

(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11月16日(16.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/195794 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 1/34 (2006.01)

JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西
3丁目9番3号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2017/017596

(22) 国際出願日:

2017年5月9日(09.05.2017)

(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 2016-094461 2016年5月10日(10.05.2016) JP

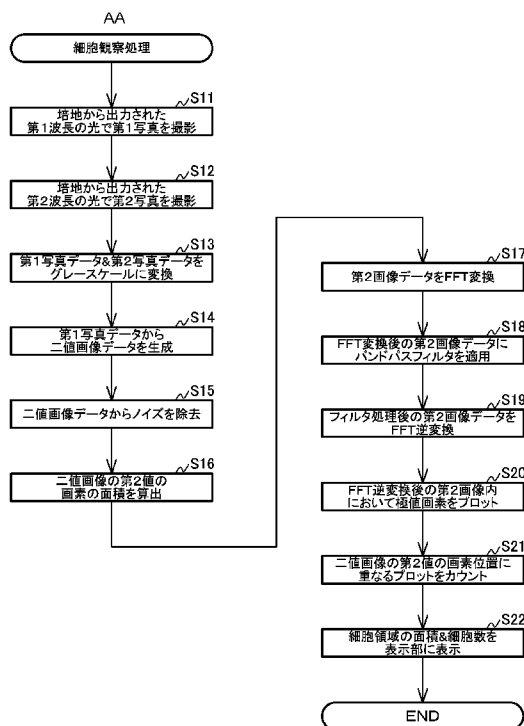
(71) 出願人: 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地85 Hokkaido (JP). ニプロ株式会社(NIPRO CORPORATION) [JP/

(72) 発明者: 本望 修(HONMOU, Osamu); 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 吉川 義洋(YOSHIKAWA, Yoshihiro); 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号 ニプロ株式会社内 Osaka (JP). 館山 大揮(TATEYAMA, Daiki); 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号 ニプロ株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 西木 信夫, 外(NISHIKI, Nobuo et al.); 〒5400012 大阪府大阪市中央区谷町2丁目4番5号 谷町センタービル9階 朋信国際特許事務所 Osaka (JP).

(54) Title: CELL OBSERVATION APPARATUS AND PROGRAM

(54) 発明の名称: 細胞観察装置及びプログラム



S11 Take first photograph by light of a first wavelength output from the medium
S12 Take second photograph by light of a second wavelength output from the medium
S13 Transform the first photograph data and second photograph data to gray scale
S14 Create binary image data from first photograph data
S15 Remove noise from binary image data
S16 Calculate the area of the second-value pixels of the binary image
S17 FFT transform second image data
S18 Apply band-pass filter to second image data after FFT transform
S19 FFT inverse transform second image data after filter processing
S20 Plot extreme pixels in second image after FFT inverse transform
S21 Count plots overlapping the second-value pixel positions of the binary image
S22 Display the area of the cell region and the cell count on the display unit
AA Cell observation process

(57) Abstract: [Problem] To provide a cell observation apparatus that makes it possible to evaluate the state of cultured cells quantitatively. [Solution] The cell observation apparatus executes a first photographing process (S11) for acquiring a first photograph in which a medium is photographed according to first photographing conditions, a second photographing process (S12) for acquiring a second photograph in which the medium is photographed according to second photographing conditions, a first specifying process (S14, S15) for specifying a cell region assumed to be a region where cultured cells



(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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

are present in the first photograph, a second specifying process (S17-S20) for specifying the position of the cell nucleus of the cultured cells and the assumed cell position in the second photograph, and a counting process (S21) for counting the number of cell positions positioned within the cell region specified by the first specifying process among the cell positions specified by the second specifying process as the cell count of the cultured cells.

(57) 要約: 【課題】培養細胞の状態を定量的に評価することが可能な細胞観察装置を提供する。【解決手段】細胞観察装置は、第1撮影条件に従って培地を撮影した第1写真を取得する第1撮影処理(S11)と、第2撮影条件に従って培地を撮影した第2写真を取得する第2撮影処理(S12)と、第1写真内において培養細胞が存在する領域と推定される細胞領域を特定する第1特定処理(S14、S15)と、第2写真内において培養細胞の細胞核の位置と推定される細胞位置を特定する第2特定処理(S17～S20)と、第2特定処理で特定された細胞位置のうち、第1特定処理で特定された細胞領域内に位置する細胞位置の数を、培養細胞の細胞数としてカウントするカウント処理(S21)とを実行する。

明 細 書

発明の名称：細胞観察装置及びプログラム

技術分野

[0001] 本発明は、培地内の細胞の状態を観察する細胞観察装置に関する。

背景技術

[0002] 従来より、病気の治療或いは医薬品の生産や評価のために、細胞の培養が行われている。細胞の培養は、無菌室内に設置されたインキュベータ内において、温度及び湿度等を一定に保った状態で行われる。また、細胞の培養を行う作業者は、例えば継代のタイミングを見極めること等を目的として、培養中の細胞の状態を定期的に観察する必要がある。

[0003] ここで、培養細胞の状態を観察する度にインキュベータからシャーレを取り出さなければならないとすると、培養細胞にダメージを与える可能性がある。そこで、例えば特許文献1には、培養細胞を撮影するためにインキュベータ内に設置された撮影手段と、撮影手段で撮影された培養細胞の画像を表示するためにインキュベータの外面に設置された表示手段とを備えるインキュベータが開示されている。これにより、インキュベータから培養細胞を取り出さずに観察することができる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2005-65567号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 培養細胞を観察する作業者は、例えば、シャーレ内における培養細胞の数、シャーレ内において培養細胞が占める面積等を割り出すことによって、継代のタイミングを判断する。しかしながら、特許文献1に記載のインキュベータでは、撮影手段で撮影された画像から培養細胞の状態を判断しなければならないので、その判断には熟練を要するという課題がある。

[0006] 本発明は、上記の事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、培養細胞の状態を定量的に評価することが可能な細胞観察装置を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] (1) 本発明の一形態に係る細胞観察装置は、写真を撮影する撮影部と、制御部とを備える。上記制御部は、培養細胞を含む培地を第1撮影条件に従って上記撮影部に撮影させることによって、第1写真を取得する第1撮影処理と、上記培地を上記第1撮影条件と異なる第2撮影条件に従って上記撮影部に撮影させることによって、第2写真を取得する第2撮影処理と、上記第1写真内において、上記培養細胞が存在する領域と推定される細胞領域を特定する第1特定処理と、上記第2写真内において、上記培養細胞の細胞核の位置と推定される細胞位置を特定する第2特定処理と、上記第2特定処理で特定された上記細胞位置のうち、上記第1特定処理で特定された上記細胞領域内に位置する上記細胞位置の数を、上記培養細胞の細胞数としてカウントするカウント処理とを実行する。

[0008] 上記構成のように、培養細胞の細胞数をカウントすることによって、当該培養細胞の状態を定量的に評価することができる。その結果、培養細胞の状態の判断に熟練していない作業者であっても、例えば、継代のタイミングを適切に判断することができる。

[0009] (2) 好ましくは、上記制御部は、上記第1特定処理において、上記第1写真を示す第1写真データのうち、第1閾値未満の画素値を第1値に置換し、上記第1閾値以上の画素値を第2値に置換した二値画像データを生成する生成処理と、上記二値画像データで示される二値画像のうち、上記第1値の画素の領域を上記細胞領域として特定する領域特定処理とを実行する。

[0010] 上記構成によれば、画素値（典型的には、輝度値）の違いによって、培養細胞が存在する領域と、培地の領域とを区別することができる。

[0011] (3) 好ましくは、上記制御部は、上記領域特定処理において、上記第1値の画素が閾値数以上連続する領域を上記細胞領域として特定する。

- [0012] 生成処理によって、第1写真に含まれるノイズの位置に第1値が割り当てられる可能性がある。しかしながら、ノイズは細胞と比較して小さいので、第1値の画素が閾値数以上連続する領域を細胞領域とすることによって、ノイズの影響を低減することができる。
- [0013] (4) 好ましくは、上記制御部は、上記第2特定処理において、上記第2写真を示す第2写真データから特定周波数成分を抽出する抽出処理と、上記特定周波数成分が抽出された上記第2写真の画素値を走査したときに、画素値の変化が減少及び増加の一方から他方に転じる境界の画素位置を上記細胞位置として特定する位置特定処理とを実行する。
- [0014] 特定周波数成分より周波数の高い成分は、例えば、細胞の輪郭、カメラの熱雑音によるノイズ、或いは小さなゴミ等の画像に対応する。一方、特定周波数成分より周波数の低い成分は、例えば、細胞質及び培地の領域の画像に対応する。そこで、これらを第2写真データから除去することによって、細胞核の画像を抽出することができるので、細胞数を正確にカウントすることができる。
- [0015] (5) 好ましくは、上記制御部は、上記抽出処理において、上記第2写真データをFFT変換する変換処理と、上記変換処理後の上記第2写真データに上記特定周波数成分を通過させるフィルタを適用するフィルタ処理と、上記フィルタ処理後の上記第2写真データをFFT逆変換する逆変換処理とを実行する。
- [0016] 上記構成のように、FFT (Fast Fourier Transform) 変換、バンドパスフィルタ、及びFFT逆変換を用いることにより、細胞核の画像を簡単且つ正確に抽出することができる。
- [0017] (6) 好ましくは、上記制御部は、上記第1特定処理で特定された上記細胞領域の面積を算出する算出処理を実行する。
- [0018] 上記構成のように、細胞領域の面積を算出することによって、培養細胞の状態をさらに定量的に評価することができる。なお、算出処理で算出された面積は、シャーレ内において培養細胞が占める割合を評価するために用いて

