

(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8月31日(31.08.2017)



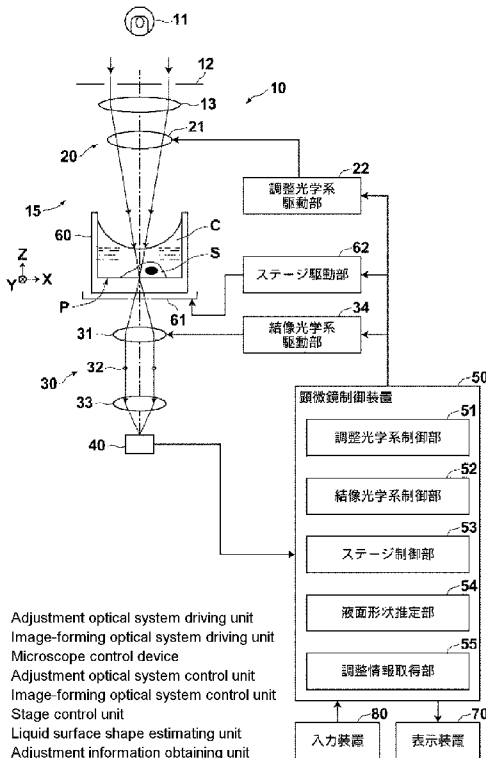
(10) 国際公開番号
WO 2017/145839 A1

- (51) 国際特許分類:
G02B 21/06 (2006.01) G02B 21/36 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/005128
- (22) 国際出願日: 2017年2月13日(13.02.2017)
- (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 2016-030705 2016年2月22日(22.02.2016) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社(FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 白石 泰士(SHIRAISHI Yasushi); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 中島 順子, 外(NAKASHIMA Junko et al.); 〒2500111 神奈川県南足柄市竹松1250番地 F F T P M O棟6F Kanagawa (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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).

[続葉有]

(54) Title: PHASE-CONTRAST MICROSCOPE AND IMAGING METHOD

(54) 発明の名称: 位相差顕微鏡および撮像方法



- 22 Adjustment optical system driving unit
- 34 Image-forming optical system driving unit
- 50 Microscope control device
- 51 Adjustment optical system control unit
- 52 Image-forming optical system control unit
- 53 Stage control unit
- 54 Liquid surface shape estimating unit
- 55 Adjustment information obtaining unit
- 62 Stage driving unit
- 70 Display device
- 80 Input device

(57) Abstract: Provided are a phase-contrast microscope and an imaging method in which the liquid surface shape of liquid in a container can be estimated without a new measurement system for determining the liquid surface shape. The present invention is provided with: an illumination light emitting unit (10) which emits illumination light for phase-contrast measurement toward the container in which the liquid and an object to be observed are contained; an imaging unit (40) which captures an image of the object to be observed to which the illumination light is emitted; an adjustment optical system (20) which adjusts refraction of the illumination light that results from the liquid surface shape of the liquid in the container; a liquid surface shape estimating unit (54) which estimates the liquid surface shape of the liquid in the container on the basis of the luminance distribution of a phase-contrast image of the object to be observed which is captured by the imaging unit (40); and an adjustment information obtaining unit (55) which obtains adjustment information for adjusting the optical properties of the adjustment optical system (20) on the basis of the liquid surface shape estimated by the liquid surface shape estimating unit (54).

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/145839 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

液面形状を求めるための新たな測定系を設けることなく、容器内の液体の液面形状を推定することができる位相差顕微鏡および撮像方法を提供する。液体および観察対象が収容された容器に対して位相差計測用の照明光を照射する照明光照射部 (10) と、照明光を照射した観察対象を撮像する撮像部 (40) と、容器内の液体の液面形状に起因する照明光の屈折を調整する調整光学系 (20) と、撮像部 (40) によって撮像された観察対象の位相差画像の輝度分布に基づいて、容器内の液体の液面形状を推定する液面形状推定部 (54) と、液面形状推定部 (54) によって推定された液面形状に基づいて、調整光学系 (20) の光学特性を調整するための調整情報を取得する調整情報取得部 (55) とを備える。

明 細 書

発明の名称：位相差顕微鏡および撮像方法

技術分野

[0001] 本発明は、液体中の観察対象を位相差計測する位相差顕微鏡およびその撮像方法に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、幹細胞などの培養された透明な細胞を非染色に観察する方法として位相差計測が広く使われ始めている。そして、このような位相差計測を行うものとして位相差顕微鏡が使用されている。

[0003] 一般的な位相差顕微鏡においては、リング状の照明光が観察対象に照射され、観察対象を通過した直接光と回折光が位相板に入射される。そして、直接光は位相板のリング部分によって減光され、回折光は位相板の透明な部分を通過し、この直接光と回折光とが結像されることによって明暗のコントラストのついた像を撮像することができる。

[0004] ここで、位相差顕微鏡によって培養液中の細胞などを観察する場合、培養液の表面張力の影響によって培養液の液面にメニスカスが形成される。そして、このメニスカスのレンズ作用によってリング状の照明光の光路がずれてしまい、位相板に入射される直接光と回折光とに影響を及ぼして明瞭な位相差画像が得られない問題がある。

[0005] このメニスカスによる光路ずれを補償するためには、メニスカスが形成する液面形状の情報が必要である。液面形状が分かれば補償することは可能であるが、メニスカスが形成する液面は、ウェルプレートなどの容器の表面の素材と容器内に收容される液体との関係から形成されるので、現実的にあり得るすべての組み合わせを考慮して補償することは難しい。また、同じウェル内であっても、ウェル内に收容される液体の種類および量並びにウェル内の表面の状態によって局所的に液面形状が異なるので、液面形状を1度計測すれば良い分けではなく、観察する度に液面形状を計測する必要がある。

る。また、タイムラプス撮影を行う場合、溶液の蒸発により、容器内の水位が変化し、これによっても液面形状が変化する。

[0006] そこで、たとえば特許文献1においては、培養液の液面の複数位置に計測光を照射し、その計測光のズレ量を検出し、そのズレ量に基づいて、培養液の液面の形状を算出することが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2015-152650号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、特許文献1に記載の装置では、計測光を照射するための構成が必要となり、装置が大型化してコストアップになる問題がある。

[0009] 本発明は、上記の問題に鑑み、液面の形状を求めるための新たな測定系を設けることなく、容器内の液体の液面形状を推定することができる位相差顕微鏡および撮像方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の位相差顕微鏡は、液体および観察対象が収容された容器に対して位相差計測用の照明光を照射する照明光照射部と、照明光を照射した観察対象を撮像する撮像部と、容器内の液体の液面形状に起因する照明光の屈折を調整する調整光学系と、撮像部によって撮像された観察対象の位相差画像の輝度分布に基づいて、容器内の液体の液面形状を推定する液面形状推定部と、液面形状推定部によって推定された液面形状に基づいて、調整光学系の光学特性を調整するための調整情報を取得する調整情報取得部とを備える。

[0011] また、上記本発明の位相差顕微鏡においては、調整情報取得部によって取得された調整情報に基づいて、調整光学系の光学特性を調整する調整光学系制御部を備えることが好ましい。

[0012] また、上記本発明の位相差顕微鏡において、液面形状推定部は、予め設定

された液面形状を用いて幾何光学シミュレーションを行って取得された位相差画像の輝度分布に基づいて、容器内の液体の液面形状を推定することが好ましい。

[0013] また、上記本発明の位相差顕微鏡において、液面形状推定部は、互いに異なる曲率を有する、予め設定された複数の液面形状を用いてそれぞれ幾何光学シミュレーションを行って取得された複数の位相差画像の輝度分布に基づいて、容器内の液体の液面形状を推定することが好ましい。

[0014] また、上記本発明の位相差顕微鏡において、液面形状推定部は、幾何光学シミュレーションを用いて取得された位相差画像の輝度分布と撮像部によって撮像された位相差画像の輝度分布との相関関係を求めることによって、容器内の液体の液面形状を推定することが好ましい。

[0015] また、上記本発明の位相差顕微鏡において、液面形状推定部は、相関関数を用いて上記相関関係を求めることが好ましい。

[0016] また、上記本発明の位相差顕微鏡において、液面形状推定部は、幾何光学シミュレーションを用いて取得された位相差画像の輝度分布における変曲点の輝度値と撮像部によって撮像された位相差画像の輝度分布における変曲点の輝度値とに基づいて、相関関係を求めることが好ましい。

[0017] また、上記本発明の位相差顕微鏡において、液面形状推定部は、撮像部によって撮像された位相差画像上において、容器内に形成されるメニスカスの中心部分から容器の外周に向かって延びる少なくとも一つの直線を設定し、その設定した直線上の位相差画像の輝度分布に基づいて、容器内の液体の液面形状を推定することが好ましい。

[0018] また、上記本発明の位相差顕微鏡において、液面形状推定部は、互いに異なる複数の方向に延びる上記直線を設定し、その複数の直線上の位相差画像の輝度分布に基づいて、容器内の液体の液面形状を推定することが好ましい。

[0019] また、上記本発明の位相差顕微鏡において、液面形状推定部は、撮像部によって撮像された位相差画像に対して平滑化処理を施し、その平滑化処理の

施された位相差画像の輝度分布に基づいて、容器内の液体の液面形状を推定することが好ましい。

[0020] 本発明の撮像方法は、液体および観察対象が収容された容器に対して位相差計測用の照明光を照射して、観察対象の位相差画像を撮像し、その撮像した位相差画像の輝度分布に基づいて、液体の液面形状を推定し、その推定した液面形状に基づいて、容器内の液体の液面形状に起因する光の屈折を調整する調整光学系の光学特性を調整するための調整情報を取得し、その調整情報に基づいて、調整光学系の光学特性が調整された後、容器に対して照明光を照射し、照明光を照射した観察対象を撮像する。

