

(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
2010年3月18日(18.03.2010)

(10) 国際公開番号
WO 2010/029799 A1

- (51) 国際特許分類:
G02B 21/00 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/060644
- (22) 国際出願日: 2009年6月10日(10.06.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-235795 2008年9月13日(13.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町4-1-8 Saitama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 五十嵐 康伸(IGARASHI Yasunobu) [JP/JP]; 〒6300192 奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿舎C-303 Nara (JP). 小原 健(OBARA Takeshi) [JP/JP]; 〒9830825 宮城県仙台市宮城野区鶴ヶ谷北1-11-18 Miyagi (JP). 出口 雄規(DEGUCHI Yuki) [JP/JP]; 〒5200052 滋賀県大津市朝日が丘1-19-12-506 Shiga (JP). 鈴

木 健史(SUZUKI Takeshi) [JP/JP]; 〒3710027 群馬県前橋市平和町1-10 向町住宅1-402 Gunma (JP). 橋本 浩一(HASHIMOTO Koichi) [JP/JP]; 〒9800861 宮城県仙台市青葉区川内元支倉35 川内住宅3-301 Miyagi (JP).

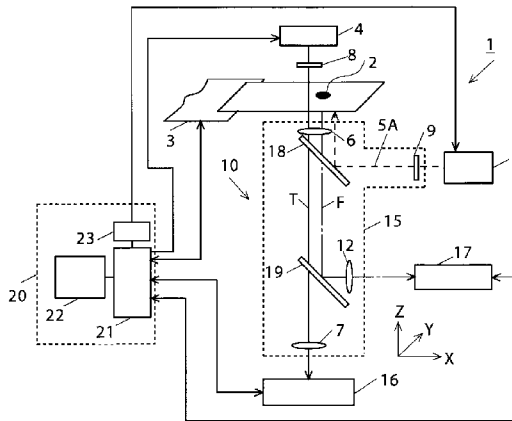
- (74) 代理人: 平山 一幸(HIRAYAMA Kazuyuki); 〒1600022 東京都新宿区新宿2-3-10 新宿御苑ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: MICROSCOPE DEVICE AND FLUORESCENT OBSERVING METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: 顕微鏡装置及びそれを用いた蛍光観察方法

[図1]



(57) Abstract: A microscope device and a fluorescent observing method both for controlling the position of an object to be observed such as cells and controlling fluorescence records. The microscope device (1) includes a stage (3) on which the object (2) is placed, a light source (4) for illuminating the object (2), an exciting light source (5) for causing the object (2) to emit fluorescence F, an image information detecting section (16) for detecting image information on the basis of light T produced by the object (2), a fluorescent image information detecting section (17) for detecting fluorescent image information attributed to the fluorescence F, and a control section (20) for determining a fluorescent observation region of the object (2) according to a motion model of the object (2) and the image information about the object (2) inputted from the image information detecting section (16) and acquiring the image information about the object (2) and the fluorescent image information from portions spaced at predetermined distances in the fluorescent observation region.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2010/029799 A1



(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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

細胞等の被観察物の位置制御と蛍光記録を制御する顕微鏡装置及び蛍光観察方法を提供する。顕微鏡装置 1 は、被観察物 2 を載置するステージ 3 と、被観察物 2 の照明用光源 4 と、被観察物 2 に蛍光 F を励起する励起光用光源 5 と、被観察物 2 で生じた光 T による画像情報を検出する画像情報検出部 16 と、蛍光 F による蛍光画像情報を検出する蛍光画像情報検出部 17 と、被観察物 2 の運動モデルと画像情報検出部 16 から入力された被観察物 2 の画像情報とに基づいて被観察物 2 の蛍光観察領域を決定し、画像情報検出部 16 から入力された被観察物 2 の画像情報と蛍光画像情報検出部 17 から入力された蛍光画像情報とを蛍光観察領域内の所定の間隔毎に取得する制御部 20 と、を備える。

明 細 書

発明の名称：顕微鏡装置及びそれを用いた蛍光観察方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体組織等の蛍光観察などに使用される顕微鏡装置及びそれを用いた被観察物の蛍光観察方法に関する。

背景技術

[0002] 分子生物学分野等において、生体組織や細胞内イオン、分子等の観察は必須の技術である。光学顕微鏡は、主に生体組織を観察するときに用いられる。また、レーザー共焦点顕微鏡は、光を生体細胞の一部に照射し、その照射位置を移動させ、細胞の一部を観察するときに用いられる。

[0003] 光学顕微鏡の主な観察技術の一つに、生体組織の細胞内のイオンや分子に蛍光色素を付け、その蛍光色素に励起光を照射し、励起された蛍光色素が発する蛍光を観察する蛍光観察法がある。

蛍光と励起光の波長は異なっている。従って、蛍光を解析することで細胞内分子の検出や濃度の計測が可能になる。このため、蛍光観察は以下の長所を持つ。

(i) イオンや分子の大きさでも観察できる。

(ii) 特定のイオンや分子のみを観察できる。

(iii) 蛍光の明るさがイオンや分子濃度に応じて変化するので、これらの濃度を測定することができる。

[0004] しかしながら、一般に蛍光観察は以下の短所も有している。

(i) 励起光の波長帯域が紫外の場合、励起光が細胞にとって有毒となる。

(ii) 励起光を当て続けると蛍光色素が退色する。退色とは、蛍光の強さが弱まることである。

[0005] 蛍光観察が可能な蛍光顕微鏡を使用して動く細胞を観察していると、細胞が顕微鏡の視野外に出て観察が中断してしまう場合がある。

[0006] この問題の解決方法として、(1) 対物レンズの倍率を下げて視野を広げ

る、(2) 機械的又は化学的に細胞の動きを抑制する、(3) ステージを動かし細胞の位置を視野の中心にする。しかし、(1) の方法は空間解像度が低下し、(2) の方法は細胞へ悪影響を及ぼす可能性がある。

[0007] 上記(3)の解決方法に関して特許文献1及び2には、微小な観察物を観察するために被観察物を追跡する機構を備えた光学顕微鏡が開示されている。これらの光学顕微鏡は、透過光を用いた細胞位置及び観察領域の制御と透過光記録とを行うことができる。

[0008] 特許文献3～5には、蛍光を用いた細胞位置及び観察領域の制御と蛍光記録とを行うことができる蛍光顕微鏡が開示されている。

[0009] 非特許文献1～5には、比較的大きな被観察物として動くゾウリムシを視野に固定して観察する方法が報告されている。

[0010] 培養液中を自由に動くことが可能な細胞のうち、医学及び生物学分野で重要視されているものとして、細菌やウイルスから人体を守る機能を持つ免疫細胞が挙げられる(非特許文献6参照)。

[0011] 免疫機能に関連する細胞内分子は数多く存在するが、それらの分子の検出や分子濃度の時間変化を計測するためには蛍光観察を用いなければならない。

[0012] 免疫細胞の中でも、スライドガラスの表面にはあまり付着せず、浮遊している細胞は浮遊細胞に分類される。シャーレ中の浮遊細胞は、培養液の対流、重力、シャーレの壁及び底部、水面及び細胞同士の相互作用などにより、常に位置を変えている。浮遊細胞の観察には、例えば非特許文献1で報告されている奥らの手法を用いて、一つの細胞を追跡する方法も考えられる。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：特開平5-80255号公報

特許文献2：特開平7-2535487号公報

特許文献3：特開平7-261097号公報

特許文献4：特開2005-214924号公報

特許文献5：特開2006-292420号公報

特許文献6：WO2003/102636号公報

非特許文献

[0014] 非特許文献1：H. Oku, N. Ogawa, Ishikawa, K. Hashimoto, “Two-dimensional tracking of a motile micro-organism allowing high-resolution observation with various imaging techniques”, Review of Scientific Instruments, Vol. 76, No. 3, 2005

非特許文献2：H. Oku, M. Ishikawa, Theodorus, and K. Hashimoto, “High-speed autofocusing of a cell using diffraction patterns”, Optics Express, Vol. 14, No. 9, pp. 3952-3960, 2006

非特許文献3：奥寛雅，石井抱，石川正俊：マイクロビジュアルフィードバックシステム，電子情報通信学会誌 D-II，Vol. J84-D-II，No. 6，pp. 994-1002，2001

非特許文献4：奥寛雅，石川正俊：キロヘルツオーダーで応答可能な高速ビジョンチップ用可変焦点レンズの構造，光学，Vol. 31，No. 10，pp. 758-764，2002

非特許文献5：橋本浩一：微生物を用いたアクティブセンシング，SORST ジョイントシンポジウム（6）講演要旨集，pp. 23-26，2007年1月30日

非特許文献6：D. M. デイビス：会話する免疫細胞，日経サイエンス，pp. 52-60，2006年5月号

非特許文献7：谷村保明：白血球分類の自動化，MEDICAL IMAGING TECHNOLOGY，Vol. 14，No. 1，pp. 14-22，1996

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 蛍光観察パラメータは、現在、観察者が経験則に従って決めている。つまり、客観的評価に従って決定しているものではないというのが現状である。この場合、細胞の位置、分布、種類等が変化しても、観察者は臨機応変に蛍光観察パラメータを調整することも困難になっている。

観察者が多くの細胞を観察しようとして、励起光の照射範囲や照射時間を過剰に広げた場合には、細胞と蛍光色素に不必要な悪影響を与えることになる。また、取得される蛍光画像データが大量となり、解析に多くの時間が掛かるようになる。

[0016] 従来の蛍光顕微鏡においても、励起光の種類や強度を自動的に制御することで細胞内の複数のイオンや分子の活性化状態を継時的に観察し、一回の実験中に起こった細胞内の複数のイオンや分子の相互作用を一括して可視化することが行われてきた。しかしながら、この自動制御は、予め決められた時間スケジュールに従ったものであるか、蛍光画像から得られる細胞情報と連動したものであった。

[0017] 蛍光画像だけを制御に用いた場合、蛍光は光の強度が弱いために制御用の画像を得るための露光時間が長くなる。つまり、制御にかかる時間が長くなってしまふ。このため、細胞が移動する最大速度が早いと、制御が有効に機能しなくなる場合が多くなる。このような制御法は、本来動かない細胞を長時間観察した際に起こるずれを補正することを主目的としていた。

[0018] 本発明は上記課題に鑑み、被観察物からの透過光等を制御に用いることで、蛍光観察時の被観察物の位置や観察領域等の自動制御を行うことができる、顕微鏡装置及びそれを用いた被観察物の蛍光観察方法を提供することを目的としている。

[0019] 上記目的を達成するため、本発明の顕微鏡装置は、被観察物を載置するステージと、被観察物に照明光を照射する第1の光源と、被観察物に蛍光を励起するための励起光を照射する第2の光源と、上記照明光によって得られた被観察物の画像情報を検出する画像情報検出部と、上記励起光によって被観察物に生じた蛍光により画像情報を検出する蛍光画像情報検出部と、被観察物の運動モデルと画像情報検出部から入力された被観察物の画像情報とに基づいて被観察物の蛍光観察領域を決定し、画像情報検出部から入力された被観察物の画像情報と蛍光画像情報検出部から入力された蛍光画像情報とを蛍光観察領域内の所定の間隔毎に取得する制御部と、を備えたことを特徴とす

る。

運動モデルとは、被観察物が持つ物理学的特性あるいは化学的特性の内、特定の次元、あるいは特定の次元の組み合わせ、あるいは特定の次元の重み付き組み合わせに注目し、その次元上における被観察物の時空間変化を予測することを目的としたモデルのことを意味する。例えば、被観察物の位置、速度、分布、種類、形状、イオン濃度、分子濃度等の何れか又はこれらの組み合わせの時空間変化を表す数理モデルを意味する。

[0020] 上記構成において、制御部は、好ましくは、蛍光観察領域をPID制御等の古典制御、最適制御、準最適制御等の現代制御、 H_∞ 制御、サンプル値制御、有限時間整定制御、適応制御等のポスト現代制御論、ニューラルネットワーク制御、ファジィ制御、遺伝的アルゴリズム制御等の知的制御に従って決定する。

PID制御とは、目標値と出力値との偏差の最小化を、偏差に比例する項、偏差の積分項、および偏差の微分項の何れか又はこれらの組み合わせにより表現される制御則に従って行う制御手法である。

最適制御とは、蛍光観察の効率を示す評価関数を作成し、それを最小化もしくは最大化することで、最適な制御則を導出する制御手法である。

準最適制御とは、蛍光観察の効率を示す評価関数を作成し、それを局所的に最小化もしくは最大化することで、局所的に最適な制御則を導出する制御手法である。

制御部は、好ましくは、被観察物の運動モデルに従って蛍光観察領域の中心位置を決定する。制御部は、好ましくは、第1の光源を制御するための第1光源制御部と第2の光源を制御するための第2光源制御部とを備えている。

ステージは、好ましくは、被観察物の位置を移動させる三次元ステージである。

蛍光画像情報検出部は、好ましくは、少なくとも1波長以上の蛍光を分離する波長選択手段を備えている。

好ましくは、第2の光源と被観察物との間に配設される第1のピンホールと蛍光と蛍光画像情報検出部との間に配設される第2のピンホールとを備えている。好ましくは、第1のピンホール又は第2のピンホールを移動及び／又は回転させるピンホール駆動部を、備えている。

好ましくは、第1の光源と被観察物との間に配設される対物レンズと対物レンズの駆動部とを備えている。好ましくは、被観察物で生じた光と前記画像情報検出部との間に配設される結像レンズと、結像レンズの駆動部と、を備えている。好ましくは、蛍光と蛍光画像情報検出部との間に配設される結像レンズと、結像レンズの駆動部と、を備えている。

好ましくは、被観察物を収容しかつ雰囲気ガスで満たされる環境制御部を備えている。環境制御部は、雰囲気ガスの種類、雰囲気ガスの温度を制御するものである。雰囲気ガスとして、窒素ガス（単体）、酸素ガス（単体）、二酸化炭素（単体）、空気（混合物）、およびそれらの混合ガスを利用することができる。環境制御部は、好ましくは、複数の被観察物を収容することができる収容部を備えている。

好ましくは、被観察物を刺激する被観察物刺激手段を備えている。被観察物に与える刺激として、例えば電氣的刺激、磁氣的刺激、力学的刺激、超音波刺激、温度的刺激、化学的刺激、光刺激等を利用することができる。被観察物刺激手段としては、例えば被観察物に電氣的刺激や磁氣的刺激を与えるために、電極、電流、電池、抵抗、コンデンサ、磁石、コイル、超伝導体、完全導体、電気伝導体、半導体、絶縁体、誘電体、圧電体、焦電体、強誘電体、イオン伝導体等からなる電氣的刺激制御装置を利用することができる。例えば被観察物に力学的刺激を与えるために、短針、プローブ、アクチュエータ、圧電体、遠心機、重り、ばね等からなる力学的刺激制御装置を利用することができる。或いは、被観察物に超音波刺激を与えるために、電歪振動子、磁歪振動子等の超音波刺激制御装置を利用することができる。或いは、例えば被観察物に温度的刺激を与えるために、ヒーター、クーラー、熱伝導体、温度計、サーモグラフィ等からなる温度的刺激制御装置を利用すること

ができる。さらには、例えば被観察物に化学刺激を与えるために、化学物質の濃度もしくは状態を時空間変化させる、ピペット、ポンプ、シリンジ、プロペラ、スクリュー、マイクロ流体デバイスからなる化学的刺激制御装置を利用することができる。例えば被観察物に光刺激を与えるために、ミラー、プリズム、フィルタ、ランプ、レーザー、メーザー等の光刺激制御装置を利用することができる。

これらの刺激制御装置及びその部材が相互に補完的であることは勿論である。例えば、光刺激制御装置は、ケージド化合物に光を当てて分解することで、細胞内外の化学物質の濃度もしくは状態を時空間変化させることができ、化学的刺激制御装置にもなりうる。また、光刺激制御装置は、光で測定液を温めることができ、温度的刺激制御装置にもなりうる。

[0021] 上記目的を達成するため、本発明の蛍光観察方法は、被観察物の画像情報と被観察物の運動モデルとに基づいて被観察物の蛍光観察領域を決定する第1段階と、蛍光観察領域内の所定の位置で蛍光画像情報を取得する第2段階と、を備えている。