もよいし、当該面積を細胞数で除することによって培養細胞の大きさの評価に用いてもよい。

[0019] (7) 好ましくは、該細胞観察装置は、出力部をさらに備える。上記制御部は、上記カウント処理でカウントされた細胞数を上記出力部に出力させる出力処理を実行する。

[0020] 出力処理の具体例は特に限定されないが、例えば、細胞数を表示部に表示させてもよいし、細胞数をプリンタに印字させてもよい。また、出力対象は細胞数のみに限定されず、算出処理で算出される細胞領域の面積がさらに出力されてもよい。

[0021] (8) 一例として、該細胞観察装置は、上記培地へ光を照射する照射部を備える。上記第1撮影条件は、上記照射部によって照射された光のうち、上記培地から出力された第1波長の光で上記第1写真を撮影することを示す。上記第2撮影条件は、上記培地から出力された上記第1波長より長い第2波長の光で上記第2写真を撮影することを示す。

[0022] (9) 例えば、上記第1波長は、400nm以上で700nm以下である。また、上記第2波長は、700nm以上であり、且つ上記第1波長より長い。

[0023] (10) 他の例として、上記撮影部は、焦点の位置を調整する調整手段を備える。上記第1撮影条件は、上記培養細胞の輪郭に焦点を合わせた状態で上記第1写真を撮影することを示す。上記第2撮影条件は、上記第1撮影条件より上記撮影部に近い位置に焦点を合わせた状態で第3写真を撮影し、且つ上記第1撮影条件より上記撮影部から離れた位置に焦点を合わせた状態で第4写真を撮影することを示す。そして、上記制御部は、上記第2撮影処理において、上記第3写真及び上記第4写真の画素値の差を、上記第2写真として取得する。

[0024] (11) 本発明の他の形態に係る細胞観察装置は、写真を撮影する撮影部と、制御部とを備える。上記制御部は、培養細胞を含む培地を第1撮影条件に従って上記撮影部に撮影させることによって、第1写真を取得する第1撮影

処理と、上記培地を上記第1撮影条件と異なる第2撮影条件に従って上記撮影部に撮影させることによって、第2写真を取得する第2撮影処理と、上記第1写真内において、上記培養細胞が存在する領域と推定される細胞領域を特定する第1特定処理と、上記第1特定処理で特定された上記細胞領域の面積を算出する算出処理とを実行する。

- [0025] (12) 本発明に係るプログラムは、コンピュータによって実行可能である。該プログラムは、培養細胞を含む培地を第1撮影条件に従って撮影した第1写真、及び上記培地を上記第1撮影条件と異なる第2撮影条件に従って撮影した第2写真を示す写真データを取得する取得処理と、上記第1写真内において、上記培養細胞が存在する領域と推定される細胞領域を特定する第1特定処理と、上記第2写真内において、上記培養細胞の細胞核の位置と推定される細胞位置を特定する第2特定処理と、上記第1特定処理で特定された上記細胞領域及び上記第2特定処理で特定された上記細胞位置の少なくとも一方に基づいて、上記培養細胞の細胞数或いは上記細胞領域の面積を算出する算出処理とを上記コンピュータに実行させる。

発明の効果

- [0026] 本発明によれば、培養細胞の細胞数をカウントすることによって、当該培養細胞の状態を定量的に評価することができる。

図面の簡単な説明

- [0027] [図1]図1は、本実施形態に係る細胞観察装置10の機能ブロック図である。
[図2]図2は、本実施形態に係る細胞観察処理のフローチャートである。
[図3]図3は、ステップS11、S12で撮影された第1写真及び第2写真の一例を示す図である。
[図4]図4は、ステップS14で生成された二値画像の一例である。
[図5]図5は、ステップS15でノイズ34が除去された二値画像の一例である。
[図6]図6は、ステップS17～S19で細胞核31及びノイズ34が抽出された第2画像の一例である。

[図7]図7は、FFT変換後の第2写真内において一列に並んだ画素の輝度値の変化を模式的に表した図である。

[図8]図8は、ステップS20でプロット50が設定された第2画像の一例である。

[図9]図9は、図5に示される二値画像にプロット50を重ねた画像の一例である。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明の好ましい実施形態を説明する。なお、本実施形態は本発明の一実施態様にすぎず、本発明の要旨を変更しない範囲で実施態様を変更できることは言うまでもない。

[0029] 本実施形態に係る細胞観察装置10は、図1に示されるように、照射部11と、第1偏光板12A及び第2偏光板12B（これらを総称して、「偏光板12」と表記することがある。）と、撮影部13と、制御部14と、表示部15とを主に備える。また、照射部11から偏光板12を経て撮影部13に至る光路上には、図示しないコリメートレンズや結像レンズ等の光学系が適宜配置される。図1において、破線の矢印は光の進行方向を示し、実線の矢印は信号の進行方向を示す。

[0030] 照射部11は、第1波長及び第1波長より長い第2波長の光を少なくとも含む白色光を出力する。照射部11の具体例は特に限定されないが、例えば、LED（Light Emitting Diode）等を用いることができる。第1波長は、例えば、400nm以上で700nm以下の中から選択される。望ましくは、第1波長は、500nm以上で550nm以下の中から選択される。第2波長は、例えば、700nm以上で且つ第1波長より長い波長が選択される。望ましくは、第2波長は、700nm以上で900nm以下の中から選択される。

[0031] 第1偏光板12Aは、照射部11から照射された白色光のうちの第1波長の光のみを通過させ、その他の波長の光を遮断する。第2偏光板12Bは、照射部11から照射された白色光のうちの第2波長の光のみを通過させ、そ

の他の波長の光を遮断する。偏光板 1 2 の具体的な構造は特に限定されないが、例えば、ポリビニルアルコール主体にヨウ素化合物分子を吸着配向させた一般的な偏光フィルムを用いることができる。

[0032] 撮影部 1 3 は、照射部 1 1 から照射され且つ偏光板 1 2 を通過した光で写真撮影する。より詳細には、撮影部 1 3 は、偏光板 1 2 を通過した光を受光し、光電変換によって写真データを生成する。そして、撮影部 1 3 は、生成した写真データを制御部 1 4 に出力する。撮影部 1 3 の具体例は特に限定されないが、例えば、CCD (Charge Coupled Device) 等の撮像素子と、焦点の位置を調整するレンズユニット (調整手段の一例) とを備えるカメラである。また、本実施形態に係る撮影部 1 3 は、カラーの写真撮影することができるものとする。

[0033] 制御部 1 4 は、照射部 1 1、偏光板 1 2、撮影部 1 3、及び表示部 1 5 の動作を制御すると共に、撮影部 1 3 から取得した写真データに対する画像処理を実行する。制御部 1 4 の動作は、図 2 を参照して後述される。制御部 1 4 は、例えば、プログラムを記憶する記憶部と、記憶部からプログラムを読み出して実行する CPU (Central Processing Unit) とで構成される。

[0034] 表示部 1 5 は、制御部 1 4 の制御に従って情報を表示する。表示部 1 5 の具体的な構成は特に限定されないが、例えば、液晶ディスプレイ (Liquid Crystal Display の略)、有機 EL ディスプレイ (Organic Electro-Luminescence Display の略) 等を採用することができる。表示部 1 5 は、出力部の一例である。

[0035] [細胞観察処理]

図 2 ～図 8 を参照して、細胞観察処理を説明する。なお、以下の各処理は、CPU が実行するプログラムによって実現されてもよいし、制御部 1 4 に搭載されたハードウェア回路によって実現されてもよいし、これらを組み合わせて実現されてもよい。

[0036] まず、細胞観察装置 1 0 の照射部 1 1 から撮影部 1 3 に至る光路上に、細

胞を培養するための培地 21 を含むシャーレ 20 が配置される。これにより、照射部 11 から照射された光の一部は、培地 21 を透過して撮影部 13 に到達する。なお、シャーレ 20 は、作業者によって細胞観察装置 10 にセットされてもよい。または、インキュベータに組み込まれた細胞観察装置 10 の照射部 11 及び撮影部 13 が、シャーレ 20 の載置部を挟んで対向配置されていてもよい。

[0037] 制御部 14 は、照射部 11 に白色光を照射させ、撮影部 13 に第 1 写真を撮影させる (S 11)。第 1 写真は、培地 21 を透過した光のうち、第 1 偏光板 12 A を通過した第 1 波長の光で撮影部 13 が撮影した写真である。すなわち、ステップ S 11 において、照射部 11 から撮影部 13 に至る光路上には、第 1 偏光板 12 A が配置される。そして、制御部 14 は、当該第 1 写真を示す第 1 写真データを撮影部 13 から取得する。ステップ S 11 は、第 1 撮影処理及び取得処理の一例である。また、ステップ S 11 において撮影部 13 に入射させる光の波長は、第 1 撮影条件の一例である。

[0038] 次に、制御部 14 は、照射部 11 に白色光を照射させ、撮影部 13 に第 2 写真を撮影させる (S 12)。第 2 写真は、培地 21 を透過した光のうち、第 2 偏光板 12 B を通過した第 2 波長の光で撮影部 13 が撮影した写真である。すなわち、ステップ S 12 において、照射部 11 から撮影部 13 に至る光路上には、第 2 偏光板 12 B が配置される。そして、制御部 14 は、当該第 2 写真を示す第 2 写真データを撮影部 13 から取得する。ステップ S 12 は、第 2 撮影処理及び取得処理の一例である。また、ステップ S 12 において撮影部 13 に入射させる光の波長は、第 2 撮影条件の一例である。

[0039] 図 3 は、ステップ S 11、S 12 で撮影された第 1 写真及び第 2 写真の一例である。第 1 写真及び第 2 写真は、視野、画角、及び倍率等の撮影条件は同一であり、撮影時に撮影部 13 に到達する光の波長が異なる。第 1 写真及び第 2 写真には、培地 21 内で培養された細胞 30 が写っている。細胞 30 は、細胞核 31 と、細胞核 31 の周りを囲む細胞質 32 と、細胞 30 の輪郭を形成する細胞壁 33 とで構成される。また、第 1 写真及び第 2 写真には、