発明の効果

[0021] 本発明の位相差顕微鏡および撮像方法によれば、観察用の位相差画像を撮像する撮像部によって撮像された位相差画像の輝度分布に基づいて、容器内の液体の液面形状を推定するようにしたので、液面形状を推定するための新たな測定系を設けることなく、容器内の液体の液面形状を推定することができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]本発明の位相差顕微鏡の一実施形態を用いた顕微鏡システムの概略構成を示す図

[図2]調整用光学素子の位置、光軸の回転および屈折力の調整を模式的に示す図

[図3]位相差画像に現れる明暗パターンの一例を示す図

[図4]メニスカスモデルMに対してリング状照明光Nが入射した場合の光路ずれの算出方法の一例を説明するための図

[図5]対物レンズモデルにリング状照明光Nが入射する範囲 d_{na} と平面Aにおける光路ずれ Δx との関係を示す図

[図6]幾何光学シミュレーションによって取得された位相差画像の輝度分布の一例を示す図

[図7]調整光学系による調整前に撮像部によって撮像された位相差画像の一例

を示す図である。

[図8]幾何光学シミュレーションによって取得された位相差画像の輝度分布G1と、撮像部によって撮像された位相差画像の輝度分布G2の一例を示す図

[図9]本発明の位相差顕微鏡の一実施形態を用いた顕微鏡システムの作用を説明するためのフローチャート

[図10]メニスカスの中心部分から外周に向かって8本の直線L1～L8を設定した例を説明するための図

[図11]位相差画像の輝度値P(x)と、液面の傾斜角 θ とを対応づけたプロファイルの一例を示す図

[図12]図11に示すプロファイルを用いて液面の傾斜角を算出する方法を説明するための図

[図13]液面の傾斜角の候補を複数存在する場合の傾斜角の決定方法を説明するための図

発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明の位相差顕微鏡および撮像方法の一実施形態を用いた顕微鏡システムについて、図面を参照しながら詳細に説明する。図1は、本実施形態の顕微鏡システムの概略構成を示す図である。

[0024] 本実施形態の顕微鏡システムは、図1に示すように、照明光照射部10と、調整光学系20と、結像光学系30と、撮像部40と、顕微鏡制御装置50と、表示装置70と、入力装置80とを備えている。

[0025] 本実施形態の顕微鏡システムにおいては、調整光学系20と結像光学系30との間に、ステージ61が設けられており、このステージ61上に、液体である培養液Cおよび観察対象Sが収容された培養容器60が設置される。そして、本実施形態の顕微鏡システムは、X方向、Y方向およびZ方向にステージ61を移動させるステージ駆動部62を備えている。X方向およびY方向は、観察対象設置面Pに平行な面上において互いに直交する方向であり、Z方向は、X方向およびY方向に直交する方向である。

[0026] 本実施形態の顕微鏡システムにおいては、上述した照明光照射部10、調

整光学系 20、結像光学系 30、撮像部 40、ステージ 61、ステージ駆動部 62 および結像光学系駆動部 34 から位相差顕微鏡本体が構成され、顕微鏡制御装置 50 は、この位相差顕微鏡本体を制御するものである。以下、位相差顕微鏡本体の具体的な構成を説明する。

[0027] 照明光照射部 10 は、培養容器 60 内に収容された観察対象 S に対して、いわゆる位相差計測のための照明光を照射するものであり、本実施形態では、その位相差計測用の照明光としてリング状照明光を照射する。具体的には、本実施形態の照明光照射部 10 は、白色光を出射する白色光源 11 と、リング形状のスリットを有し、白色光源 11 から出射された白色光が入射されてリング状照明光を出射するスリット板 12 と、スリット板 12 から射出されたリング状照明光が入射され、その入射されたリング状照明光を観察対象 S に対して照射するコンデンサレンズ 13 とを備えている。

[0028] スリット板 12 は、白色光源 11 から出射された白色光を遮光する遮光板に対して白色光を透過するリング形状のスリットが設けられたものであり、白色光がスリットを通過することによってリング状照明光が形成される。

[0029] なお、本実施形態においては、上述したようにスリット板 12 を用いてリング状照明光を形成するようにしたが、リング状照明光を形成する方法としては、これに限らず、たとえば空間光変調素子などを用いてリング状照明光を形成するようにしてもよい。

[0030] また、本実施形態においては、位相差計測用照明光としてリング状照明光を用いるようにしたが、リング状以外の形状を有する照明光でもよく、後述する位相板と共役な形状となっていれば三角形状や四角形状などその他の形状でもよい。

[0031] ステージ 61 上に設置された培養容器 60 は、その底面が観察対象設置面 P であり、観察対象設置面 P には観察対象 S として細胞群などが配置される。培養容器 60 内には培養液 C が満たされており、この培養液 C の液面には、凹形状のメニスカスが形成される。培養容器 60 としては、シャーレおよび複数のウェルが配列されたウェルプレートなどがある。ウェルプレートの

場合、各ウェルに観察対象Sおよび培養液Cが収容され、ウェル毎にメニスカスが形成される。

[0032] また、本実施形態においては、培養液中で培養される細胞群を観察対象Sとしたが、観察対象Sとしてはこのような培養液中のものに限らず、水、ホルマリン、エタノール、およびメタノールなどの液体中において固定された細胞を観察対象Sとしてもよい。この場合も、容器内のこれらの液体の液面にメニスカスが形成される。

[0033] 調整光学系20は、上述したメニスカスの液面形状に起因する位相差計測用の照明光の屈折を調整するものである。本実施形態の調整光学系20は、調整用光学素子21と、調整光学系駆動部22とを備えている。

[0034] 調整用光学素子21は、屈折力を有する光学素子であり、具体的には、入射面または出射面に曲率を有する平凸面レンズ、入射面および出射面の両方に曲率を有する両凸面レンズ、電圧印加によって屈折力が変化する液晶レンズ、レンズの曲率半径を変更可能な液体レンズ、および焦点距離を変更可能な空間光変調器などを用いることができる。

[0035] 調整光学系駆動部22は、後述する調整光学系制御部51から出力された制御信号に基づいて、調整用光学素子21の屈折力を変更して焦点距離を調整するものである。具体的には、調整光学系駆動部22は、調整用光学素子21の位置および光軸方向を変更する機構を備えたものである。また、調整用光学素子21として液晶レンズまたは空間光変調器を用いる場合には、調整光学系駆動部22は、液晶レンズまたは空間光変調器に対して所望の焦点距離に応じた電圧を印加するものである。また、調整用光学素子21として液体レンズを用いる場合には、調整光学系駆動部22は、所望の焦点距離に応じて液体レンズ内の液体の量を調整し、これにより液体レンズの曲率半径を調整するものである。

[0036] 図2Iは、X方向、Y方向およびZ方向への調整用光学素子21の位置の変更を模式的に示す図である。また、図2IIは、調整用光学素子21の光軸方向の変更を模式的に示す図であり、具体的には、調整用光学素子21の光

軸のX軸回り (θ) の回転調整、Y軸回り (ϕ) の回転調整およびZ軸回り (ρ) の回転調整を模式的に示す図である。また、図2 IIIは、調整用光学素子21の屈折力の調整を模式的に示すものである。なお、図2 IIIでは、調整用光学素子21の曲率半径を調整することによって屈折力を調整する例を示しているが、屈折力を調整する方法としては、これに限らず、たとえば、調整用光学素子21として液晶レンズや空間光変調器を用いる場合には、印加電圧を調整することによって、屈折力を調整することができる。

[0037] また、本実施形態においては、調整用光学素子21をX方向、Y方向およびZ方向に移動させるようにしたが、この調整用光学素子21の移動による光学的な作用と同等の作用を得られるのであれば、必ずしも調整用光学素子21を移動させなくてもよい。たとえば、調整用光学素子21として液晶レンズや空間光変調器を用いる場合には、印加電圧を調整することによって、調整用光学素子21の移動による光軸のシフトと同様の作用効果を得るようにしてもよい。また、調整用光学素子21の光軸方向についても同様に、必ずしも調整用光学素子21自体を回転させる必要はなく、印加電圧を調整することによって、調整用光学素子21自体の回転による光軸の回転と同様の作用効果を得るようにしてもよい。

[0038] また、本実施形態においては、調整用光学素子21をX方向およびY方向に移動するようにしたが、これに限らず、ステージ61をX方向およびY方向に移動させることによって、調整用光学素子21と培養容器60内に形成されたメニスカスとのX方向およびY方向についての相対的な位置関係を変更してもよい。

[0039] また、本実施形態においては、1つの調整用光学素子21を用いるようにしたが、焦点距離の異なる複数の調整用光学素子21を切り替えることによって屈折力を調整してもよい。その場合、調整用光学素子21の交換は、自動で行ってもよいし、手動で行ってもよい。複数の調整用光学素子21を手動で交換する場合には、たとえば後述する液面形状推定部54によって推定された液面形状に基づいて、適切な調整用光学素子21の種類を表示

装置 70 に表示させ、その表示に基づいて、ユーザが手動で調整用光学素子 21 を交換してもよい。

[0040] 結像光学系 30 は、対物レンズ 31 と、位相板 32 と、結像レンズ 33 と、結像光学系駆動部 34 とを備えたものである。位相板 32 は、リング状照明光の波長に対して透明な透明板に対して位相リングを形成したものである。なお、上述したスリット板 12 のスリットの大きさは、この位相リングと共役な関係にある。