[0022] 上記構成において、第1段階の蛍光観察領域を、好ましくは、PID制御等の古典制御、最適制御、準最適制御等の現代制御、 H_{∞} 制御、サンプル値制御、有限時間整定制御、適応制御等のポスト現代制御論、ニューラルネットワーク制御、ファジィ制御、遺伝的アルゴリズム制御等の知的制御に従って決定する。

第1段階と第2段階との間において、好ましくは、被観察物の画像情報と被観察物の運動モデルとの少なくとも一方に基づいて蛍光観察領域の中心位置を決定する。第2段階において、好ましくは、被観察物の画像情報を取得する。各段階を、蛍光観察領域内の所定の位置毎に所定の回数繰り返し行うようにすれば好ましい。

運動モデルのパラメータは、好ましくは、被観察物の位置、速度、分布、種類、イオン濃度、分子濃度等の何れか又はこれらの組み合わせからなる。

発明の効果

[0023] 本発明の顕微鏡装置によれば、被観察物からの画像情報と被観察物の運動モデルに基づいて蛍光観察領域を決めるので、蛍光観察を自動的に行うことができる。

[0024] 本発明の顕微鏡装置を用いた蛍光観察方法によれば、被観察物の運動モデルに基づいて評価関数と自動制御則を導出するために被観察物の位置、分布、種類、状態、イオン濃度、分子濃度等をフィードバック情報として用いることで、被観察物の動的変化に対しても臨機応変かつ自動的に蛍光観察パラメータを調整することができる。

図面の簡単な説明

- [0025] [図1]本発明の第1実施形態に係る顕微鏡装置の構成を示す模式図である。
- [図2]蛍光観察領域のモデルを示す図である。
- [図3]上記第1実施形態に係る顕微鏡装置を用いた蛍光観察手順を示すフロー図である。
- [図4]第2実施形態に係る顕微鏡装置の構成を示す模式図である。
- [図5]第3実施形態に係る顕微鏡装置の構成を示す模式図である。
- [図6]第4実施形態に係る顕微鏡装置の構成を示す模式図である。
- [図7]第5実施形態に係る顕微鏡装置の構成を示す模式図である。
- [図8]第6実施形態に係る顕微鏡装置の構成を示す模式図である。
- [図9]第7実施形態に係る顕微鏡装置の構成を示す模式図である。
- [図10]第8実施形態に係る顕微鏡装置の構成を示す模式図である。
- [図11]環境制御部の構成を示す模式図で、(A)は平面図、(B)は(A)のX-Xに沿った断面図である。
- [図12]複数の被観察物の観察ができる環境制御部の別の構成を示す模式図で、(A)は平面図、(B)は(A)のX-Xに沿った断面図である。
- [図13]観察開始直後の細胞分布の一例を示す図である。
- [図14]蛍光観察手順において、制御量 $U(k)$ を用いた実施例の評価関数 J と、蛍光観察領域幅を固定した場合の比較例の評価関数 J と、を比較した模式図である。

発明を実施するための最良の形態

[0026] 以下、この発明の実施の形態について図面を参照して詳細に説明する。各図において同一又は対応する部材には同一符号を用いる。

(第1実施形態)

図1は本発明の第1実施形態に係る顕微鏡装置1の構成を示す模式図である。第1実施形態に係る顕微鏡装置1は、被観察物2を載置し、被観察物2の位置を自由に移動し得るステージ3と、光学系10と、ステージ3の位置等を制御する制御部20と、を備えている。

光学系10は、被観察物2の像や位置を検出するために被観察物2に照明光を照射する照明用光源4と、被観察物2から生じる蛍光を励起するための励起光を照射する励起用光源5と、照明用光源4の光が照射されて被観察物2から得られた透過光Tの光路、励起光5Aを被観察物2に導く光路及び被観察物2によって生じた蛍光Fの光路を形成するための光学部品を配置した鏡筒部15と、鏡筒部15から出射した被観察物2からの透過光からなる画像情報を検出する画像情報検出部16と、鏡筒部15から出射された被観察物2の蛍光画像情報を検出する蛍光画像情報検出部17と、を有している。被観察物2は、例えば生体試料である細胞等であってよい。

[0027] ステージ3には被観察物2が載置され、後述する制御部20により被観察物2の位置が制御される。このステージ3は、所謂電動ステージであり、被観察物2の載置される二次元の平面(X-Y平面)で駆動制御されるXYステージでも、又は三次元で駆動制御されるXYZステージであってもよい。三次元の駆動はマニピュレータで行ってもよい(非特許文献3参照)。

ここで、観察領域のXY軸方向に関する位置制御は、照明用光源4や励起用光源5の照射位置、後述するピンホールの配置される位置を制御してなされてもよい。観察領域のZ軸方向に関する位置制御は、後述する対物レンズ、結像レンズ、ピンホールの配置される位置を制御してなされてもよい(特許文献6、非特許文献2、4参照)。

[0028] 照明用光源4が透過光用の光源である場合、照明用光源4は、被観察物2

が吸収する波長又は反射する波長を含む光を発するものであれば何でもよい。このような照明用光源 4 としては、ハロゲンランプ等の各種ランプ、発光ダイオード、各種レーザーを使用することができる。透過光 T が励起光 5 A や蛍光 F と干渉しないように、照明用光源から出力される光のうち励起光 5 A や蛍光 F と同じ波長帯は光学フィルタ 8 等でカットされることが望ましい。照明用光源 4 から被観察物 2 へ照射された照明光が、被観察物 2 からの透過光 T や反射光となって画像情報検出部 16 で検出される。被観察物 2 からの画像は、所謂明視野像や暗視野像等の画像情報である。

[0029] 励起用光源 5 は、被観察物 2 それ自体又は被観察物 2 に含有させた蛍光体を励起できる光源であれば何でもよい。このような励起用光源 5 としては、キセノンランプ、水銀ランプ等のランプ、アルゴンレーザ等の各種レーザーを励起光 5 A とすることができる。励起光 5 A を、透過光 T や蛍光 F と干渉させないためには、不必要な波長帯を光学フィルタ 9 等でカットすることが望ましい。励起用光源 5 は、図示しない投光管を介して被観察物 2 に導入されてもよい。

[0030] 鏡筒部 15 は、照明用光源 4 の光によって被観察物 2 で生じた光、励起光 5 A 及び蛍光 F を通過させる光路を形成するために、第 1 及び第 2 のビームスプリッター 18、19、対物レンズ 6 及び結像レンズ 7 からなる光学部品を含んで構成されている。図示の場合には、倒立型の顕微鏡装置の一例を示している。ここで、照明用光源 4 の光によって被観察物 2 で生じた光は、透過光 T ではなく反射光であってもよい。

[0031] 第 1 及び第 2 のビームスプリッター 18、19 は、鏡筒部 15 に設けた図示しないポートに配置されてもよい。ビームスプリッター 18、19 は、照明用光源 4 の波長と被観察物 2 から発生する蛍光 F の波長とを分離できるダイクロイックミラーなどを使用することができる。以下の説明においては、ビームスプリッター 18、19 をダイクロイックミラーとして説明する。

[0032] 第 1 のダイクロイックミラー 18 は、短波長の光を反射し長波長の光を透過させる作用を有しているので、励起光 5 A は反射し、紙面上方の被観察物

2へ入射する。一方、被観察物2からの透過光Tは、励起光5Aの波長よりも長波長の光を用いることにより、第1のダイクロイックミラー18を透過する。

[0033] 第2のダイクロイックミラー19は、第1のダイクロイックミラー18の下方に配置されている。第1のダイクロイックミラー18を透過した被観察物2からの透過光Tは、第2のダイクロイックミラー19と結像レンズ7を通過し、鏡筒部15から画像情報検出部16へ出射される。結像レンズ7と画像情報検出部16との間に図示しないフィルタを配置しておくことにより、透過光Tを励起光5Aや蛍光Fと干渉させずに画像情報検出部16へ入射させてもよい。

[0034] 第1のダイクロイックミラー18を透過した被観察物2からの蛍光Fは、第2のダイクロイックミラー19で反射され、結像レンズ12を通過し、その後蛍光画像情報検出部17へ出射される。結像レンズ12と蛍光画像情報検出部17との間に図示しないフィルタを配置しておくことにより、蛍光Fを励起光5Aや透過光Tと干渉させずに蛍光画像情報検出部17へ入射させてもよい。

[0035] 画像情報検出部16は、照明用光源4からの光が被観察物2からの透過光Tや反射光による画像情報を取得できる検知器を備えている。透過光Tの光軸で、かつ、透過光Tを検出する画像情報検出部16の直前には結像レンズ7が設けられている。検知器には撮像素子、例えば、CCD型撮像素子やCMOS型撮像素子を使用できる。さらに、これらの撮像素子は、S/N比（信号対雑音比）を向上させて雑音を減らすように、例えば液体窒素やペルチエ素子を使用した冷却装置で冷却してもよい。検知器は、画像処理を行う計算機を備えていてもよい。また、目視観察用として接眼レンズを備えていてもよい。

[0036] 蛍光画像情報検出部17は、被観察物2からの蛍光画像を取得できる検知器を備えている。この検知器は、目的に応じて銀塩カメラや撮像素子を用いることができる。撮像素子としては、画像情報検出部16と同様に、CCD

型撮像素子やCMOS型撮像素子を使用できる。さらに、これらの撮像素子は、S/N比（信号対雑音比）を向上させ雑音を減らすように、液体窒素やペルチェ素子を使用した冷却装置で冷却してもよい。蛍光Fの光路上で、かつ、蛍光Fを検出する蛍光画像情報検出部17の直前に結像レンズ12を設けてもよい。また、目視観察用として接眼レンズを備えていてもよい。

[0037] 画像情報検出部16用の結像レンズ7と蛍光画像情報検出部17用の結像レンズ12は異なるレンズであってもよい。例えば、画像情報検出部16用の結像レンズ7の倍率を下げると共に、蛍光画像情報検出部17用の結像レンズ12の倍率を上げるようにしてもよい。この場合、画像情報検出部16で取得する透過光Tの画像の視野を広げることができると共に、蛍光画像情報検出部17では、被観察物2のより拡大した蛍光画像を得ることができる。

[0038] 図1では、説明のために透過光Tの光路や励起光5A及び蛍光Fの光路を重ねないように示しているが、これらの各光路は一致させてもよい。画像情報検出部16と蛍光画像情報検出部17との間で、視野中心位置及び焦点位置のズレが生じる場合がある。この場合、予めそれらのズレを測定し、被観察物2の位置制御及び観察領域制御におけるオフセットとして利用してもよい。オフセットを掛けることによって、視野中心位置や焦点位置のズレを補正することができる。

[0039] 制御部20は、被観察物2の透過光Tや反射光による画像情報が、画像情報検出部16を介して入力される。制御部20は、画像情報の処理と、画像情報の処理結果に基づいたステージ3の制御とを行う。制御部20は電子計算機から構成されている。このような電子計算機としては、パーソナルコンピュータ21を用いることができる。パーソナルコンピュータ21は、被観察物2の画像などを表示するディスプレイ装置22を備えている。パーソナルコンピュータ21は、画像情報検出部16及び光画像情報検出部17における撮影の開始及び終了、撮影速度、撮影画素数、ビニング数、ゲイン、ビット数等を制御する。

[0040] 制御部 20 には、光学系 10 により被観察物 2 を透過した透過光 T の画像情報が入力され、この画像情報により制御部 20 はステージ 3 上の被観察物 2 の位置を制御する。

[0041] 顕微鏡装置 1 においては、画像情報検出部 16 から入力された被観察物 2 の画像情報と被観察物 2 の運動モデルとに基づいて、被観察物 2 の蛍光観察領域を決定し、ステージ 3 を動かして、蛍光観察領域内の所定の間隔毎の位置で、画像情報検出部 16 から入力された被観察物 2 の画像情報と蛍光画像情報検出部 17 から入力された蛍光画像情報とを取得する。

ここで、運動モデルのパラメータは、被観察物 2 の位置、速度、分布、種類、形状、イオン濃度、分子濃度の何れか又はこれらの組み合わせからなる。

具体的には、蛍光観察のために、制御部 20 は、画像情報検出部 16 から入力された被観察物 2 の透過光の画像情報により、被観察物 2 の蛍光観察領域を決定する第 1 段階と、被観察物 2 の運動モデルに従って蛍光観察領域の中心位置を決定する第 2 の段階と、所定の間隔で蛍光観察領域内の蛍光観察と明視野観察とを行う第 3 の段階と、を含む制御を行い、被観察物 2 の蛍光情報の取得を制御することができる。ここで、蛍光観察領域は、後述する最適制御則等の知的制御に従って決定することができる。

[0042] (位置制御アルゴリズム)

先ず、第 1 段階における被観察物 2 の透過光の画像情報により、被観察物 2 の細胞位置を制御する方法、即ち細胞位置制御アルゴリズムについて説明する。

画像情報検出部 16 において、被観察物 2 の透過光の画像を取得し、次に、画像情報から画像特徴量を抽出する。画像特徴量は、画像情報の二値化によって観察対象の存在する領域を抽出し、このとき、直前に観察対象が存在していた領域の近傍でのみ抽出を行うセルフウィンドウ法を用いることで、障害物に惑わされることなく観察対象のみを抽出することができる（非特許文献 1 参照）。

[0043] 具体的には、透過光画像特徴量として、上記の二値データから0, 1, 2次モーメントを計算する。この画像特徴量を、制御部20のパーソナルコンピュータ21で読み出し、被観察物2の重心と方向を求める。被観察物2の運動はカルマンフィルタやパーティクルフィルタ等で予測してもよい。

[0044] 次に、被観察物2の重心が視野中心に移動するように、ステージ3のモーター回転角の目標値を定め、このモーターをフィードバック制御する。例えば、ステージ3にはXYZステージを使用することができる。このフィードバック制御には、比例、積分、微分の何れか、またはこれらの組み合わせによる制御手法を用いることができる。

また、被観察物2の特定の部位を観察するために、もしくは被観察物2の立体画像を取るため意図的に、被観察物2の重心からずれた特定の位置を視野中心に移動するように、ステージ3のモーター回転角の目標値を定め、このモーターをフィードバック制御してもよい。

[0045] 透過光画像特徴量は、上記セルフウィンドウ法以外を用いてもよく、例えば、被観察物2の回折像から抽出してもよい（非特許文献2参照）。

[0046] 被観察物2の軌跡を再構成、つまり、再現するためには、上記のXYZステージ3の変位情報をパーソナルコンピュータ21に記録しておく。これにより被観察物2の軌跡を得ることができる。

[0047] 透過光Tを使用するのは、追跡対象となる被観察物2の全体像を高輝度で安定して写すためである。透過光T以外には、落斜照明を用いた被観察物2からの反射光を用いることもできる。反射光の光源は、照明用光源4と同様の光源を用いることができる。この場合、被観察物2からの画像は反射光画像である。

なお、照明用光源4からの透過光Tを被観察物2に当て過ぎると、被観察物2の温度を上げるおそれがある。このため、本実施形態の制御部20は、照明用光源4からの光の強度や照射時間などを調整できるようにしている。

[0048] (蛍光観察方法)

次に、本発明の顕微鏡装置1を用いた蛍光観察方法について説明する。

被観察物 2 には、蛍光試薬を担持または注入する。被観察物 2 が細胞の場合には、Indo-1 (AM体、同仁化学研究所) のような蛍光試薬を使用し、適度な濃度で所定時間負荷すればよい。Indo-1 (AM体) は蛍光 F を発しないが、微生物の細胞膜を通過する。

[0049] 細胞膜を通過した Indo-1 (AM体) は、体内の酵素エステラーゼによって脱AM体に変化する。つまり、Indo-1 (AM体) は、細胞膜を通過すると、蛍光 F を発するが細胞膜を通過できない Indo-1 に変化する。Indo-1 は Ca^{2+} イオンと結合した場合と解離した場合で異なる波長の蛍光 F を発する。

[0050] 結合と解離のそれぞれの状態にある Indo-1 の量は、 Ca^{2+} 濃度によって変化する。つまり、 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴い、結合状態の Indo-1 による蛍光 F は増え、逆に、解離状態の Indo-1 による蛍光 F は減少する。この特性により、それぞれの波長における蛍光 F の強度を比較することで、 Ca^{2+} 濃度を求めることができる。具体的には、後述する顕微鏡装置 40 を用いた場合には、2 波長蛍光観察像を波長ごとに分割し、各画素ごとに計算した蛍光強度比を、予め作成しておいた検量線に代入することで、 Ca^{2+} 濃度を求めることができる。