ノイズ 3 4 が含まれている。ノイズ 3 4 の原因は特に限定されないが、例えば、撮影部 1 3 の熱雑音によるノイズ、撮影部 1 3 のレンズ等に付着した小さなゴミによるノイズ等が考えられる。

[0040] 次に、制御部 1 4 は、カラーの第 1 写真データ及び第 2 写真データ（以下、これらを総称して、「写真データ」と表記することがある。）を、グレースケールの写真データに変換する（S 1 3）。なお、ステップ S 1 3 で生成される写真データは、各画素が輝度値の大小を表すものであればグレースケールに限定されない。例えば、写真データを RGB 色空間から YUV 色空間に変換し、輝度信号のみを抽出した輝度画像であってもよい。また、ステップ S 1 1、S 1 2 において、撮影部 1 3 がグレースケールの写真データを生成する場合、ステップ S 1 3 は省略することができる。

[0041] 次に、制御部 1 4 は、グレースケールの第 1 写真データから二値画像データを生成する（S 1 4）。具体的には、制御部 1 4 は、グレースケールの第 1 写真データのうち、第 1 閾値未満の画素値を第 1 値（例えば、“0”）4 1 に置換し、第 1 閾値以上の画素値を第 2 値（例えば、“1”）4 2 に置換することによって、二値画像データを生成する。ステップ S 1 4 の処理は、生成処理の一例である。

[0042] 図 4 は、ステップ S 1 4 で生成される二値画像データで示される二値画像の一例である。図 4 に示される二値画像は、第 1 写真の細胞 3 0 及びノイズ 3 4 の位置に対応する画素値が第 1 値（図 4 における白色の領域）4 1 となり、培地 2 1 の位置に対応する画素値が第 2 値（図 4 における黒色の領域）4 2 となる。すなわち、図 4 に示される二値画像では、培地 2 1 及び細胞 3 0 が区別され、細胞核 3 1、細胞質 3 2、及び細胞壁 3 3 が区別されない。

[0043] なお、本実施形態では、細胞 3 0 及びノイズ 3 4 の画素が培地 2 1 の画素より画素値が小さいことを前提としている。しかしながら、この画素値の関係が逆転する場合、制御部 1 4 は、ステップ S 1 4 において、第 1 閾値以上の画素値を第 1 値に置換し、第 1 閾値未満の画素値を第 2 値に置換すればよい。

[0044] 次に、制御部 14 は、ステップ S 14 で生成された二値画像データからノイズ 34 を除去する (S 15)。具体的には、制御部 14 は、連続する第 1 値の画素が閾値数未満であることに応じて、当該画素の画素値を第 1 値 41 から第 2 値 42 に変更する。換言すれば、制御部 14 は、細胞 30 の一般的な大きさより十分に小さい第 1 値 41 の画素の塊を第 2 値 42 の画素に置換する。

[0045] 図 5 は、ノイズ 34 に対応する画素に第 2 値 42 が設定された二値画像の一例である。図 5 に示される二値画像は、ノイズ 34 の位置の画素に第 2 値 42 が設定されている点において、図 4 に示される二値画像と相違する。そして、制御部 14 は、図 5 に示される二値画像のうち、第 1 値 41 が設定された画素の領域を、細胞 30 が存在すると推定される領域（以下、「細胞領域」と表記する。）として特定する。ステップ S 15 の処理は、領域特定処理の一例である。ステップ S 14、S 15 は、第 1 特定処理の一例である。

[0046] 次に、制御部 14 は、図 5 に示される二値画像のうち、第 1 値 41 の画素の面積を算出する (S 16)。具体的には、制御部 14 は、二値画像に含まれる第 1 値 41 の画素数をカウントし、当該画素数に 1 画素の面積を乗じることによって、第 1 値 41 の画素の面積を算出する。ステップ S 16 で算出された面積は、第 1 写真に含まれる細胞領域の面積に相当する。ステップ S 16 の処理は、算出処理の一例である。

[0047] 次に、制御部 14 は、グレースケールの第 2 写真データを FFT (Fast Fourier Transform) 変換する (S 17)。すなわち、制御部 14 は、空間領域の第 2 写真データを、周波数領域の第 2 写真データに変換する。ステップ S 17 の処理は、変換処理の一例である。なお、ステップ S 17 で第 2 写真データに適用される処理の具体例は FFT に限定されず、例えば、離散コサイン変換 (Discrete Cosine Transform) 等であってもよい。

[0048] 次に、制御部 14 は、FFT 変換された第 2 写真データにバンドパスフィルタを適用する (S 18)。バンドパスフィルタは、変換処理後の第 2 写真

データの周波数成分のうち、特定周波数成分を通過させ、特定周波数成分より高い周波数成分（以下、「高周波数成分」と表記する。）及び特定周波数成分より低い周波数成分（以下、「低周波数成分」と表記する。）を遮断（減衰）するフィルタである。ステップS 1 8の処理は、フィルタ処理の一例である。

[0049] なお、特定周波数成分とは、例えば、細胞核3 1を表す画像の複雑さに対応する予め定められた範囲の周波数である。また、高周波成分は、例えば、細胞3 0の輪郭（すなわち、細胞壁3 3）及びノイズ3 4等を表す画像の複雑さに対応する。さらに、低周波成分は、例えば、培地2 1、細胞質3 2、及び照射部1 1から照射される光の偏りによる輝度ムラ等を表す画像の複雑さに対応する。

[0050] 次に、制御部1 4は、バンドパスフィルタが適用された第2写真データをFFT逆変換する（S 1 9）。すなわち、制御部1 4は、周波数領域の第2写真データを、空間領域の第2写真データに変換する。但し、ステップS 1 7で第2写真データが離散コサイン変換された場合、ステップS 1 9で第2写真データが離散コサイン逆変換される。ステップS 1 9の処理は、逆変換処理の一例である。ステップS 1 7～S 1 9の処理は、第2写真データから特定周波数成分を抽出する抽出処理の一例である。

[0051] 図6は、抽出処理後の第2写真データで示される第2写真の一例である。図6に示される第2写真は、培地2 1、細胞質3 2、細胞壁3 3、及びノイズ3 4の一部を示す画像を、図3に示される第2写真から除去したものに相当する。但し、図6に示される第2写真には、ノイズ3 4の一部が未だ含まれている可能性がある。また、図6に示される第2写真において、細胞核3 1及びノイズ3 4の位置の画素は、その他の位置の画素より画素値が小さい。

[0052] 次に、制御部1 4は、FFT逆変換後の第2写真内において、極値画素の画素位置にプロット5 0を設定する（S 2 0）。極値画素は、例えば、第2写真の画素を左右方向（或いは、上下方向）に走査したときに、輝度値の変

化が減少及び増加の一方から他方に転じる境界の画素を指す。例えば図 7 に示されるように、細胞核 3 1 及びノイズ 3 4 の位置の画素がその他の位置の画素より画素値が小さい場合の極値画素は、輝度値の変化が減少から増加に転じる境界の画素（すなわち、画素値が極小となる極小画素）を指す。一方、細胞核 3 1 及びノイズ 3 4 の位置の画素がその他の位置の画素より画素値が大きい場合の極値画素は、輝度値の変化が増加から減少に転じる境界の画素（すなわち、画素値が極大となる極大画素）を指す。

[0053] 図 7 は、F F T 変換後の第 2 写真内において一列に並んだ画素の輝度値の変化を模式的に表した図である。制御部 1 4 は、ステップ S 2 0 において、図 7 に示される画素のうちの輝度値が第 2 閾値未満の画素（実線部分）のみを走査対象にする。そして、制御部 1 4 は、連続する走査対象画素列 A のうちの輝度値が最小になる極小画素 A 1 の画素位置にプロット 5 0 を設定する。また、制御部 1 4 は、連続する走査対象画素列 B に極大画素 B 1 が存在する場合、極大画素 B 1 より走査方向の一方側において輝度値が最小となる極小画素 B 2 の画素位置と、極大画素 B 1 より走査方向の他方側において輝度値が最小となる極小画素 B 3 の画素位置とに、プロット 5 0 を設定する。

[0054] 図 8 は、プロット 5 0 が設定された第 2 写真の一例である。図 8 に示される第 2 写真には、図 6 に示される第 2 写真に含まれる細胞核 3 1 及びノイズ 3 4 の位置に、プロット 5 0 が設定される。また、図 8 では、細胞核 3 1 及びノイズ 3 4 の図示は省略されている。ステップ S 2 0 の処理は、位置特定処理の一例である。ステップ S 1 7 ~ S 2 0 の処理は、細胞核 3 1 の位置と推定される位置（以下、「細胞位置」と表記する。）を特定する第 2 特定処理の一例である。すなわち、プロット 5 0 の位置が細胞位置に相当する。

[0055] 次に、制御部 1 4 は、図 9 に示されるように、図 4 に示される第 1 写真に図 8 に示されるプロット 5 0 を重ねる。そして、制御部 1 4 は、図 9 に示される画像において、第 1 値 4 1 の領域に重なるプロット 5 0 の数を、細胞 3 0 の数（以下、「細胞数」と表記する。）としてカウントする（S 2 1）。すなわち、制御部 1 4 は、図 9 に示される画像において、第 1 値 4 1 の領域

に重なるプロット50は細胞核31の位置を示し、第2値42の領域に重なるプロット50はノイズ34の位置を示していると判断する。ステップS21は、カウント処理の一例である。