[0041] 位相リングは、入射された光の位相を $1/4$ 波長ずらす位相膜と、入射された光を減光する減光フィルタとがリング状に形成されたものである。位相板 32 に入射された直接光は位相リングを通過することによって位相が $1/4$ 波長ずれるとともに、その明るさが弱められる。一方、観察対象 S によって回折された回折光は大部分が位相板 32 の透明板を通過し、その位相および明るさは変化しない。

[0042] 対物レンズ 31 は、結像光学系駆動部 34 によって Z 方向に移動するものである。観察対象 S の位相差画像を撮像する場合には、結像光学系駆動部 34 によって対物レンズ 31 を Z 方向へ移動させることによってオートフォーカス制御が行われ、撮像部 40 によって撮像される画像のコントラストが調整される。

[0043] 結像レンズ 33 は、位相板 32 を通過した直接光および回折光が入射され、これらの光を撮像部 40 に結像するものである。

[0044] 結像光学系駆動部 34 は、上述したように対物レンズ 31 を Z 方向に移動させる機構を備えたものである。

[0045] 撮像部 40 は、結像レンズ 33 によって結像された観察対象 S の位相差画像を撮像する撮像素子を備えたものである。撮像素子としては、CCD (charge-coupled device) イメージセンサや CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) イメージセンサなどを用いることができる。

[0046] ここで、上述したような構成の位相差顕微鏡本体による位相差画像の撮像について説明する。なお、ここでは培養液 C の液面に形成されたメニスカス

の影響はないものとして説明する。

[0047] まず、照明光照射部 10 から出射されたリング状照明光が、観察対象 S に照射される。観察対象 S に照射された照明光は、観察対象 S 内を直進した直接光と観察対象 S によって回折された回折光とに分かれる。そして、観察対象 S を透過した直接光と回折光は、対物レンズ 31 を透過して位相板 32 に入射される。観察対象 S を透過した直接光は、位相板 32 の位相リングに入射され、その位相が $1/4$ 波長ずれるとともに、その明るさが弱められる。一方、観察対象 S を透過した回折光は大部分が位相板 32 の透明な部分を通過する。

[0048] 位相板 32 を透過した直接光と回折光は、結像レンズ 33 によって撮像素子の撮像面に結像され、直接光と回折光との干渉によってエッジ部分などのコントラストが強調された位相差画像が撮像される。

[0049] なお、本実施形態においては、ステージ 61 が X 方向および Y 方向に移動することによって、培養容器 60 内が照明光によって走査され、培養容器 60 内の照明光が照射された領域毎の位相差画像が撮像される。

[0050] 次に、図 1 に示す顕微鏡制御装置 50 は、CPU (Central Processing Unit)、メモリおよびハードディスクなどを備えたコンピュータから構成されるものである。

[0051] 顕微鏡制御装置 50 は、具体的には、図 1 に示すように、調整光学系駆動部 22 を制御する調整光学系制御部 51 と、結像光学系駆動部 34 を制御する結像光学系制御部 52 と、ステージ駆動部 62 を制御するステージ制御部 53 と、撮像部 40 によって撮像された位相差画像の輝度分布に基づいて、培養容器 60 内の培養液 C の液面形状を推定する液面形状推定部 54 と、液面形状推定部 54 によって推定された液面形状に基づいて、調整光学系 20 の光学特性を調整するための調整情報を取得する調整情報取得部 55 とを備えている。

[0052] ここで、本実施形態の液面形状推定部 54 による液面形状の推定について、詳細に説明する。液面形状推定部 54 は、上述したように撮像部 40 によ

って撮像された位相差画像の輝度分布に基づいて、培養容器60内の培養液Cの液面形状を推定する。まず、このように位相差画像の輝度分布に基づいて、培養液Cの液面形状を推定する原理について説明する。

[0053] 図3 Iは、位相差画像の一例を示すものであり、図3 IIは、図3 Iに示す位相差画像の一部（四角で囲まれる範囲）の拡大図である。位相差画像においては、図3に示すように、同心円状に明暗のパターン（輝度分布）が形成される。以下、このような明暗パターンが形成される理由を説明する。

[0054] 培養容器60内の培養液Cの液面に形成されたメニスカスの中心部分を透過した照明光は、メニスカスによる屈折の影響をほとんど受けないので、その直接光は位相板32の位相リングに入射されて減光され、その結果、メニスカスの中心部分の位相差画像は周囲より暗い画像となる（図3 IIの矢印Aで示す範囲）。なお、メニスカスの中心部分とは、培養容器60内の液面全体に亘って形成される曲面のことをメニスカスといった場合に、培養容器60の底面に最も近い位置を含むメニスカスの底面の部分のことである。

[0055] そして、メニスカスの中心部分に隣接する曲面部分を透過した照明光は、メニスカスの曲面による屈折の影響を受けるので、その直接光は位相板32の位相リングに入射されずに透明部分を透過する。その結果、曲面部分の位相差画像は、中心部分の位相差画像よりも明るくなる（図3 IIの矢印Bで示す範囲）。ただし、メニスカスの中心部分より外側の曲面部分であっても、その中心部分からの距離がある程度離れた部分を透過した照明光については、メニスカスの曲面によって大きく屈折するので、その直接光は対物レンズ31の外側を通過して入射されなくなり、その結果、暗い位相差画像が形成される（図3 IIの矢印Cで示す範囲）。したがって、上述したような作用によって、位相差画像においては、図3に示すような同心円状の明暗パターンが形成される。

[0056] 位相差画像に現れる明暗パターンは、メニスカスの形状によって変化することから、本実施形態においては、その明暗パターンを用いて、メニスカスの形状、すなわち液面形状を推定する。

[0057] 具体的には、本実施形態においては、既知の光学系のパラメータを用いた幾何光学シミュレーションを行って位相差画像上に現れる明暗パターン（輝度分布）を取得し、その幾何光学シミュレーションによって予め取得された明暗パターンに基づいて、培養液Cの液面形状を推定する。

[0058] 幾何光学シミュレーションについては、たとえば互いに異なる曲率を有する複数の液面形状（メニスカス）のモデルを設定し、その各液面形状のモデルについて、それぞれ入射光の光路ずれを算出し、その光路ずれに基づいて、位相差画像上に現れる明暗パターンを算出する。

[0059] 図4は、メニスカスモデルMに対してリング状照明光Nが入射した場合の光路ずれの算出方法の一例を説明するための図である。なお、図4に示す60aは培養容器のモデルであり、31aは対物レンズのモデルであり、32aは位相板のモデルであり、Aは位相差板モデル32aの位置における平面を表している。図4において空気の屈折率を1とし、培養液のモデルCaの屈折率を水と同じ1.33とすると、スネルの法則から、下式により θ_2 が算出される。

[0060] [数1]

$$\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_{1,2}} = \frac{1.33}{1}$$

$$\theta_{1,2} = \sin^{-1} \left[\frac{\sin \theta_1}{1.33} \right]$$

$$\theta_2 = \theta_1 - \theta_{1,2}$$

同様に、スネルの法則から、下式により θ_3 が算出される。

[0061] [数2]

$$\frac{\sin \theta_2}{\sin \theta_3} = \frac{1}{1.33}$$

$$\theta_3 = \sin^{-1}(1.33 \sin \theta_2)$$

そして、光軸からの光路ずれ Δx は、下式により算出することができる。
 なお、fは、対物レンズモデル31aの焦点距離であり、対物レンズモデル3

1 aの焦点位置は、培養容器モデル60aの底面に合焦しているものとする。

[0062] [数3]

$$\Delta x = f \tan \theta_3$$

また、対物レンズモデル31aにリング状照明光Nが入射する範囲 d_{na} は、下式により算出することができ、図5は、この範囲 d_{na} と平面Aにおける光路ずれ Δx との関係を示す図である。なお、下式におけるNAは対物レンズモデル31aの開口数である。また、図5に示す ϕ_1 および ϕ_2 は、光路ずれがない場合における位相板モデル32aの像の内径および外径を示している。また、図5に示す t_1 および t_2 は、光路ずれが Δx の場合におけるリング状照明光Nの像の内径および外径を示している。

[0063] [数4]

$$d_{na} = f \tan (\sin^{-1} NA)$$

そして、位相差板モデル32aの減光率をND（定数）とすると、平面Aにおける (x, y) の位置毎の透過率 $T(x, y)$ は、下式で表すことができる。

[0064] [数5]

$$T(x, y) = ND \left(\phi_1 < \sqrt{x^2 + y^2} < \phi_2 \text{ のとき} \right)$$

$$T(x, y) = 0 \left(d_{na} < \sqrt{x^2 + y^2} \text{ のとき} \right)$$

$$T(x, y) = 1 \left(\text{others} \right)$$

また、平面Aにおける (x, y) の位置毎の入射光強度 $P(x, y)$ は、下式で表すことができる。

[0065] [数6]

$$P(x, y) = 1 \left(t_1 < \sqrt{(x - \Delta x)^2 + y^2} < t_2 \text{ のとき} \right)$$

$$P(x, y) = 0 \left(\text{others} \right)$$

なお、このとき、入射光強度 $P(x, y)$ をガウス分布で表現してもよく

、その場合は、下式で表すことができる。

[0066] [数7]

$$P(x, y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma^2} \exp \left[-\frac{\left[\sqrt{(x - \Delta x)^2 + y^2} - \frac{t_2 + t_1}{2} \right]^2}{2\sigma^2} \right]$$