[0051] Ca^{2+} イオンのみならず、顕微鏡装置 1 におけるフィルタ 9 及びダイクロイックミラー 18, 19, 26 を交換することで、他のイオンや分子を対象とした蛍光色素を利用することも可能である。

[0052] (蛍光観察領域の制御アルゴリズム)

顕微鏡装置 1 を用いて、蛍光観察枚数を減らすこと及び蛍光観察できる細胞数を増やすための制御について説明する。

この制御としては、蛍光観察のためにステージ 3 の Z 軸方向、つまり、結像レンズ 7 の位置の時間的変化、より具体的には蛍光観察領域幅の時間的変化として与える。

[0053] 蛍光観察の手順として、最初に蛍光観察する領域を決定する。図 2 は、蛍光観察領域のモデルを示す図である。図の斜線で示した箇所は蛍光観察する

領域を示す。その観察領域を等分割する。分割する幅 d （ここで、 $d > 0$ ）は、観察する対象によって決定する。次に、観察領域の各点で蛍光観察を行う。そして、数十秒の時間をおいた後、観察領域を再設定し、蛍光観察を行う。これらの観察を T 回（ここで、 $T > 0$ ）繰り返す。

[0054] 一枚の蛍光観察で励起光 $5 A$ を照射する時間 e (> 0) と、観察点の数 $N(k)$ （ここで、 $k > 0$ ）とを掛けた値である $e N(k)$ が、一回の蛍光観察で励起光 $5 A$ を照射した総時間となる。 e は可変にも拡張できるが、ここでは簡単のために固定とする。 $k \in \{0, 1, \dots, T-1\}$ 回目の蛍光観察の領域幅 $2x(k)$ は、下記(1)式によって与えられる。

[数1]

$$2x(k) = N(k)d \quad (1)$$

蛍光観察時間は、 k 回目の試行から $k+1$ 回目の蛍光 F に移行するとき、 $x(k)$ を $x(k+1)$ と更新する。

[0055] 蛍光観察の評価関数として、下記(2)式によって与えられる $J(T)$ を導入する。

[数2]

$$J(T) = \sum_{k=0}^{T-1} [qe N^2(k) - ry^2(k)] \quad (2)$$

ここで、 q (> 0)、 r (> 0) は、それぞれ、蛍光観察に要する時間と観察される細胞数に関する重みである。 $y(k)$ は蛍光観察領域幅 $2x(k)$ 内で蛍光観察される細胞数である。(2)式において、右辺は蛍光観察枚数 $N(k)$ が少ないほど小さくなり、蛍光観察される細胞数 $y(k)$ が多いほど小さくなる。一方、 $N(k)$ が少なくなると、 $y(k)$ も少なくなる。

よって問題は、評価関数 $J(T)$ を最小化する蛍光観察パラメータ $N(k)$ を探す問題と置き換えられる。(1)式より、 $N(k)$ と $x(k)$ とは(1)式の関係があるので、以下では $x(k)$ の最適制御側を求める。

[0056] 時刻 k における $x(k)$ を、下記(3)式によって更新する。

[数3]

$$x(k+1) = x(k) + u(k) \quad (3)$$

ここで、 $x(k)$ は正の値である。制御量 $u(k)$ は細胞数の観測値 $y(k)$ をフィードバックしたものである。(3)式は、次の時刻の $x(k+1)$ は今の時刻の $x(k)$ に制御量 $u(k)$ を加えたものであることを意味する。

[0057] 以上のことから、 $x(k)$ を求める問題は、下記(4)式で定義される最適制御量 $U^*(T-1) = [u^*(0), u^*(1), \dots, u^*(T-1)]$ を求めることに帰着できる。これは、制御理論において最適な出力フィードバック則を求める問題となる。従って、下記(5)式の最適制御則 $U^*(T-1)$ を満たす最適制御則 $U^*(T-1) = [u^*(0), u^*(1), \dots, u^*(T-1)]$ を求める。

[数4]

$$U^*(T-1) = \arg \min_{U(T-1)} J(T) \quad (4)$$

[0058] いま、制御量 $u(k)$ を求める上で問題となるのは、顕微鏡装置1の光軸方向に沿った細胞2の運動である。これは、顕微鏡装置1の光軸方向の運動によって、細胞2が蛍光観察領域に存在しなくなることが問題であるためである。従って、顕微鏡装置1の光軸における細胞2の運動を予想するためのモデルを用いる。そして、蛍光観察領域幅 $2x(k)$ とその領域内に存在する細胞数 $y(k)$ の関係を求める。

[0059] 全細胞数を M とする。細胞2を識別するための番号を i とする。 i は、 $i \in \{1, 2, \dots, M\}$ の範囲とする。細胞2の顕微鏡装置1の光軸方向の位置 $z_i(k) (> 0)$ を、下記(5)式とする。

[数5]

$$z_i(k+1) = z_i(k) + v_0 + \omega_i(k) \quad (5)$$

ここで、 v_0 は細胞2の移動速度の集団平均を表す定数である。 $\omega_i(k)$ は

、細胞2の運動の項に入るホワイトノイズである。その特性は、平均 $E[\omega_i(k)] = 0$ で、分散は下記(6)式によって与えられるとする。

[数6]

$$E[\omega_i(k)\omega_j^T(\tau)] = W_i \delta_{k\tau} \delta_{ij} \quad (6)$$

ここで、 $\delta_{k\tau}$ 及び δ_{ij} はクロネッカーのデルタである。Tは、転置を表す。

[0060] 初期位置 $z_i(0)$ は、下記(7)式によって与えられる平均と下記(8)式によって与えられる分散が既知である確率変数とする。 v_0 と $\omega_i(k)$ とは独立であるとする。ここで、

[数7]

$$E[z_i(0)] = \bar{z}_i(0) \quad (7)$$

[数8]

$$E[(z_i(0) - \bar{z}_i(0))^2] = P_i(0) \quad (8)$$

[0061] $z_i(k)$ の分散 $P_i(k)$ の時間更新式は、上記の(5)式から、下記(9)式によって与えられる。

[数9]

$$P_i(k+1) = P_i(k) + W_i \quad (9)$$

[0062] 細胞2の運動モデルとして、細胞2の分布を与えることによって、各時刻における細胞位置の平均と分散を求めることができる。細胞位置の集団平均 \bar{z} (k)は下記(10)式によって与えられ、細胞位置の分散の集団平均 P (k)は下記(11)式によって与えられる。

[数10]

$$\bar{z}(k) = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M z_i(k) \quad (10)$$

[数11]

$$P(k) = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M P_i(k) \quad (11)$$

[0063] 細胞数が十分に多いときは、中心極限定理によって、細胞2の分布は正規分布とみなすことができる。よって、kにおける細胞2の顕微鏡装置1の光軸方向における位置の分布は、下記(12)式の確率密度関数 $h(z(k))$ によって与えられるとする。

[数12]

$$h(z(k)) = \frac{1}{\sqrt{2\pi P(k)}} \exp\left[-\frac{(z(k) - \bar{z}(k))^2}{2P(k)}\right] \quad (12)$$

[0064] この場合、 $P(k)$ と $\bar{z}(k)$ の時間更新は、上記(9)～(12)式によって、それぞれ、下記(13)式及び(14)式によって与えられる。蛍光観察領域の中心は、(14)式の $\bar{z}(k+1)$ に一致するように制御する。

[数13]

$$P(k+1) = P(k) + \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M W_i \quad (13)$$

[数14]

$$\bar{z}(k+1) = \bar{z}(k) + v_0 \quad (14)$$

[0065] kにおける顕微鏡装置1の光軸方向の細胞数分布 $f(k, n(k))$ を、下記(15)式のように確率密度関数 $h(n(k))$ のM倍であるとする。なぜならば、正規分布である $h(n(k))$ を $n(k)$ について $-\infty$ から $+\infty$ の区間で積分すると1となるが、 $f(k, n(k))$ の同区間での積分値はその定義からMとなるためである。

[数15]

$$f(k, n(k)) = Mh(n(k)) \quad (15)$$

[0066] 顕微鏡装置1の光軸方向の観測領域幅 $2x(k)$ 内に存在する細胞数 $y(k)$ は、下記(16)式によって与えられる。

[数16]

$$\begin{aligned} y(k) &= g(k, x(k)) \\ &= \int_{x(k)-x(k)}^{x(k)+x(k)} f(k, n(k)) dn(k) \\ &= M \sqrt{1 - \exp\left[-\frac{x^2(k)}{2P(k)}\right]} \end{aligned} \quad (16)$$

[0067] $y(k)$ に関する上記(16)式を $x(k)$ に関して線形近似すると、下記(17)式となる。

[数17]

$$y(k) = c(k)x(k) + s(k) \quad (17)$$

ここで、 $c(k)$ は $x(k)$ に掛かる係数で、下記(18)式によって与えられる。

[数18]

$$\begin{aligned} c(k) &= \left. \frac{\partial g}{\partial x} \right|_{x=x(k-1)} \\ &= \frac{1}{2} M \frac{x(k-1) \exp\left[-\frac{x^2(k-1)}{2P(k)}\right]}{P(k) \sqrt{1 - \exp\left[-\frac{x^2(k-1)}{2P(k)}\right]}} \end{aligned} \quad (18)$$

(18)式より、 $x(k-1) > 0$ のとき $c(k) > 0$ となることがわかる。これは、観測幅に対して、その領域内に存在する細胞数が単調増加する

ことを意味し、物理的に妥当である。

$s(k)$ は $x(k)$ を含まない項であり、下記(19)式によって与えられる。

[数19]

$$s(k) = g(k, x(k-1)) - c(k)x(k-1) \quad (19)$$

[0068] 次に、最適制御量の導出について説明する。

(1)式と(17)式を(2)式に代入して、評価関数 $J(T)$ を整理すると、 $J(T)$ は下記(20)式によって与えられる。

[数20]

$$J(T) = \sum_{k=0}^T [q_2(k)x^2(k) + \alpha(k)x(k) + \beta(k)] \quad (20)$$

ここで、 $q_2(k)$ 、 $\alpha(k)$ 及び $\beta(k)$ は下記(21)式によって与えられる。

[数21]

$$\begin{aligned} q_2(k) &= 4qe/d^2 - rc^2(k), \\ \alpha(k) &= -2rc(k)s(k), \\ \beta(k) &= -rs^2(k) \end{aligned} \quad (21)$$

[0069] そして、評価区間を l (l は L の小文字) から T 回目までとした観察における評価関数の総和 $\bar{J}(l)$ を、下記(22)式によって定義する。

[数22]

$$\bar{J}(l) = \sum_{k=l}^T [q_2(k)x^2(k) + \alpha(k)x(k) + \beta(k)] \quad (22)$$

ここで、 l は、 $l \in \{1, 2, \dots, T-1\}$ の範囲である。

[0070] 数学的帰納法を用いると、 $l=m$ における $\bar{J}(m)$ は下記(23)式となる。

[数23]

$$\begin{aligned} \bar{J}(m) = & \sum_{k=m+1}^T \left\{ q_2(k) \left[u(k-1) + x(k-1) + \frac{\alpha(k)}{2q_2(k)} \right]^2 \right\} \\ & + q_2(m)x^2(m) + \alpha(m)x(m) + \sum_{k=m}^T \beta(k) - \sum_{k=m+1}^T \frac{\alpha^2(k)}{4q_2(k)} \end{aligned} \quad (23)$$

[0071] (23) 式に最適性の原理を適用すると、最適制御量 $u^*(k)$ が下記 (24) 式によって与えられる。

[数24]

$$u^*(k) = -x(k) - \frac{\alpha(k+1)}{2q_2(k+1)} \quad (24)$$

[0072] さらに、(24) 式の最適制御量 $u^*(k)$ を (17) 式を用いて書き直すと、最適制御量 $u^*(k)$ は下記 (25) 式によって与えられる。

[数25]

$$u^*(k) = -c^{-1}(k)y(k) - \frac{\alpha(k+1)}{2q_2(k+1)} + c^{-1}(k)s(k) \quad (25)$$

最適制御量 $u^*(k)$ は、細胞数の観測値 $y(k)$ をフィードバックしたものであることを示している。

[0073] (画像処理)

最適制御量を得るために必要な細胞数等の計測のための画像処理について説明する。

細胞2の運動モデルの同定として必要なのは、顕微鏡装置1の光軸方向への細胞2の移動速度の集団平均 v_0 と、細胞位置の分散の時間変化 W_i である。なお、被観察物2が静止物の場合は、移動速度の集団平均 v_0 及び位置の分散の時間変化 W_i を0として扱うことができる。

[0074] 細胞数を計測していくと、細胞2が焦点からずれた位置に存在するときにも数える場合がある。この場合、実際に細胞2が存在しない位置に、細胞2が存在すると計測していることになるので測定誤差となる。よって、細胞位

置を推定する手法が必要不可欠であり、ベッケ線法等を応用することができる。

[0075] 細胞2の位置が焦点距離よりも対物レンズ6側に近いとき、細胞2の内側に明るい縞が生じ、外側に黒い縞が生じる。細胞2の位置が焦点距離よりも対物レンズ6側から遠いとき、細胞2の外側に明るい縞が生じ、内側に黒い縞が生じる。これらはベッケ線と呼ばれている。これは、細胞2を観察すると、焦点面を境に光の回折が大きく変化することによる。このベッケ線を画像処理に応用することにより、細胞2の顕微鏡装置1の光軸方向位置を推定することができる（非特許文献2参照）。

[0076] 上記の画像処理方法によれば、ベッケ法を用いて細胞位置を推定するので、細胞2が焦点からずれた位置に存在するときの、細胞数測定誤差を小さくすることができる。

[0077] 透過光画像処理は、以下の手順によって行うことができる。

(i) 細胞2が浮遊する試験溶液の観察領域を顕微鏡装置1の光軸方向とし、被観察物2を画像情報検出部16に設けたカメラ等で撮像する。これを観察画像1とする。この場合、観察画像1は、明視野像である。

(ii) (i)の観察画像よりも所定の距離だけ対物レンズ6に近い画像を撮影する。これを観察画像2とする。所定の距離としては、例えば1 μm のオーダーとすることができる。

(iii) 観察画像1と観察画像2との差分をとる。

(iv) 画像上の差分値の二値化を行う。

(v) 半径が所定の大きさの画素の円形マスクを使用して膨張処理を行い、同一細胞2の離れた画素を一つに纏める。

(vi) (v)の上記画素の円形マスクを使用して縮小処理し、細胞2以外の小さなノイズを除去する。

(vii) 八近傍の画素を連結させてラベリングし、細胞数を計測する。

(viii) ラベリングした細胞2の大きさによってフィルタリングする。つまり、大きすぎれば二つと数え、手順(v)で別の細胞2を同一細胞2とみなした場

合に対処する。小さすぎればノイズとみなし、細胞 2 以外の存在を消しきれなかった場合に対処する。

[0078] 上記の画像処理は、顕微鏡装置 1 の画像情報検出部 16 と制御部 20 とステージ 3 を用いて、以下の (1) ~ (7) の手順によって行うことができる。

- (1) パーソナルコンピュータ 21 が指示を出す。
- (2) パーソナルコンピュータ 21 から指示を受けた D/A ボードが電圧を出力する。
- (3) ステージ 3 を動かす。
- (4) 対物レンズ 6 を通して得た画像をカメラで取り込む。
- (5) 取り込んだ画像を、パーソナルコンピュータ 21 に送る。
- (6) パーソナルコンピュータ 21 が画像処理を行う。
- (7) 画像処理した情報をもとに、パーソナルコンピュータ 21 が D/A ボードに指示を出す。

[0079] 画像処理によって各画像の細胞数を計測し、この細胞数が、観察領域の各観察点の細胞数となる。これより、観察領域内の細胞分布が求められる。各観察点の細胞数を用いて、 z バー (k) を計算し、時間変化に対する z バー (k) の変化量を細胞の移動速度の集団平均 v_0 として求めることができる。

[0080] さらに、細胞位置の分散の時間変化 W_i も求めることができる。

[0081] 次に、上記蛍光観察の最適制御則と、最適制御則の適用に必要な細胞数等の計測のための画像処理と、を組み合わせた蛍光観察について説明する。

図 3 は、本発明の第 1 実施形態に係る顕微鏡装置 1 を用いた蛍光観察手順を示すフロー図の一例である。

まず、ステップ S T 1 において、被観察物 2 を所定の間隔として、 d (μ m) 間隔 (以下、 d 間隔と呼ぶ) で、観察領域内の明視野観察を行う。被観察物 2 は、例えば免疫細胞の一種である T 細胞である。

