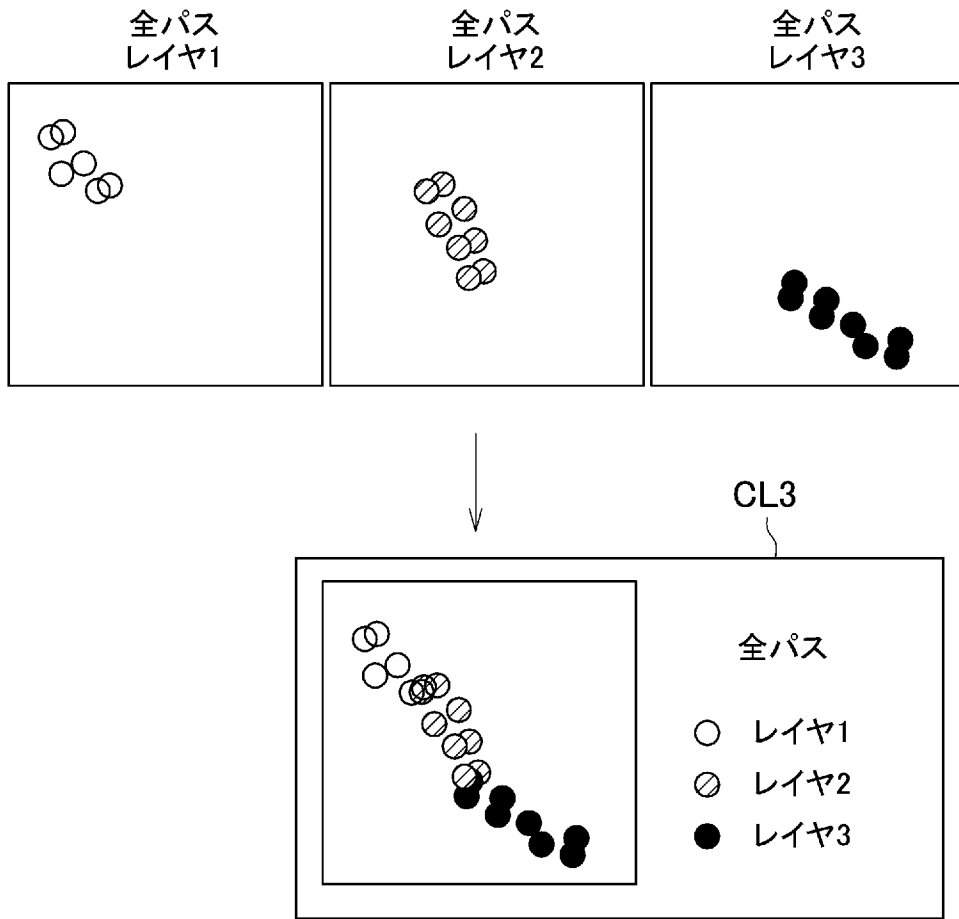
撮像位置

上端	<input type="text" value="1050"/>	nm	<input type="button" value="Set"/>
下端	<input type="text" value="0"/>	nm	<input type="button" value="Set"/>
Zステップサイズ	<input type="text" value="150"/>	nm	
パス数	<input type="text" value="10"/>		
全フレーム数	<input type="text" value="10000"/>		
撮像順序	<input type="text" value="下から上"/>		
ファイル名	<input type="text" value="C001"/>		