以上より、メニスカスモデルMの液面の傾斜が θ_1 のときの平面Aを通過する光の強度の総和 $O(\theta_1)$ は、下式で表すことができる。

[0067] [数8]

$$O(\theta_1) = \iint T(x, y) P(x, y) dx dy$$

上述したような演算に基づく幾何光学シミュレーションを行うことによって、メニスカスモデルMの液面上の各位置を通過した光の強度の分布、すなわち位相差画像の輝度分布を取得することができる。

[0068] なお、図4から明らかなように、位相差画像の位置と液面傾斜 θ_1 の位置とは、わずかに Δx_d だけずれている。したがって、下式を用いて推定位置を補正することによって、高精度に液面形状の推定を行うことができる。

[0069] [数9]

$$\Delta x_d = d \tan \theta_2$$

そして、互いに異なる曲率を有する複数の液面形状のそれぞれの位相差画像の輝度分布が取得され、液面形状推定部54にこれらの輝度分布が予め記憶される。図6は、幾何光学シミュレーションによって取得された位相差画像の輝度分布の一例を示す図である。図6に示す輝度分布は、メニスカスモデルMの中心から培養容器モデル60aの外周に向かって延びる直線上の輝度分布を示したものであり、図6の横軸は、メニスカスモデルMの中心からの距離である。なお、メニスカスモデルMの中心とは、上述したメニスカスの中心部分の中の中央位置のことであり、幾何光学シミュレーションの場合には、培養容器モデル60aの中心位置と同じ位置となる。また、図6に示す縦軸のOD値は、上述した直線上の輝度値を、メニスカスモデルMの中心の輝度値によって規格化した値である。図6に示すように、幾何光学シミュ

レーションによる結果においても、メニスカスの中央部分から外側に向かって明暗パターンが形成される。

[0070] 液面形状推定部54は、互いに異なる曲率を有する複数の液面形状のそれぞれについて、図6に示すような輝度分布を記憶している。具体的には、たとえば曲率 $R = 3$ 、 $R = 4$ 、 $R = 5$ および $R = 6$ に対応する輝度分布を記憶している。

[0071] 一方、液面形状推定部54は、上述した調整光学系20による調整前に撮像部40によって撮像された位相差画像を取得し、その位相差画像の輝度分布を取得する。なお、調整光学系20による調整前の位相差画像の撮像方法としては、調整光学系20の光学特性を初期状態として位相差画像を撮像するようにしてもよいし、調整光学系20を照明光の光路から退避させた状態で位相差画像を撮像するようにしてもよい。調整光学系20の光学特性を初期状態として位相差画像を撮像する場合には、上述した幾何光学シミュレーションにおいてもその初期状態の調整光学系20の光学パラメータが考慮されるものとする。

[0072] 図7は、調整光学系20による調整前に撮像部40によって撮像された位相差画像の一例を示す図である。液面形状推定部54は、図7に示すように、撮像部40によって撮像された位相差画像上において、メニスカスの中心部分から培養容器60の外周に向かって延びる直線Lを設定し、その設定した直線L上の位相差画像の輝度分布を取得する。なお、ここで設定する直線Lの延伸方向と、幾何光学シミュレーションにおいて輝度分布を取得する際に位相差画像上において設定した直線の延伸方向とは同じ方向である。

[0073] また、上述したように位相差画像の輝度分布を取得する前に、位相差画像に対してローパスフィルタ処理などの平滑化処理を施し、その平滑化処理の施された位相差画像の輝度分布を取得してもよい。これにより、細胞由来の輝度変化を取り除くことができ、より高精度に液面形状の推定を行うことができる。

[0074] また、撮像部40によって撮像された位相差画像上において上述した直線

Lを設定する場合、幾何光学シミュレーションの場合と違ってメニスカスがどのように形状で形成されているか不明なので、メニスカスの中心部分を特定する必要がある。なお、実際に培養容器60内の液面に形成されるメニスカスの形状は、培養容器60の種類、培養液Cの量および培養期間などによって異なり、メニスカスの中心部分は必ずしも培養容器60の中心部分と一致する訳ではない。

[0075] そこで、液面形状推定部54は、位相差画像の輝度に基づいて、メニスカスの中心部分を特定する。具体的には、たとえば予め設定された閾値以下の輝度の領域を位相差画像から抽出し、その抽出された領域のうち位相差画像の中央部分に近い円形の領域を特定することによってメニスカスの中心部分を特定する。そして、特定されたメニスカスの中心部分の中の中央位置から外側に向かって延びる直線を設定することによって、図7に示す直線Lを設定する。

[0076] 次に、液面形状推定部54は、幾何光学シミュレーションによって取得された位相差画像の輝度分布と、撮像部40によって撮像された位相差画像の輝度分布との相関関係を求める。具体的には、液面形状推定部54は、予め記憶した曲率 $R=3$ 、 $R=4$ 、 $R=5$ および $R=6$ の液面形状の輝度分布と、撮像部40によって撮像された位相差画像の輝度分布との相関関係をそれぞれ求め、最も相関が高い液面形状の輝度分布を特定する。図8は、曲率 $R=4$ の液面形状の輝度分布G1と、撮像部40によって撮像された位相差画像の輝度分布G2との一例を示す図である。

[0077] 予め記憶した液面形状の輝度分布と、撮像部40によって撮像された位相差画像の輝度分布との相関関係を求める方法としては、たとえば相関関数を用いて、これらの輝度分布の相関関係を求めるようにすればよい。また、相関関数を用いた方法に限らず、たとえば、図8に矢印で示すように、予め記憶した液面形状の輝度分布と撮像部40によって撮像された位相差画像の輝度分布における変曲点を求め、これらの輝度分布の対応する変曲点の輝度値(OD値)の差の合計値を求める。そして、予め記憶した複数の液面形状の

輝度分布のそれぞれについて上述した合計値を求め、その合計値が最も小さい輝度分布を最も相関が高い輝度分布として特定するようにしてもよい。

[0078] そして、液面形状推定部54は、撮像部40によって撮像された位相差画像の輝度分布との相関が最も高い曲率の液面形状を特定し、その特定した曲率の液面形状を培養容器60内の培養液Cの液面形状として推定する。

[0079] 以上が、本実施形態の液面形状推定部54による液面形状の推定についての説明である。

[0080] 図1に戻り、調整情報取得部55は、上述したように液面形状推定部54によって推定された液面形状に基づいて、調整光学系20の光学特性を調整するための調整情報を取得するものである。具体的には、本実施形態の調整情報取得部55は、液面形状推定部54によって推定された液面形状に基づいて、位相差画像の撮像領域内における液面の傾斜角を取得し、その傾斜角と培養液Cの屈折率とに基づいて、撮像領域内における照明光の屈折角を算出する。なお、本実施形態においては、上述したように培養容器60内が照明光によって走査され、培養容器60内を分割した複数の撮像領域毎の位相差画像の撮像が行われるため、その撮像領域毎について、照明光の屈折角が算出される。

[0081] 調整情報取得部55は、各撮像領域内の照明光の屈折角の情報を調整情報として調整光学系制御部51に出力する。

[0082] 調整光学系制御部51は、調整情報取得部55によって算出された照明光の屈折角の情報に基づいて、調整光学系20の光学特性を調整するものである。具体的には、調整光学系制御部51には、撮像領域内の照明光の屈折角と、調整光学系20の調整用光学素子21の調整量とを対応付けたルックアップテーブルが予め設定されている。そして、調整光学系制御部51は、照明光の屈折角の情報に基づいて、上記ルックアップテーブルを参照して調整光学系20の調整用光学素子21の調整量を取得し、その調整量に応じた制御信号を調整光学系駆動部22に出力するものである。なお、調整光学系20の調整用光学素子21の調整量としては、上述したように調整用光学素子

21のX方向、Y方向およびZ方向の位置、屈折力並びに光軸方向などがある。

[0083] 調整光学系制御部51から出力された制御信号は、調整光学系駆動部22に入力され、調整光学系駆動部22は、入力された制御信号に基づいて、調整用光学素子21の屈折力、X方向、Y方向およびZ方向の位置、並びに光軸方向を調整することによって光学特性を調整する。

[0084] なお、複数の調整用光学素子21を交換することによってメニスカスに起因する屈折を調整する場合には、調整情報取得部55は、液面形状推定部54によって推定された液面形状に応じた光学特性を有する調整用光学素子21の種類を特定する情報を調整情報として取得する。調整情報取得部55には、液面形状とその液面形状に対応する調整用光学素子21の種類を特定する情報とが対応づけられたテーブルが予め設定されているものとする。

[0085] そして、調整情報取得部55において取得された調整用光学素子21の種類を特定する情報は、調整光学系制御部51に出力され、調整光学系制御部51は、入力された情報に基づいて、液面形状に応じた調整用光学素子21に自動的に切り替える。なお、調整用光学素子21の種類を特定する情報を表示装置70に表示させてユーザに報知させることによって、ユーザが手動で調整用光学素子21を交換するようにしてもよい。

[0086] 結像光学系制御部52は、結像光学系駆動部34を駆動制御することによって対物レンズ31をZ方向に移動させるものである。具体的には、本実施形態の結像光学系制御部52は、位相差画像を撮像する際、結像光学系駆動部34によって対物レンズ31をZ方向へ移動させることによってオートフォーカス制御するものである。

[0087] ステージ制御部53は、ステージ駆動部62を駆動制御することによってステージ61をX方向、Y方向およびZ方向に移動させるものである。ステージ制御部53は、上述したようにステージ61をX方向およびY方向に移動させることによって、培養容器60内を照明光で走査し、培養容器60内（たとえば、1つのウェル内）で分割された複数の撮像領域毎の位相差画像