[0082] ステップ S T 2 において、観察領域内の被観察物 2 の平均位置と分散を算出する。

ステップ S T 3 では、観察したい被観察物 2 の数に応じて蛍光観察領域を

決定する。

ステップS T 4において、d間隔で、蛍光観察領域の蛍光観察と明視野観察を行う。透過光画像の情報を増すために、蛍光観察と比べて明視野観察の観察間隔を狭めたり、観察領域を広げてもよい。

ステップS T 5において、所定の時間、例えば20秒待機する。制御に用いる透過光の画像情報を増すために、蛍光観察と比べて明視野観察の待機時間を短くしてもよい。

[0083] 次に、ステップS T 6において、最適制御則に従って蛍光観察領域を決定する。

ステップS T 7において、被観察物2の運動モデルに従って蛍光観察領域の中心位置を決定する。

[0084] 次に、ステップS T 8において、d間隔で、蛍光観察領域の蛍光観察と明視野観察を行う。d間隔は、例えば300 μ mとすることができる。透過光画像の情報を増すために、蛍光観察と比べて明視野観察の観察間隔を狭めたり、観察領域を広げてもよい。

[0085] ステップS T 9において、蛍光観察を終了するか否かを判定する。そして、ステップS T 9において、蛍光観察が所定回数、例えばT回繰り返していないと判定した場合には、再びステップS T 5からステップS T 8の蛍光観察を行う。

[0086] ステップS T 9において、ステップS T 5からステップS T 8までの被観察物2の測定がT回行われたと判定したとき、蛍光観察を終了する。このようにして、被観察物2の蛍光観察を、最適制御則に従って行うことができる。

[0087] 最初の $k = 0$ 回目の試行では、例えば観察領域内をd間隔で全観察領域を観察する。 $k = 1$ 回目以降の試行以降は、蛍光観察領域幅 $2 \times (k)$ を観察する。 $x(k)$ は最適制御量 $U^*(k)$ によって決定する。

[0088] ここで、蛍光観察領域の中心zバー(k)は、上記(i)~(viii)の透過光画像処理手順で求めた細胞2の運動モデルパラメータ v_0 を利用して更新する。

中心zバー（k）、幅x（k）で、所定ビット、例えば8ビットグレースケールの明視野観察像を、画像情報検出部16に設けたカメラで撮像し、このグレースケール画像を画像処理し、k+1回目の試行のx（k+1）を決定する。同時に、蛍光画像情報検出部17に設けた蛍光観察用カメラで蛍光観察像を撮像する。

- [0089] 顕微鏡装置1によれば、従来、蛍光観察前に観察者が手動で行っていた蛍光観察のパラメータを自動化することができる。このため観察者の負担を軽減することができる。
- [0090] 制御部20によって、さらに、蛍光観察の制御や蛍光画像の記録を行うことができる。図1に示すように、制御部20はさらに、励起用光源5を制御するための第2光源制御部としての励起用光源制御部23を備えて構成されてもよい。励起用光源制御部23は、被観察物2の透過光Tによる画像データに基づいて、励起光5Aにおける点滅や点灯時間を制御する機能を有している。また、励起光5Aの波長及び強度を選択して照射する機能を備えていてもよい。
- [0091] 蛍光画像の記録や画像処理を行うために、蛍光画像情報検出部17からの検知出力が制御部20に入力される。
- [0092] さらに、顕微鏡装置1によれば、透過光画像から得られる被観察物2の情報は、被観察物2からの蛍光Fに比較して光量が多く、かつ、高速に記録されている。したがって、蛍光Fと同時に取得した透過光画像を、蛍光画像の解析処理に用いることで解析結果の時空間精度が向上する。
- [0093] 顕微鏡装置1では、透過光画像から得られる位置などの細胞情報と連動させて、蛍光画像情報検出部17の蛍光画像を記録することができる。つまり、蛍光Fが照射されている時間だけ蛍光画像を記録すればよい。したがって、被観察物2が顕微鏡装置1の視野に入っていない時間の蛍光画像記録が不要となる。このため、蛍光画像記録のための演算時間や記憶装置の容量を減らすことができ、パーソナルコンピュータ21を有効利用することができる。無駄な蛍光画像を記録する必要がなくなるので、蛍光画像の解析時間も大

幅に短縮することができる。

なお、本発明において、透過光画像を用いた蛍光観察の制御は、スケジューリング問題と一般化できる。このため、蛍光観察の制御には、上記した最適制御則以外に、PID制御等の古典制御、準最適制御等の現代制御、 H_{∞} 制御、サンプル値制御、有限時間整定制御、適応制御等のポスト現代制御論、ニューラルネットワーク制御、ファジィ制御、遺伝的アルゴリズム制御等の知的制御を用いてもよい。

[0094] さらに、顕微鏡装置 1 の構成は、以下に示す種々の実施形態とすることができる。

(第 2 実施形態)

図 4 は、第 2 実施形態に係る顕微鏡装置 30 の構成を示す模式図である。

顕微鏡装置 30 が顕微鏡装置 1 と異なるのは、対物レンズ 6 を透過光 T の光軸、即ち Z 軸方向に移動できるように対物レンズ用駆動部 32 を設けた点にある。対物レンズ用駆動部 32 は、制御部 20 によって制御される。対物レンズ用駆動部 32 は、ピエゾ素子のような駆動部品を用いて構成することができる。他の構成は顕微鏡装置 1 と同じであるので説明は省略する。

[0095] (第 3 実施形態)

図 5 は、第 3 実施形態に係る顕微鏡装置 35 の構成を示す模式図である。

顕微鏡装置 35 が顕微鏡装置 1 と異なるのは、画像情報検出部 16 側の結像レンズ 7 を光軸方向 (Z 軸方向) に移動できるように透過光用の結像レンズ用駆動部 37 を設けた点にある。結像レンズ用駆動部 37 は、制御部 20 によって制御される。結像レンズ用駆動部 37 は、ピエゾ素子のような駆動部品を用いて構成することができる。他の構成は顕微鏡装置 1 と同じであるので、説明は省略する。

[0096] (第 4 実施形態)

図 6 は、第 4 実施形態に係る顕微鏡装置 40 の構成を示す模式図である。

顕微鏡装置 40 が顕微鏡装置 1 と異なるのは、蛍光画像情報検出部 17 の前に蛍光波長選択部 25 を設けた点にある。蛍光波長選択部 25 は、二つの

蛍光波長を分離して検出できる構成を有している。蛍光波長選択部 25 は、第 3 のダイクロイックミラー 26 とミラー 27 とプリズム 28 とから構成されている。さらに、レンズ 29 を設けてもよい。この構成によれば、2 波長の蛍光 F を分離して検知することができる。蛍光波長選択部 25 は、鏡筒部 15 又は蛍光画像情報検出部 17 に配置することができる。他の構成は顕微鏡装置 1 と同じであるので、説明は省略する。

[0097] 蛍光波長選択部 25 は、2 波長の蛍光 F の分離を行う態様を示しているが、分光器を用いることで多波長の蛍光 F を検知してもよい。つまり、蛍光波長選択部 25 は、少なくとも 1 波長以上の蛍光 F を分離するプリズムや分光器等の部品からなる波長選択手段を備えて構成することができる。

[0098] 顕微鏡装置 40 によれば、励起光 5A の種類や強度の制御が可能になる。つまり、複数の蛍光色素に対して、観測時間の自動割り振りなどが可能になる。一般に、細胞 2 は、その運動状態や外部からの刺激により、活性化または不活性化する細胞 2 内のイオンや分子が異なることが知られている。このため、透過光画像から得られる被観察物 2 の運動情報や細胞 2 の形状及び刺激の種類や強度等と連動させて、被観察物 2 へ励起する励起光 5A の波長や強度の選択制御が可能となる。これにより、透過光画像から得られる被観察物 2 の情報に連動させて、被観察物 2 からの蛍光情報を効率よく取得することができる。

なお、複数種類の細胞 2 を同時に観察するときには、透過光画像に含まれる各細胞 2 の面積、形状、色の濃度、色調、テクスチャ等を用いて、細胞 2 の種類を画像処理で自動判別することも可能である（非特許文献 7 参照）。

[0099] (第 5 実施形態)

図 7 は、第 5 実施形態の顕微鏡装置 45 の構成を示す模式図である。

顕微鏡装置 45 が顕微鏡装置 1 と異なるのは、蛍光画像情報検出部 17 の光軸方向に挿入された結像レンズ 12 を光軸方向に移動させるように、結像レンズ用駆動部 52 を設けている点にある。他の構成は顕微鏡装置 1 と同じであるので、説明は省略する。

[0100] 顕微鏡装置 4 5 によれば、結像レンズ 1 2 を、結像レンズ用駆動部 5 2 によって駆動することによって被観察物 2 の焦点位置を変えることができる。結像レンズ 1 2 の駆動は、透過光 T を検出する画像情報検出部 1 6 に対して独立して行うことができる。これにより、被観察物 2 からの蛍光 F の光軸方向の観察を行うことができる。

[0101] (第 6 実施形態)

図 8 は、第 6 実施形態に係る顕微鏡装置 5 0 の構成を示す模式図である。

顕微鏡装置 5 0 が顕微鏡装置 1 と異なるのは、光学系 1 0 中に、さらに 2 つのピンホール 5 3, 5 4 を設けて共焦点光学系で構成した点にある。第 1 のピンホール 5 3 は、励起用光源 5 とフィルタ 9 との間の光軸上に配設されている。第 1 のピンホール 5 3 とフィルタ 9 の配置順は入れ替えてもよい。第 2 のピンホール 5 4 は、蛍光画像情報検出部 1 7 と結像レンズ 1 2 との間の蛍光 F の光軸上に配設されている。第 2 のピンホール 5 4 と結像レンズ 1 2 との配置順は入れ替えてもよい。他の構成は顕微鏡装置 1 と同じであるので、説明は省略する。

[0102] 顕微鏡装置 5 0 によれば、蛍光 F を観察する光学系が共焦点光学系で構成されている。第 1 のピンホール 5 3 を設けることによって、励起用光源 5 の照射位置を制御することができる。第 2 のピンホール 5 4 を設けることによって、焦点以外からの光が蛍光画像情報検出部 1 7 へ入射しなくなる。このため、明瞭な蛍光像が得られる。さらに、被観察物 2 を載置するステージ 3 の制御が X Y ステージで行う構成の場合には、X Y ステージ 3 の移動に応じて被観察物 2 の走査が行われる。

[0103] (第 7 実施形態)

図 9 は、第 7 実施形態の顕微鏡装置 5 5 の構成を示す模式図である。

顕微鏡装置 5 5 が顕微鏡装置 5 0 と異なるのは、さらに、第 2 のピンホール 5 4 を蛍光 F の光軸方向に移動及び／又は回転させるように第 2 のピンホール 5 4 を駆動するピンホール駆動部 5 6 を設けている点にある。他の構成は顕微鏡装置 1 と同じであるので、説明は省略する。

[0104] 顕微鏡装置 55 では、蛍光の光軸方向に挿入された第 2 のピンホール 54 を、ピンホール駆動部 56 によって駆動することによって被観察物 2 から蛍光 F の焦点及び観察位置を変えることができる。第 2 のピンホール 54 の駆動は、透過光 T を検出する画像情報検出部 16 に対して独立して行うことができる。また、第 2 のピンホール 54 は、複数の穴から構成されていてもよい。

[0105] さらに、第 1 のピンホール 53 を駆動するピンホール駆動部 58 を設けてもよい。第 1 のピンホール 53 を光軸上で移動及び／又は回転させることで、励起用光源 5 の照射位置を制御することもできる。また、第 1 のピンホール 53 は、複数の穴から構成されていてもよい。

[0106] (第 8 実施形態)

図 10 は、第 8 実施形態の顕微鏡装置 60 の構成を示す模式図である。

顕微鏡装置 60 が顕微鏡装置 1 と異なるのは、被観察物 2 の下方から透過光 T が照射される、所謂正立型の光学系 10A を有している点である。他の構成は顕微鏡装置 1 と同じであるので、説明は省略する。

[0107] 顕微鏡装置 60 の光学系 10A は、第 2～第 7 の実施形態に係る顕微鏡装置 30, 35, 40, 45, 55 の光学系 10 の何れか又はこれらを組み合わせた構成とすることができる。例を挙げると、顕微鏡装置 60 において、顕微鏡装置 30 のように対物レンズ 6 を光軸方向 (Z 軸方向) に移動できるように対物レンズ用駆動部 32 を設けてもよい。

[0108] さらに、顕微鏡装置 60 において、顕微鏡装置 35 のように画像情報検出部側 16 の結像レンズ 7 を光軸 (Z 軸方向) に移動できるように結像レンズ用駆動部 37 を設けてもよい。

[0109] 顕微鏡装置 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 の何れにおいても、顕微鏡装置 1 と同様に透過光画像及び蛍光画像の観察を行うことができる。

[0110] (被観察物の環境制御)

被観察物 2 の環境制御について説明する。

図 1 1 は環境制御部 6 0 の構成を示す模式図であり、(A) は平面図、(B) は (A) の X-X に沿った断面図である。環境制御部 6 0 は、本体部 6 2 と、本体部 6 2 の下部に配置され被観察物 2 を収容する収容部 6 4 と、を含んで構成されている。

本体部 6 2 は、樹脂板 6 5 をスライドガラス 6 6 と樹脂フィルム 6 7 とで挟んで構成され、具体的には本体部 6 2 は、収容部 6 4 に対応する開口 6 5 A を有している長方形の樹脂板 6 5 と、樹脂板 6 5 の上部に配設され樹脂板 6 5 を覆うスライドガラス 6 6 と、樹脂板 6 5 の下部に配設され樹脂板 6 5 を覆う樹脂フィルム 6 7 と、を備えている。さらに、本体部 6 2 には、樹脂板 6 5 の開口部 6 5 A に接続するガス配管 6 8 が設けられている。ガス配管 6 8 の入力側 6 8 A から出力側 6 8 B へ雰囲気ガス 6 9 が導入される。雰囲気ガス 6 9 としては、窒素ガス (単体)、酸素ガス (単体)、二酸化炭素 (単体)、空気 (混合物)、およびそれらの混合ガス等を挙げることができる。

ここで、樹脂板 6 5 は、例えばアクリル樹脂を用いることができる。樹脂フィルム 6 7 は、マイラーからなるフィルム等を用いることができる。さらに、樹脂板 6 5、スライドガラス 6 6 及び樹脂フィルム 6 7 を保持する保持手段 7 0 を備えていてもよい。

[0111] 収容部 6 4 は皿状の容器構造を有しており、容器最上部の外周部が樹脂フィルム 6 7 に当接されている。収容部 6 4 における底部の開口にはカバーガラス 7 1 が配設されている。樹脂フィルム 6 7 において収容部 6 4 と対向する下面には、カバーガラス 7 2 が設けられている。雰囲気ガス 6 9 は、樹脂フィルム 6 7 に設けられている細孔 6 7 A を介して収容部 6 4 へ導入される。収容部 6 4 は、図示しない被観察物 2 と被観察物用の培養液 7 4 で満たされる。これにより、収容部 6 4 内の被観察物 2 と被観察物用の培養液 7 4 は、雰囲気ガス 6 9 に曝されるようになる。

[0112] 環境制御部 6 0 を顕微鏡装置 1 のステージ 3 に載置することで、被観察物 2 を培養液 7 4 に保持した状態で観察することができる。さらに、顕微鏡装

置 1 を恒温槽内に收容すれば、培養液 7 4 の温度を一定とすることができる。これにより、被観察物 2 を培養液 7 4 に保持し、温度と雰囲気ガス 6 9 を一定の状態として、被観察物 2 の透過光 T や蛍光 F を観察することができる。

[0113] 環境制御部 6 0 は、複数の被観察物 2 を観察することができるように構成されてもよい。具体的には、図 1 1 に示した環境制御部 6 0 を複数配設した構造としてもよい。

図 1 2 は複数の被観察物 2 の観察ができる環境制御部 8 0 の構成を示す模式図で、(A) は平面図、(B) は (A) の X-X に沿った断面図である。