[0056] 次に、制御部14は、ステップS16で算出した細胞領域の面積と、ステップS21でカウントした細胞数とを表示部15に表示させる（S22）。また、制御部14は、細胞領域の面積を細胞数で除した細胞30の面積の平均値を、表示部15にさらに表示させてもよい。ステップS22の処理は、出力処理の一例である。

[0057] [本実施形態の作用効果]

上記の実施形態のように、波長が異なる2つ光を用いて撮影した第1写真及び第2写真を画像処理することによって、細胞領域の面積を算出し、細胞30の細胞数をカウントすることができる。その結果、熟練した作業者でなくても当該細胞30の状態を定量的に評価することができるので、例えば、継代のタイミングや当該培地の倍加時間を適切に判断することができる。なお、上記の実施形態では、面積の算出及び細胞数のカウントの両方を実行する例を説明したが、いずれか一方のみが実行されてもよい。細胞数のカウントを省略する場合、ステップS17～S21の処理が省略される。

[0058] なお、継代のタイミングや倍加時間の判断は、作業者にではなく、制御部14に実行させてもよい。一般的に、細胞の数が所定の数に達したことによって継代が行われる。また、細胞の面積が大きいほど倍加時間が長くなり、細胞の面積が小さいほど倍加時間が短くなる傾向がある。そこで、継代を実行するときの細胞の数や、細胞の面積と倍加時間との関係等をデータベースとして制御部14に予め与えておくことによって、培養のスケジュールを制御部14に立案させることができる。そして、立案されたスケジュールは、ステップS22において、表示部15に表示されてもよい。

[0059] また、上記の実施形態によれば、第1写真内における画素値の違いによって培地21と細胞30とが区別され（S14）、第1値41の画素の塊の大きさによって細胞30とノイズ34とが区別される（S15）。これにより

、第1写真内における細胞領域を適切に特定することができる。

[0060] また、上記の実施形態によれば、バンドパスフィルタによって第1写真から特定周波数成分（すなわち、細胞核31を示す画像）が抽出され（S17～S19）、二値画像と重ね合わせることによってノイズ34が除去される（S21）。これにより、第2写真内における細胞位置を適切に特定することができる。

[0061] なお、上記の実施形態に係る細胞観察処理は、シャーレ20上の複数の箇所それぞれに対して実行されてもよい。より詳細には、制御部14は、シャーレ20上の互いに異なる撮影範囲に対してステップS11～S21の処理を実行してもよい。そして、制御部14は、ステップS22において、ステップS16で算出された面積の合計値（或いは、平均値）と、ステップS21でカウントされた細胞数の合計値（或いは、平均値）とを、表示部15に表示させてもよい。

[0062] また、図1に示される細胞観察装置10の具体的な構成は、前述の例に限定されない。例えば、照射部11は、制御部14の制御に従って、第1波長の単色光と、第2波長の単色光とを選択的に出力してもよい。この場合、偏光板12は省略することができる。また、照射部11から培地21を経由して撮影部13に到達する光は、培地21を透過することに限定されず、培地21で反射されたものであってもよい。また、出力部の具体例は表示部15に限定されず、情報をシートに記録するプリンタ等であってもよい。

[0063] また、ステップS11、S12における撮影条件は、撮影部13に入射させる光の波長が異なることに限定されず、焦点の位置が異なることであってもよい。焦点の位置は、レンズユニットを操作することによって変更される。レンズユニットは、細胞観察装置10の作業者によって手動で操作されてもよいし、制御部14によって制御される不図示のアクチュエータによって操作されてもよい。さらに他の例として、ステップS11、S12において、光の波長及び焦点の位置の両方が異なる撮影条件を採用してもよい。なお、ステップS13以降の処理は、前述の例と共通する。

[0064] より詳細には、制御部 14 は、ステップ S 11 において、細胞 30 の輪郭に焦点を合わせた状態で、撮影部 13 に第 1 写真を撮影させてもよい。このときの焦点の位置（以下、「第 1 焦点位置」と表記する。）は、第 1 撮影条件の一例である。この場合の第 1 写真は、細胞 30 の輪郭が鮮明に写った写真となる。

[0065] 一方、制御部 14 は、ステップ S 12 において、第 1 焦点位置より撮影部 13 に近い位置（以下、「第 2 焦点位置」と表記する。）に焦点を合わせた状態で、撮影部 13 に第 3 写真を撮影させ、且つ第 1 焦点位置より撮影部 13 から離れた位置（以下、「第 3 焦点位置」と表記する。）に焦点を合わせた状態で、撮影部 13 に第 4 写真を撮影させてもよい。このときの焦点の位置は、第 2 撮影条件の一例である。すなわち、第 1 焦点位置は、第 2 焦点位置及び第 3 焦点位置の間に位置する。第 1 焦点位置及び第 2 焦点位置の距離、及び第 1 焦点位置及び第 3 焦点位置の距離は、例えば、 $10\ \mu\text{m} \sim 30\ \mu\text{m}$ である。

[0066] 第 3 写真及び第 4 写真を比較すると、細胞核 31 の位置のコントラストが相対的に高く、細胞核 31 と異なる位置のコントラストが相対的に低くなる。そこで、制御部 14 は、ステップ S 12 において、第 3 写真及び第 4 写真の画素値の差を、第 2 写真として取得してもよい。より詳細には、制御部 14 は、第 3 写真及び第 4 写真の同一の位置（例えば、左端）の画素値の差を、第 2 写真における当該位置（例えば、左端）の画素値とすればよい。この場合の第 2 写真は、細胞核 31 がはっきり写った写真となる。

[0067] また、上記の実施形態に係る細胞観察装置 10 は、図 1 に示される全ての構成要素を一体化したものに限定されない。細胞観察装置 10 は、例えば、照射部 11、偏光板 12、及び撮影部 13 を備える撮影装置と、制御部 14 及び表示部 15 を備える画像処理装置とが通信ネットワークを通じて接続されていてもよい。この場合の画像処理装置は、例えば、一般的な PC (Personal Computer) であってもよい。

[0068] さらに、細胞観察処理の各ステップの実行順序は、図 2 の例に限定されな

い。例えば、ステップS 1 2の処理は、ステップS 1 6、S 1 7の間で実行されてもよい。但し、ステップS 1 1、S 1 3、S 1 4、S 1 5、S 1 6はこの順に実行され、ステップS 1 2、S 1 3、S 1 7、S 1 8、S 1 9、S 2 0、S 2 1はこの順に実行される。

符号の説明

- [0069] 1 0 . . . 細胞観察装置
1 1 . . . 照射部
1 2 A, 1 2 B . . . 偏光板
1 3 . . . 撮影部
1 4 . . . 制御部
1 5 . . . 表示部

請求の範囲

- [請求項1] 写真を撮影する撮影部と、
 制御部と、を備えており、
 上記制御部は、
 培養細胞を含む培地を第1撮影条件に従って上記撮影部に撮影させることによって、第1写真を取得する第1撮影処理と、
 上記培地を上記第1撮影条件と異なる第2撮影条件に従って上記撮影部に撮影させることによって、第2写真を取得する第2撮影処理と、
 、
 上記第1写真内において、上記培養細胞が存在する領域と推定される細胞領域を特定する第1特定処理と、
 上記第2写真内において、上記培養細胞の細胞核の位置と推定される細胞位置を特定する第2特定処理と、
 上記第2特定処理で特定された上記細胞位置のうち、上記第1特定処理で特定された上記細胞領域内に位置する上記細胞位置の数を、上記培養細胞の細胞数としてカウントするカウント処理と、を実行する細胞観察装置。
- [請求項2] 上記制御部は、上記第1特定処理において、
 上記第1写真を示す第1写真データのうち、第1閾値未満の画素値を第1値に置換し、上記第1閾値以上の画素値を第2値に置換した二値画像データを生成する生成処理と、
 上記二値画像データで示される二値画像のうち、上記第1値の画素の領域を上記細胞領域として特定する領域特定処理と、を実行する請求項1に記載の細胞観察装置。
- [請求項3] 上記制御部は、上記領域特定処理において、上記第1値の画素が閾値数以上連続する領域を上記細胞領域として特定する請求項2に記載の細胞観察装置。
- [請求項4] 上記制御部は、上記第2特定処理において、

上記第2写真を示す第2写真データから特定周波数成分を抽出する抽出処理と、

上記特定周波数成分が抽出された上記第2写真の画素値を走査したときに、画素値の変化が減少及び増加の一方から他方に転じる境界の画素位置を上記細胞位置として特定する位置特定処理と、を実行する請求項1から3のいずれかに記載の細胞観察装置。

[請求項5]

上記制御部は、上記抽出処理において、

上記第2写真データをFFT変換する変換処理と、

上記変換処理後の上記第2写真データに上記特定周波数成分を通過させるフィルタを適用するフィルタ処理と、

上記フィルタ処理後の上記第2写真データをFFT逆変換する逆変換処理と、を実行する請求項4に記載の細胞観察装置。

[請求項6]

上記制御部は、上記第1特定処理で特定された上記細胞領域の面積を算出する算出処理を実行する請求項1から5のいずれかに記載の細胞観察装置。

[請求項7]

出力部をさらに備えており、

上記制御部は、上記カウント処理でカウントされた細胞数を上記出力部に出力させる出力処理を実行する請求項1から6のいずれかに記載の細胞観察装置。

[請求項8]

該細胞観察装置は、上記培地へ光を照射する照射部を備えており、

上記第1撮影条件は、上記照射部によって照射された光のうち、上記培地から出力された第1波長の光で上記第1写真を撮影することを示し、

上記第2撮影条件は、上記培地から出力された上記第1波長より長い第2波長の光で上記第2写真を撮影することを示す請求項1から7のいずれかに記載の細胞観察装置。

[請求項9]

上記第1波長は、400nm以上で700nm以下であり、

上記第2波長は、700nm以上であり、且つ上記第1波長より長

い請求項 8 に記載の細胞観察装置。

[請求項10]