を撮像するものである。

- [0088] また、顕微鏡制御装置 50 には、入力装置 80 と表示装置 70 とが接続されている。入力装置 80 は、キーボードやマウスなどの入力デバイスを備えたものであり、ユーザによる設定入力を受け付けるものである。
- [0089] 表示装置 70 は、液晶ディスプレイなどの表示デバイスから構成されるものであり、撮像部 40 において撮像された位相差画像などを表示するものである。なお、表示装置 70 をタッチパネルで構成し、表示装置 70 が入力装置を兼ねてもよい。
- [0090] 次に、本実施形態の顕微鏡システムの作用について、図 9 に示すフローチャートを参照しながら説明する。
- [0091] まず、観察対象 S および培養液 C が收容された培養容器 60 がステージ 61 上に設置される。そして、まず、調整光学系 20 による調整前の観察対象 S の位相差画像が撮像され、液面形状推定部 54 によって取得される (S10)。
- [0092] 液面形状推定部 54 は、上述したように調整前の位相差画像上において、メニスカスの中心部分から培養容器 60 の外周に向かって延びる直線 L を設定し、その設定した直線 L 上の位相差画像の輝度分布を取得する (S12)。
- [0093] そして、液面形状推定部 54 は、その調整前の位相差画像の輝度分布と、予め記憶された曲率 $R=3$ 、 $R=4$ 、 $R=5$ および $R=6$ の液面形状の輝度分布との相関関係をそれぞれ求め、調整前の位相差画像の輝度分布と最も相関が高い液面形状の輝度分布を特定し、その特定した液面形状を培養容器 60 内の培養液 C の液面形状として推定する (S14)。
- [0094] 液面形状の推定結果は調整情報取得部 55 に出力され、調整情報取得部 55 は、推定された液面形状に基づいて、調整光学系 20 の光学特性を調整するための調整情報を取得する (S16)。
- [0095] そして、調整情報取得部 55 によって取得された調整情報は調整光学系制御部 51 に出力され、調整光学系制御部 51 は、入力された調整情報に基づ

いて、調整光学系20の光学特性を調整する(S18)。

[0096] そして、上記のようにして調整光学系20の光学特性が調整されて、これにより培養液Cの液面に形成されたメニスカスによる屈折の影響が取り除かれた後、再び観察対象Sの位相差画像が撮像部40によって撮像される(S20)。

[0097] 撮像部40によって撮像された位相差画像は表示装置70に出力され、表示装置70によって表示される。

[0098] 上記実施形態の顕微鏡システムによれば、観察用の位相差画像を撮像する撮像部40によって撮像された位相差画像の輝度分布に基づいて、培養容器60内の培養液Cの液面形状を推定するようにしたので、液面形状を推定するための新たな測定系を設けることなく、培養容器60内の培養液Cの液面形状を推定することができる。そして、その推定した液面形状に基づいて、調整光学系20の光学特性を調整し、その後、観察対象の位相差画像の撮像を行うようにしたので、メニスカスの影響を抑制した位相差画像を撮像することができる。

[0099] なお、上記実施形態においては、液面形状の推定を行う際、撮像部40によって撮像された位相差画像上において、メニスカスの中心部分から培養容器60の外周に向かって延びる1本の直線Lを設定し、その直線L上の輝度分布を位相差画像全体の輝度分布を代表するものとして用いるようにしたが、メニスカスの中心部分から外周に向かって延びる直線を複数本設定するようにしてもよい。すなわち、培養容器60内に形成されるメニスカスは、必ずしもその中心から培養容器60内の外周に向かう各方向について、全て同じ曲率で形成されているとは限らない。

[0100] したがって、たとえば、図10に示すように、メニスカスの中心部分から外周に向かって延びる8本の直線L1~L8を設定し、その直線毎の輝度分布を取得するようにしてもよい。そして、直線毎の輝度分布に対応する液面形状の曲率を求めることによって、8方向についてそれぞれ液面形状の曲率を求めるようにしてもよい。これにより、液面形状をより高精度に推定する

ことができる。

[0101] このように複数の方向について液面形状の曲率を求めるようにした場合には、これらの曲率の平均値または最頻値などを代表値として求め、その代表値の曲率に基づいて、調整光学系20の調整情報を取得してもよい。または、各方向について求められた曲率を用いて、その方向毎に分割された領域毎について調整光学系20の調整情報を取得してもよい。方向毎の領域の分割方法としては、たとえば各方向に延びる直線をそれぞれ円弧の中心に含む扇形の領域に分割するようにすればよい。

[0102] また、上記実施形態においては、液面形状を推定する際、液面形状が球形に近いことを前提に、液面形状の曲率 R を求めるようにしたが、たとえば培養容器60の大きさによってメニスカスの平坦な底面部分が大きくなるので、液面形状は球形にならず、液面形状の推定精度が下がる可能性がある。そこで、以下のようにして、液面形状を推定してもよい。

[0103] まず、幾何光学シミュレーションを用いて、図11に示すような、位相差画像の輝度値 $P(x)$ と、液面の傾斜角 θ とを対応づけたプロファイルを取得する。輝度値 $P(x)$ は、メニスカスモデル M の中心部分から培養容器60aの外周までの間の各位置 x における輝度値を表している。また、液面の傾斜角 θ とは、図4に示す傾斜角 θ_1 である。なお、図11に示すプロファイルは、上記実施形態における演算結果を用いて取得することができる。

[0104] 次に、上記実施形態と同様に、撮像部40によって撮像された位相差画像を取得し、メニスカスの中心部分の輝度値が1となるように位相差画像を規格化し、その規格化された位相差画像に対して平滑化処理を施して細胞由来の高周波ノイズを除去する。

[0105] そして、その平滑化処理の施された位相差画像上において、図12に示すようにメニスカスの中心部分から外周に向けて延びる直線を設定し、その直線上をメニスカスの中心から走査して各位置 x_1, x_2, \dots, x_n における輝度値を取得する。そして、図11に示したプロファイルを用いて、各位置 x の輝度値 $P(x)$ に対応する液面の傾斜角 θ を求める。これにより、図1

2に示す直線上の各位置における液面の傾斜角 θ を求めることができ、上記直線上の液面の形状を推定することができる。

[0106] なお、図11に示すプロファイルを用いて液面の傾斜角 θ を求める際、図13に示すように同一の輝度値 $P(x)$ （図13に示す例では1.5）に対して2つの傾斜角 θ が求まる場合がある。したがって、上述したようにメニスカスの中心から順に輝度値を取得して、その輝度値に対応する傾斜角 θ を順次求める場合には、メニスカスの中心から離れるほど液面の傾斜角は大きくなるものとし、傾斜角 θ の候補が複数ある場合には、最も小さい傾斜角 θ を先に選択するようにすればよい。

[0107] また、上記実施形態の顕微鏡システムにおいては、液面上に形成されたメニスカスに起因する照明光の屈折の影響を取り除くために調整用光学素子21を設けるようにしたが、必ずしもこのような調整用光学素子21を設けなくてもよく、たとえば、調整情報に基づいて、スリット板12をX方向およびY方向に移動させたり、位相板32をX方向およびY方向に移動させたりして、メニスカスに起因する照明光の屈折の影響を取り除くようにしてもよい。すなわち、本発明における調整光学系として、スリット板12や位相板32を用いるようにしてもよい。

[0108] また、上記実施形態の顕微鏡システムにおいては、調整用光学素子21をコンデンサレンズ13と培養容器60との間に設けるようにしたが、調整用光学素子21の位置はこの位置に限らず、たとえば白色光源11とスリット板12との間、位相板32とコンデンサレンズ13との間、および培養容器60と対物レンズ31との間などその他の位置に設けるようにしてもよい。

符号の説明

- [0109] 10 照明光照射部
11 白色光源
12 スリット板
12a スリット板モデル
13 コンデンサレンズ

- 1 3 a コンデンサレンズモデル
- 2 0 調整光学系
- 2 1 調整用光学素子
- 2 2 調整光学系駆動部
- 3 0 結像光学系
- 3 1 対物レンズ
- 3 1 a 対物レンズモデル
- 3 2 位相板
- 3 2 a 位相板モデル
- 3 3 結像レンズ
- 3 4 結像光学系駆動部
- 4 0 撮像部
- 5 0 顕微鏡制御装置
- 5 1 調整光学系制御部
- 5 2 結像光学系制御部
- 5 3 ステージ制御部
- 5 4 液面形状推定部
- 5 5 調整情報取得部
- 6 0 培養容器
- 6 0 a 培養容器モデル
- 6 1 ステージ
- 6 2 ステージ駆動部
- 7 0 表示装置
- 8 0 入力装置
- C 培養液
- C a 培養液モデル
- G 1 輝度分布
- G 2 輝度分布