環境制御部 8 0 が環境制御部 6 0 と異なるのは、收容部 8 4 が一体ではなく、格子状の障壁部 8 5 によって複数の收容区画 8 6 を有するように仕切られている点である。各收容区画 8 6 には培養液 7 4 が注入されている。他の構成は環境制御部 6 0 と同じであるので、説明は省略する。

[0114] 環境制御部 8 0 によれば、複数の收容区画 8 6 のそれぞれに被観察物 2 を收容することができるので、複数の被観察物 2 からの透過光 T や蛍光 F を、温度と雰囲気ガス 6 9 を一定の状態にして観察することができる。複数の收容区画 8 6 に注入する培養液 7 4 の種類を異なるようにし、被観察物 2 となる細胞の種類は同じものとしてもよい。これらの場合には、培養液 7 4 の条件を変えたときの各細胞 2 からの透過光 T や蛍光 F を、温度と雰囲気ガス 6 9 を一定の状態にして連続的に観察することができる。逆に、複数の收容区画 8 6 に注入する培養液 7 4 の種類を同じとして、被観察物 2 となる細胞の種類は異なるものとしてもよい。

[0115] さらに、環境制御部 6 0, 8 0 を備えた顕微鏡装置 1 による蛍光観察では、透過光画像から得られる被観察物 2 の情報に連動させて、被観察物 2 からの蛍光情報を効率よく取得することができる。このため、被観察物 2 へ蛍光 F を発生させるための励起光 5 A の照射時間を短くすることができる。従って、被観察物 2 が細胞等の生体試料である場合には、従来の蛍光観察に比較して、より長時間透過光 T や蛍光 F を観察することができる。

[0116] さらに、環境制御部 60、80 は、被観察物 2 を刺激するための刺激手段を備えていてもよい。このような刺激手段としては、電氣的刺激、磁氣的刺激、力学的刺激、超音波刺激、温度的刺激、化学的刺激、光刺激等が挙げられる。

実施例

[0117] 以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

図 4 に示す顕微鏡装置 30 を製作した。光学系 10 としては、倒立顕微鏡（オリンパス株式会社製、I X 71）を使用し、照明用光源 4 及び励起用光源 5 は、それぞれ、ハロゲンランプとキセノンランプを使用した。対物レンズ 6（オリンパス株式会社製、U A p o 40 × 3 / 340）は 40 倍のものを用了。

[0118] 明視野観察像をパーソナルコンピュータ 21 に取り込む画像情報検出部 16 には、カメラ（POINTGREY 製、Dragofly Express）を用了。このカメラは、100 fps（フレーム／秒）で 8 ビットのグレースケール画像を取得することができる。画素サイズは、640 × 480 である。

[0119] 対物レンズ 6 の位置を顕微鏡装置 30 の光軸方向に制御する対物レンズ用駆動部 32 として、ピエゾステージ（Physik Instrument 製、P-723）を用了。このピエゾステージ 32 の最大稼動距離は 350 μm である。電圧入力により、ピエゾステージ 32 は動く。ピエゾステージ 32 への電圧入力には、D/A 変換ボード（Interface 製 D/A ボード、P C I - 3346 A）を用了。

[0120] 制御部 20 は、リアルタイム基本ソフトウェアとして、R T - L i n u x を搭載したパーソナルコンピュータ 21 を用了。

[0121] 蛍光画像情報検出部 17 の検知器は、冷却 CCD カメラ（Q-Imaging 社製、Retiga 2000R、1600 × 1200 画素）を用了。冷却温度は、周囲温度よりも 25℃低い温度とした。蛍光 F は、光学系 10 のデュアルポート内のダイクロイックミラー 19（Semrock 製のダイクロイックミラー、FF01-520/35-25）によって透過光 T と分離した。蛍光 F の励起光 5 A、蛍光 F 及び追跡

用の透過光Tが干渉しないよう、それぞれの波長帯が異なるようにフィルタを選んだ。冷却CCDカメラは、 4×4 画素を一まとめにするビニング処理を行い、取得画素数を 400×300 画素とした。露光時間は 33ms とした。

[0122] 前述のように図3に示すフロー図に従って、免疫細胞の一種であるT細胞2の観察を行った。d間隔を $1.5\mu\text{m}$ とした。観察したい細胞数に応じて、蛍光観察領域幅 $x(0)$ を決定した。そして、蛍光観察領域内を、 $1.5\mu\text{m}$ 間隔で蛍光観察と明視野観察を同時に行った。以降は、20秒間待機の後、最適制御則に従って蛍光観察領域を決定し、細胞2の運動モデルに従って蛍光観察領域の中心を求めた。そして、蛍光観察領域を $1.5\mu\text{m}$ 間隔で蛍光観察と明視野観察を同時に行う、という作業を60回($T=60$)繰り返した。

[0123] 図13は、観察開始直後の細胞分布の一例を示す図である。図13の横軸はピエゾステージ32の位置(μm)であり、縦軸は細胞数(個)である。

[0124] 図14は、蛍光観察手順において、制御量 $U(k)$ を用いた実施例の評価関数 J と、蛍光観察領域幅を固定した場合の比較例の評価関数 J と、を示す模式図である。図14の横軸は固定した場合の蛍光観察領域の幅(μm)を示し、縦軸は評価関数 J の値を示す。本発明の制御量を用いた場合の蛍光領域の幅は、動的に変えている。

図14から明らかなように、制御量 $U(k)$ を用いた実施例の評価関数 J と蛍光観察領域幅を固定した比較例の評価関数 J を比較すると、本発明の制御量を用いた実施例の評価関数 J の値が常に比較例の J の値よりも小さくなっており、最適化されていることが分かる。

[0125] 本発明は、上記実施の形態に限定されることなく、請求の範囲に記載した発明の範囲内で種々の変形が可能であり、それらも本発明の範囲内に含まれることはいうまでもない。上述した実施形態においては、第1及び第2の検出光学系16、17に撮像素子を用いたが、撮像素子位置で目視の観察や写真撮影なども行うことができるように、検出光学系は必要に応じて複数の検

出光学系とすることも可能である。また、蛍光Fを検知する検出光学系17の構成などは、被観察物2に応じて最適な設計や使用部品を選定できることは勿論である。

蛍光観察領域の中心は、被観察物の画像情報に基づいて、或いは当該画像情報と被観察物の運動モデルとに基づいて、求めても良い。

ステージの制御は、被観察物の運動モデルに基づいて、或いは当該運動モデルと上記画像情報とに基づいて行っても良い。

結像レンズ7、結像レンズ12の倍率を調整すること、例えば倍率を低くすることで、画像情報検出部16、蛍光画像情報検出部17で取得する画像中の被観察物の大きさを小さくすることができる。これによって、観察視野が広がり、より多数の被観察物を同時に観察することができる。そして、被観察物を表す画素数が少なくなり、制御部20における細胞一つ当たりの画像処理時間を一層短縮することもできる。

符号の説明

- [0126] 1, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 : 顕微鏡装置
- 2 : 被観察物
- 3 : X YまたはX Y Zステージ
- 4 : 照明用光源
- 5 : 励起用光源
- 5 A : 励起光
- 6 : 対物レンズ
- 7 : 結像レンズ (透過光用)
- 8, 9 : フィルタ
- 10, 10 A : 光学系
- 12 : 結像レンズ (蛍光用)
- 15 : 鏡筒部
- 16 : 画像情報検出部
- 17 : 蛍光画像情報検出部

- 18, 19 : 第1及び第2のビームスプリッター (ダイクロイックミラー)
- 20 : 制御部
- 21 : パーソナルコンピュータ
- 22 : ディスプレー装置
- 23 : 励起用光源制御部
- 25 : 蛍光波長選択部
- 26 : 第3のダイクロイックミラー
- 27 : ミラー
- 28 : プリズム
- 29 : レンズ
- 32 : 対物レンズ用駆動部
- 37 : 透過光の結像レンズ用駆動部
- 52 : 蛍光用結像レンズ用駆動部
- 53 : 第1のピンホール
- 54 : 第2のピンホール
- 56, 58 : ピンホール駆動部
- 60, 80 : 環境制御部
- 62 : 本体部
- 64, 84 : 收容部
- 65 : 樹脂板
- 66 : スライドガラス
- 67 : 樹脂フィルム
- 67A : 細孔
- 68 : ガス配管
- 68A : 入力側
- 68B : 出力側
- 69 : 雰囲気ガス
- 70 : 保持手段

7 1, 7 2 : カバーガラス

7 4 : 培養液

8 5 : 障壁部

8 6 : 収容区画

F : 蛍光

T : 透過光

請求の範囲

- [請求項1] 被観察物を載置するステージと、
上記被観察物に照明光を照射する第1の光源と、
上記被観察物に蛍光を励起するための励起光を照射する第2の光源と、
上記被観察物で生じた光による画像情報を検出する画像情報検出部と、
上記被観察物で生じた蛍光による蛍光画像情報を検出する蛍光画像情報検出部と、
上記被観察物の運動モデルと上記画像情報検出部から入力された上記被観察物の画像情報とに基づいて上記被観察物の蛍光観察領域を決定し、上記画像情報検出部から入力された上記被観察物の画像情報と上記蛍光画像情報検出部から入力された蛍光画像情報とを上記蛍光観察領域内の所定の間隔毎に取得する制御部と、
を備えたことを特徴とする、顕微鏡装置。
- [請求項2] 前記制御部は、前記蛍光観察領域を最適制御、準最適制御等の現代制御に従って決定す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] 前記制御部は、前記被観察物の運動モデルと前記被観察物の画像情報との少なくとも一方に従って前記蛍光観察領域の中心位置を決定す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4] 前記制御部は、前記被観察物の運動モデルと前記被観察物の画像情報との少なくとも一方により、上記被観察物を追尾するように上記ステージを制御すると共に、上記被観察物の蛍光情報の取得を制御す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5] 前記制御部は、前記画像情報による比例、積分、微分の何れか又はこれらの組み合わせによるPID制御等の古典制御により前記ステージを制御す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6] 前記制御部は、前記第1の光源を制御するための第1光源制御部と前記第2の光源を制御するための第2光源制御部とを備えてい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7] 前記ステージは、前記被観察物の位置を移動させる二次元または三次元ステージであ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8] 前記蛍光画像情報検出部は、少なくとも1波長以上の蛍光を分離する波長選択手段を備えたことを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。
- [請求項9] 前記第2の光源と前記被観察物との間に配設される第1のピンホールと、前記蛍光と前記蛍光画像情報検出部との間に配設される第2のピンホールと、を備えたことを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。
- [請求項10] 前記第1のピンホール又は前記第2のピンホールを移動及び／又は回転させるピンホール駆動部を、備えたことを特徴とする、請求項9に記載の顕微鏡装置。
- [請求項11] 前記第1の光源と前記被観察物との間に配設される対物レンズと、該対物レンズの駆動部と、を備えたことを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。
- [請求項12] 前記被観察物で生じた光と前記画像情報検出部との間に配設される結像レンズと、該結像レンズの駆動部と、を備えたことを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。
- [請求項13] 前記蛍光と前記蛍光画像情報検出部との間に配設される結像レンズと、該結像レンズの駆動部と、を備えたことを特徴とする、請求項1に記載の顕微鏡装置。
- [請求項14] 前記被観察物を収容しかつ雰囲気ガスで満たされる環境制御部を備えたことを特徴とする、請求項13に記載の顕微鏡装置。
- [請求項15] 前記環境制御部は、複数の前記被観察物を収容することができる収

容部を備えたことを特徴とする、請求項 14 に記載の顕微鏡装置。

[請求項16] 前記被観察物を刺激する被観察物刺激手段を備えたことを特徴とする、請求項 1 に記載の顕微鏡装置。

[請求項17] 被観察物の画像情報と該被観察物の蛍光画像情報とを取得する蛍光観察方法であって、

上記被観察物の画像情報と上記被観察物の運動モデルとに基づいて上記被観察物の蛍光観察領域を決定する第 1 段階と、

上記蛍光観察領域内の所定の位置で上記蛍光画像情報を取得する第 2 段階と、

を備えたことを特徴とする、被観察物の蛍光観察方法。

[請求項18] 前記第 1 段階の蛍光観察領域を、PID 制御等の古典制御、最適制御、準最適制御等の現代制御に従って決定することを特徴とする、請求項 17 に記載の被観察物の蛍光観察方法。

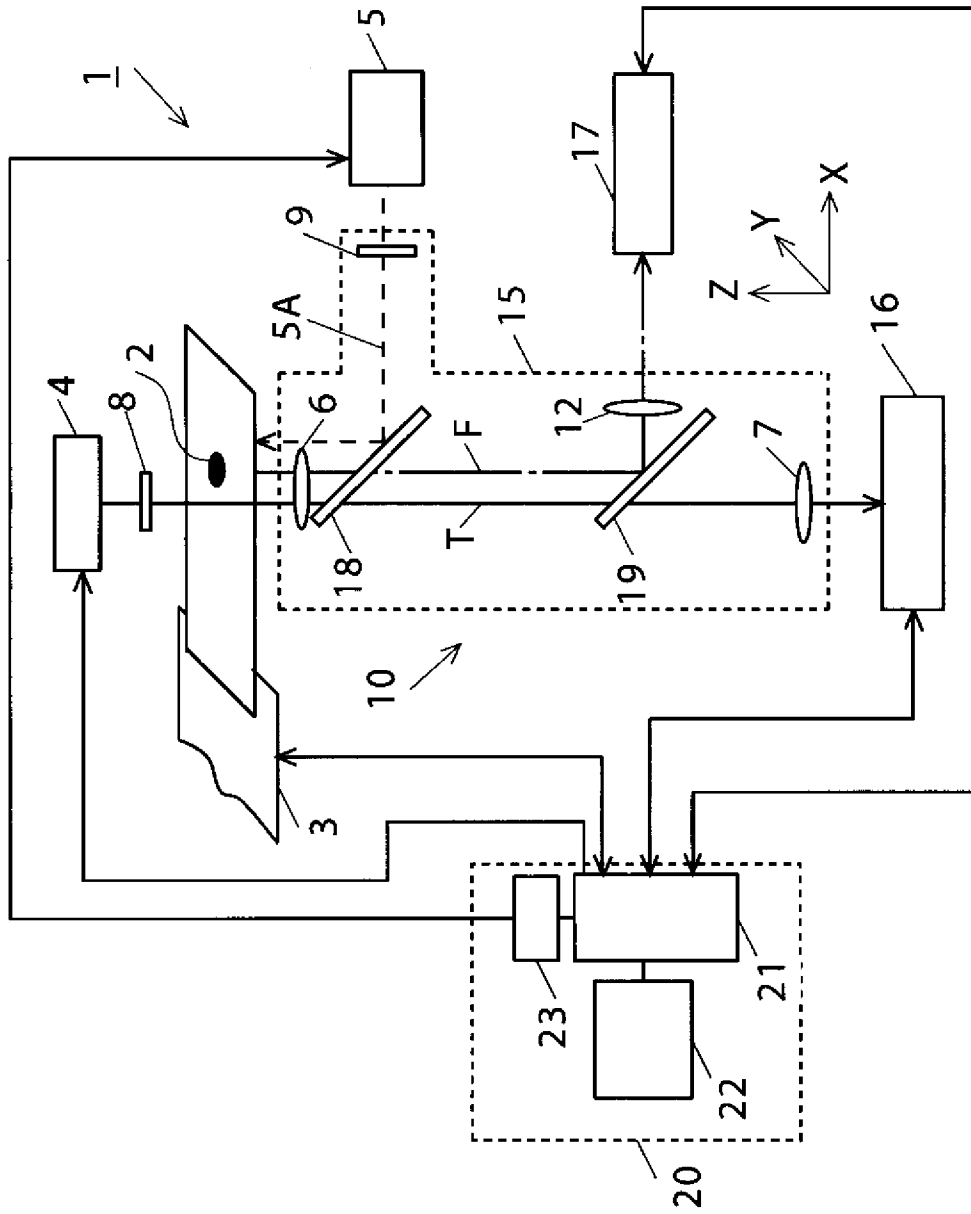
[請求項19] 前記第 1 段階と前記第 2 段階との間において、前記被観察物の画像情報と前記被観察物の運動モデルとの少なくとも一方に基づいて前記蛍光観察領域の中心位置を決定することを特徴とする、請求項 17 に記載の被観察物の蛍光観察方法。