上記撮影部は、焦点の位置を調整する調整手段を備えており、

上記第 1 撮影条件は、上記培養細胞の輪郭に焦点を合わせた状態で上記第 1 写真を撮影することを示し、

上記第 2 撮影条件は、上記第 1 撮影条件より上記撮影部に近い位置に焦点を合わせた状態で第 3 写真を撮影し、且つ上記第 1 撮影条件より上記撮影部から離れた位置に焦点を合わせた状態で第 4 写真を撮影することを示し、

上記制御部は、上記第 2 撮影処理において、上記第 3 写真及び上記第 4 写真の画素値の差を、上記第 2 写真として取得する請求項 1 から 9 のいずれかに記載の細胞観察装置。

[請求項11]

写真を撮影する撮影部と、

制御部と、を備えており、

上記制御部は、

培養細胞を含む培地を第 1 撮影条件に従って上記撮影部に撮影させることによって、第 1 写真を取得する第 1 撮影処理と、

上記培地を上記第 1 撮影条件と異なる第 2 撮影条件に従って上記撮影部に撮影させることによって、第 2 写真を取得する第 2 撮影処理と、

上記第 1 写真内において、上記培養細胞が存在する領域と推定される細胞領域を特定する第 1 特定処理と、

上記第 1 特定処理で特定された上記細胞領域の面積を算出する算出処理と、を実行する細胞観察装置。

[請求項12]

コンピュータによって実行可能なプログラムであって、

培養細胞を含む培地を第 1 撮影条件に従って撮影した第 1 写真、及び上記培地を上記第 1 撮影条件と異なる第 2 撮影条件に従って撮影した第 2 写真を示す写真データを取得する取得処理と、

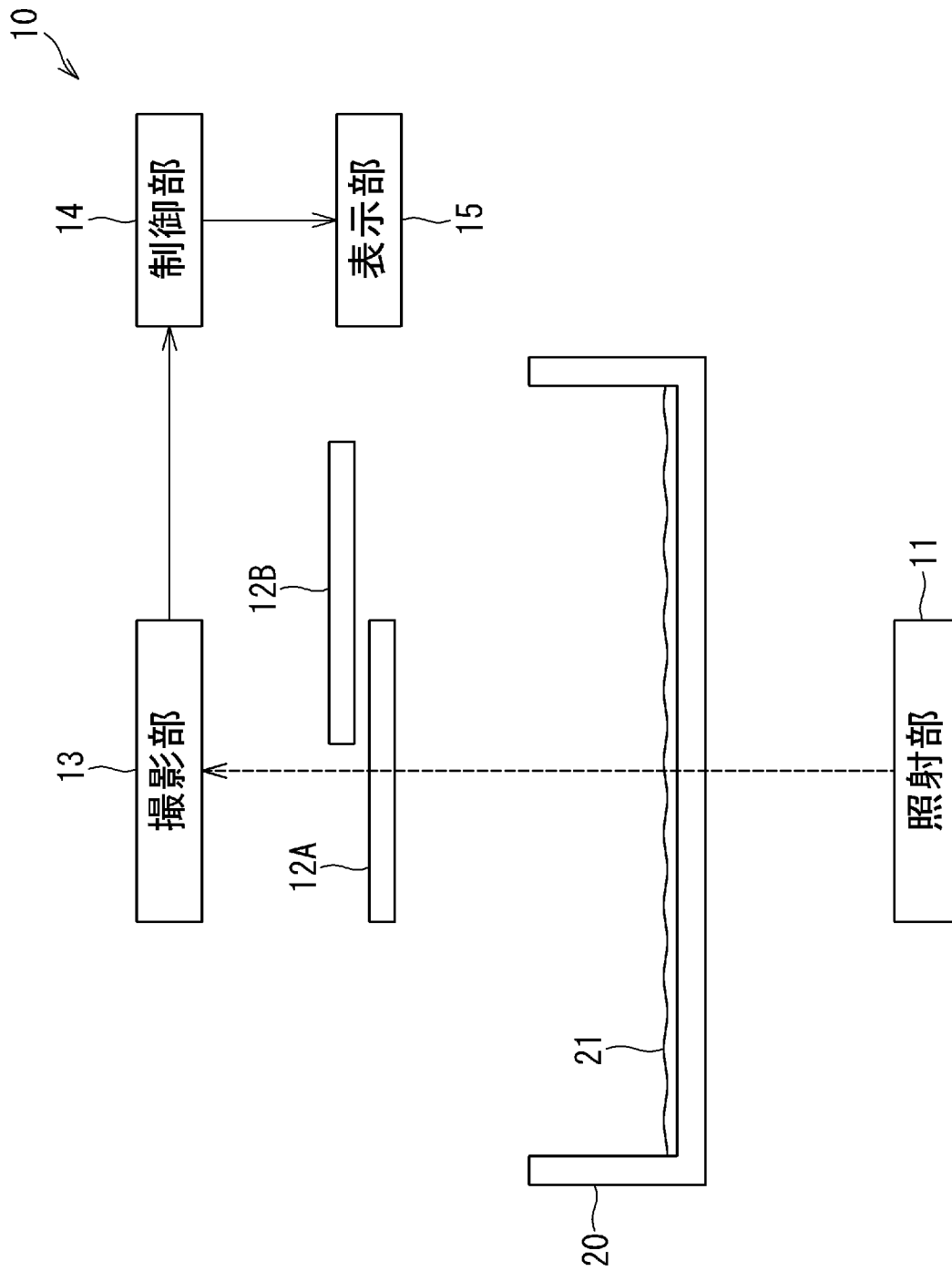
上記第 1 写真内において、上記培養細胞が存在する領域と推定され

る細胞領域を特定する第1特定処理と、

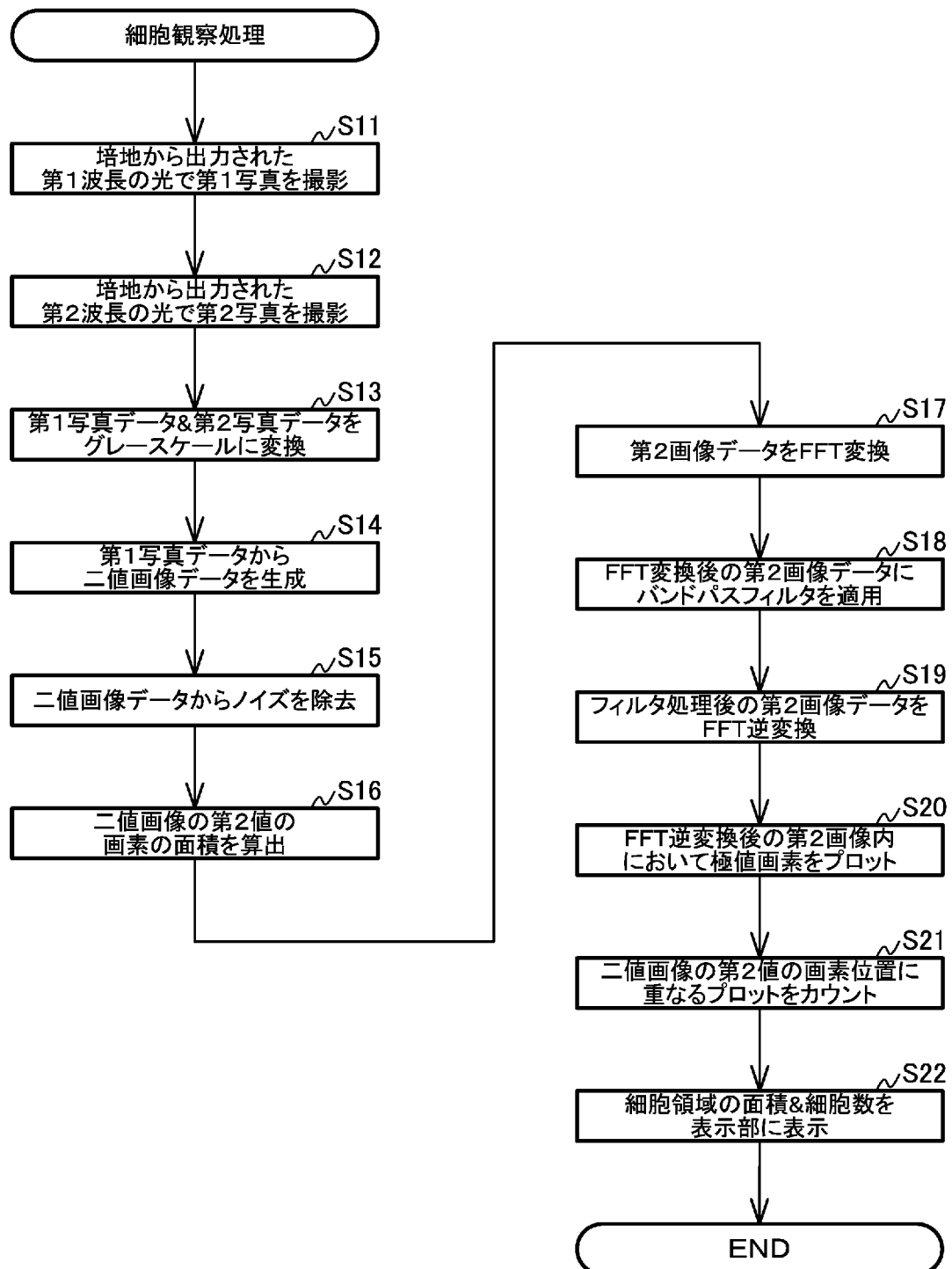
上記第2写真内において、上記培養細胞の細胞核の位置と推定される細胞位置を特定する第2特定処理と、