- L 直線
- L 1 - L 8 直線
- M メニスカスモデル
- N リング状照明光
- P 観察対象設置面

請求の範囲

- [請求項1] 液体および観察対象が収容された容器に対して位相差計測用の照明光を照射する照明光照射部と、
前記照明光を照射した前記観察対象を撮像する撮像部と、
前記容器内の液体の液面形状に起因する前記照明光の屈折を調整する調整光学系と、
前記撮像部によって撮像された前記観察対象の位相差画像の輝度分布に基づいて、前記容器内の液体の液面形状を推定する液面形状推定部と、
前記液面形状推定部によって推定された液面形状に基づいて、前記調整光学系の光学特性を調整するための調整情報を取得する調整情報取得部とを備えたことを特徴とする位相差顕微鏡。
- [請求項2] 前記調整情報取得部によって取得された調整情報に基づいて、前記調整光学系の光学特性を調整する調整光学系制御部を備えた請求項1記載の位相差顕微鏡。
- [請求項3] 前記液面形状推定部が、予め設定された液面形状を用いて幾何光学シミュレーションを行って取得された位相差画像の輝度分布に基づいて、前記容器内の液体の液面形状を推定する請求項1または2記載の位相差顕微鏡。
- [請求項4] 前記液面形状推定部が、互いに異なる曲率を有する、予め設定された複数の液面形状を用いてそれぞれ幾何光学シミュレーションを行って取得された複数の位相差画像の輝度分布に基づいて、前記容器内の液体の液面形状を推定する請求項3記載の位相差顕微鏡。
- [請求項5] 前記液面形状推定部が、前記幾何光学シミュレーションを用いて取得された位相差画像の輝度分布と前記撮像部によって撮像された位相差画像の輝度分布との相関関係を求めることによって、前記容器内の液体の液面形状を推定する請求項3または4記載の位相差顕微鏡。
- [請求項6] 前記液面形状推定部が、相関関数を用いて前記相関関係を求める請

求項5記載の位相差顕微鏡。

[請求項7] 前記液面形状推定部が、前記幾何光学シミュレーションを用いて取得された位相差画像の輝度分布における変曲点の輝度値と前記撮像部によって撮像された位相差画像の輝度分布における変曲点の輝度値とに基づいて、前記相関関係を求める請求項5記載の位相差顕微鏡。

[請求項8] 前記液面形状推定部が、前記撮像部によって撮像された位相差画像上において、前記容器内に形成されるメニスカスの中心部分から前記容器の外周に向かって延びる少なくとも一つの直線を設定し、該設定した直線上の前記位相差画像の輝度分布に基づいて、前記容器内の液体の液面形状を推定する請求項1から7いずれか1項記載の位相差顕微鏡。

[請求項9] 前記液面形状推定部が、互いに異なる複数の方向に延びる前記直線を設定し、該複数の直線上の位相差画像の輝度分布に基づいて、前記容器内の液体の液面形状を推定する請求項8記載の位相差顕微鏡。

[請求項10] 前記液面形状推定部が、前記撮像部によって撮像された位相差画像に対して平滑化処理を施し、該平滑化処理の施された位相差画像の輝度分布に基づいて、前記容器内の液体の液面形状を推定する請求項1から9いずれか1項記載の位相差顕微鏡。

[請求項11] 液体および観察対象が収容された容器に対して位相差計測用の照明光を照射して、前記観察対象の位相差画像を撮像し、

該撮像した位相差画像の輝度分布に基づいて、前記液体の液面形状を推定し、

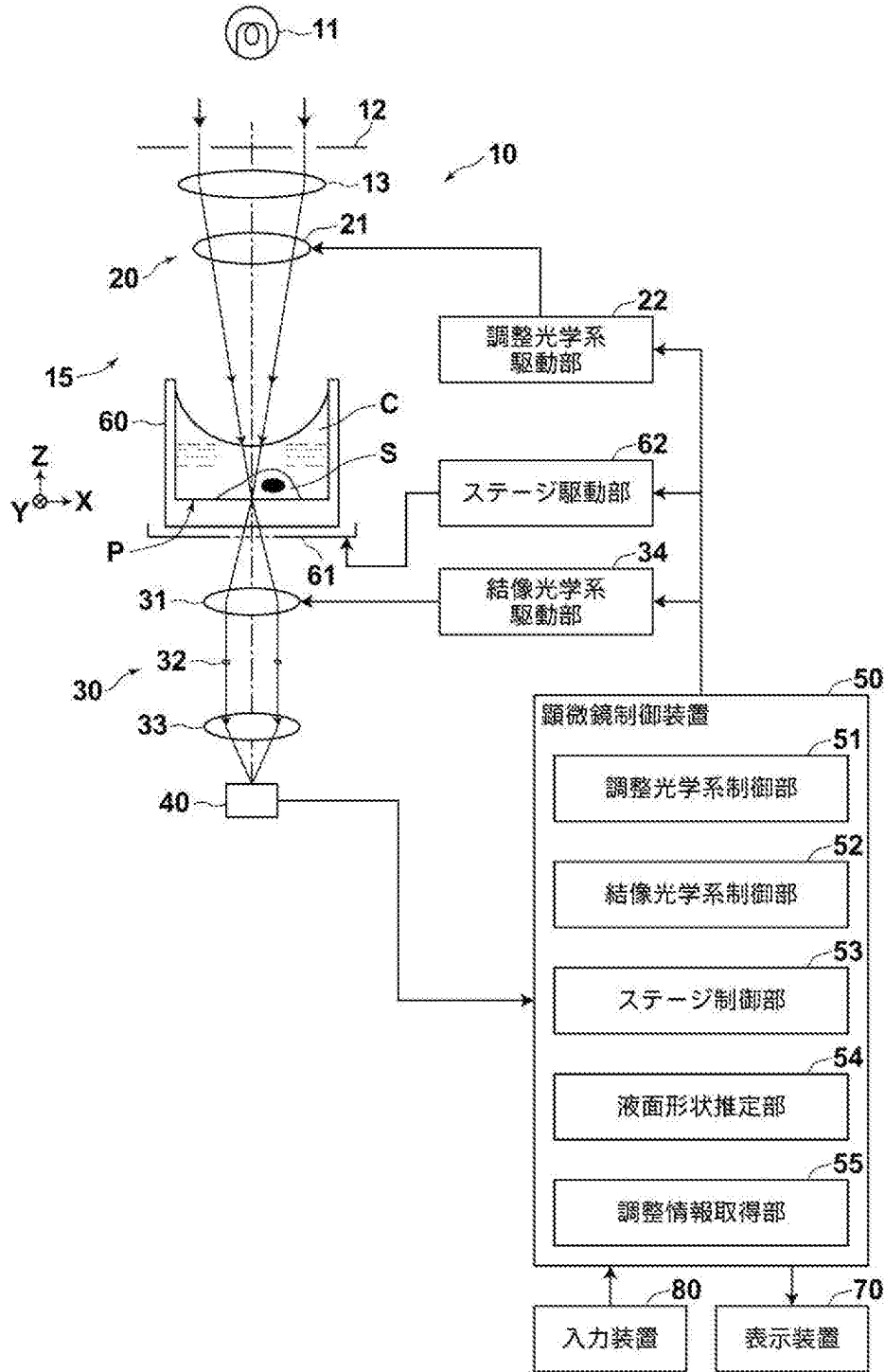
前記推定した液面形状に基づいて、前記容器内の液体の液面形状に起因する光の屈折を調整する調整光学系の光学特性を調整するための調整情報を取得し、

該調整情報に基づいて、前記調整光学系の光学特性が調整された後、前記容器に対して前記照明光を照射し、

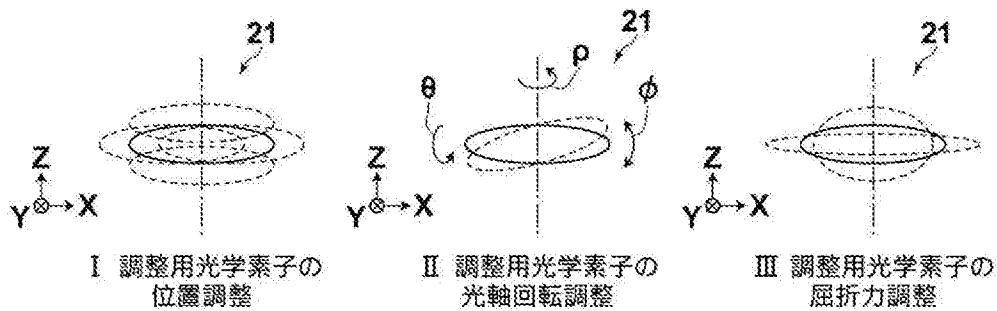
前記照明光を照射した前記観察対象を撮像することを特徴とする撮

像方法。

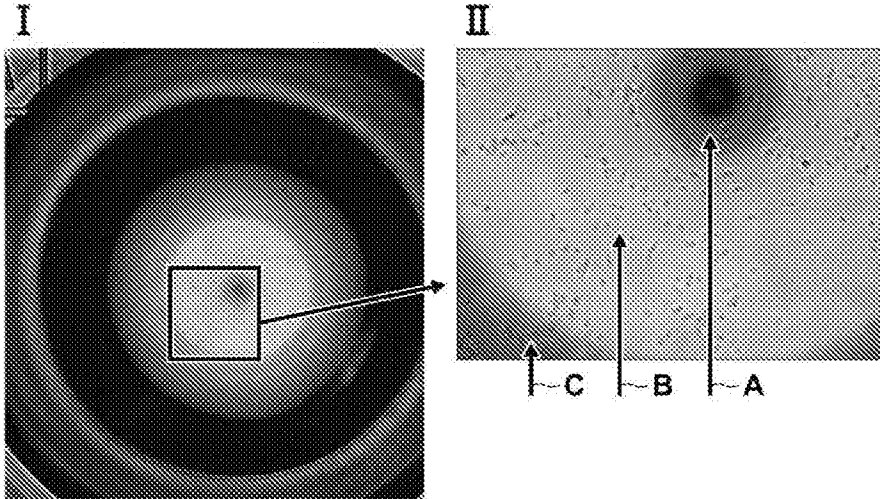
[図1]