[請求項20] 前記第 2 段階において、前記被観察物の画像情報を取得することを特徴とする、請求項 17 に記載の被観察物の蛍光観察方法。

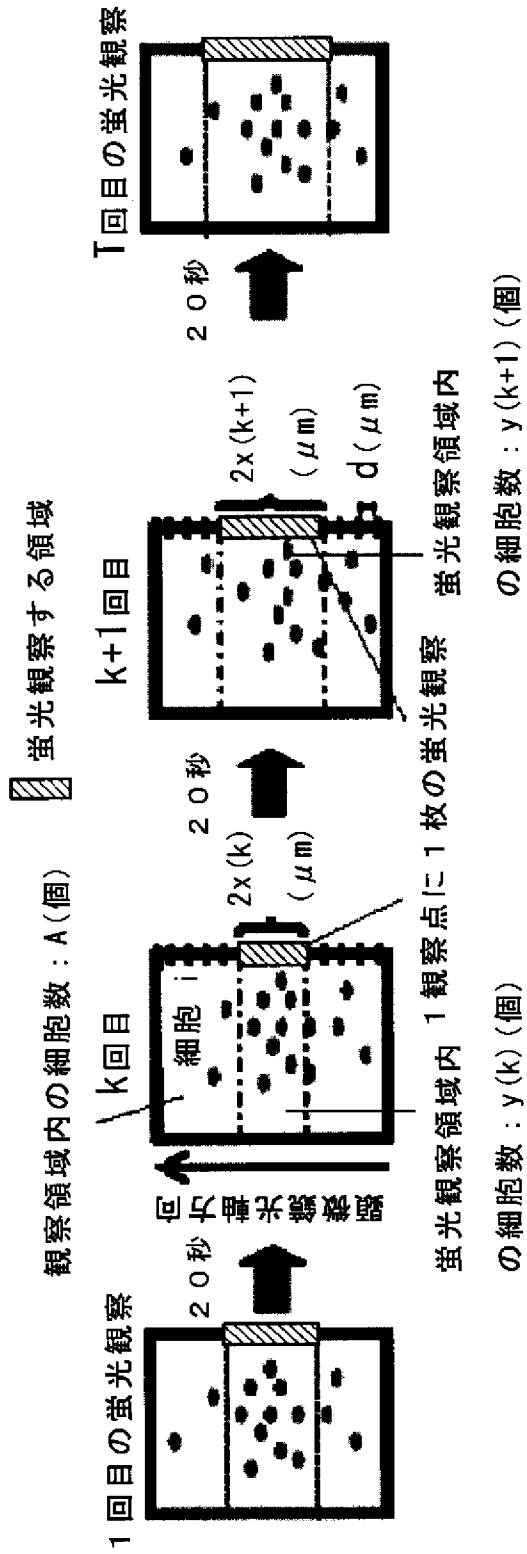
[請求項21] 前記各段階を、前記蛍光観察領域内の所定の位置毎に所定の回数繰り返し行うことを特徴とする、請求項 17 ~ 20 の何れかに記載の被観察物の蛍光観察方法。

[請求項22] 前記運動モデルのパラメータは、前記被観察物の位置、速度、分布、種類、形状、イオン濃度、分子濃度の何れか又はこれらの組み合わせからなることを特徴とする、請求項 17 に記載の被観察物の蛍光観察方法。

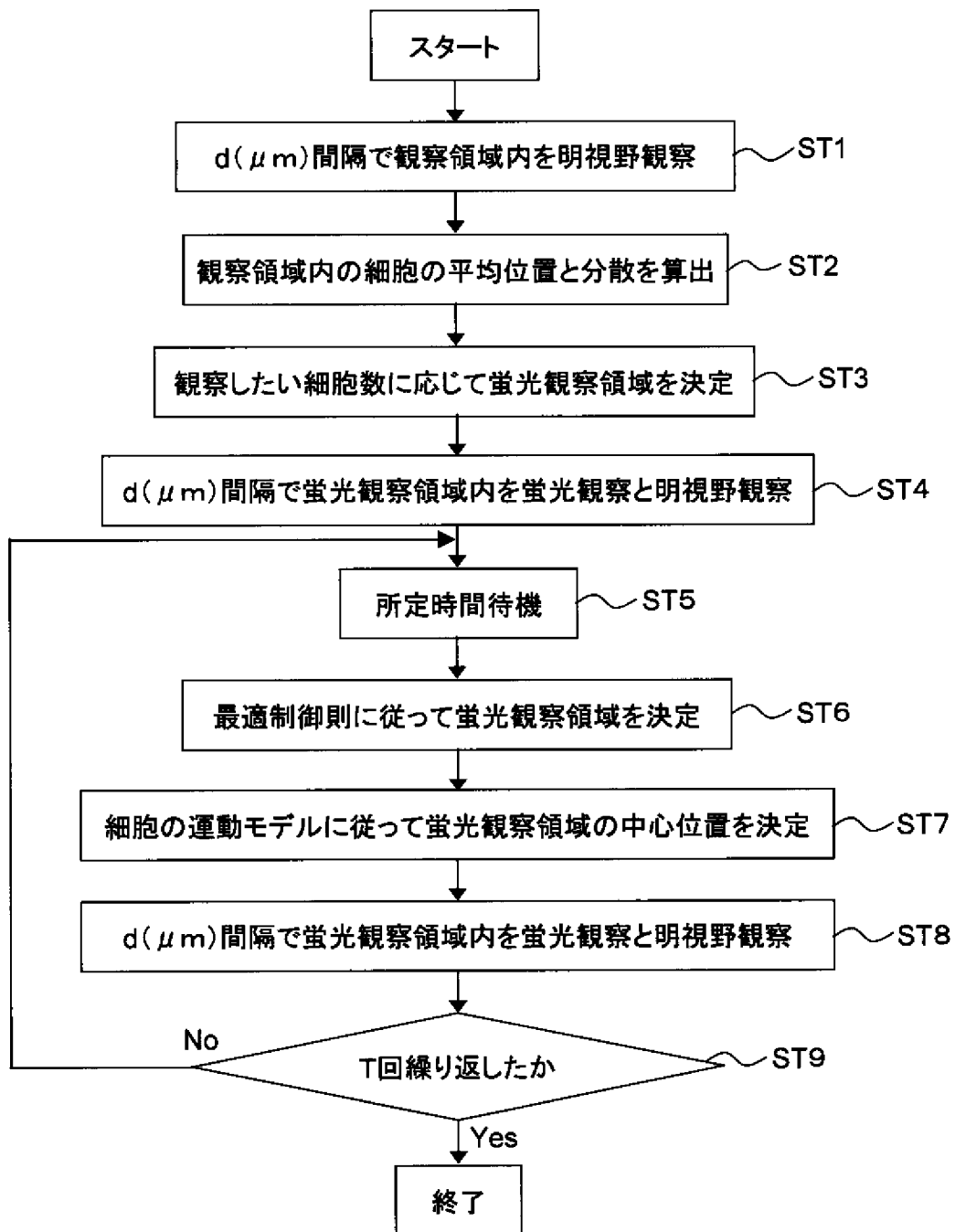
[図1]



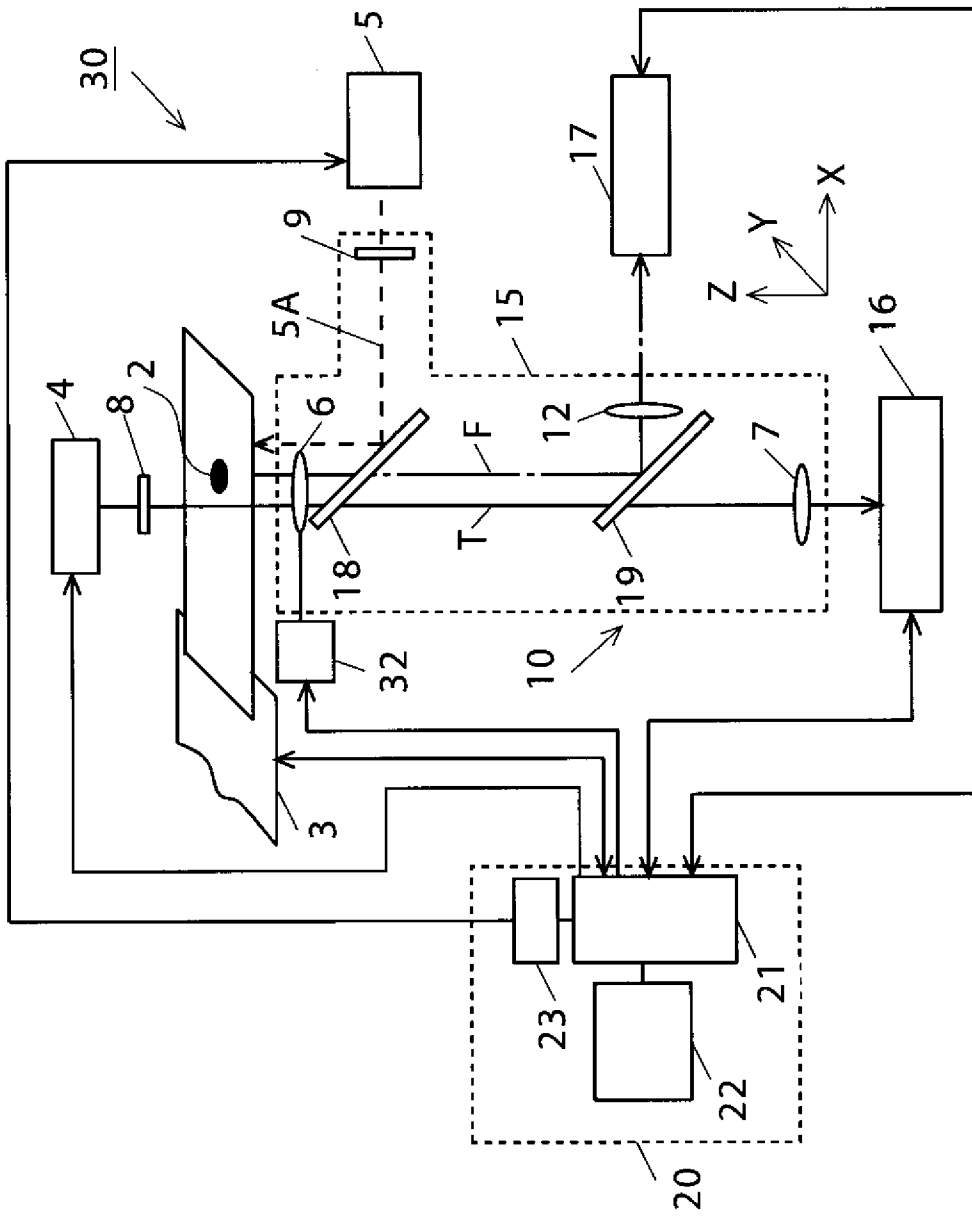
[図2]



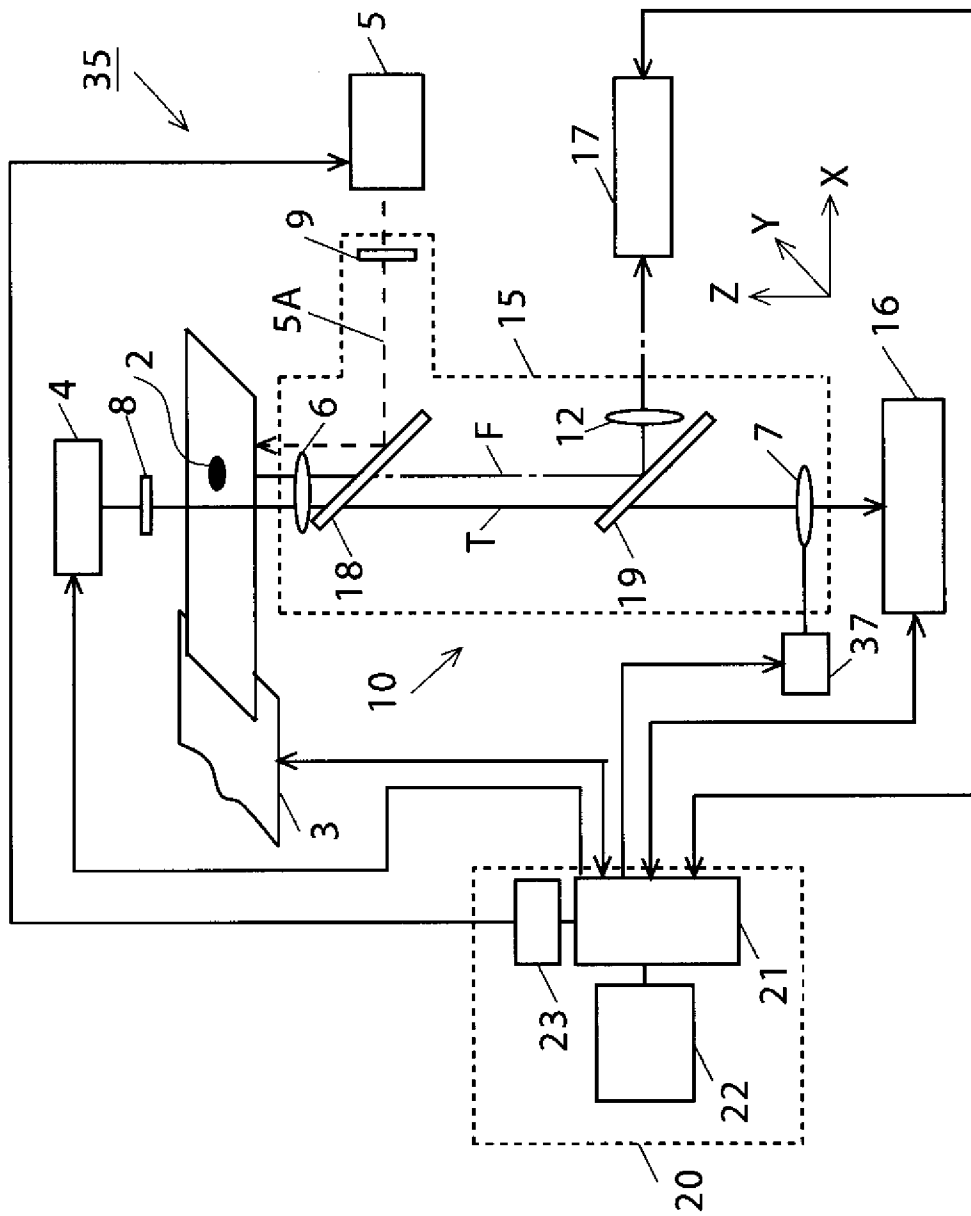
[図3]