上記第1特定処理で特定された上記細胞領域及び上記第2特定処理で特定された上記細胞位置の少なくとも一方に基づいて、上記培養細胞の細胞数或いは上記細胞領域の面積を算出する算出処理と、を上記コンピュータに実行させるプログラム。

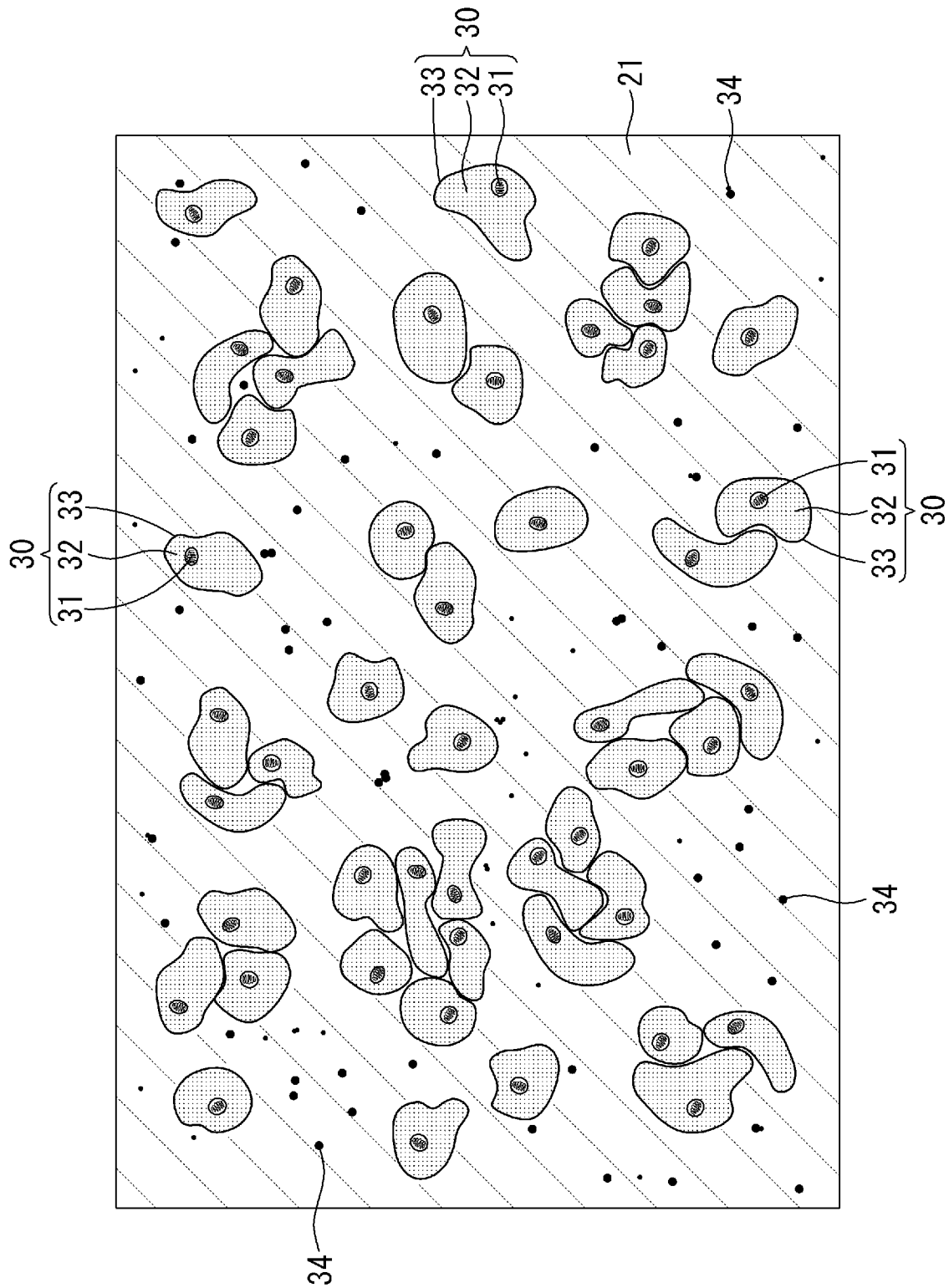
[図1]



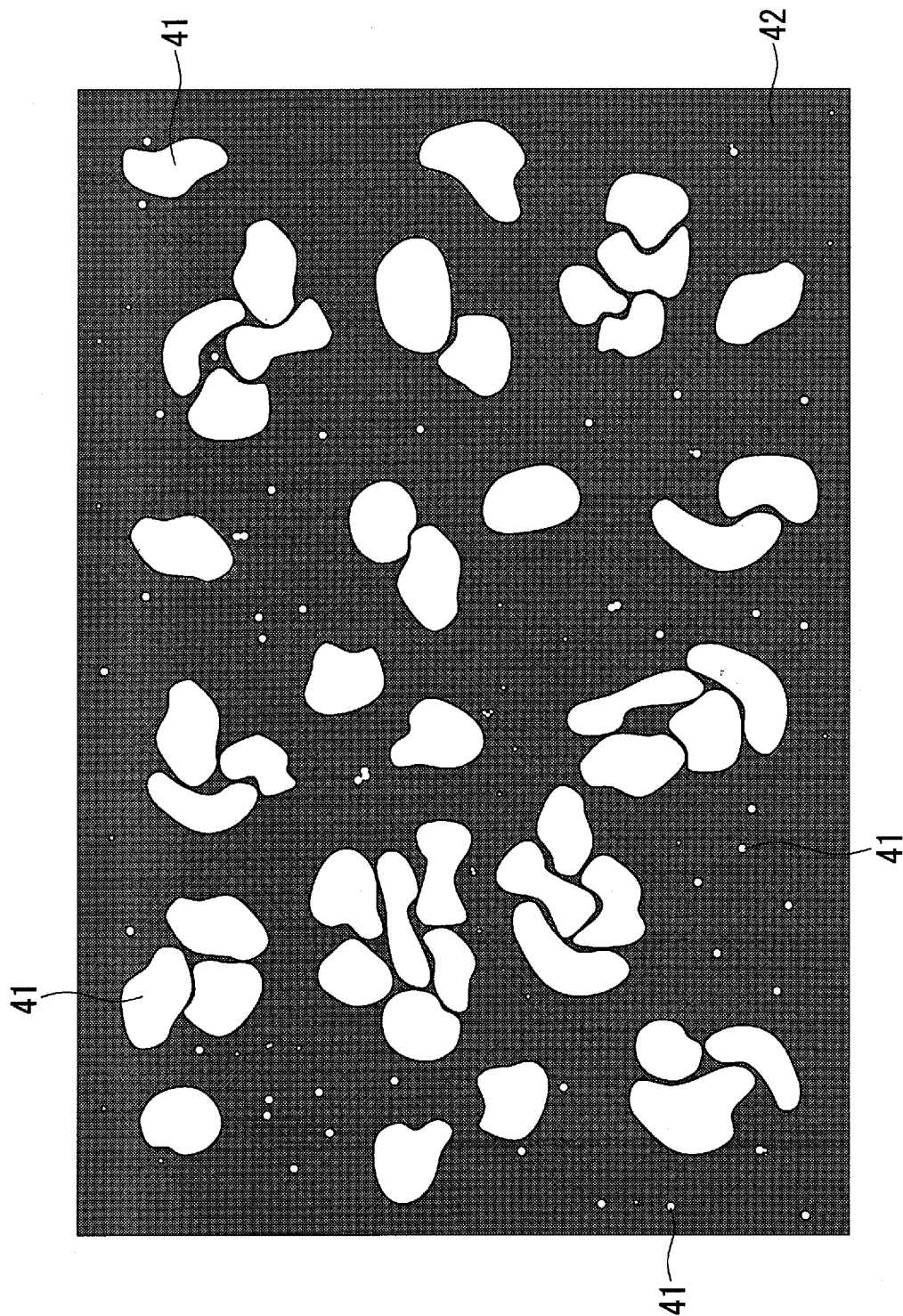
[図2]