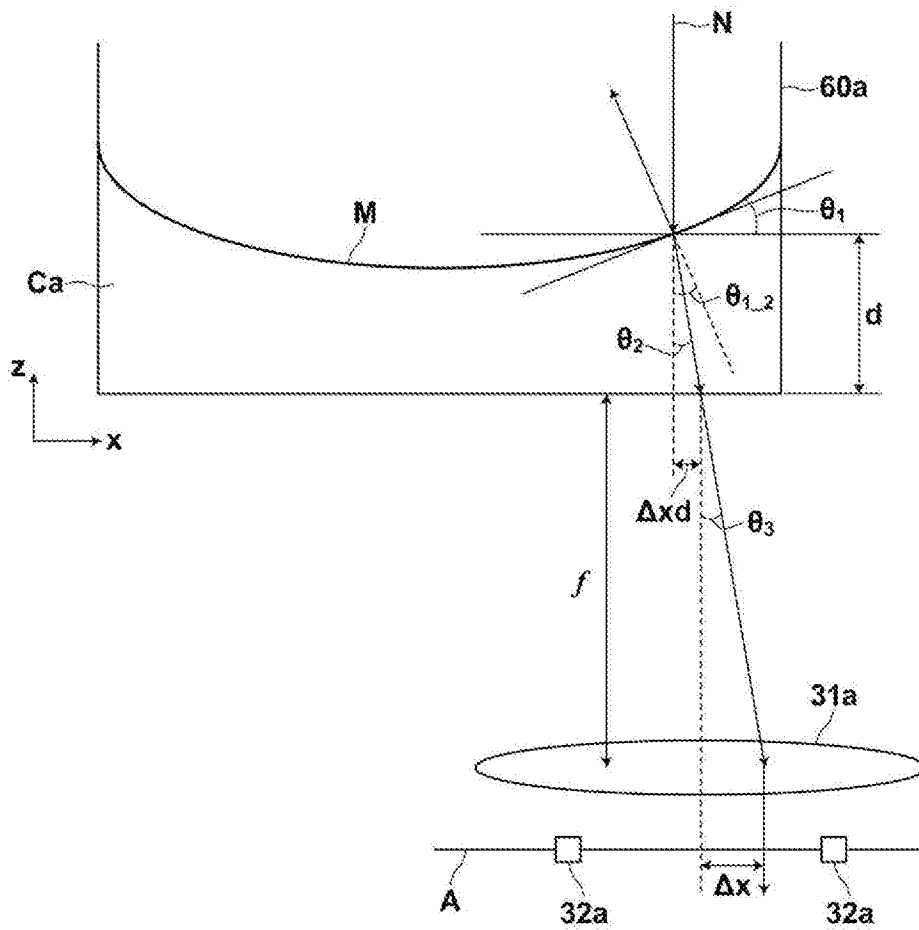
[図2]



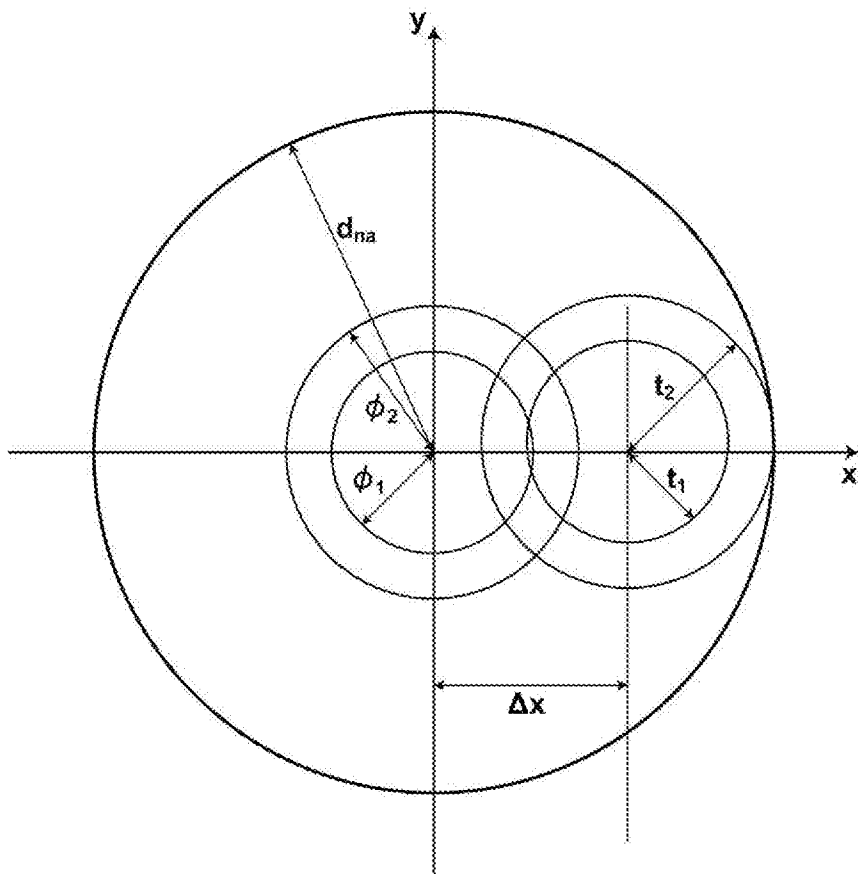
[図3]



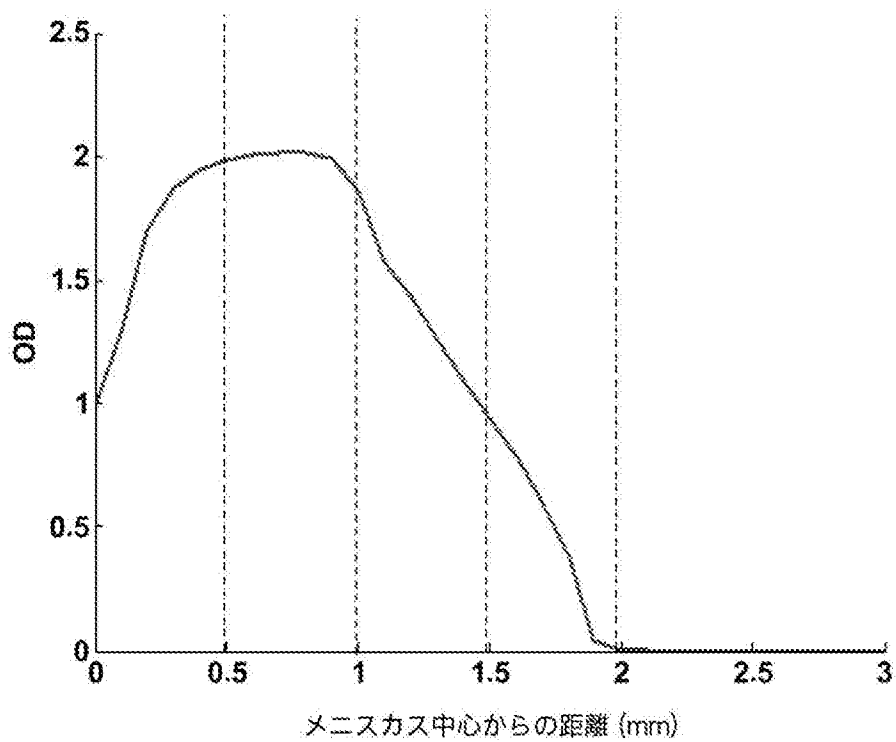
[図4]



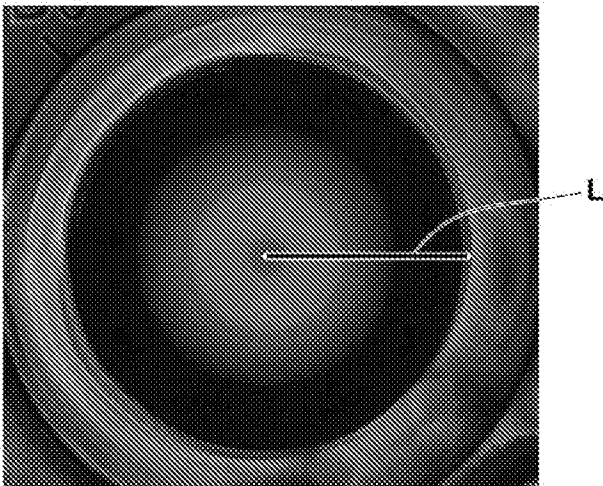
[図5]



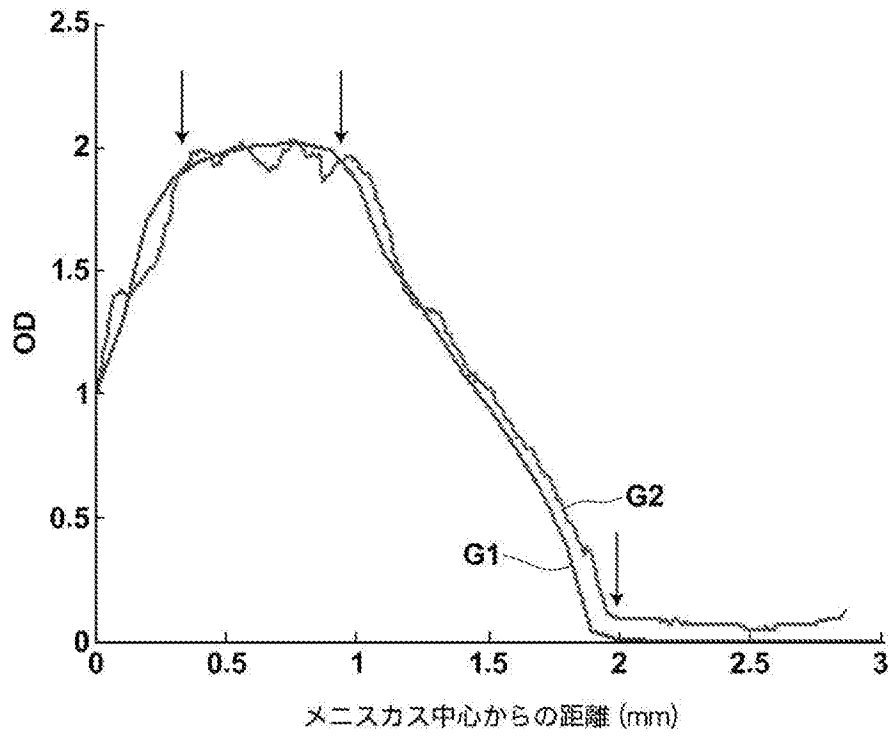
[図6]