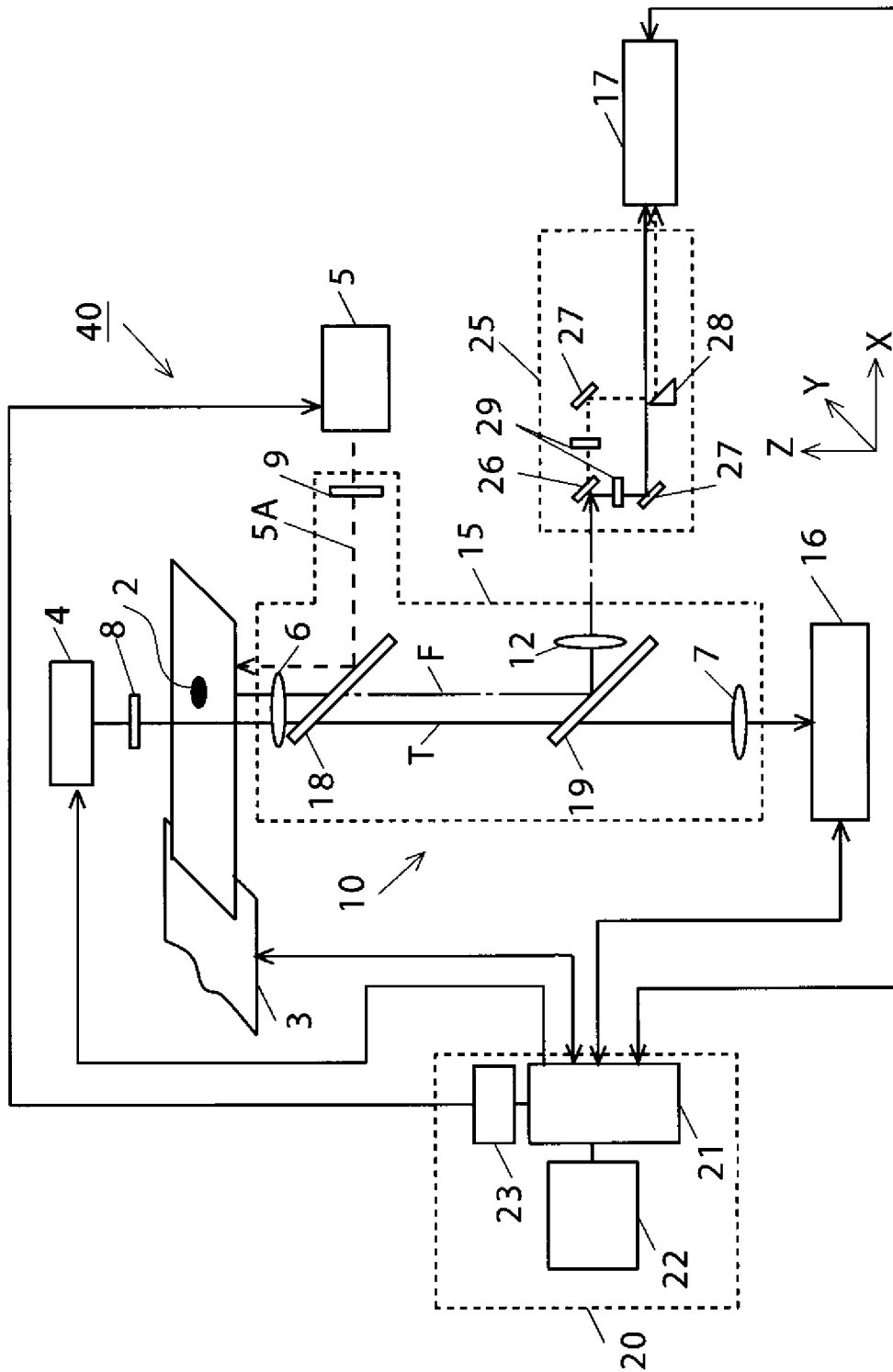
[図4]



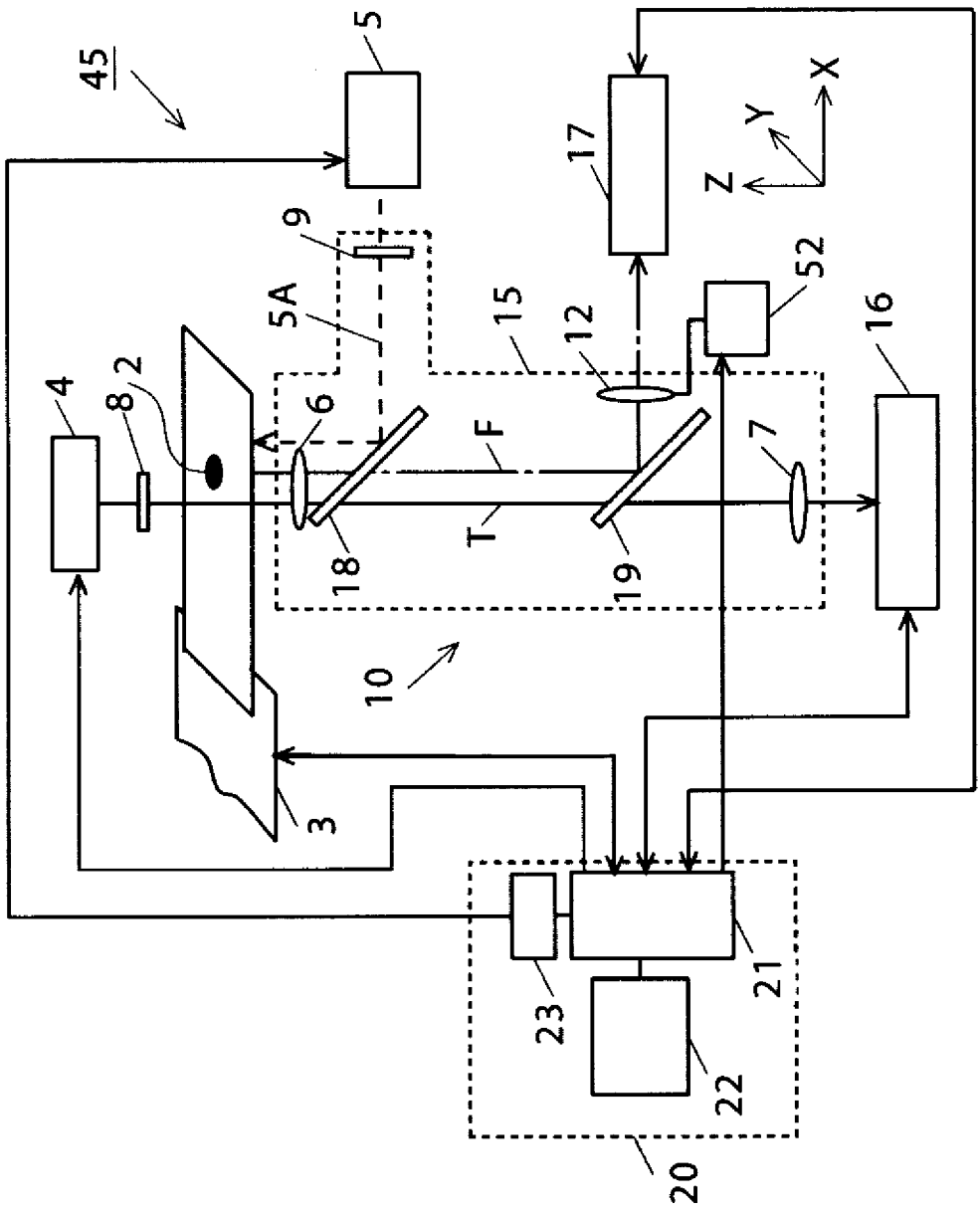
[図5]



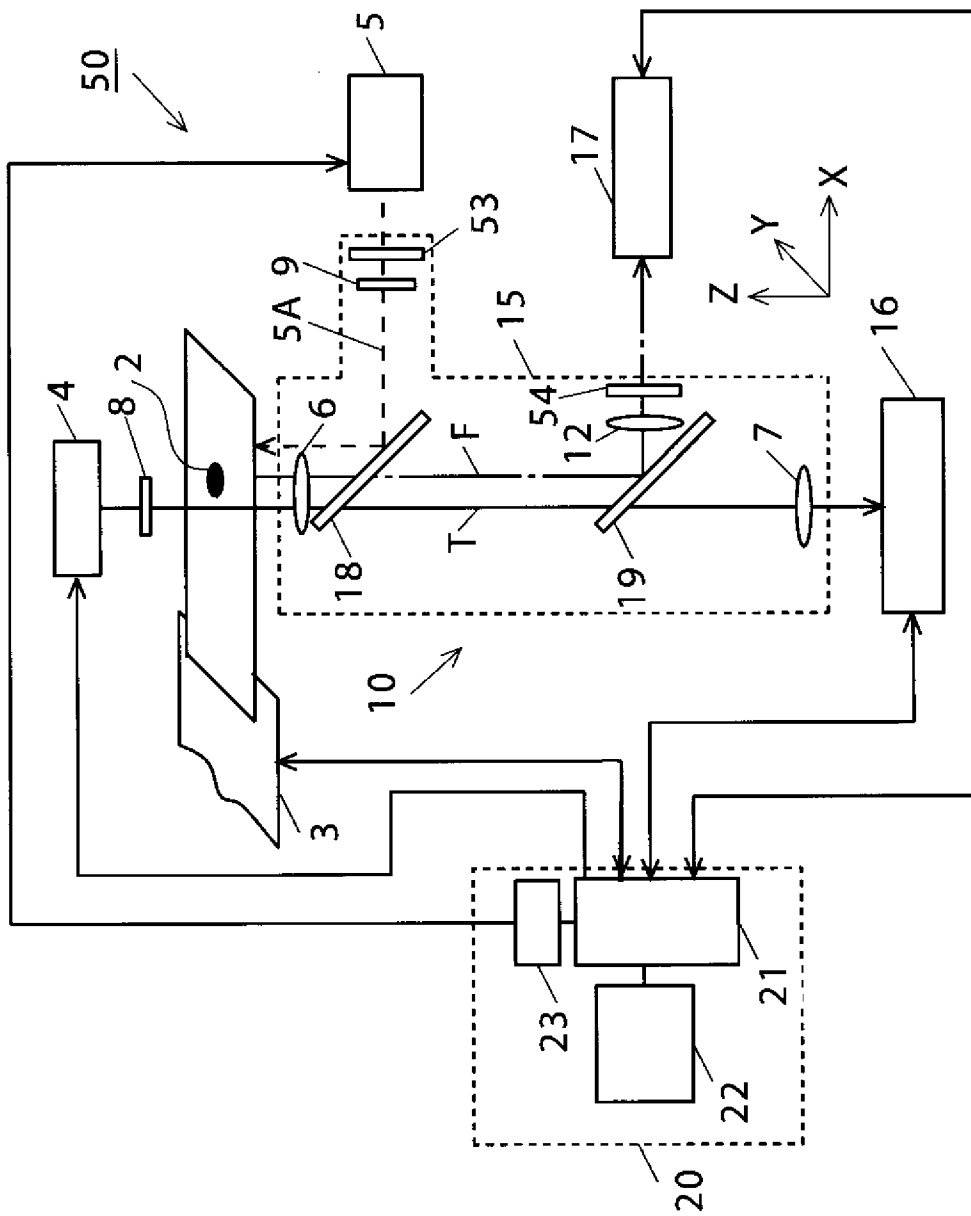
[図6]



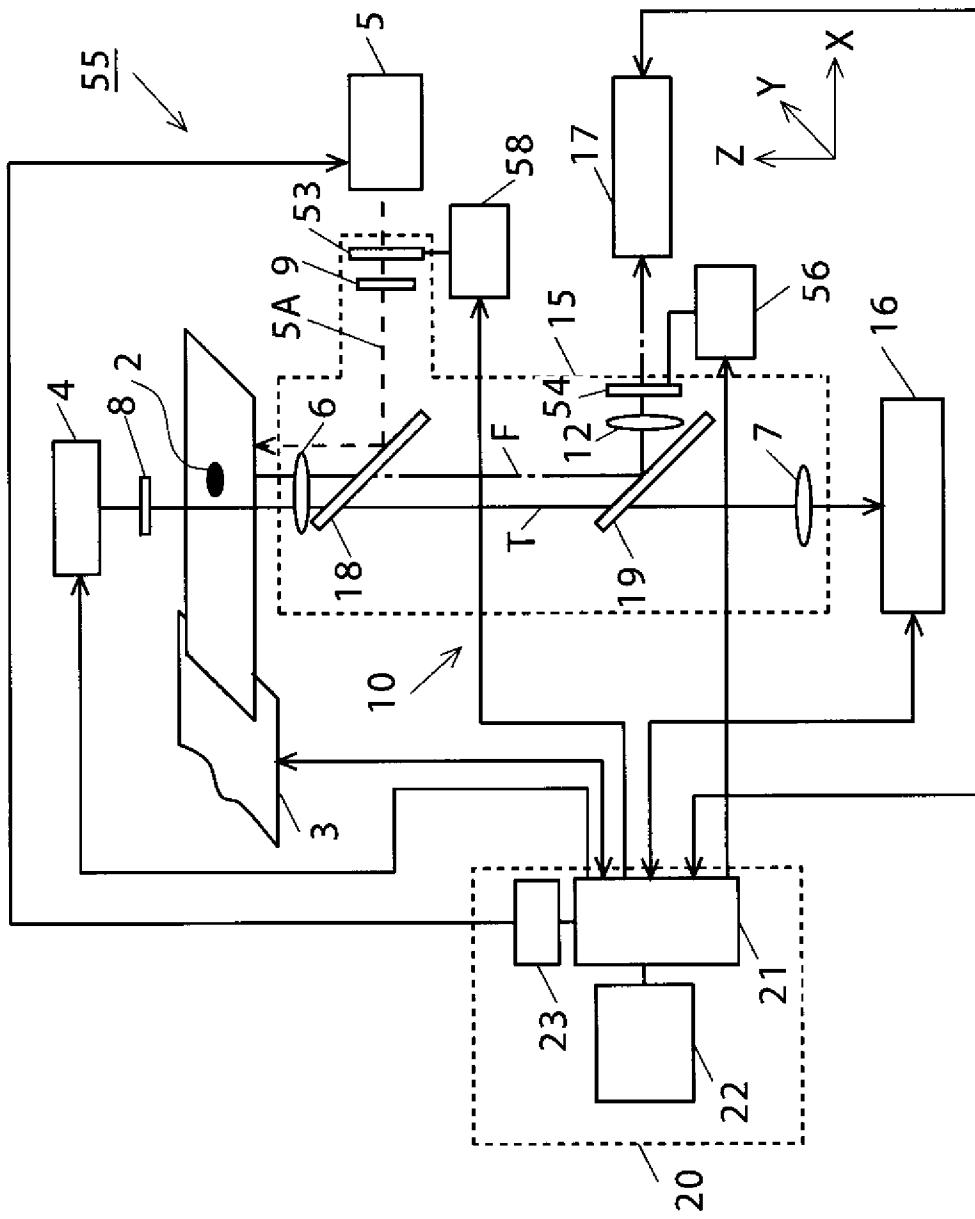
[図7]



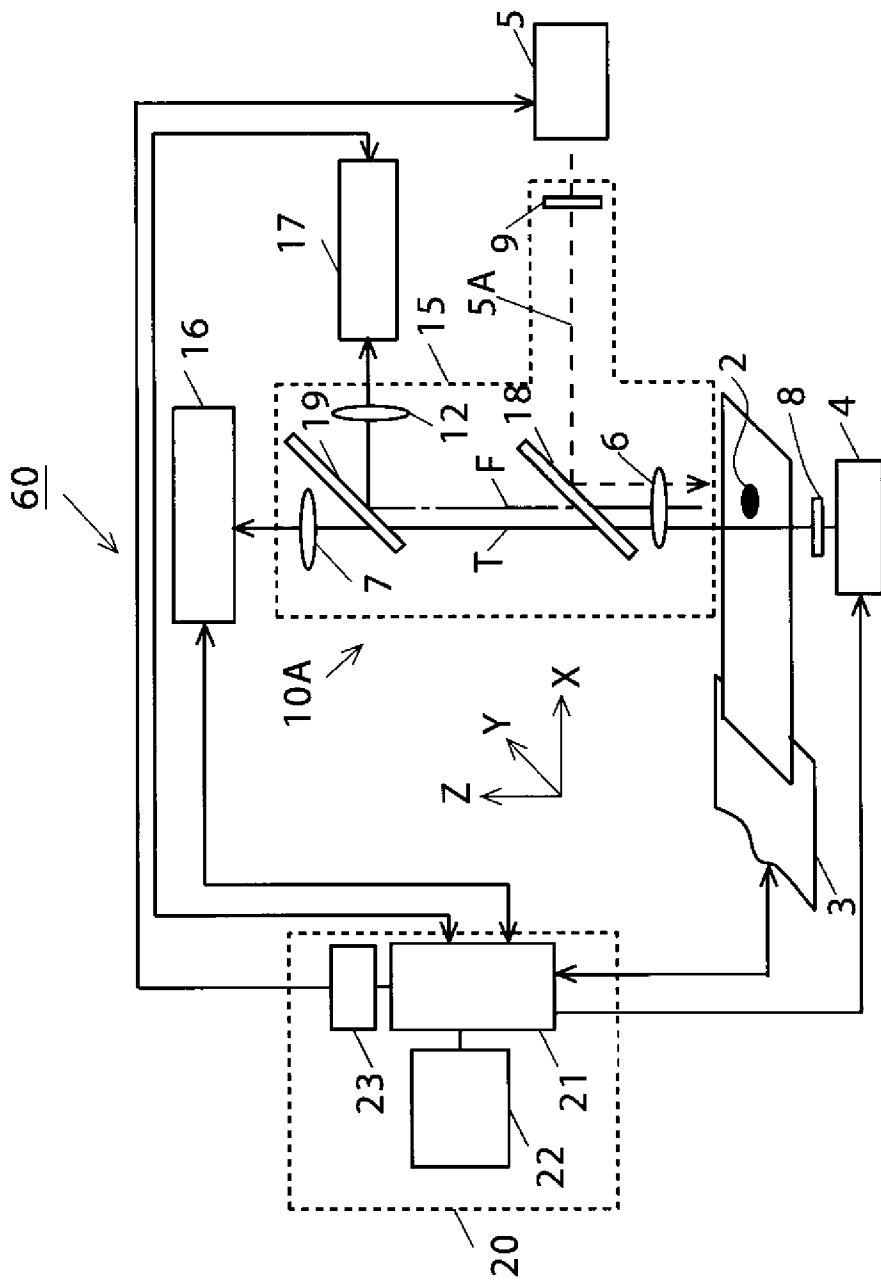
[図8]