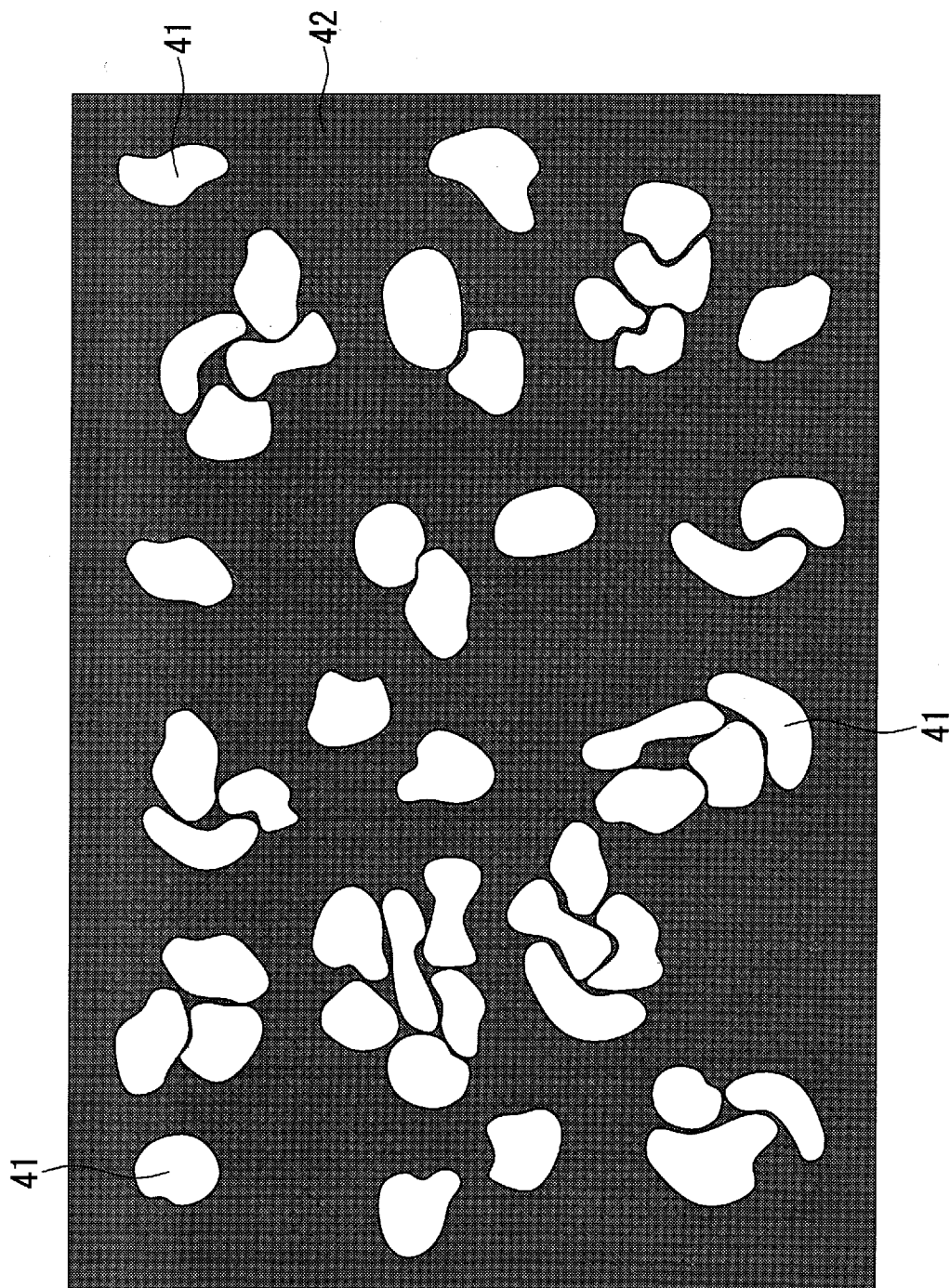
[図3]



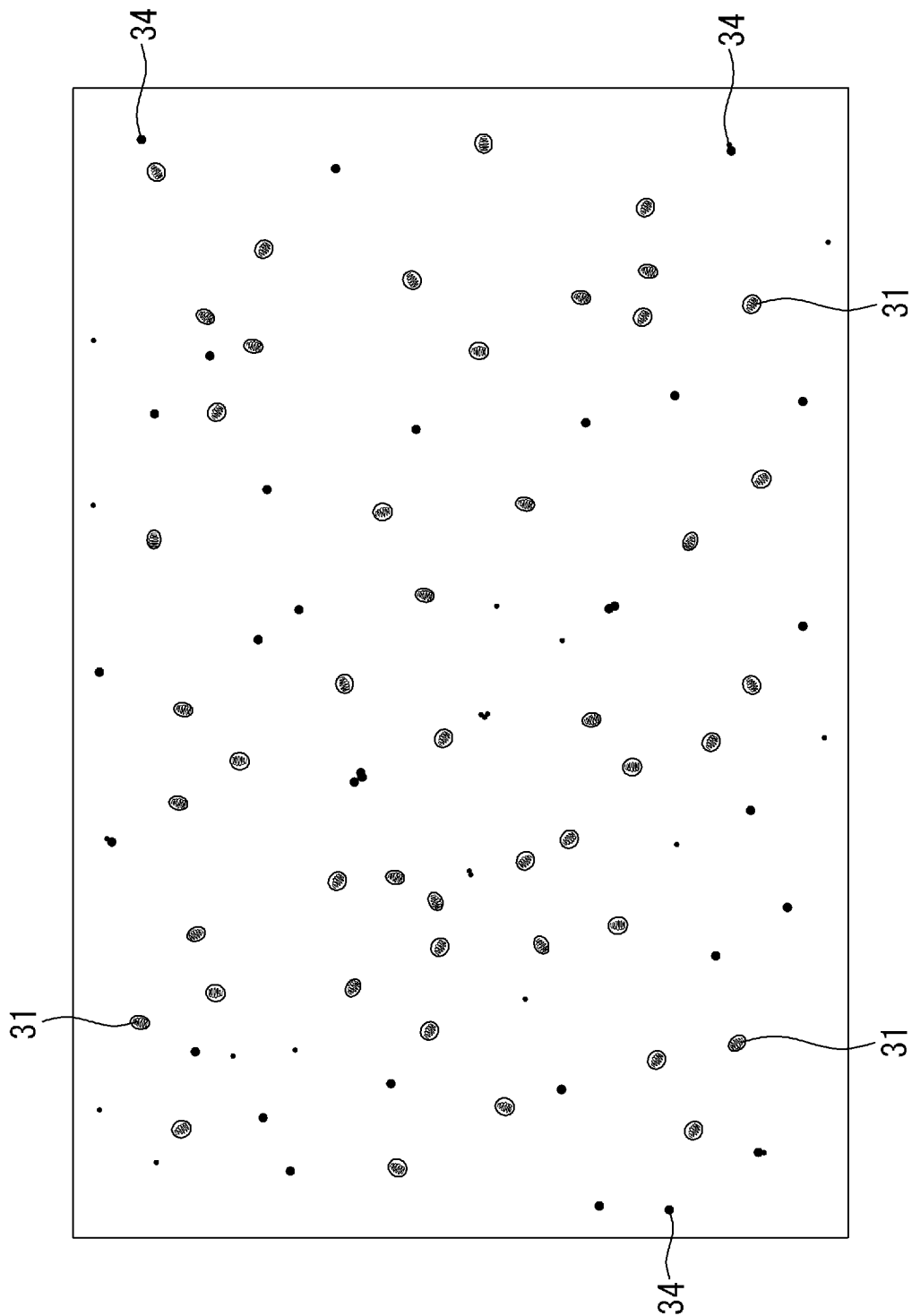
[図4]



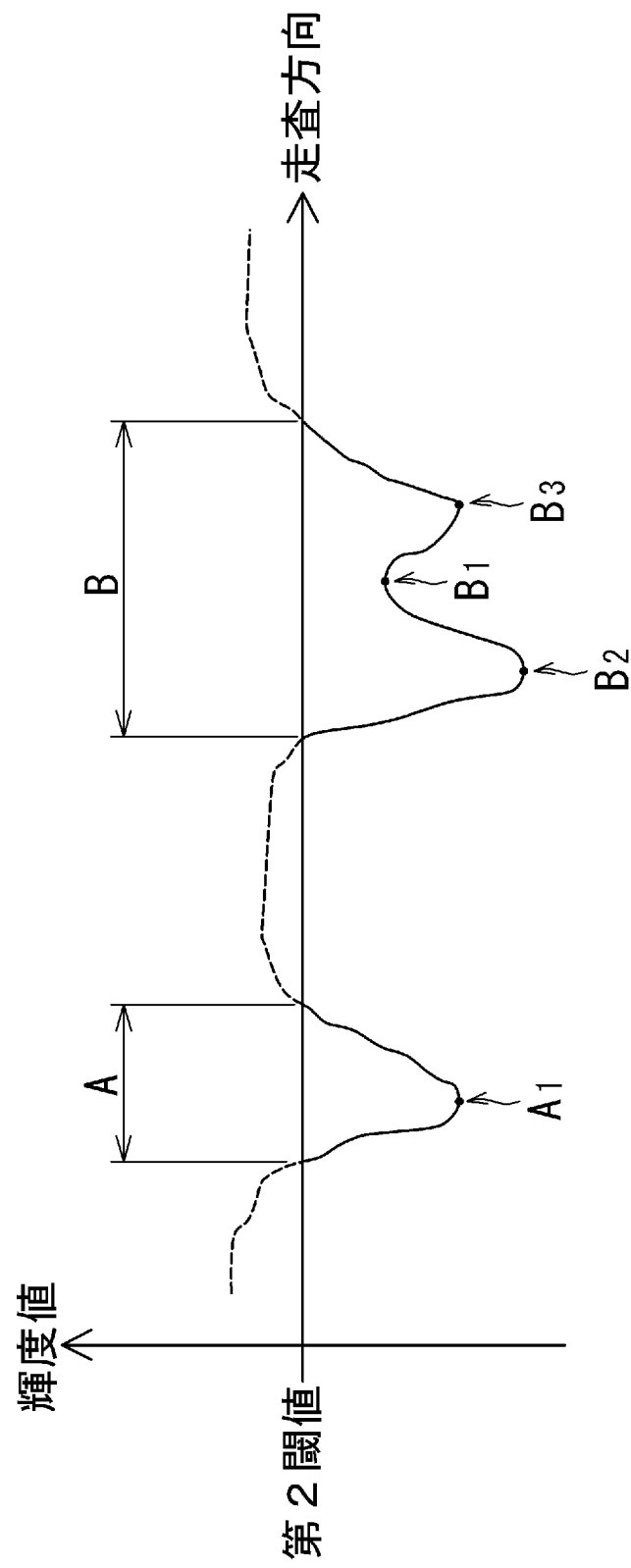
[図5]