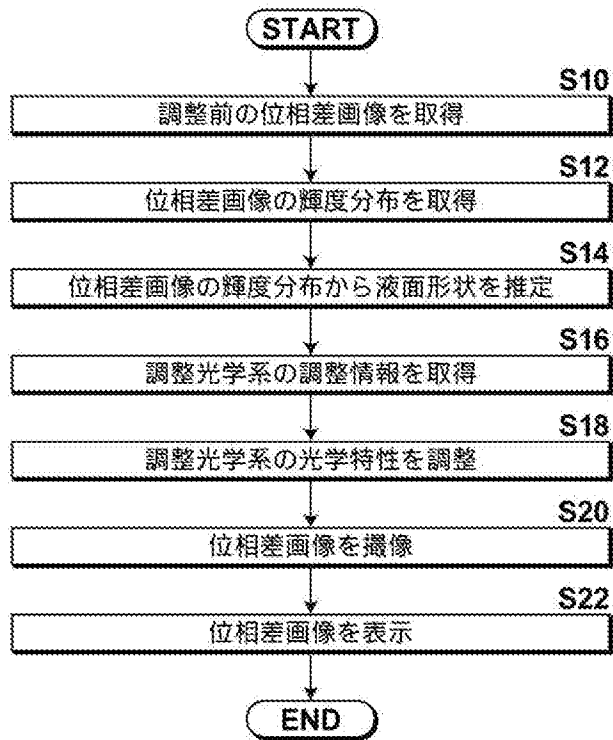
[図7]



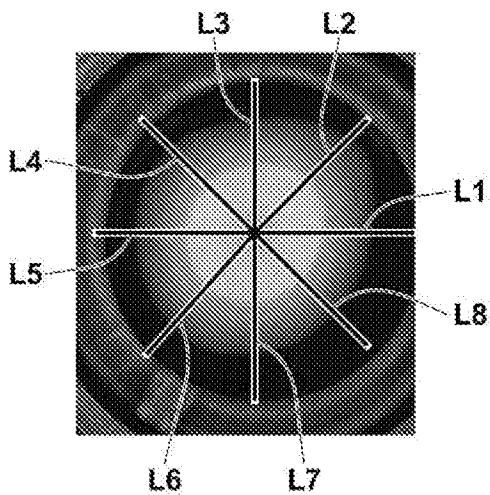
[図8]



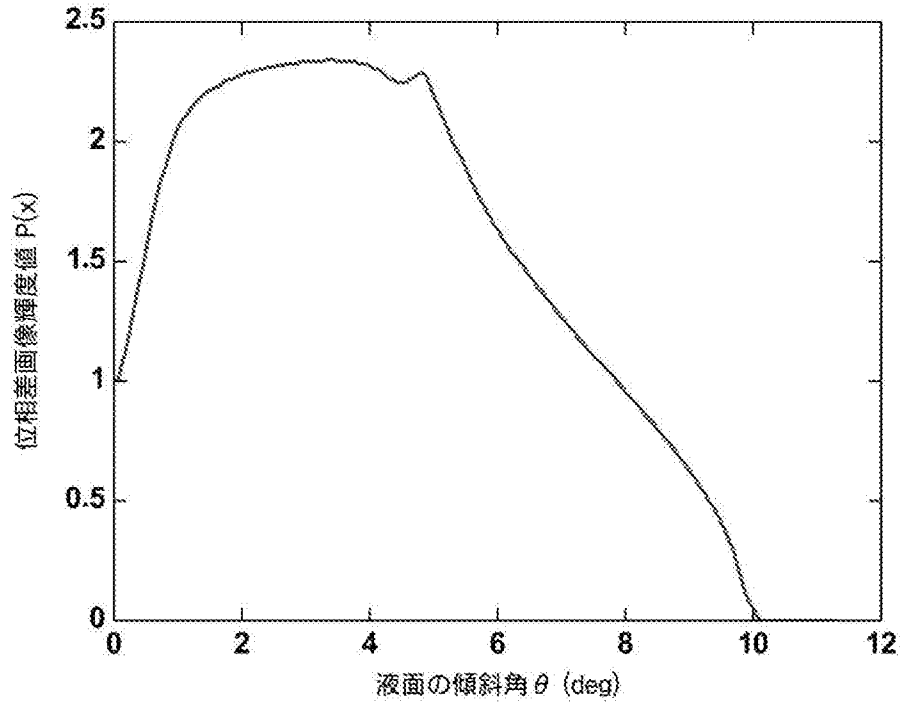
[図9]



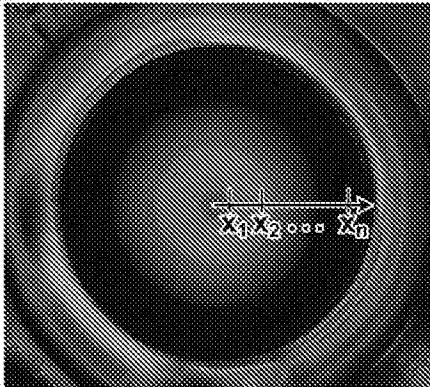
[図10]



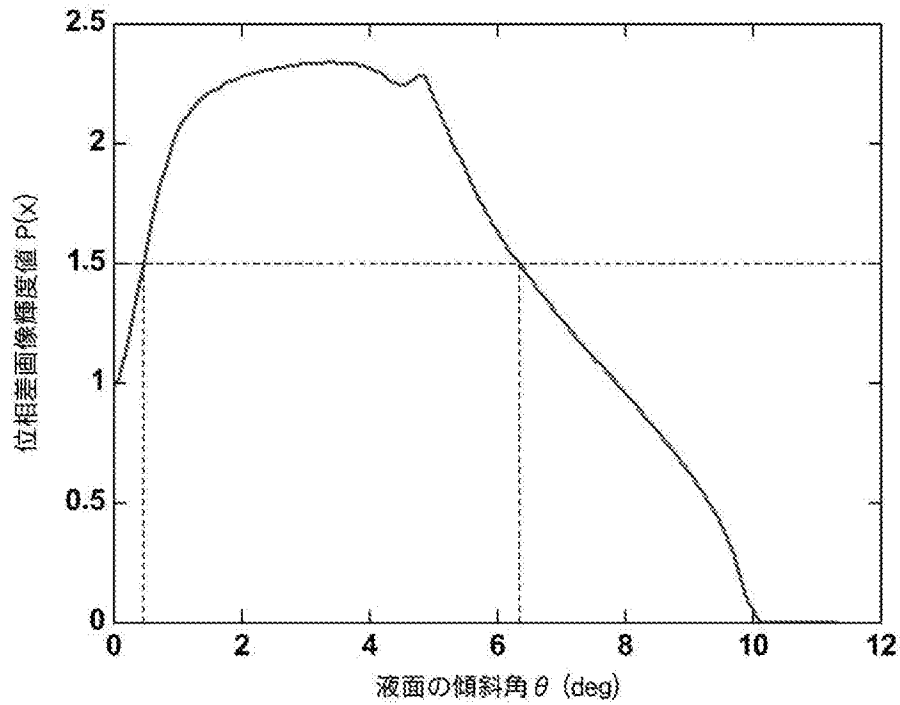
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/005128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G02B21/06(2006.01) i, G02B21/36(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)
G02B21/06, G02B21/36

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2012-13888 A (Nikon Corp.), 19 January 2012 (19.01.2012), paragraphs [0015] to [0041] (Family: none)	1-6, 8, 10-11 7, 9
A	JP 2012-73591 A (Olympus Corp.), 12 April 2012 (12.04.2012), paragraphs [0037] to [0154]; fig. 8 & US 2012/0057013 A1 paragraphs [0058] to [0191]; fig. 8	1-11

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 24 April 2017 (24.04.17)	Date of mailing of the international search report 09 May 2017 (09.05.17)
---	--

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/JP2017/005128

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0047845 A1 (STEMCELL TECHNOLOGIES INC.), 25 February 2010 (25.02.2010), paragraphs [0005] to [0013] & WO 2008/104063 A1 & EP 2140267 A1 & CA 2675495 A & CN 101652660 A & CN 105779276 A	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G02B21/06(2006.01)i, G02B21/36(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. G02B21/06, G02B21/36

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)

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	JP 2012-13888 A (株式会社ニコン) 2012.01.19, [0015]-[0041] (ファミリーなし)	1-6, 8, 10-11
A		7, 9
A	JP 2012-73591 A (オリンパス株式会社) 2012.04.12, [0037]-[0154]、 図 8 & US 2012/0057013 A1, [0058]-[0191] FIG. 8	1-11

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

24.04.2017

国際調査報告の発送日

09.05.2017

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)

瀬戸 息吹

2V

5362

電話番号 03-3581-1101 内線 3271

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	US 2010/0047845 A1 (STEMCELL TECHNOLOGIES INC.) 2010.02.25, [0005]-[0013] & WO 2008/104063 A1 & EP 2140267 A1 & CA 2675495 A & CN 101652660 A & CN 105779276 A	1-11