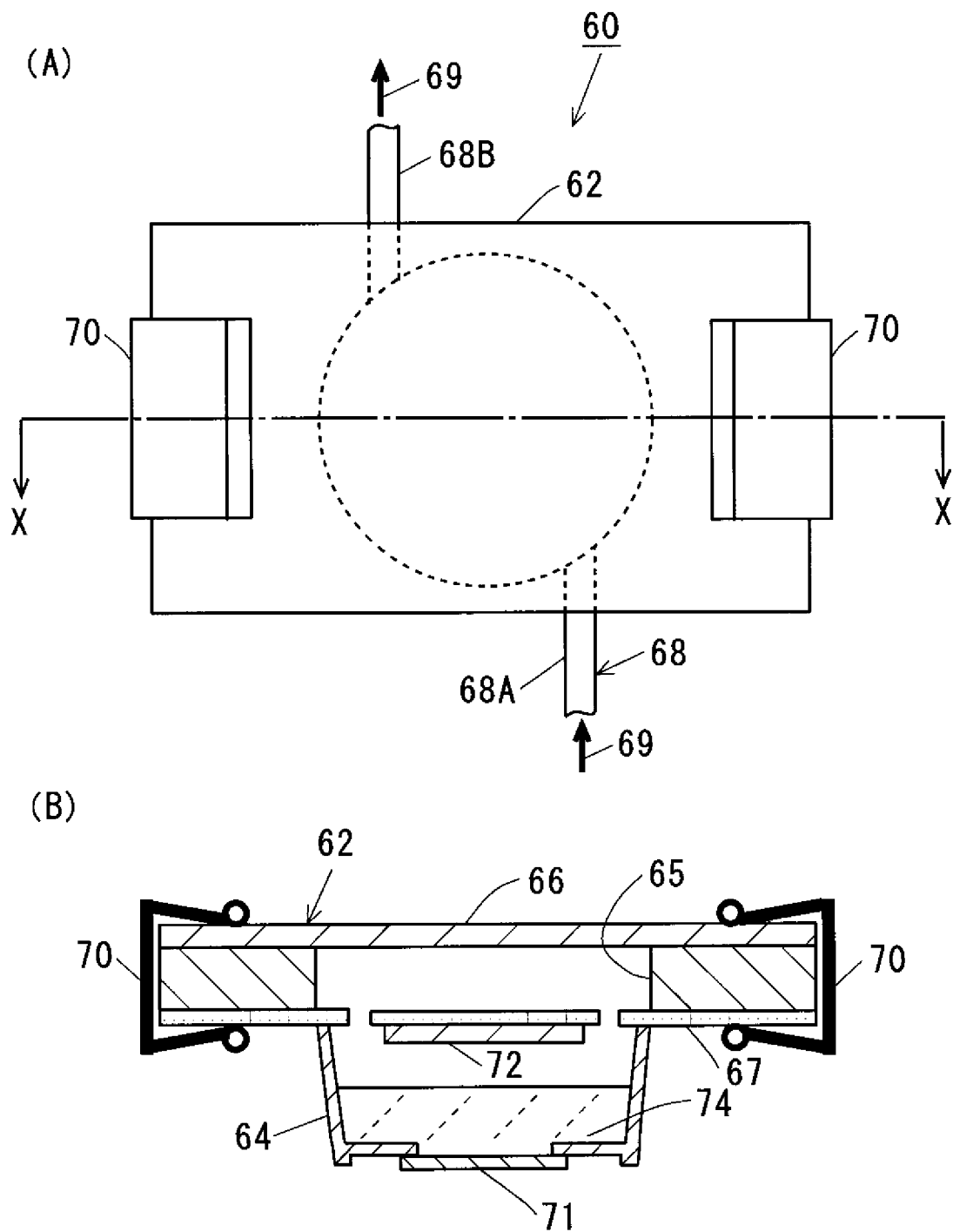
[図9]



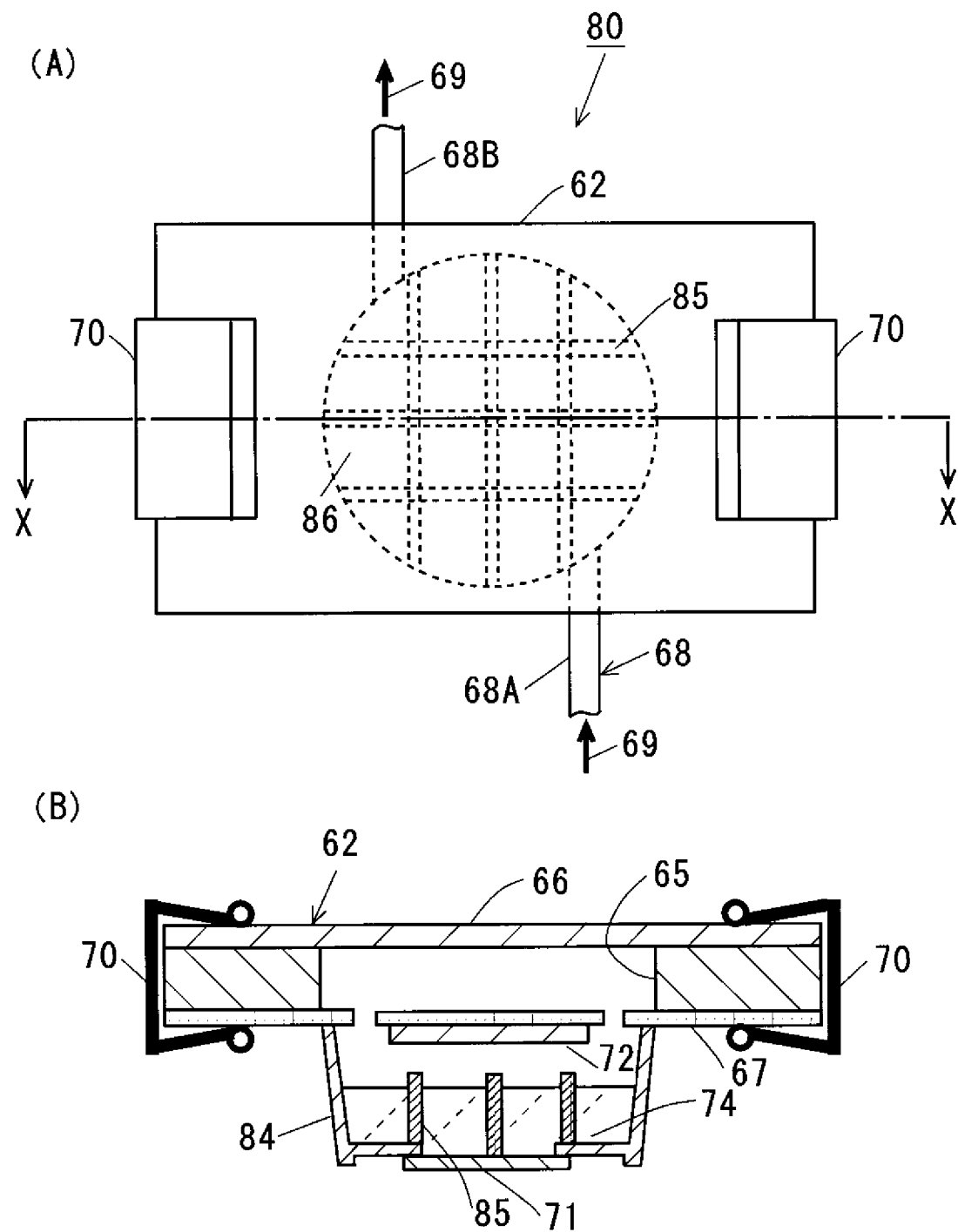
[図10]



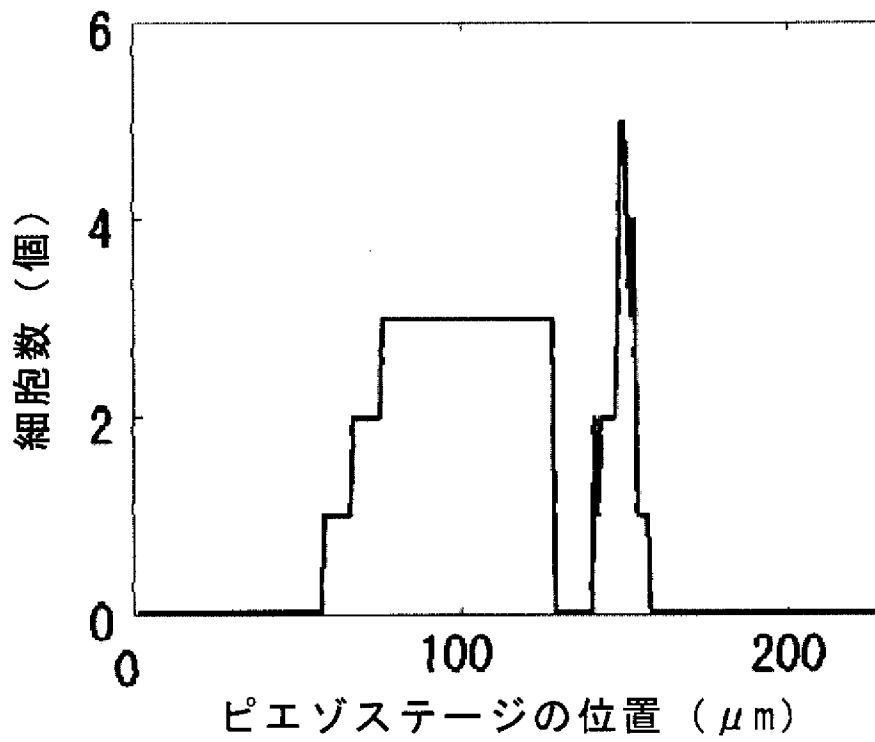
[図11]



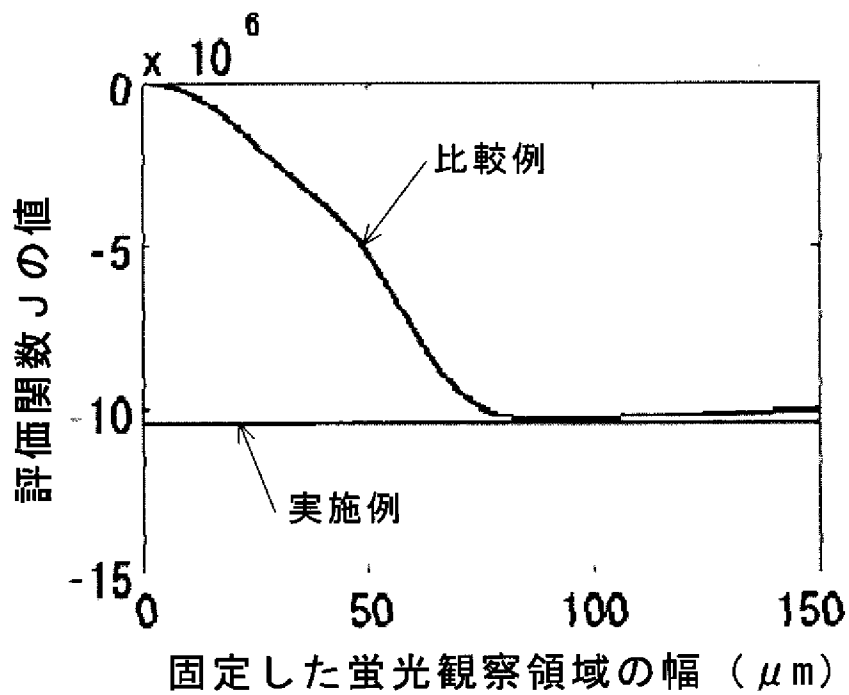
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/060644

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G02B21/00(2006.01) i, G01N21/64(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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
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.
P, A	JP 2008-242014 A (V Technology Co., Ltd.), 09 October, 2008 (09.10.08), Full text; all drawings (Family: none)	1-22
A	JP 2007-114130 A (Tohoku University), 10 May, 2007 (10.05.07), Full text; all drawings (Family: none)	1-22
A	JP 2006-292420 A (Olympus Corp.), 26 October, 2006 (26.10.06), Full text; all drawings (Family: none)	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 August, 2009 (04.08.09)		Date of mailing of the international search report 18 August, 2009 (18.08.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/060644

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 2006-209698 A (Olympus Corp.), 10 August, 2006 (10.08.06), Full text; all drawings & US 2008/0226126 A1 & EP 1847961 A1 & WO 2006/080355 A1	1-22
A	JP 2005-214924 A (Olympus Corp.), 11 August, 2005 (11.08.05), Full text; all drawings (Family: none)	1-22
A	JP 2005-128493 A (Olympus Corp.), 19 May, 2005 (19.05.05), Full text; all drawings & US 2005/0068614 A1 & US 7345814 B2	1-22
A	JP 2005-128086 A (Olympus Corp.), 19 May, 2005 (19.05.05), Full text; all drawings & US 2005/0082494 A1 & US 7253420 B2	1-22
A	JP 2000-292422 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 20 October, 2000 (20.10.00), Full text; all drawings (Family: none)	1-22
A	JP 7-261097 A (Fujitsu Ltd.), 13 October, 1995 (13.10.95), Full text; all drawings (Family: none)	1-22
A	JP 7-253548 A (Nikon Corp.), 03 October, 1995 (03.10.95), Full text; all drawings (Family: none)	1-22
A	JP 5-80255 A (Nippon Telegraph And Telephone Corp.), 02 April, 1993 (02.04.93), Full text; all drawings (Family: none)	1-22
A	H. OKU, et al., Two-dimensional tracking of a motile micro-organism allowing high-resolution observation with various imaging techniques, Review of Scientific Instruments, 2005.02.02, Vol. 76, Issue 3, Article 034301, p. 034301-1 to 034301-9	1-22
A	Hiromasa OKU, et al., High-speed autofocusing of a cell using diffraction patterns, Optics Express, 2006.05.01, Vol. 14, Issue 9 (No. 9), p. 3952 to 3960	1-22

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		
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		
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 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
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
P, A	JP 2008-242014 A (株式会社ブイ・テクノロジー) 2008.10.09, 全文、全図、(ファミリーなし)	1-22
A	JP 2007-114130 A (国立大学法人東北大学) 2007.05.10, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-22
A	JP 2006-292420 A (オリンパス株式会社) 2006.10.26, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 04.08.2009	国際調査報告の発送日 18.08.2009	
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) 森内 正明 電話番号 03-3581-1101 内線 3271	2V 9222

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2006-209698 A (オリンパス株式会社) 2006.08.10, 全文、全図 & US 2008/0226126 A1 & EP 1847961 A1 & WO 2006/080355 A1	1-22
A	JP 2005-214924 A (オリンパス株式会社) 2005.08.11, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-22
A	JP 2005-128493 A (オリンパス株式会社) 2005.05.19, 全文、全図 & US 2005/0068614 A1 & US 7345814 B2	1-22
A	JP 2005-128086 A (オリンパス株式会社) 2005.05.19, 全文、全図 & US 2005/0082494 A1 & US 7253420 B2	1-22
A	JP 2000-292422 A (オリンパス光学工業株式会社) 2000.10.20, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-22
A	JP 7-261097 A (富士通株式会社) 1995.10.13, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-22
A	JP 7-253548 A (株式会社ニコン) 1995.10.03, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-22
A	JP 5-80255 A (日本電信電話株式会社) 1993.04.02, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-22
A	H. OKU, et al., Two-dimensional tracking of a motile micro-oraganism allowing high-resolution observation with various imaging techniques, Review of Scientific Instruments, 2005.02.02, Vol. 76, Issue 3, Article 034301, p. 034301-1 to 034301-9	1-22
A	Hiromasa OKU, et al., High-speed autofocusing of a cell using diffraction patterns, Optics Express, 2006.05.01, Vol. 14, Issue 9(No. 9), p. 3952 to 3960	1-22