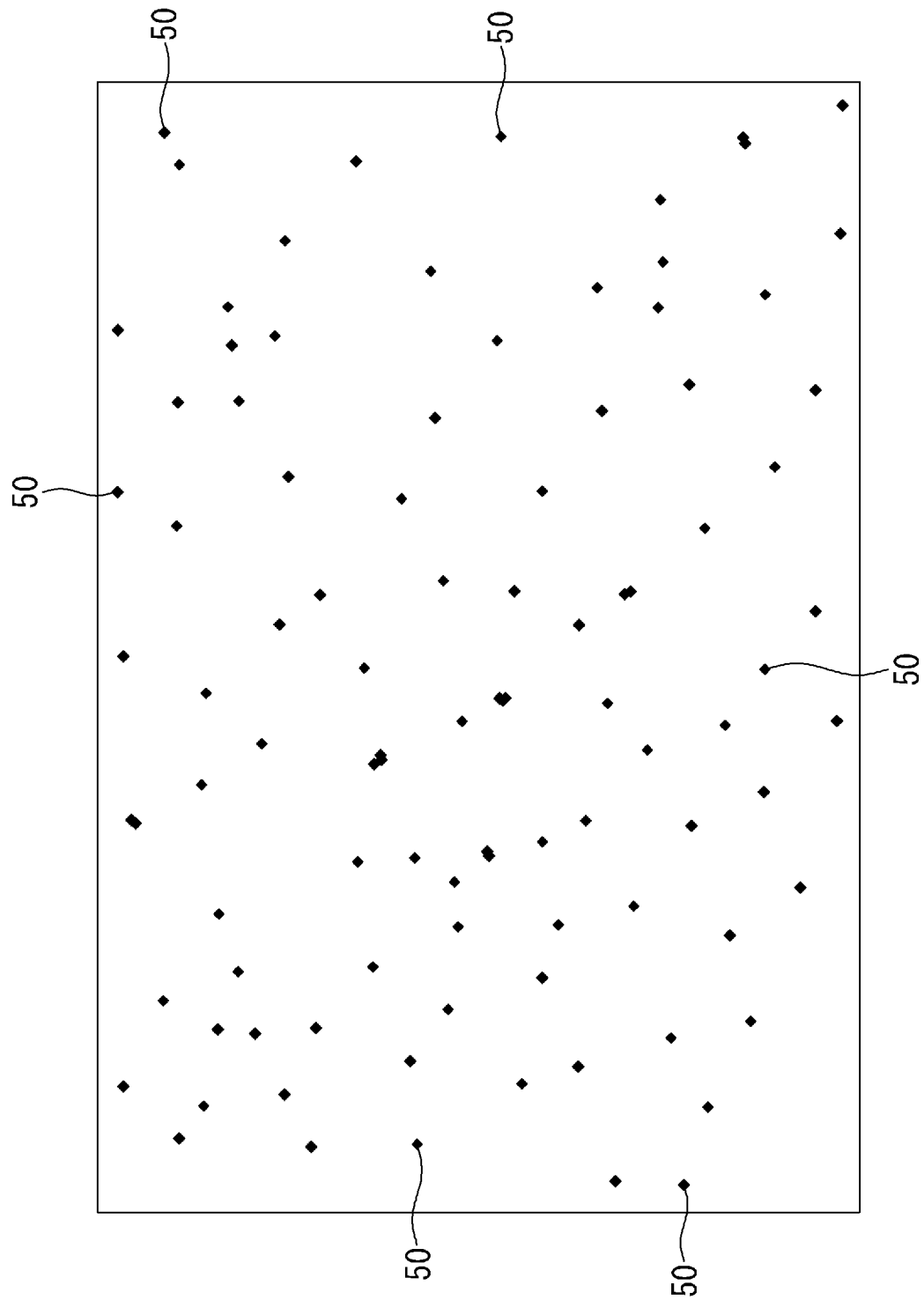
[図6]



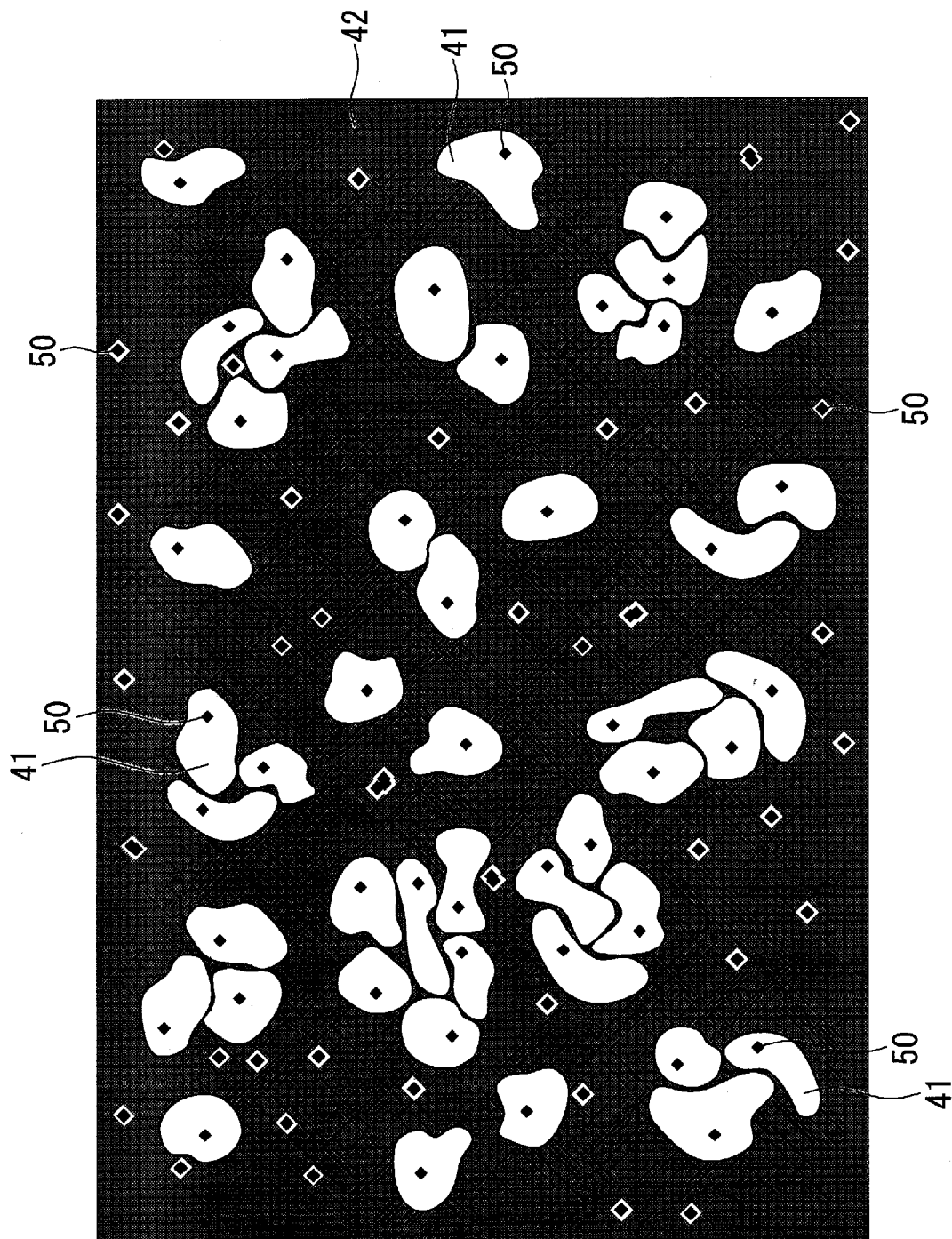
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/34 (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)

C12M1/34

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2014/162744 A1 (Nikon Corp.), 09 October 2014 (09.10.2014), claim 36; paragraphs [0055], [0077], [0078], [0111] to [0113], [0121] & US 2016/0103072 A1 claim 18; paragraphs [0077], [0099], [0100], [0133] to [0135], [0143] & EP 2982968 A1	1-5, 7, 8, 10 6, 9, 11, 12
Y	JP 2001-275659 A (Masahito TAYA, Japan Tissue Engineering Co., Ltd.), 09 October 2001 (09.10.2001), claim 4 & US 2003/0054335 A1 claim 4 & WO 2001/075070 A1 & EP 1270718 A1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
02 August 2017 (02.08.17)

Date of mailing of the international search report
15 August 2017 (15.08.17)

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/JP2017/017596

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/101056 A1 (Medinet Co., Ltd.), 28 September 2006 (28.09.2006), entire text & US 2008/0201083 A1 entire text & EP 1862533 A1	1-12
A	WO 2009/031283 A1 (Nikon Corp.), 12 March 2009 (12.03.2009), entire text & US 2010/0208960 A1 entire text & EP 2202291 A1	1-12
A	MINAMIKAWA, T., et al., Real-time imaging of laser-induced membrane disruption of a living cell observed with multifocus coherent anti- Stokes Raman scattering microscopy, 2011, Journal of Biomedical Optics, Vol.16, No.2, p. 021111-1 - 021111-5, entire text	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/34 (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. C12M1/34

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed

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 Y	WO 2014/162744 A1 (株式会社ニコン) 2014.10.09, 請求項36、[0055]、[0077]、[0078]、[0111] - [0113]、[0121] & US 2016/0103072 A1、請求項18、[0077]、[0099]、[0100]、 [0133] - [0135]、[0143] & EP 2982968 A1	1-5, 7, 8, 10 6, 9, 11, 12

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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

02.08.2017

国際調査報告の発送日

15.08.2017

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)

福澤 洋光

4 B

3963

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
Y	JP 2001-275659 A (田谷正仁、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) 2001.10.09, 請求項 4 & US 2003/0054335 A1、請求項 4 & WO 2001/075070 A1 & EP 1270718 A1	1-12
A	WO 2006/101056 A1 (株式会社メディネット) 2006.09.28, 全文 & US 2008/0201083 A1、全文 & EP 1862533 A1	1-12
A	WO 2009/031283 A1 (株式会社ニコン) 2009.03.12, 全文 & US 2010/0208960 A1、全文 & EP 2202291 A1	1-12
A	MINAMIKAWA, T., et al., Real-time imaging of laser-induced membrane disruption of a living cell observed with multifocus coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy, 2011, Journal of Biomedical Optics, Vol.16, No.2, p.021111-1 - 021111-5 全文	1-12