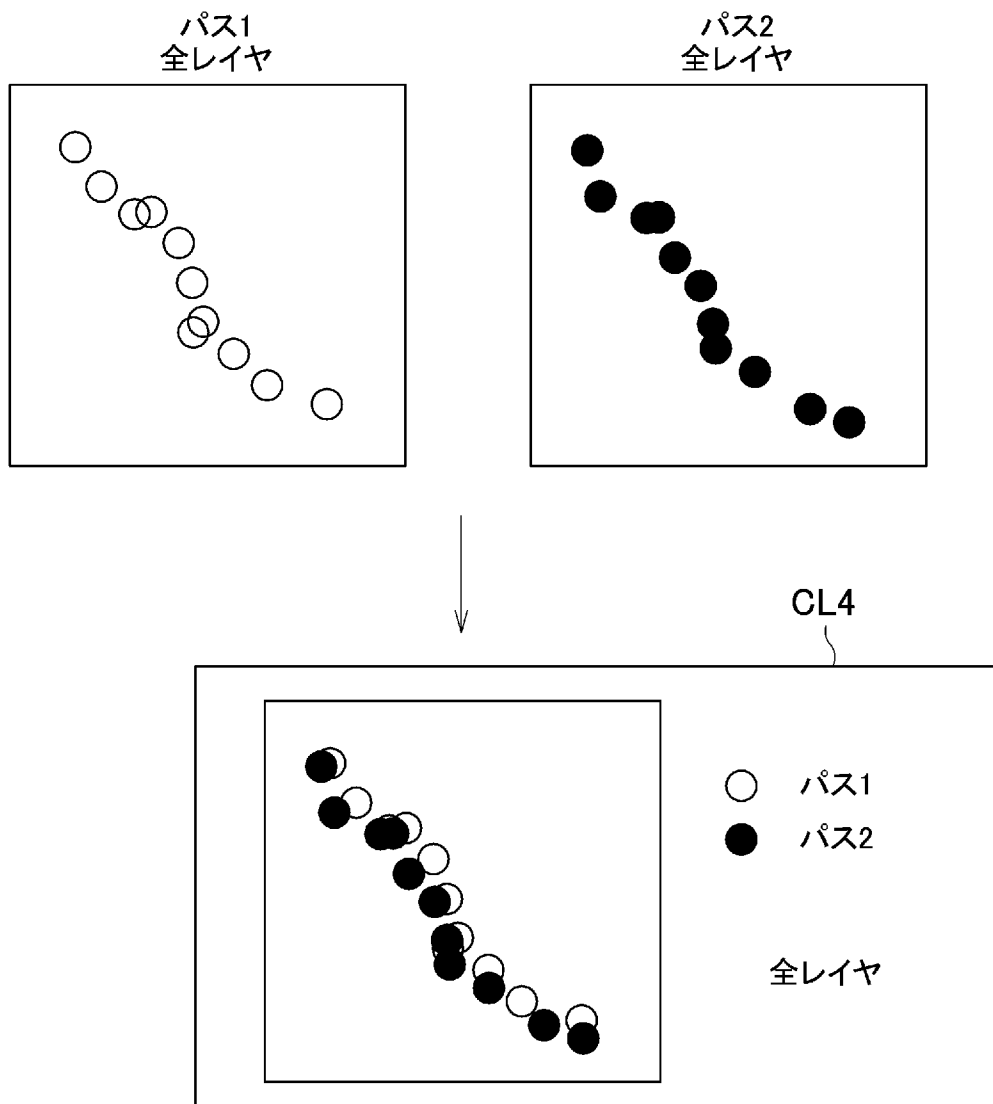
[図18]



[図19]



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/083511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G02B21/00(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, H04N5/225(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)
G02B21/00, G01N21/64, H04N5/225

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2016</i>
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2016</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2016</i>

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A A	JP 2013-015665 A (Nikon Corp.), 24 January 2013 (24.01.2013), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0042], [0092] to [0103]; fig. 7 (Family: none) JP 2014-089311 A (Nikon Corp.), 15 May 2014 (15.05.2014), entire text; all drawings (Family: none)	1-6, 8-10, 12-15 7, 11 1-15

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 16 February 2016 (16.02.16)	Date of mailing of the international search report 01 March 2016 (01.03.16)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/083511

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 2011-508214 A (President and Fellows of Harvard College), 10 March 2011 (10.03.2011), entire text; all drawings & WO 2009/085218 A1 entire text; all drawings & US 2011/0002530 A1 & EP 2232244 A & CN 101918816 A	1-15
A	WO 2011/152523 A1 (Nikon Corp.), 08 December 2011 (08.12.2011), entire text; all drawings & US 2013/0088776 A1 entire text; all drawings & EP 2579084 A1 & CN 102934005 A	1-15
A	JP 2015-506498 A (Carl Zeiss Microscopy GmbH), 02 March 2015 (02.03.2015), entire text; all drawings & US 2015/0002632 A1 entire text; all drawings & WO 2013/104483 A1 & EP 2802921 A	1-15
A	JP 2015-502566 A (Sanford-Burnham Medical Research Institute), 22 January 2015 (22.01.2015), entire text; all drawings & WO 2013/063096 A1 entire text; all drawings & US 2013/0100272 A1 & EP 2771882 A	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G02B21/00(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, H04N5/225(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. G02B21/00, G01N21/64, H04N5/225		
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 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年		
国際調査で利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)		
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
X A A	JP 2013-015665 A (株式会社ニコン) 2013.01.24, 全文、全図、特に、段落[0042]、[0092]-[0103]、図7等 (ファミリーなし) JP 2014-089311 A (株式会社ニコン) 2014.05.15, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-6, 8-10, 12-15 7, 11 1-15
<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 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 16.02.2016	国際調査報告の発送日 01.03.2016	
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) 殿岡 雅仁 電話番号 03-3581-1101 内線 3271	2V 4748

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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 2011-508214 A (プレジデント アンド フェロウズ オブ ハーバード カレッジ) 2011.03.10, 全文、全図 & WO 2009/085218 A1, 全文、全図 & US 2011/0002530 A1 & EP 2232244 A & CN 101918816 A	1-15
A	WO 2011/152523 A1 (株式会社ニコン) 2011.12.08, 全文、全図 & US 2013/0088776 A1, 全文、全図 & EP 2579084 A1 & CN 102934005 A	1-15
A	JP 2015-506498 A (カール ツァイス マイクロスコピー ゲーエムベークーハー) 2015.03.02, 全文、全図 & US 2015/0002632 A1, 全文、全図 & WO 2013/104483 A1 & EP 2802921 A	1-15
A	JP 2015-502566 A (サンフォードバーナム メディカル リサーチ インスティテュート) 2015.01.22, 全文、全図 & WO 2013/063096 A1, 全文、全図 & US 2013/0100272 A1 & EP 2771882 A	1-15